

**T.C.**  
**MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ENZİMATİK BİYOANALİZLERİN İZLENMESİNE**  
**YÖNELİK ETKİN ELEKTROKİMYASAL**  
**YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ: BİYOSENTRİ-**  
**VOLTAMMETRİ VE NANOYAPI TEMELLİ**  
**SİSTEMLER**

**DOKTORA TEZİ**

**SERDAR ÇEVİK**

**MAYIS 2013**

**MUĞLA**

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

SERDAR ÇEVİK tarafından hazırlanan ENZİMATİK BİYOANALİZLERİN İZLENMESİNE YÖNELİK ETKİN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ: BİYOSENTRİ-VOLTAMMETRİ VE NANOPYATI TEMELLİ SİSTEMLER başlıklı tezinin, 03/05/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda doktora derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

**TEZ SINAV JURİSİ**

Prof Dr. Zekerya Dursun \* (Jüri Başkanı)  
Biyokimya Ana Bilim Dalı,  
Ege Üniversitesi, İzmir

İmza: 

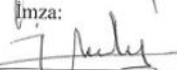
Doç. Dr. Ülkü ANIK (Danışman)  
Kimya Anabilim Dalı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza: 

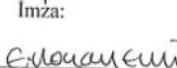
Prof. Dr. Nurgün BEŞÜN (Üye)  
Kimya Anabilim Dalı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza: 

Doç. Dr. İbrahim KULA (Üye)  
Kimya Anabilim Dalı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza: 

Yrd. Doç. Dr. Emine Sonay ELGİN (Üye)  
Kimya Anabilim Dalı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza: 

**ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI**

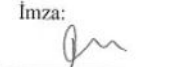
Prof Dr. Gül Asiye AYÇIK  
Kimya Ana Bilim Dalı Başkanı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza: 

Doç. Dr. Ülkü ANIK  
Danışman, Kimya Anabilim Dalı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza: 

Prof. Dr. Suna TİMUR  
İkinci Danışman, Biyokimya Ana Bilim Dalı,  
Ege Üniversitesi, İzmir

İmza: 

Savunma Tarihi: 03/05/2013

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Serdar Çevik

08/04/2013

**ÖZET**

**ENZİMATİK BİYOANALİZLERİN İZLENMESİNE YÖNELİK ETKİN  
ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ:  
BİYOSENTRİ-VOLTAMMETRİ VE NANOYAPI TEMELLİ SİSTEMLER**

Serdar ÇEVİK

Doktora Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ülkü ANIK

İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. Suna TİMUR

Mayıs 2013, 139 sayfa

Bu doktora tezinde sentri-voltammetri ilk kez biyosensör sistemi ile birleştirilmiştir. Bu yöntemle biyosentri-voltammetri (aynı zamanda sentri-biyovoltammetri olarak da bilinmektedir) adı verilmiştir. İlk bölümde, camımsı karbon elektrot üzerine modifiye edilen Au film ile asetilkolin (ATCh) tayini gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullar altında ATCh için analitiksel karakteristik çalışmaları yapılmıştır. İkinci bölümde, biyosentri-voltammetri ile ATCh tayini gerçekleştirilmeden önce biyosentri-voltammetri yöntemi iyi bilinen bir enzimatik sisteme uygulanmıştır. Bu amaçla, biyosentri-voltammetrik hücrenin alt kısmında bulunan Pt elektroda ksantinoksidaz enzimi immobilize edilmiş ve ksantin (X) biyosensörü elde edilmiştir. Santrifüj hızı, santrifüj süresi ve enzim miktarı gibi önemli deneysel parametreler optimize edilmiştir. Daha sonra X için analitiksel karakteristik çalışmaları yapılmıştır. Yöntem şarap örneğinde X tayinine uygulanmış ve iyi geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Üçüncü bölümde, AChE aktivitesini tayin etmek amacıyla, ATCh'nin biyosentri-voltammetrik tayini gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon süresi, santrifüj hızı, santrifüj süresi ve enzim miktarı gibi parametreler optimize edilmiştir. Uygun çalışma şartları belirlendikten sonra ATCh için analitiksel karakteristik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Biyosentri-voltammetri yöntemi, asetilkolin esteraz (AChE) inhibisyon çalışması için Alzheimer hastalığında kullanılan Neurem (DonepezilHCl, 5 mg) ilacına uygulanmıştır. Dördüncü bölümde, ACh biyosentri-voltammetrik yöntem ile belirlenmiştir. Bu amaçla AChE ve kolin oksidaz (CHOD) enzimleri kullanılarak biyosensör sistemi oluşturulmuştur. Bunun için reaksiyon süresi, pH, AChE ve CHOD miktarları, santrifüj süresi ve santrifüj hızı gibi parametreler optimize edilmiştir. En iyi ortam şartları belirlendikten sonra ACh ve Ch için analitiksel karakteristikler incelenmiştir. ACh tayinine biyosentri-voltammetrinin etkisinin anlaşılması için santrifüj parametreleri kullanılmaksızın ACh için bir doğrusal aralık oluşturulmuştur. Oluşturulan biyosensör aynı zamanda Ch belirlenmesinde kullanılmıştır. Biyosentri-voltammetri yöntemi, sentetik serum örneklerinde ACh ve Ch belirlenmesine uyarlanmıştır. Son bölümde ise çok duvarlı karbon nanotüp

temelli AChE biyosensör sistemi oluşturulmuştur. Zayıf bir katyonik polielektrolit olan poly(allylaminehydrochloride) (PAH) ve nitrik asit (HNO<sub>3</sub>) ile fonksiyonellendirilmiş çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) ile AChE temelli biyosensör elde edilmiştir. AChE ve pH parametreleri optimize edildikten sonra ATCh için analitiksel karakteristik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen biyosensör sistemi model pestisit olarak seçilen monokrotofos belirlenmesine uyarlanmıştır. İnhibisyon süresi optimize edildikten sonra % inhibisyon ile monokrotofos derişimi arasında doğrusal bir ilişki elde edilmiştir. Bundan sonra, biyosensör çeşme ve maden suyu, domates ve üzüm örneklerine uygulanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Senti-voltammetri, biyosenti-voltammetri, asetilkolin, Alzheimer, pestisit

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT EFFECTIVE ELECTROCHEMICAL METHODS FOR FOLLOWING ENZYMATIC BIOANALYSIS: BIOCENTRI-VOLTAMMETRY AND NANOSTRUCTURE BASED SYSTEMS

Serdar ÇEVİK

PhD in Chemistry

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ulku ANIK

Co-Supervisor: Prof. Dr. Suna Timur

May 2013, 139 pages

In this PhD thesis, centri-voltammetry was combined with a biosensor system for the first time. We recommend the name “biocentri-voltammetry” (also known as centri-biovoltammetry). In the first chapter, acetylthiocholine (ATCh) was detected by using Au film modified glassy carbon electrode. Analytical characteristics for ATCh were investigated under optimum conditions. In the second chapter, before ATCh was detected with biocentri-voltammetry, it was applied to the best known enzymatic system. For this purpose, xanthine oxidase was immobilized onto Pt electrode which placed at the bottom of the biocentri-voltammetric cell and xanthine (X) biosensor was obtained. Important experimental parameters such as centrifugation speed, centrifugation time and amount of enzyme were optimized. After that analytical characteristics for X were investigated. The method was applied to the determination of xanthine in wine sample and good recovery values were obtained. In the third chapter, ATCh was detected by using biocentri-voltammetry in order to determine AChE activity. Reaction time, centrifugation speed, centrifugation time and amount of enzyme were optimized. Under optimized conditions, analytical characteristics were investigated. Bio-centrivoltammetry method was utilized for Neurem (DonepezilHCl, 5mg) medicine which used for Alzheimer disease in order to monitor acetylcholinesterase (AChE) inhibition. In the fourth chapter, ACh was detected by using biocentri-voltammetry. A biosensor based on AChE and choline oxidase (CHOD) was fabricated. After experimental parameters such as reaction time, pH, AChE and CHOD amount, centrifugation time and centrifugation speed were optimized, analytical characteristics were investigated for ACh and Ch. A calibration graph was obtained without biocentri-voltammetry in order to explore effect of centrifugation parameters. Obtained biosensor was also used to detect Ch. Biocentri-voltammetry was applied for determination of ACh and Ch in synthetic serum samples. In the last chapter, poly(allylaminehydrochloride) which is a weak cationic polyelectrolyte and nitric acid-treated MWCNT based AChE biosensor was

fabricated. After parameters such as pH and amount of AChE were optimized, a linear range was obtained for ATCh. Monocrotophos was detected as a model pesticide with developed biosensor system. A linear relationship between inhibition % and monocrotophos concentration was obtained after optimization of inhibition time. After that, biosensor was applied to detect monocrotophos in tomato, grape mineral and tap water samples.

**Keywords:** Centri-voltammetry, biocentri-voltammetry, acetylcholine, Alzheimer, pesticide

## ÖNSÖZ

Doktora tezi çalışmalarım boyunca çok büyük desteklerini gördüğüm, çalışmalarım sırasında bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan, yardımlarını esirgemeyen danışmanlarım Doç. Dr. Ülkü ANIK ve Prof. Dr. Suna TİMUR'a teşekkür eder, gösterdikleri ilgi, sabır ve anlayıştan dolayı şükranlarımı sunarım.

Doktora çalışmalarım boyunca desteği, sabrı ve anlayışından dolayı Yeliz YAVUZ'a teşekkür ederim. Araştırma süresince yardımlarını gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, ilgi ve desteklerinden dolayı arkadaşlarım kimyager Dr. Meliha ÇUBUKÇU, Araş. Gör. Sema ASLAN, Uzman Özge TOKUL ve yüksek lisans öğrencisi Sinan CEMGİL SULTAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Hep yanımda olduklarını bildiğim, yaşamımın her döneminde daima bana destek ve fedakarlıklarda bulunan annem, babam ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma TÜBİTAK "Bazı Önemli Biyolojik Bileşiklerin Tayinine Yönelik Etkin Elektrokimyasal Yöntemlerin Geliştirilmesi" isimli 109T885 no'lu proje ile ve Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi BAP projesi kapsamında desteklenmiştir. Her iki kuruma da sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Amaç ve Kapsam.....	3
1.2. Kaynak Özetleri.....	3
1.2.1. Voltammetri.....	3
1.2.2. Voltammetride kullanılan elektrotlar.....	3
1.2.2.1. Yardımcı elektrot (karşıt elektrot).....	3
1.2.2.2. Referans elektrotlar.....	4
1.2.2.3. Çalışma elektrotları.....	4
1.2.3. Voltammetrik teknikler.....	9
1.2.3.1. Döngüsel voltammetri (CV).....	10
1.2.3.2. Diferansiyel puls voltammetri (DPV).....	10
1.2.4. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi.....	11
1.2.4.1. Elektrokimyasal impedans spektroskopisinin teorisi.....	11
1.2.5. Nanoteknoloji.....	15
1.2.6. Karbon nanotüpler.....	15
1.2.6.1. Nanotüplerin yapısal özellikleri.....	16
1.2.6.2. Nanotüplerin elektriksel özellikleri.....	16
1.2.6.3. Nanotüplerin mekaniksel özellikleri.....	17
1.2.7. CNT'lerin sentezi.....	17
1.2.7.1. Ark buharlaştırma yöntemi.....	17
1.2.7.2. Lazer-ocak yöntemi.....	18
1.2.7.3. Kimyasal buhar biriktirme.....	18
1.2.8. CNT'lerin fonksiyonellendirilmesi.....	19
1.2.9. Biyosensörler.....	20
1.2.9.1. Elektrokimyasal biyosensörler.....	20
1.2.9.2. Enzim temelli elektrokimyasal biyosensörler.....	21
1.2.10. Enzim immobilizasyonu.....	23

1.2.10.1. Fiziksel adsorpsiyon .....	24
1.2.10.3. Tutuklama .....	25
1.2.10.4. Çapraz bağlama .....	26
1.2.11. Biyosensör örnekleri .....	27
1.2.11.1. Glukoz biyosensörü .....	27
1.2.11.2. Ksantin biyosensörü .....	27
1.2.11.3. Asetilkolin biyosensörü .....	27
1.2.12. İnhibisyon temelli biyosensörler .....	28
1.2.12.1. Tersinir İnhibisyon .....	29
1.2.12.2. Tersinmez İnhibisyon .....	30
1.2.12.4. Enzim aktivitesinin yenilenmesi .....	31
1.2.13. Pestisitler .....	32
1.2.14. Senti-voltammetri .....	35
1.2.15. Biyosenti-voltammetri (Centri-biyovoltammetri) .....	36
<b>2. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>	<b>39</b>
2.1. Cihaz ve Malzemeler .....	39
2.2. Kullanılan Elektrotlar .....	40
2.3. Kimyasallar ve Reaktifler .....	44
2.3.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması .....	44
2.3.1.1. Destek elektrolit tampon çözeltisinin hazırlanması .....	44
2.3.1.2. Çalışma hücresinde kullanılan çözeltinin hazırlanması .....	45
2.4. Elektrotların Hazırlanması Ve Prosedür .....	45
2.4.1. Au-film modifiye GCE hazırlanması .....	45
2.4.2. X biyosensörünün hazırlanması .....	45
2.4.3. AChE temelli biyosensörlerin hazırlanması .....	47
2.4.3.1. AChE aktivite tayini için biyosensör hazırlanması .....	47
2.4.3.2. ACh biyosensörünün hazırlanması .....	48
2.4.3.1. MWCNT'nin HNO <sub>3</sub> ile muamele edilmesi .....	49
2.4.3.2. Pestisit tayini için AChE/PAH/f-MWCNT/CPE'nin hazırlanması .....	50
2.5. Örnek Uygulamaları .....	52
2.5.1. Şarap örneğinde biyosenti-voltammetrik X tayini .....	52
2.5.2. AChE inhibisyonu temelli ilaç örneği .....	52
2.5.3. Sentetik serum örneğinde biyosenti-voltammetrik ACh ve Ch tayini .....	52
2.5.4. Doğal örneklerde pestisit tayini .....	53
<b>3. BULGULAR VE İRDELEME .....</b>	<b>54</b>

<b>4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>56</b>
4.1. Au Film Modifiye GCE ile ATCh Tayini .....	56
4.1.1 H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub> miktarı etkisi .....	57
4.1.2. pH etkisi.....	57
4.1.3. Analitiksel karakteristik.....	58
4.2. Biyosentri-Voltammetri İle X Tayini .....	59
4.2.1. Santrifüj hızı etkisi .....	60
4.2.2. Santrifüj süresinin etkisi .....	61
4.2.3. Enzim miktarının etkisi .....	62
4.2.4. Santrifüj gücünün etkisi.....	63
4.2.5. Analitiksel karakteristik ve örnek deneme .....	64
4.3. Enzim Aktivite Çalışması İçin Biyosentri-Voltammetri.....	67
4.3.1. Reaksiyon süresinin etkisi .....	67
4.3.2. Santrifüj hızının etkisi .....	68
4.3.3. Santrifüj süresinin etkisi .....	69
4.3.4. Enzim miktarının etkisi .....	70
4.3.5. Analitiksel karakteristik ve örnek deneme .....	71
4.4. Asetilkolinin Biyosentri-Voltammetrik Tayini .....	74
4.4.1. Reaksiyon süresinin etkisi .....	74
4.4.2. pH etkisi.....	75
4.4.3. CHOD miktarının etkisi.....	76
4.4.4. AChE miktarının etkisi.....	78
4.4.5. Santrifüj süresinin etkisi .....	81
4.4.6. Santrifüj hızının etkisi .....	86
4.4.7. Analitiksel karakteristik ve örnek deneme .....	87
4.5. Pestisit Tayini İçin AChE Tememli Biyosensör Sistemi.....	90
4.5.1. EIS Çalışmaları .....	91
4.5.2. SEM Karakterizasyonu.....	92
4.5.3. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE ile ATCh'ın elektrokimyasal davranışı.....	93
4.5.4. Elektrokimyasal mekanizmanın incelenmesi.....	93
4.5.5. AChE miktarının etkisi.....	98
4.5.6. pH etkisi.....	98
4.5.7. ATCh için analitiksel karakteristik .....	99
4.5.8. Monokrotofos belirlenmesi.....	101
4.5.9. İnhibisyon süresinin etkisi .....	101

4.5.10. Monokrotofos analitiksel karakteristik.....	102
4.5.11.AChE'nin aktivitesinin yenilenmesi ve örnek deneme .....	104
4.6. Sonuç.....	105
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>107</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>118</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Platin elektrot için çalışma potansiyel sınırları (Tural vd, 2006).....	6
Çizelge 1.2. Altın elektrot için çalışma potansiyel sınırları .....	6
Çizelge 1.3. Parafin-gömme karbon elektrotlar için potansiyel sınırları .....	7
Çizelge 1.4. Karbon pasta elektrotlar için potansiyel sınırları .....	8
Çizelge 4.1. X'in artan derişimleri içi biyosentri-voltammetri yöntemi kullanılarak ve kullanılmadan elde edilen akım değerleri .....	66
Çizelge 4.2. X belirlenmesi için yapılan elektrokimyasal biyosensör ile biyosentri-voltammetrik yöntemin doğrusal aralık ve LOD açısından karşılaştırılması.....	68
Çizelge 4.3. Biyosentri-voltammetri kullanılarak farklı örneklerde X belirlenmesi için elde edilen geri kazanım değerleri .....	68
Çizelge 4.4. ATCh belirlenmesi için yapılan elektrokimyasal biyosensör ile biyosentri-voltammetrik yöntemin doğrusal aralık ve LOD açısından karşılaştırılması.....	74
Çizelge 4.5. ACh belirlenmesi için yapılan elektrokimyasal biyosensör ile biyosentri-voltammetrik yöntemin doğrusal aralık ve LOD açısından karşılaştırılması.....	91
Çizelge 4.6. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE ile monokrotofos belirlenmesinin doğrusal aralık ve LOD açısından farklı AChE biyosensörleri ile karşılaştırılması .....	107
Çizelge 4.7. Farklı örneklerde monokrotofos belirlenmesi için elde edilen geri kazanım değerleri .....	108

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. A) Doygun Ag/AgCl referans elektrodu, B) platin yardımcı elektrodu.....	4
Şekil 1.2. Voltammetride kullanılan çalışma elektrotların şematik gösterimi .....	5
Şekil 1.3. Elektrot yüzeyine bağlanma ile oluşturulan modifikasyon .....	9
Şekil 1.4. CV’de elde edilen a) potansiyel-zaman, b) potansiyel-akım eğrileri.....	10
Şekil 1.5. DPV’de elde edilen a) potansiyel-zaman, b) potansiyel-akım eğrileri .....	11
Şekil 1.6. Randles eşdeğer hücre .....	13
Şekil 1.7. Nyquistik eğri.....	13
Şekil 1.8. Bode eğrisi.....	14
Şekil 1.9. Bir biyosensörün yapısı .....	20
Şekil 1.10. I. nesil biyosensör.....	22
Şekil 1.11. II. nesil biyosensör .....	22
Şekil 1.12. III. nesil biyosensör .....	23
Şekil 1.13. Fiziksel adsorpsiyona ile immobilizasyon.....	24
Şekil 1.14. Kovalent bağlama ile immobilizasyon .....	25
Şekil 1.15. a) kafes tipi, b) mikrokapsülleme tutuklama yöntemi.....	25
Şekil 1.16. Çapraz bağlama yöntemi ile immobilizasyonu.....	26
Şekil 1.17. İnhibitörsüz ve farklı inhibitör varlığında reaksiyon hızı-substrat derişimi ilişkisi.....	29
Şekil 1.18. İnhibisyon temelli biyosensör çalışma prensibi .....	31
Şekil 1.19 Doğada pestisitlerin döngüsü.....	33
Şekil 1.20. Pestisitlerin pozitif ve negatif etkileri .....	34
Şekil 1.21. A) Diklorvos, B) monokrotofos organofosforlu pestisitlerin kimyasal yapısı.....	35
Şekil 2.1. AUTOLAB PGSTAT 12 cihazı.....	39
Şekil 2.2. $\mu$ -AUTOLAB TYPE III cihazının resmi.....	40
Şekil 2.3. Üçlü elektrot sistemine ait düzenek .....	41
Şekil 2.4. Polietilen biyosentri-voltammetrik hücre .....	42
Şekil 2.5. A) Delrin biyosentri-voltammetrik hücre, B) a- biyosentri-voltammetrik gövde, b) koruyucu kapak, c) çalışma elektrodu, d) kapak.....	43
Şekil 2.6. Biyosentri-voltammetrik X tayininin şematik gösterimi.....	46
Şekil 2.7. Biyosentri-voltammetrik ATCh tayininin şematik gösterimi .....	48
Şekil 2.7. Biyosentri-voltammetrik ACh tayininin şematik gösterimi .....	49
Şekil 2.9. Monokrotofos belirlenmesinin şematik gösterimi .....	51

Şekil 4.1. Au film modifiye GCE' ye ait diferansiyel puls voltammogramları: (a) Au film, (b) Au film ve 25 µM ATCh, fosfat tampon sistemi (pH 7,0).....	56
Şekil 4.2. Farklı derişimlerde ki H <sub>Au</sub> Cl <sub>4</sub> için elde edilen akım değerleri, 10 µM ATCh, fosfat tampon sistemi (pH 7,0).....	57
Şekil 4.3. pH a) 6, b) 6,5, c) 7, d) 7,5, e) 8 ve f) 8,5 için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar; 10 µM ATCh, 500 µM H <sub>Au</sub> Cl <sub>4</sub> ..	58
Şekil 4.4. 10 µM ATCh için fosfat tamponunun farklı pH değerlerinin akım değerlerine etkisi.....	58
Şekil 4.5. Au film modifiye GCE ile a) 2, b) 5, c) 10, d) 15 e) 20 ve f) 25 µM için elde edilen D.P voltammogramları. Deneysel koşullar; 500 µM H <sub>Au</sub> Cl <sub>4</sub> , H 7,0.....	59
Şekil 4.6. ATCh için elde edilen kalibrasyon eğrisi (2-25 µM). Deneysel koşullar Şekil 4.5 ile aynıdır .....	59
Şekil 4.7. a) 0, b) 1000, c) 2000, d) 3000, e) 3500 rpm santrifüj hızlarında 20 µM X için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar; santrifüj süresi: 5 dakika, 50 mM fosfat tamponu ( pH 7,0), step potential 5 mV, modulasyon genliği 25 mV .....	60
Şekil 4.8. Santrifüj hızının akım değerlerine etkisi. Deneysel koşullar şekil 4.7 ile aynıdır .....	61
Şekil 4.9. a) 1, b) 3, c) 5, d) 8 dakika santrifüj sürelerinde 20 µM X için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar; santrifüj hızı: 3500 rpm, 50 mM fosfat tamponu ( pH 7,0), step potential 5 mV, modulasyon genliği 25 mV .....	61
Şekil 4.10. Santrifüj süresinin elde edilen akım değerlerine etkisi. Deneysel koşullar Şekil 4.9 ile aynıdır .....	62
Şekil 4.11. a) 0,1, b) 0,2, c) 0,5, d) 1, e) 1,5 mg XO için elde edilen D.P voltammogramları. 20 µM xanthine, 50 mM fosfat tamponu ( pH 7,0), santrifüj hızı; 3500 rpm, santrifüj süresi; 5 dakika .....	63
Şekil 4.12. Enzim miktarının biyosentri-voltammetrik akım değerlerine etkisi. Deneysel koşullar Şekil 4.11 ile aynıdır .....	63
Şekil 4.13. Biyosentri-voltammetrik ile A) 0,1-1 µM ve C) 5-50 µM arasında X için elde kalibrasyon aralıkları. B) 0,1-1 µM, D) 5-50 µM arasında X için doğrusallıktan sapmaya gösteren grafikler. Deneysel koşullar: Santrifüj hızı; 3500 rpm, santrifüj süresi; 5 dakika, destek elektrolit; fosfat tamponu pH 7,0, step potential 5 mV, modulasyon genliği 25 mV .....	65
Şekil 4.14. Reaksiyon süresinin elde edilen akım değerlerine etkisi. Deneysel koşullar: 0,25 mM ATCh 49,56x10 <sup>-4</sup> U mL <sup>-1</sup> AChE, santrifüj hızı; 4000 rpm, Santrifüj süresi; 4 dakika, 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) .....	68
Şekil 4.15. Santrifüj hızının biyosensör yanıtlarına etkisi. Deneysel koşullar: 0,25 mM ATCh 49,56x10 <sup>-4</sup> U mL <sup>-1</sup> AChE, reaksiyon süresi; 15 dakika, Santrifüj süresi; 4 dakika, 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) .....	69

- Şekil 4.16. siyah) 0, kırmızı) 1, mavi) 2, koyu yeşil) 3, pembe) 4, kahverengi) 5, yeşil) 6 dakika santrifüj süreleri için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar: 0,25 mM ATCh  $49,56 \times 10^{-4}$  U mL<sup>-1</sup> AChE, reaksiyon süresi; 15 dakika, Santrifüj hızı; 4000 rpm, 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0), step potential 0.005 V, amplitude 0.025 V.....70
- Şekil 4.17. Farklı santrifüj sürelerinin elde edilen akım değerlerine etkisi. Deneysel koşullar Şekil 4.16 ile aynıdır.....70
- Şekil 4.18.  $4,95 \times 10^{-4}$ ,  $9,91 \times 10^{-4}$ ,  $24,78 \times 10^{-4}$ ,  $49,56 \times 10^{-4}$  ve  $74,34 \times 10^{-4}$  UmL<sup>-1</sup> AChE miktarlarının biyosensör yanıtlarına etkisi. Deneysel koşullar: 0,25 mM ATCh reaksiyon süresi; 15 dakika, Santrifüj hızı; 4000 rpm, Santrifüj süresi; 5 dakika, 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0).....71
- Şekil 4.19. A) 1–350 µM arasında ATCh için elde edilen kalibrasyon eğrisi, B) Doğrusallıktan sapmayı gösteren grafik.....72
- Şekil 4.20. a) 350 µM ATCh, b) 350 µM ATCh ve 500 µL donepezil için elde edilen DP voltammogramlar .....73
- Şekil 4.21. Biyosensör yanıtlarına reaksiyon süresinin (0,5, 1, 2, 5, 8 ve 10 dakika) etkisi. Koşullar; 0,25 mM ACh, 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0), Santrifüj hızı; 5000 rpm, Santrifüj süresi; 3 dakika, 4,2 U/mg CHOD, 155 U/mg AChE.....75
- Şekil 4.22. Akım değerlerine pH etkisi. Deneysel koşullar: 0,25 mM ACh, santrifüj hızı; 5000 rpm, santrifüj süresi; 3 dakika, reaksiyon süresi; 5 dakika, 4,2 U/mg CHOD, 155 U/mg AChE.....75
- Şekil 4.23. a) zemin, b) 0,25 mM Ch ile A) 1,4 U/mg, B) 2,8 U/mg CHOD için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar: santrifüj hızı; 5000 rpm, santrifüj süresi; 3 dakika, reaksiyon süresi; 5 dakika, 155 U/mg AChE ..76
- Şekil 4.24. a) zemin, b) 0,25 mM Ch ile C) 4,2 U/mg, D) 5,6 U/mg CHOD için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar: santrifüj hızı; 5000 rpm, santrifüj süresi; 3 dakika, reaksiyon süresi; 5 dakika, 155 U/mg AChE ..77
- Şekil 4.25. a) zemin, b) 0,25 mM Ch ile E) 7,0 U/mg CHOD için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar: santrifüj hızı; 5000 rpm, santrifüj süresi; 3 dakika, reaksiyon süresi; 5 dakika, 155 U/mg AChE .....78
- Şekil 4.26. CHOD miktarlarının elde edilen biyosensör yanıtlarına etkisi.....78
- Şekil 4.27. a) zemin, b) 0,25 mM ACh ile A) 51,8 U/mg, B) 103,6 U/mg AChE için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar: santrifüj hızı; 5000 rpm, santrifüj süresi; 3 dakika, reaksiyon süresi; 5 dakika, 5,6 U/mg CHOD .....79
- Şekil 4.28. a) zemin, b) 0,25 mM ACh ile C) 155 U/mg, D) 207,2 U/mg AChE için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar: santrifüj hızı; 5000 rpm, santrifüj süresi; 3 dakika, reaksiyon süresi; 5 dakika, 5,6 U/mg CHOD .....80
- Şekil 4.29. a) zemin, b) 0,25 mM ACh ile E) 259 U AChE U/mg için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar: santrifüj hızı; 5000 rpm, santrifüj süresi; 3 dakika, reaksiyon süresi; 5 dakika, 5,6 U/mg CHOD.....81
- Şekil 4.30. AChE miktarlarının elde edilen biyosensör yanıtlarına etkisi.....81



Şekil 4.31. a) zemin, b) 0,25 mM ACh ile A) 0 B) 1 santrifüj süreleri için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar: santrifüj hızı; 5000 rpm, reaksiyon süresi; 5 dakika, 207,2 U/mg AChE, 5,6 U/mg CHOD .....	82
Şekil 4.32. a) zemin, b) 0,25 mM ACh ile C) 2 D) 3 santrifüj süreleri için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar: santrifüj hızı; 5000 rpm, reaksiyon süresi; 5 dakika, 207,2 U/mg AChE, 5,6 U/mg CHOD .....	83
Şekil 4.33. a) zemin, b) 0,25 mM ACh ile E) 4, F) 5 santrifüj süreleri için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar: santrifüj hızı; 5000 rpm, reaksiyon süresi; 5 dakika, 207,2 U/mg AChE, 5,6 U/mg CHOD .....	84
Şekil 4.34. a) zemin, b) 0,25 mM ACh ile A) 1 B) 2 santrifüj süreleri için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar: santrifüj hızı; 5000 rpm, reaksiyon süresi; 5 dakika, 207,2 U/mg AChE, 5,6 U/mg CHOD .....	85
Şekil 4.35. Santrifüj süresinin elde edilen akım değerlerine etkisi.....	86
Şekil 4.36. Biyosensör yanıtlarına santrifüj hızının (0, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 ve 6000 rpm) etkisi. Deneysel koşullar: reaksiyon süresi; 5 dakika, 207,2 U/mg AChE, 5,6 U/mg CHOD, 207,2 U/mg AChE.....	87
Şekil 4.37. ACh için $5,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M arasında elde edilen kalibrasyon grafiği. B) Doğrusallıktan sapmayı gösteren grafik. Deneysel koşullar: reaksiyon süresi; 5 dakika, santrifüj süresi; 4 dakika, santrifüj hızı; 4000 rpm; 207,2 U/mg AChE, 5,6 U/mg CHOD, 207,2 U/mg AChE.....	88
Şekil 4.38. ACh için biyosentri-voltammetrisiz elde edilen kalibrasyon grafiği. Deneysel koşullar Şekil 4.37 ile aynıdır .....	89
Şekil 4.39. Ch için $10 \times 10^{-6}$ - $5 \times 10^{-4}$ M arasında elde edilen kalibrasyon grafiği, . B) Doğrusallıktan sapmayı gösteren grafik. Şekil 4.37 ile aynıdır .....	89
Şekil 4.40. a) CPE, b) PAH/f-MWCNT/CPE, c) AChE/PAH/f-MWCNT/CPE için içeren 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,0) 0,18 V'da 0,01 Hz-10 kHz arasında elde edilen EIS Nyquistik diyagramları .....	91
Şekil 4.41. a) SPE, b) PAH/f-MWCNT/SPE, c) AChE/PAH/f-MWCNT/SPE'nin SEM görüntüleri .....	92
Şekil 4.42. a) AChE/PAH/f-MWCNT/CPE için 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,0); b) AChE/CPE, c) AChE/PAH/CPE d) AChE/PAH/f-MWCNT/CPE için 0,5 mM ATCh içeren 50 mM fosfat tamponunda 50 mV/s'de elde edilen CV voltammogramları .....	93
4.41. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE için a) 10, b) 25 mVs <sup>-1</sup> tarama hızlarında 0,5 mM ATCh'a ait döngüsel voltammogramlar; Deneysel koşullar: Potansiyel aralığı; 0 ile 1,25, destek elektrolit; 50 mM fosfat tamponunu (pH 7,0) .	94
Şekil 4.42. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE için c) 50, d) 100 mVs <sup>-1</sup> tarama hızlarında 0,5 mM ATCh'a ait döngüsel voltammogramlar; Deneysel koşullar: Potansiyel aralığı; 0 ile 1,25 V, destek elektrolit; 50 mM fosfat tamponunu (pH 7,0).....	95
Şekil 4.43. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE için e) 250, f) 500 mVs <sup>-1</sup> tarama hızlarında 0,5 mM ATCh'a ait döngüsel voltammogramlar; Deneysel koşullar: Potansiyel aralığı; 0 ile 1,25 V, destek elektrolit; 50 mM fosfat tamponunu (pH 7,0).....	96

Şekil 4.44. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE için g) 1000 mVs <sup>-1</sup> tarama hızında 0,5 mM ATCh'a ait döngüsel voltammogramlar; Deneysel koşullar: Potansiyel aralığı; 0 ile 1,25 V, destek elektrolit; 50 mM fosfat tamponunu (pH 7,0) .....	97
Şekil 4.45. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE için elde edilen tarama hızının kareköküne bağlı doğrusal grafik .....	97
Şekil 4.46. Elde edilen akım değerlerine AChE miktarının (0.04-1 U) etkisi. Deneysel koşullar: destek elektrolit; 50 mM fosfat tamponunu (pH 7,0), tarama hızı; 50 mVs <sup>-1</sup> , ATCh derişimi; 1 mM .....	98
Şekil 4.47. Biyosensör yanıtlarına pH etkisi. Deneysel koşullar: AChE miktarı; 0,4 U, tarama hızı; 50 mVs <sup>-1</sup> , ATCh derişimi; 1 mM.....	99
Şekil 4.48. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE ile 5,0x10 <sup>-5</sup> -2,0x10 <sup>-3</sup> M ATCh arasında elde edilen döngüsel voltammogramlar. Deneysel koşullar: AChE miktarı; 0,4 U, tarama hızı; 50 mVs <sup>-1</sup> , destek elektrolit; 50 mM fosfat tamponunu (pH 7,0).....	99
Şekil 4.49. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE ile AChE için elde edilen kalibrasyon grafiğı, B) Doğrusallıktan sapmayı gösteren grafik. Deneysel koşullar: AChE miktarı; 0,4 U, tarama hızı; 50 mVs <sup>-1</sup> , destek elektrolit; 50 mM fosfat tamponunu (pH 7,0).....	100
Şekil 4.50. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE ile 1 M ATCh için a) monokrotofossuz, b) 5 dakika monokrotofosla inkübasyon sonucu elde edilen CV voltammogramları .....	101
Şekil 4.51. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE yanıtlarına inhibisyon süresinin etkisi. Deneysel koşullar: AChE miktarı; 0,4 U, tarama hızı; 50 mVs <sup>-1</sup> , destek elektrolit; 50 mM fosfat tamponunu (pH 7,0), ATCh derişimi; 1 mM; monokrotofos derişimi; 25 pgml <sup>-1</sup> .....	102
Şekil 4.52. % inhibisyon ile monokrotofos derişimi arasında elde edilen doğrusal ilişki, Doğrusallıktan sapmayı gösteren grafik. Deneysel koşullar: AChE miktarı; 0,4 U, tarama hızı; 50 mVs <sup>-1</sup> , destek elektrolit; 50 mM fosfat tamponunu (pH 7,0), ATCh derişimi; 1 mM; inhibisyon süresi; 5 dakika .....	103

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AChE	Asetilkolin Esteraz
ACh	Asetilkolin
GCE	Camımsı Karbon Elektrot
ATCh	Asetiltiyokolin
X	Ksantin
XO	Ksantin Oksidaz
CHOD	Kolin Oksidaz
CNT	Karbon Nanotüp
MWCNT	Çok Duvarlı Karbon Nanotüp
SWCNT	Tek Duvarlı Karbon Nanotüp
DWCNT	Çift Duvarlı Karbon Nanotüp
HNO <sub>3</sub>	Nitrik Asit
CV	Döngüsel Voltammetrisi
DPV	Diferansiyel Puls Voltammetrisi
EIS	Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
nm	Nanometre
CVD	Kimyasal Buhar Yöntemi
μA	Mikro Amper
μM	Mikro Molar
CPE	Karbon Pasta Elektrot

# 1. GİRİŞ

Sentri-voltammetri (Centri-voltammetry) santrifüj ve voltammetrik yöntemlerin birleşimini içeren bir yöntemdir. Bu yöntemde tayin edilmek istenen madde, uygun bir taşıyıcı ve santrifüj yardımıyla elektrot yüzeyine toplanmaktadır. Voltammetrik ölçüm bu toplanmanın ardından aynı elektrot yüzeyinde yürütülmektedir. Bu sayede, madde ve zaman kaybına neden olan süzme ve ayırma gibi işlemler gereksizdir. Voltammetrik tayin yapılmaktadır. Bunun sonucunda analit kaybı önlenmekte ve daha doğru ve daha duyar sonuçlar alınmaktadır (Kırgöz vd., 2004, 2005).

Biyosensörler gerçekleşen biyolojik tepkimelerde hedeflenen analitleri belirlemek için kullanılan küçük algılayıcı cihazlardır. Birbiri içine geçmiş, biri biyokimyasal diğeri elektrokimyasal özellikteki iki çeviriciden oluşmaktadır. Biyokimyasal kısmın görevi analizlenecek maddeyle etkileşerek onu tanımadır. Bu tanıma olayının sonucunda bir biyokimyasal ürün de oluşabilmektedir. Biyosensörün ikinci kısmı olan elektrokimyasal kısım ise bu tanıma olayını ölçülebilir bir sayısal değere çevirmekle görevlidir (Çubukcu, 2008; Sherredani vd., 2006). Biyosensörler, kısa yanıt süresi, sağladığı seçicilik ve duyarlılık gibi özelliklerinden dolayı önemli biyomoleküllerin belirlenmesinde çok fazla kullanılmıştır. Biyosensör sisteminde kullanılan enzimlerin immobilize edilme yöntemleri, enzim aktivitesi için büyük önem taşır. Enzim aktivitesinde düşme enzim kararlılığını ve ömrünü olumsuz etkiler ve substrat ile etkileşiminde azalma olur. Örneğin, asetilkolin esterase (AChE) enzimi, sempatik sinir sisteminde yer alan asetilkolin (ACh) analitinin hidrolizini gerçekleştirir. AChE enzim aktivitesinin azalması durumunda bu hidroliz gerçekleşmediği için dokularda ACh birikmesinden dolayı bazı bedensel bozukluklar oluşturur (Niwa vd., 1998; Bonanni vd., 2012).

