

49807

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENZİME DAYALI ELEKTROKİMYASAL
BİYOSENSÖRLERİN MEDİYATÖR
KULLANARAK TASARIMI**

Analitik Kimya Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eczacı M. Emrah KILINÇ

49807

Danışman Öğretim Üyesi : Doç. Dr. M. E. ŞENGÜN ÖZSÖZ

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM BAKANLIĞI
DOKÜMANTASYON MERKEZİ
İZMİR/1996**

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tez çalışmalarım boyunca benden bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen , destek olan yüksek lisans öğrenimimi tamamladığım Analitik Kimya A.B.D öğretim görevlilerinden başta danışmanım sayın hocam Doç. Dr. Şengün Özsöz , Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü Başkanı, Analitik Kimya A.B.D Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Aycıl Kayalı ve Analitik Kimya A.B.D 'nın öğretim görevlisi tüm hocalarıma, kürsüdeki araştırma görevlisi iş arkadaşlarıma, Çalışmalarımı hem literatür hem de kimyasal madde açısından destekleyen Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Beyin Cerrahi A.B.D. öğretim üyesi Doç. Dr. Tayfun Dalbastı 'ya, tezimin yazım aşamasında geniş bilgisayar bilgisiyle hep yanımda olan arkadaşım Uzm. Ecz. Mehmet Ali Ege 'ye, tüm sıcaklığıyla somurtgan oğullarına kucak açan aileme ve tabii ki SANA teşekkürü borç bilirim,

Ecz. M. Emrah Kılınç

1. İÇİNDEKİLER

1. İÇİNDEKİLER.....	1
2. BÖLÜM I.....	3
2.1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2.2 GENEL BİLGİLER.....	8
2.2.1 TANIM.....	8
2.2.2 İDEAL BİYOSENSÖR.....	9
2.2.2.1 SEÇİCİLİK.....	10
2.2.2.2 KULLANIM ÖMRÜ.....	10
2.2.2.3 KALİBRASYON GEREKSİNİMİ.....	10
2.2.2.4 TEKRARLANABİLİRLİK.....	11
2.2.2.5 STABİLİTE.....	11
2.2.2.6 YÜKSEK DUYARLILIK.....	11
2.2.2.7 YETERLİ DÜZEYDE TAYİN SINIRI.....	12
2.2.2.8 GENİŞ ÖLÇÜM ARALIĞI.....	12
2.2.2.9 HIZLI CEVAP ZAMANI.....	12
2.2.2.10 HIZLI GERİYE DÖNME ZAMANI.....	13
2.2.2.11 BAŞTILIK VE UCUZLUK.....	13
2.2.2.12 KÜÇÜLTÜLEBİLİRLİK VE STERİLİZE EDİLEBİLİRLİK.....	14
2.2.3 TARİHÇE.....	14
2.2.4 YÖNTEMLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER.....	15
2.2.4.1 AMPEROMETRİ.....	15
2.2.4.1.1 KRONOAMPEROMETRİ.....	16
2.2.4.1.2 HİDRODİNAMİK AMPEROMETRİ.....	17
2.2.4.1.2.1 AMPEROMETRİK GLUKOZ BİYOSENSÖRLERİ.....	19
2.2.4.1.2.1.1 BİRİNCİ KUŞAK GLUKOZ BİYOSENSÖRLERİ.....	20
2.2.4.1.2.1.2 İKİNCİ KUŞAK GLUKOZ BİYOSENSÖRLERİ.....	20
2.2.4.1.2.1.3 ÜÇÜNCÜ KUŞAK GLUKOZ BİYOSENSÖRLERİ.....	21
2.2.4.2 SIKLIK VOLTAMETRİ(CV).....	23
3. BÖLÜM II.....	25
3.1 DENEYSEL KISIM.....	25
3.1.1 KULLANILAN MADDELER VE GEREÇLER.....	25
3.1.1.1 O-FENİLEN DİAMİN (OFD).....	25
3.1.1.2 GLUKOZ OKSİDAZ.....	26
3.1.1.3 β-D-GLUKOZ.....	26
3.1.1.4 ÜRİK ASİT.....	27
3.1.1.5 L-ASKORBİK ASİT.....	28
3.1.1.6 β-D-FRUKTOZ.....	28
3.1.1.7 ÜRE.....	29
3.1.1.8 PARASETAMOL.....	30
3.1.1.9 PLATİN MİKRO ELEKTROT.....	30
3.1.1.10 POTASYUM DİHİDROJEN FOSFAT.....	30
3.1.1.11 DİPOTASYUM HİDROJEN FOSFAT.....	31
3.1.1.12 SÜLFÜRİK ASİT ÇÖZELTİSİ.....	31
3.1.1.13 RODYUM ATOMİK ABSORPSİYON STANDART ÇÖZELTİSİ.....	32
3.1.2 YÖNTEM.....	32
3.1.2.1 KULLANILAN ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANIŞI.....	32
3.1.2.1.1 GLUKOZ ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANIŞI.....	32
3.1.2.1.2 O-FENİLEN DİAMİN (OFD) ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANIŞI.....	33
3.1.2.1.3 FOSFAT TAMPONUNUN HAZIRLANIŞI.....	33
3.1.2.1.4 H ₂ SO ₄ ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANIŞI.....	33
3.1.2.2 ELEKTROT HAZIRLANMASI.....	33
3.1.2.2.1 PLATİN MİKROELEKTROTLARIN HAZIRLANIŞI.....	33
3.1.2.2.2 PLATİN MİKROELEKTROTLARIN ÖN TEMİZLİĞİ (PRECONDITIONING).....	34
3.1.2.2.3 PLATİN MİKROELEKTROTLARIN DIŞ YÜZEYİNE RODYUM KAPLANMASI.....	34
3.1.2.2.4 PLATİN MİKROELEKTROTLARA ENZİMİN POLİMER ARACILIĞIYLA İMMOBİLİZASYONU.....	35
3.1.2.3 ÖLÇÜM İŞLEMLERİ.....	35
3.1.2.3.1 AKIM-ZAMAN EĞRİLERİNİN ELDE EDİLMESİ.....	35

3.1.2.3.2 KALİBRASYON EĞRİSİNİN ELDE EDİLMESİ.....	36
3.1.3 KULLANILAN CİHAZLAR.....	36
4. BÖLÜM III.....	37
4.1 BULGULAR.....	37
4.1.1 AKIM-ZAMAN EĞRİSİNİN YORUMLANMASI.....	37
4.1.2 KALİBRASYON EĞRİSİNİN YORUMLANMASI.....	38
4.1.3 SIKLIK VOLTAMOGRAMLARIN YORUMLANMASI.....	40
4.1.4 GİRİŞİM YAPABİLECEK MADDELERİN (INTERFERANSLARIN) İNCELENMESİ.....	42
4.1.5 RODYUM KAPLAMA İŞLEMİNİN ENZİM KAPLAMANMASINDAN SONRA YAPILMASININ CEVABA ETKİSİ.....	44
4.1.6 METAL ELEKTRİKSEL KAPLAMA POTANSİYELİNİN CEVABA ETKİSİ.....	45
4.1.7 ELEKTROT STABİLİTESİNİN İNCELENMESİ.....	46
5. BÖLÜM IV.....	48
5.1 TARTIŞMA VE SONUÇ.....	48
5.1.1 TARTIŞMA.....	48
5.1.2 SONUÇ.....	50
5.2 ÖZET.....	53
5.3 SUMMARY.....	54
5.4 KAYNAKLAR.....	55
5.5 ÖZGEÇMİŞ.....	60



2. BÖLÜM I

2.1 GİRİŞ VE AMAÇ

Biyosensörler, kısa geçmişlerine rağmen günümüzde giderek artan ilgiyle pek çok çalışmaya konu olmaktadır. Biyosensörler, kelime bazında “biyo” (= biyolojik kökenli) ve “sensör” (= algılayıcı) kelimelerinden oluşmaktadır. Tanım olarak ise biyosensörler : *“Birbiri içine geçmiş bir tanesi biyokimyasal diğeri elektrokimyasal iki çeviriciden oluşmuştur. Biyokimyasal çevirici analizlenecek madde ile etkileşerek onu tanır. Bu etkileşme sonucunda oluşan madde (biyokimyasal ürün), elektrokimyasal çevirici tarafından okunabilir bir sayısal değere çevrilir. Bu ilke çerçevesinde nitel ve nicel analiz yapabilen kompleks cihazlara BİYONSENSÖR adı verilmiştir..”* şeklinde ifade edilebilir. Literatürde yer alan diğer biyosensör tanımlarında yukarıda yapılan tanıma benzemektedir(1-5).

Biyosensör uygulamaları içerisinde amperometrik uygulamalar oldukça geniş yer tutmaktadır. Amperometrik elektroda sahip bir biyosensör ile herhangi bir maddenin miktar tayininin yapılabilmesi için o maddenin ya da enzimatik olarak o maddeden oluşturulan ürünün elektroaktif olması gereklidir.

Üzerinde ençok çalışılan konulardan biride amperometrik glukoz biyosensörleridir(6-29). Amperometrik glukoz çalışmalarında kullanılan elektrotlar çapları genelde 5-6mm olan *“glassy-carbon elektrotlar(24)”* veya *“karbon pastası elektrotları(30)”* dir. Bu tip elektrotlar genellikle cam bir muhafaza içerisine iletken bir materyalin (İletken reçine veya grafit tozu ve mineral yağı) yerleştirilmesiyle hazırlanmışlardır. Daha sonraları glukoz elektrotlarının in vivo kullanımlarına olanak sağlamak için elektrotlarının çaplarının küçültülmesine çalışılmıştır(31). Bugün için çapları 50-500µm arası olan mikroeletrot(31) veya ultramikroeletrot(31) olarak

adlandırılan ve çapları $<50\mu\text{m}$ olan değişik maddelerden yapılmış elektrotlarla gerçekleştirilmiş çalışmalar mevcuttur(32). Elektrotların çapını küçültmede nanoelektrot aşamasına da ulaşılmıştır. Nanoelektrot denilen bu elektrotlar altın disklerden yapılmış olup çapları 10 - 30 nm ($0.01\mu\text{m} - 0.03 \mu\text{m}$) arasında değişmektedir. Bu elektrotların hazırlanmasında yaklaşık 10 nm çapında deliklere sahip filtrasyon membranlarının deliklerinin içerisine elektriksel kaplama yöntemiyle(elektrodepozisyon) metalik altın kaplaması yapılmıştır. Electrodeposition yönteminde altın tuzu çözeltisine negatif potansiyel uygulanarak metalik altının kaplanması sağlanmıştır. Bu şekilde dolan deliklerden 10 nm çapında disk şeklinde altın elektrotlar oluşmuştur(33).

Amperometrik glukoz çalışmalarında kullanılan mikroelektrotların yapımında karbon fiber(12,17,20,21), μm boyutunda platin tel(7,8,10,16,19), platin-iridyum tel(22) ve altın tel(9), gibi maddeler kullanılmıştır.

Amperometrik glukoz çalışmalarında tayin ilkesi glukoz oksidaz enzimi tarafından biyolojik ürün olarak oluşturulan H_2O_2 'nin belirli bir çalışma potansiyelinde oksidasyona uğratılması sonucu oluşan anodik(oksidatif) akımın kaydedilmesidir. H_2O_2 'nin amperometrik olarak tayin edilebilmesi için gerekli potansiyel 600-700 mV aralığıdır(18) . Değişik çalışma potansiyellerinde yapılmış çalışmalar TABLO 1 'de gösterilmiştir :

TABLO 1 : Çeşitli çalışma potansiyellerinde yapılmış amperometrik çalışmalar

ÇALIŞMALAR	E(mV)	ÇALIŞMALAR	E (mV)
Elisabeth Csöregi et al(20)	0.0	Joseph Wang et al(12) Cosimino Malitesta et al(31) Guy Fortier et al(36) John P. Lowry et al(11)	650
Wlodzimierz Kutner et al(19)	300	Maya Snejdarkova et al(23)	670
Dario Compagnone et al(34)	400	Zhisheng Sun et al(26) John P. Lowry et al(10)	700
Yanan Zhang et al(18) Rajesh Vaidya et al(35) Rathbun K. Rhodes et al(16)	600	Philip N. Bartlett et al(37)	900

Uygulama potansiyelinin yüksek bir değer olması çeşitli sakıncalarında beraberinde getirir.

Bunların en önemlisi ortamda bulunan çeşitli safsızlıkların girişim etkisinde belirgin bir artış gözlenmesidir. Bu girişimleri gidermenin çeşitli yöntemleri vardır :

1) Çalışma elektroduna immobilize edilmiş enzim tabakasının üzerini negatif yüklü bir membran ile kaplayarak, kanda urat, askorbat gibi negatif yüklü katyonları halinde bulunan askorbik asit, ürik asit ve bunun gibi girişim yapan maddelerin enzim tabakasına ulaşması engellenebilir. Bu sayede okunacak yanıt akımında hata gözlenmesi olasılığı ortadan kaldırılmış olur(38).

2) Çalışmalarda aynı anda iki adet çalışma elektrodu kullanılabilir. Bu yöntemde elektrotlardan birisine enzim kaplanmaz, diğerine kaplanır. Daha sonra girişim yapan maddelerden gelebilecek gürültü sinyalleri iki elektrotdan alınan akım değerlerinin farkının alınmasıyla ortadan kaldırılmıştır(38).

3) Biyosensör uygulamalarında girişimi azaltmanın bir diğer yönteminde çift enzim kullanılmaktadır. Bu yöntemde kaplanan enzimlerden bir tanesi analizlenecek maddeden biyolojik sinyali oluşturmakla görevliken diğeri ortamda bulunan girişim yapabilecek maddeleri enzimatik olarak elektroaktif olmayan ürünlere parçalar. Böylece girişim yapabilecek maddelerin cevap akımı değerlerinde pozitif veya negatif yönde hataya sebep olmaları önlenmiş olur(38).

4) Girişim yapabilecek maddelerin etkilerini izole etmenin son yöntemi ise çalışma potansiyelini düşük tutmaktır. Bu sayede analizlenecek madde yanında girişim yapan maddelerinde tepkimeye girmesi önlenmiş olur(38). Çalışma potansiyelini düşürmede yapılan işlem çalışma elektroduna elektriksel kaplama yöntemiyle elektrokatalitik etkiye sahip olduğu bilinen bir metal ile kaplama işlemi uygulanır. Bu şekilde kaplama yapılan elektrotlar ile normal elektrotlara göre glukoz tayinini daha düşük potansiyel değerlerinde yapılabilmektedir. Bu şekilde tasarlanan amperometrik glukoz elektrotlarında mediyatörün potansiyel düşürme ve elektriksel iletkenliğe yardımcı olmak gibi temel görevlerini, elektrot yüzeyine kaplanan metaller üstlenmişlerdir. Bu sayede dışarıdan mediyatör kullanımına gerek kalmamıştır. Kaplamada kullanılan elektrokatalitik etkiye sahip metal olarak genelde periyodik tablonun VIII B grubunun elementleri seçilmiştir. Bu elementler TABLO 2 'deki gibidir :

TABLO 2 : Çeşitli çalışma potansiyellerinde kullanılmış VIII B grubu elementler.

<i>ÇALIŞMALAR</i>	<i>KAPLANAN METAL</i>	<i>Ç. POTANSİYELİ</i>
Joseph Wang et al(12)	Rh	300 mV
Joseph Wang et al(13)	Rh, Pt	450 mV, 500 mV
James W.Furbee et al(21)	Pt	700 mV
Hari Gunasingham et al(24)	Pt	700 mV
Stephen F. White et al(28)	Rh, Pt	400 mV, 350 mV

Bu çalışmaların yanısıra VIII B grubu metal taneciklerinin değişik bir çok elektrot tepkimesi için elektrokatalitik etkiye sahip olduğunu belgeleyen yayınlar TABLO 3 'de verilmiştir :

TABLO 3 : Elektrokatalitik olarak kullanılan bazı VIII B grubu elementler.

<i>ÇALIŞMALAR</i>	<i>VIII B GRUBU METAL</i>	<i>ANALİZLENEN MADDE</i>
A. Leone et al(39)	Pd	Kaplama denemesi
Joseph Wang et al(40)	Ru, Rh, Pd	Katekol, dopamin, hidrokinon, p-metoksifenol
Plamen Atanosov et al(41)	Co	Glukoz
Yip-Kai Lai et al(42)	Ru	Glukoz
Timothy J. Ohara et al(43)	Os	Glukoz
Timothy J. Ohara et al(44)	Os	Glukoz, Laktik asit
Joseph Wang et al(29)	Rh	Glukoz
Joseph Wang et al(45)	Ir	Glukoz
Emmanuel I. Iwuoha et al(27)	Os	Glukoz
Mehmet Ozsoz et al(30)	Co	Fenol, katekol, dopamin
Joseph Wang et al(46)	Pt, Pd, Ru	H ₂ O ₂ , 2-butanon peroksit, hidrazin
Junko Motonaka et al(47)	Os	Kolesterol

VIII B grubu elementlerinin periyodik tablodaki yerleşimleri TABLO 4 'de verilmiştir :

TABLO 4 : VIII B grubu elementlerin periyodik tablodaki yerleri.

VIB	VIIIB	VIIIB	VIIIB	VIIIB	IB	IIB
Cr	Mn	<i>Fe*</i>	<i>Co*</i>	<i>Ni</i>	Cu	Zn
Mo	Tc	<i>Ru*</i>	<i>Rh*</i>	<i>Pd*</i>	Ag	Cd
W	Re	<i>Os*</i>	<i>Ir*</i>	<i>Pt*</i>	Au	Hg
Unh	Uns	<i>Uno</i>	<i>Une</i>			

* (Çeşitli çalışmalarda kullanılmış olan metaller)

Amperometrik glukoz çalışmalarında girişim yapan maddelerin neler olduğunun incelenmesi gereklidir : Bunların başında L-Askorbik asit, Ürik asit, Üre, Parasetamol, Laktik asit, Glukonik asit, Prüvik asit, L-Sistein, gibi maddeler gelmektedir.

Bu çalışmada amaçlanan ise glukoz oksidazla modifiye edilmiş bir mikroelektrodu, elektriksel metalik kaplama (electrodeposition) yöntemiyle elektroaktif hale getirip girişimlerden etkilenmeyi önleyerek, düşük potansiyelerde çalışma imkanını araştırmaktır. Elektroda elektriksel metalik kaplamada kullanılan VIII B grubu metal dışarıdan uygulanan mediyatörün görevlerini üstlendiği için ayrıca dışarıdan mediyatör kullanımına gerek kalmayacaktır. Bu ek basamağın aradan çıkarılmasıyla amperometrik glukoz biyosensörünün tasarımında basitlik sağlanacaktır. Ayrıca avantaj olarak elektrot çapı çok küçük tutulduğundan elektrot in vivo çalışmalara açık olabilecektir.

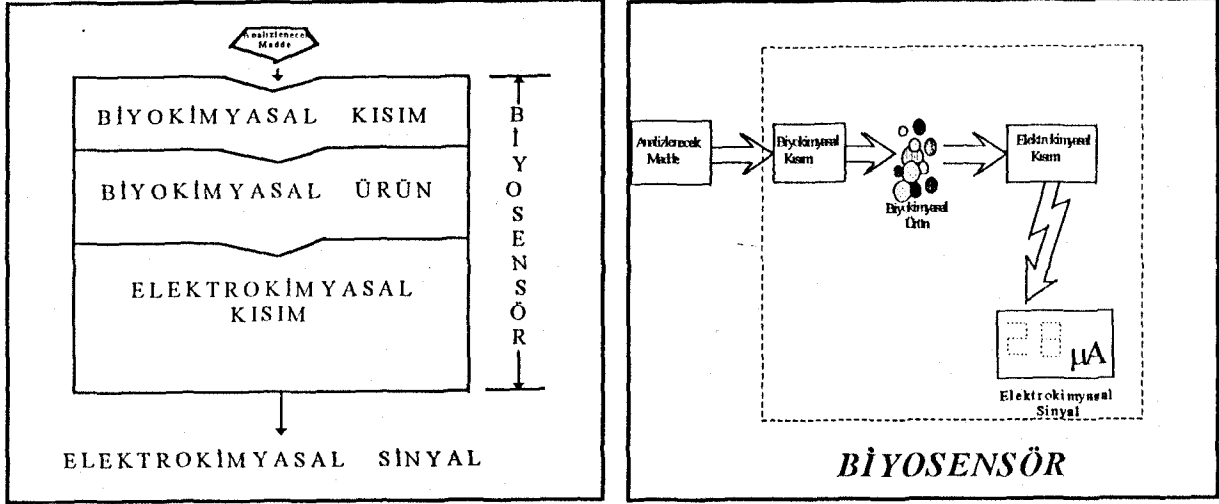
2.2 GENEL BİLGİLER

2.2.1 TANIM

Giriş ve Amaç bölümünde yapılan tanımları özetliyecek ve basitleştirecek olursak : Biyosensörler iki ana bölümden oluşmuşlardır. Bunlar : 1) Biyokimyasal kısım 2) Elektrokimyasal kısım. Biyosensörlerin tasarımında bu iki kısım içiçe geçecek şekilde tasarlanmıştır. İşte bu şekilde ortaya çıkan cihaza "BIYOSENSÖR" tanımı getirilmiştir. Biyokimyasal kısmın görevi analizlenecek maddeyle etkileşerek bir sekonder madde = biyokimyasal ürün oluşturmaktır. Örneğin amperometrik olarak miktar tayini yapan glukoz biyosensörlerinde biyolojik kısım tarafından oluşturulan bu sekonder madde H_2O_2 'dir. Biyosensörün ikinci kısmı olan elektrokimyasal kısmın görevi ise ortamda oluşturulmuş olan sekonder maddeden okunabilir bir sayısal değer = elektrokimyasal sinyal oluşturmaktır. Örneğin amperometrik olarak miktar tayini yapan glukoz biyosensörlerinde elektrokimyasal

kısım tarafından oluşturulan elektrokimyasal sinyal, tamamıyla analizlenecek madde konsantrasyonuyla orantılı olarak oluşturulan akım değerleridir.

Buraya kadar yapılan biyosensör tanımını ŞEKİL 1 'de özetliyelim :



ŞEKİL 1: Biyosensör tanımını özetleyen şekiller

2.2.2 İDEAL BİYOSENSÖR

Bunun yanısıra ideal bir biyosensörün sahip olması gerekli özelliklerde literatürde(48) sıralanmıştır. Bu özellikler TABLO 5 'de verilmiştir :

TABLO 5 : İdeal biyosensörlere ait özellikler.

İDEAL BİR BİYOSENSÖRÜN ÖZELLİKLERİ	
1	SEÇİCİLİK
2	UZUN KULLANIM ÖMRÜ
3	MİNİMUM KALİBRASYON İHTİYACI
4	TEKRARLANABİLİRLİK (ÖRNEKTEN ÖRNEĞE)
5	STABİLİTE (GÜNDEN GÜNE)
6	YÜKSEK DUYARLILIK
7	YETERLİ DÜZEYDE TAYİN SINIRI
8	GENİŞ ÖLÇÜM ARALIĞI
9	HIZLI YANIT ZAMANI
10	HIZLI GERİYE DÖNME ZAMANI
11	BASİTLİK VE UCUZLUK
12	KÜÇÜLTÜLEBİLİR VE STERİLİZE EDİLEBİLİRLİK

Bu çizelgede sıralanan parametreleri açıklıyacak olursak :

2.2.2.1 SEÇİCİLİK

En önemli parametrelerden birisidir çünkü biyosensörün kompleks bir matriks içerisinde tek başına analitik bir ölçüm cihazı olarak kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır. Seçiciliğin yeterli olmadığı durumlarda çalışma prosedürüne bu eksiği giderecek uzun ek işlemler eklenmesi gerekir. Yada zayıf seçicilik nedeniyle aynı anda ölçülen yabancı sinyallerin (girişimlerin) ayıklanması gerekir. Seçiciliğin zayıf olmasından kaynaklanan tüm bu sorunlar biyosensörün kullanımını zor hale getirmektedirler.

2.2.2.2 KULLANIM ÖMRÜ

Biyolojik çevirici olarak enzim kullanıldığı durumlarda enzim aktivitesindeki azalma kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktördür. Enzimin yaşam süresi biyosensörün kullanım ömrü yanısıra kalibrasyonun sıklığı, stabilite, tekrarlanabilirlik gibi diğer parametreleride etkilemektedir.

2.2.2.3 KALİBRASYON GEREKSİNMESİ

İdeal bir biyosensörün hiç kalibrasyona gerek duymaması ya da en az kalibrasyona gereksinmesi istenir. Ama teorikte planlanan bu özellik pratikte günümüzde gerçekleştirilememiştir. Yani biyosensörlerin kullanım ömürleri boyunca sıkça ya da belirli aralıklarla kalibre edilerek duyarlılıklarından bir şey kaybedip kaybetmedikleri araştırılmalıdır. Bunun yanısıra yeni imal edilen bir parti biyosensöründe her birinin tek tek kalibre edilmesi gerektiği düşünülürse bu problemin çözümünde aslında emekleme evresinde olduğumuz

anlaşılır. Dolayısıyla hazırlanan bir parti elektrot içerisinde aynı konsantrasyondaki substrata farklı cevap veren elektrotlar da bulunacaktır.

2.2.2.4 TEKRARLANABİLİRLİK

İdeal bir biyosensör elektrodunun aynı konsantrasyonda ya da aynı özelliklere sahip birden fazla örneklerle daldırılmasıyla yapılan deneylerde aynı sonuçların okunabilmesi istenir. Ama pratikte bu mümkün değildir. O yüzden biyosensörlerle yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir. Tekrarlanabilirlik değeri ne denli iyi olursa o biyosensör uygulamasında o denli iyi olduğundan bahsedilebilir. Elektrotdan elektroda olan tekrarlanabilirlik te ise tekrarlanabilirlik parametresini sağlayabilmek her elektrodun ayrı ayrı kalibre edilmesi gerektiğinden daha da zordur.

2.2.2.5 STABİLİTE

Elektrot stabilitesinin yüksek olduğu durumlar tanım olarak ideal biyosensörler için gereklidir. Stabilite, kullanılan enzimin fiziksel dayanıklılığından etkilendiği gibi; pH, ısı, nem, ortam O₂ konsantrasyonu, enzimi immobilize etmede kullanılan polimerin kimyasal ve fiziksel karakteri gibi parametrelerden de etkilenmektedir.

2.2.2.6 YÜKSEK DUYARLILIK

Tasarlanan elektrodun immobilize edilmiş enzimi biyosensörün yalnız belirli maddelere(substratlara) karşı duyarlı olması tanım olarak ideal biyosensörlerin özelliklerindedir. Duyarlılık akım-konsantrasyon eğrisinin eğimi ile orantılıdır. Eğim değeri büyüdükçe duyarlılıkta da artış gözlenir(48). Kullanılan enzimin substratları dışında biyosensörlerin potansiyel girişim yapan maddelerden etkilenmemesi istenir.

2.2.2.7 YETERLİ DÜZEYDE TAYİN SINIRI

Tasarlanan bir biyosensörün ideal tanımına uyması için tayin sınırının belirli bir konsantrasyon değerinin altında olması gerekmektedir. Belirtilen bu tayin sınırı elektrot yüzeyinin büyüklüğü, enzimin tayin edilecek maddeye karşı olan afinitesi, immobilize edilen enzim miktarı, enzimin immobilizasyonunda kullanılan polimer tabakasının kalınlığı gibi faktörlerden etkilenir.

2.2.2.8 GENİŞ ÖLÇÜM ARALIĞI

Biyosensör uygulamalarında ölçüm aralığı olarak adlandırılan bölge biyosensörden alınan akım-konsantrasyon eğrilerinin lineer olduğu konsantrasyon aralığıdır. Yüksek analizlenecek madde konsantrasyonlarıyla yapılan çalışmalarda örneğin glukoz miktar tayininin yapıldığı fermentasyon çalışmalarında geniş bir ölçüm aralığına sahip olmak ideal biyosensörlerin özelliklerindedir. Bununla birlikte tüm biyosensör uygulamalarında çalışma ortamında belirli bir konsantrasyon değerine ulaşıldıktan sonra akım-konsantrasyon eğrilerinde lineerlikten sapma gözlenmeye başlar. Bu durum enzimatik eğrilerin en önemli ve de karakteristik özelliğidir. Lineerlikten sapmanın nedeni yanıt olarak okunan akım değerlerindeki değişimin azalmasından kaynaklanır. Bunun nedeniyse ortamda artan analizlenecek madde miktarının fazlasıyla reaksiyona girecek enzim fazlalığı olmamasıdır. Dolayısıyla ortama analizlenecek madde enjeksiyonu devam etse bile akım değerleri sabit kalacaktır.

2.2.2.9 HIZLI CEVAP ZAMANI

Cevap zamanı bazı uygulamalarda geriye dönme zamanı ile aynı manaya gelse bile genellikle bahsi geçen tanımdan farklıdır. Amperometrik uygulamalarda analizlenecek bir madde örneğini çalışma ortamına enjekte etmeden önce elektrot yüzeyinde oluşan akımın sabit

kalması istenir (Steady-state). Akım sabit kaldıktan sonra analizlenecek madde ortama enjekte edilir ve akımdaki değişim kaydedilir. İkinci bir enjeksiyondan önce akım değerinin gene sabit kalması beklenir. İşte ilk enjeksiyondan sonra akımın tekrar sabit kalmasına kadar geçen zamana “cevap zamanı” denir. Cevap zamanının kısa ya da hızlı olması ideal biyosensörlerin özelliklerindedir. İkinci ve onu takip eden diğer analizlerin daha hızlı yapılmasını sağladığı için analizin daha kısa sürede bitmesini sağlar. Bir biyosensör elektrodunun cevap zamanı elde edilen akım-zaman eğrilerinden anlaşılabilir. Merdiven basamağı şeklinde elde edilen eğride basamakların şekli yayvan ve genişse cevap zamanı uzun (yavaş), tersi söz konusuysa cevap zamanı kısa (hızlı)dır.

2.2.2.10 HIZLI GERİYE DÖNME ZAMANI

Geriye dönme zamanı ilk örnekte ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini belirler. Genellikle hızlı cevap zamanı hızlı geriye dönme zamanına tekabül eder. Yani ilk örneğin enjeksiyonundan sonra sabit akım değerleri kısa sürede gözlenebiliyorsa ikinci örnekte aynı süre sonra enjekte edilebilecektir.

2.2.2.11 BASİTLİK VE UCUZLUK

Kullanımı, tasarımı basit ve ucuz biyosensörler tasarlamak biyosensör yapımında her zaman hedef alınmış bir düşüncedir. Bu nedenle ilk biyosensör örneklerinin karmaşık ve de pahalı olan yapıları daha sonraları ara basamaklar ortadan kaldırılarak basitleştirilmiş ve mümkün olduğunca da ucuzlaştırılmıştır. Biyosensör yapılarını basitleştirilmesine en iyi örnek ikinci kuşak biyosensörlerin yapılarında bulunan mediyatörlerin daha gelişmiş modeller olan üçüncü kuşak biyosensörlerde ortadan kaldırılmasıdır.

2.2.2.12 KÜÇÜLTÜLEBİLİRLİK VE STERİLİZE EDİLEBİLİRLİK

Biyosensör elektrotlarının sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi biyosensör çalışmalarının son ufkunu oluşturmaktadır. Bununla birlikte biyosensör elektrotlarının yapısına giren enzimlerin fiziksel dayanıklılığı sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametredir. Enzim tabakasının koruyucu bir membran tabakasıyla kaplanması sonucu sterilizasyon büyük ölçüde mümkün olmaktadır(49).

2.2.3 TARİHÇE

Bilimsel literatür “biyosensör” tanımıyla ilk kez 1962 yılında L.C. Clark ve C. Lyons sayesinde tanıştı(2-4). Tanımlanan bu biyosensör glukoz oksidaz enzimiyle Clark tipi bir oksijen elektrodunun kombinasyonundan ibaretti. Bu araştırmacılar glukozdan glukoz oksidaz enzimi sayesinde oluşturulan H_2O_2 konsantrasyonundaki artıştan veya glukoz oksidaz enziminin kullanılan ortamdaki O_2 konsantrasyonundaki azalmadan yola çıkarak glukoz konsantrasyonunun tayin edilebileceğini ispatlamış oldular. 1967 yılında ise S.J. Updike ve G.P. Hicks isimli bilimadamları geliştirdikleri bir glukoz biyosensörüne “enzim elektrodu” ismini verdiler(50). Bu biyosensör, glukoz oksidaz enziminin poliakrilamid jeli vasıtasıyla bir oksijen elektrodunun yüzeyine tutturulmasıyla hazırlanmıştı. Amperometrik enzim elektrotlarının yanısıra ilk potansiyometrik enzim elektrotları G.G. Guilbault ve J. Montalvo tarafından 1969 yılında hazırlandı(50). 1970 ‘li yıllarda ise biyosensörlerin hem biyolojik hem de elektrokimyasal kısımlarında modifikasyonlar yapılarak birçok çeşit biyosensörlerin ilk prototipleri geliştirilmeye başlanmıştır. Biyosensör tasarımında kullanılan elektrotların duyarlılığı ve seçiciliği artırılmaya çalışılırken aynı zamanda boyutlarında olanak oranında küçültülmüştür. Bugün için ise biyosensörlerin yeni çalışma alanı olarak mikroelektrotlar görülmektedir(6-22)

Yapılmakta olan biyosensör çalışmalarının sayısı hakkında fikir verebilmek amacıyla 1985 yılında biyosensörler üzerine yapılan yayınlar (48), Tablo 7 'de özetlenmiştir :

TABLO 7 : 1985 yılında çeşitli ülkelerde biyosensörler üzerine yapılan yayınlar.