Bu doktora tezi kapsamında ilk olarak camımsı karbon elektrot (GCE) üzerine modifiye edilen Au film ile asetiltiyokolin (ATCh) tayini gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullar belirlendikten sonra ATCh için analitiksel karakteristik çalışmaları yapılmıştır. Sentri voltammetri ile ATCh tayini gerçekleştirilmeden önce sentri-voltammetri yöntemi iyi bilinen bir enzimatik sisteme uygulanmıştır. Bu

amaçla, sentri-voltammetrik hücrenin alt kısmında bulunan Pt elektroda ksantin oksidaz enzimi (XO) immobilize edilerek, ksantin analitine (X) yönelik bir biyosensör sistemi yapılmıştır. Geliştirilen yöntem sentri-voltammetri ve biyosensör yöntemlerinin bileşimi olan biyosentri-voltammetri adı verilmiştir. X'in biyosentri-voltammetrik tayinine yönelik santrifüj hızı, santrifüj süresi ve enzim miktarı gibi deneysel parametreler optimize edildikten sonra X için analitiksel karakteristik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra yöntem, gerçek örneklerde X tayinine uygulanmış ve iyi geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Bir başka çalışmada, AChE aktivitesini tayin etmek amacıyla, ATCh'nin biyosentri-voltammetrik tayini gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, reaksiyon süresi, santrifüj hızı, santrifüj süresi ve enzim miktarı gibi parametreler optimize edilmiştir. Uygun çalışma şartları belirlendikten sonra ATCh için analitiksel karakteristik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Biyosentri-voltammetri yöntemi, AChE inhibisyon çalışması için Alzheimer hastalığında kullanılan Neurem (Donepezil HCl, 5 mg) ilacına uygulanmıştır. Bundan sonra tasarlanan çalışmada ise, ACh biyosentri-voltammetri yöntem ile belirlenmiştir. Bu amaçla AChE ve kolin oksidaz (CHOD) enzimleri kullanılarak biyosensör sistemi oluşturulmuştur. Bunun için reaksiyon süresi, pH, AChE ve CHOD miktarları, santrifüj süresi ve santrifüj hızı gibi parametreler optimize edilmiştir. En iyi ortam şartları belirlendikten sonra ACh ve Ch için analitiksel karakteristikler incelenmiştir. ACh tayinine biyosentri-voltammetrinin etkisinin anlaşılması için santrifüj parametreleri kullanılmaksızın ACh için bir doğrusal aralık oluşturulmuştur. Oluşturulan biyosensör aynı zamanda Ch belirlenmesinde kullanılmıştır. Biyosentri-voltammetri yöntemi ile sentetik serum örneklerinde ACh ve Ch tayini gerçekleştirilmiştir. Doktora tezinin son kısmında ise çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) temelli AChE biyosensör sistemi oluşturulmuştur. Bu amaçla zayıf bir katyonik polielektrolit olan poly(allylamine hydrochloride) (PAH) ve nitrik asit (HNO<sub>3</sub>) ile fonksiyonellendirilmiş MWCNT ile AChE temelli biyosensör elde edilmiştir. AChE ve pH parametreleri optimize edildikten sonra ATCh için analitiksel karakteristik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen biyosensör sistemi model pestisit olarak seçilen monokrotofos belirlenmesine uyarlanmıştır. İnhibisyon süresi optimize edildikten sonra % inhibisyon ile monokrotofos derişimi arasında doğrusal bir ilişki elde edilmiştir. Analitiksel karakteristik çalışmaları tamamlandıktan sonra, geliştirilen biyosensör sistemi, çeşme ve maden suyu, domates ve üzüm örneklerine uygulanmıştır

## 1.1. Amaç ve Kapsam

Bu doktora tezi kapsamında sentri-voltammetrinin (centri-voltammetry) uygulama alanının genişletilerek biyolojik öneme sahip moleküllere uygulanması amaçlanmıştır. Bunun için bu doktora tezinde ilk kez sentri-voltammetri, enzim temelli biyosensör sistemi birleştirilmiştir. Bu yeni yöntem “Biyosentri-voltammetri (centri-biyovoltammetri olarak da adlandırılmaktadır)” adı verilmiştir. Bu yöntemde özel olarak dizayn edilmiş biyosentri-voltammetrik hücrenin alt kısmında bulunan çalışma elektroduna modifiye ya da immobilize edilmiş enzim ile substratın tayin edilmesini içerir. Substratın herhangi bir taşıyıcı materyal kullanılmadan, uygulanan santrifüj kuvveti ile çalışma elektrodun üzerine biriktirilmesi sağlanır. (Anık, 2013)

## 1.2. Kaynak Özetleri

### 1.2.1. Voltammetri

*Voltammetri*, akım-gerilim ve derişim ilişkilerine dayanan bir yöntemdir. Voltammetri de çalışma elektrodu elektrodun polarize olduğu koşullarda uygulanan potansiyelde akımın ölçülmesi ile analit hakkında bilgi edinilmesini sağlayan elektroanalitiksel bir yöntemdir. Akım-gerilim eğrileri, iki ya da üç elektrotlu sistemlerle elde edilir. Voltammetride değişik türden çalışma elektrotları ve değişik türde gerilim kaynakları kullanılır. Bunları doğru akım, alternatif akım, kare dalga akım, değişik türden pulslu akımlar, dögüsel akım şeklinde sıralayabiliriz.

### 1.2.2. Voltammetride kullanılan elektrotlar

Voltammetride iki ya da üç elektrotlu sistemler kullanılabilir. Genellikle aşağıda sıralanan üç elektrodu içeren sistemler kullanılır.

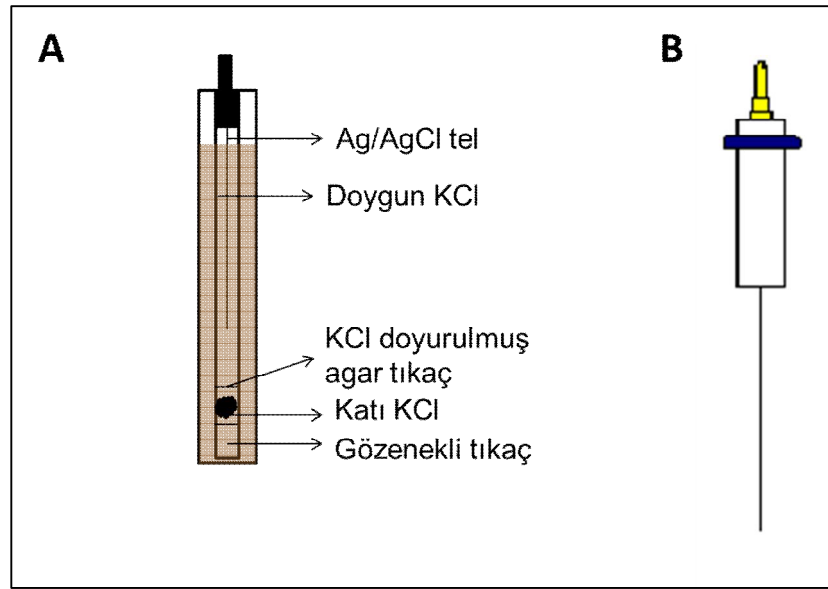
#### 1.2.2.1. Yardımcı elektrot (karşı elektrot)

Akım, çalışma elektrodu ile yardımcı elektrot ikilisinden geçirilir. Çalışma elektrodunun potansiyeli karşılaştırma elektroduna karşı sıfır akım altında saptanır.

Elektriğin, sinyal kaynağından çözeltinin içinden geçerek mikro elektroda aktarılmasını sağlayan yardımcı elektrottur. (Tural vd, 2006).

### 1.2.2.2. Referans elektrotlar

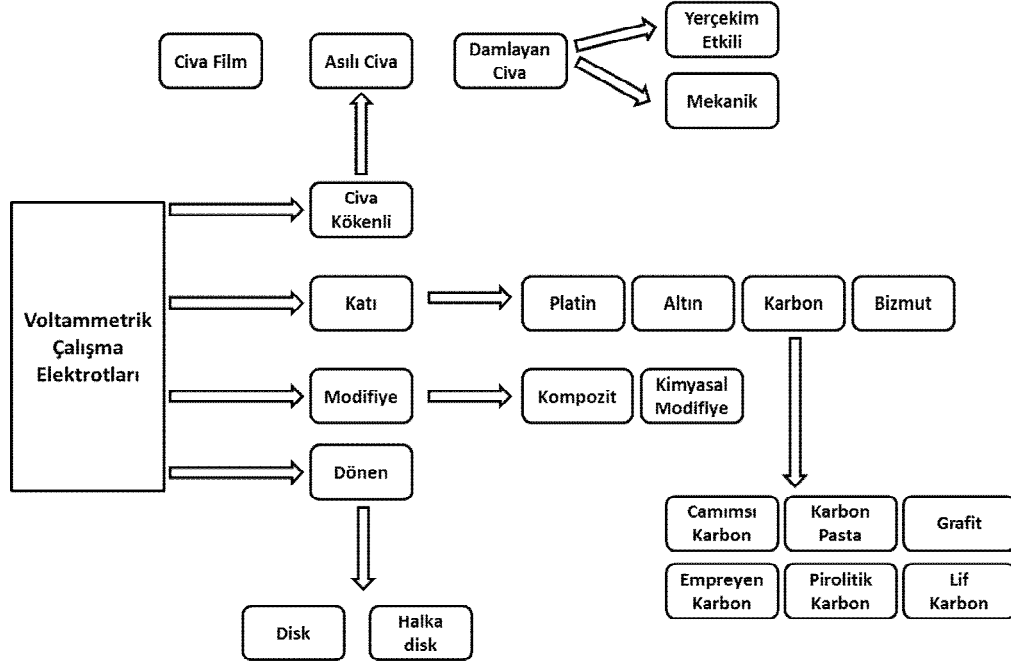
Potansiyeli deney süresince sabit kalır ve genellikle Ag/AgCl veya Hg ve Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (doymuş kalomel). Referans elektrotlar polarize olmazlar ve akım şiddeti artınca ideal konumlarından saparak reaksiyon boyunca potansiyelleri değişmeden sabit kalır (Tural vd, 2006). Voltammetride civa, platin, altın, bizmut, karbon kökenli katı ve modifiye elektrotlar gibi çalışma elektrotları kullanılır.



Şekil 1.1. A) Doymun Ag/AgCl referans elektrodu, B) platin yardımcı elektrodu

### 1.2.2.3. Çalışma elektrotları

Çalışma elektrotların sahip oldukları hem kimyasal hem de elektrokimyasal özellikleri voltammetride sınırlı sayıda polarlanabilen elektrot kullanılmasına neden olur. Bunlar her birinin potansiyel çalışma aralıkları farklı olan dönen, civa temelli, katı ve modifiye elektrotlardır. Potansiyel çalışma aralığı elektrot türüne bağlı olduğu gibi kullanılan elektrolit türüne ve pH' a bağlıdır. Katodik sınırı hidrojen oluşumu ya da destek elektrolitinin indirgenmesi, anodik sınırı ise elektrot materyalinin ya da çözücünün yükseltgenmesi belirler (Tural vd, 2006).



Şekil 1.2. Voltammetride kullanılan çalışma elektrotlarının şematik gösterimi

Bazı analitlerin yükseltgenmesi, daha pozitif potansiyelerde gerçekleşir. Bu nedenle yükseltgenme olaylarının incelenmesi için elektrot malzemesinin anodik çözünmesi daha pozitif potansiyelerde gerçekleşmesi gerekir. Bu özelliği taşıyan platin, altın gibi soy metaller ve karbon gibi materyaller katı elektrot yapımında kullanılır (Tural vd, 2006).

#### a) Platin Elektrotlar

Platin elektrotlar doğrudan ya da yüzeyi modifiye edilerek kullanılabilir. Platin elektrodun değişik ortamlardaki sahip olduğu farklı çalışma potansiyel aralığı Çizelge 1.1' de verilmiştir (Tural vd, 2006).



**Çizelge 1.1. Platin elektrot için çalışma potansiyel sınırları (Tural vd, 2006)**

Ortam	Anodik Sınır (V)	Katodik Sınır (V)
0,1 M HCl	+1,10	-0,3
0,1 N KCl	+1,00	-1,0
2 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+1,25	-
Asetat tamponu pH 4,0	+0,90	-0,5
Fosfat tamponu pH 7,0	+0,94	-0,7
0,05 M Borat tamponu pH 9,2	-	-0,8
NH <sub>4</sub> /NH <sub>3</sub> tamponu pH 9,3	+0,60	-0,8
0,1 M NaOH	+0,72	-0,9

### **b) Altın Elektrotlar**

Altın, platine göre belli bir derişime kadar oksijeni soğurmadığından dolayı kimi çalışmalarda platine göre daha iyi bir elektrot malzemesidir. Ayrıca yüzeyi modifiye edilerek kullanılması mümkündür.

Yüksek akım değerlerinde 1 M HClO<sub>4</sub> çözeltisinde altın elektrodun anodik sınırı +1,5 V olmasına karşın; küçük akım değerlerinde bu sınır +0,8 V' dur. Bunun nedeni +0,8 V' da elektrot yüzeyinde altın oksit oluşur. Yüzeyde oluşan altın oksit küçük de olsa bir akıma neden olur. Elde edilen küçük akım koşullarında bu artık akımın dikkate alınması gerekir. Klorürlü ortamlarda ise, altının klorür ile kararlı kompleksler oluşturması nedeniyle anodik sınır +0,6 V değerine kadar kayar. Farklı ortamlardaki altın elektrodunun sahip olduğu çalışma sınırları Çizelge 1.2' de verilmiştir (Tural vd, 2006).

**Çizelge 1.2. Altın elektrot için çalışma potansiyel sınırları**

Ortam	Anodik Sınır (V)	Katodik Sınır (V)
0,1 M HClO <sub>4</sub> pH 1,0	+1,5	-0,37
0,1 M NaCl	+0,6	-1,10
Asetat tamponu pH 4,0		-0,88
0,1 M NaClO <sub>4</sub>		-1,13
Fosfat Tamponu pH 7,0		-1,19
0,05 M Borat tamponu pH 9,2		-1,25

### c) Karbon elektrotlar

Karbon geniş bir anodik potansiyel aralığına, düşük elektriksel dirence, düşük artık akım ve tekrarlanabilir yüzey yapısına sahip olduğundan çalışmalarda kullanılabilir ideal bir elektrot malzemesidir. Karbon elektrotlar, karbon lif, camımsı karbon, grafit pasta ve karbon film gibi değişik şekillerde elektrokimyasal çalışmalarda kullanılabilir (Tural vd, 2006).

Grafit, (%5-%20) oranında kül içerdiğinden elektrokimyasal çalışmalarda kullanılabilirliği sınırlıdır. Bu nedenle yapay grafit kullanılır.

Camımsı karbon elektrotlar, gözenek büyüklüğünün özel bir yöntem kullanılarak azaltılması ile hazırlanır. Camımsı karbon bazı polimerlerin yaklaşık 1800 °C' de ısıtılma bozundurulmaları sonucu elde edilir. Bu malzeme sert olduğu için her deneme öncesinde parlatılabilirler ve + 0,65 V' de bir ön polarizasyon işlemi uygulanması ile kullanıma hazır hale getirilirler. Çalışma potansiyel sınırları yaklaşık olarak + 1,00 V ve -0,75 V' dir. Camımsı karbon elektrotlar durağan ya da dönen diskler olmak üzere iki farklı şekilde kullanılabilirler. HPLC ve akışkan sistemlerde de dedektör olarak kullanılabilirler.

Gömme (Empreyene) karbon elektrotlar grafit, parafin ve uygun reçineler ile karıştırılır. Daha sonra eritilip homojen hale getirilir. Bu işlemden sonra metalik iletken içeren bir tüpe doldurulur. Parafin-gömme karbon elektrodun sahip olduğu anodik ve katodik potansiyel sınırları Çizelge 1.3' de verilmiştir (Tural vd, 2006).

**Çizelge 1.3. Parafin-gömme karbon elektrotlar için potansiyel sınırları**

Ortam	Anodik Sınır (V)	Katodik Sınır (V)
0,1 M KCl	+1,00	-1,30
HCl-KCl pH 1,20	+1,32	-1,28
Ftalat tamponu pH 3,95	+1,33	-1,30
Fosfat Tamponu pH 7,2	+1,35	-1,38
Boraks tamponu pH 9,8	+1,04	-1,61

Pirolitik grafit elektrot, 1200 °C' den yüksek sıcaklıklarda metan gibi hidrokarbon içeren maddelerin ısıtılma bozundurulması ile elde edilir. Bu elektrodun asitli ortamda doygun kalomel elektroduna karşı çalışma potansiyeli +1,00 V ile -0,80 V arasındadır. Mikro karbon elektrotlar, 5-10 mm çap ve 500-1000 mm uzunluğa sahiptir. Üretimi için özel teknikler kullanılan mikro karbon elektrotlar lif şeklinde

olan karbon telciklerdir. Bizmut elektrot, asetik asit-asetat tamponunda (pH 4,7) -0,2 ve -1,20 V potansiyel aralığına sahiptir. Bizmutun katodik bölgede kullanılması, hidrojenin bizmut üzerinden çıkış aşırı potansiyelinin yüksek olması ile ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte civa ile karşılaştırıldığında uçuculuğunun ve zehirliliğinin az olması gibi başlıca üstünlükleri vardır (Tural vd, 2006).

Voltammetride kullanılan elektrotların sınırlı olması nedeniyle, elektrotların kimyasal ya da elektrokimyasal nitelikleri değiştirilerek çalışma koşulları geliştirilen modifiye elektrotlar elde edilmiştir. Genel olarak ya elektrot yüzeyinde önderiştirme sağlayan kimyasal maddelerle işlem ya da elektrot yüzeyinin elektron aktarma niteliğini değiştiren işlem yapılarak hazırlanırlar. Modifiye elektrotlar iki ana gruba ayrılabilirler;

**a) Kompozit elektrotlar:** Modifiye edici kimyasal doğrudan iletken elektrot malzemesine katılıp, karıştırılarak elektrot hazırlanabilir. Bu elektrotlara kompozit elektrot denir. Örneğin, modifiye edici madde karbon tozu ve nujol ile birlikte pasta haline getirilerek kullanılır. Karbon pasta elektrot, toz grafitin nujol ya da mineral yağ gibi organik bir sıvı ile karıştırılması ile hazırlanır. Hazırlanan pasta, elektriksel bağlantının platin ya da bakır bir tel ile sağlandığı teflon tüp gibi bir yapı içerisine doldurulur. Karbon pasta elektrotların sahip olduğu potansiyel aralıkları Çizelge 1.4' de verilmiştir (Tural vd, 2006).

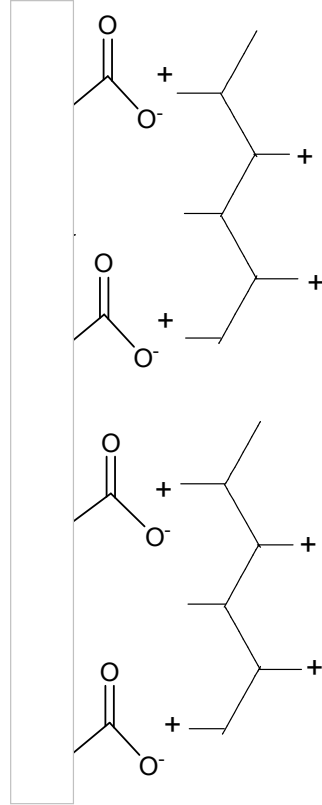
**Çizelge 1.4. Karbon pasta elektrotlar için potansiyel sınırları**

Ortam	Anodik Sınır (V)	Katodik Sınır (V)
1 M KCl	+1,10	-1,1
1 M HCl	+1,02	-0,9
Asetat tamponu pH 4,7	+1,27	
0,1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+1,30	
1 M NaOH		-1,4
1 M NaClO <sub>4</sub>		-1,1
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>3</sub> tamponu		-1,2

**b) Kimyasal modifiye elektrotlar:** Modifiye edici kimyasal, elektrot yüzeyine kimyasal bağla ya da kimyasal adsorpsiyonla bağlanarak hazırlanabilirler. Ayrıca modifiye edici uygun bir monomer elektrot yüzeyinde elektropolimerizasyona uğratarak ya da elektrot yüzeyinde doğrudan polimer film oluşturularak bu tür elektrotlar hazırlanabilirler.

Altın elektrotlar kimyasal adsorpsiyonla n-alkantiyolleri yüzeylerine mono moleküler bağlarlar. Bu türde ki modifikasyonla elektrodu oluşturmak için altın ya da altın kaplı katı bir elektrodun tiyol çözeltilerine daldırılıp bekletilmeleri yeterlidir.

Yüzeyinde oksijen bağlı olan elektrotların oksijeni değişik etkin gruplarla tepkimeye sokularak da elektrotlar modifiye edilebilirler. Elektrot yüzeyine bağlı oksit yeterli değilse önce elektrokimyasal ya da plazma işlemleriyle yüzey oksidasyonunu arttırabilir. Şekil 1.3' de bir modifikasyon örneği verilmiştir (Tural vd, 2006).



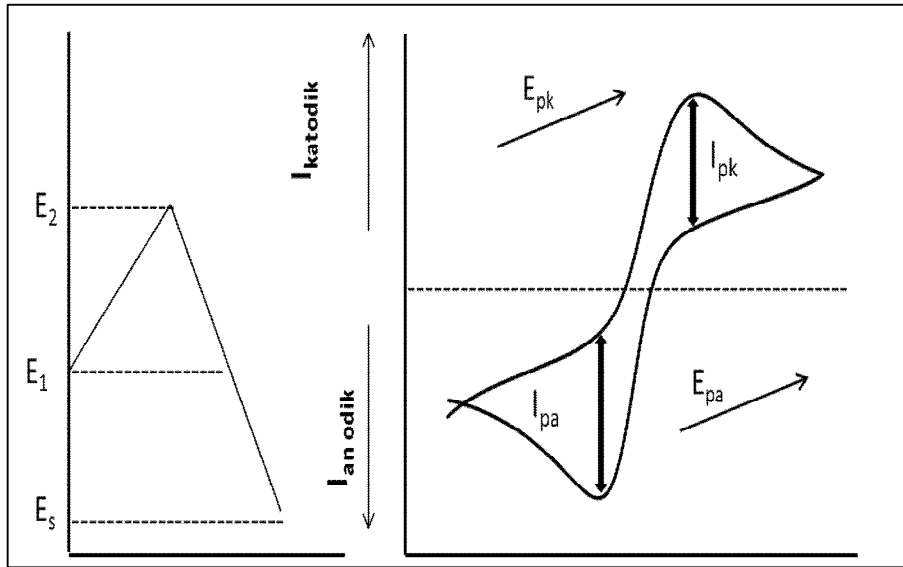
Şekil 1.3. Elektrot yüzeyine bağlanma ile oluşturulan modifikasyon

### 1.2.3. Voltammetrik teknikler

Voltammetrik tekniklerde kapasitif akımın giderilmesi sağlayan ileri voltammetrik yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler sayesinde duyarlılık  $10^{-12}$  M düzeyine kadar indirilmiştir (Tural vd, 2006). Bu doktora tezi kapasamında ileri voltammetrik yöntemler arasında döngüsel voltammetri (CV) ve diferansiyel puls voltammetri (DPV) kullanıldığından bu tekniklerin sahip oldukları özellikler verilmiştir.

### 1.2.3.1. Döngüsel voltammetri (CV)

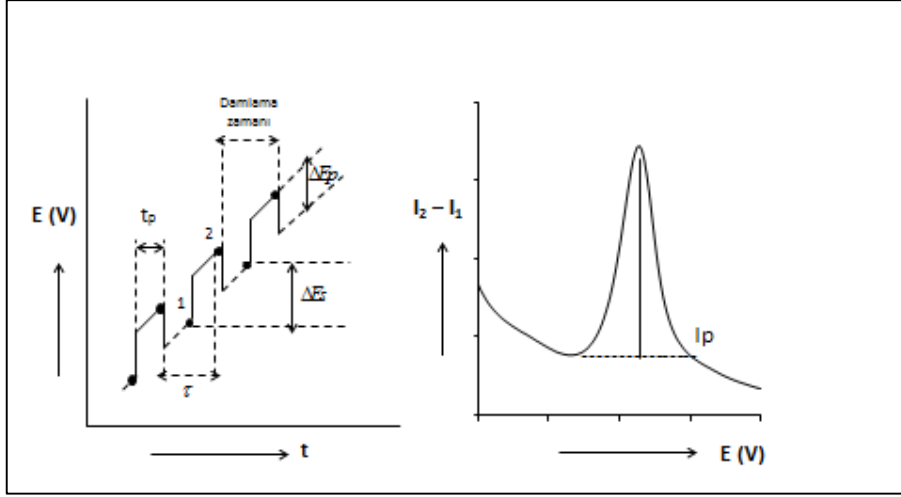
CV’de döngüsel olarak potansiyel tarama işlemi gerçekleştirilir. Potansiyel  $E_1$  değerinden  $E_2$  değerine istenilen hız ile tarandıktan sonra, tekrar taramanın yönü ters çevrilerek tekrar  $E_1$  değerine ulaşılır. Böylelikle oluşan ürünün elektrokimyasal davranışının incelenmesine olanak sağlar. Potansiyel taraması tek döngü ya da birden fazla döngü ile gerçekleştirilebilir. CV’de  $i$ - $E$  eğrileri ilgili analitlerin hem anodik hem de katodik özelliklerin incelenmesine olanak sağlar. Eğrilerden elde edilen pik akımları ve pik potansiyel verilerinden yola çıkılarak tepkimenin tersinir olup olmadığı ve difüzyon kontrollü olup olmadığı belirlenir. CV’ de elde edilen  $i$ - $E$  eğrisi Şekil 1.4’ de verilmiştir (Tural vd, 2006).



Şekil 1.4. CV’de elde edilen a) potansiyel-zaman, b) potansiyel-akım eğrileri

### 1.2.3.2. Diferansiyel puls voltammetri (DPV)

Ölçülen akımda ki sığasal akımın değerini düşürmek amacıyla uygulanan pulsun başında ve sonunda ki akımlar ölçülür ve farkları alınır. DPV’ de doğru akım potansiyeline sahip genlikli pulslar uygulanmaktadır. Bu yöntemde elde edilen eğriler Şekil 1.5’de verilmiştir.



Şekil 1.5. DPV’de elde edilen a) potansiyel-zaman, b) potansiyel-akım eğrileri

#### 1.2.4. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi

İmpedans spektroskopisi, elde edilen materyallerin birden fazla elektriksel özelliklerini ortaya çıkarmak için kullanılan sinüsoidal ve küçük genlikli sinyaller sağlayan bir tekniktir (Sun vd., 2010.). Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), impedans spektroskopisinin, en önemli alt kategorilerinden bir tanesidir ve elektrokimyanın birden fazla alanında (elektrot kinetikleri, çift tabaka çalışmaları, piller, korozyon, katı hal elektrokimya ve biyoelektrokimya) çok fazla kullanılır. EIS, iletken ya da yarı iletken yüzeylerin kapasitans ya da direnç gibi ara yüzeyler hakkında bilgi sahibi olmak için yapılan araştırmalarda kullanılan çok etkili bir tekniktir. EIS çalışmalarında yüksek frekanslarda Nyquist eğrisinde oluşan yarım daire elektron transferine karşı gösterilen direnci ifade eder ve yarım dairenin çapı elektron transfer direncine eşittir (Chen vd., 2008; Bonanni vd., 2012).

##### 1.2.4.1. Elektrokimyasal impedans spektroskopisinin teorisi

EIS herhangi bir uyarılmanın sahip olduğu frekansın bir fonksiyonu olarak sistemin impedansını ( $Z$ ) ölçer. Elektrokimyasal sistemler ile çalışıldığı zaman elde edilen yanıt uygulanan gerilim, faz ve genlikte meydana gelen farklılıklardan oluşur. Uygulanan gerilimin ölçülen akıma oranı bir impedans sistemidir ( $Z = E / I$ ) ve geniş frekans aralığı boyunca kolaylıkla ölçülebilir. Elde edilen spektrum farklı frekans

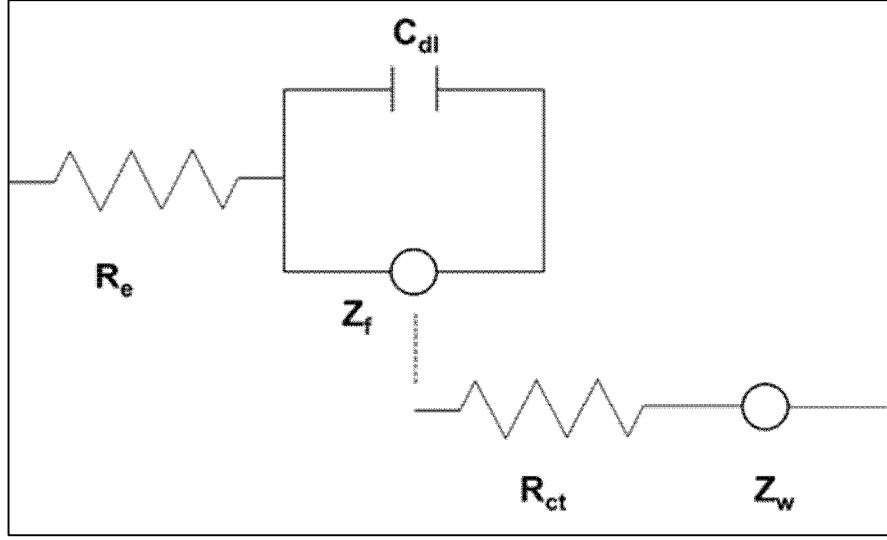
bölgelerinde baskın olan sistemde meydana gelen farklı kinetik çalışmaları hakkında bilgi verir (Fernandez-Sanchez vd., 2005).

Fizik açısından bakıldığında zaman, impedans sadece indüktörler, kondansatörler, dirençler ya da bunların birleşiminde oluşan bir devreden bir alternatif akım geçtiğinde oluşan toplam kompleks direncidir. Bu genlik bize karmaşık bir formül verir;

$$Z = Z' + jZ'' = R - jX; \quad X = 1 / \omega C; \quad j = \sqrt{-1} \quad 1.1$$

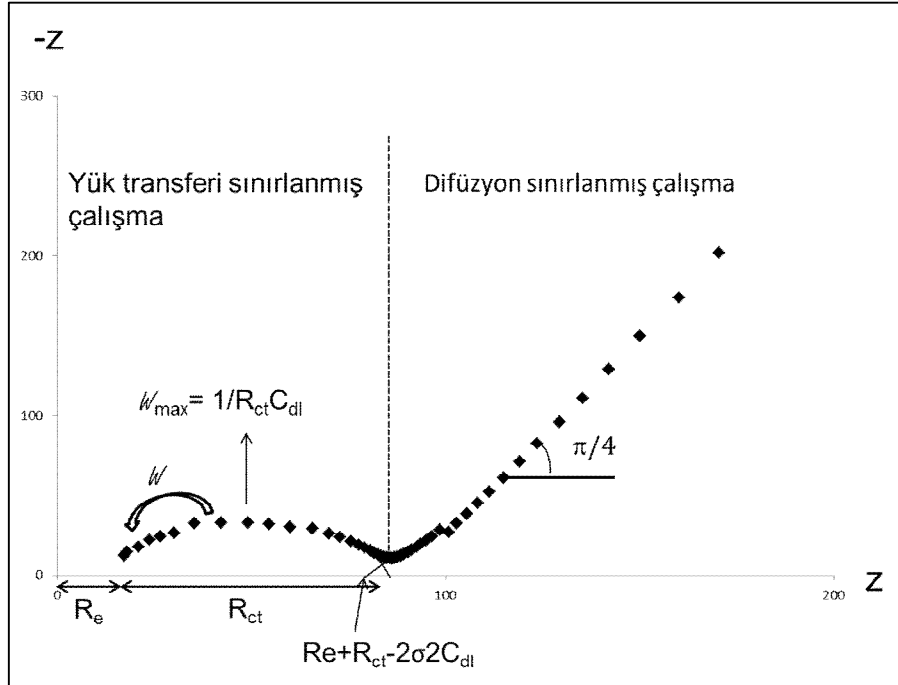
Bu eşitlikte R direnç, X reaktans, C, kapasitans ve  $\omega$  ise uygulanan açısal frekanstır. Bir elektrokimyasal hücrenin deneysel impedans datası kolaylıkla başlıca dirençleri ve kondansatörleri kapsayan bir eşdeğer devrenin impedansına uyarlanabilir.

Randles hücresi, difüzyon varlığında tek adımlı faradayik işlemler içeren bir elektrokimyasal hücreyi tanımlayan basit eşdeğer hücredir (Şekil 1.6). Randles hücresi temel olarak başlıca referans ve çalışma elektrot arasında ki elektrolit direnci ( $R_e$ ), çift tabaka kapasitansı ( $C_{dl}$ ) ve çalışma elektrodu-elektrolit arayüzeyinde yük transferinden dolayı faradayik impedansı ( $Z_f$ ) birleştirir.  $Z_f$  'de yük transfer direnci ( $R_{ct}$ ) ve elektrokimyasal hücrenin sahip olduğu toplam impedansda elektroaktif türlerin kütle taşınımının etkisini sınırlayan Warburg direnci ( $Z_w$ ) olmak üzere 2'ye ayrılır. Bundan dolayı difüzyonu sınırlandırılmış çalışmalarda  $Z_w$  baskın olur. Fakat yük transfer kontrollü çalışmalarda  $Z_f$  sadece  $R_{ct}$  olur. Bütün bu bileşenler geniş frekans aralığı boyunca bir elektrokimyasal hücre boyunca impedansda değişen çalışmalar ile tanımlanabilir (Fernandez-Sanchez vd., 2005).



Şekil 1.6. Randles eşdeğer hücre

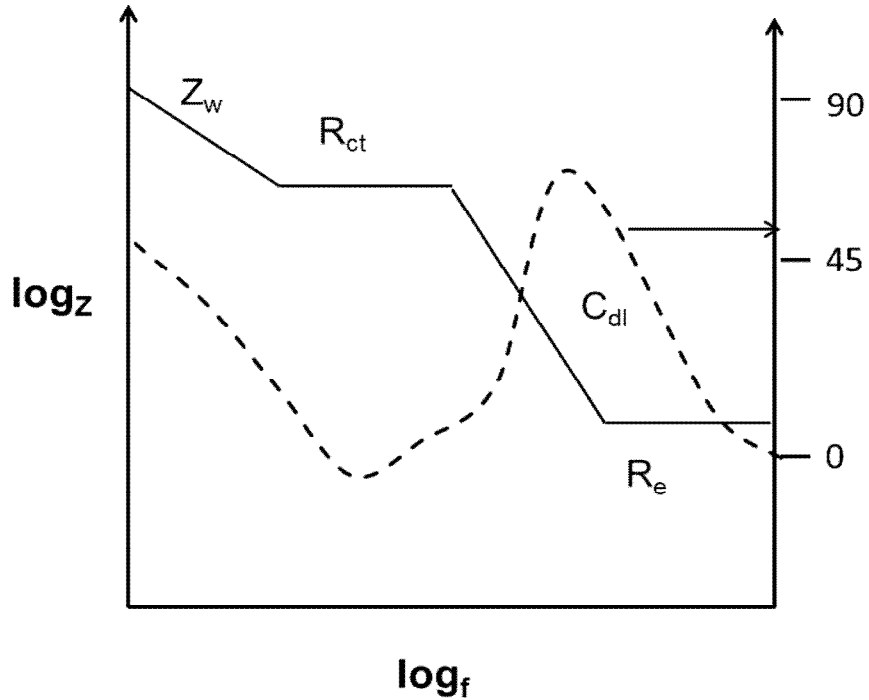
Elde edilen verinin gösterilen biçimlerinden bir tanesi hayaline ( $Z''$ ) karşı gerçek ( $Z'$ ) bileşenleri ile elde edilen Nyquistik eğrisidir. Bu eğride iki ayrı kısım çok belirgin bir biçimde ayrılmıştır. Elde edilen yarım çember yük transferi ile ilgili bilgi verir. X ekseninde olan kesim noktaları  $R_e$  ve  $R_{ct}$  değerlerini verir. Bununla birlikte şekilden de görüldüğü gibi  $Z_w$  ve Warburg katsayısını ( $\sigma$ ) da hesaplamak mümkündür (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Nyquistik eğri



Elde edilen impedans datasının diğeri Bode eğrisidir. Bode eğrisinde frekansın logaritmik değerine karşı faz ( $\phi$ ) ve  $Z$  değerinin logaritmik değerleri ile elde edilen eğrisidir. Şekil 1.8 Randles hücresi için elde edilen Bode eğrisini gösterir. Nyquistik eğrisinden farklı olarak, Bode eğrileri  $f$  ve  $\phi$  hakkında bilgi edinmemizi sağlar ve buda birden fazla faz elemanlarını tespit etmemize yardımcı olur. Yatay çizgi  $\log Z$ - $\log f$  ile çizilen eğride gözlenmektedir ve  $\phi$ ,  $0^\circ$  yakın ölçülmektedir. Bununla birlikte, bir frekans bölgesinde kapastif davranış  $90^\circ$  civarında ki  $\phi$  ve  $\log Z$ - $\log f$  eğrisinde  $-1$ 'in eğimi ile düz bir çizgi ile tanımlanır. Oysa difüzyon kontrollü çalışmada,  $45^\circ$  civarında ki  $\phi$  ve  $-1/2$  eğimle düz bir çizgi elde edilir (Fernandez-Sanchez vd., 2005).



Şekil 1.8. Bode eğrisi

Elektrokimyasal impedans spektroskopisinde impedans davranışlarını açıklamak için ohmik direnç, kapasitans, sabit faz elementi ve Warburg impedans terimleri kullanılır. Eşdeğer devreler seri ya da paralel olarak bağlanmış durumda düzenlenen çoğu elektrokimyasal sistemler, bu yöntemle göre oluşturulur. Bunlardan bir tanesi yapılmış olan çalışmalar ile karşılaştırılarak impedans davranışları için bir model oluşturulmasıdır. Bu bakış açısı analiz için bir başlangıç noktası oluşturabilir. Elektrolit ile temas halinde olan bir elektrot için Randles hücresi kullanılır (Şekil

1.6). Randles hücresi çözelti direnci ( $R_s$ ), yük transfer direnci ( $R_{ct}$ ), çift tabaka direnci ( $C_{dl}$ ) ve Warburg impedansı ( $W$ ) parametrelerini içerir (Lisdar ve Schäfer, 2008).

### **1.2.5. Nanoteknoloji**

Nano kısaltması Yunanca cüce kelimesinden türetilmiştir. Nanoteknoloji, nanometre (nm) boyutundaki cihazların ve materyallerin sentezi, karakterizasyonu, uygulamaları ve dizaynını içeren bir bilim dalı olarak tanımlanır. 1 nm yaklaşık olarak 6 karbon atom genişliğine ya da 10 su molekülüne eşittir. İnsan saçı yaklaşık olarak 80,000 nm genişliğinde ve kırmızı bir kan hücresi yaklaşık olarak 7000 nm genişliğindedir (Emerich ve Thanos, 2003; Sahoo vd., 2007).

Nanoteknolojinin kavramsal iskeleti ilk olarak 1959'da fizikçi Richard Feynman tarafından verilmiş olan bir konferansta oluşturulmuştur. Richard Feynman atom ya da molekül boyutlarda işlenmiş materyallerin oluşturulabilme potansiyellerinin mümkün olduğunu görmüştür. Başka bir deyişle, bütün Britannica ansiklopedilerinin bir iğne ucuyla yazıldığını hayal etmiş ve nanoboyutta maddenin kontrol edilip ve incelenme olanağının arttığını önceden görmüştür. Nanoteknoloji terimi 1974'e kadar kullanılmıştır. Fakat Tokyo Üniversitesi'nden Nori Taniguchi bu terimi nanometre düzeyde mühendislik malzemelerine dikkat çekmek amacıyla kullanmıştır. Bundan sonra elektronik endüstrisi silikon çiplerde daha küçük elektronik cihazlar kullanmak için nanoteknolojinin özelliklerinden yararlanmıştır. Bunun yanında Amerika Birleşik Devletler'inde IBM'de elektron ışın litografi adı verilen teknik 1970'li yılların başında 40 ve 70 nm kadar küçük boyutunda nanoyapılar ve cihazlar oluşturmuşlardır (Sahoo vd., 2007).

Nanoteknolojiyi açıklamak için top-down ve top-bottom olmak üzere iki yaklaşım kullanılır.

### **1.2.6. Karbon nanotüpler**

CNT'ler 1978 yılında Wiles ve Abrahamson tarafından keşfedilmiştir. Bundan 13 yıl sonra Iijima tarafından tekrar yeniden açığa çıkarılmıştır. (Dai vd., 2006). CNT'ler

sahip oldukları yüksek elektriksel iletkenlik, yüksek kimyasal kararlılık ve mükemmel mekaniksel kararlılık gibi özelliklerinden dolayı çok fazla ilgi uyandırmıştır. Sahip oldukları bu özellikler nedeniyle, taramalı mikroskop uçlar, nanoölçekli transistörler, alan emisyon cihazlar ve kompozit materyaller için gerekli olabilecek bileşenler olarak kullanılmıştır. CNT'nin yapısı, karbon atomların komşu atomlara kovalent bağlanmasıyla grafit tabakanın boru şeklinde toplanması olarak tanımlanır. Bu tabaka kabuğunun sarmallığı CNT'lerin metalik ya da yarı iletken olarak sınıflandırılmasına neden olmaktadır. Yüksek en boy oranı ile birlikte CNT'lerin iletkenliği elektron alış verişini arttırdığından dolayı çok ilgi çekmiştir. Bununla birlikte, yarı iletken nanotüpler, biyosensör olarak kullanılmış ve giriş voltajının değiştirilmesi ile optimize edilmiştir. Sahip olduğu bu özellikler kullanıldığı uygulamalarda düşük saptama limitleri ile yüksek duyarlılıkların elde edilmesine neden olmuştur. Tek duvarlı karbon nanotüp (SWCNT), çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) ve çift duvarlı karbon nanotüp (DWCNT) olmak üzere üç çeşit CNT vardır. CNT'lerin sahip oldukları çaplar yaklaşık 1.4 nm'den 60 nm'ye kadar değişiklik gösterir ve uzunlukları mikron düzeyinden 1 cm arasında değişiklik gösterir. (Merkoçi vd., 2005; Yun vd., 2007; Duan vd., 2012).

#### *1.2.6.1. Nanaotüplerin yapısal özellikleri*

Sumi Iijima tarafından 1991 yılında bulunduktan sonra CNT'ler ilgi çekmeye başlamışlardır. Yapılan araştırmalar ışığında CNT'lerin mükemmel fiziksel, kimyasal, elektriksel ve optik özelliklere sahip olduğu bulunmuştur.

Yapılan araştırmalar sonucunda CNT'lerin hegzagonal yapıda ki karbon atomların meydana getirdiği silindir halde ki yapılar olduğu tespit edilmiştir. CNT'ler "armchair", "zigzag" ve "chiral olmak üzere 3 çeşit oluşum yönleri vardır. (Koç, 2003; Çubukcu, 2008).

#### *1.2.6.2. Nanotüplerin elektriksel özellikleri*

CNT'ler çok iyi iletim sağlayan nanomateryallerdir. Bu açıdan polifenilen esaslı zincirler ile karşılaştırıldığında 10 ila 100 kat daha fazla akım iletimi sağlanmaktadır. Isı iletkenliği en iyi olan elmas ile karşılaştırıldıklarında ise 2 kat daha fazla ısı iletimi sağlar. CNT'lerin elektronik yapılarını sahip oldukları küçük çaptan dolayı

kuantum mekanik etkileri etkiler. Başka bir anlamda söylenirse, kuantizasyon şartlarının nanotüp çevresi boyunca nanotübün metal ya da yarı iletken olarak davranıp davranmadığını belirler. CNT'lerin sahip olduğu bu özellik gelecekte nanoelektronikinin temeli olduğu düşünülür (Merkoçi, 2005). Geometrik yapılarına bağlı olarak yarı-iletken ve metalik özellik gösterirler. Bundan dolayı herhangi bir madde kullanılmadan geometrik özellikleri ile oynanması durumunda, elektronik özelliklerinde de değişimler sağlanabilir.

### *1.2.6.3. Nanotüplerin mekaniksel özellikleri*

CNT'ler elmas kadar yüksek bir dirence sahiptirler. En iyi yüksek mukavemetli çelik alaşımından 30 kat daha güçlüdür. Düğüm haline getirilebilecek kadar esnekler ve sahip olduğu yoğunluk malzemeleri, hafif özelliğe sahip alüminyumun yarısı ve çeliğin 1/6'sı kadardır. Bununla birlikte kararlılıklarını 3000 °C'ye kadar korurlar. CNT'nin sağlamlılığını gösteren en önemli özelliklerinden bir tanesi sahip olduğu ağırlığının 300 milyon katı başka ağırlığa dayanabilmesidir. Ayrıca CNT lerin optik ve kimyasal özelliklerinden de bahsedebiliriz. Mesela CNT ler optik olabilirler ancak chiral nanotüpler çok uzun iseler optiklik ortadan kalkar. Kimyasal olarak da inerttirler ve graphene levhalardan daha reaktiftirler (Çubukcu, 2008) .

### **1.2.7. CNT'lerin sentezi**

#### *1.2.7.1. Ark buharlaştırma yöntemi*

Ark buharlaştırma yönteminde yaklaşık olarak 1 mm ile ayrılmış olarak uc uca yerleştirilen grafit çubuğun 50 ve 700 mbar arasında ki basınçta helyum ve argon gibi inert gazlar ile doldurularak ark buharlaştırılması ile oluşturulur. Bir doğru akım ark voltajı SiC tozu üretmek için kullanılan cihazlar ile ayrılmış olan iki grafit çubuk arasına uygulandıktan sonra, buharlaşan anot çember içerisinde kurum şeklinde fullerinleri oluşturur ve buharlaşan anodun bir kısmı katotta birikir. Fe ve Co gibi bir metal katalizör içeren bir grafit, saf grafit olarak anot ve katotta kullanıldığında, SWCNT'ler, MWCNT'ler yerine üretilir (Iijima ve Ichihashi, 1993; Merkoçi vd., 2005).

MWCNT'lerin ark buharlaştırma ile geniş ölçekli sentezi helyum atmosferinde gerçekleştirilmiştir. Saf grafitin çubuğun ark buharlaştırılması sadece helyum ve argon gibi gazlarla değil metan gazıyla da gerçekleştirilmiştir. Metanın MWCNT'lerin sentezinde en iyi gaz olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni metanın termal bozunması sonucu oluşan hidrojenin helyum ve argon gibi inert gazlar ile karşılaştırıldığında daha yüksek sıcaklık ve aktivite sağlamasından dolayıdır (Merkoçi vd., 2005; Guo vd., 2002; Colbert vd., 1994).

#### *1.2.7.2. Lazer-ocak yöntemi*

Lazer-ocak ya da kesikli lazer yöntemi başlangıçta çok ince tanecikler ya da metal kümesinin bir kaynağı olarak kullanılmıştır (Powers vd., 1982; Bernstein, 1990). Daha sonra fullerinler ve CNT üretimi için kullanılmıştır. Bu yöntem SWCNT'lerin üretimi için çok fazla kullanılmıştır. Lazer yüksek kaynama sıcaklığı ile materyaller için uygundur. Bu yöntemde bir CO<sub>2</sub> ışını, kuvars tüp fırının merkezine yerleştirilen hedef üzerine gönderilir. Hedef yüksek sıcaklıkta ki argon ortamında buharlaştırılır ve SWCNT'ler oluşur. Üretilen SWCNT'ler özel olarak tasarlanmış bir toplayıcıya gaz yardımıyla taşınır (Merkoçi vd., 2005).

#### *1.2.7.3. Kimyasal buhar biriktirme*

Ark buharlaştırma ve lazer-ocak yöntemleri, sentezlenen CNT'lerin sıralanmasının ve yerleşim kontrolünün sağlanamaması gibi eksikliklere sahiptir. Bu eksiklikler kimyasal buhar yöntemi (CVD) ile edilir. Bu yöntemde, bir metal katalizör varlığında termal olarak bozulan hidrokarbon buharı kullanılır. Bu metal aynı zamanda termal ya da katalitik CVD olarak da bilinir. CVD hidrokarbonların bozunmasını sağlayacak yeterli yüksek sıcaklıkta katalizör bir materyal varlığında bir tüp fırın içerisinde hidrokarbon buharının geçirilmesi ile gerçekleştirilir. CNT'ler katalizör üzerinden geçirilir ve oda koşullarında soğutulan sistemde toplanır. Bununla birlikte CNT'ler organometallic katalizörler kullanılarak da sentezlenmiştir. CVD metodunda oluşma sıcaklığı, katalizör tipi ve hidrokarbon tipi önemli parametrelerdir (Merkoçi vd., 2005; Rao vd., 1998).

### 1.2.8. CNT'lerin fonksiyonellendirilmesi

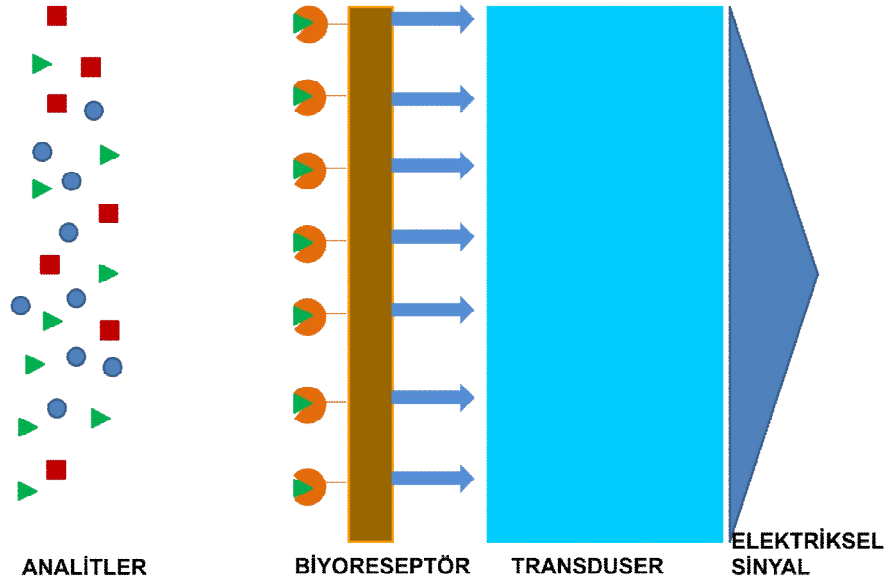
CVD ve ark buharlaştırma yöntemlerinde katalizör olarak yaygın olarak demir, kobalt ya da nikel ya da bunların bileşimi kullanılır. Bu katalizör nanopartiküller nanotüplerin tabanında ve ucunda kalır. CNT'lerin elektrokatalitik etkisi bu katalizörden kaynaklanabilir. İlk başta CNT'ler kuvvetli asitler ile muamele edildiğinde (yıkama prosedürü) bu metal nanopartiküllerin çözüldüğü ve CNT'lerden uzaklaştırıldığı iddia edilmiştir. Fakat daha sonra yapılan çalışmalarda yıkama işleminden sonra CNT'lerin demir ve bakır safsızlıkları içerdiği anlaşılmıştır ve CNT modifiye elektrotlarda hidrojen peroksit ve hidrazin gibi moleküllerin katalizlenmesini sağladığı bulunmuştur. Metal safsızlıkların tüp eksenini boyunca ya da nanotüp sonunda muhtemelen tutulduğu düşünülmüştür. Bu yüzden yıkama prosedürü kullanılarak CNT'lerin fonksiyonel hale getirilmesi son zamanlarda ki gerçekleştirilen çalışmalarda önem kazanmıştır (Banks vd., 2006; Sýljukic vd., 2006; Pumera, 2007).

Yüzey modifikasyonu ve fonksiyonellendirilmesi, biyolojik molekülleri seçici immobilize edilmesi için gerçekleştirilebilir. Karboksil, hidroksil, keton, alkol, ester, amin ve tiyol gibi fonksiyonel gruplar yaş ve kuru kimyasal modifikasyonu ile oluşturulmuştur. Temel olarak fonksiyonellendirme, CNT'nin yan duvarları ve sonunda oksitler ya da kusurlar oluşmasına neden olan bir işlemdir (Stronga vd., 2003; Daniel vd., 2007). Bununla birlikte CNT'ler inerttir ve grafit gibi tepkimeye girmeye karşı isteksizdirler. Yan duvarları ile karşılaştırıldığında, CNT'nin son uçları  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{OsO}_4$ ,  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{O}_2(\text{g})$ ,  $\text{CF}_4$  ve  $\text{SF}_6$  gibi güçlü asitlere karşı daha reaktiftir. CNT'lerin asitler ile muamele edilmesi ile yüzeyde oluşturulan gruplar ile biyolojik türlerin CNT'ler üzerine immobilizasyonu gerçekleştirilir (Yun vd., 2007,).

Poli alliamin hidroklorit (PAH) asit ile fonksiyonellendirilmiş CNT'ler sensör ve biyosensör uygulamalarında çok fazla kullanılmıştır. PAH zayıf bir katyonik polielektrolittir. İyonize olabilen amin gruplarına sahiptir. Katyonik özelliğinden dolayı, sensör uygulamalarında anyonik bir polielektrolit ile birden fazla tabaka oluşturmak için çok fazla kullanılmıştır (Sartori vd, 2011; Sartori ve Fatibello-Filho, 2012).

### 1.2.9. Biyosensörler

Biyosensör, herhangi bir ortamda bulunan ve tayin edilmek istenen analit derişimine karşı sinyal üreten bir transduser ile bir enzimden oluşan analitiksel cihazlardır. Üretilen sinyal, enzim tarafından katalizlenen reaksiyon sonucu oluşan ısı emisyonu, yansıma ya da absorpsiyon, ışık emisyonu, oksijen ya da amonyak gibi gazların tüketimi ya da ortama salınımı ve proton derişiminin değişiminden kaynaklanabilir. Transduser, sinyali akım, potansiyel, sıcaklık değişimi ve absorpsiyon gibi ölçülebilir bir değere dönüştürür (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Bir biyosensörün yapısı

Enzimler sahip oldukları katalitik ve spesifik özelliklerinden dolayı biyosensör sistemlerinde algılayıcı element olarak çok fazla kullanılmıştır. İlk biyosensör Clark ve Lyons tarafından, glukoz tayinini gerçekleştirmek için oksijen elektrot üzerine immobilize edilen glukoz oksidaz ile oluşturulan sistemdir (Mulchandani, 2006).

#### 1.2.9.1. Elektrokimyasal biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler biyolojik tanıma elementi olarak hedef analit ile seçici olarak reaksiyona giren enzimler, proteinler, antibodiler, nükleik asitler, hücreler, dokular ve reseptörlerin kullanıldığı ve analit derişimi ile orantılı olarak elektriksel sinyal üretilen sistemlerdir. Elektrokimyasal biyosensörler, biyolojik tanıma işlemin yapılışına göre biyokatalitik cihazlar ve affinite sensörler olmak üzere iki ana gruba

ayrılırlar. Biyokatalitik cihazlar, elektroaktif türler üreten ve hedeflenen analiti belirleyen doku parçaları, sağlıklı hücreler ve enzimleri içerir. Affinite biyosensörler, antikor, reseptör ve nükleik asit gibi biyolojik bir eleman ve analit arasında seçici bir bağlayıcı etkileşime dayanır (Wang, 2006; Ronkainen vd., 2008).

Biyolojik aygıtlarda değişik türlerde biyolojik tanıma elementleri kullanılmasına rağmen, elektrokimyasal biyosensörler sahip oldukları yüksek biyokatalitik aktivite ve spesiflik yüzünden öncelikli olarak enzimleri kullanırlar (Grieshaber vd., 2008; Ronkainen vd., 2008). Sahip oldukları üstün özelliklerin yanında, enzimlerin kullanıldığı biyokatalitik sensörlerin tasarımı oldukça kolaydır. Biyokatalitik sensörler aynı zamanda klinik ve endüstriyel analizlere kolaylıkla uygulanabilir. İnsan kanında glukoz miktarının belirlenmesini sağlayan cihazlar, biyokatalitik sensörlerin ticari kullanımına yönelik en başarılı uygulamadır.

Enzimler reaksiyon hızını arttırarak kimyasal reaksiyonu katalizler. Enzimin substrat ile ilişkisi kinetik çalışmalar ile karakterize edilir. Enzimlerin depolama ve çalışma kararlılığı gibi parametreler önem taşımaktadır. Bununla birlikte karıştırma, sıcaklık ve pH gibi deneysel parametrelere duyarlılığı minimum düzeyde olmalıdır ve ölçüm aralarında bu parametrelerde ki değişim mümkün olduğu kadar az olmalıdır. Enzimler substratlarına karşı mükemmel bir özgünlüğe sahiptir ve idrar ya da kan gibi örneklerde kendi substratını belirleyebilirler. Böylelikle karmaşık metotlarda kullanılan başka maddelerle girişim olanağını arttıran ön işlem ve ayırma adımlarının yapılmamasını sağlar. Enzimlerin aktif taraflarında protein yapısında olmayan kimyasal gruplar girişim yapabilecek türlerden kaynaklanabilecek girişimleri engeller (Copeland, 2000; Ronkainen vd., 2008).

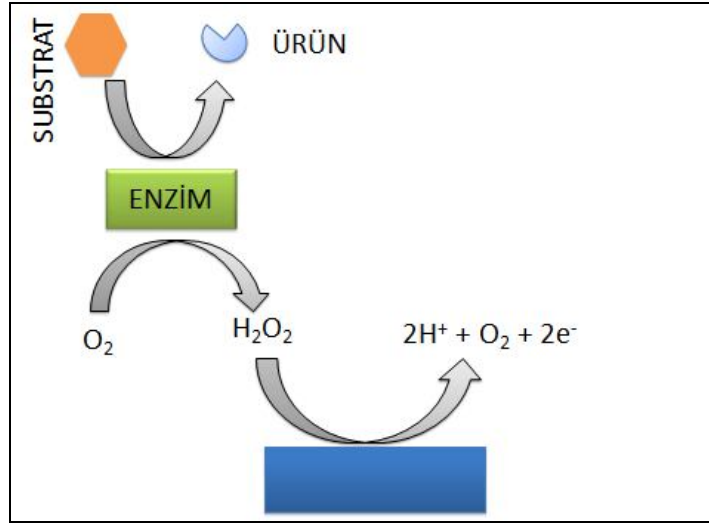
### *1.2.9.2. Enzim temelli elektrokimyasal biyosensörler*

Enzim elektrotlar çalışma elektrot üzerinde ince bir tabaka halinde immobilize edilen enzimden oluşan elektrokimyasal problardır. Enzim, elektroaktif türün oluşumunu katalizler ve bundan dolayı sensörün seçiciliğini sağlar. Bununla birlikte enzim elektrodun aktivitesi elektrot dizaynına ve çözelti parametrelerine bağlıdır. Hızlı bir enzim katalizi bazı zamanlar biyosensörlerde sinyalin arttırılmasını sağlar (Ronkainen vd., 2008).

Enzim temelli biyosensörlerde I. nesil biyosensörler oksijene bağlı, II. nesil biyosensörler medyatöre bağlı biyosensörlerdir. III. nesil biyosensörler birleştirilmiş

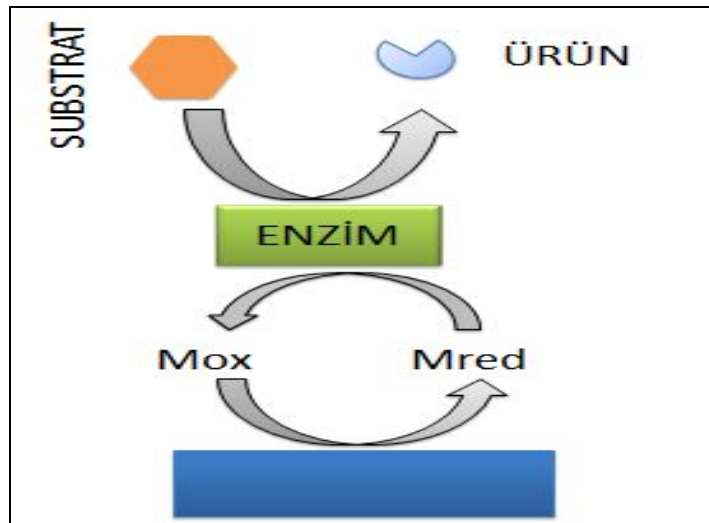


enzim elektrotlardan oluşur. Birinci nesil biyosensörlerde ortamda moleküler halde bulunan oksijen substratın ürüne dönüşümünde hidrojen peroksit indirgenir (Şekil 1.10). Substart miktarı katodik potansiyelde oksijen indirgenmesi ve anodik potansiyelde hidrojen peroksit yükseltgenmesi izlenerek belirlenebilir (Anık, 2012).



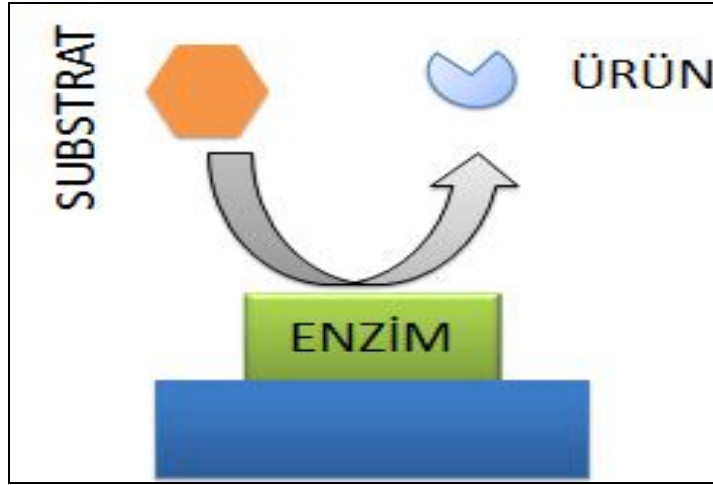
Şekil 1.10. I. nesil biyosensör

II. nesil biyosensörlerde medyatörler kullanılır ve medyatörlerin indirgenip yükseltgenmesi ile elektron transferi gerçekleşir (Şekil 1.11). Bu amaçla kullanılacak medyatörün indirgenmiş ve yükseltgenmiş halinin kararlı yapıda olması, ortamda bulunan oksijen ile tepkime vermemesi ve indirgenmiş koenzim ile hızlı tepkime vermesi gerekir (Anık, 2012).



Şekil 1.11. II. nesil biyosensör

III. nesil biyosensörlerde elektrot yüzeyi ile enzimin redoks merkezi arasında doğrudan bir etkileşim söz konusudur (Şekil 1.12). Bu etkileşim organik iletken tuzlar ile sağlanır ve organik metal olarak adlandırılan bu metaller ortam sıcaklıklarında genellikle metalik özellikler gösterirler (Anık, 2012).



Şekil 1.12. III. nesil biyosensör

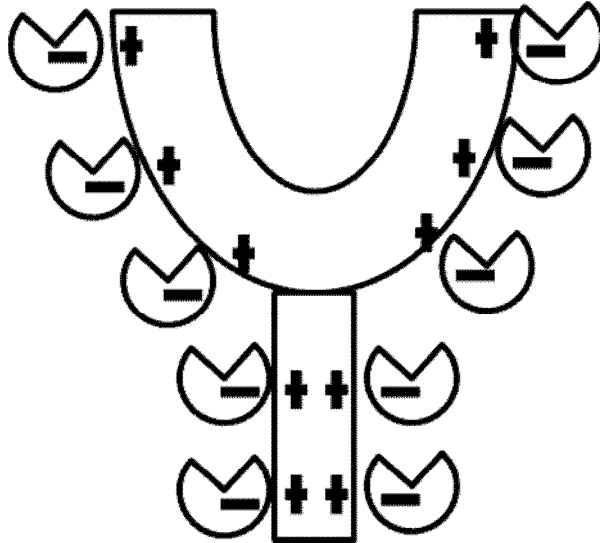
#### 1.2.10. Enzim immobilizasyonu

Enzimi elektrot üzerine tutturmak için kullanılan yöntem çok önem taşır. Bu olay materyal ara yüzeyi ile biyolojik bileşen arasında sağlanan değişik türde ki etkileşimler ile sağlanır (Andreescu ve Sadık, 2004; Andreescu vd., 2008). İmmobilize edilen enzimlerin serbest enzimlere üstünlüklerini aşağıda ki gibi sıralayabiliriz;

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabildiklerinden, ürünlerin enzimler tarafından kirletilmesi gibi bir problem oluşmaz.
- Çevre koşullarına karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilirler.
- Sürekli işlemler uygulanabilirler.
- Serbest enzimler ile kıyaslandıklarında daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen birden fazla basamaklı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimler ile kıyaslandıklarında daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendi kendini parçalama olasılığı azalır (Özdemir, 2010).

### 1.2.10.1. Fiziksel adsorpsiyon

Fiziksel adsorpsiyon, basit, ekonomik ve enzimlerin daha az denature olmasını sağlayan bir yöntemdir (Şekil 1.13). Fiziksel adsorpsiyon, destek ya da elektrot bir materyal üzerine enzimin kolaylıkla biriktirilmesi ile gerçekleştirilir. Bu yöntemde enzim aktivitesini etkileyecek herhangi başka bir kimyasal kullanılmaz. Ancak fiziksel adsorpsiyona neden olan etkileşimler zayıf olduğundan, bu yöntemle sağlanan enzim immobilizasyonu pH, sıcaklık, çözücü ve iyonik şiddette meydana gelen değişimlere karşı duyarlıdır. Bu yüzden uzun süreli çalışma kararlılığı, depolama kararlılığı ve enzim aktivitesinde artış sağlamaz (Gerard vd., 2002; Scouten vd., 1995; Thevenot vd., 2001).

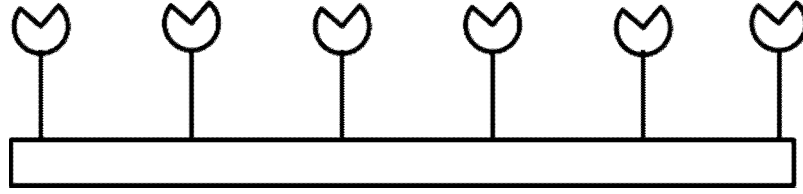


Şekil 1.13. Fiziksel adsorpsiyona ile immobilizasyon

### 1.2.10.2. Kovalent bağlama

Bu yöntemde, enzimin kullanılacak taşıyıcıya bağlanması zorunlu gruplar üzerinden olmamalıdır. Enzimde yer alan amino asitlerin sahip oldukları fonksiyonel gruplar ile kovalent bağlanma gerçekleşir (Şekil 1.14). Immobilizasyon için kullanılan taşıyıcı hidrofobik karakterde olmamalı ve mekanik kararlılığa sahip olmalıdır. Bununla birlikte taşıyıcının mikroorganizma üremesini engellemesi, pH ve kullanılan çözümlere karşı dayanıklı olması gerekir (Özdemir, 2010). Bu yöntemde kuvvetli kimyasal bağlanmalardan dolayı enzim kararlılığında sağladığı artışlar gibi

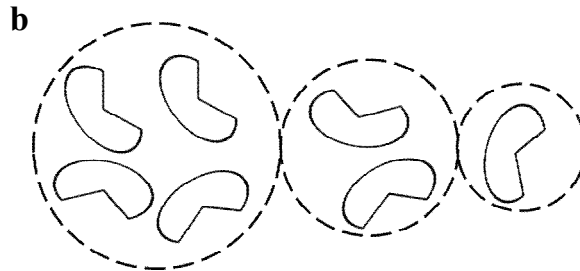
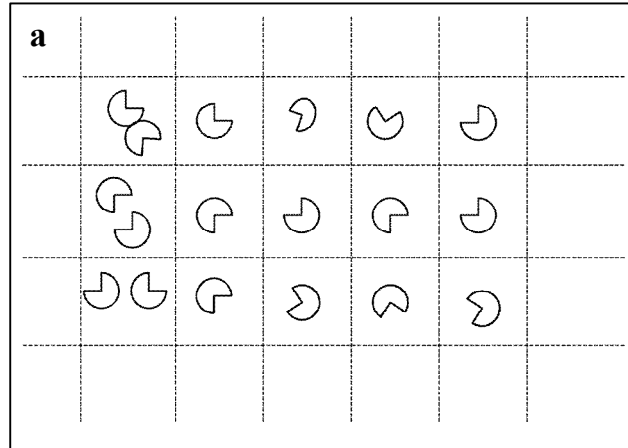
avantajları vardır. Fakat fazla miktarda enzimin kullanılması, enzim aktivitesinde düşüşler gözlenmesi, düşük tekrarlanabilirlik gibi dezavantajlara sahiptir (Gooding ve Hibbert, 1999; Andreescu vd., 2008 Andreescu ve Marty, 2006).



Şekil 1.14. Kovalent bağlama ile immobilizasyon

### 1.2.10.3. Tutuklama

Enzim immobilizasyonu için en uygun yöntemlerden bir diğeri inert bir materyal içinde fiziksel tutuklamadır (Şekil 1.15). Bu yöntemin, enzimin yüksek kararlılığı, ekonomik ve tek adımda oluşturulması gibi sahip olduğu özelliklerinden dolayı diğere yöntemlerden üstünlükleri vardır. Fakat bu yöntemi, substratların taşınmasında meydana gelen difüzyonel engel sınırlar. Bununla birlikte enzimin tutuklandığı inert materyal içerisinden sızma ihtimali söz konusudur (Cosnier, 2005; Cosnier vd., 2006; Andreescu vd., 2008).



Şekil 1.15. a) kafes tipi, b) mikrokapsülleme tutuklama yöntemi

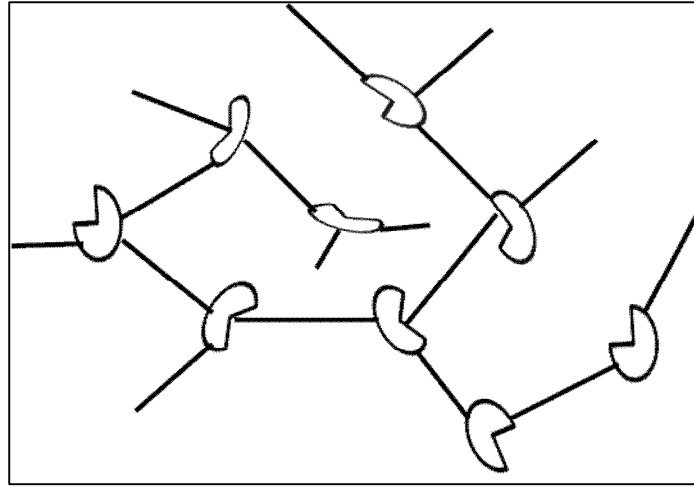
#### 1.2.10.4. Çapraz bağlama

Çok fonksiyonelli küçük moleküllü reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar oluşmasına neden olur (Şekil 1.16). Böylelikle suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasına neden olur. İmmobilizasyon edilecek enzim, protein ve reaktif derişimi ve pH, çapraz bağlanma derecesini ve immobilizasyonu etkiler (Telefoncu, 1997; Özdemir, 2010).

Çapraz bağlama ile enzim immobilizasyonu dört farklı şekilde gerçekleştirilir;

- a) Enzimin sadece bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- b) İkinci bir protein varlığında enzimin bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- c) Suda çözünen bir taşıyıcıda enzimin adsorpsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- d) Enzimin bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonudur.

En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaldehid, klorformat, karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bisoksiranlar, divinilsülfanlar, p-benzokinonlar, geçiş metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir (Telefoncu, 1997; Özdemir, 2010).



Şekil 1.16. Çapraz bağlama yöntemi ile immobilizasyonu

## 1.2.11. Biyosensör örnekleri

### 1.2.11.1. Glukoz biyosensörü

Glukoz miktarının, kan ve idrar örneklerinde belirlenmesi diyabet hastalığının önceden teşhis edilmesi açısından önemlidir. Aynı zamanda fermantasyonla oluşan glukoz miktarı yiyecek kalitesini etkiler. Bu yüzden gıda sektöründe de glukoz miktarının belirlenmesi önemlidir (Wang vd., Nenkova., 2010). Glukoz belirlenmesi için genellikle glukoz oksidaz (GOD) enzimi kullanılmıştır. GOD ile glukoz belirlenmesi, bu enzim varlığında çözünmüş oksijen varlığında glukozun yükseltgenmesi ile oluşan hidrojen peroksidin yükseltgenmesi süresince anodik akımın artışı ya da enzimatik reaksiyonda çözünmüş oksijenin indirgenmesi süresince katodik akımda meydana gelen azalmaya bağlı olarak belirlenir (Updike ve Hicks, 1967; Guilbault ve Lubrano, 1973; Chena vd; 2011) .

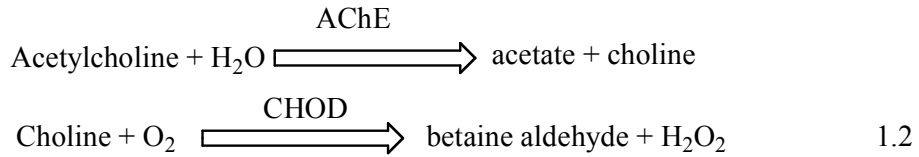
### 1.2.11.2. Ksantin biyosensörü

Ksantin (X), purin metabolizmasında bir ara üründür ve ATP bozunmasından sonra üretilir. Bu sebeple ksantin oksidaz (XO), tarafından X'in fizyolojik dönüşümü tıbbi alanlarda artan bir ilgiye sahiptir (Arslan vd., 2006; Ronkainen vd., 2010). Bunun yanında X biyosensörleri et ve balık tazeliğinin belirlenmesi için sıklıkla kullanılmıştır. Çünkü insanlara satılan ürünlerin kabul edilebilir tazeliğinin belirlenmesi çok önem taşır. Bu yüzden et ve balık ürünlerinin bozunması ile oluşan ürünlerin belirlenmesi için hızlı ve güvenilir analitiksel metotlara ihtiyaç duyulur (Çubukcu., 2007; Ronkainen vd., 2010).

### 1.2.11.3. Asetilkolin biyosensörü

Nörotransmitterler sinir akzonu ucundan salınan kimyasal bir maddedir. Sinapsis yerinde presinaptik nöronun akzon ucundan salınan bu madde, postsinaptik nöron yüzeyinde bulunan bir reseptör tarafından tanınır. Bu hücreyi uyarır yada inhibe eder (Noyan, 1989). Asetilkolin (ACh) merkezi sinir sisteminde ve beyinde olduğu belirlenen ilk nörotransmitterdir. ACh, merkezi sinir sisteminde hafızanın oluşumu ve öğrenme, bağımlılığın tedavisi ve bu tedavilerin geliştirilmesi ve Alzheimer ve

Parkinson hastalıklarının tedavisinde çok önemli fonksiyonlara sahiptir. Bununla birlikte Alzheimer ve Parkinson gibi sinirsel bozuklukların başlamasında ACh ve onun metabolitinin anormal seviyeye çıkması ile gerçekleştiğini gösteren çok fazla çalışma vardır (Yang vd., 2007; Wei vd., 2009; Khan ve Ghani, 2011; Hou vd., 2012). Bundan dolayı Donepezil ve takrin gibi ilaçların etkilerinin araştırılması için AChE temelli elektrokimyasal biyosensörler çok fazla kullanılmıştır. Donepezil, Alzheimer tedavisinde kullanılan ikinci nesil bir kolin esteraz inhibitörüdür. Alzheimer, beyinde kolinerjik fonksiyonlarda meydana gelen bozukluktan oluşan bir hastalıktır. Bundan dolayı Donepezil, kolinerjik iletimin sağlanmasında Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılır (Snape vd, 1999; Ozturk vd, 2007, Ozturk vd, 2008). ACh, asetilkolin esteraz (AChE) ve kolin oksidaz (CHOD) enzimlerinin kullanıldığı ikili enzimatik sistem ile aşağıda verilen denklemlere bağlı olarak belirlenir.



### 1.2.12. İnhibisyon temelli biyosensörler

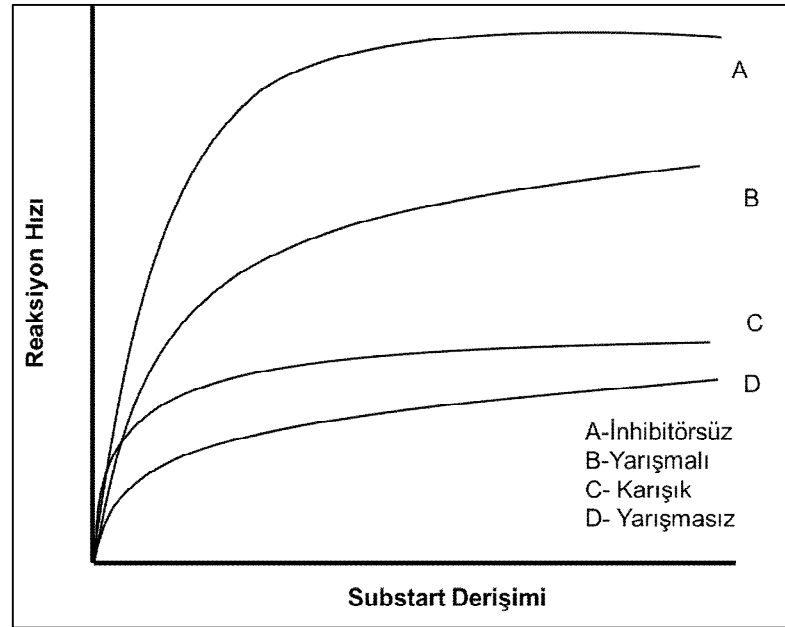
Enzim inhibisyonu temelli biyosensörler organofosforlu pestisitler (OPs), organoklorin pestisitler, insektisit türevlerini, ağır metal ve glycoalkaloidler gibi önemli analitlerin belirlenmesinde çok fazla kullanılmıştır. Bu biyosensör sistemleri hedef analit ile muamele edilmeden önce ve edildikten sonra enzim aktivitesinin ölçümüne dayanmaktadır. Böylelikle enzim aktivitesinde ki düşüşün yüzdesi ile inhibitör arasında bir ilişki elde edilir (Guerrieri vd, 2002; Ivanov vd, 2003; Aminea vd, 2006).

Tarımsal uygulamalarda kullanılan pestisitlerin tayininde AChE temelli biyosensörler çok fazla kullanılır. Pestisitler AChE enzimini, serin gruplarında fosforilasyon oluşturmasından dolayı inhibe eder. Böylelikle enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan tiyokolin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi analitlere ait sinyallerin azalmasına neden olur (Upadhyay ve Verma, 2013). Bu pestisit grubundan organofosforlu pestisitler, böceklerle karşı gösterdiği toksik özelliğinden dolayı haşerat ile mücadelede kullanılır. Fakat OPs kullanımı çevreye ve insan sağlığına karşı ciddi bir tehdit

oluşturur (Gan vd., 2010; Wang vd., 2011). Bu sebeple OPs'in belirlenmesi için AChE temelli biyosensör sistemleri son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzim inhibisyonu çalışmaları ile ağır metal analizleride gerçekleştirilir. Eser miktarda cıvanın belirlenmesi için turp peroksidaz (horseradish peroxidase) (Han vd., 2001), üreaz (Krawczyk vd., 2000; De Melo vd., 2002; Kuswandi, 2003), glikoz oksidaz (Alexander and Rechnitz, 2000) ve alkol oksidaz (Pirvutoiuet vd., 2002) kullanılmıştır. Kadmiyum iyonu ise üreaz (Lee and Russel, 2003) ve bütirikolin oksidaz (Mourzina vd., 2004) gibi enzimler kullanılarak belirlenmiştir.

#### 1.2.12.1. Tersinir İnhibisyon

Tersinir inhibisyonda, enzim ile inhibitör arasında gerçekleşen etkileşim oranı karakterize edilir. Bu nedenle aktivitesinde tersinir inhibisyona uğrayan biyosensör yeniden elde edilebilir. Ancak, enzim aktivitesinde ki düşüş nedeni ile biyosensör yanıtlarında azalma görülebilir. Çünkü enzim aktivitesini büyük oranda aktivitesini tekrar kazanma çalışmasından sonra kaybeder. Enzim aktivitesini inhibe eden mekanizmaya dayalı olarak inhibitörler yarışmalı, yarışmasız ve karışık inhibitörler olarak sınıflandırılır (Upadhyay ve Verma, 2013). Her üç inhibitör türünde de reaksiyon hızı düşer. Şekil 1.17'den görüldüğü gibi reaksiyon hızında düşüş en fazla yarışmasız inhibitörde görülür.