Ü L K E	YAYINLAR	PATENTLER	TOPLAM
JAPONYA	59	74	133
A.B.D	35	9	44
İNGİLTERE	33	5	38
DEM. ALMANYA	12	19	31
S.S.C.B	14	3	17
FEDERAL ALMANYA	10	3	13
FRANSA	9	1	10
DİĞER 7 ÜLKE	172	114	286
DÜNYA	213	119	332

2.2.4 YÖNTEMLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER

Amperometrik glukoz biyosensörü dizaynında kullanılan elektrokimyasal yöntemler iki tanedir. Bunlar : 1) Amperometri 2) Siklik Voltametri (cv) yöntemleridir.

2.2.4.1 AMPEROMETRİ

Günümüzde kullanılan değişik çeviriciler sayesinde çeşitli biyosensör ya da sensörleri tasarlamak mümkündür. Olası seçenekler Tablo 8 'de verilmiştir(3) :

TABLO 8 : Tasarlanabilecek Biyosensör Çeşitleri.

ÇEVİRİCİ	ÖLÇÜM PRENSİBİ VE ÖLÇÜLEN ÖZELLİK
Elektrokimyasal	Potansiyometri Amperometri Voltametri Alan etkili (ISFET, chemFET)
Elektriksel	Yüzey İletkenliği (MOS) Elektrolit İletkenliği
Optiksel	Fluoresans Absorpsiyon Yansıma Luminesans Kırılma İndeksi
Manyetik	Paramanyetizm
Kütleye duyarlı	Piezoelektrik kristallerinin rezonans frekansı Yüzey akustik dalgaları

Termal	Reaksiyon ısı Adsorpsiyon ısı
--------	----------------------------------

Tüm bu yöntemler içerisinde amperometri gittikçe artan bir önem kazanmaktadır. Değişik yöntemler kullanılarak çeşitli yıllarda yapılmış çalışmalar Tablo 9 'da verilmiştir (4) :

TABLO 9 : Çeşitli Yöntemler Kullanılarak Değişik Yıllarda Yapılmış Çalışmalar.

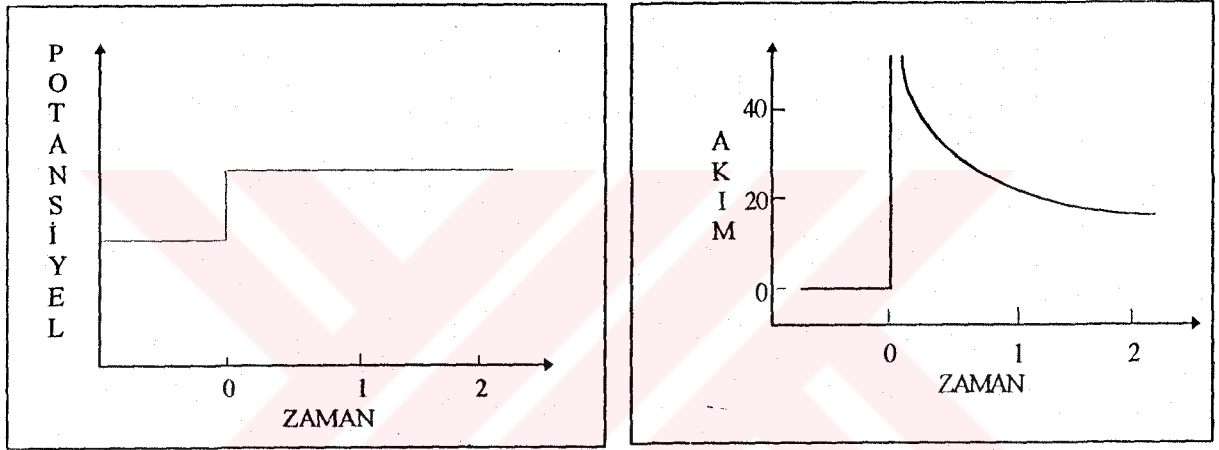
ÇALIŞMA	YILLAR		
	1985-1987	1988-1989	1990-1991
Derlemeler	88	63	145
Termal	6	6	15
Kütleli	19	24	40
İyon Seçici Elektrotlar	336	130	180
Potansiyometri	83	87	129
Amperometri	93	101	210
Kondüktometri	65	66	101
Optik	37	99	142
TOPLAM	727/Yıl	576/Yıl	962/Yıl

Amperometri aynen potansiyometri, polarografi, voltametri ve kronoamperometri gibi klasik bir elektrokimyasal yöntemdir. Amperometrinin prensibi çalışma elektrodu ve referans elektrotları arasında sabit bir potansiyel uygulayarak bu potansiyele bağlı olarak oluşan oksidasyon veya redüksiyon şeklindeki elektrot reaksiyonu sonucu gözlemlenen akım değerlerinin yorumlanmasıdır. Amperometrik yöntemler uygulandıkları çalışma yöntemlerine göre 2 alt gruba ayrılırlar(51): a) Ölçümler durgun ortamda yapılırsa "*kronoamperometri*" b) Ölçümler hareketli bir çözeltide yapılırsa "*hidrodinamik amperometri*" adını alır.

2.2.4.1.1 KRONOAMPEROMETRİ

Bu yöntemde çalışma elektroduna uygulanan ilk potansiyelde analizlenecek madde elektrolize olmaz. Daha sonra potansiyel elektrolizin başlayacağı bir değere yükseltilir. Bu sırada ölçülen akım değerleri zamanın bir fonksiyonudur. Analizlenecek maddeye ait kütle taşınımı bu yöntemde ayrı karıştırma işlemi uygulanmadığı ve durgun çözeltide çalışıldığı için sadece

difüzyon ile sağlanır. Elektrot yüzeyine doğru olan difüzyonun hızı konsantrasyon gradienti(farkı) ile doğru orantılıdır. Potansiyel değeri çalışma elektrodu ile referans elektrodu arasına uygulandığında elektroliz başlar ve elektrot yüzeyinde hemen bir difüzyon tabakası oluşturur. Difüzyon hızını sınırlayan konsantrasyon gradienti ise difüzyon tabakasının kalınlığından etkilenir. Potansiyel ilk uygulandığı zaman difüzyon tabakası ince olduğu için kütle taşınım hızı yüksektir. Dolayısıyla çözeltiliden akan akım da büyük olur. Reaksiyon ilerledikçe difüzyon tabakasının kalınlığı artar ve akım değerinde düşme gözlenir. Bu yöntemin elde edilen grafikleri ŞEKİL 2 'dedir(51) :



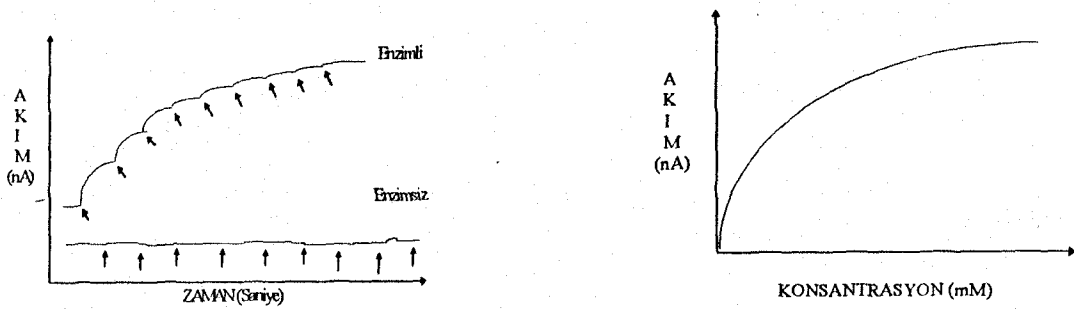
ŞEKİL 2 : Koronoamperometriye ait potansiyel-zaman ve akım-zaman grafikleri.

Kronoamperometri yöntemi konsantrasyon tayini için ender kullanılmakla birlikte elektrokimyasal reaksiyonların hızının tespitinde kullanılabilir. Elektrot reaksiyonlarının sadece reaksiyon kinetikleri tarafından sınırlandırıldığı ama kütle transferi veya difüzyon tarafından etkilenmediği çok kısa zaman aralıklarında kronoamperometri kullanarak reaksiyon hızı saptanması olasıdır.

2.2.4.1.2 HİDRODİNAMİK AMPEROMETRİ

Analizlenecek örneğin elektrot yüzeyine konvektif olarak taşındığı, sabit potansiyelde çalışılan amperometriye "*hidrodinamik amperometri*" denir(51). Bu yöntemde de aynı kronoamperometrideki gibi elektrotlara potansiyel uygulandığı andan itibaren elektrot

yüzeyinde difüzyon tabakası oluşur. Oluşan difüzyon tabakasının kalınlığı elektrot yüzeyindeki çözelti hareketinin hızı tarafından belirlenir. Çözelti hareketinin hızı ise konsantrasyon gradienti tarafından tayin edilir. Dolayısıyla örneğin elektroliziyle oluşan akımda çözeltideki örnek konsantrasyonuyla orantılı olacaktır. Hız sabit tutulduğu sürece akımda sabit kalacaktır. Bu kronoamperometriye zıt düşmektedir. Kronoamperometride zamanla difüzyon tabakasındaki artış devam etmektedir. Hidrodinamik amperometride çözelti hareketliliği ya çözeltiyi hareket ettirerek (karıştırarak) ya da çalışma elektrodunu çözelti içerisinde hareket ettirerek sağlanabilir. Hareketli elektrot sistemleri içerisinde en çok kullanılanı “*dönen disk elektrot*” sistemidir. Bu sistem elektrot dönüş hızının ayarlanmasıyla kütle transfer hızının ayarlamasına olanak verdiği için hidrodinamik elektrotların en faydalılarından biridir. Çözeltinin hareket ettirildiği sistemlerdeyse en çok kullanılan elektrot sistemi ise “*tübüler elektrot*” sistemidir(51). Tübüler elektrot sistemlerinin çok çeşidi olmakla beraber en çok kullanılanları grafit tozu ve mineral yağı kullanılarak yapılan “*karbon pastası*” elektrotları, grafit tozunun özel karışımlarla sertleştirilerek sadece elektrot yüzeyinden 1-2 mm lik konuma sıkıştırılarak hazırlanan daha dayanıklı olan “*glassy-carbon*” elektrotları ve üzerine gerekli kaplamaların yapılmasıyla kullanılabilen çeşitli ebat ve çaplarda “*metal kablo*” elektrotlardır(51). Bu yöntemde eğrileri ŞEKİL 3 ‘de verilmiştir



ŞEKİL 3 : Hidrodinamik amperometriye ait akım-zaman ve akım-konsantrasyon eğrileri.

İlk grafik olan akım-zaman eğrileri, çalışma ortamına analizlenecek madde çözeltisi enjekte edilerek elde edilir. Bu grafikte enjeksiyon zamanları okla işaretlenir. Önce enzimlessiz elektrotla çalışılır, sonra aynı koşullar altında enzimli elektrotla deney tekrarlanır. Enzimli elektrotta her enjeksiyon sonrası akım değerinde artış gözlenirken enzimlessiz elektrotta herhangi bir artış gözlenmez. İkinci grafik ilk grafikden elde edilen verilerin işlenmesiyle elde edilir. Her enjeksiyonla konsantrasyondaki artış bilindiğine göre bu değerler X eksenine işlenir. Akımda gözlemlenen artış da akım-zaman eğrisinden hesaplanarak Y eksenine işlenir. Bu şekilde elde edilen grafiğe akım-konsantrasyon eğrisi ya da kalibrasyon eğrisi denir. Kalibrasyon eğrisinde belirli bir konsantrasyon aralığının lineer olması istenir.

Günümüzde amperometrik biyosensörler ile laktik asit(13,52), nitrat(53), mangan(54), glukoz(22), fenol(40), parasetamol(55), salisilik asit(55), katekol(30) ve dopamin(30) gibi değişik maddelerin analizi yapılabilmektedir. Bunun yanısıra amperometrik biyosensörler kullanılarak yapılabilen diğer tetkikler de aşağıda TABLO 10 'da verilmiştir(56) :

TABLO 10 : Amperometrik Olarak Tayin Edilebilen Maddeler.

MADDE	Ö R N E K L E R				
<i>Amino Asit</i>	D-Alanine	L-Sistein	L-Histidin	L-Tirozin	L-Lizin
<i>Gaz</i>	NH ₃	H ₂	CH ₄	SO ₂	NO
<i>Kofaktör</i>	AMP	ATP	FAD	NADPH	TPP
<i>Karbonhidrat</i>	Amigdalin	Laktoz	Galaktoz	Fruktoz	Maltoz
<i>Amin, amid</i>	Adenozin	Aminoprin	Anilin	Asetilkolin	Kreatin
<i>Organik asit</i>	Asetik Asit	Formik Asit	Malik Asit	Glukonik Asit	Maleik Asit
<i>Alkol, fenol</i>	Bilirubin	Katekol	Kolesterol	Etanol	Gliserol
<i>Anorganik</i>	F ⁻	NO ₂ ⁻	SO ₄ ²⁻	Hg ²⁺	Cu ²⁺
<i>Enzim,protein</i>	Albumin	Proinsülin	Peroksidaz	Transaminaz	α-amilaz

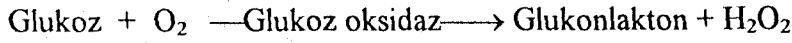
2.2.4.1.2.1 AMPEROMETRİK GLUKOZ BIYOSENSÖRLERİ

Amperometrik glukoz elektrotlarında aynen diğer amperometrik biyosensörlerde olduğu gibi enzimatik tepkimenin hızı, oluşan akımı kaydederek ölçülür. Okunan akım değerleri

analizlenecek madde konsantrasyonuyla doğru orantılı olduğu için buradan çözeltinin konsantrasyonu bulunabilir. Bugüne kadar glukozun enzimatik yıkımı sırasında oluşan ürünlere göre 3 tip amperometrik glukoz biyosensörü tasarlanmıştır : 1) Birinci Kuşak Glukoz Biyosensörleri 2) İkinci Kuşak Glukoz Biyosensörleri 3) Üçüncü Kuşak Biyosensörleri.

2.2.4.1.2.1.1 BİRİNCİ KUŞAK GLUKOZ BİYOSENSÖRLERİ

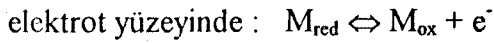
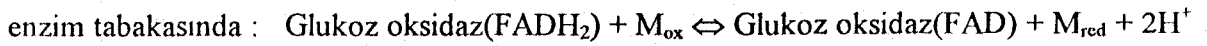
Birinci kuşak glukoz biyosensörleri glukoz miktar tayinini, tepkime bir oksidasyon olduğuna göre ya ortamdaki O₂ konsantrasyonundaki azalmadan ya da oluşan H₂O₂ konsantrasyonundaki artıştan yararlanarak yapmaktadır :



Bu kuşak glukoz elektrotlarına S. J. Updike ve G. P. Hicks 'in yaptığı ilk glukoz biyosensörlerinden olan çalışma örnektir(50).