Şekil 1.17. İnhibitörsüz ve farklı inhibitör varlığında reaksiyon hızı-substrat derişimi ilişkisi



### 1.2.12.2. Tersinmez İnhibisyon

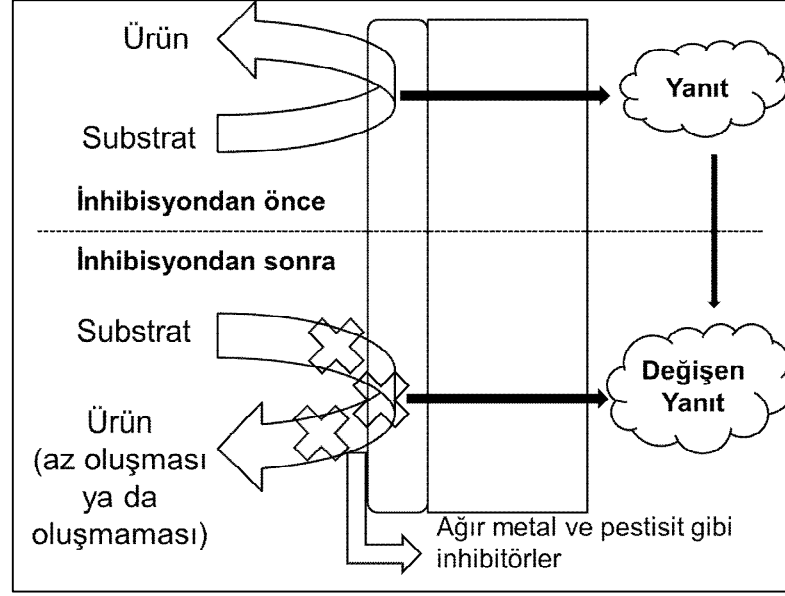
Tersinmez inhibisyonda inhibitör enzim aktif bölgesine kovalent bağ ile bağlanır ve enzim aktivitesini kalıcı olarak inhibe eder. Yüksek derecede etkin olan inhibitör enzimi tersinmez olarak bağlar ve bu yüzden aktivitesini inhibe eder (Turdean, 2011; Upadhyay ve Verma, 2013).

### 1.2.12.3. İnhibisyon Temelli Biyosensör Yanıtları

Biyosensör yanıtları genellikle Şekil 1.18’de gösterildiği gibi inhibitör ile muamele edildikten sonra enzim aktivitesinde ki değişimin hesaplanması ile değerlendirilir. İnhibitör derişimi, enzimin inhibitör ile muamele edilmeden ve edildikten sonra inhibisyon yüzdesinin ölçülmesi ile hesaplanır. Yüzde inhibisyon aşağıda verilen eşitlik ile hesaplanır:

$$I (\%) = \frac{I_{p, \text{control}} - I_{p, \text{exp}}}{I_{p, \text{control}}} \times 100\% \quad 1.3$$

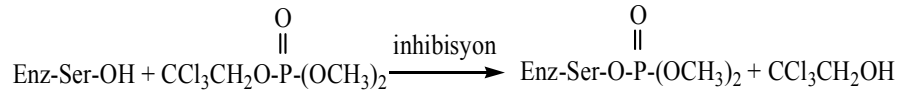
Bu denklemde, I (%) yüzde inhibisyon,  $I_{p, \text{control}}$  enzim bir inhibitör ile muamele edilmeden önce elde edilen akım değeri,  $I_{p, \text{exp}}$  ise enzim bir inhibitör ile muamele edildikten sonra elde edilen akım değeridir. İnhibisyon temelli biyosensör sistemlerinde sadece inhibitör derişimi hakkında bilgi vermez, aynı zamanda inhibisyon çalışmasının kinetik karakteri hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlar. Bununla birlikte enzimin aktif bölgeleri ve enzimin katalitik mekanizması hakkında önemli bilgiler elde edilebilir. İnhibisyon temelli biyosensör sistemlerinde inkübasyon süresi ve inhibitör derişimi inhibisyon oranını etkileyen iki önemli parametredir (Turdean, 2011; Upadhyay ve Verma, 2013).



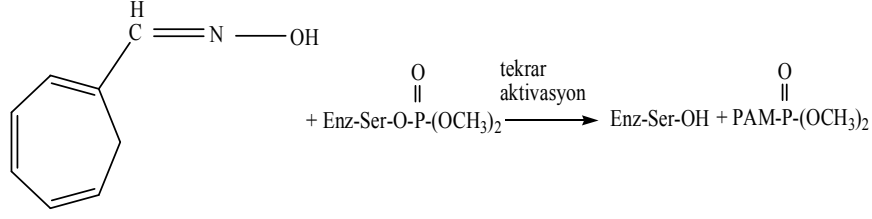
Şekil 1.18. İnhibisyon temelli biyosensör çalışma prensibi

#### 1.2.12.4. Enzim aktivitesinin yenilenmesi

Enzim aktivitesinin inhibitör tarafından inhibe edilmesi elektron transfer zincirinin bloklanması ve bakır kofaktörü ile kompleks oluşumundan dolayı enzimlerin aktif bölgelerinin etkilenmesine dayanır. OPs, fosforilasyon sayesinde bir serin fosfoester oluşturmak için nükleofilik bir saldırı ile aktif bölgede bulunan serin tarafının inhibe olması ile AChE aktivitesinde düşüğe neden olur (Simonian vd., 2001; Amine vd., 2006). Bu durumda enzimin kuvvetli inhibisyonu biyosensörün tekrar kullanımının sınırlandırılması pratik uygulamalarda ciddi problemler oluşturur. Bu problemi yenmek için, AChE için pridin-2-aldoksim metiliodür (2-PAM) ve 4-formilpiridinium bromid dioksim (TMB-4) gibi reaktifler kullanılarak enzim aktivitesinin yenilenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Gulla vd., 2002). Aşağıda AChE enziminin bir pestisit ile fosforilasyonu sonucu inhibe olması reaksiyon olarak gösterilmiştir (Jaffrezic-Renault, 2001) .



İnhibe olan AChE'nin 2-PAM kullanılarak aktivitesinin tekrar kazanılması aşağıda reaksiyon ile gösterilmiştir(Jaffrezic-Renault, 2001).



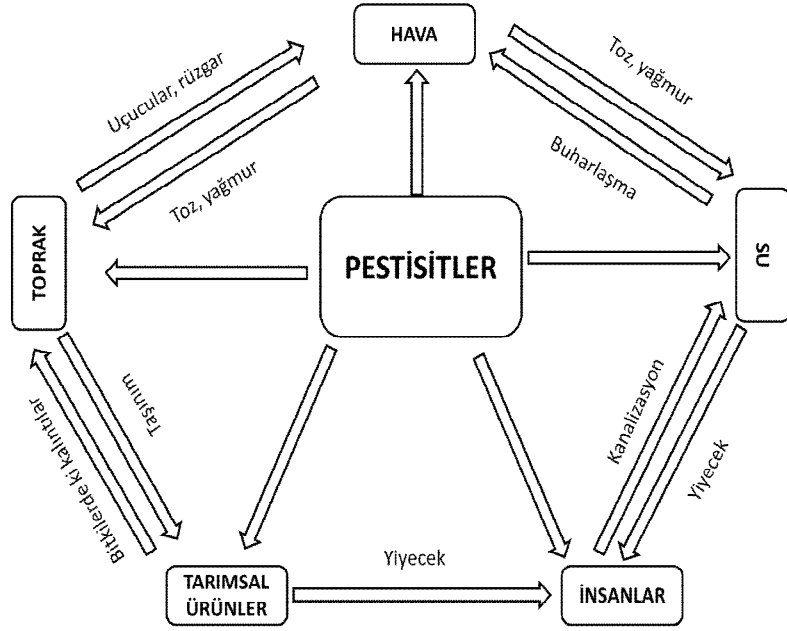
### 1.2.13. Pestisitler

Pestisitler, tarımsal uygulamalar ve evlerde haşeratları öldürmek için kullanılan kimyasal bileşiklerdir. Pestisitler gıdaların ve tarımsal ürünlerin kalitelerinin ve miktarının kontrol edilmesini sağlar. Böylelikle kemirgen taşıyıcılar ve böcekler tarafından taşınan birçok hastalığın engellenmesini sağlar. Bununla birlikte çok fazla yararları olmasına rağmen, pestisitler çok toksik özelliklere sahiptir ve çevrede devamlı hareket halinde olan bir döngüsü vardır. Bu sebeple aşırı kullanımları çevre ve insanlarda zararlı etkilere neden olur. Aynı zamanda gıdalarda varlıkları ise son derece tehlikelidir. Sahip oldukları çevresel kararlılık, toksik özellikler ve biyobirikme özelliklerinden dolayı, pestisitler insan vücuduna yerleşerek önemli derecede hastalıklara ve zehirlenmelere neden olabilir (Fenik vd., 2011).

Pestisitler farklı yollar ile çevrede yer alır. Pestisitler tarımsal ürünlerin kalitesinin ve veriminin artırılmasında çok büyük öneme sahiptir. Pestisitler aşağıda verilen amaçlar için kullanılır;

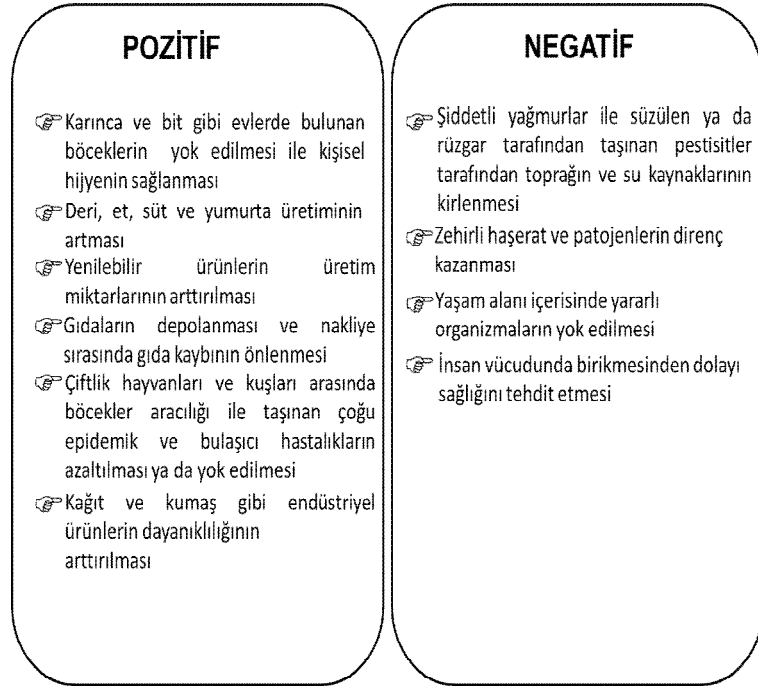
- Bitkilere yada belli bir bölgesine zarar veren haşeratların sayısının kontrol edilmesinde;
- Hayvan ve bitki biyokütle üretiminin artmasında;
- Çiftlik ürünlerinin çürümesine ve bozulmasına neden olan mikroorganizmalar ile mücadelede;
- Yosun, bakteri, mantar ve yabani otlar ile mücadelede;
- Ürünlere zarar veren hayvansal böcekler ile mücadelede;
- Bitkinin gelişme dönemini yavaşlatmak ya da hızlandırılmasında;
- Farklı yaşam alanlarında zararlı organizmaları öldürülmesinde (Fenik vd., 2011).

Pestisitlerin yukarıda belirtildiği gibi geniş kapsamlı kullanımı su, hava ve toprak da bulunmasının yanında meyve ve sebze gibi tarımsal ürünlerde de birikmesine neden olur. Pestisitler başta hava ve yağmurla uygulandığı noktadan yakın olan komşu bölgelere taşınır (Hajslova ve Zrostlikova, 2003; Moreno vd., 2006; Fenik vd., 2011).



**Şekil 1.19 Doğada pestisitlerin döngüsü**

Şekil 1.20’de pestisitlerin pozitif ve negatif etkileri verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi pestisitler insan sağlığına ve çevreye bir tehdit oluşturmaktadır. Her yıl Avrupa Birliği ülkelerinde 140,000 ton pestisit tarımsal ürünlerde kullanılmaktadır. Meyve ve sebzeler pestisitler tarafından en fazla etkilenen tarımsal ürünlerdir. Bu meyve ve sebze grubu arasında en fazla üzüm, turunçgil ve patates üzerine bulaşır. 2008’de Avrupa Birliği Pestisit Hareket Ağı tarafından verilen bilgilere göre Avrupa Birliği ülkelerinde üretilen gıdalarda 350 farklı pestisit bulunmuştur. Bu ürünlerin %5’den fazlasında pestisit miktarının olması gereken sınırdan daha fazla olduğu anlaşılmıştır (Fenik vd., 2011).



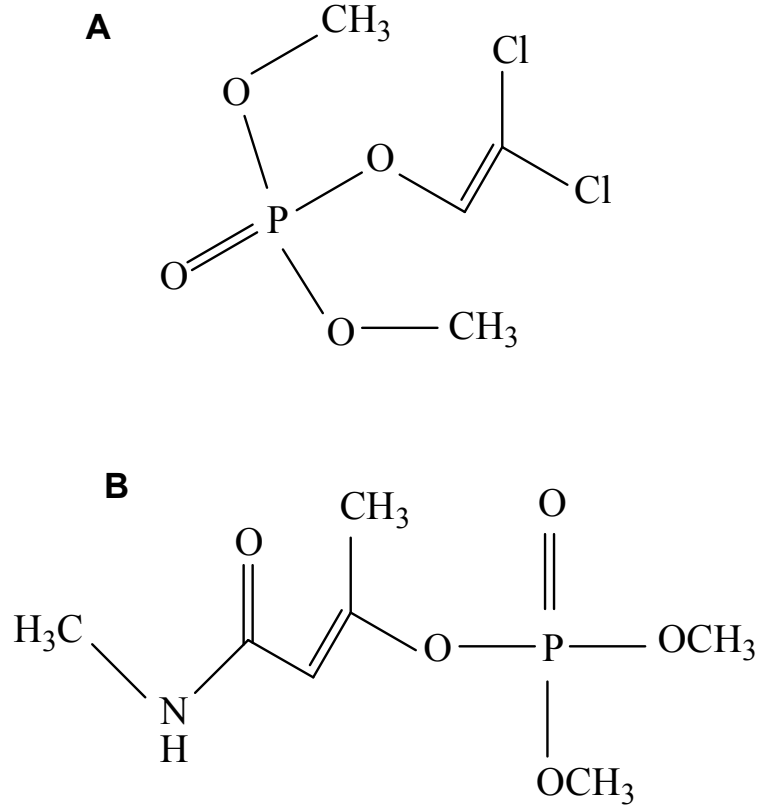
**Şekil 1.20. Pestisitlerin pozitif ve negatif etkileri**

Pestisitlerin sahip oldukları kimyasal yapıları, fonksiyonları ve uygulamaları onların sınıflandırılmasını zorlaştırır. Fakat aşağıda verilen önemli kriterler göz önüne alınarak kategorize edilirler;

- Toksik özelliği
- Uygulama amacı
- Kimyasal yapısı
- Çevrede gösterdiği kararlılık
- Hedef analiti etkileme yolu

Yapısal olarak organik ve inorganik yapılar olmak üzere ikiye ayrılır. İnorganik yapılar, arsenik insektisitler, florit insektisitler, inorganik bitki öldürücüler ve inorganik mantar öldürücülerdir. Organik yapılar ise, organoklorinli, organofosforlu (OPs) ve organonitrojenli pestisitlerdir. Organik yapıya sahip pestisitler arasında OPs bitkilerin korunmasında en önemli pestisit grubudur. OPs fosfor içeren organik bileşiklerdir (Jokanovic, 2001 ve 2009). OPs endüstriyel bitki yetiştirme, meyve ve sebze yetiştirmede haşerat ile mücadelede kullanılır. OPs toksik özelliği, özellikle AChE gibi sinir sisteminin fonksiyonlarını kontrol eden enzimin aktivitesini inhibe etmesine bağlıdır. Kolinesterzaların aktivitelerinin inhibe olmasından dolayı

sinapslarda ACh miktarında artma olur. Bunun sonucunda merkezi solunum sistemi ve kaslarda ciddi problemler ortaya çıkar (Fenik vd., 2011).



Şekil 1.21. A) Diklorvos, B) monokrotofos organofosforlu pestisitlerin kimyasal yapısı

#### 1.2.14. Senti-voltammetri

Senti-voltammetri, santrifüj ve voltammetri yöntemlerinden oluşan bir metottür. Bu yöntem, ilgili analitlerin birlikte çöktürüldüğü ve direk voltammetrik analizin yapılması sağlayan pratik bir yol sağlar.

Senti-voltammetride hedeflenen analitlerin belirlenmesi için farklı taşıyıcılar kullanılmıştır. Bu taşıyıcılar sayesinde istenilen analitlerin senti-voltammetrik hücrenin alt kısmında kare şeklinde bulunan Pt elektrot üzerine önderiştirilmesi sağlanmıştır. Bunlardan biri  $Al(OH)_3$ 'dür. Santrifüj gücü ile elektrot yüzeyine ince bir tabaka halinde adsorbe olan  $Al(OH)_3$  ağır metallerin önderiştirilmesini sağlamıştır. Bu çalışmada ki asıl amaç analit olarak seçilen kurşun iyonlarını birlikte çöktürmeyle  $Al(OH)_3$  ile elektrot arasında tuzaklamaktır. Bunun yanında adımları olmadan aynı senti-voltammetrik hücrede voltammetrik analizlerin gerçekleştirilmesini sağlayan iletken bir tabaka sağlamıştır (Kırgöz vd., 2004).

Diğer bir çalışmada ise taşıyıcı olarak sahip olduğu iyi mekaniksek direnç, önderiştirme etkisi ve yüksek seçicilikten dolayı çok fazla kullanılan şelatlaştırıcı reçinelerden bir tanesi olan Amberlite XAD-7 reçinesi kullanılmıştır. Bu çalışmada kurşun iyonları, Amberlite XAD-7 reçine ile sentri-voltammetrik hücrenin alt kısmında bulunan kare şeklindeki Pt elektrot üzerinde önderiştirilmiştir. Böylelikle daha duyarlı sonuçlar elde edilmiştir (Kırgöz vd., 2005).

Sentri-voltammetrinin biriktirme çalışmalarında kullanılan başka bir teknik olan ASV'den önemli bir farkı vardır. Bu yöntemde, analitik sadece küçük bir kısmı kontrol edilebilen koşullar altında elektrot üzerinde önderiştirilir. Ancak sentri-voltammetride elektrot yüzeyinde analitin büyük bir kısmının önderiştirilmesi mümkündür. Bu özellik daha düşük LOD değerlerinin elde edilmesini sağlar (Kırgöz vd., 2005).

Diğer bir çalışmada civa iyonları sentri-voltammetrik olarak belirlenmiştir. Bu yöntemde metalik civa sodyum bor hidrür kullanılarak indirgenmiş ve bir taşıyıcı kullanılmadan santrifüj gücü ile sentri-voltammetrik hücrenin alt kısmında bulunan altın elektrot ile amalgam oluşturulması sağlanmıştır (Ürkmez vd., 2009).

Sentri-voltammetrik diğer bir çalışmada, molibden iyonları pyrogallol red kullanılarak önderiştirilmiştir. Bu çalışmada kompleks halinde olan molibden ve pyrogallol red, santrifüj gücü ile ince bir film halinde elektrot yüzeyinde biriktirilmiştir (Koçak ve Ertaş, 2013).

### **1.2.15. Biyosentri-voltammetri (Centri-biyovoltammetri)**

Bu doktora tezi kapsamında sentri-voltammetrinin uygulama alanının genişletilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ilk kez sentri-voltammetri, enzim temelli biyosensör sistemi birleştirilmiş ve bu yöntem “Biyosentri-voltammetri (sentri-biyovoltammetri olarak da adlandırılmaktadır)” adı verilmiştir. Bu yöntem biyosentri-voltammetrik hücrenin çalışma elektrodunun üzerine uygun bir enzimin immobilize edilmesini içerir. Substratın herhangi bir taşıyıcı materyal kullanılmadan, uygulanan santrifüj kuvveti ile çalışma elektrodun üzerine biriktirilmesi sağlanır. Biyosentri-voltammetrik (sentri-biyovoltammetrik) yöntem ile biyolojik öneme sahip moleküllerin daha duyarlı belirlenmesi sağlanır (Anık, 2013)

## 2. MALZEME VE YÖNTEM

### 2.1. Cihaz ve Malzemeler

Voltammetrik ölçümler AUTOLAB PGSTAT 12, impedimetrik ölçümler ise FRA 2  $\mu$ -AUTOLAB Type III elektrokimyasal ölçüm sistemi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.1 ve 2.2). Bilgisayar kontrollü olan AUTOLAB PGSTAT 12 ve FRA 2  $\mu$ -AUTOLAB Type III cihazının sinyalleri GPES Windows 4,9 yazılımı ile değerlendirilmiştir.



Şekil 2.1. AUTOLAB PGSTAT 12 cihazı





**Şekil 2.2.  $\mu$ -AUTOLAB TYPE III cihazının resmi**

Deney süresince kullanılan diğer cihazlar ve kullanım amaçları şöyledir:

- ☞ GCE ve CPE'yi temizlemek ve bazı maddeleri çözmek amacıyla BANDELIN marka RK 102 H model sonikatör kullanılmıştır.
- ☞ 25 °C' de pH = 7 ve pH = 7,5'da standart elektrot çözeltileriyle kalibre edilmiş ORION STAR SERIES model pH metre ile pH ölçümleri yapılmıştır.
- ☞ Kimyasal çözeltileri hazırlamak için katı kimyasalların tartımı PRECISA XR 205SM-DR model hassas terazi ile yapılmıştır.
- ☞ Santrifüj işlemleri için Nüve NF 800 ve SİGMA 3-16 PK model (seri no: 121 321, maksimum hız (rpm): 15 300, maksimum kapasite (mL): 1000: maksimum yer çekimsel alan (x g): 23 031, maksimum kinetik enerji (Nm): 9970, Rotor 19 776-H; 1400 min<sup>-1</sup>, maksimum yükleme 6x80 g) santrifüj cihazları kullanılmıştır.
- ☞ Yüzey karakterizasyonu için SEM görüntüleri JEOL JSM-7600F kullanılarak elde edilmiştir.

## **2.2. Kullanılan Elektrotlar**

Çalışma hücresi, istenilen miktarda analit içeren destek elektrolit çözeltisine daldırılmış üç elektrottan oluşmuştur. Deneyler oda sıcaklığında 10 mL'lik

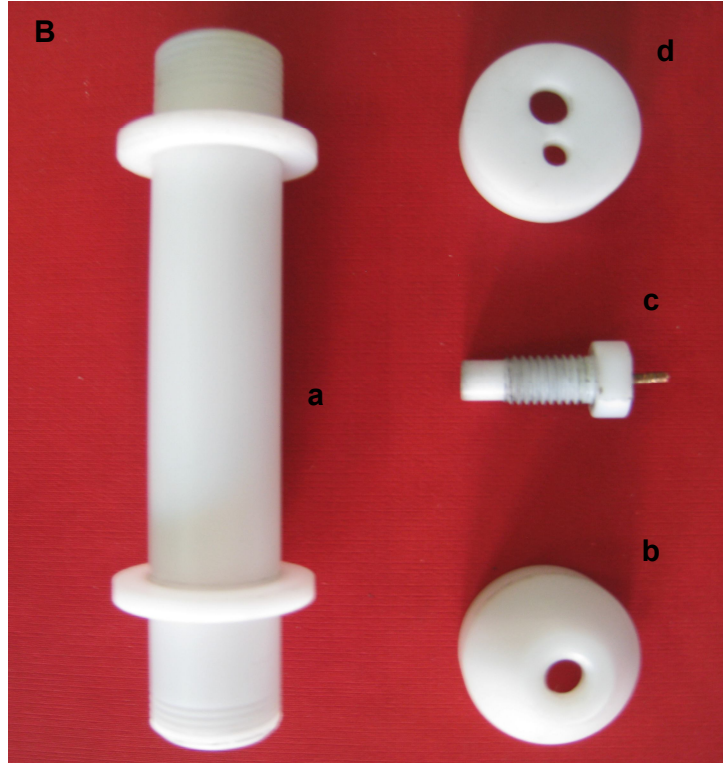
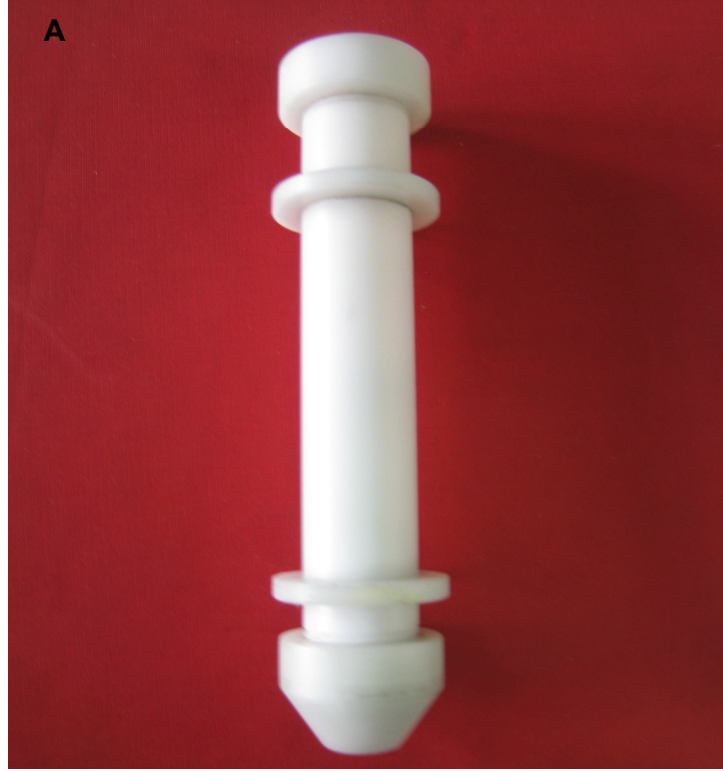
voltammetrik hücrede (Metrohm) üçlü elektrot sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.3). Biyosentri-voltammetrik çalışmalar için santrifüj ve voltammetrik çalışmalara uygun olarak tasarlanmış iki farklı hücre kullanılmıştır. Polietilen biyosentri-voltammetrik hücre 3 cm iç çapa sahiptir. Uzunluğu 11,5 cm'dir. Bu hücrenin alt tarafında 6 mm<sup>2</sup> yüzey alanına sahip olan kare şeklinde olan Pt elektrot, çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır (Şekil 2.4). Delrin biyosentri-voltammetrik hücre, 1,2 cm iç çapa sahiptir. Uzunluğu 10 cm'dir. (Şekil 2.5). Çalışma elektrodu vidalama sistemi ile hücrenin alt kısmına yerleştirilmiştir. Çalışma elektrodu olarak Au film ile modifiye GCE, XO immobilize Pt elektrot, CPE ve AChE-CHOD ile modifiye CPE kullanılmıştır.



Şekil 2.3. Üçlü elektrot sistemine ait düzenek



**Şekil 2.4. Polietilen biyosentri-voltammetrik hücre**



Şekil 2.5. A) Delrin biyosentri-voltammetrik hücre, B) a- biyosentri-voltammetrik gövde, b) koruyucu kapak, c) çalışma elektrodu, d) kapak

## 2.3. Kimyasallar ve Reaktifler

Substrat çözeltileri olarak asetiltiyokolin (Sigma-Aldrich, ATCh), asetilkolin (Sigma, ACh) kolin (Sigma, Ch), ksantin (Sigma, X) kullanılmıştır.  $K_3Fe(CN)_6$  (99,99+%,  $d=1,89$  g/mL, Sigma-Aldrich) impedans ölçümleri için kullanılmıştır. Karbon pasta için, grafit tozu (graphite powder (particle size  $<50$   $\mu$ m, Merck) ve bunları pasta kıvamına getirmek için mineral yağ (Sigma-Aldrich) gibi organik bir sıvı ile karıştırılarak hazırlanmışlardır. Biyosensör yapımında pasta içinde AChE (from *Electrophorus electricus*, 236 Units/mg solid), CHOD (from *Alcaligenes* 14 Units /mg solid) kullanılmıştır. Bununla birlikte immobilize sistem için Pt çalışma elektrodun üstüne immobilize edilen XO (from buttermilk, 0,06 Units/mg solid) kullanılmıştır. AChE enziminin tekrar aktive edilmesi için 2-pyridine aldoxime methiodide (2-PAM) kullanılmıştır. Sentetik plazma örneği çalışmalarında ise serum örneği 140 mM NaCl (99.0-100.1% supplied, Pancreac), 4,5 mM KCl, 2,5 mM  $CaCl_2$  (calcium chloride dehydrate, ACS reagent,  $\geq 99\%$ , Sigma), 0,8 mM  $MgCl_2$  (magnesium chloride hexahydrate, GR for analysis 99,0-101,0%, Merck) 2,5 mM üre (99.5% pure, Horasan Kimya), ve 4,7 mM glikoz (D-(+) glucose monohydrate for microbiology, Merck) kullanılarak hazırlanmıştır. Sentetik plazma çözeltisi 10 mM TRIS-HCl (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane, TRIS, 99,0-100,1%, Merck) tamponu kullanılarak hazırlanmıştır.

### 2.3.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

#### 2.3.1.1 Destek elektrolit tampon çözeltisinin hazırlanması

Deneylerde destek elektrolit olarak 50 mM fosfat tamponu ( $KH_2PO_4$ , Merck) kullanılmıştır.  $KH_2PO_4$ 'den gerekli miktarda tartım alınarak çözelti hacmi 500 mL olacak şekilde distile su ilave edilmiştir. Destek elektrolit hazırlanırken üzerine derişik NaOH ilave edilerek pH ayarlaması yapılmıştır.

#### 3.3.1.2. Reaktiflerin hazırlanması

DeneySEL çalışmalarda kullanılan X, ATCh, ACh ve Ch çözeltilerinin  $10^{-2}$  M'lık stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bunun için analitlerden gerekli tartımlar alındıktan sonra hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. EIS ölçümleri için  $10^{-1}$  M'lık  $K_3Fe(CN)_6$  çözeltisi hazırlanmıştır.

### 2.3.1.2. Çalışma hücresinde kullanılan çözeltinin hazırlanması

Voltammetrik ve EIS ölçümlerinde kullanılmak için daha önce belirtilen destek elektrolit ve reaktif çözeltisinden gerekli miktarda alınarak son hacim 10 mL olacak şekilde çözelti hazırlanmıştır.

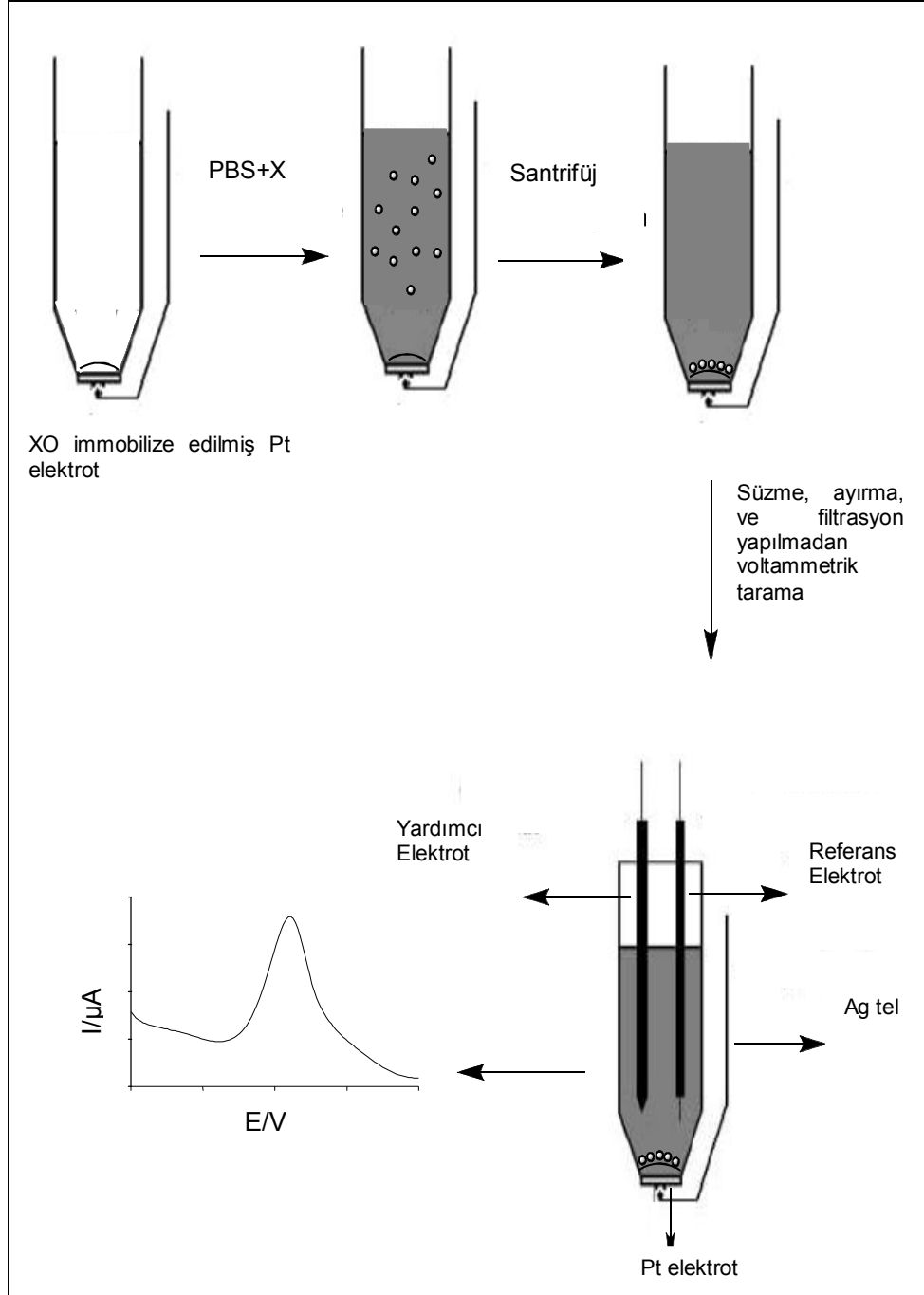
## 2.4. Elektrotların Hazırlanması Ve Prosedür

### 2.4.1. Au-film modifiye GCE hazırlanması

Hazırlama prosedürüne göre GCE yüzeyi önce alüminyum toz ile iyice parlatılmıştır. Daha sonra 5 dakika ultrasonik banyoya daldırılmış ve yüzeydeki safsızlıklar temizlenmiştir. Altın kaplama çözeltisi olarak uygun miktarda H<sub>Au</sub>Cl<sub>4</sub> içeren 10 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi kullanılmıştır. GCE, uygun miktarda ATCh içeren altın kaplama çözeltisine daldırıldıktan sonra 10 dakika N<sub>2</sub> gazından geçirilmiştir. 1,5 V'dan -0,045 V'a kadar 100 mV/sn'de döngüsel voltammogram yöntemi ile GCE üzerine altın film (in-situ) oluşturulmuştur. GCE saf su ile yıkandıktan sonra 10 mL fosfat tamponu (pH 7,0) içerisine daldırılmıştır. 0 V ile 1,4 V arasında ATCh'a ait elektroanalitiksel yanıtlar incelenmiştir.

### 2.4.2. X biyosensörünün hazırlanması

1 mg XO ve 10 mg jelatin 38 °C'de 100 µL fosfat tamponu (50 mM, pH 7,0) içerisinde karıştırılmıştır. Bu karışımdan 100 µL alınarak Şekil 2.4'de gösterilen biyosentri-voltammetrik hücrenin alt kısmında kare şeklinde olan Pt çalışma elektrodun üzerine damlatılmış ve 4 °C'de 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra çapraz bağlanmanın sağlanması için %2,5'lik glutareldhit çözeltisine 5 dakika daldırılmıştır. Biyosentri-voltammetrik hücre içine istenen miktarda X çözeltisi konulmuştur. Daha sonra biyosentri-voltammetrik hücre uygun santrifüj hızı ve santrifüj süresinde santrifüjlenmiştir. Biyosentri-voltammetrik hücre, voltammetrik standı alınarak çözelti içerisine referans ve yardımcı elektrotlar daldırılmıştır. -500 mV ile 900 mV arasında DP voltammogramlar kaydedilmiştir.



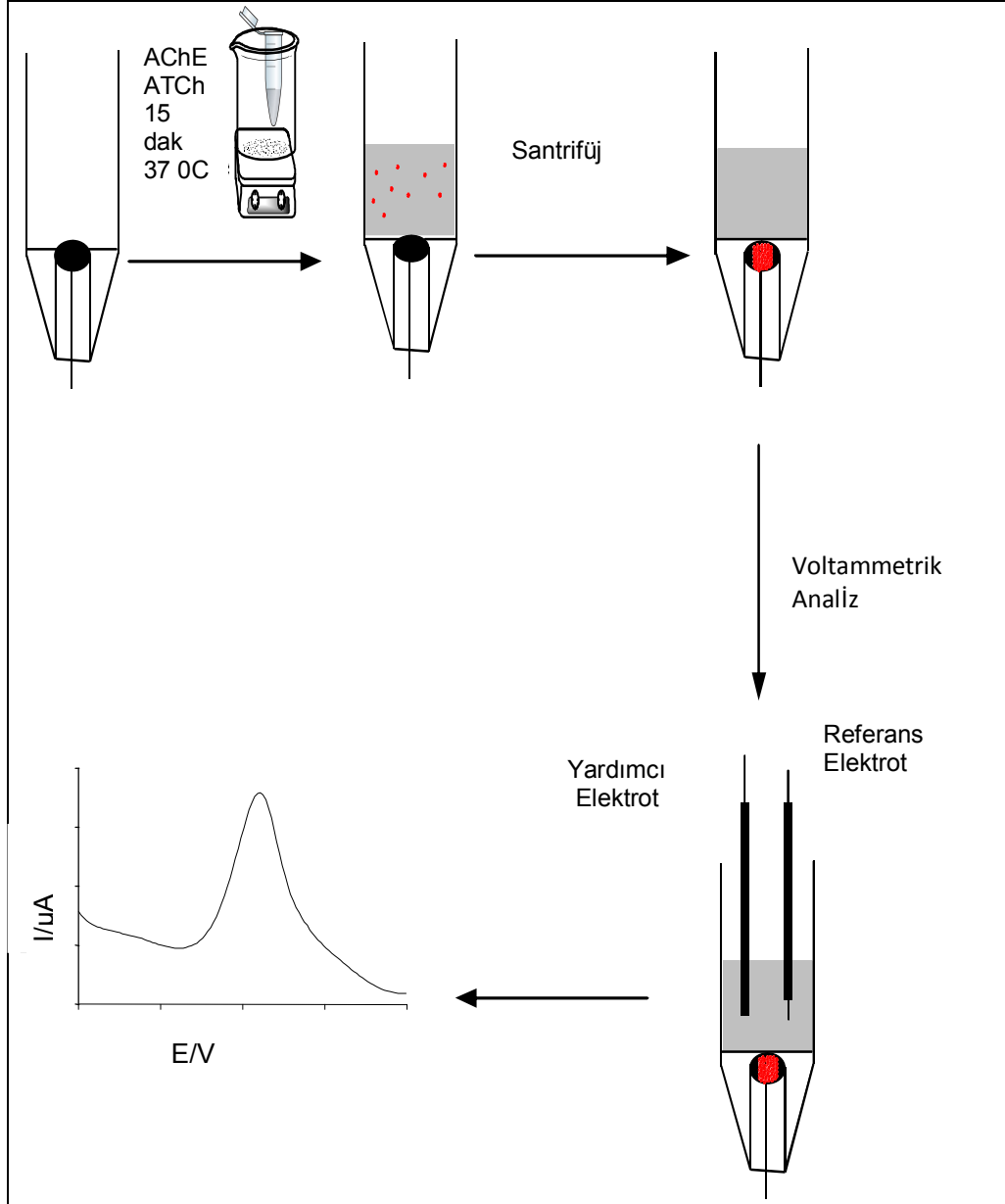
Şekil 2.6. Biyosentri-voltammetrik X tayininin şematik gösterimi

### 2.4.3. AChE temelli biyosensörlerin hazırlanması

#### 2.4.3.1. AChE aktivite tayini için biyosensör hazırlanması

%70:30 oranında grafit tozu ve mineral yağ karıştırılması ile CPE hazırlanmıştır. Hazırlanan CPE'den uygun miktarlarda alınarak biyosentri-voltammetrik hücrenin alt kısmından vidalı sistem ile çıkarılabilen çalışma elektrodunun içine konulmuştur. Uygun mikarda AChE pH 7,0 fosfat tamponunda çözülmüştür. Bu karışımdan 4,2 µL alınıp 1 mL fosfat tamponu ile seyreltilmiştir. Enzim çözeltisi ile ATCh istenen miktarlarda karıştırılarak son hacim pH 7,0 fosfat tamponu ile 2 mL'ye tamamlanmıştır. Enzimatik reaksiyonun gerçekleşmesi için 37 °C'de uygun sürelerde bekletilmiştir. Çözelti biyosentri-voltammetrik hücreye (Şekil 2.5) alınarak uygun santrifüj hızı ve süresinde santrifüjlenmiştir. Biyosentri-voltammetrik hücre voltammetrik standı alındıktan sonra çözelti içerisine referans ve yardımcı elektrotlar daldırılmıştır. 0 V ile 1 V arasında DP voltammogramlar kaydedilmiştir.