2.2.4.1.2.1.2 İKİNCİ KUŞAK GLUKOZ BİYOSENSÖRLERİ

Bu tip biyosensörlerin bünyesinde enzimin aktif redoks merkezi ile elektrodun yüzeyi arasında elektron alışverişinden sorumlu mediyatörler vardır. Bu kuşak biyosensörlerin analizlenecek maddeyle verdikleri elektrokimyasal reaksiyon iki basamakta verilebilir:

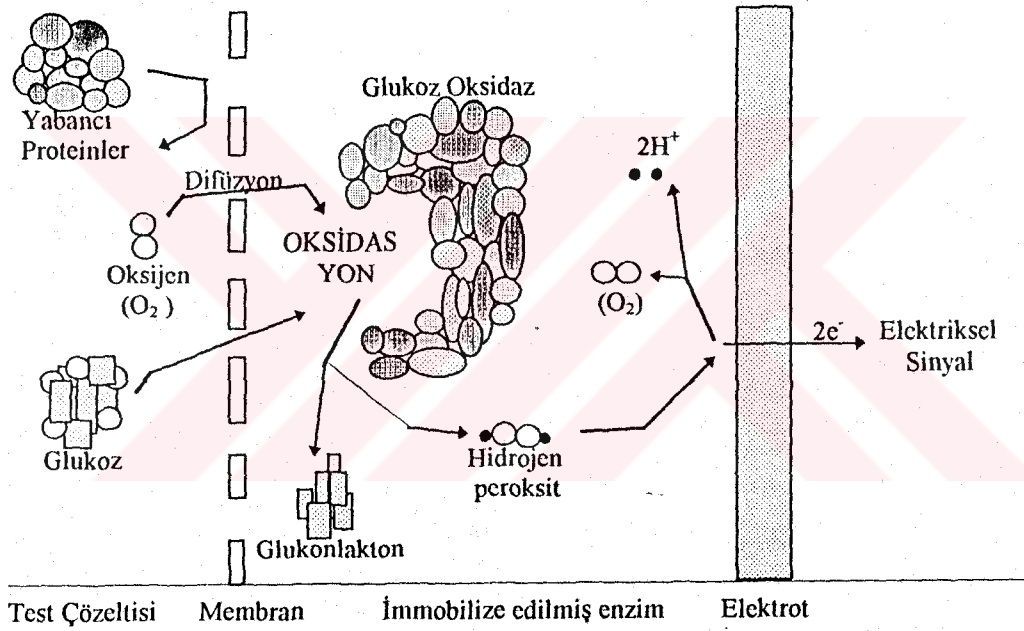


Oluşan akım, mediyatörün (M_{red}) oksidasyona uğrarken verdiği elektrondan kaynaklanan akımdır. Kaydedilen bu akım oksidasyona uğratılan mediyatör konsantrasyonuyla, o da oksitlenen glukoz konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğu için okunan akım değerinden ortamda bulunan glukoz konsantrasyonuna geçilebilir. Bu tip elektrotların ilk örneklerinde kullanılan mediyatörler suda çözünür özelliktedirler (heksasynoferrat III) ve çalışma ortamına dışarıdan eklenmekteydiler. Daha sonraları daha basit konfigürasyonlu elektrotlar hazırlanırken bu fazladan mediyatör işlemi ortadan kaldırılmış ve mediyatörler doğrudan doğruya elektroda

immobilize edilmişlerdir. İmmobilizasyon işleminde kullanılan mediyatörlerin molekül ağırlığı yüksek olanlardan seçilmesiyle mediyatörlerin elektrodun yapısından çalışma çözeltisine dağılmaları önlenmiş olur.

Çalışmada kullanılan glukoz biyosensörü de ikinci kuşak glukoz biyosensörlerine örnektir. Enzim elektrodunun yapımında ayrıca dışardan bir mediyatör kullanılmamış ama elektrot yüzeyine mediyatör görevi gören ve elektrokatalitik etkiye sahip VIII B grubu bir metal ile kaplama yapılmıştır.

Çalışmada gerçekleşen tüm elektrot reaksiyonları aşağıdaki ŞEKİL 4 ile de özetlenebilir :



ŞEKİL 4 : Amperometrik Glukoz Tayinine Ait Tüm Elektrot Reaksiyonları.

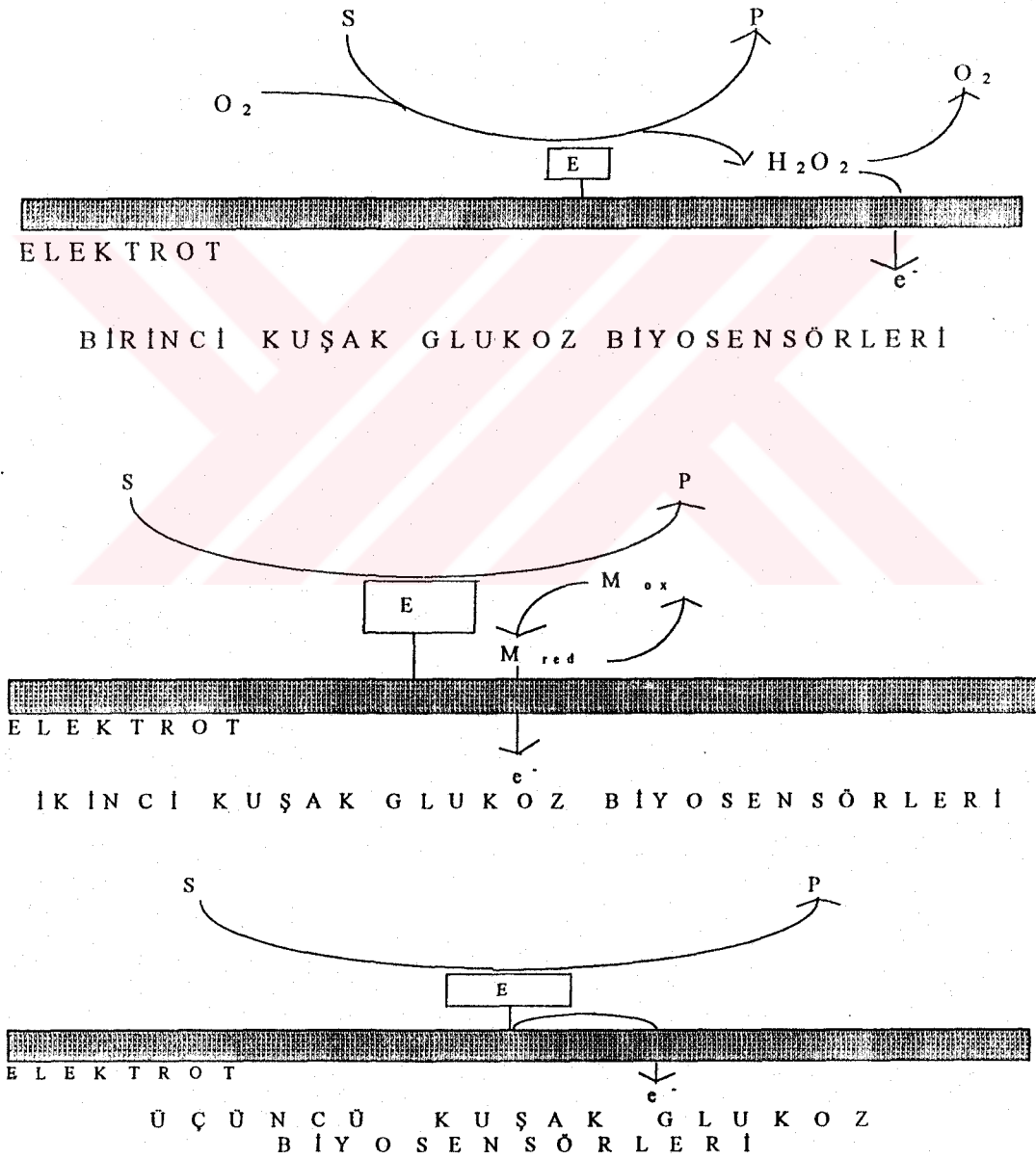
2.2.4.1.2.1.3 ÜÇÜNCÜ KUŞAK GLUKOZ BİYOSENSÖRLERİ

Bu kuşak glukoz enzim elektrotları enzimin aktif redoks merkeziyle elektrot yüzeyi arasında direkt elektriksel bağlantı kurmak için tasarlanmıştır. Bu kuşak glukoz elektrotlarına aslında mediyatörsüz glukoz elektrotları da denilebilir. Ama enzimlerin protein yapısının

karmaşıklılığının ve zor iletken olmasının getirdiği sorunlar nedeniyle bu kuşak glukoz elektrotlarıyla yapılmış başarılı çalışma sayısı azdır.

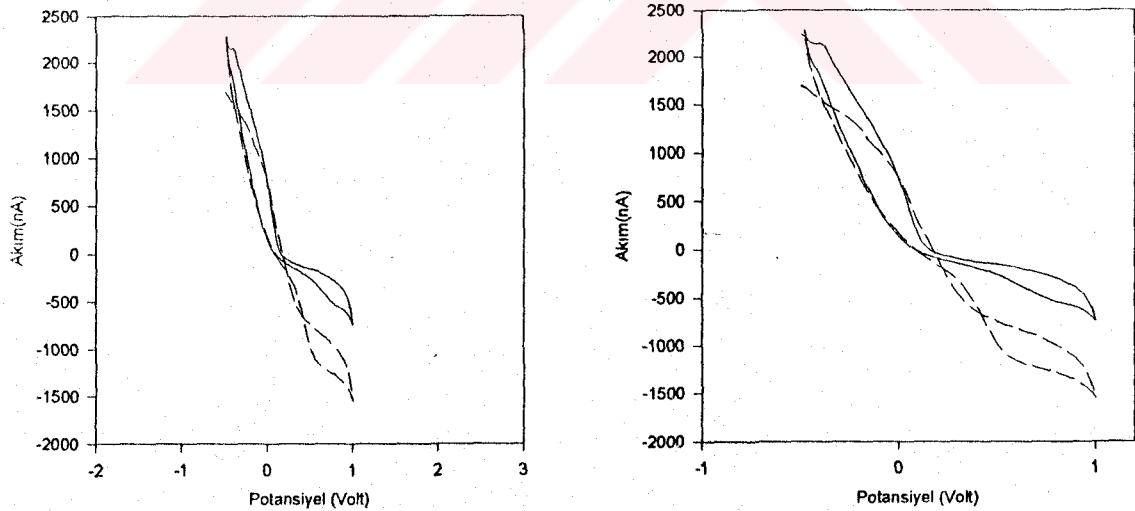
Her üç kuşak biyosensörlere ait elektrokimyasal reaksiyonlar şu ŞEKİL 5 'de özetlenebilir :

ŞEKİL 5 : Birinci, ikinci ve üçüncü kuşak amperometrik glukoz biyosensörleri. (S = Substrat, P = Ürün)



2.2.4.2 SIKLIK VOLTAMETRİ(CV)

Amperometrik glukoz biyosensörünün dizaynında amperometrinin yanısıra siklik voltametri yöntemi de kullanılmıştır. Bu yöntemde çalışma elektroduna, belirli başlangıç ve bitiş değerleri arasında saniyede belirli miktarda değişen potansiyel değerleri uygulanır. Sürekli değişen potansiyel değerlerine karşı akımda olan değişim grafiğe geçirilerek elde edilen eğriye siklik voltamogram denir. Siklik voltametri bir miktar tayini yöntemi değildir ama analizlenecek maddenin hangi potansiyelde nasıl davrandığı hakkında bilgi verir. Siklik voltamogramlarda pozitif potansiyel uygulanarak yürütülen oksidasyon işlemlerinde oluşan oksidatif akım negatif işarette verilir. Bu bilgiler o maddenin miktar tayininde hangi potansiyelde optimum cevabın alınabileceğini gösterir. Böylece miktar tayini yönteminin oturtulması daha kolaylaşmış olur. Siklik voltametri uygulanması sonucu elde edilen eğri olan siklik voltamogramlara örnek ŞEKİL 6 'da verilmiştir :



ŞEKİL 6 : Örnek siklik voltamogramlar.

Her iki siklik voltamogramda çalışma ortamına eklenen 20 mM glukoz çözeltisinin -0.5 V ile 1.0 V potansiyel aralığında, 1 mV/sn. 'lik tarama hızında gösterdiği davranışı

incelemektedir. Her grafik iki ayrı voltamogramdan oluşmuştur. Sürekli çizgiyle gösterilen voltamogramlar sadece çalışma ortamını oluşturan fosfat tamponuna aittir. Kesikli çizgiyle gösterilen voltamogramlar ise aynı çalışma ortamına 20 mM glukoz çözeltisi enjekte edildikten sonra alınan siklik voltamogramlardır. İlk grafikteki voltamogramlardan elde edilen bilgi glukoz moleküllerinin 1 V çalışma potansiyeli yakınlarında yüksek oksidatif akım değerleri göstererek oksitlendiğidir. İkinci grafikte işe ilkinden farklı olarak X eksenini sadece eğrinin girdiği alanı alacak şekilde küçültülmüştür. Buradan daha iyi anlaşılacağı üzere oksidasyon alanında 0.0 V potansiyel değerini hemen geçince başlamakla beraber 1.0 V potansiyel değerine yaklaşıldıkça artmaktadır. Siklik voltametriye elde edilen siklik voltamogramların şekli ve yapısında seçilen potansiyel aralığının yanısıra, seçilen tarama hızının, kaç tur tarama yapıldığının da etkisi vardır.



3. BÖLÜM II

3.1 DENEYSEL KISIM

3.1.1 KULLANILAN MADDELER VE GEREÇLER

3.1.1.1 O-FENİLEN DİAMİN (OFD)

(1,2-benzendiamin; o-diaminobenzen) Monomer olarak sağlanan OFD daha sonra +0.65 V potansiyel altında polimerleştirilerek enzimin platin mikro elektrot yüzeyine yapıştırılmasında kullanılmıştır. OFD tüm pH değerlerinde elektrokimyasal oksidasyonla polimerik film oluşturabildiği(57) ve oksidasyonu irreversibl olmadığı , dolayısıyla oluşturduğu polimerik film stabil olduğu(57) için polimerik materyal olarak seçilmiştir. Polimer film oluşturmak için OFD benzer çalışmalarda da kullanılmıştır(7,10,11,58,59,60-63)

Firma : Sigma

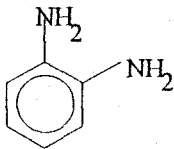
Molekül ağırlığı : 108.14 g/mol

Kapalı formül : C₆H₈N₂

Çözünürlük : Alkol, kloroform, eterde çözünür; suda ise kısmen çözünür.

Erime noktası : 103-104 °C

Açık formül :



3.1.1.2 GLUKOZ OKSİDAZ

(β -D-Glucopyranose aerodehydrogenase; EC 1.1.3.4) Miktarı ünite cinsinden verilir. 1 glukoz oksidaz ünitesi 30°C temperatürde, 1 dakikalık süre içerisinde, pH 5.9 'da, 0.1 M fosfat tamponu ve %3.3 glukoz monohidrat içeren ortamda, yeterli O₂ varlığında, 10 mm³ O₂ tüketen enzim miktarıdır. Glukoz oksidaz enzimi prostetik grup (aktif merkez) olarak FAD (flavin adenin dinükleit) ve kofaktör olarak bakır (Cu) içerir (kofaktörler enzimlerin aktivite gösterebilmesi için gerekli maddelerdir). Glukoza optimum cevabı pH 5.5-6.0 aralığında verir. Bununla birlikte pH 4.5 -7.0 aralığında stabildir. Glukoz miktar tayininde kullanılan cihazların test elektrotlarının yapısına girmesinden başka ambalajlanan gıda maddelerindeki istenilmeyen glukozdan ve ortam oksijeninden kurtulmak için kullanılır.

Firma : Sigma

Çözünürlük : suda sarı-yeşil çözeltiler vererek çözünür.

3.1.1.3 β -D-GLUKOZ

(Dekstroz, dekstrosol, glukolin) İnsan kanında % 0.008-0.1 oranında bulunur.

Firma : Sigma

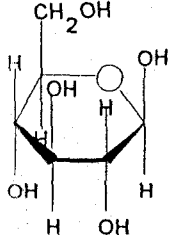
Molekül ağırlığı : 180.16 g/mol

Kapalı formül : C₆H₁₂O₆

Çözünürlük : 1 gramı 1 ml su veya 60 ml alkolde çözünür.

Erime noktası : 148-155 °C

Açık formül :



3.1.1.4 ÜRİK ASİT

(7,9-dihidro-1H-pürin-2,6,8(3H)-trion; 8-hidroksiksantin; pürin-2,6,8-triol; 2,6,8-trioksipürin) Canlılarda azot metabolizmasının son ürünüdür. Kanda 0.27-0.48 mM konsantrasyonda bulunur(22). Amperometrik glukoz tayinlerinde potansiyel interferanstır. Kalitatif tayini müreksit reaksiyonuyla olur.

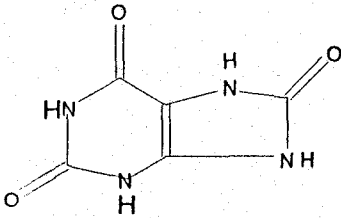
Firma : Sigma

Molekül ağırlığı : 168.11 g/mol

Kapalı formül : C₅H₄N₄O₃

Çözünürlük : gliserol, alkali hidroksit çözeltilerinde çözünür, alkolde çözünmez. 1gramı 15000 kısım suda çözünür.

Açık formül :



3.1.1.5 L-ASKORBİK ASİT

(Vitamin C; 3-oxo-L-gulofuranolakton) Kanda 0.01-0.11 mM konsantrasyonda bulunur(22). Amperometrik glukoz miktar tayinlerinde potansiyel interferanstır. Kuru toz halindeyken atmosferik oksijenden etkilenmemekle beraber çözeltileri halindeyken kısa sürede oksitlenir. Ve bu oksidasyon işlemi alkalilerin, Cu, Fe gibi metallerin varlığında hızlanır.

Firma : Sigma

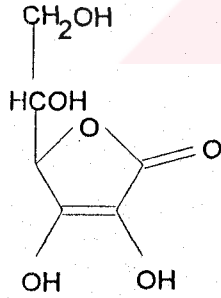
Molekül ağırlığı : 176.12 g/mol

Kapalı formül : C₆H₈O₆

Çözünürlük : 1 gramı 3 ml suda çözünür. Kloroform, benzen, eterde çözünmez.