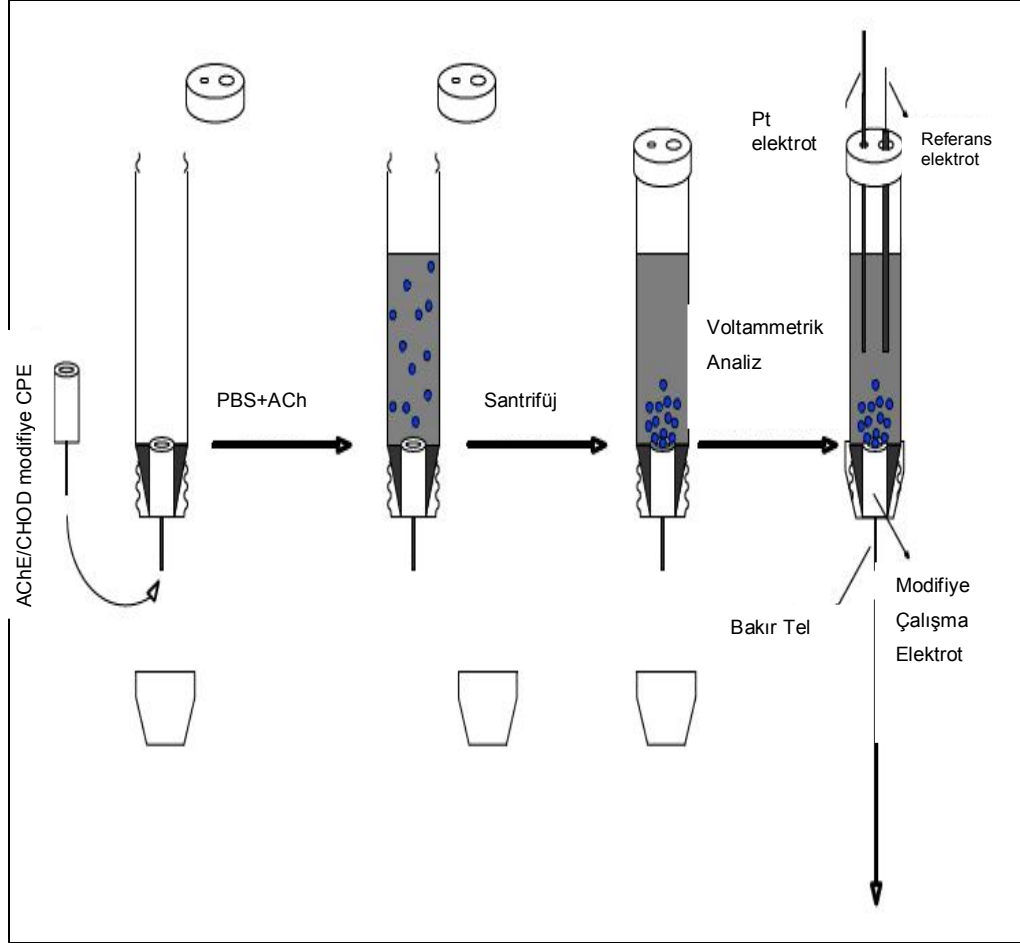


Şekil 2.7. Biyosentri-voltammetrik ATCh tayininin şematik gösterimi

#### 2.4.3.2. ACh biyosensörünün hazırlanması

AChE/CHOD modifiye CPE, uygun miktarlarda grafit tozu, mineral yağ, AChE ve CHOD'nin karıştırılması ile oluşturulmuştur. Hazırlanan karbon pasta biyosentri-voltammetrik hücrenin alt kısmından vidalı sistem ile çıkarılabilen çalışma elektrodunun içine konulmuştur. Daha sonra elektrot yüzeyi iyice parlatılarak, yüzey saf su ile yıkanmıştır. Çalışma elektrodu biyosentri-voltammetrik hücreye yerleştirildikten sonra uygun miktarlarda ACh içeren fosfat tamponu (pH 7,0)

konulmuştur ve istenen santrifüj hızı ve süresinde santrifüjlenmiştir. Biyosentri-voltammetrik hücre standa alınarak çözelti içerisinde referans ve yardımcı elektrotlar daldırılmıştır. DP ölçümleri, 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,0) ve +1,0 V' dan 0 V' a potansiyel aralığında gerçekleştirilmiştir. Elektrot yüzeyi her ölçümden önce yenilenmiştir.



Şekil 2.7. Biyosentri-voltammetrik ACh tayininin şematik gösterimi

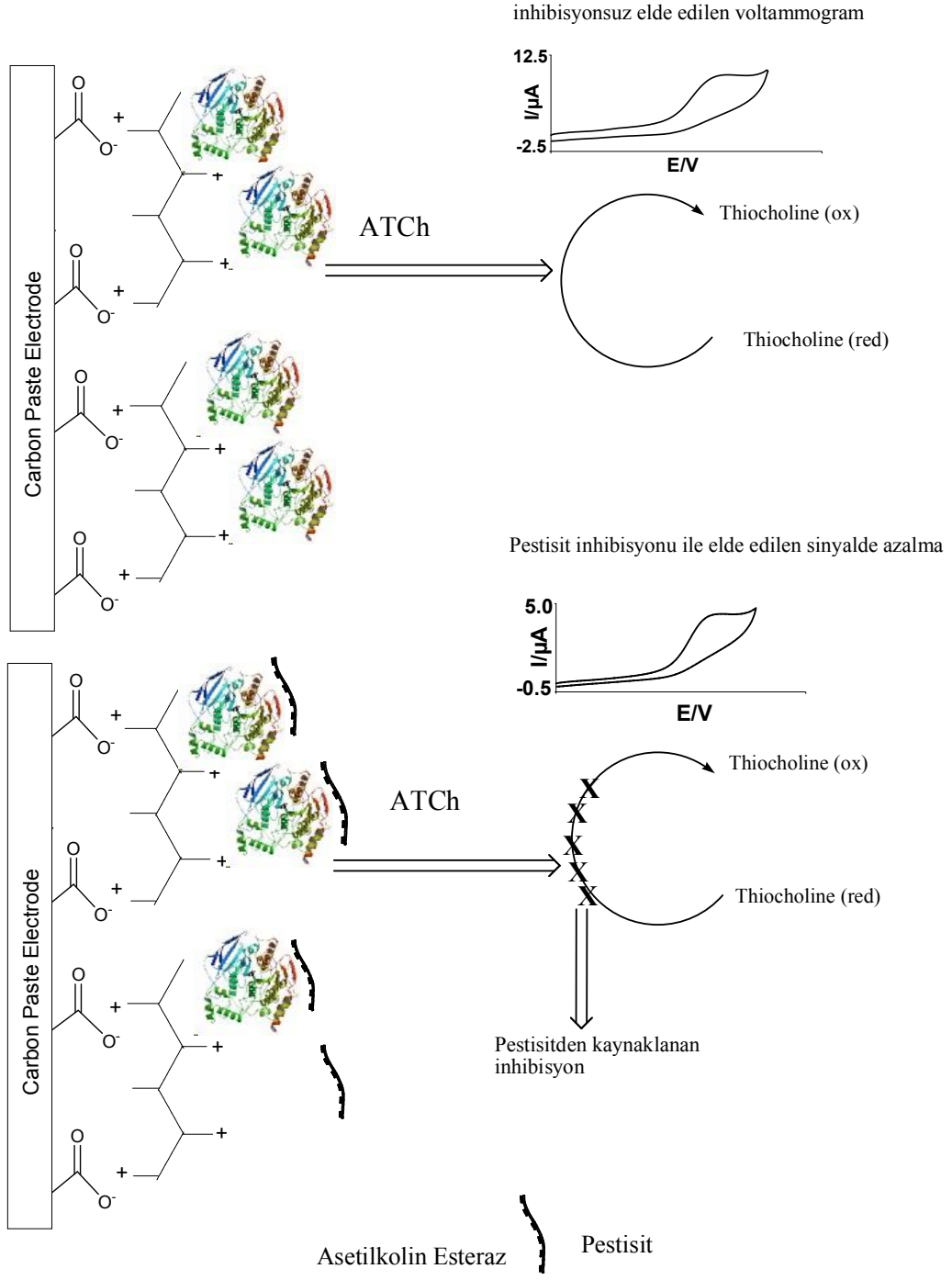
#### 2.4.3.1. MWCNT'nin HNO<sub>3</sub> ile muamele edilmesi

1 mg MWCNT 6 M 60 mL HNO<sub>3</sub> içinde 5 saat 80 °C'de bekletilmiştir. Daha sonra gece boyunca oda koşullarında MWCNT'ye karboksil gruplar eklenmesi için bekletilmiştir. Fonksiyonel grup eklenmiş MWCNT (f-MWCNT) birkaç kez saf su ile yıkanmıştır.

#### 2.4.3.2. Pestisit tayini için AChE/PAH/f-MWCNT/CPE'nin hazırlanması

1 mg f-MWCNT ve 1 mg PAH, 500 mL PBS (pH 7,0) içerisine konulmuş ve 20 dakika sonike edilmiştir. PAH/f-MWCNT çözeltisinden 20 µL CPE üzerine damlatılmış ve 2 saat 4 °C bekletilmiştir (PAH/f-MWCNT/CPE). AChE çözeltisinden (0.38 mg ml<sup>-1</sup>) istenen miktarda PAH/f-MWCNT/CPE üzerine damlatılmış ve 1 saat 4 °C bekletilmiştir (AChE/PAH/f-MWCNT/CPE). Çalışma hücrelerine istenilen miktarda ATCh içeren fosfat tamponu alındıktan sonra 50 mVsn<sup>-1</sup>'de 0 V ile 1,0 V arasında CV voltammogramlar kaydedilmiştir. Pestisit analizleri için AChE/PAH/f-MWCNT/CPE 5 pg ml<sup>-1</sup> monokrotofos içeren çözeltiliye daldırıldıktan sonra 5 dakika beklenmiştir. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE ATCh içeren fosfat tamponuna daldırıldıktan sonra tekrar 50 mVsn<sup>-1</sup>'de 0 V ile 1,0 V arasında CV voltammogramlar kaydedilmiştir. İnhibüsyon değerleri bölüm 1'de verilen 1.3 nolu denklem ile hesaplanmıştır.

Bu denklemde  $I_p$ , control ATCh için elde edilen akım değeridir.  $I_p$ , exp ise AChE/PAH/f-MWCNT/CPE monokrotofos çözeltisine daldırıldıktan sonra ATCh için elde edilen akım değeridir.



**Şekil 2.9. Monokrotophos belirlenmesinin şematik gösterimi**

## 2.5. Örnek Uygulamaları

### 2.5.1. Şarap örneğinde biyosentri-voltammetrik X tayini

Biyosentri-voltammetrik X tayini, şarap örneğine uygulanmıştır. Bu amaçla standart katma yöntemi kullanılmıştır. Şarap örneği fosfat tampon çözeltisi (50 mM, pH 7,0) ile 1:10 oranında seyreltilmiştir ve bilinen miktarlarda X her birine eklenmiştir. X eklenmesinden sonra elde edilen akım değerleri izlenmiş ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

### 2.5.2. AChE inhibisyonu temelli ilaç örneği

AChE inhibisyon çalışması için Alzheimer tedavisinde kullanılan Neurem ( Donepezil HCl, 5 mg) analiz edilmiştir. Bu amaçla Neurem ilacı bir havan içerisinde toz haline getirilmiştir. 1.0 mg Neurem fosfat tamponunda (pH 7,0) çözülmüştür. 350  $\mu\text{M}$  ATCh,  $49,56 \times 10^{-4}$  U  $\text{mL}^{-1}$  AChE and 500  $\mu\text{L}$  Neurem 37  $^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika bekletilmiştir. Çözelti, biyosentri-voltammetrik hücrenin içine konulmuştur ve 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Biyosentri-voltammetrik hücre, voltammetrik ölçüm standın üzerine konulduktan sonra referans ve yardımcı elektrot çözeltiye daldırılmıştır. Potansiyel 0 V'dan 1 V'a kadar taranmıştır. İnhibisyon bölüm 1'de verilen 1.3 nolu denklem ile hesaplanmıştır.

Yukarıda ki denklemde  $I_p$ , control ATCh için elde edilen akım değeridir.  $I_p$ , exp ise Donepezil ile ATCh için elde edilen akım değeridir.

### 2.5.3. Sentetik serum örneğinde biyosentri-voltammetrik ACh ve Ch tayini

ACh ve Ch belirlenmesi sentetik serum örneklerine uygulanmıştır. Sentetik serum örneği aşağıdaki adımlar izlenerek hazırlanmıştır. 140 mM NaCl 4,5 mM KCl, 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2,5 mM üre and 4,7 mM glukoz, 10 mM tris-HCl çözeltisinde hazırlanmıştır. Çözelti derişik HCl kullanılarak 7,3'e ayarlanmıştır. Standart çözeltiler, zemin çözelti olarak sentetik plazma elektroliti kullanılarak hazırlanmıştır ve daha sonra uygun miktarda analit standart katma metoduna göre fosfat tampon çözeltisine (pH 7,0) eklenmiştir.

#### **2.5.4. Doğal örneklerde pestisit tayini**

Çeşme suyu, maden suyu, domates ve üzüm örneklerinde standart katma metodu ile pestisit belirlenmesine uygulanmıştır. Çeşme suyu ve maden suyu herhangi bir ön işlem uygulanmadan kullanılmıştır. Domates ve üzüm örnekleri öncelikle saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra örnekler ince dilimler halinde kesilmiştir. Her iki örnekten 5 gram alınarak 10 mL fosfat tamponu(pH 7,0) içerisine konulmuştur ve oda koşullarında 1 saat karıştırılmıştır. Örnekler süzildükten sonra aseton içerisinde çözülmüştür. Standart katma metodu kullanılarak örneklerde ki geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

### 3. BULGULAR VE İRDELEME

Bu doktora tezi beş temel çalışma bölümünden oluşmaktadır. Çalışmanın ilk bölümünde, elektroaktif bir analit olan ve AChE tarafından hidrolizlenerek asetik asit ve tiyokoline dönüştürülen ATCh tayini GCE üzerine modifiye edilen Au film ile gerçekleştirilmiştir. H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> miktarı ve pH gibi parametrelerin elde edilen akım değerlerine etkisi incelenmiştir. Optimum koşullar altında 2-25 µM arasında ( $R^2=0,9928$ ,  $y=0,0275x+0,7211$ ) ATCh için doğrusal aralık elde edilmiştir. 15 µM ATCh için yapılan ölçümler sonucunda tekrarlanabilirliğine ilişkin RSD değeri %3,59 (n=4) olarak hesaplanmıştır.

Çalışmanın ikinci bölümünde biyosentri-voltammetri yöntemi iyi bilinen bir enzimatik sisteme uygulanmıştır. Bu amaçla, biyosentri-voltammetrik hücrenin alt kısmında bulunan Pt elektroda XO enzimi immobilize edilerek, X'e yönelik bir biyosensör yapılmıştır. Biyosentri-voltammetrik X tayininde öncelikli olarak santrifüj hızı, santrifüj süresi ve enzim miktarı gibi deneysel parametreler optimize edildikten sonra X için analitiksel karakteristik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. X için 0,1-1 µM ( $R^2=0,984$ ,  $y=0,0383x+5,7203$ ) ile 5-50 µM arasında ( $R^2=0,997$ ,  $y=2,9724x+0,8499$ ) iki tane doğrusal aralık elde edilmiştir. LOD değeri  $9,2 \times 10^{-8}$  olarak hesaplanmıştır. RSD değeri %3,4 (n=5) olarak bulunmuştur. Biyosentri-voltammetrik X tayini şarap örneğine uygulanmıştır. Geri kazanım değeri  $101 \pm 0,61\%$  (n=3) olarak hesaplanmıştır.

Çalışmanın üçüncü bölümünde, AChE aktivitesini tayin etmek amacıyla, ATCh'ın biyosentri-voltammetrik tayini gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, reaksiyon süresi, santrifüj hızı, santrifüj süresi ve enzim miktarı gibi parametreler optimize edilmiştir. Optimize edilen koşullar altında 1,0–350 µM arasında ( $R^2=0,99$ ,  $y=0,0004x+0,0163$ ) ATCh için doğrusal bir aralık elde edilmiştir. Biyosentri-voltammetri yöntemi, AChE inhibisyon çalışması için Alzheimer hastalığında kullanılan Neurem (Donepezil HCl, 5 mg) ilacına uygulanmıştır. Neurem ilacı, AChE aktivitesinde %80 oranında inhibisyona neden olmuştur.

Çalışmanın dördüncü bölümünde, ACh biyosentri-voltammetri yöntem ile belirlenmiştir. Bu amaçla AChE ve CHOD enzimleri kullanılarak biyosensör sistemi oluşturulmuştur. Bunun için reaksiyon süresi, pH, AChE ve CHOD miktarları, santrifüj süresi ve santrifüj hızı gibi parametreler optimize edilmiştir. En iyi ortam şartları belirlendikten sonra ACh ve Ch için analitiksel karakteristikler incelenmiştir. ACh için  $5,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-5}$  arasında ( $R^2= 0,9943$ ,  $y= 0,0263x+0,0788$ ) doğrusal bir ilişki elde edilmiştir. Bununla birlikte Santrifüj parametreleri kullanılmadan ACh için  $2 \times 10^{-6}$ - $25 \times 10^{-6}$  M ( $R^2=0,7035$ ,  $y= 0,0043x + 0,0944$ ) arasında doğrusal bir aralık elde edilmiştir. LOD değeri  $0.51 \times 10^{-7}$  olarak hesaplanmıştır. RSD değeri %4,56 (n=5) olarak bulunmuştur. Oluşturulan biyosensör aynı zamanda Ch belirlenmesinde kullanılmıştır. Ch için  $10 \times 10^{-6}$ - $5 \times 10^{-4}$  M ( $R^2= 0,9901$ ,  $y= 0,0008x + 0.261$ ) arasında doğrusal bir aralık elde edilmiştir. Analitiksel karakteristik belirlendikten sonra ACh ve Ch belirlenmesi sentetik serum örneklerine uygulanmıştır. Standart ACh ve Ch çözeltileri sentetik serum örneğinde hazırlanmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda geri kazanım ACh için  $104,7 \pm 0.15$  (n=3), Ch için  $100,9 \pm 0.14$  (n=3) olarak hesaplanmıştır.

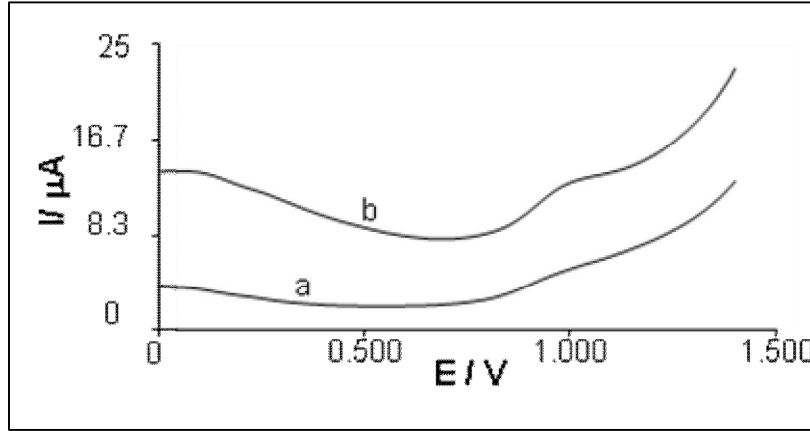
Çalışmanın beşinci bölümünde, model pestisit olarak seçilen monokrotofos için AChE/PAH/f-MWCNT/CPE temelli bir biyosensör sistemi oluşturulmuştur. Bu amaçla öncelikli olarak ATCh analitiksel karakteristik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. AChE miktarı ve pH parametreleri optimize edildikten sonra ATCh için  $5,0 \times 10^{-5}$ - $2,0 \times 10^{-3}$  M arasında ( $R^2= 0,9958$ ,  $y= 0,0027x - 0.0946$ ) doğrusal bir ilişki elde edilmiştir. Monokrotofos için inhibisyon süresinin etkisi araştırıldıktan sonra 1-25 pg/mL arasında doğrusal bir ilişki bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri sırası ile 0,88 and 2,9 pg/mL olarak hesaplanmıştır. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE' nin reaktivasyonu 2-PAM ile araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda inhibe olan AChE' nin orijinal yanıtının %95'i geri kazanılmıştır. Geliştirilen biyosensör çeşme suyu, maden suyu, domates ve üzüm örneklerinde standart katma metodu ile monokrotofos belirlenmesine uygulanmıştır. Çeşme suyu ve maden suyu örneklerinde geri kazanım değerleri sırası ile 98,3 ve 100,75 olarak hesaplanmıştır. Domates ve üzüm örneklerinde sırası ile %2,5 ve %32,8 matriks etkisi bulunmuş ve geri kazanım değerleri sırası ile 98,5 ve 101 olarak hesaplanmıştır.



## 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 4.1. Au Film Modifiye GCE ile ATCh Tayini

ATCh elektroaktif bir maddedir ve AChE tarafından hidrolizlenerek asetik asit ile tiyokolin oluşturur. Aynı zamanda ACh'in duyarlı belirlenmesi immobilize sistemde kullanılan ikili enzimatik oluşumda AChE aktivitesine bağlıdır. Bundan dolayı AChE'nin aktivitesinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Tüm bu nedenlerden ötürü, bu çalışmada öncelikle ATCh'in duyarlı bir şekilde belirlenmesi için GCE yüzeyine Au film oluşturulmuştur.

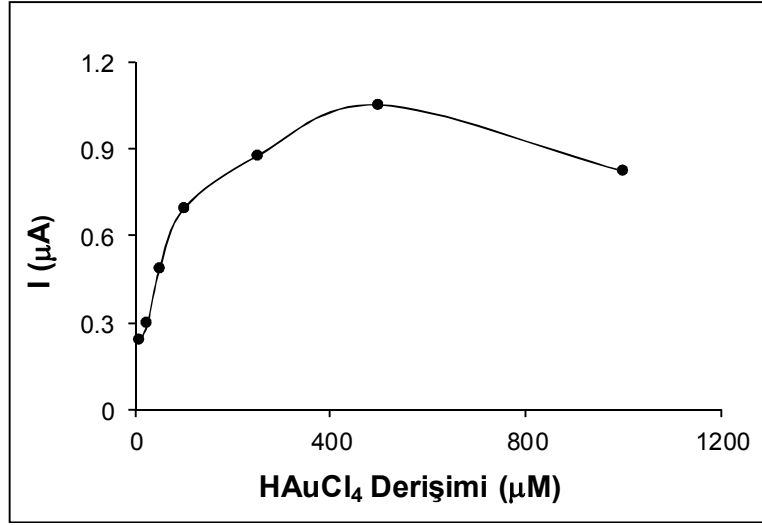


Şekil 4.1. Au film modifiye GCE' ye ait diferansiyel puls voltammogramları: (a) Au film, (b) Au film ve 25  $\mu\text{M}$  ATCh, fosfat tampon sistemi (pH 7,0)

Şekil 4.1'den görüldüğü gibi yalnız GCE ile ATCh'a ait 1.007 V'da 0.292  $\mu\text{A}$  değerinde bir pik elde edilememiştir. Fakat Au filmin in-situ olarak GCE yüzeyinde oluşturulması ile ATCh'a ait pik gözlenmiştir. Bundan dolayı Au film ile modifiye GCE kullanılarak ATCh tayinine yönelik optimizasyon parametrelerin belirlenmesine geçilmiştir.

#### 4.1.1 H<sub>AuCl<sub>4</sub></sub> miktarı etkisi

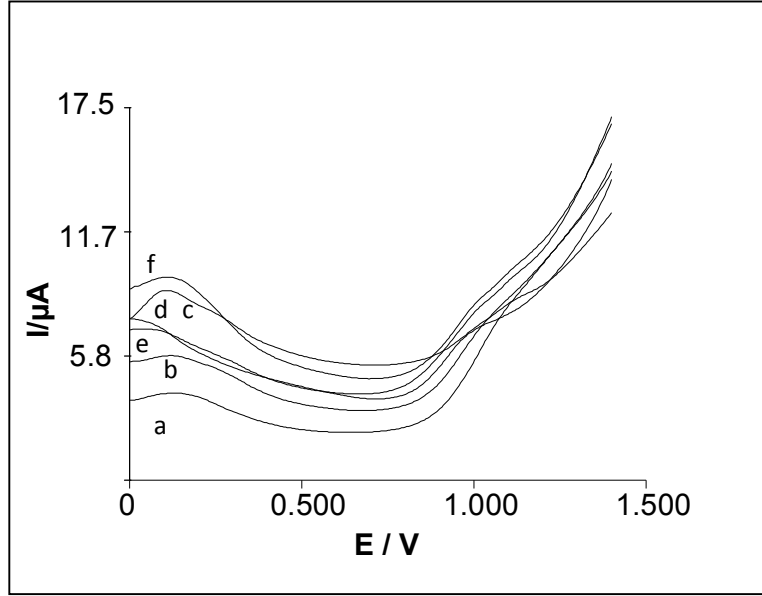
Hazırlanan Au film modifiye GCE'nin çalışma koşullarının optimizasyonuna ilişkin ilk olarak H<sub>AuCl<sub>4</sub></sub> miktarının etkisi araştırılmıştır. 10 µM ile 1 mM aralığında değişen derişim miktarlarında ki H<sub>AuCl<sub>4</sub></sub> çözeltilerinden hazırlanan Au film elektrotlar ile 10 µM ATCh'n pik akımlarının değişimi kıyaslanmıştır (Şekil 4.2). Elde edilen akım değerlerinden en yüksek değer 500 µM H<sub>AuCl<sub>4</sub></sub> ile elde edildiği için sonraki çalışmalarda bu değer kullanılmıştır.



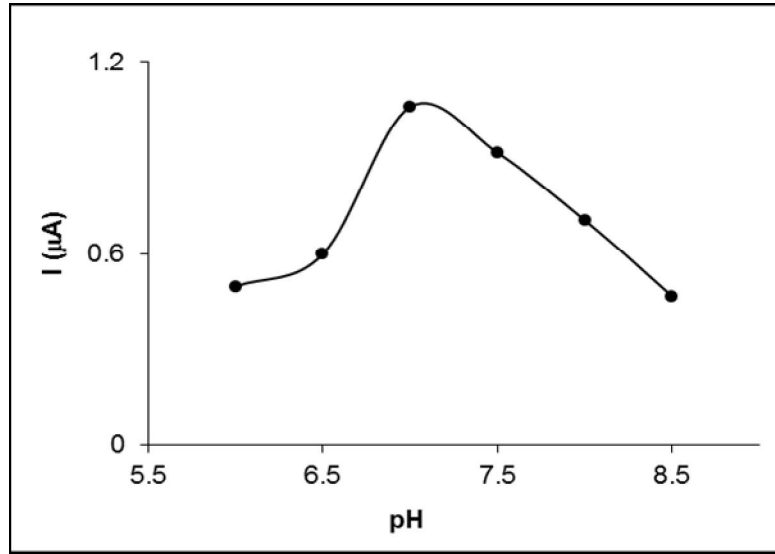
Şekil 4.2. Farklı derişimlerde ki H<sub>AuCl<sub>4</sub></sub> için elde edilen akım değerleri, 10 µM ATCh, fosfat tampon sistemi (pH 7,0)

#### 4.1.2. pH etkisi

Destek elektrolit olarak kullanılan fosfat tamponununun pH 6,0'dan 8,5'a kadar 0,5 birimlik artışlar ile 10 µM ATCh için elde edilen akım değerlerine etkisi incelenmiştir (Şekil 4.3). Şekil 4.4'den görüldüğü gibi en yüksek akım değeri 7,0'de elde edilmiştir. pH 7,0'dan sonra akım değerlerinde düşüş gözlenmiştir.



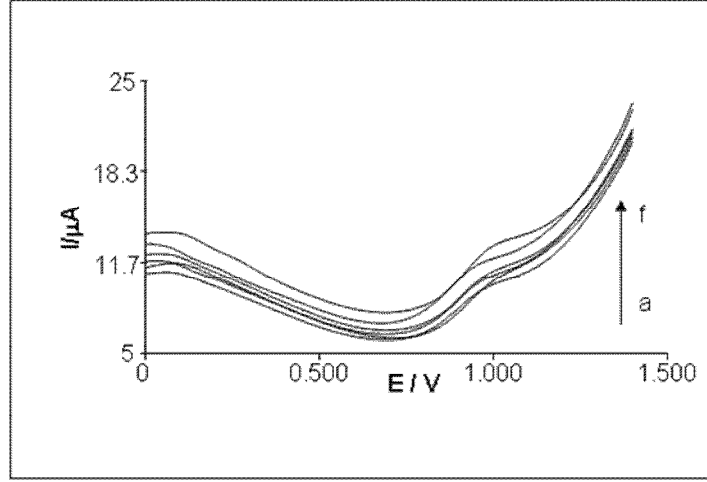
Şekil 4.3. pH a) 6, b) 6,5, c) 7, d) 7,5, e) 8 ve f) 8,5 için elde edilen DP voltammogramları.  
Deneysel koşullar; 10  $\mu\text{M}$  ATCh, 500  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>



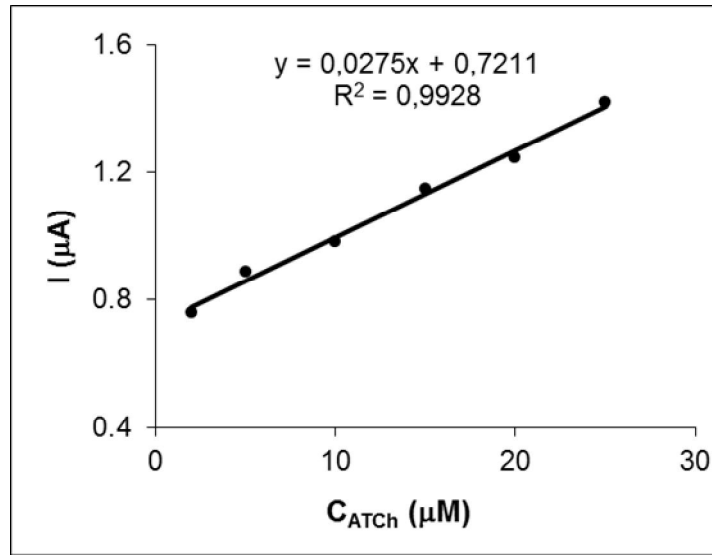
Şekil 4.4. 10  $\mu\text{M}$  ATCh için fosfat tamponunun farklı pH değerlerinin akım değerlerine etkisi

#### 4.1.3. Analitiksel karakteristik

En uygun çalışma koşulları belirlendikten sonra analitiksel karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.5). ATCh için 2-25  $\mu\text{M}$  arasında ( $R^2 = 0.9928$ ,  $y = 0,0275x + 0,7211$ ) arasında doğrusal bir ilişki elde edilmiştir (Şekil 4.6). 15  $\mu\text{M}$  ATCh için yapılan çalışmalar sonucunda tekrarlanabilirliğe ilişkin RSD değeri %3,59 ( $n = 4$ ) olarak bulunmuştur.



Şekil 4.5. Au film modifiye GCE ile a) 2, b) 5, c) 10, d) 15 e) 20 ve f) 25  $\mu\text{M}$  için elde edilen D.P voltammogramları. Deneysel koşullar; 500  $\mu\text{M}$   $\text{HAuCl}_4$ , H 7,0



Şekil 4.6. ATCh için elde edilen kalibrasyon eğrisi (2-25  $\mu\text{M}$ ). Deneysel koşullar Şekil 4.5 ile aynıdır

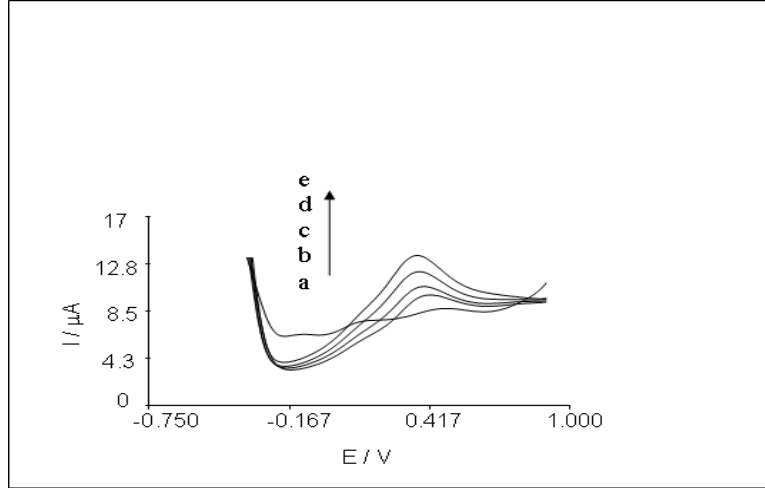
#### 4.2. Biyosentri-Voltammetri İle X Tayini

Bu bölümde ATCh'nin biyosentri-voltammetri ile tayin edilmesinden önce bilinen enzimatik bir sistem temel alınarak ve santrifüjle biyosensör sistemi birleştirilerek biyosentri-voltammetri yöntemi geliştirilmiştir. Şekil 2.4'de verilen biyosentri-voltammetrik hücre kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikli olarak deneysel parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

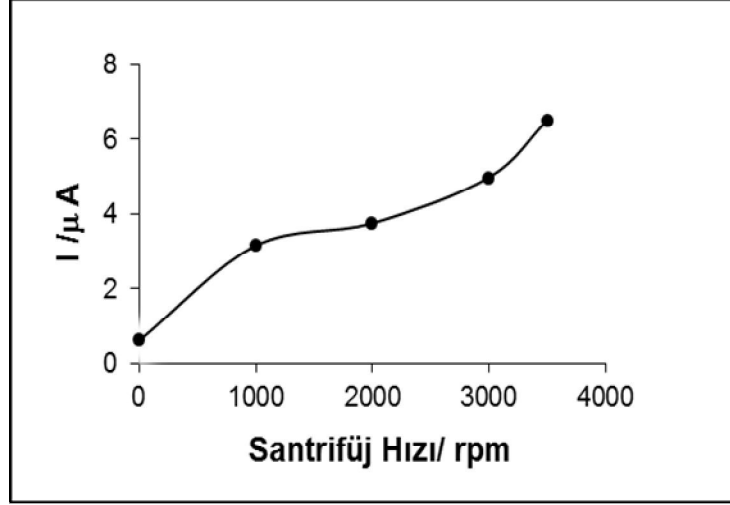
#### 4.2.1. Santrifüj hızı etkisi

Biyosentri-voltammetrik uygulamalarda santrifüj parametreleri önemli bir yere sahiptir. Çünkü bu parametreler analitin önderiştirilmesini etkiler. Bu yüzden biyosentri-voltammetrik yöntemin duyarlılığını etkiler (Anık vd, 2013).

Bu parametrelerden biri olan santrifüj hızının akım yanıtlarına etkisi incelenmiştir. 0, 1000, 2000, 3000 ve 3500 rpm santrifüj hızları 20  $\mu\text{M}$  X içeren çözelti için gerçekleştirilmiş ve elde edilen DP voltammogramları Şekil 4.7.'de verilmiştir. Şekil 4.8'den açıkça görüldüğü gibi santrifüj hızı arttıkça akım yanıtlarında artış gözlenmiştir. Santrifüj hızı arttıkça akım değerlerinde artışın olması konveksiyonda ki artış ile daha fazla analitin elektrot yüzeyinde toplanmasına bağlanabilir. Yüksek santrifüj hızlarında daha iyi akım değerleri elde edilebilirdi ancak yüksek santrifüj hızlarında biyosentri-voltammetrik hücrede bozulmalar meydana gelebileceğinden 3500 rpm optimum değer olarak seçilmiştir ve çalışmalarda bu değer kullanılmıştır.



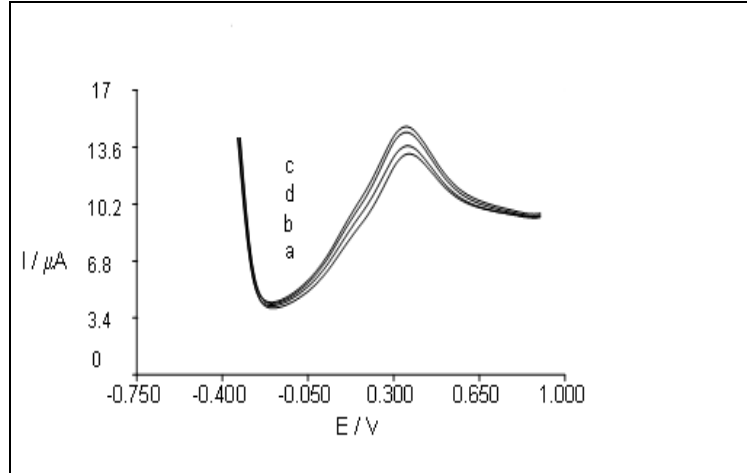
**Şekil 4.7. a) 0, b) 1000, c) 2000, d) 3000, e) 3500 rpm santrifüj hızlarında 20  $\mu\text{M}$  X için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar; santrifüj süresi: 5 dakika, 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0), step potential 5 mV, modülasyon genliği 25 mV**



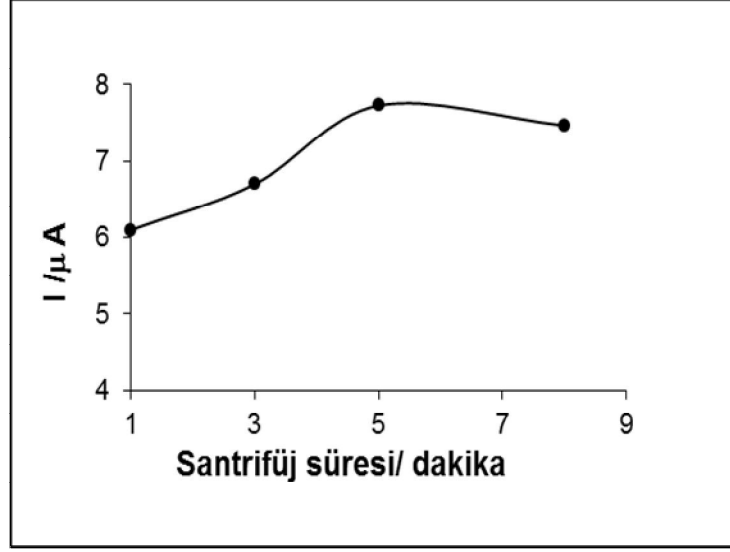
Şekil 4.8. Santrifüj hızının akım değerlerine etkisi. DeneySEL koşullar şekil 4.7 ile aynıdır

#### 4.2.2. Santrifüj süresinin etkisi

1, 3, 5 ve 8 dakika santrifüj süresinin elde edilen DP voltammogramlarına etkisi incelenmiştir (Şekil 4.9). Şekil 4.10'da açıkça görüldüğü gibi 5 dakika santrifüj süresine kadar akım değerlerinde bir artış olmuştur. 5 dakika santrifüj süresinden sonra akım değerinde düşüş gözlenmiştir. Uzun santrifüj süreleri elektrot yüzeyinde santrifüj gücü ile biriktirilen analitin dağılıp çözeltiye karışmasına neden olabilir. Bu sebeple akım değerlerinde düşüş gözlenmiştir. En yüksek akım değeri 5 dakikada elde edildiği için sonraki çalışmalarda bu süre kullanılmıştır.