Erime derecesi : 190-192 °C

Açık formül :



3.1.1.6 β -D-FRUKTOZ

(Levuloz; meyve şekeri) Kanda <0.4 mM konsantrasyonda bulunur(22). Amperometrik glukoz ölçümlerinde potansiyel interferans olarak davranabileceği için yanıtı etkisi olup olmayacağı incelenmelidir.

Firma : Sigma

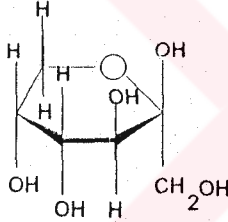
Molekül ağırlığı : 180.16 g/mol

Kapalı formül : $C_6H_{12}O_6$

Çözünürlük : su, piridin, aseton, etilaminde çözünür.

Erime noktası : 129-130 °C

Açık formül :



3.1.1.7 ÜRE

(Karbamid; karbonil diamid) Canlılarda protein metabolizmasının son ürünüdür. Kanda 1.3-4.3 mM konsantrasyonda bulunur(22). Amperometrik glukoz miktar tayinlerinde potansiyel interferanstır. Malonik asit esterleriyle reaksiyona sokularak barbitürik asit sentezinde kullanılır. Tedavide diüretik olarak kullanılır.

Firma : Sigma

Molekül ağırlığı : 60.06 g/mol

Kapalı formül : CH_4N_2O

Çözünürlük : kloroform ve eterde çözünmez. 1 gramı 1mL su, 10 mL alkol, 2mL gliserolde çözünür.

Erime noktası : 132.7 °C

Açık formül : NH₂-CO-NH₂

3.1.1.8 PARASETAMOL

(Asetanilid; p-asetamido-fenol; N-asetil-p-aminofenol; p-hidroksiasetanilid) Kanda <0.17 mM konsantrasyonda bulunur(22). Amperometrik glukoz miktar tayinlerinde potansiyel interferanstır. Azo boyar maddelerin imalinde ve tedavide analjezik, antipiretik amaçlı kullanılır.

Firma : Atabay Kimya

Molekül ağırlığı : 151.16 g/mol

Kapalı formül : C₈H₉NO₂

Çözünürlük : Etanol, metanol, aseton, etil asetatda çözünür. Suda ve eterde daha az çözünür.

Benzen ve pentanda çözünmez.

Erime noktası : 169-170.5 °C

Açık formül :



3.1.1.9 PLATİN MİKRO ELEKTROT

Platin mikroeletrotların dizaynında kullanılan platin mikroteller teflon ile kaplanmış olup elektrokatalitik olduğu bilinen %10 Ir(45) (İridyum) içermektedir. Çapları 50 µm'dir(61).

Firma : Medwire©

3.1.1.10 POTASYUM DIHİDROJEN FOSFAT

(Potasyum bifosfat; monopotasyum fosfat) Ph değeri 7.4 olan fosfat tamponunun hazırlanmasında kullanılmıştır. Kan pH değeri 7.4 olduğu için ve benzer çalışmalarda da fosfat tamponu kullanıldığı için seçilmiştir.

Firma : Riedel-de Haen

Molekül ağırlığı : 136.09 g/mol

Kapalı formül : KH_2PO_4

Çözünürlük : 1 gramı 4.5 K suda çözünür. Alkolde çözünmez.

3.1.1.11 DİPOTASYUM HİDROJEN FOSFAT

(Dipotasyum fosfat) pH değeri 7.4 olan tampon çözeltisinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Firma : Merck

Molekül ağırlığı : 174.18 g/mol

Kapalı formül : K_2HPO_4

Çözünürlük : suda iyi alkolde az çözünür.

3.1.1.12 SÜLFÜRİK ASİT ÇÖZELTİSİ

Hazırlanan elektrotların ön temizliğinde kullanılmak üzere % 95-98' lik stok çözeltiden 0.5 M konsantrasyon olacak şekilde seyreltilerek hazırlanmıştır.

Firma : Merck

Molekül ağırlığı : 98.08 g/mol

Kapalı formül : H_2SO_4

Çözünürlük : Su ve alkolle fazla miktarda ısı açığa çıkararak ve hacimce küçülerek karışır.

Yoğunluk : 1.84 g/dm³

Kaynama noktası : 290 °C

3.1.1.13 RODYUM ATOMİK ABSORPSİYON STANDART ÇÖZELTİSİ

Enzim ve polimer karışımıyla kaplanmış mikroelektrotların yüzeyine metalik kaplama yapmak için kullanılmıştır.

Firma : Aldrich

Molekül ağırlığı : 209.3 g/mol

Kapalı formül : RhCl₃

Konsantrasyon : %5 'lik HCl çözeltisinde 1000 µg/mL Rh içermektedir.

Yoğunluk : 1.025 g/dm³

3.1.2 YÖNTEM

3.1.2.1 KULLANILAN ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANIŞI

3.1.2.1.1 GLUKOZ ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANIŞI

Ölçümler sırasında 1 mM glukoz stok çözeltisi hazırlanmış ve gerektiğinde bu çözeltiden seyreltme yapılarak değişik konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Elektrot tasarımında kullanılan glukoz oksidaz enzimi glukozun β monomerine etkilidir. Glukozun α monomeri sulu çözeltilerde 24 saat içerisinde β monomere dönüşme özelliğine sahiptir. β monomerden hazırlanan glukoz çözeltisi içinde bulunabilecek α monomerlerin β monomere dönüşebilmesi için glukoz çözeltileri kullanılmadan önce 24 saat bekletilmiştir. Zamanla hazırlanan glukoz çözeltilerinde mikrobiyel bozunma gözlemlendiği için ölçümlerde kullanılan çözeltiler taze hazırlanmış ve 24 saat bekleme alınmış çözeltilerdir.

3.1.2.1.2 O-FENİLEN DİAMİN (OFD) ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANIŞI

Çalışmada kullanılan monomer OFD çözeltisi 300 mM konsantrasyonda fosfat tamponunda hazırlanmıştır(61). Hazırlanan monomer çözeltisi içerisinde çözünmüş olarak bulunan O_2 gazı ortamdaki N_2 gazı geçirilerek uzaklaştırılmıştır.

3.1.2.1.3 FOSFAT TAMPONUNUN HAZIRLANIŞI

Ölçümler sırasında kullanılan Fosfat tamponunun reçetesi şöyledir : (0.01 mol KH_2PO_4 + 0.04 mol K_2HPO_4) / 1L. Bu şekilde hazırlanan tampon çözeltisinin pH değeri pH metre ile kontrol edilmiş ve pH ayarlamaları NaOH ve H_3PO_4 ile yapılmıştır.

3.1.2.1.4 H_2SO_4 ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANIŞI

Kaplama işlemlerine hazır hale getirilmiş platin mikroelektrotların ön temizliğinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır(61). 1L 'si 1.84 kg olan % 95-98 'lik stok çözeltiden 0.5M konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.1.2.2 ELEKTROT HAZIRLANMASI

3.1.2.2.1 PLATİN MİKROELEKTROTLARIN HAZIRLANIŞI

Medwire firmasından sağlanan 50 μm çapındaki teflon kaplı platin tel 5 cm 'lik uzunlukta mikroelektrotlar halinde kesilmiştir. Teflon kaplı mikroelektrotların uç kısmından 2 mm 'lik kısım yakılarak teflon kaplamasından temizlenmiştir. Böylece elektrodun sadece uç kısmı

iletken hale getirildiği için; enzim ve diğer maddelerin kaplama işlemlerinde sadece bu uç kısımların kaplanmaya duyarlı hale gelmesi sağlanmıştır(61).

3.1.2.2.2 PLATİN MİKROELEKTROTLARIN ÖN TEMİZLİĞİ (PRECONDITIONING)

Hazırlanan mikroelektrotların enzim kaplanacak yüzeylerindeki safsızlıkların temizlenmesi ve giderilmesi işlemidir (61):

1) Elektrotlar önce +1.9 V potansiyel altında 30 sn. süreyle 0.5M H₂SO₄ çözeltisi içerisinde tutulmuştur. Böylece yüksek potansiyel değerlerinde oksitlenerek elektrot yüzeyinden temizlenen safsızlıkların giderilmesi sağlanmıştır.

2) 10 dk. süreyle (ya da sabit akım değerleri gözlemleninceye kadar) -0.25 V ile +1.1 V potansiyel değerleri arasında 100 mV/sn. 'lik tarama hızıyla siklik voltametri uygulanmıştır. Böylece hem negatif potansiyel değerlerinde redüksiyona uğrayan safsızlıklar hem de pozitif potansiyel değerlerinde oksidasyona uğrayan safsızlıklar elektrot yüzeyinden temizlenmiştir.

3) Ön temizlik işlemleri tamamlanan elektrotlar distile suyla temizlenerek kaplama işlemlerine hazır hale getirilmiştir.

3.1.2.2.3 PLATİN MİKROELEKTROTLARIN DIŞ YÜZEYİNE RODYUM KAPLANMASI

Rodyum metaline ait atomik absorpsiyon standart çözeltisi 1/10 oranında seyreltilerek, -0.8 V potansiyel değeri elektroda 10 dk. süreyle uygulanarak, Rh³⁺ iyonunun metalik Rodyum (Rh⁰) haline indirgenerek elektrot yüzeyine kaplanması sağlanmıştır.

3.1.2.2.4 PLATİN MİKROELEKTROTLARA ENZİMİN POLİMER ARACILIĞIYLA İMMOBİLİZASYONU

Hazırlanan OFD monomeri çözeltisinde 5 mg/mL enzim konsantrasyonu sağlanacak şekilde glikoz oksidaz enzimi çözündürülür. Daha sonra 10 dk. süreyle, 25 °C 'de, +0.65 V potansiyel uygulanarak monomer OFD 'nin polimerleşerek enzim moleküllerini de içerisine alarak elektrot yüzeyine kaplama yapması sağlanmıştır.

3.1.2.3 ÖLÇÜM İŞLEMLERİ

3.1.2.3.1 AKIM-ZAMAN EĞRİLERİNİN ELDE EDİLMESİ

Kaplama işlemleri tamamlanarak kullanıma hazır hale getirilen platin mikroeletrot (çalışma elektrodu) içerisinde fosfat tamponu (pH = 7.4) bulunan 10 mL 'lik çalışma hücre sine yerleştirildi. Aynı çalışma hücre sine Ag/AgCl referans elektrodu ve yardımcı elektrot olarak kullanılan ikinci bir platin tel yerleştirildi. Çalışma elektroduna referans elektroda karşı +0.30 V ile +0.65 V arasında uygun potansiyel uygulandı. Aynı anda çalışma hücre sindeki çözeltiye manyetik karıştırıcıyla karıştırma işlemi uygulandı. Uygulanan potansiyele karşı elde edilen akım değerlerinin sabit bir platoya ulaşması beklendi. Akım değerlerinde sabitlik gözlemlendikten sonra belirli konsantrasyonda hazırlanan glukoz çözeltisi enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan önce akımın tekrar sabit değere ulaşması beklendi. Enzimatik eğrilere ait sabit akım platosuna ulaşılana kadar işlem sürdürüldü.

3.1.2.3.2 KALİBRASYON EĞRİSİNİN ELDE EDİLMESİ

Belirli konsantrasyondaki glukoz çözeltisi enjekte edilince akım-zaman eğrisindeki gözlenen akım artışları konsantrasyon değerlerine karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi. Bunun için akım-zaman eğrisinde oluşan eğrinin genliği mm cinsinden ölçülerek duyarlılık katsayısıyla çarpıldı. Elde edilen bu akım değerleri her enjeksiyon ile artan konsantrasyon değerlerine karşı grafiğe geçirildi. Daha sonra elde edilen bu kalibrasyon eğrisinin yorumu yapıldı.

3.1.3 KULLANILAN CİHAZLAR

Çalışmalar esnasında kullanılan tüm cihazlar TABLO 11 'de verilmiştir :

TABLO 11 : Çalışma ve ölçümler esnasında kullanılan cihazlar.

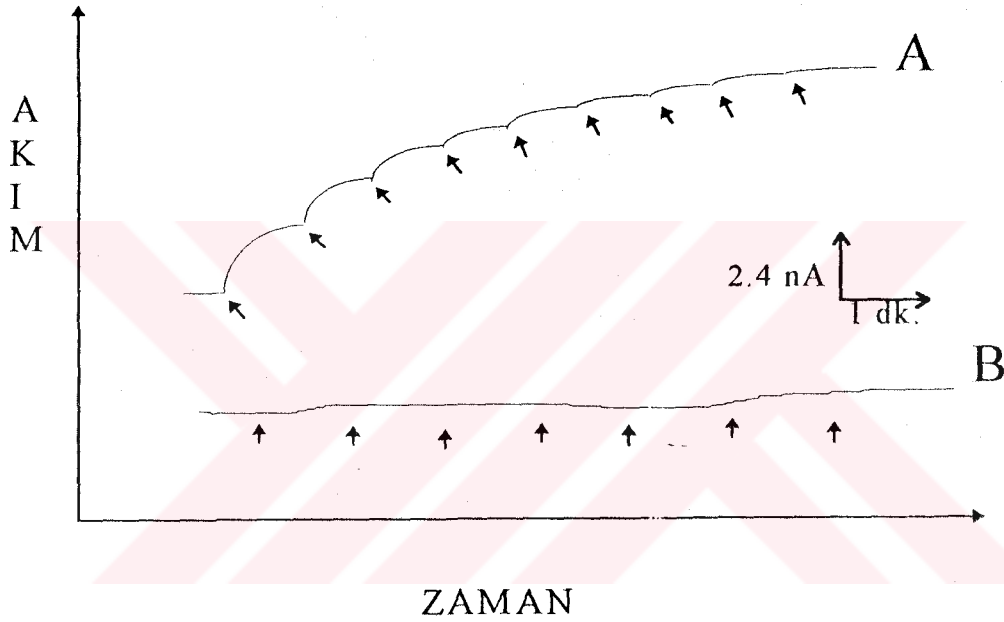
<i>CİHAZ</i>	<i>MARKA</i>
Amperometrik Analizör (Potentiostat)	1) EG&G Princeton Applied Research Model 264A Polarographic Analyzer/Stripping Voltammeter 2) Metrohm 626 Polarecord
pH metre	Schott-Mainz pH-meter CG710
Manyetik Karıştırıcı	Nüve MK 20
Hassas Terazî	Sartorius 2442

4. BÖLÜM III

4.1 BULGULAR

4.1.1 AKIM-ZAMAN EĞRİSİNİN YORUMLANMASI

Çalışmamızda elde edilen akım-zaman eğrisi ŞEKİL 7 'de verilmiştir :



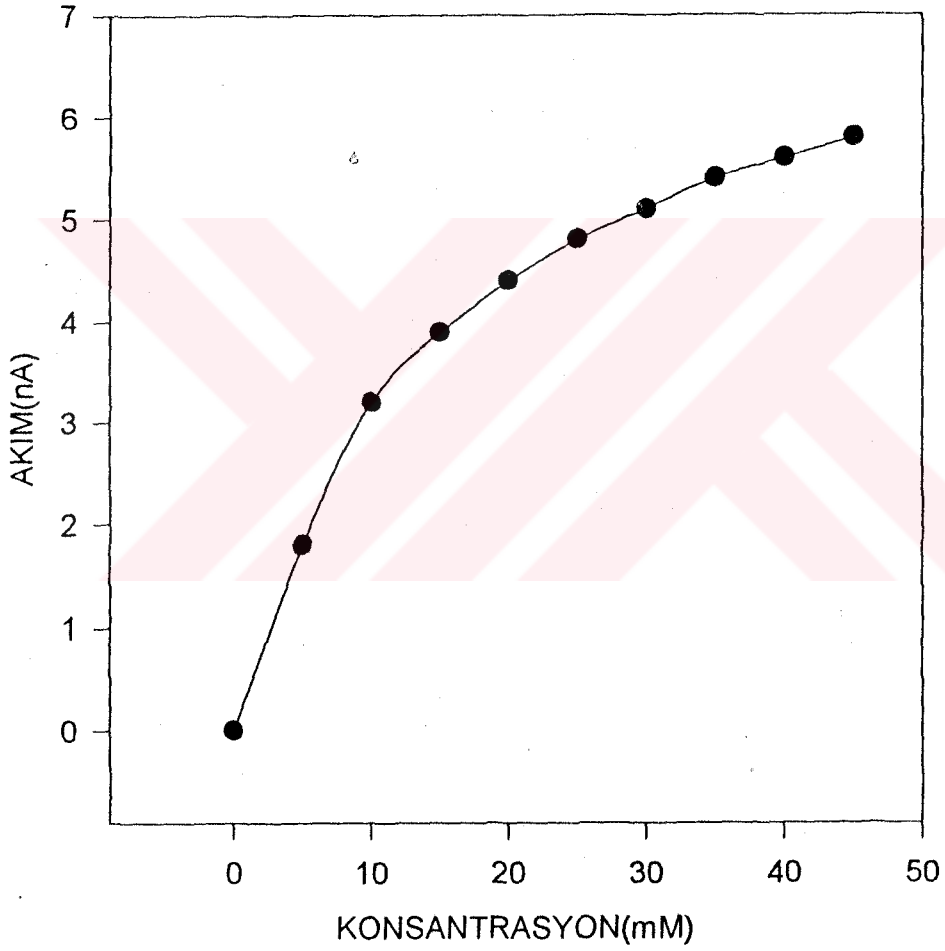
ŞEKİL 7 : Çalışmalar sırasında elde edilen Akım-zaman eğrisi.