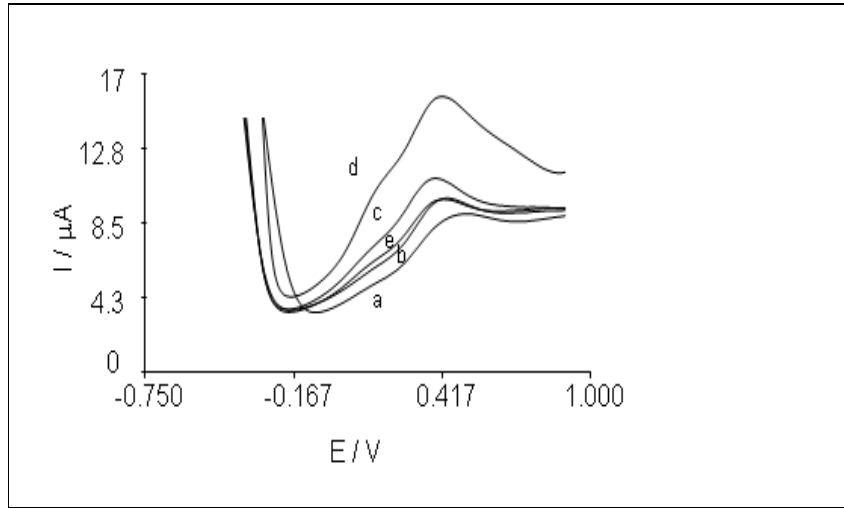
Şekil 4.9. a) 1, b) 3, c) 5, d) 8 dakika santrifüj sürelerinde 20 µM X için elde edilen DP voltammogramları. DeneySEL koşullar; santrifüj hızı: 3500 rpm, 50 mM fosfat tamponu ( pH 7,0), step potential 5 mV, modülasyon genliği 25 mV



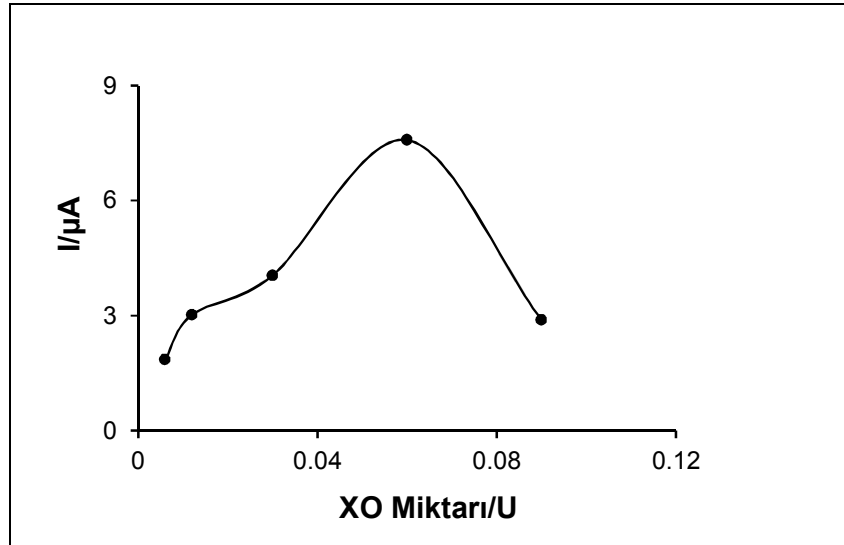
Şekil 4.10. Santrifüj süresinin elde edilen akım değerlerine etkisi. Deneysel koşullar Şekil 4.9 ile aynıdır

#### 4.2.3. Enzim miktarının etkisi

XO miktarının biyosentri-voltammetrik yanıtlara etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 0,1, 0,2, 0,5, 1 ve 1,5 mg XO, jelatin kullanılması ile biyosentri-voltammetrik hücrenin alt kısmında bulunan Pt elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Daha sonra glutaraldehit kullanılarak 5 dakika çapraz bağlanmıştır. İstenen miktarda X biyosentri-voltammetrik hücreye alındıktan sonra 3500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir (Şekil 4.11). Hücre voltammetrik hücreye alındıktan sonra DP voltammogramlar kaydedilmiştir. Şekil 4.12' de görüldüğü gibi 1 mg XO'ya kadar akım değerlerinde artış olmuştur. Bununla birlikte 0,1-1 mg XO arasında enzim aktivitesi ile akım değerlerinde  $y = 6,0582x + 1,3993$  eşitliği ve  $R^2 = 0.98$  değeri ile doğrusal bir ilişki elde edilmiştir. Bu eşitlikte x mg cinsinden enzim aktivitesini, y ise  $\mu A$  cinsinden akım değerini göstermektedir. 1,5 mg XO miktarında ise düşüş olmuştur. Bu düşüş XO'nun inhibe olmasından kaynaklanabilir. Çünkü enzimatik reaksiyon sonucunda ortaya çıkan urik asit XO aktivitesini inhibe eder (Radi vd., 1992). En yüksek akım değeri 1 mg XO ile elde edildiğinden bundan sonra ki çalışmalar bu enzim miktarı ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.11. a) 0,1, b) 0,2, c) 0,5, d) 1, e) 1,5 mg XO için elde edilen D.P voltammogramları. 20  $\mu$ M xanthine, 50 mM fosfat tamponu ( pH 7,0), santrifüj hızı; 3500 rpm, santrifüj süresi; 5 dakika



Şekil 4.12. Enzim miktarının biyosentri-voltammetrik akım değerlerine etkisi. Deneysel koşullar Şekil 4.11 ile aynıdır

#### 4.2.4. Santrifüj gücünün etkisi

Sentri-voltammetrinin yanında, sıyırma metotları analitlerin önderiştirilmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Ancak sentri-voltammetri sıyırma metotlarından farklıdır. Örnek olarak, anodik sıyırma voltammetrisi analitin küçük bir kısmının kontrol edilebilen koşullar altında elektrot yüzeyinde önderiştirilmesidir (Wang, 1985). Sentri-voltammetri ise santrifüj gücü ya da uygun bir reaktif ile analitin büyük bir kısmının elektrot yüzeyinde biriktirilmesidir. Bundan dolayı daha düşük LOD



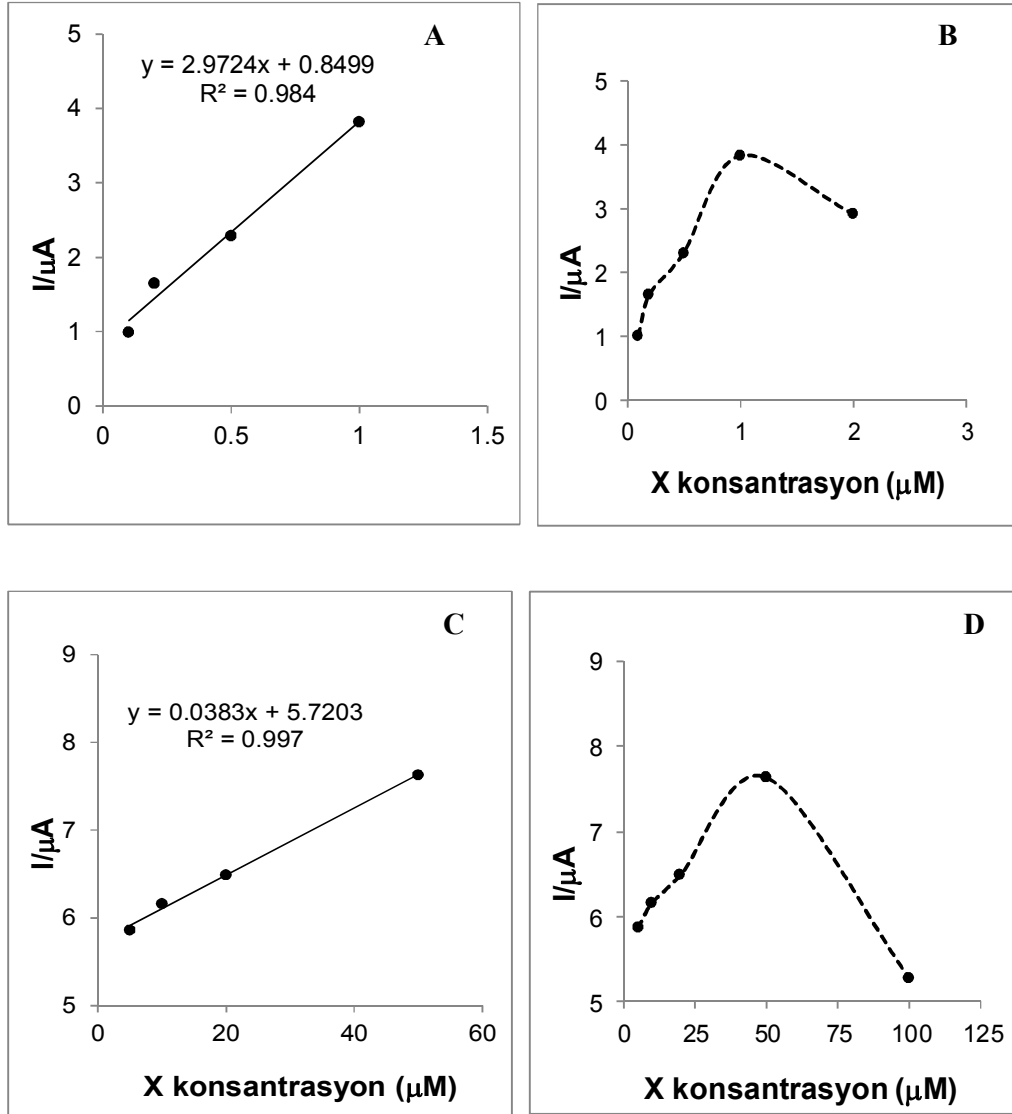
değerleri elde edilmektedir. Bunu araştırmak için, X aynı biyosentri-voltammetrik hücre kullanılarak santrüfuj parametreleri kullanılmadan DP voltammogramları kaydedilmiştir ve sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Biyosentri-voltammetri ile X artan derişimleriyle akım değerlerinde orantılı bir artış aldığı görülmüştür. Buna karşın biyosentri-voltammetri kullanılmadan artan X derişimleri ile akım değerlerinde bir artış gözlenmemiştir.

**Çizelge 4.1. X'in artan derişimleri için biyosentri-voltammetri yöntemi kullanılarak ve kullanılmadan elde edilen akım değerleri**

Derişim ( $\mu\text{M}$ )	Biyosentri-voltammetri ile elde edilen akım değerleri ( $\mu\text{A}$ )	Biyosentri-voltammetri kullanılmadan elde edilen akım değerleri ( $\mu\text{A}$ )
0,1	0,99	3,32
0,2	1,65	4,08
0,5	2,29	3,91
1	3,82	4,04
5	5,86	3,63
10	6,16	3,69
20	6,49	3,44
50	7,63	3,04

#### 4.2.5. Analitiksel karakteristik ve örnek deneme

Optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildikten sonra analitiksel karakteristik değerleri incelenmiştir. Optimize edilen koşullar altında 0,1-1  $\mu\text{M}$  arasında ( $R^2= 0,984$ ,  $y= 2,9724x + 0,8499$ ) ve 5-50  $\mu\text{M}$  arasında ( $R^2= 0,997$ ,  $y= 0,0383x + 5,7203$ ) arasında iki tane doğrusal aralık elde edilmiştir (Şekil 4.13). Birinci doğrusal aralığın elektrot yüzeyinde oluşan tek tabaka X'den kaynaklandığı söylenebilir. İkinci doğrusal aralık ise biriktirme olayı süresince elektrot yüzeyi etrafında çok tabakalı X oluşumu ile açıklanabilir. LOD değeri  $9,2 \times 10^{-8}$  M olarak hesaplanmıştır. Bununla birlikte biyosensör kararlılığı test edilmiştir. 1 hafta sonra yapılan ölçümler sonucunda enzim aktivitesinde düşüş gözlenmemiştir.



**Şekil 4.13.** Biyosentri-voltammetrik ile A) 0,1-1  $\mu\text{M}$  ve C) 5-50  $\mu\text{M}$  arasında X için elde kalibrasyon aralıkları. B) 0,1-1  $\mu\text{M}$ , D) 5-50  $\mu\text{M}$  arasında X için doğrusallıktan sapmaya gösteren grafikler. Deneysel koşullar: Santrifüj hızı; 3500 rpm, santrifüj süresi; 5 dakika, destek elektrolit; fosfat tamponu pH 7,0, step potential 5 mV, modülasyon genliği 25 mV

Biyosentri-voltammetrik ile elektrokimyasal biyosensörler X tayini için doğrusal aralık ve LOD değerleri açısından kıyaslanmıştır (Çizelge 4.2). Çizelge 4.2'den de açıkça görüldüğü gibi biyosentri-voltammetrik yönteminde X için daha geniş aralık elde edilmiştir. Bunun yanında diğer elektrokimyasal biyosensörlerden daha düşük LOD değeri bulunmuştur. Bu sonuçlar biyosentri-voltammetrik yöntemin duyarlılığını bir kez daha kanıtlamıştır.

**Çizelge 4.2. X belirlenmesi için yapılan elektrokimyasal biyosensör ile biyosentri-voltammetrik yöntemin doğrusal aralık ve LOD açısından karşılaştırılması**

Elektrot	Doğrusal Aralık (M)	LOD (M)	Referans
PPy/XO/Pt	1,0x10 <sup>-5</sup> -4,0x10 <sup>-4</sup> 4,0x10 <sup>-4</sup> -2,2x10 <sup>-3</sup>	1,0x10 <sup>-6</sup>	Arslan vd., 2006
SG/XO/MWCNT/GCE	2,0x10 <sup>-7</sup> -1,0x10 <sup>-5</sup>	1,0x10 <sup>-7</sup>	Gao vd., 2009
Pd/Pt/XO/Grafit	1,0x10 <sup>-6</sup> -7,0x10 <sup>-5</sup>	1,5x10 <sup>-6</sup>	Dodevska vd., 2010
CuPtCl <sub>6</sub> /XO/GCE	6,0x10 <sup>-7</sup> -2,0x10 <sup>-4</sup>	1,0x10 <sup>-7</sup>	Pei ve Li, 2000
ZnO-NPs/PPy/ XOD/Pt	8,0x10 <sup>-7</sup> -4,0x10 <sup>-5</sup>	8,0x10 <sup>-7</sup>	Rooma vd., 2011
XOD/AuPPy/Pt	4,0x10 <sup>-7</sup> -1,0x10 <sup>-4</sup>	4,0x10 <sup>-7</sup>	Rooma vd., 2012
Biyosentri-voltammetri	1,0x10 <sup>-7</sup> -1,0x10 <sup>-6</sup> 5,0x10 <sup>-6</sup> -5,0x10 <sup>-5</sup>	9,2x10 <sup>-8</sup>	Bu çalışma

Analitiksel karakteristik çalışmalarından sonra biyosentri-voltammetrik X tayini şarap örneğine uygulanmıştır. Elde edilen geri kazanım değeri Çizelge 4.3’ de verilmiştir. Şarap örneği, bölüm 2.5.1’de belirtildiği gibi standart katma metodu ile analizlenmiştir. Bilinen miktarda X, 50 mM fosfat tamponu ile 1:10 oranında seyrelmiş şarap örneği ile hazırlanmış stok çözeltisinden biyosentri-voltammetrik hücreye konulmuştur. Geri kazanım değerleri sırası ile 101±0,61 (n=3) olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.3). Elde edilen geri kazanım değerleri, biyosentri-voltammetrik X tayininin şarap örneklerinde uygulanabilirliğini göstermiştir.

**Çizelge 4.3. Biyosentri-voltammetri kullanılarak farklı örneklerde X belirlenmesi için elde edilen geri kazanım değerleri**

Örnekler	Geri kazanım değerleri ± SD (n=3) (%)
Şarap	101±0,61

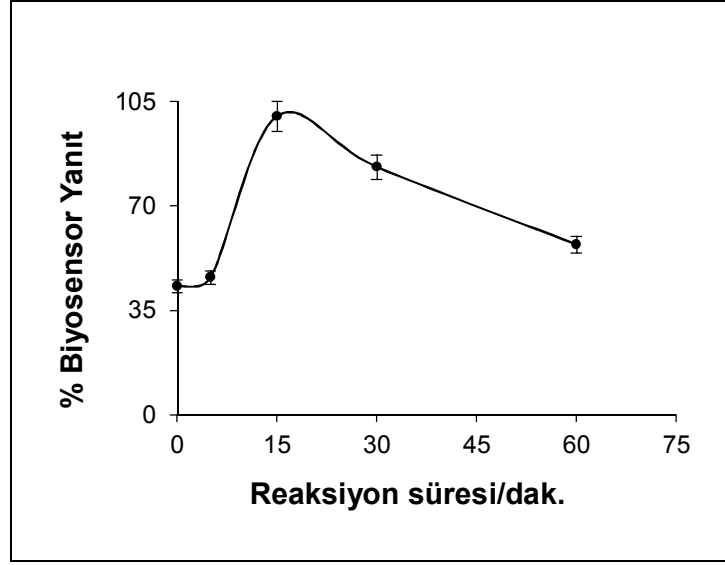
SD: Standart sapma, n: ölçüm sayısı

### 4.3. Enzim Aktivite Çalışması İçin Biyosentri-Voltammetri

Biyosentri-voltammetrik X tayininde iyi sonuçlar elde edilmesinden sonra bu sistem, AChE aktivitesinin izlenmesi için ATCh'n taşıyıcısız olarak enzimatik sistem ile belirlenmesine uygulanmıştır. Bu amaçla öncelikle optimum parametrelerin araştırılmasına geçilmiştir.

#### 4.3.1. Reaksiyon süresinin etkisi

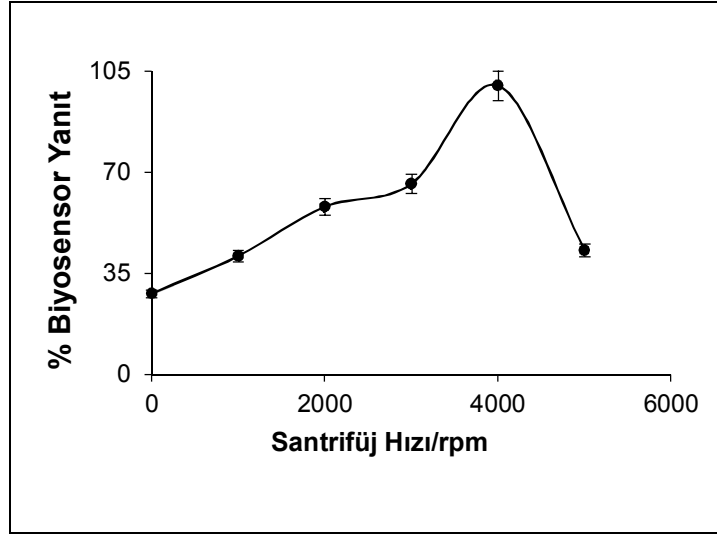
ATCh'n AChE ile hidrolizi ile elde edilen akım yanıtlarına reaksiyon süresinin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 0,25 mM ATCh  $49,56 \times 10^{-4}$  U mL<sup>-1</sup> AChE ile 37 °C'de 0, 5, 15, 30 ve 60 dakika reaksiyona sokulmuştur. Daha sonra biyosentri-voltammetrik hücre 4000 rpm'de 4 dakika santrifüjlenmiştir. DP voltammogramları 0 V ile 1,0 V arasında kaydedilmiştir. Optimum çalışma koşullarında elde edilen en yüksek akım değeri %100 olarak kabul edilmiştir ve diğer değerler buna göre hesaplanmıştır. Şekil 4.14'den görüldüğü gibi 15 dakika reaksiyon süresine kadar akım değerlerinde artış olmuştur. 15 dakikadan sonra akım değerlerinde düşüş gözlenmiştir. Bu düşüş, enzim aktivitesinin uzun inkübasyon süresinden dolayı aktivitesini kaybetmesinden kaynaklanabilir. Bununla birlikte 15 dakikadan daha uzun reaksiyon sürelerinde sinyalde ki düşüşler enzimatik reaksiyon sonucu oluşan tiyokolinin (TCh) oluşturabileceği bir dimer ya da enzimin sistein kalıntıları ile reaksiyona girebileceğinden kaynaklanabilir. En yüksek akım değeri 15 dakika reaksiyon süresinde elde edildiğinden bundan sonraki çalışmalarda bu değer kullanılmıştır.



Şekil 4.14. Reaksiyon süresinin elde edilen akım değerlerine etkisi. Deneysel koşullar: 0,25 mM ATCh  $49,56 \times 10^{-4}$  U mL<sup>-1</sup> AChE, santrifüj hızı; 4000 rpm, Santrifüj süresi; 4 dakika, 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0)

#### 4.3.2. Santrifüj hızının etkisi

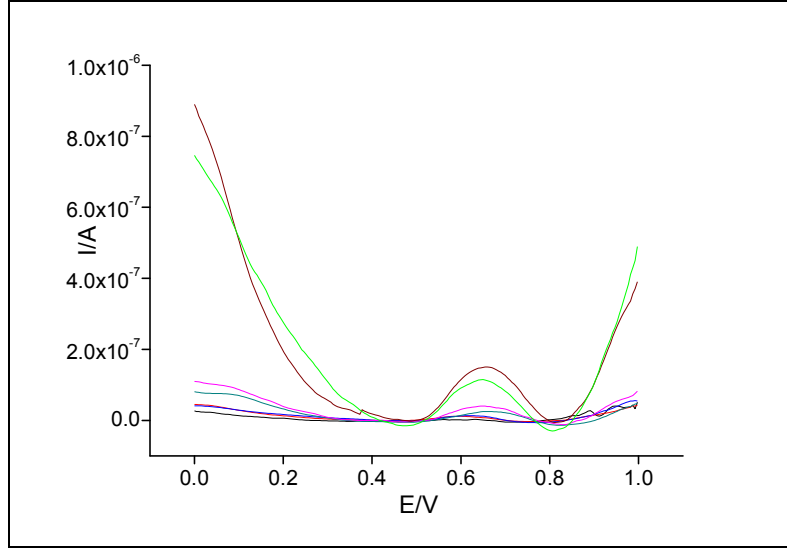
Santrifüj parametrelerinden ilk olarak santrifüj hızı için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla  $49,56 \times 10^{-4}$  U mL<sup>-1</sup> AChE ve 0,25 mM ATCh için 15 dakika reaksiyon süresi uygulandıktan sonra 4 dakika, 0, 1000, 2000, 3000, 4000 ve 5000 rpm santrifüj hızlarında santrifüjlenmiştir. 4000 rpm'e kadar biyosensör yanıtlarında artma olmuştur. 5000 rpm'de biyosensör yanıtları düşmüştür (Şekil 4.15). Santrifüj hızı arttıkça elektrot yüzeyinde daha fazla analitin birikmesine neden olmuştur. Bundan dolayı 4000 rpm kadar akım değerleri artmıştır. Bunun yanında daha büyük santrifüj hızında biyosensör yanıtında ki düşüş elektrot yüzeyinde toplanan analitin yüksek hızdan dolayı elektrot yüzeyinden çözeltiliye karışmasına bağlanabilir.



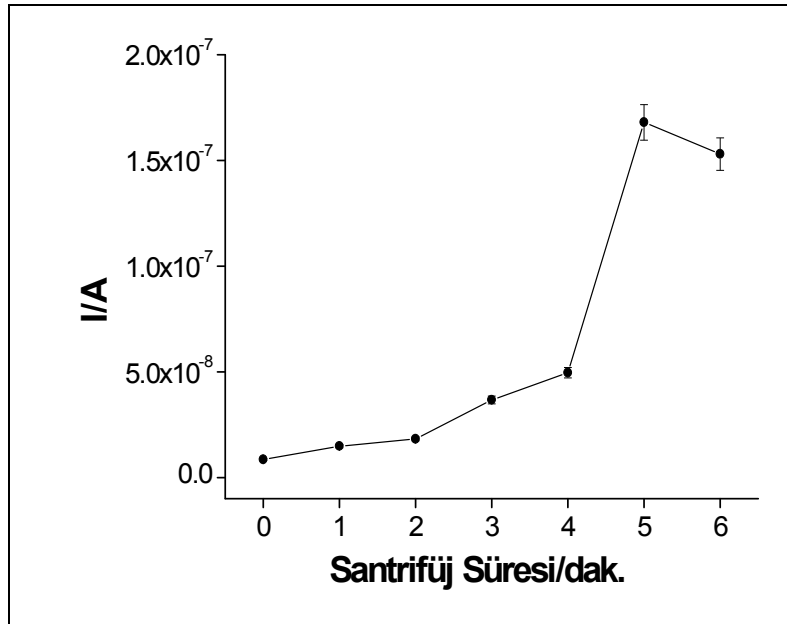
Şekil 4.15. Santrifüj hızının biyosensör yanıtlarına etkisi. Deneysel koşullar: 0,25 mM ATCh  $49,56 \times 10^{-4}$  U mL<sup>-1</sup> AChE, reaksiyon süresi; 15 dakika, Santrifüj süresi; 4 dakika, 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0)

#### 4.3.3. Santrifüj süresinin etkisi

0, 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 dakika santrifüj sürelerinin elde edilen DP voltammogramlarına etkisi incelenmiştir (Şekil 4.16). Şekil 4.17’de açıkça görüldüğü gibi 5 dakika santrifüj süresine kadar akım değerleri artmıştır. Bu değerden sonra akım değerinde düşüş gözlenmiştir. Bu düşüş daha uzun süreli santrifüj süresinde elektrot üzerinde toplanan analit kaybindan kaynaklanabilir. Bu yüzden bundan sonra ki çalışmalarda 5 dakika santrifüj süresi kullanılmıştır.



Şekil 4.16. siyah) 0, kırmızı) 1, mavi) 2, koyu yeşil) 3, pembe) 4, kahverengi) 5, yeşil) 6 dakika santrifüj süreleri için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar: 0,25 mM ATCh  $49,56 \times 10^{-4}$  U mL<sup>-1</sup> AChE, reaksiyon süresi; 15 dakika, Santrifüj hızı; 4000 rpm, 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0), step potential 0.005 V, amplitude 0.025 V

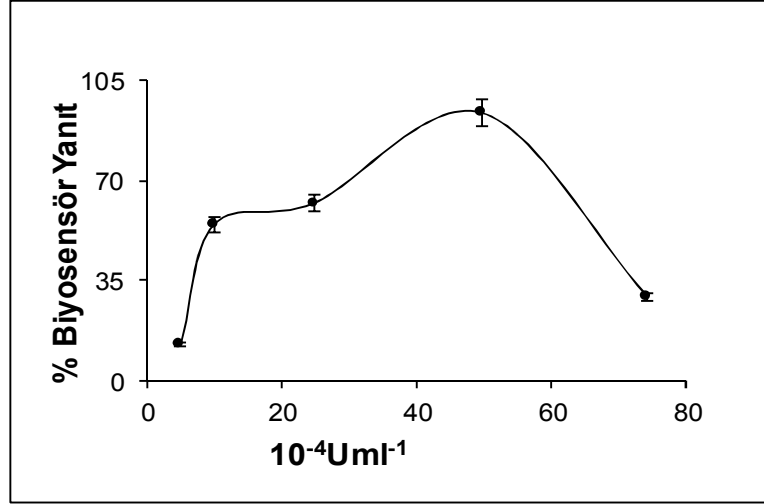


Şekil 4.17. Farklı santrifüj sürelerinin elde edilen akım değerlerine etkisi. Deneysel koşullar Şekil 4.16 ile aynıdır

#### 4.3.4. Enzim miktarının etkisi

Optimum AChE miktarını bulmak için  $4,95 \times 10^{-4}$ ,  $9,91 \times 10^{-4}$ ,  $24,78 \times 10^{-4}$ ,  $49,56 \times 10^{-4}$  ve  $74,34 \times 10^{-4}$  U mL<sup>-1</sup> AChE miktarları 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj parametreleri kullanılarak 0.25 mM ATCh için elde edilen akım değerlerine etkisi incelenmiştir

(Şekil 4.18).  $49,56 \times 10^{-4} \text{ UmL}^{-1}$  AChE miktarına kadar biyosensör yanıtları artmıştır. Bu değerden sonra ise keskin bir düşüş olmuştur. Bu düşüş difüzyon problemine de neden olabilen fazla protein varlığından dolayı elektrodun pasivasyonundan kaynaklanabilir. Bundan sonra ki çalışmalarda  $49,56 \times 10^{-4} \text{ UmL}^{-1}$  AChE miktarı kullanılmıştır.

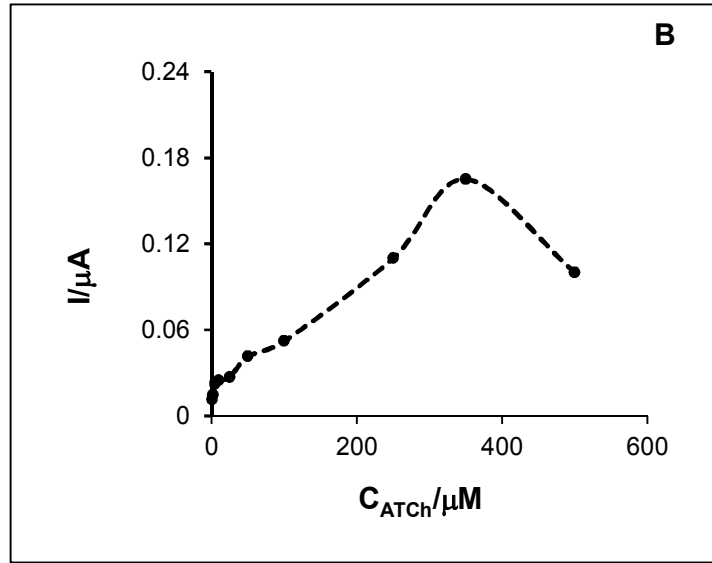
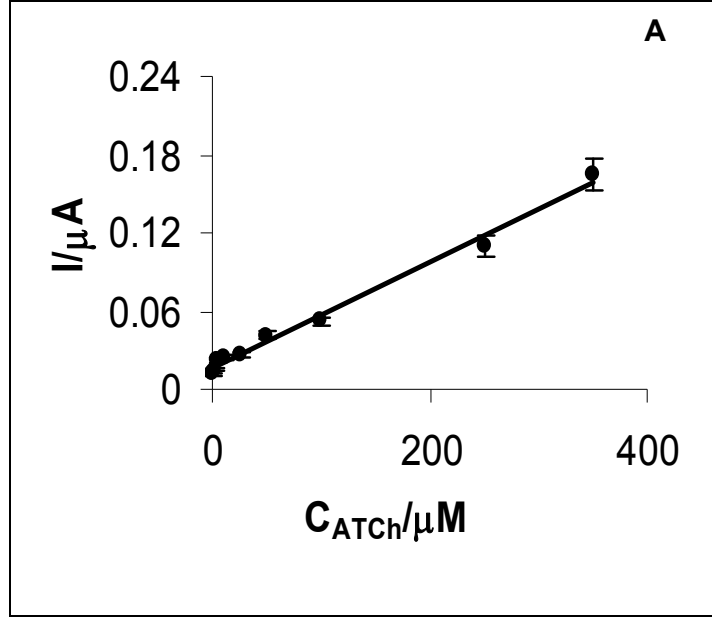


Şekil 4.18.  $4,95 \times 10^{-4}$ ,  $9,91 \times 10^{-4}$ ,  $24,78 \times 10^{-4}$ ,  $49,56 \times 10^{-4}$  ve  $74,34 \times 10^{-4} \text{ UmL}^{-1}$  AChE miktarlarının biyosensör yanıtlarına etkisi. Deneysel koşullar: 0,25 mM ATCh reaksiyon süresi; 15 dakika, Santrifüj hızı; 4000 rpm, Santrifüj süresi; 5 dakika, 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0)

#### 4.3.5. Analitiksel karakteristik ve örnek deneme

Deneysel parametreler optimize edildikten sonra analitiksel karakteristik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. ATCh için 1–350  $\mu\text{M}$  arasında  $y = 0,0004x + 0,0163$  eşitliği ve  $R^2 = 0,99$  değeri ile bir doğrusal bir aralık elde edilmiştir (Şekil 4.19). RSD değeri ise %3.6 (n=4) olarak hesaplanmıştır.





Şekil 4.19. A) 1–350  $\mu M$  arasında ATCh için elde edilen kalibrasyon eğrisi, B) Doğrusallıktan sapmayı gösteren grafik

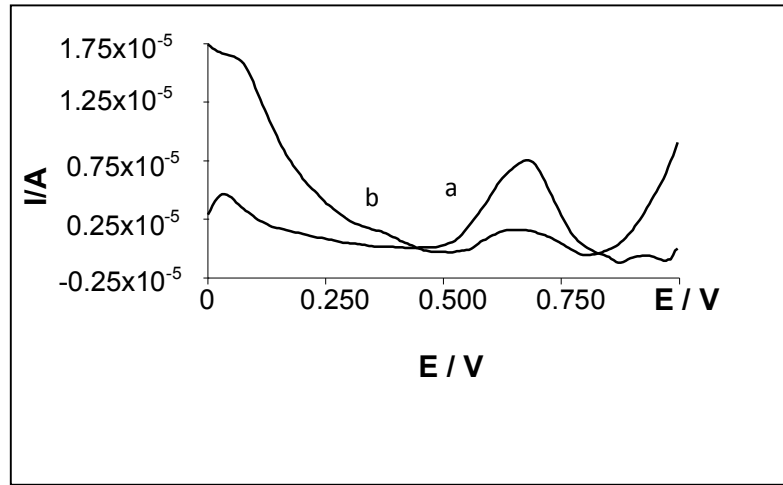
ATCh belirlenmesi için kullanılan elektrokimyasal biyosensörler ve biyosentri-voltammetrik yöntem ile elde edilen doğrusal aralık açısından karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.4.). Çizelge 4.4'den açıkça görüldüğü gibi biyosentri-voltammetri yöntemi ile ATCh için daha geniş bir doğrusal aralık elde edilmiştir.

**Çizelge 4.4. ATCh belirlenmesi için yapılan elektrokimyasal biyosensör ile biyosentri-voltammetrik yöntemin doğrusal aralık ve LOD açısından karşılaştırılması**

Elektrot	Doğrusal Aralık ( $\mu\text{M}$ )	Referans
GCE/MWCNT/PANI/AChE	10–89,2	Cesarino vd., 2011
AChE/xGnP/Chitosan/GCE	5–39 ve 64–258	Ion vd., 2010
AChE/TiO <sub>2</sub> -G/GCE	300–1100	Wang vd., 2011
AChE/AuNPs/SiSG/GCE	10–1000	Du vd., 2007
AChE/PAN/AuNPs/Pt	10–170	Marinov vd., 2010
Biyosentri-voltammetri	1-350	Bu çalışma

AChE inhibisyon çalışması için Alzheimer tedavisinde kullanılan Neurem ( Donepezil HCl, 5 mg) analiz edilmiştir. Bu amaçla Neurem ilacı bir havan içerisinde toz haline getirilmiştir. 1.0 mg Neurem fosfat tamponunda (pH 7,0) çözülmüştür. 350  $\mu\text{M}$  ATCh,  $49,56 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$  AChE and 500  $\mu\text{L}$  Neurem 37 °C’de 15 dakika bekletilmiştir. Çözelti, sentri-voltammetrik hücrenin içine konulmuştur ve 4000 rpm’de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Sentri-voltammetrik hücre, voltammetrik ölçüm standın üzerine konulduktan sonra referans ve yardımcı elektrot çözeltiye daldırılmıştır. Potansiyel 0 V’den 1 V’a kadar taranmıştır (Şekil 5.19). İnhibisyon değeri 1.3 nolu denklem ile hesaplanmıştır.

Bu denklemde  $I_p$ , control ATCh için elde edilen akım değeridir.  $I_p$ , exp ise Donepezil ile ATCh için elde edilen akım değeridir. Şekil 4.20’de görüldüğü gibi donepezil, AChE’ nin aktif uçlarını inhibe ettiğinden pik yüksekliğinde düşüşe neden olmuştur. Yapılan ölçümler sonucunda inhibisyon değeri %80 olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 4.20. a) 350  $\mu\text{M}$  ATCh, b) 350  $\mu\text{M}$  ATCh ve 500  $\mu\text{L}$  donepezil için elde edilen DP voltammogramlar**

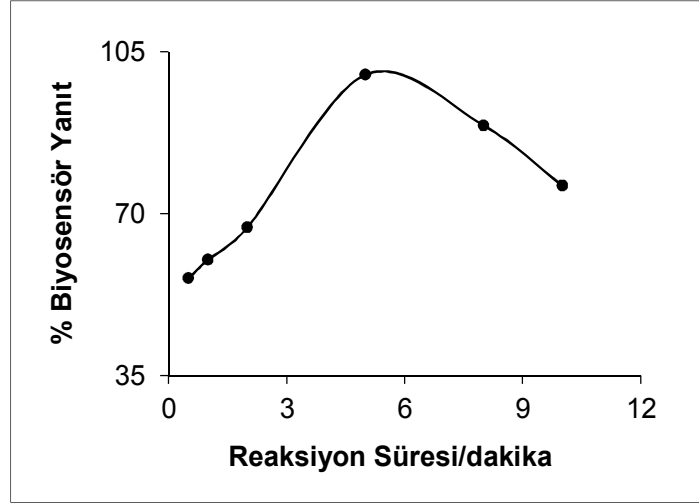
#### **4.4. Asetilkolinin Biyosentri-Voltammetrik Tayini**

ACh sempatik sinir sisteminde bulunan en önemli nörotransmitterlerden biridir. Hedefe bağlandıktan sonra ACh, AChE tarafından parçalanır. Eğer ACh metabolize edilemez ve sinir dokularında birikirse, Parkinson ve Alzheimer gibi bazı nöropsikiyatrik hastalıklara neden olabilir. ACh elektroaktif bir madde değildir. Bu nedenle ACh aşağıda verilen ikili enzimatik sistem ile belirlenmektedir.

ACh belirlenmesi bölüm 1’de verilen 1.2 nolu denklemde belirtilen enzimatik reaksiyon sonucu üretilen hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) veya oksijenin ( $O_2$ ) tüketimine dayanmaktadır.  $H_2O_2$  sinyalinin izlenmesi yüksek çalışma potansiyeli gerektirir. Bu yüzden bu potansiyelde, askorbik asit ve ürik asit gibi kolayca yükseltgenen türlere karşı AChE biyosensörleri çok duyarlı olur. Bu nedenle, biyosentri-voltammetri yöntemi ile ACh tayini için  $O_2$  tüketimine dayanılarak çalışmalar yapılmıştır.

##### **4.4.1. Reaksiyon süresinin etkisi**

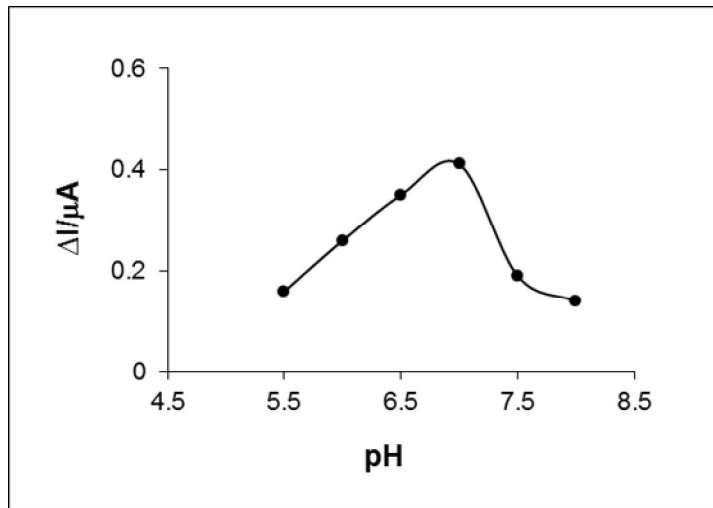
Enzim substrat etkileşimini arttırmak için reaksiyon süresinin biyosensör yanıtlarına etkisi incelenmiştir. Bu amaçla AChE-CHOD modifiye CPE biyosentri-voltammetrik hücreye yerleştirildikten sonra 0.25 mM ACh içeren 10 mL fosfat tamponu hücre içerisine konulduktan sonra oda koşullarında 0,5, 1, 2, 5, 8 ve 10 dakika reaksiyon için beklenmiştir. Şekil 4.21’den görüldüğü gibi 0,5 dakikadan 5 dakikaya kadar biyosensör yanıtları artmıştır ve daha sonra düşmüştür. 5 dakikadan sonra gerçekleşen bu düşüş, reaktif olmayan türlerin uzun süreli reaksiyon sürelerinde enzim aktivitesini kaybetmesinden kaynaklanabilir. Bu yüzden bundan sonra ki çalışmalarda 5 dakika reaksiyon süresi olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.21. Biyosensör yanıtlarına reaksiyon süresinin (0,5, 1, 2, 5, 8 ve 10 dakika) etkisi. Koşullar; 0,25 mM ACh, 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0), Santrifüj hızı; 5000 rpm, Santrifüj süresi; 3 dakika, 4,2 U/mg CHOD, 155 U/mg AChE

#### 4.4.2. pH etkisi

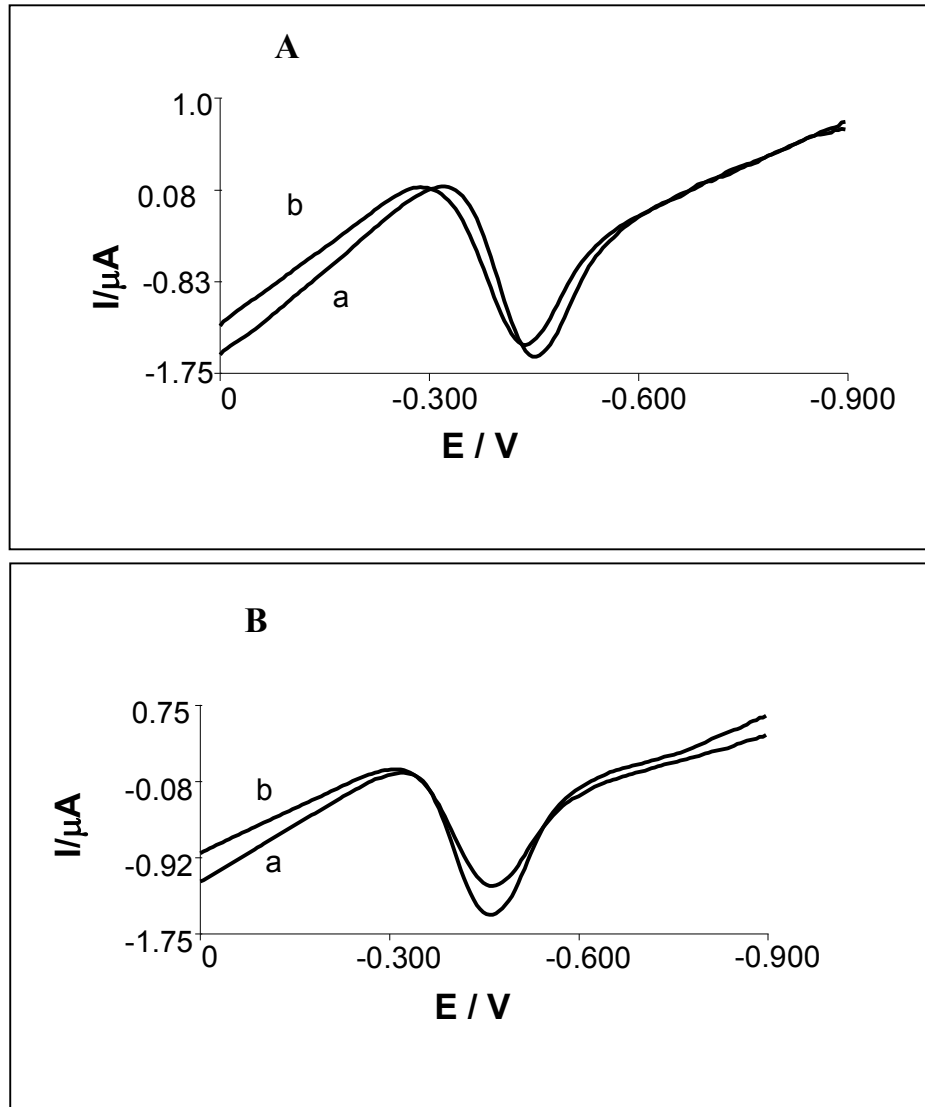
Kullanılan tampon çözeltinin pH'ı enzimin protonasyon bölgesini değiştirdiği için biyosensör yanıtlarını etkiler. Bu yüzden, pH 5,0-8,0 arasında (0,5 birimlik artış ile) 50 mM fosfat tamponu ile AChE-CHOD modifiye CPE için optimum pH çalışmaları araştırılmıştır (Şekil 4.22). Akım değerleri pH 5,0-7,0'e kadar artış gözlenmiştir. Enzim denatürasyonundan dolayı pH 7,0'den değerinden sonra düşüş gözlenmiştir. Bu nedenle bundan sonra gerçekleştirilen çalışmalarda pH 7,0 fosfat tamponu kullanılmıştır.



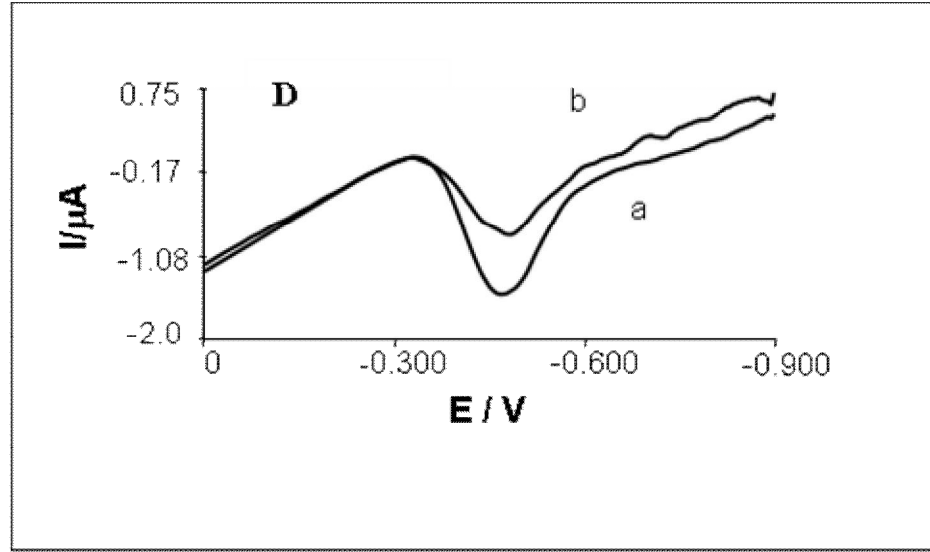
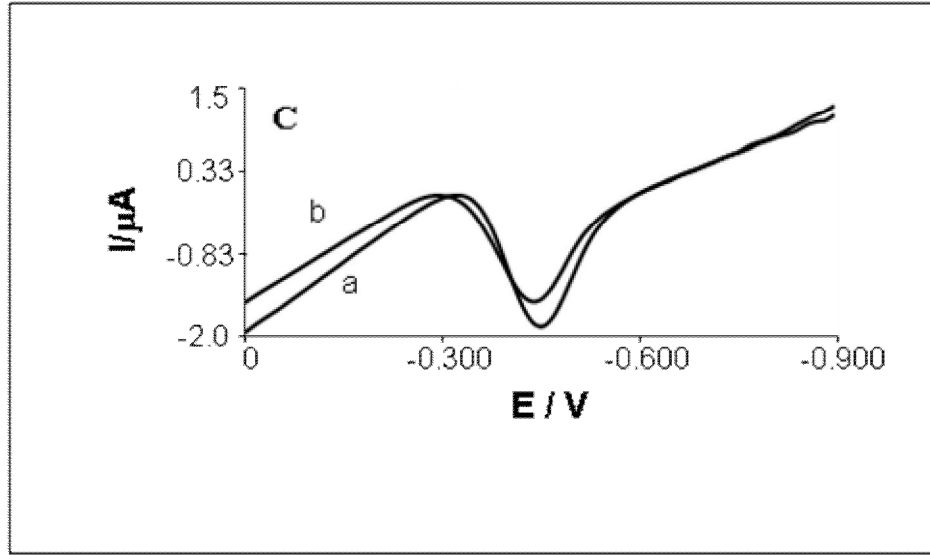
Şekil 4.22. Akım değerlerine pH etkisi. Deneysel koşullar: 0,25 mM ACh, santrifüj hızı; 5000 rpm, santrifüj süresi; 3 dakika, reaksiyon süresi; 5 dakika, 4,2 U/mg CHOD, 155 U/mg AChE

#### 4.4.3. CHOD miktarının etkisi

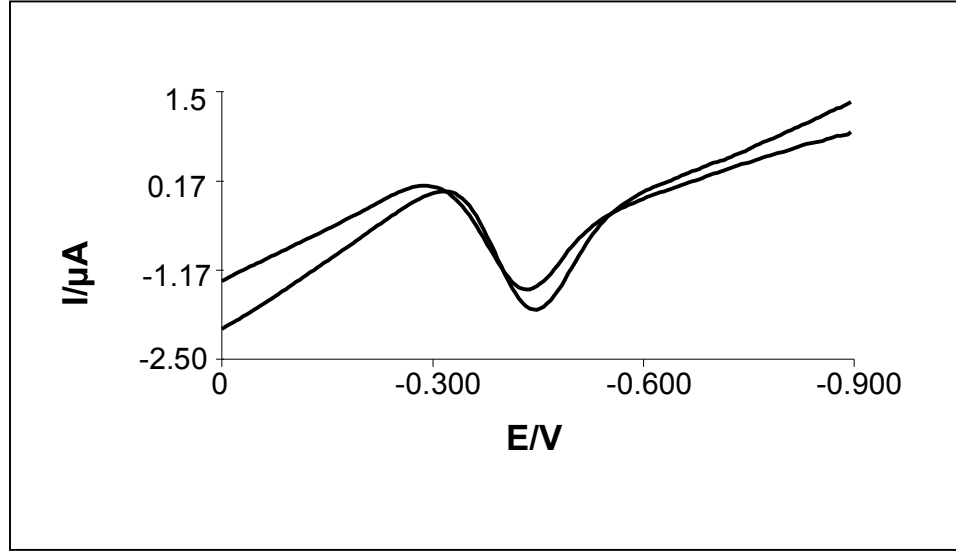
Enzim miktarı, biyosensör performansını etkileyen kritik bir etmendir. Bu nedenle ikili enzimatik sistemde, CHOD biyosensörü için, CHOD'nin değişen derişimleri ile Ch yanıtları incelenmiştir. 1,4, 2,8, 4,2, 5,6 ve 7,0 U CHOD'nin 0,25 M Ch için elde edilen DP voltammogramları Şekil 4.23, 4.24 ve 4.25'de gösterilmiştir. Şekil 4.26'de gösterildiği gibi 5,6 U/mg CHOD'ye kadar biyosensör yanıtlarında bir artış gözlenmiştir. Fakat 5,6 U/mg CHOD'den sonra düşüş gözleendiğinden ikili enzimatik sistemde CHOD miktarı 5,6 U/mg olarak kullanılmıştır.



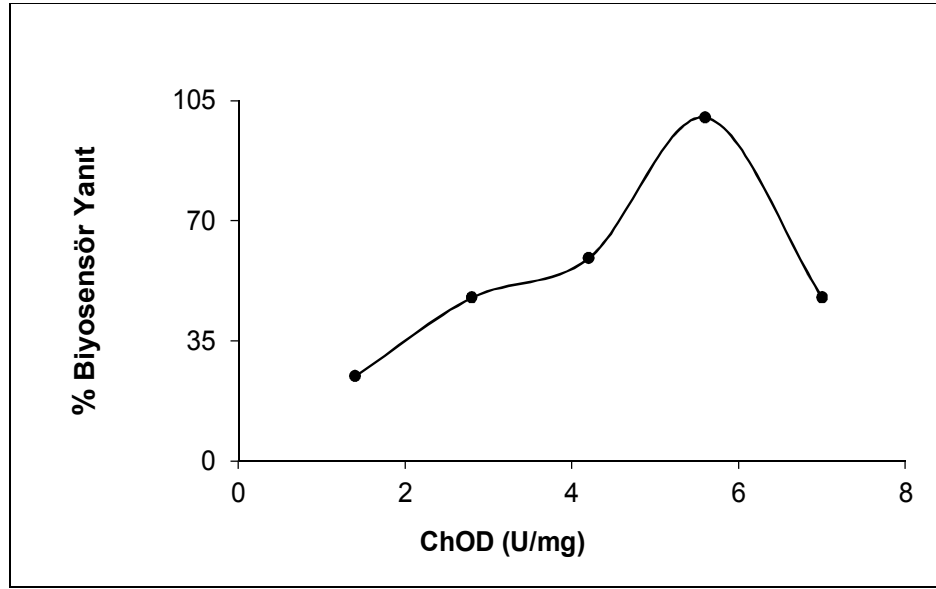
Şekil 4.23. a) zemin, b) 0,25 mM Ch ile A) 1,4 U/mg, B) 2,8 U/mg CHOD için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar: santrifüj hızı; 5000 rpm, santrifüj süresi; 3 dakika, reaksiyon süresi; 5 dakika, 155 U/mg AChE



Şekil 4.24. a) zemin, b) 0,25 mM Ch ile C) 4,2 U/mg, D) 5,6 U/mgCHOD için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar: santrifüj hızı; 5000 rpm, santrifüj süresi; 3 dakika, reaksiyon süresi; 5 dakika, 155 U/mg AChE



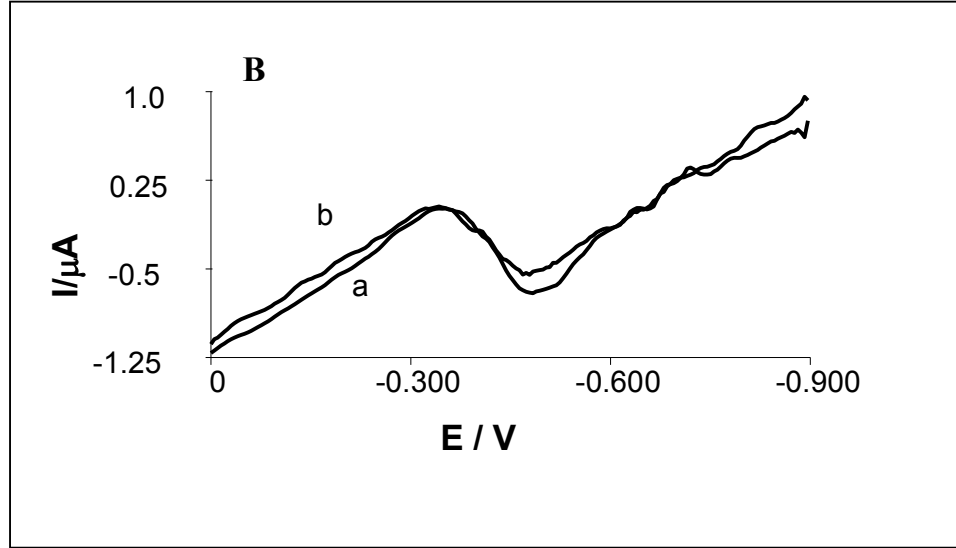
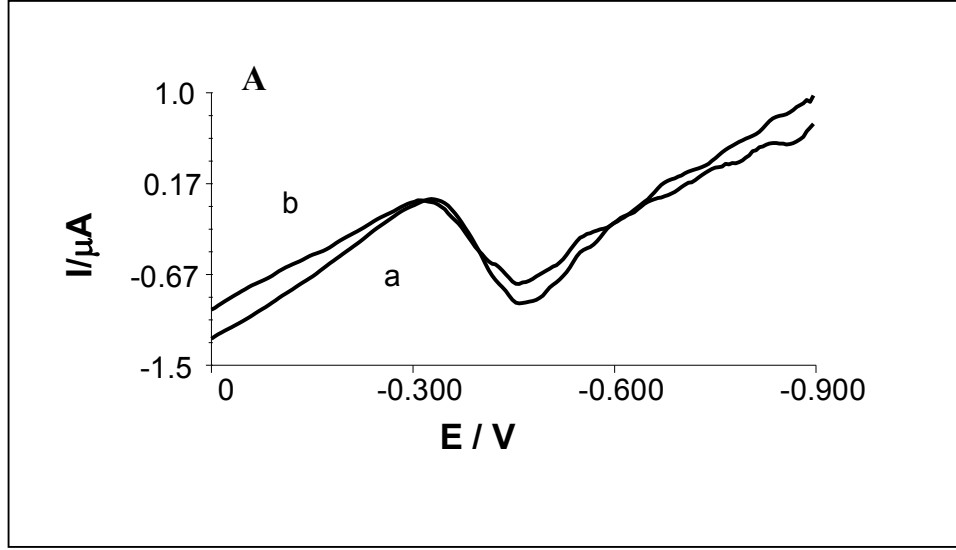
Şekil 4.25. a) zemin, b) 0,25 mM Ch ile E) 7,0 U/mg CHOD için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar: santrifüj hızı; 5000 rpm, santrifüj süresi; 3 dakika, reaksiyon süresi; 5 dakika, 155 U/mg AChE



Şekil 4.26. CHOD miktarlarının elde edilen biyosensör yanıtlarına etkisi

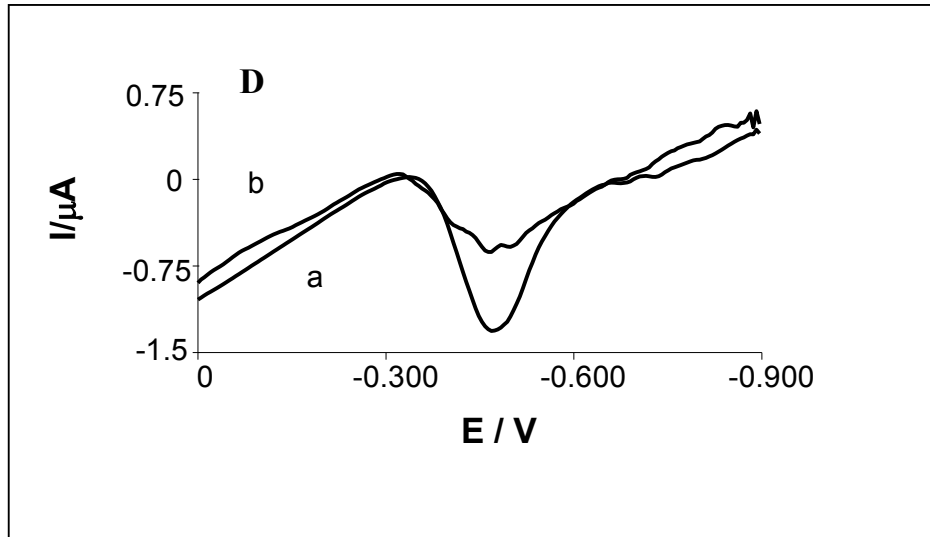
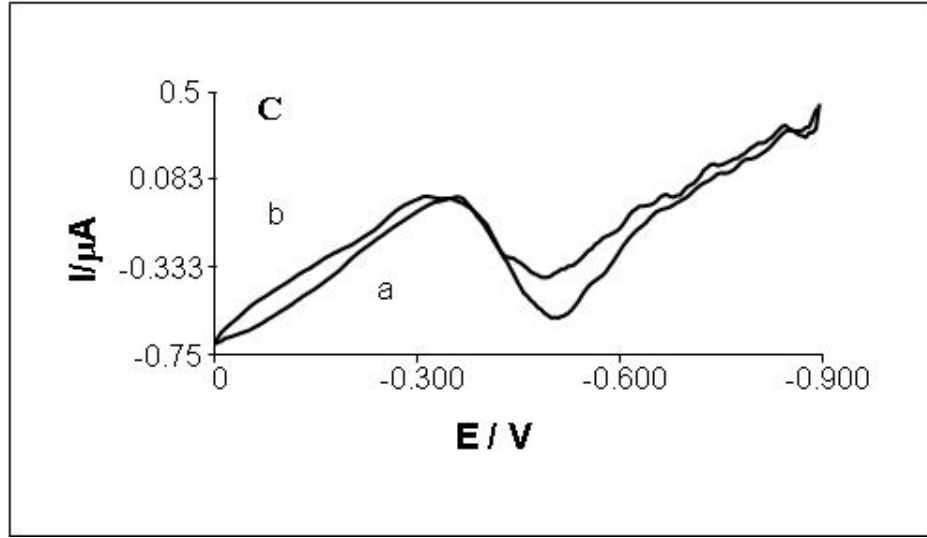
#### 4.4.4. AChE miktarının etkisi

AChE miktarının biyosensör yanıtlarına etkisi incelenmiştir. Bunun için 51,8, 103,6, 155, 207,2 ve 259 U/mg AChE'nin 0,25 mM ACh DP voltammogramları şekil 4.27, 4.28 ve 4.29'da gösterilmiştir. Şekil 4.30'da açıkça görüldüğü gibi 0,25 mM ACh'a karşı en iyi yanıt 207,2 U/mg'da elde edilmiş ve bundan sonraki çalışmalarda bu miktar kullanılmıştır.

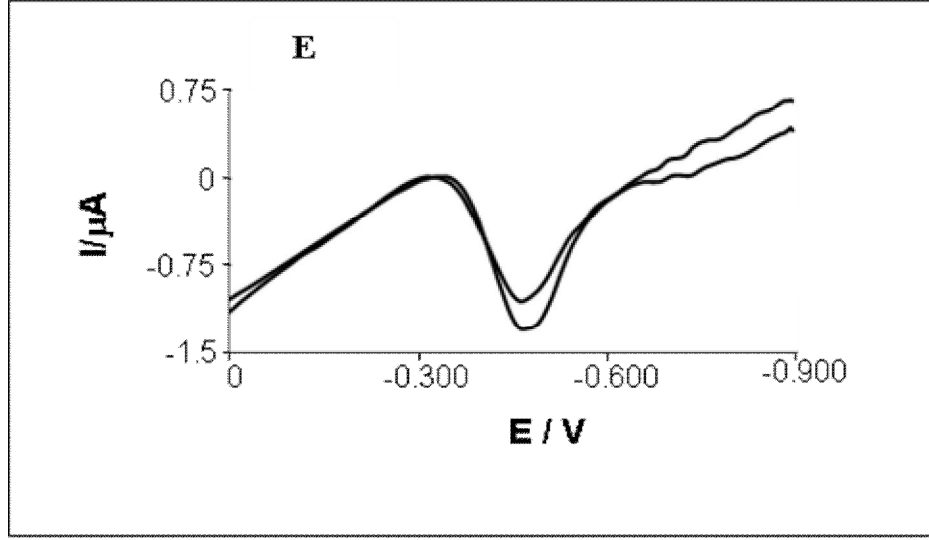


Şekil 4.27. a) zemin, b) 0,25 mM ACh ile A) 51,8 U/mg, B) 103,6 U/mg AChE için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar: santrifüj hızı; 5000 rpm, santrifüj süresi; 3 dakika, reaksiyon süresi; 5 dakika, 5,6 U/mg CHOD

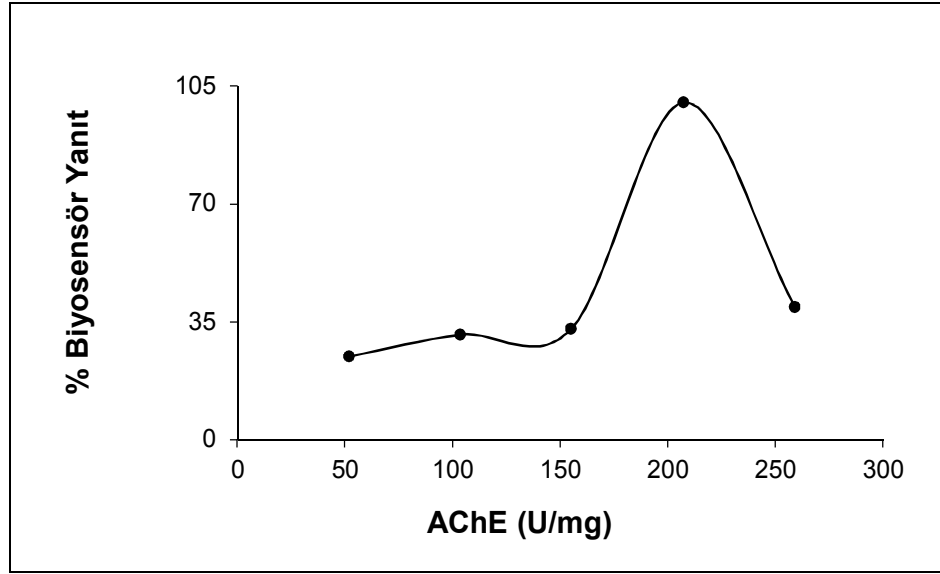




Şekil 4.28. a) zemin, b) 0,25 mM ACh ile C) 155 U/mg, D) 207,2 U/mg AChE için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar: santrifüj hızı; 5000 rpm, santrifüj süresi; 3 dakika, reaksiyon süresi; 5 dakika, 5,6 U/mg CHOD



Şekil 4.29. a) zemin, b) 0,25 mM ACh ile E) 259 U AChE U/mg için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar: santrifüj hızı; 5000 rpm, santrifüj süresi; 3 dakika, reaksiyon süresi; 5 dakika, 5,6 U/mg CHOD

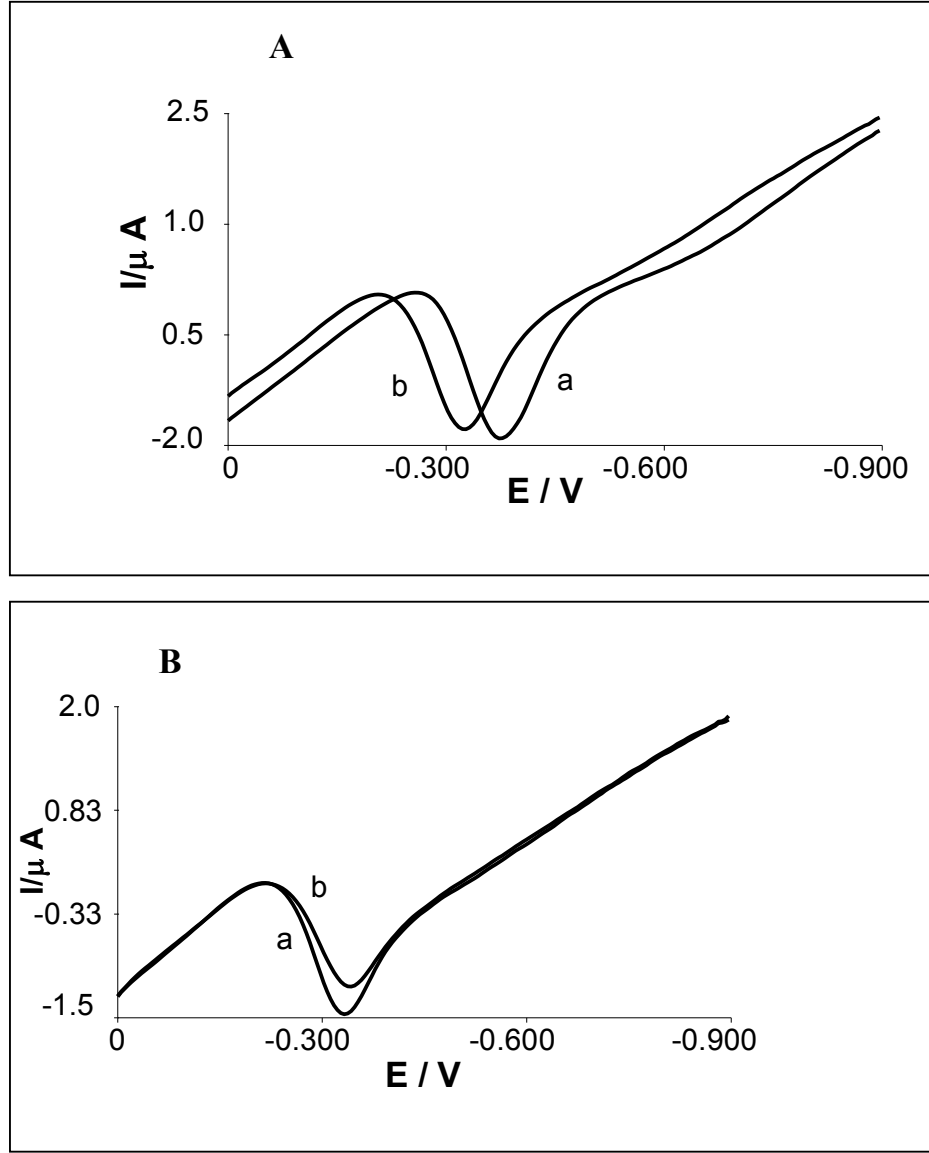


Şekil 4.30. AChE miktarlarının elde edilen biyosensör yanıtlarına etkisi

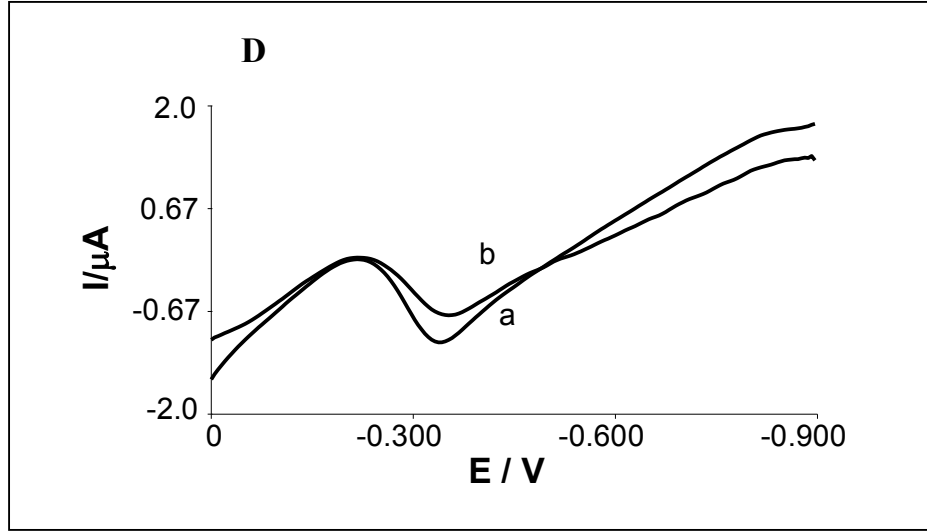
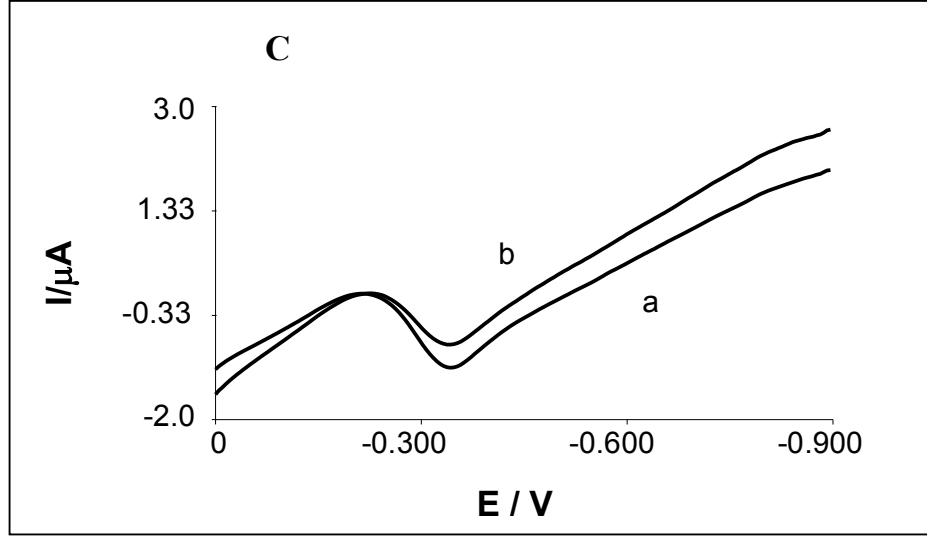
#### 4.4.5. Santrifüj süresinin etkisi

Yukarıda belirtilen optimum koşullar altında 0,25 mM ACh için ilk olarak santrifüj süresinin etkisi incelenmiştir. Bunun için 5 dakika reaksiyon süresinden sonra biyosentri-voltammetrik hücre 3000 rpm'de 0, 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 dakika santrifüj sürelerinin DP voltammogramlara etkisi Şekil 4,31, 4,32, 4,33 ve 4,34'de verilmiştir. Şekil 4,35'den görüldüğü gibi 4 dakikaya kadar biyosensör yanıtlarında artış

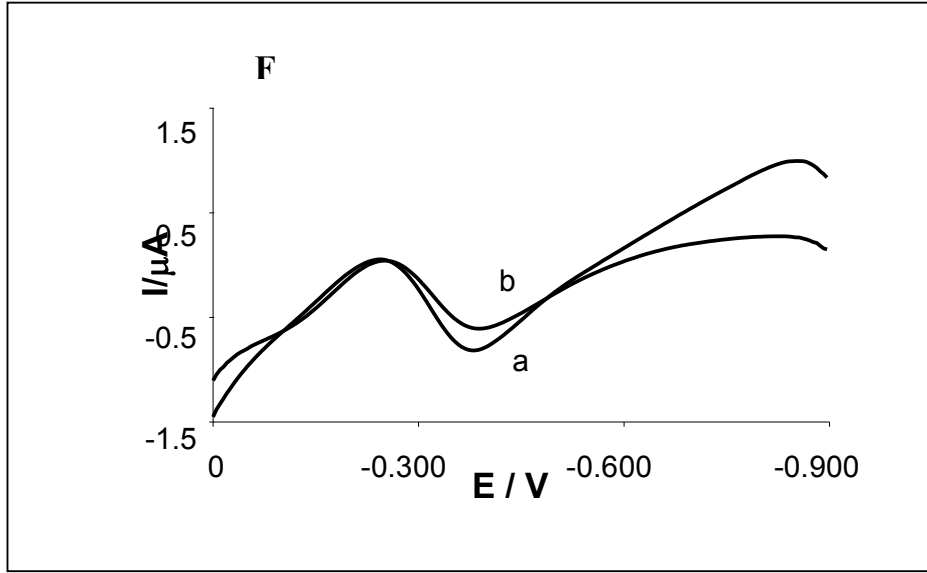
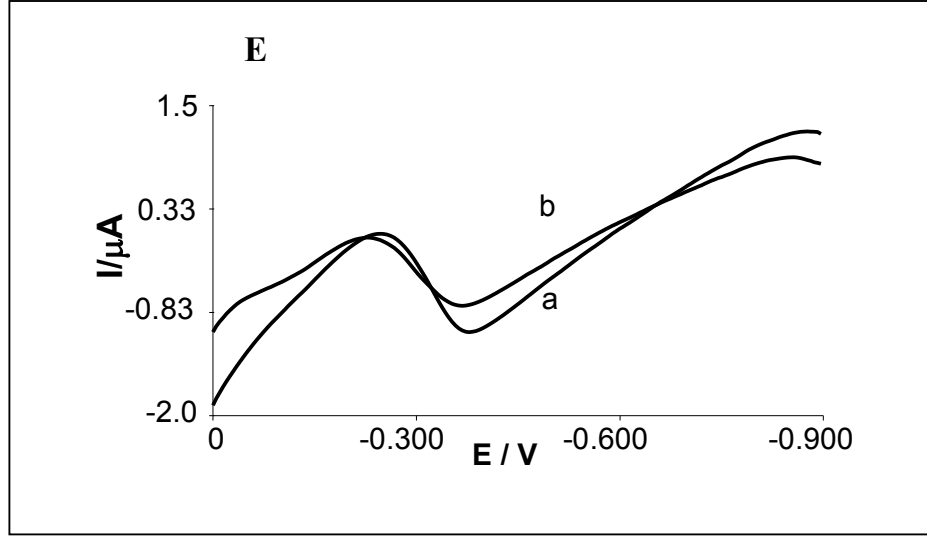
gözenmiş ve 4 dakikadan sonra bir düşüş gözlenmiştir. 4 dakika optimum santrifüj süresi seçilmiştir.