Bu grafikte “A” harfiyle gösterilen eğri glukoz oksidaz enzimiyle kaplanmış elektrotla yapılan deneyi, “B” harfiyle gösterilen eğri ise enzim kaplanmamış (kör) elektrot ile yapılan deneyi göstermektedir. Enzim ile modifiye edilen elektrot 5 mM ‘lık partiler halinde yapılan glukoz enjeksiyonlarına cevap vererek akım değerlerinde artışa sebep olmuştur. İlerleyen zamanla birlikte akım değerlerindeki artışta azalma görülmektedir. akım değerlerindeki artıştaki bu azalma enzimatik eğrilerin karakteristik özelliklerindedir. “B” harfi ile gösterilen

enzimsiz elektrot ise yapılan enjeksiyonların hiç birisine cevap vermedi. Böylece enzimli elektrotta akım değerlerinde gözlenen artışın glukoz enjeksiyonlarından kaynaklandığı gösterilmiştir.

4.1.2 KALİBRASYON EĞRİSİNİN YORUMLANMASI

Akım-zaman grafiğinden elde edilen kalibrasyon eğrisi ŞEKİL 8 'deki gibidir :

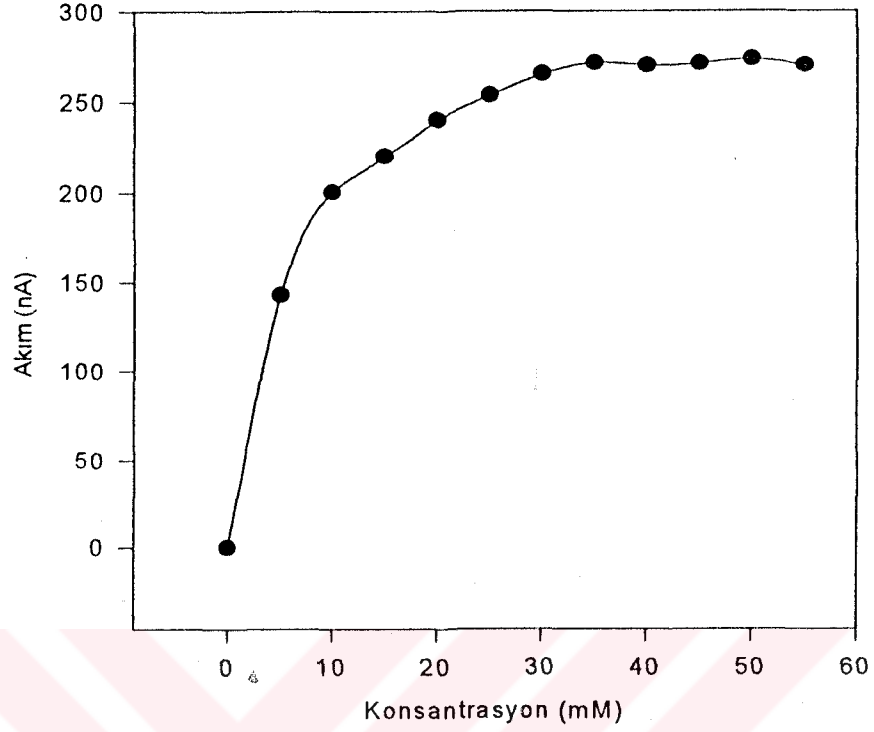


ŞEKİL 8 : Ölçümler sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi(akım-konsantrasyon eğrisi).

Kalibrasyon eğrisinde 5 mM 'lık ilk glukoz enjeksiyonlarında akım değerlerinde hızlı bir artış gözlenirken, ortamda glukoz konsantrasyonu arttıkça akımın artış miktarında azalma olmaktadır. Bu enzimatik eğrilerin karakteristik özelliklerindedir. Ölçüm sırasında çalışma potansiyeli +0.3 V olup çalışma çözeltisi karıştırılmıştır. Kalibrasyon eğrisinde lineerlik 10 mM konsantrasyon değerine kadar gözlenmiş daha sonra lineerlikten sapma gözlenmiştir. Konsantrasyon değerleri arttıkça lineerlikten sapmada artmış ve en son olarak akım değerleri sabit bir platoya ulaşmıştır.

Elde edilen kalibrasyon eğrisinden konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin miktar tayinlerini yapmak mümkündür : Bunun için önce standart glukoz çözeltisinin belirli miktarlarda çalışma ortamına eklenmesiyle hazırlanan kalibrasyon eğrisinde lineerliğin gözlemlendiği aralığın saptanması gereklidir. Bu aralık saptandıktan sonra miktar tayini yapılacak örnek eğer bu lineerliğin gözlemlendiği konsantrasyon aralığına giriyorsa hemen enjeksiyon yapılır. Akım değerinde gözlemlenen artıştan miktarı kaydedilir. Daha sonra bu değer Y ekseninde işaretlenir ve Y eksenindeki noktadan X eksenine paralel olacak şekilde lineer doğruya kadar gidilir. Oradan X eksenine dik olacak şekilde aşağıya inilirse eklenen bilinmeyen örnekteki glukoz miktarı bulunmuş olur.

Hazırlanışı tamamen aynı şartlarda olmakla beraber glukoz tayini +0.65 V 'luk çalışma potansiyelinde yapılmış enzimli elektrodun kalibrasyon eğrisi ise ŞEKİL 9 'daki gibi elde edilmiştir :

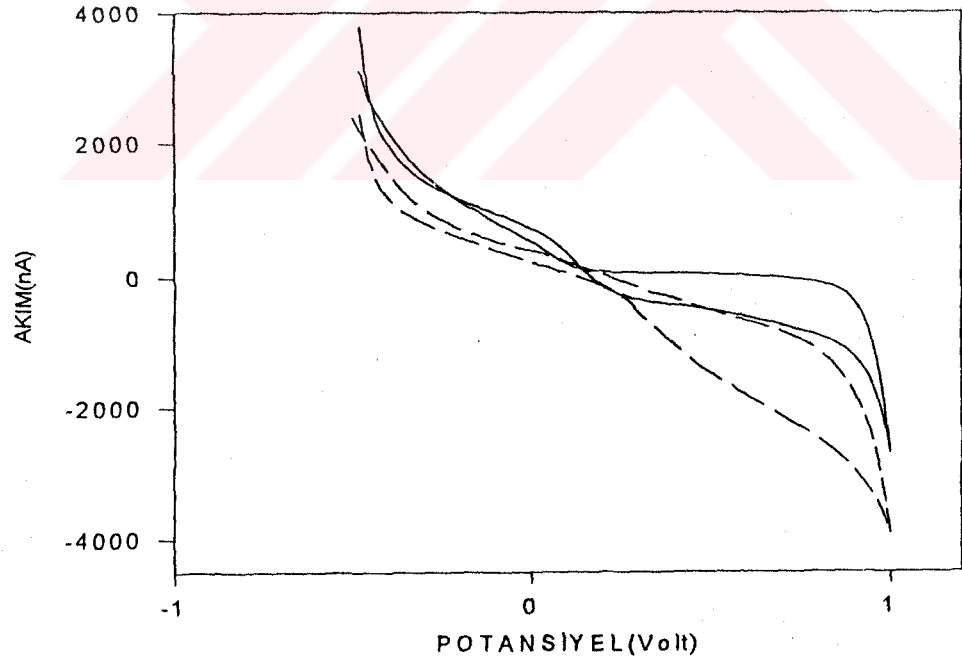
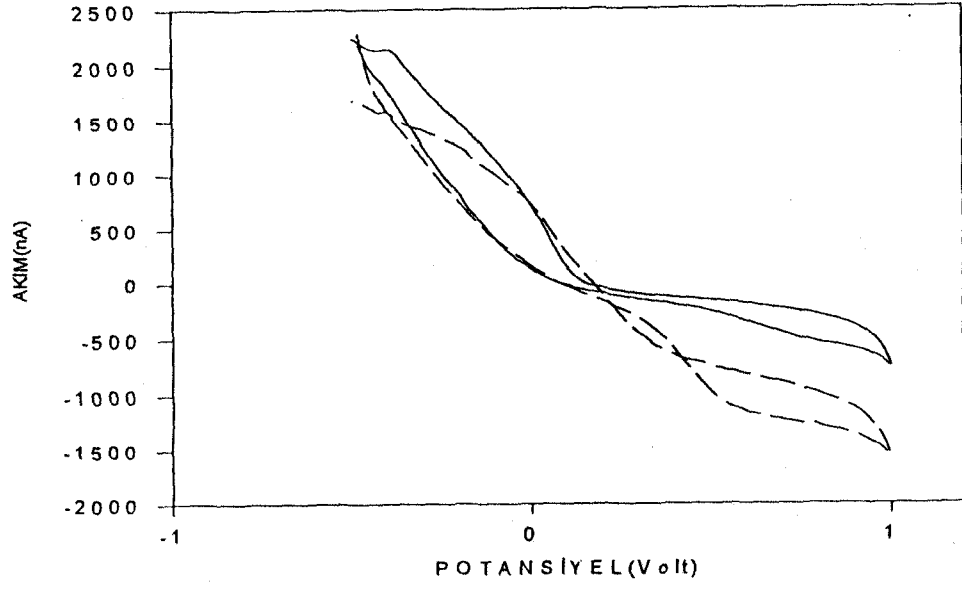


ŞEKİL 9 : Aynı yöntemler kullanılarak hazırlanan enzimli elektrot ile +0.65 V 'da alınan kalibrasyon eğrisi.

Grafikten de görüldüğü üzere çalışma potansiyeli 0.35V artırılarak +0.65V 'a getirildiğinde elektrodun cevabında olağan olarak oldukça yüksek artışlar gözlenmiştir. Bunun sebebi glukozun enzimatik ürünü olan elektroaktif özellikteki H_2O_2 'nin yüksek potansiyellerde çok kolay oksitlenme özelliğine sahip olmasıdır.

4.1.3 SIKLIK VOLTAMOGRAMLARIN YORUMLANMASI

Enzim elektrodunun siklik voltametri ile yapılan tetkiklerinin onucunda elde edilen siklik voltamogram ŞEKİL 10 'daki gibidir:



ŞEKİL 10 : Enzimli ve enzimsiz elektrotla elde edilmiş siklik voltamogramlar.

İlk voltamogram Rodyum kaplaması yapılmamış elektrot ile alınmıştır. İkinci voltamogram ise Rodyum kaplaması yapılmış elektrot ile alınmıştır. Her iki elektrottada düz çizgiyle gösterilen voltamogramlar ortamda var olan sadece fosfat tamponuna aittir. Kesik çizgi ile gösterilen voltamogramlar ise fosfat tamponu bulunan ortama 20 mM glukoz eklenerek alınmıştır. Her iki elektroda ait voltamogramda da fosfat tamponu bulunan ortama 20 mM glukoz eklenerek alınan voltamogramlarda farklanma gözlenmiştir. Negatif işaretli akım değerlerinde (oksidatif akım) negatif istikamette gözlenen artış, glukozun oksitlenmesiyle oluşmuştur. Rodyum kaplaması yapılan elektrotta glukozun oksitlenmesinin getirdiği akım değerindeki artış diğer elektroda göre daha fazla olmaktadır, yani oksidasyon daha düşük potansiyellere kaydırılmıştır. Rodyum kaplanan elektrottaki bu farklılık elektroda avantaj sağlamakta ve Rodyum metalinin elektrokatalitik özelliğinden kaynaklanmaktadır. Her iki elektrotla alınan voltamogramda da oksidatif akım potansiyel değeri arttıkça artmaktadır. Rodyum kaplaması yapılmamış elektrotta +0.3 V potansiyel değerleri civarında okunan akım -500 nA civarındayken, Rodyum kaplaması yapılmış elektrot +0.3 V potansiyel değeri civarında okunan akım -1000 nA civarındadır. Böylece aynı koşullar altında Rodyum 'lu elektrodun +0.3 V potansiyel değerinde daha yüksek oksidatif akım değerleri verdiği için düşük potansiyellerde amperometrik glukoz miktar tayinleri için daha uygun olduğunu göstermektedir.

4.1.4 GİRİŞİM YAPABİLECEK MADDELERİN (INTERFERANSLARIN)

İNCELENMESİ

Amperometrik glukoz biyosensörlerin kan, idrar gibi kompleks ortamlarda da kullanılabileceği düşünülerek böyle ortamlarda bulunabilecek ve potansiyel interferans olarak davranabilecek maddelerin etkileri mutlaka incelenmelidir. Amperometrik glukoz biyosensörü tasarımı yapılan çalışmada çeşitli interferans maddelerinin etkileri incelenmiştir. Bunlar : Üre,

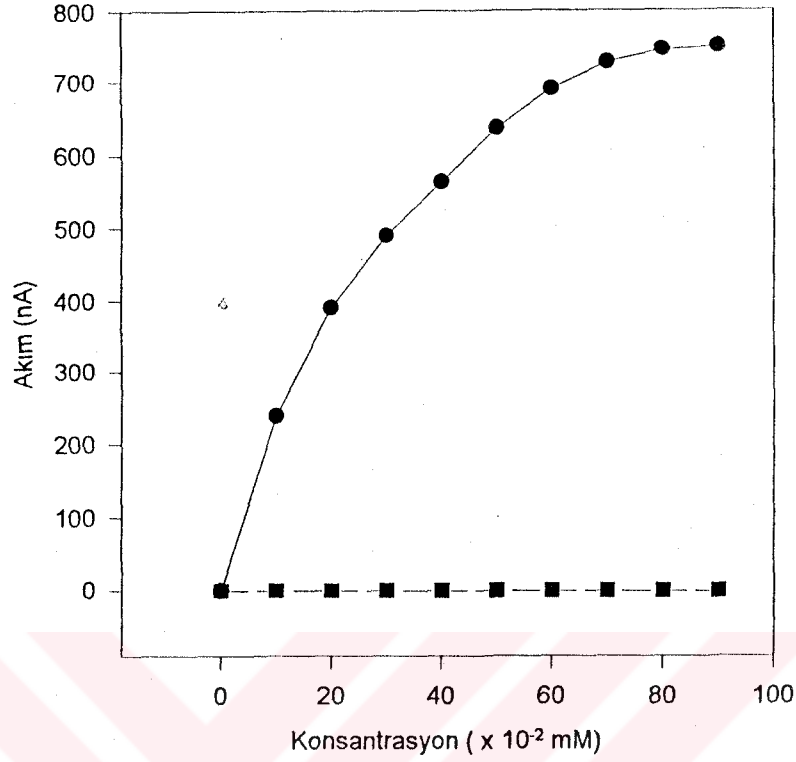
Parasetamol, Ürik Asit, Askorbik Asit, Fruktoz 'dur. Bu maddelerin glukozun cevabına göre oranını gösteren TABLO 12 şöyledir :

<u>ELEKTROT % CEVABI</u>	<u>GİRİŞİM YAPAN MADDE</u>
5.77	ÜRE
2.42	FRUKTOZ
1.82	ÜRİK ASİT
1.82	ASKORBİK ASİT
0.91	PARASETAMOL

TABLO 12 : Girişim yapan maddelerin etkisini inceleyen tablo.

-Enzimli elektrodun glukoz enjeksiyonuna verdiği cevap 100 birim kabul edildiğinde, aynı elektrodun çeşitli girişim yapan maddelere verdiği cevap bu tabloda sıralanmıştır. Enzimli elektrodun tüm girişim yapan maddelere verdiği toplam cevap ise: % 5.77 + % 2.42 + % 1.82 + % 1.82 + % 0.91 = % 12.74 'dür. Böylece kullanılan enzimli elektrodun cevabını 100 birim kabul edildiğinde, bu cevabın % 87.26 'sı ortamda bulunan glukozla, arta kalan % 12.74 'ü ise girişim yapan maddelere ait olacaktır. Girişim yapan maddelerin elektrot reaksiyonuna etkileri incelenirken enjeksiyonlarda kullanılan çözeltiler bu maddelerin vücutta buldukları fizyolojik konsantrasyonlarına göre hazırlanmıştır. Bu maddelerin fizyolojik konsantrasyonlar şunlardır : Askorbik asit = 0.01-0.11 mM, Ürik asit = 0.27-0.48 mM, Fruktoz = <0.4 mM, Parasetamol = <0.17 mM, Üre = 1.3 - 4.3 mM

Askorbik asitin +0.65V (-●-) ve +0.30 V(-■-) potansiyelde fizyolojik konsantrasyonda iken gösterdiği girişim etkileri aşağıdaki ŞEKİL 11 'de gösterilmiştir :



ŞEKİL 11 : Değişik çalışma potansiyellerinde askorbik asit girişim etkilerini gösteren grafik.

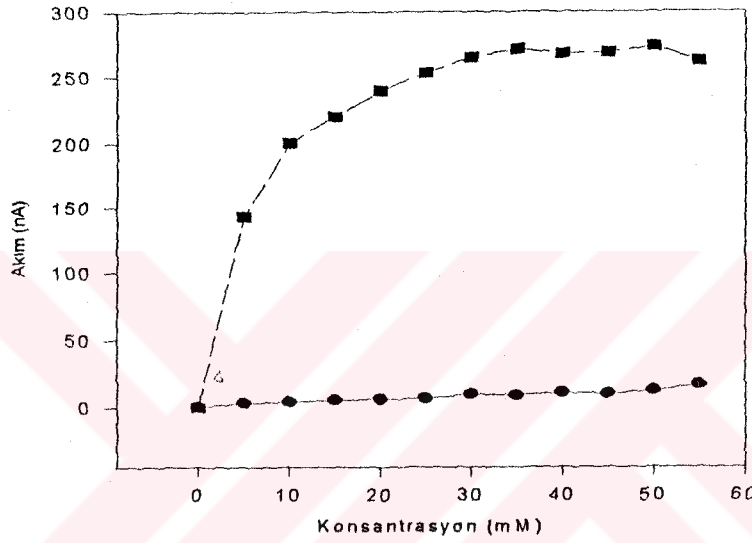
Grafikten görüldüğü üzere +0.65 V (●) potansiyel değerinde fizyolojik konsantrasyondaki askorbik asit enjeksiyonlarına yüksek akım değerleriyle cevap veren enzimli elektrot; +0.30 V potansiyel değerinde 0.0 nA akım değerine çok yakın cevaplar vermiştir. +0.30 V 'da askorbik asit enjeksiyonundan alınan cevaplar +0.30 V 'da (■) glukoz enjeksiyonlarına alınan cevapların yaklaşık % 2 'si kadardır. (Gösterilmedi)

4.1.5 RODYUM KAPLAMA İŞLEMİNİN ENZİM KAPLAMASINDAN SONRA

YAPILMASININ CEVABA ETKİSİ

Bölüm III 'de Elektrot İşlemleri kısmında belirtildiği üzere ölçümlerde kullanılan tüm enzimli elektrotlarda elektriksel Rodyum kaplanması glukoz oksidaz enziminin OFD

polimeriyle kaplanmasından önce yapılmıştır. Rodyum kaplanmasının öne alınmasının sebebi Rodyum standart çözeltisinin % 5 'lik HCl çözeltisi içerisinde hazırlanmış olması sebebiyle enzim ile asit moleküllerinin temasını önleyerek olası bir enzim koagülasyonunu önlemek içindir. % 5 'lik HCl çözeltisinin enzimli elektroda etkisi incelenmek üzere Rodyum kaplamasının sonra yapılmış enzimli elektrot hazırlanarak +0.65 V 'da kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Asit moleküllerinin enzime etkisi ŞEKİL 12 'de gösterilmiştir :

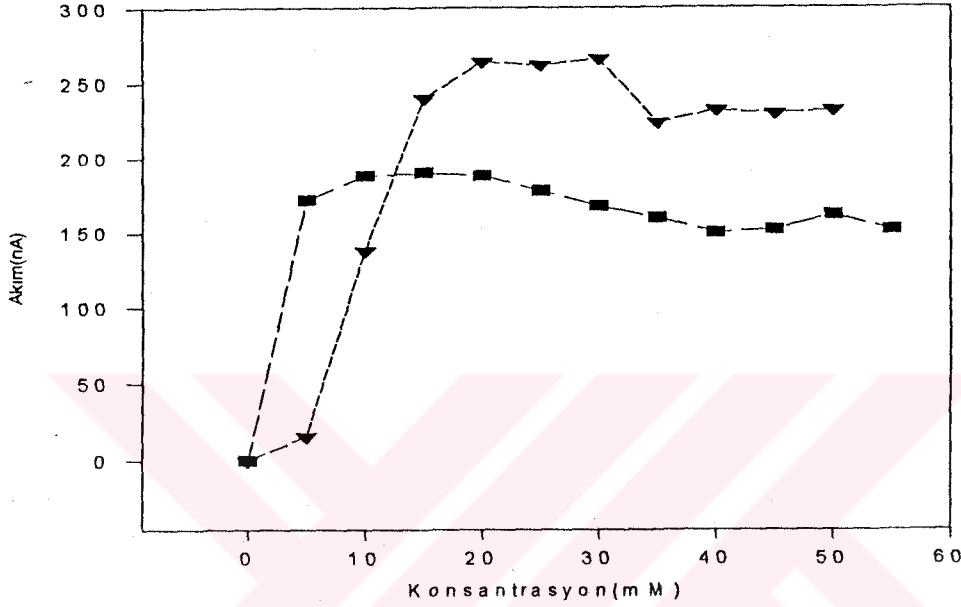


ŞEKİL 12 'ye ait grafikte noktaları dikdörtgenle işaretlenen eğri (-■-) Rodyum kaplaması enzim kaplamasından önce yapılmış bir elektroda aittir. Daire(-●-) kullanılarak çizilen eğri ise Rodyum kaplaması enzim kaplamasından sonra yapılmış bir elektroda aittir. Grafikte de görüldüğü üzere enzim molekülleri % 5 'lik HCl çözeltisiyle temas ettikten sonra koagüle olmuş elektrodun cevabı 0.0 nA akım değerine çok yaklaşmıştır.

4.1.6 METAL ELEKTRİKSEL KAPLAMA POTANSİYELİNİN CEVABA ETKİSİ

Elektrokatalitik etkisinden yararlanmak üzere elektriksel kaplama uygulanan VIII B grubu metallerin kaplama işleminde uygulanan potansiyel -0.8 V 'dur. Bu potansiyelde kaplama yapılmış çeşitli çalışmalar mevcuttur(13). Kaplanan Rh miktarının dolayısıyla elektrokatalitik

etkinin kaplama potansiyelinin düşürülmesinden nasıl etkileneceği araştırıldı. Bunun için önce -800 ile -400 mV potansiyel değerlerinde iki ayrı kaplama yapıldı ve glukoz enjeksiyonlarıyla denendi. Glukoz enjeksiyonlarına karşı elde edilen akım değerleri grafiğe geçirilerek ŞEKİL 13 elde edildi :



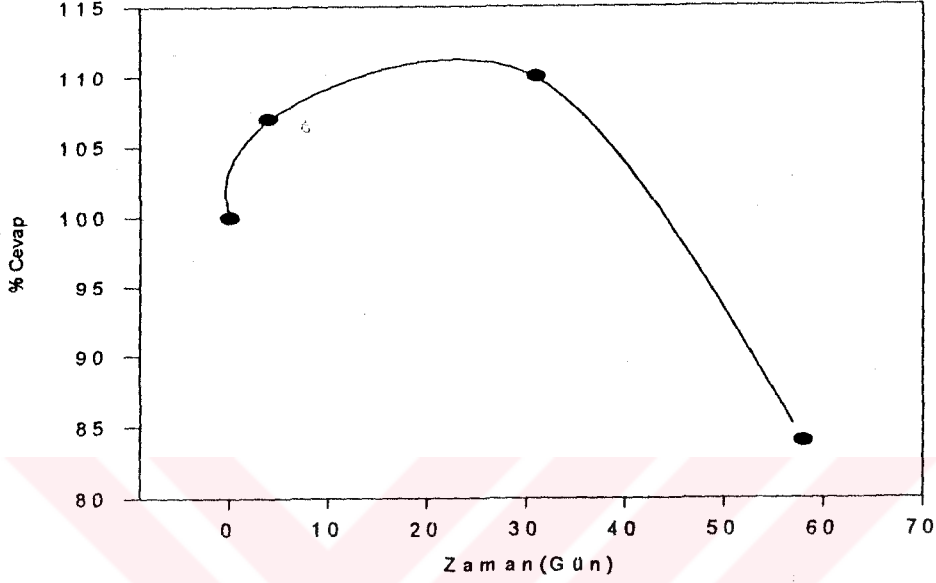
ŞEKİL 13 : Rodyum elektriksel kaplama potansiyelinin değiştirilmesinin elektrot cevabına etkisi.

Grafikte dikdörtgen ile gösterilen eğri -400 mV da yapılan Rh kaplamasını, üçgen ile gösterilen eğri ise -800 mV da yapılan Rh kaplamasını göstermektedir. -400 mV da alınan ölçümlerde alınan akım değerlerinde düşüş gözlenmiştir. Kaplama potansiyelindeki azalma sebebiyle kaplanan Rh miktarında azalmıştır. Dolayısıyla akım değerlerinde gözlenen düşüş, kaplanan Rh miktarındaki azalmadan kaynaklanmaktadır.

4.1.7 ELEKTROT STABİLİTESİNİN İNCELENMESİ

Rh kaplanmış enzimli elektrodun stabilitesini incelemek için Rh kaplanmış üç ayrı elektrotla ölçüm alınmış ve okunan akım değerlerinin aritmetik ortalamaları alınarak elektroda

ait stabilite eğrisi çıkarılmıştır. Çalışma potansiyeli olarak +0.30 V potansiyel seçilmiştir. Ortamdaki glukoz konsantrasyonu her seferinde tek enjeksiyon sonucu 5 mM 'dır. Elde edilen stabilite grafiği ŞEKİL 14 'de verilmiştir:



ŞEKİL 14 : Enzimli elektrode ait stabilite eğrisi.

Stabiliteye başladığı gün alınan 6,8 nA 'lık akım değeri 4. gün 7,3 nA 'e yükselmiştir. Daha sonra 31. günde 7,2 nA değerindeyken, 58. gün 5,75 nA değerine gerilemiştir. İlk okunan akım değeri olan 6,8 nA % 100 kabul edilince 4. günde okunan ikinci akım değeri % 107 'ye yükselmiştir. 31. günde üçüncü akım değeri % 110 'na tekabül etmektedir. 58. günde dördüncü akım değerinde azalma eğilimi gözlenmiş ve % 84 olarak gerçekleşmiştir. Böylece iki ay boyunca stabilitesi izlenen elektrotların cevabının 60. günün sonunda % 100 'den % 85 'e gerilediği gözlenmiştir.

5. BÖLÜM IV

5.1 TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1.1 TARTIŞMA

Amperometrik miktar tayinlerinde analizlenecek maddenin ya da ürünün elektroaktif olması gerekmektedir. Bu çalışmada miktar tayini yapılan glukozun enzimatik yıkım ürünü olan H_2O_2 elektroaktiftir. H_2O_2 amperometrik olarak +0.7 V civarındaki potansiyelerde oksitlenebilir. Geliştirilen Rodyum kaplanmış glukoz oksidaz elektroduyla oksidasyon +0.3 V potansiyel değerinde gerçekleştirildi. Oluşan oksidasyon sonucu gözlenen akım (oksidatif akım) değerlerinden yola çıkılarak glukoz konsantrasyonu bulundu çünkü oluşan akım değerleri H_2O_2 konsantrasyonu ile orantılıdır. H_2O_2 konsantrasyonu da çalışma ortamında bulunan glukoz konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Glukoz miktar tayininin hangi potansiyel aralığında yapılabileceğini tayin etmek için hazırlanan Rodyum kaplı enzim elektroduyla siklik voltamogram alındı. Alınan voltamogramda glukozdan enzimatik olarak oluşturulan H_2O_2 'nin +0.2 ile +1.0 V potansiyel değerleri aralığında oksidasyona uğradığı gözlemlendi. Bununla birlikte +0.2 V 'da gözlemlenen oksidatif akımın oldukça küçük olması sebebiyle aslında çalışılabilir aralığın +0.3 ile +1.0 V potansiyel değerleri arasında olduğu anlaşıldı. Çalışma potansiyeli olarak mümkün olan en küçük potansiyel değeri seçilmesi gerektiğinden +0.3 V seçildi. Bunun sebebi kompleks ortamlarda (kan, idrar vb.) çalışıldığında ortamda bulunan girişim yapabilecek çeşitli maddelerin (askorbik asit, ürik asit, üre, parasetamol vb.) yüksek potansiyelerde ($\geq + 0.65$ V) aynen glukoz gibi oksitlenebilmesi sebebiyle glukoz miktar tayinlerinde pozitif hataların gözlenmesidir. Bu sebeple çalışma potansiyeli düşürülmüştür. Böylece girişim yapan maddelerin etkileri büyük ölçüde

ortadan kaldırılmıştır. Hazırlanan enzimli elektrodun glukoz enjeksiyonuna verdiği cevap 100 birim kabul edildiğinde girişim yapan tüm maddelerin toplam cevabı 12.74 birim olarak gerçekleşmiştir. Potansiyel düşürmek için elektrokatalitik özelliğe sahip olduğu bilinen VIII B grubu metallere Rodyum, elektriksel kaplama yöntemiyle enzimli elektrodun dış yüzeyine kaplanmıştır. Rodyum kaplanmamış ve sadece glukoz oksidaz enzimi ile o-fenilen diamin(OFD) polimeri kaplanmış elektrot +0.3 V potansiyelde glukoz enjeksiyonlarına cevap vermemiştir. Rodyum kaplı elektrot ise glukoz enjeksiyonlarına tatminkar cevaplar vermiştir. Böylece Rodyum metalinin elektroaktif etkisi kanıtlanmıştır.

Elektrokatalitik Rodyum metalinin elektriksel kaplama potansiyeli olan -0.8 V değeri -0.4 V değerine indirilerek kaplama potansiyelinin enzimli elektrot cevabına etkisi incelenmiştir. -0.4 V potansiyelde yapılan elektriksel kaplama sonucunda hazırlanan enzimli elektrodun cevaplarında önemli ölçüde azalma gözlemlenmiştir. Bunun sebebi ise azalan kaplama potansiyeli sebebiyle daha az Rodyum metalinin elektrot yüzeyine kaplanması ve dolayısıyla da elektrokatalitik etkide azalma gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda da glukoz enjeksiyonunun cevabı azalmıştır.

Hazırlanan enzimli elektrotların stabiliteleri 60 gün süreyle takip edilmiştir. 4. günden itibaren hafif artış gösteren elektrot aktivitesi 58. gün sonunda ilk aktivite değerinin % 85 'i olan 5,75 nA akım değerine düşmüştür. 2 ay sonunda yakalanan % 85 'lik cevap yüzdesi, hazırlanan enzimli elektrodun stabilitesinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Hazırlanan enzimli elektrodun tekrarlanabilirlik parametresi aynı elektrot üzerinde denenmiştir. Bu işlem için seçilen elektrot çalışma hücrelerine yerleştirilmiş ve sabit akım değerleri yakalandıktan sonra bir adet glukoz enjeksiyonu yapılmıştır. Oluşan akım değeri kaydedilmiştir. Daha sonra elektrot çalışma hücrelerinden çıkarılmış ve çalışma hücreleriyle beraber yıkanmıştır. İkinci enjeksiyondan önce elektrot tampon ilave edilen çalışma hücrelerine tekrar oturtulmuş ve çalışma potansiyeli tekrar tatbik edilmiştir. Elektrodun sabit akım değerine

ulaşması beklendikten sonra ikinci enjeksiyon yapılmıştır. Bu şekilde 6 adet enjeksiyon yapılmıştır. Çalışma potansiyeli olarak seçilen potansiyel değeri +0.65 V olup her bir glukoz enjeksiyonu sonucunda ortamın glukoz konsantrasyonu 5 mM olmuştur. 6 adet enjeksiyon sonucunda elde edilen 6 adet akım değerinin toplamı (Σx) 107 nA 'dır. Aritmetik ortalaması 17.8 nA 'dır. Standart sapma (s) değeri 2.99 nA olup, varyasyon yüzdesi (% CV) ise 16.7 olarak gerçekleşmiştir. Tekrarlanabilirlik paramatresinin incelenmesi sonucu % CV değeri olumsuz olacak şekilde oldukça yüksek bulunmuştur. Dolayısıyla tasarlanan elektrot prototipinin dahada geliştirilmesi gerekmektedir.

5.1.2 SONUÇ

Çalışmamda amperometrik olarak glukoz miktar tayini yapabilen ve değişik ortamlarda çalışıldığında girişim yapabilecek maddelerden mümkün olduğunca az etkilenecek bir biyosensör tasarımı yapıldı. Denenen parametreler arasından ; çalışmayı girişim yapabilecek maddelerden etkilenmeyi önlemek için potansiyelinin düşürülmesi, elektrot stabilitesinin iyi olması, Rodyum metalinin elektrokatalitik etkisinin kanıtlanması işlemlerinde başarı sağlanmıştır. Ama tekrarlanabilirlik parametresinde yeterli başarı sağlanamamıştır (% CV = 16.7).

Aniperometrik glukoz çalışmalarında en büyük sorunlardan birisi olan girişim yapan maddelerin etkisi tasarlanan enzim elektrodunda oldukça azaltılmıştır. Özellikle kanda fizyolojik olarak bulunan askorbik asitin +0.65 ve +0.30 V potansiyel değerleri arasında oluşturduğu akımlar arasında büyük fark vardır. +0.65 V 'da fizyolojik konsantrasyon kullanılarak hazırlanan kalibrasyon grafiğinde askorbik asit glukozdan daha yüksek akım değerleri oluştururken; +0.30 V 'da askorbik asitin akım değerleri glukozun akım değerlerinin % 2 'sine denk gelen akım değerlerine geri çekilebilmiştir. Böylece in vivo çalışmalar uygun boyutlarda olması için mikroelektrot olarak tasarlanan ve imal edilen enzim elektrodu kan, idrar gibi

girişim yapabilecek özellikte birçok maddeyi içeren kompleks ortamlarda kullanılabilir düzeyde prototipin modifiye edilmesiyle kolaylıkla getirilebilecektir.

Rodyum metalinin elektrokatalitik etkisi, ikiside enzimli olup bir tanesine metalik kaplama yapılmamış elektrotlara ait akım değerlerinin kıyaslanmasıyla ispat edilmiştir. Kaplama yapılmamış enzimli elektrot çalışma potansiyeli olan +0.30 V potansiyelde glukoz enjeksiyonlarına cevap vermezken Rodyum metalinin elektriksel kaplaması yapılan enzimli elektrot oldukça tatminkar sonuçlar vermiştir. Böylece Rodyum metalinin elektrokatalitik etkisi kanıtlanmıştır.

% 5 'lik HCl çözeltisi içerisinde hazırlanmış Rodyum çözeltisi kullanılarak yapılan elektriksel Rodyum kaplama işlemi enzim kaplama işleminden sonra gerçekleştirilince elektrot cevabında çok büyük boyutlarda azalma görülmüştür. Bunun sebebi glukoz oksidaz enzimi moleküllerinin % 5 'lik HCl çözeltisiyle temas etmeleri sonucunda koagüle olmaları ve dolayısıyla da glukoz molekülleriyle etkileşememeleridir. Böylece elektrot hazırlamasında Rodyum kaplama işlemi enzimin asitten etkilenmemesi için enzim kaplama işleminden önce gerçekleştirilmiştir.

Elektriksel kaplaması yapılan Rodyum metalinin elektrokatalitik etkisinin elektrot yüzeyine kaplanan metal miktarıyla doğru orantılı olduğunda ayrıca kanıtlanmıştır. Bunun için -0.4 V ve -0.8 V potansiyel değerlerinde iki ayrı elektroda Rodyum elektriksel kaplaması yapılmıştır. Hazırlanan enzimli elektrotlar glukoz enjeksiyonlarıyla denediklerinde -0.4 V ile kaplaması yapılmış olan enzimli elektrodun cevabının -0.8 V ile kaplaması yapılanaya göre düşük olduğu gösterilmiştir. Böylece Rodyum ' un elektrokatalitik etkisinin elektrot yüzeyine elektriksel kaplamayla kaplanan miktarıyla doğru orantılı olduğu kanıtlanmıştır.

Sonuç olarak çalışmalarda genellikle belirtilenin aksine düşük çalışma potansiyelinde (+0.3 V), amperometrik olarak glukoz miktar tayini yapabilen ve düşük potansiyelde çalışıldığı için ortamda bulunabilecek girişim yapabilecek maddelerden minimum düzeyde etkilenen

biyosensörün tasarımı ve imali gerçekleştirilmiştir. Deneyler sonucunda gözlemlenen toplam % 12.74 'lük toplam girişim etkisi, prototipin modifikasyonu çerçevesinde ikinci bir koruyucu membran(CA = selüloz asetat) ilavesiyle hemen hemen tamamıyla ortadan kaldırılabilir^{35, 22}. Yapılan tasarımın sağladığı bir diğer avantaj ise enzimli elektrodun çapının 50 µm olması sebebiyle in vivo glukoz tayinleri içinde uygun boyutlarda dizayn edilmiş olmasıdır. Bununla birlikte in vivo kullanım için aksayan kısımların modifiye edilerek biyosensör prototipinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.



5.2 ÖZET

Daha önce literatüre geçmiş çalışmalardan farklı olarak düşük potansiyelerde (+0.3 V) amperometrik olarak glukoz miktar tayini yapabilen bir biyosensör dizaynı ve imali yapıldı. Biyosensörün tasarımında önce çalışma elektrodu hazırlandı. Çalışma elektrodu olarak teflon kaplı, 50µm çapında platin mikroelektrot kullanıldı. Çalışma elektroduna O-fenilen diamin polimeri vasıtasıyla glukoz oksidaz enzimi kaplaması uygulandı. Son olarakta enzimli elektrodun dış yüzeyine elektriksel kaplama yöntemiyle Rodyum kaplaması uygulandı. Tasarımı yapılan biyosensör glukozun enzimatik oksidasyonu sonucunda açığa çıkan H_2O_2 'yi + 0.3 V 'da oksitlemekte ve bunun karşılığında oksidatif akım oluşturmaktadır. Oluşan bu akım H_2O_2 ile; dolayısıyla da glukoz konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Biyosensörün glukozu düşük potansiyelerde tayin edbilmesini sağlayan Rodyum 'un elektriksel kaplamasıdır. Biyosensör düşük çalışma potansiyelinde glukoz tayini yaparak, çeşitli girişim yapabilecek maddelerin (ürik asit, askorbik asit, fruktoz, üre, vs vs) istenmeyen girişim etkilerinden korunmuştur.

Sonuç olarak hem girişim yapan maddelerin varlığından minimum düzeyde etkilenen hem de in vivo uygulamalar için boyut olarak uygun amperometrik glukoz biyosensörü, mediyatör olarak elektriksel Rodyum kaplaması kullanılarak tasarlanmış ve imal edilmiştir.

5.3 SUMMARY

An amperometric biosensor capable of determining the glucose concentration at low (+0.30 V) applied potential is designed and manufactured. To build the biosensor a teflon coated platinum wire (50 μm i.d) is used as the working electrode to be coated with the enzyme (glucose oxidase) and the polymer (O-phenylene diamine). And finally Rhodium is electroplated to the surface of the working electrode. The enzyme electrode determines the glucose concentration by oxidizing H_2O_2 . H_2O_2 is the product of enzymatic oxidation of glucose. Electroplating of Rhodium is responsible from the capability of the biosensor to work at low applied potentials. By functioning at low potential the interfering effects of some potential interferences (uric acid, ascorbic acid, fructose, urea and so on) are minimized.

Therefore finally an amperometric biosensor owning a microelectrode (suitable for in vivo applications) capable of determining glucose concentrations at low working potentials is designed and manufactured.

5.4 KAYNAKLAR

- 1) Pişkin Erhan, *Bilim Teknik*, Ocak (1994)47.
- 2) Stoecker W. Paul, Yacynych M. Alexander, *Selective Electrode Rev.*, 12(1990)137-160.
- 3) Cammann Karl, Lemke Udo, Rohen Anja, Sander Jürgen, Wilken Hildegard ve Winter Babette, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 30 (1991)516-539.
- 4) Janata Jiri, *Anal. Chem.*, 64 (1992)196R-219R.
- 5) Emr A. Sally, Yacynych M. Alexander, *Electroanalysis*, 7 (1995) 913-923.
- 6) Csöregi Elisabeth, Schmidtke W. David, Heller Adam, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 1240-1244.
- 7) Moussy Francis, Harrison Jed D., O'Brien W. Darryl ve Rajotte V. Ray, *Anal. Chem.*, 65 (1993)2072-2077.
- 8) Moussy Francis, Jakeway Stephen, Harrison Jed D. ve Rajotte V. Ray, *Anal. Chem.*, 66 (1994)3882-3888.
- 9) Csöregi Elisabeth, Quinn P. Chris, Schmidtke W. David, Lindquist Sten-Eric, Pishko V. Michael, Ye Ling, Katakis Ioanis, Hubbel A. Jeffrey ve Heller Adam, *Anal. Chem.*, 66 (1994)3131-3138.
- 10) Lowry P. John ve O'Neill Robert, *Electroanalysis*, 6 (1994)369-379.
- 11) Lowry P. John, McAteer Karl, El Atrash S. Satea, Duff Adrienne ve O'Neill D. Robert, *Anal. Chem.*, 66 (1994)1754-1761.
- 12) Wang Joseph ve Angnes Lucio, *Anal. Chem.*, 64 (1992)456-459.
- 13) Wang Joseph ve Chen Qlang, *Anal. Chem.*, 66 (1994)1007-1011.
- 14) Abe Takayuki, Lau Yau Yi ve Ewing G. A., *Anal. Chem.*, 64 (1992)2160-2163.

- 15) Pierce T. David, Unwin R. Patrick ve Bard J. Allen, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 1795-1804.
- 16) Rhodes K. Rathbun, Shults C. Mark ve Updike J. Stuart, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1520-1529.
- 17) Kawagoe L. Jodi, Niehaus E. David ve Wightman Mark R., *Anal. Chem.*, 63 (1991) 2961-2965.
- 18) Zhang Yanan, Hu Yibai, Wilson S. George, Moatti-Sirat Dinah, Poitout Vincent ve Reach Gérard, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1183-1188.
- 19) Kutner Wlodzimierz, Wu Huihuang ve Kadish M. Karl, *Electroanalysis*, 6 (1994) 934-944.
- 20) Csöregi Elizabeth, Gorton Lo ve Marko-Varga György, *Electroanalysis*, 6 (1994) 925-933.
- 21) Furbee James, Kuwana Theodore Jr. ve Kelly S. Richard, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1575-1577.
- 22) Bindra S. Dilbir, Zhang Yanan, Wilson S. George, Sternberg Robert, Thévenot R. Daniel, Moatti Dinah ve Reach Gérard, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 1692-1696.
- 23) Snejdarkova Maja, Rehak Marian ve Otto Mattihias, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 665-668.
- 24) Gunasingham Hari ve Tan Beng Chee, *Analyst*, 114 (1989) 695-698.
- 25) Yon-Hin F.Y. Bernadette, Smolander Maria, Crompton Thomas ve Lowe R. Christopher, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 2067-2071.
- 26) Sun Zhisheng ve Tachikawa Hiroyasu, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 1112-1117.
- 27) Iwuoha I. Emmanuel, Smyth R. Malcolm ve Vos G. Johannes, *Electroanalysis*, 6 (1994) 982-989.
- 28) White F. Stephen, Turner P. F. Anthony, Schmid D. Rolf, Bilitweski Ursula ve Bradley Joanne, *Electroanalysis*, 6 (1994) 625-632.
- 29) Wang Joseph, Liu Jie, Chen Liang ve Lu Fang, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 3600-3603.

- 30) Ozsoz Mehmet, Erdem Arzum, Kilinc Emrah ve Gokgunnec Levent, *Electroanalysis*, 8 (1996)147-150.
- 31) Reynolds E. R. ve Yacynych A. M., *American Laboratory*, March (1991)19-26.
- 32) Tschuncky P. ve Heinze J., *Anal. Chem.*, 67 (1995)4020-4023.
- 33) Menon P. Vinod Ve Martin R. Charles, *Anal. Chem.*, 67 (1995)1920-1928.
- 34) Compagnone Dario, Federici Giorgio ve Bannister V. Joe, *Electroanalysis*, 12 (1995)1151-1155.
- 35) Vaidya Rajesh ve Wilkins Ebtisam, *Electroanalysis*, 6 (1994)677-682.
- 36) Fortier Guy ve Belanger Daniel, *Biotechnology and Bioengineering*, 37 (1991)854-858.
- 37) Barlett N. Philip, Tebbutt Peter ve Tyrrell H. Claire, *Anal. Chem.*, 64 (1992)138-142.
- 38) Johnson W. Kirk, Bryan-Poole Nancy Ve Mastrototaro J. John, *Electroanalysis*, 6 (1994)321-326.
- 39) Leone A., Marino W. ve Scharifker B. R., *J. Electrochem. Soc.*, 139 (1992)438-443.
- 40) Reynolds E. R. ve Yacynych A. M., *American Laboratory*, March (1991)19-26.
- 41) Atanasov Plamen, Gamburgzev Sergej ve Wilkins Ebtisam, *Electroanalysis*, 8 (1996)158-164.
- 42) Lai Yip-Kai ve Wong Kwok-Yin, *Electroanalysis*, 6 (1994)919-924.
- 43) Ohara J. Timothy, Rajagopalan Ravi ve Heller Adam, *Anal. Chem.*, 65 (1993)3512-3517.
- 44) Ohara J. Timothy, Rajagopalan Ravi ve Heller Adam, *Anal. Chem.*, 66 (1994)2451-2457.
- 45) Wang Joseph, Rivas Gustavo ve Chicharro Manuel, *Electroanalysis*, 8 (1996)434-437.
- 46) Wang Joseph, Naser Najih, Angnes Lucio, Wu Hui Ve Chen Liang, *Anal. Chem.*, 64 (1992)1285-1288.
- 47) Mtonaka Junko ve Faulkner R. Larry, *Anal. Chem.*, 65 (1993)3258-3261.

- 48) Yacynych M. Alexander, "*Bioinstrumentation: Research, Developments and Applications*", Bölüm 42, sayfa: 1317-1333.
- 49) Ammon H.P.T., Ege W., Oppermann M., Göpel W. ve Eisele S., *Anal. Chem.*, 67 (1995)466-471.
- 50) Coulet R. Pierre, "*Biosensor Principles And Applications*" editör: Loic J. Blum ve Pierre R. Coulet, Marcel Dekker Inc., New York, 1991., pp 1-6.
- 51) "*Pharmaceutical Analysis Modern Methods Part B*", editör: James W. Munson, Chapter 6, Richard A. Couch ve Carter L. Olson
- 52) Katakis Ioanis ve Heller Adam, *Anal. Chem.*, 64 (1992)1008-1013.
- 53) Cosnier Serge, Innocent Christophe ve Jouanneau Yves, *Anal. Chem.*, 66 (1994)3198-3201.
- 54) Smit H. Mark ve Rechnitz A. Garry, *Anal. Chem.*, 64 (1992)245-249.
- 55) Frew E. Jane ve Green J. Monika, *Analytical Proceedings*, 26 (1989)334-335.
- 56) Scheller Frieder, Schubert Florian, Pfeiffer Dorothea, Hintsche Rainer, Dransfeld Ina, Renneberg Reinhard, Wollenberg Ulla, Riedel Klaus, Pavlova Mariana, Kühn Manfred, Müller Hans-Georg, Tan minh Pham, Hoffmann Werner, Moritz Werner, *Analyst*, 114 (1989)653-662.
- 57) Heinemann R. William, Wieck J. Henry ve Yacynych M. Alexander, *Anal. Chem.*, 52 (1980)345-346.
- 58) Centonze Diego, Malitesta Cosimimo, Palmisano Francesco ve Zambonin Giorgio Pier, *Electroanalysis*, 6 (1994)423-429.
- 59) Malitesta Cosimino, Palmisano Francesco, Torsi Luisa ve Zambonin Giorgio Pier, *Anal. Chem.*, 62 (1990)2735-2740.
- 60) Wang Joseph ve Naser Najih, *Analytical letters*, 26 (1993)1333-1346.
- 61) Dalbasti Tayfun, *Acta Neurochirurgica*, 129 (1994)229.

62) Palmisano Francesco ve Zambonin G. Pier, *Anal. Chem.*, 65 (1993)2690-2692.

63) Lowry P. John ve O'Neill D. Robert, *Anal. Chem.*, 64 (1992)456-459.



5.5 ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında İstanbul' da doğdum. İlk öğrenimimi Kütahya Uygulama İlkokulu' nda, orta öğrenimimi İzmir Özel Fatih Koleji İngilizce Bölümü' nde tamamladım. 04.07.1994 tarihinde İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi' nden mezun oldum. 16.09.1994 tarihinde Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün açtığı Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans sınavını kazandım ve Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı' nda yüksek lisans programına başladım. 10.01.1996 tarihinde yapılan araştırma görevlisi kadro sınavını kazanarak, 02.02.1996 tarihinde araştırma görevlisi olarak Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya A.B.D'ye atandım ve göreve başladım. Halen ismi geçen anabilim dalında araştırma görevlisi olarak görev yapmaktayım.