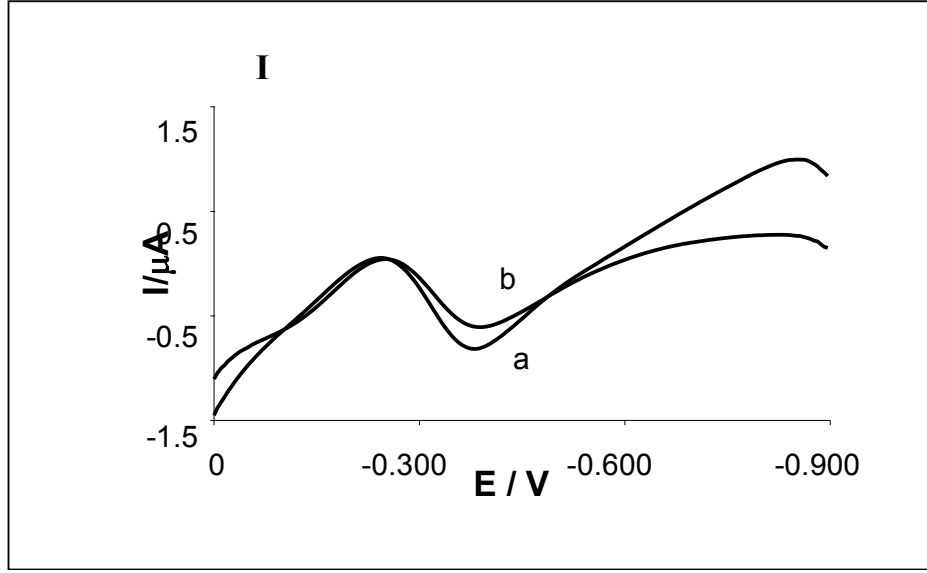
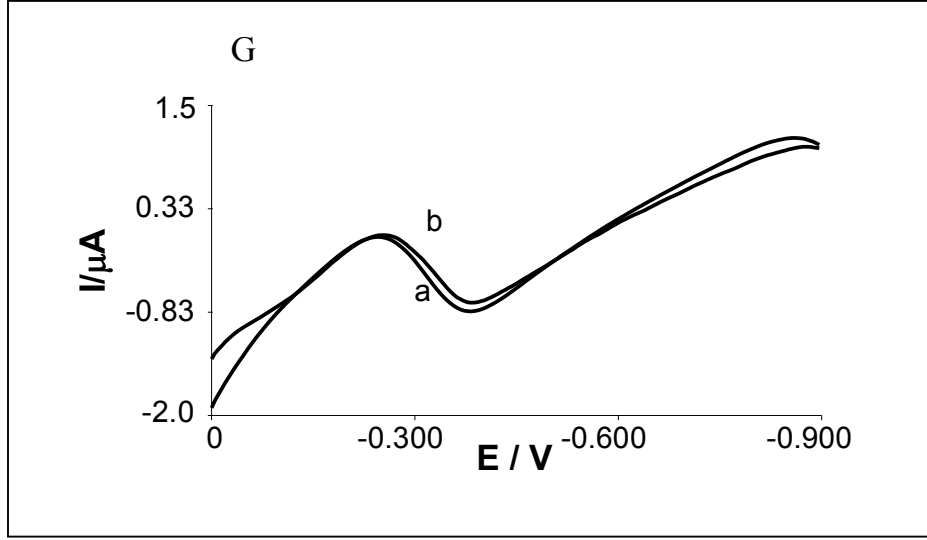
Şekil 4.31. a) zemin, b) 0,25 mM ACh ile A) 0 B) 1 santrifüj süreleri için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar: santrifüj hızı; 5000 rpm, reaksiyon süresi; 5 dakika, 207,2 U/mg AChE, 5,6 U/mg CHOD



Şekil 4.32. a) zemin, b) 0,25 mM ACh ile C) 2 D) 3 santrifüj süreleri için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar: santrifüj hızı; 5000 rpm, reaksiyon süresi; 5 dakika, 207,2 U/mg AChE, 5,6 U/mg CHOD



Şekil 4.33. a) zemin, b) 0,25 mM ACh ile E) 4, F) 5 santrifüj süreleri için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar: santrifüj hızı; 5000 rpm, reaksiyon süresi; 5 dakika, 207,2 U/mg AChE, 5,6 U/mg CHOD



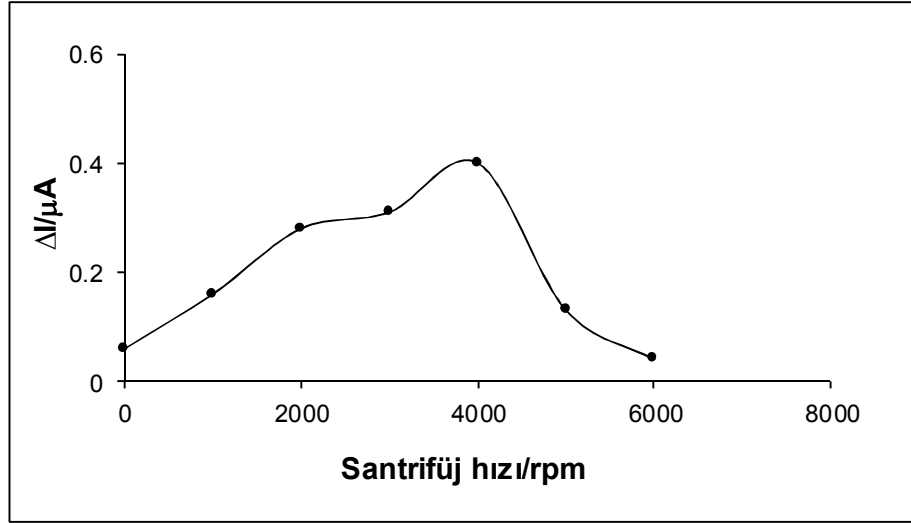
Şekil 4.34. a) zemin, b) 0,25 mM ACh ile A) 1 B) 2 santrifüj süreleri için elde edilen DP voltammogramları. Deneysel koşullar: santrifüj hızı; 5000 rpm, reaksiyon süresi; 5 dakika, 207,2 U/mg AChE, 5,6 U/mg CHOD



Şekil 4.35. Santrifüj süresinin elde edilen akım değerlerine etkisi

#### 4.4.6. Santrifüj hızının etkisi

0,25 mM ACh için diğer önemli bir parametre olan santrifüj hızının etkisi incelenmiştir. Bunun için 5 dakika reaksiyon süresinden sonra biyosentri-voltammetrik hücre 0, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 ve 6000 rpm'de 4 dakika santrifüjlenmiştir (Şekil 4.36). 4000 rpm'e kadar biyosensör yanıtlarında artış gözlenmiş ve 4000 rpm'den sonra bir düşüş gözlenmiştir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda 4000 rpm santrifüj hızı olarak kullanılmıştır.

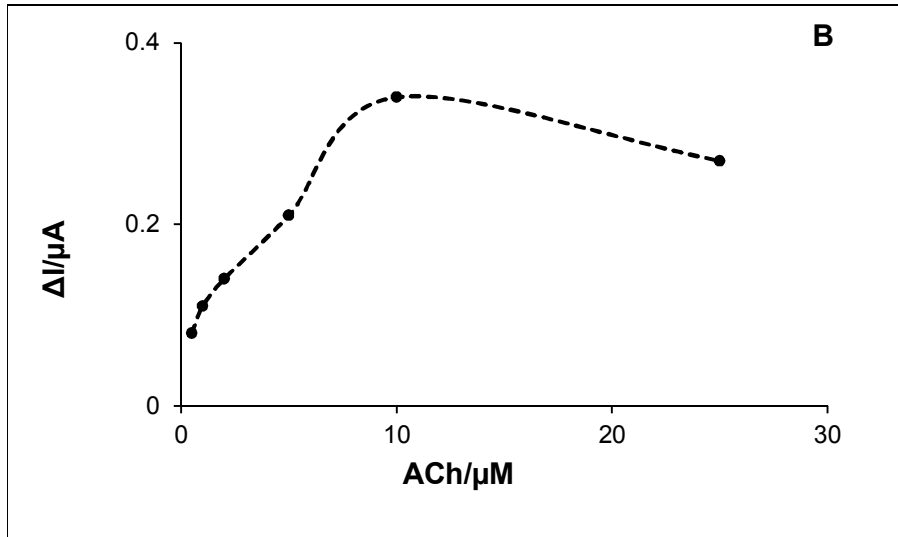
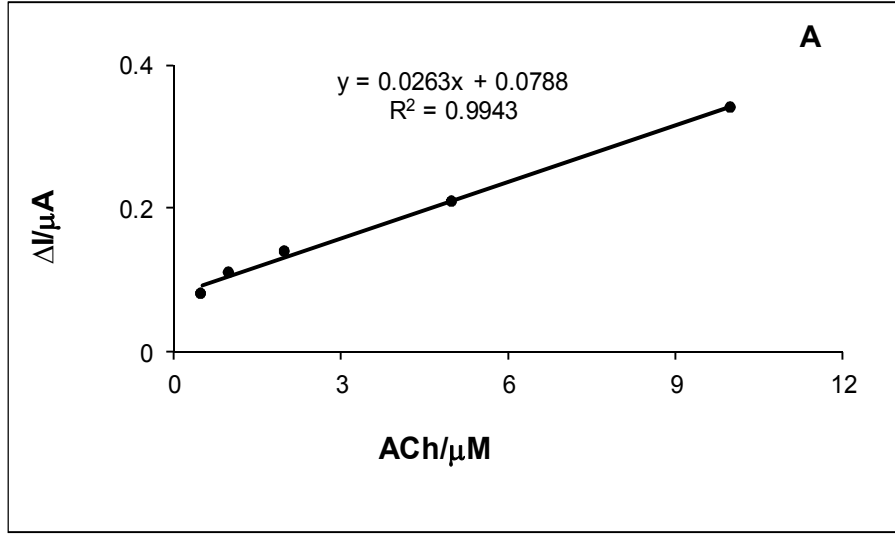


Şekil 4.36. Biyosensör yanıtına santrifüj hızının (0, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 ve 6000 rpm) etkisi. Deneysel koşullar: reaksiyon süresi; 5 dakika, 207,2 U/mg AChE, 5,6 U/mg CHOD, 207,2 U/mg AChE

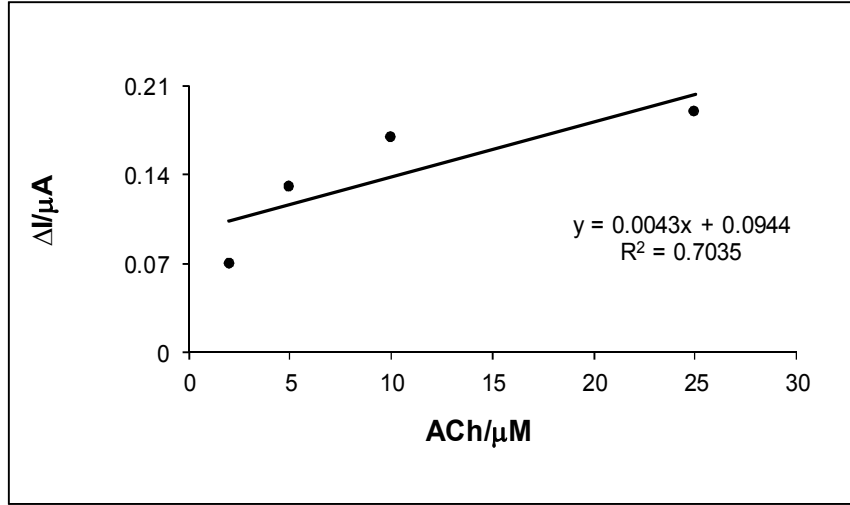
#### 4.4.7. Analitiksel karakteristik ve örnek deneme

Optimum şartlar belirlendikten sonra ACh için analitiksel karakteristik belirlenmiştir. Bunun için yukarıda belirtilen deneysel şartlar altında ACh için  $5,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-5}$  M ( $y = 0,0263x + 0,0788$ ,  $R^2 = 0,9943$ ) arasında doğrusal bir aralık elde edilmiştir (Şekil 4.37). RSD değeri %4,56 (n=5) olarak hesaplanmıştır. Santrifüj parametreleri kullanılmadan ACh için  $2 \times 10^{-6}$ - $25 \times 10^{-6}$  M ( $y = 0,0043x + 0,0944$ ,  $R^2 = 0,7035$ ) arasında doğrusal bir aralık elde edilmiştir (Şekil 4.38). Açıkça görüldüğü gibi biyosentri-voltammetri yöntemi ile daha geniş bir doğrusal aralık ve iyi bir  $R^2$  elde edilmiştir. ACh biyosensörü aynı zamanda Ch belirlenmesi için kullanılmıştır. Ch için  $10 \times 10^{-6}$ - $5 \times 10^{-4}$  M ( $y = 0,0008x + 0,261$ ,  $R^2 = 0,9901$ ) arasında doğrusal bir aralık elde edilmiştir (Şekil 4.39).

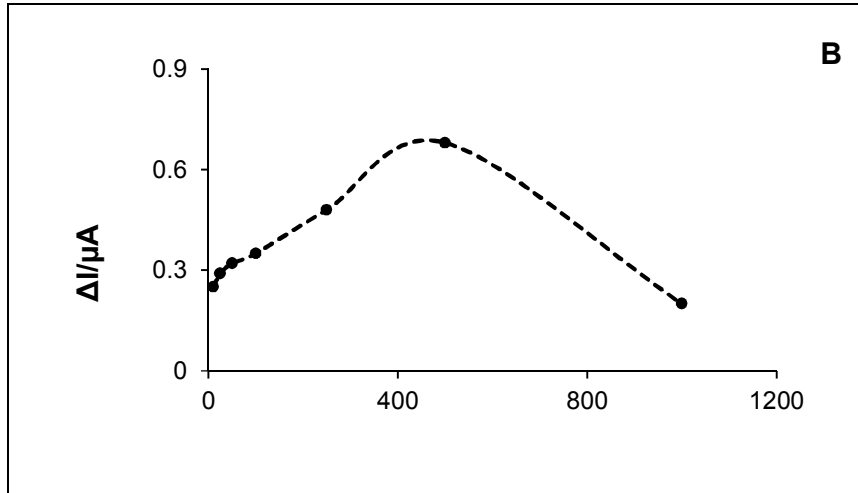
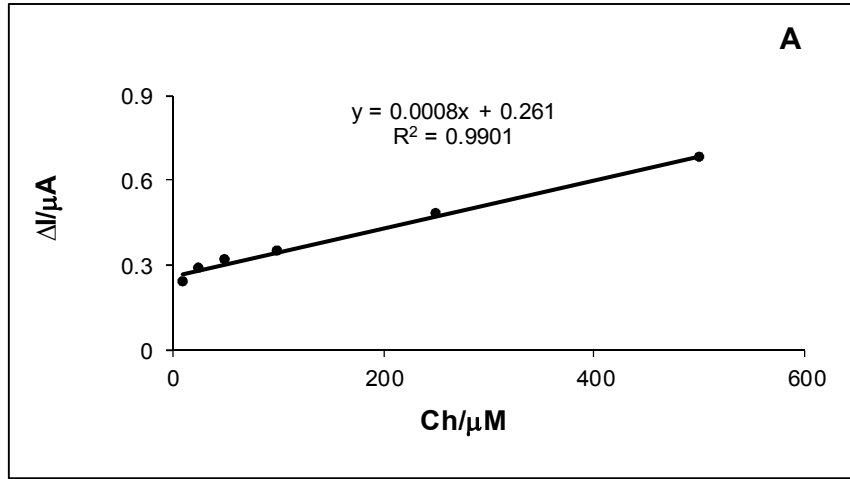




Şekil 4.37. ACh için  $5,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-5}$  M arasında elde edilen kalibrasyon grafiği. B) Doğrusallıktan sapmayı gösteren grafik. Deneysel koşullar: reaksiyon süresi; 5 dakika, santrifüj süresi; 4 dakika, santrifüj hızı; 4000 rpm; 207,2 U/mg AChE, 5,6 U/mg CHOD, 207,2 U/mg AChE



Şekil 4.38. ACh için biyosentri-voltammetrisiz elde edilen kalibrasyon grafiği. Deneysel koşullar Şekil 4.37 ile aynıdır



Şekil 4.39. Ch için 10x10<sup>-6</sup>-5x10<sup>-4</sup> M arasında elde edilen kalibrasyon grafiği, . B) Doğrusallıktan sapmayı gösteren grafik. Şekil 4.37 ile aynıdır

ACh belirlenmesi için kullanılan elektrokimyasal biyosensörler ve biyosentri-voltammetrik yöntem ile elde edilen doğrusal aralıklar karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.5). Çizelge 4.5’den açıkça görüldüğü gibi biyosentri-voltammetri yöntemi ile ACh için daha duyarlı sonuçlar elde edilmiştir.

**Çizelge 4.5. ACh belirlenmesi için yapılan elektrokimyasal biyosensör ile biyosentri-voltammetrik yöntemin doğrusal aralık ve LOD açısından karşılaştırılması**

Elektrot	Doğrusal Aralık (M)	LOD (M)	Referanslar
AChE/CHOD/pnAN/Pt	$1.0 \times 10^{-6}$ - $1.5 \times 10^{-3}$	$5.0 \times 10^{-7}$	Yang vd., 2005
AChE/CHOD/PEG/Pt	$5.0 \times 10^{-6}$ - $1.0 \times 10^{-4}$	$2.0 \times 10^{-7}$	Doretti vd., 2000
AChE-F127M/CHOD- F127M/Pt	$8.0 \times 10^{-6}$ - $8.0 \times 10^{-4}$	-	Shimomura vd., 2009
MWCNT/AuNP/CHOD (PDDA-AChE)/Pt	$5.0 \times 10^{-6}$ - $4.0 \times 10^{-4}$	$1.0 \times 10^{-6}$	Houa vd., 2012
AChE/CHOD/CPE (Biyosentri-voltammetri)	$5.0 \times 10^{-7}$ - $1.0 \times 10^{-5}$	$0.51 \times 10^{-7}$	Bu çalışma

Analitiksel karakteristik belirlendikten sonra ACh ve Ch belirlenmesi sentetik serum örneklerine uygulanmıştır. Sentetik serum örneği aşağıdaki adımlar izlenerek hazırlanmıştır.

- 140 mM NaCl 4,5 mM KCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,8 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM üre and 4,7 mM glukoz, 10 mM tris-HCl çözeltisinde hazırlanmıştır.
- Çözeltinin pH’ı derişik HCl kullanılarak 7,3’e ayarlanmıştır.

Standart ACh ve Ch çözeltileri sentetik serum örneğinde hazırlanmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda geri kazanım ACh için  $104,7 \pm 0.15$  (n=3), Ch için  $100,9 \pm 0.14$  (n=3) olarak hesaplanmıştır.

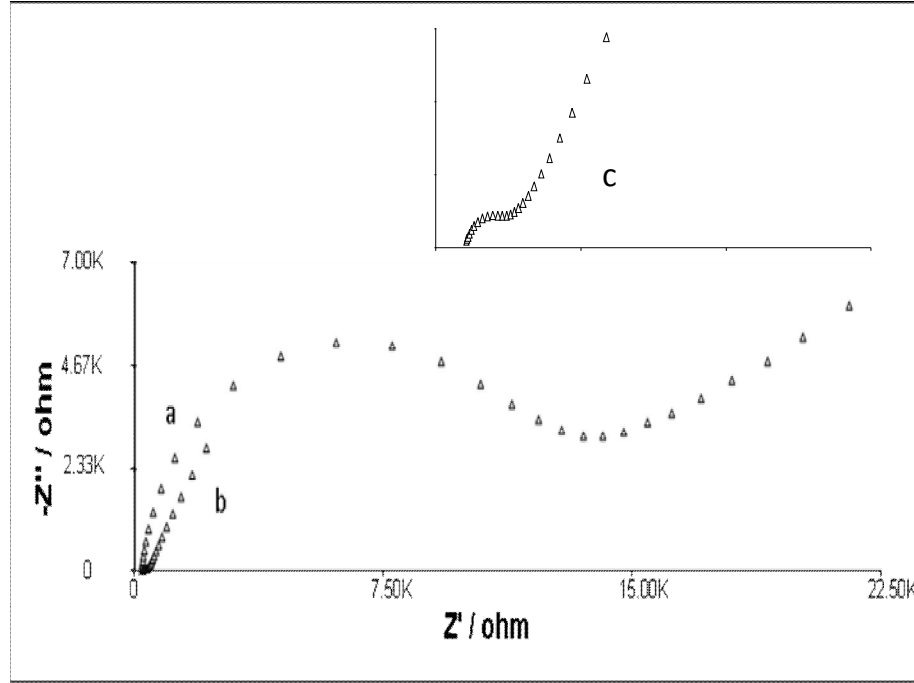
#### 4.5. Pestisit Tayini İçin AChE Tememli Biyosensör Sistemi

Organofosforlu pestisitler, zararlı böceklerle karşı sahip olduğu yüksek toksik özelliğinden dolayı tarımsal uygulamalarda çok fazla kullanılmıştır. Ancak organofosforlu pestisitlerin çevrede birikmesi sonra insan sağlığına, çevreye ve gıdalara karşı önemli riskler oluşturur (Arduini vd., 2006; Lin vd., 2006; Gan vd.,

2010). Bu yüzden organofosforlu pestisitlerin hızlı ve duyarlı olarak belirlenmesi büyük önem taşır. Bu bölümde, poly(allylamine hydrochloride) ve fonksiyonellendirilmiş MWCNT kullanılarak AChE temelli biyosensör oluşturulmuştur. Model organofosforlu pestisit olarak monokrotofos kullanılmıştır. Bu amaçla bölüm 2.4.3.2’de belirtildiği gibi hazırlanan AChE/PAH/f-MWCNT/CPE için kontrol ve optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

#### 4.5.1. EIS Çalışmaları

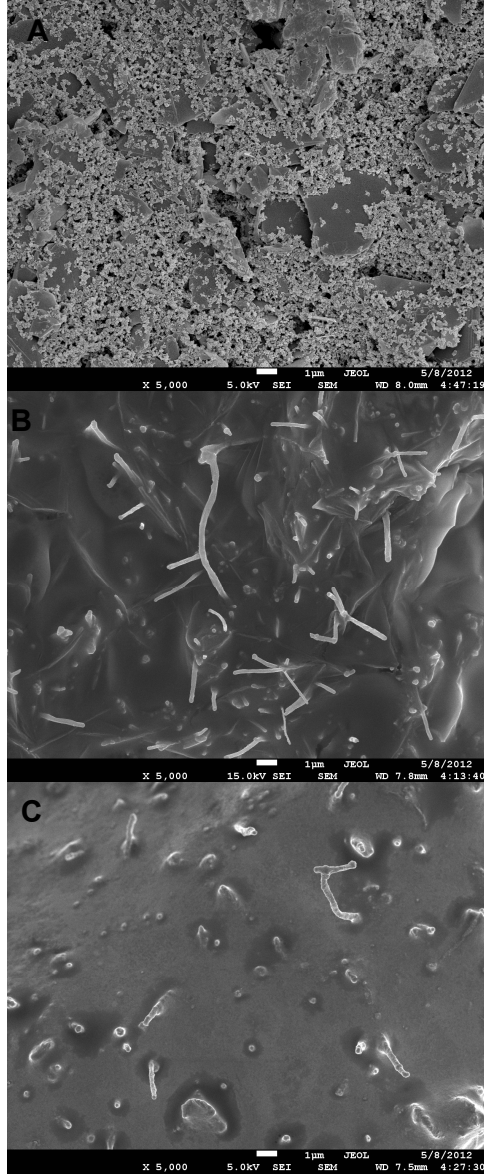
CPE, PAH/f-MWCNT/CPE, AChE/PAH/f-MWCNT/CPE için 5 mM  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  içeren fosfat tamponunda elde edilen Nyquistik diyagramlar Şekil 4.40’de verilmiştir. Şekil 4.40a’da açıkça görüldüğü gibi CPE için geniş bir yarı daire elde edilmiştir. PAH/f-MWCNT/CPE için aynı çalışma koşulları altında düz bir çizgi elde edilmiştir (Şekil 4.40b). Bu sonuç, çözelti ara yüzeyi ile elektrot arasında elektrot transferinin arttığını doğrulamıştır. PAH/f-MWCNT/CPEye AChE immobilize edildiğinde ise ara yüzey kalınlığının artmasından dolayı yarı daire çapında bir artış olmuştur (Şekil 4.40c).



Şekil 4.40. a) CPE, b) PAH/f-MWCNT/CPE, c) AChE/PAH/f-MWCNT/CPE için içeren 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,0) 0,18 V’da 0,01 Hz-10 kHz arasında elde edilen EIS Nyquistik diyagramları

#### 4.5.2. SEM Karakterizasyonu

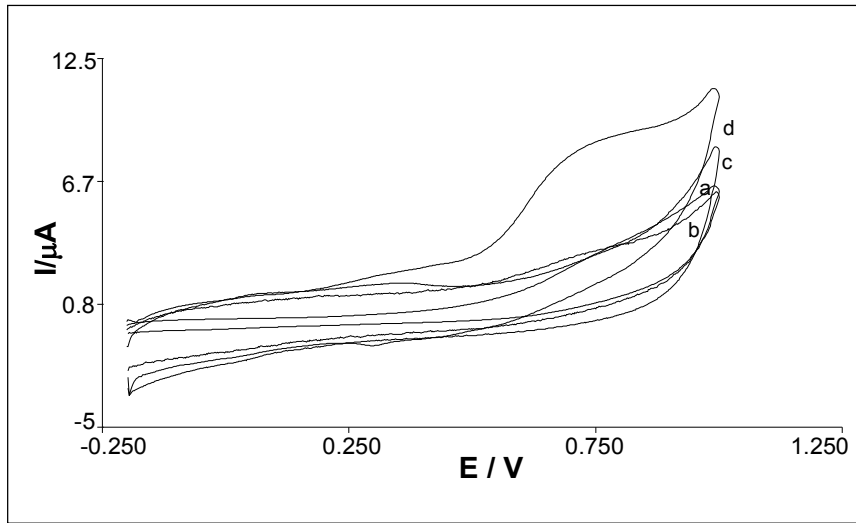
EIS çalışmalarından sonra SEM karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. A) SPE, B) PAH/f-MWCNT/SPE ve C) AChE/PAH/f-MWCNT/SPE için elde edilen SEM görüntüleri Şekil 4.41’de verilmiştir. PAH/f-MWCNT’nin homojen bir şekilde SPE üzerine yayıldığı Şekil 4.41B’den açıkça görülmüştür. AChE, PAH/f-MWCNT/SPE üzerine damlatıldıktan sonra yüzey görüntüsü tamamen değişmiştir (4.41C).



Şekil 4.41. a) SPE, b) PAH/f-MWCNT/SPE, c) AChE/PAH/f-MWCNT/SPE’nin SEM görüntüleri

#### 4.5.3. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE ile ATCh'n elektrokimyasal davranışı

CV çalışmaları, AChE/PAH/f-MWCNT/CPE, AChE/PAH/CPE ve AChE/CPE için ATCh içeren ve içermeyen 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,0) elektrokimyasal yanıtlarını karşılaştırmak için gerçekleştirilmiştir. 0,5 mM ATCh içeren fosfat tamponunda AChE/CPE küçük ve belirlemeyen tersinmez bir yükseltgenme piki göstermiştir(Şekil 4.42b). AChE/PAH/CPE için yukarıda verilmiş olan aynı koşullar altında bir pik elde edilememiştir (Şekil 4.42c). ATCh içermeyen fosfat tamponunda pik gözlenmemiştir (Şekil 4.42a). Bununla birlikte 0,5 mM ATCh varlığında 698 mV'da önemli bir yükseltgenme piki vermiştir. Bu pik AChE tarafından katalizlenen ATCh'n hidroliz ürünü olan tiyokolinin yükseltgenmesine ait piktir. Bu pik kendine has iletken özellikler ve katalitik davranışa sahip olan f-MWCNT'nin biyosensör yapısında olaması ile elde edilmiştir (Anık vd., 2010).

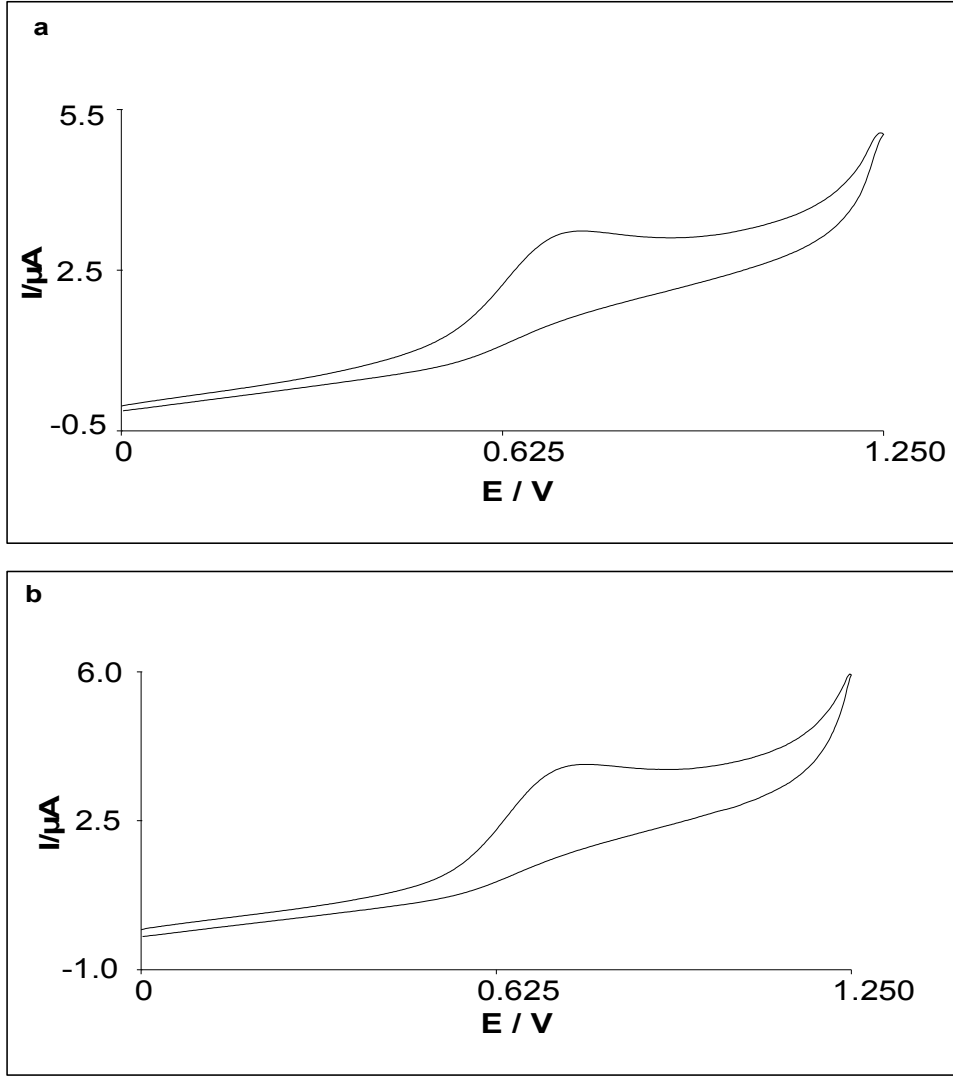


Şekil 4.42. a) AChE/PAH/f-MWCNT/CPE için 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,0); b) AChE/CPE, c) AChE/PAH/CPE d) AChE/PAH/f-MWCNT/CPE için 0,5 mM ATCh içeren 50 mM fosfat tamponunda 50 mV/s'de elde edilen CV voltammogramları

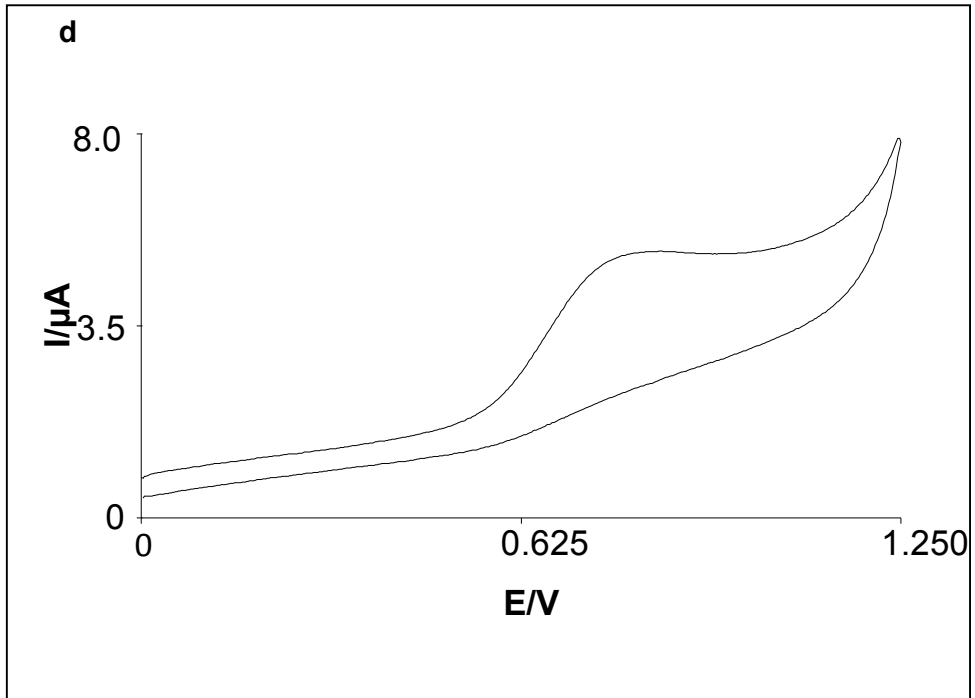
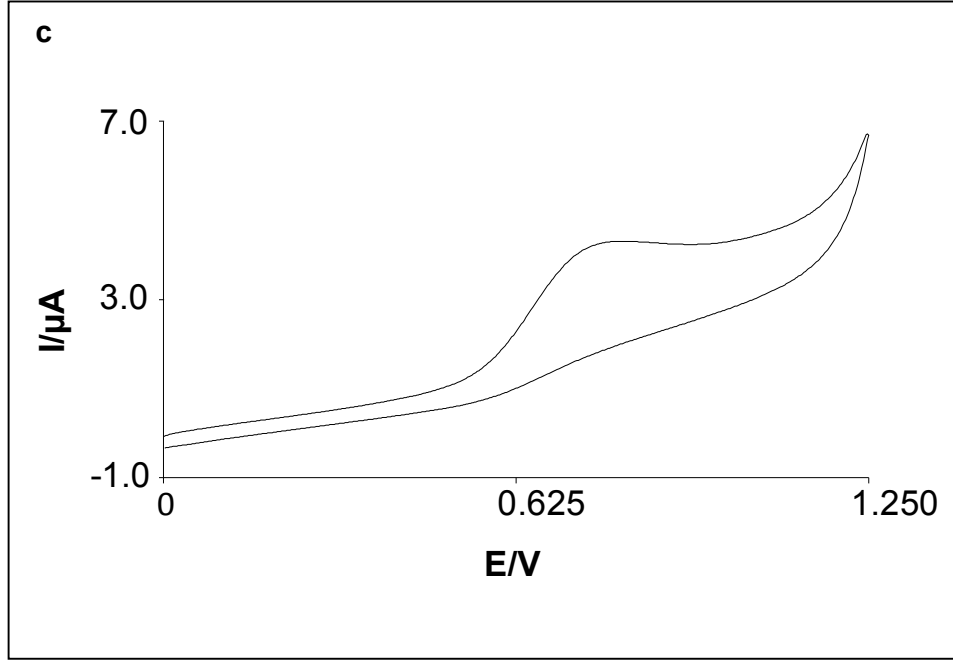
#### 4.5.4. Elektrokimyasal mekanizmanın incelenmesi

AChE/PAH/f-MWCNT/CPE için 0,5 mM ATCh içeren 50 M fosfat tamponunda (pH 7,0) değişik tarama hızlarında CV analizleri gerçekleştirilmiştir. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE için 0,5 mM ATCh ile elde edilen akım değerlerine karşı tarama hızının karekökü eğrileri oluşturularak reaksiyonun elektrokimyasal analizi yapılmıştır (Şekil 4.41, 4.42, 4.43, 4.44). Bunun sonucunda 10–1000 mVs<sup>-1</sup> arası

tarama hızının kareköküne karşı akımın doğrusal olarak değiştiği gözlenmiştir (Şekil 4.45). Böylelikle akımın yarı-sonsuz lineer difüzyon tarafından kontrol edildiğini söyleyebiliriz.

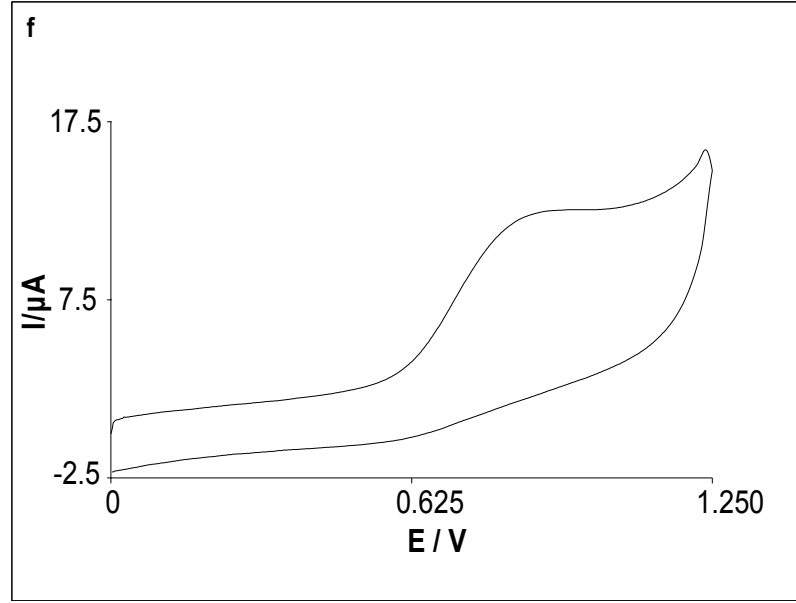
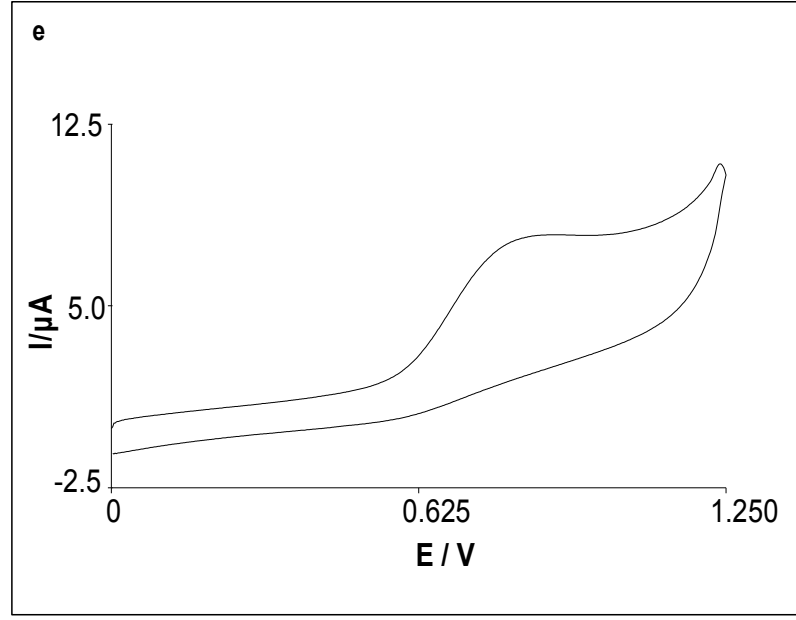


4.41. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE için a) 10, b) 25 mVs<sup>-1</sup> tarama hızlarında 0,5 mM ATCh'a ait döngüsel voltammogramlar; Deneysel koşullar: Potansiyel aralığı; 0 ile 1,25, destek elektrolit; 50 mM fosfat tamponunu (pH 7,0)

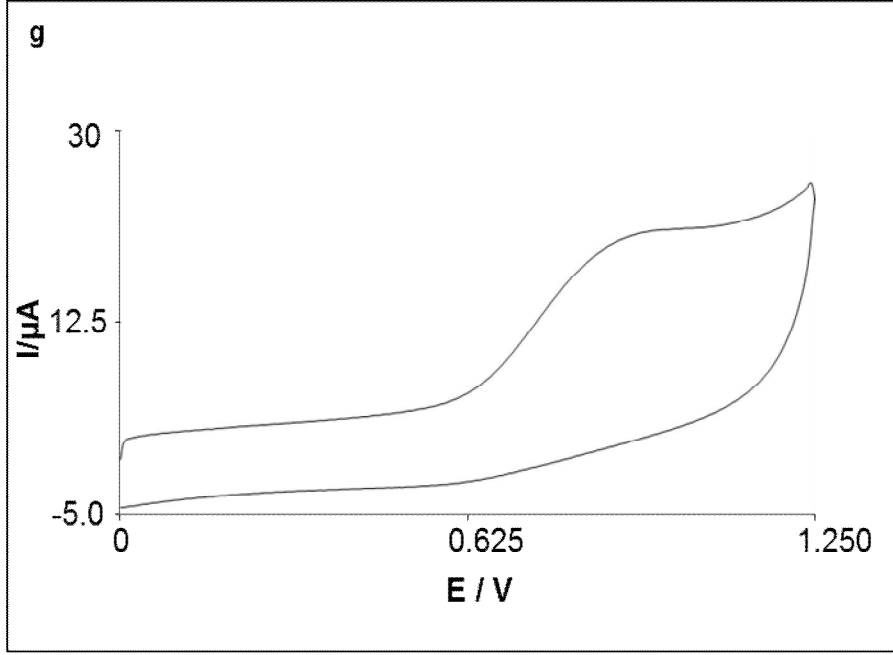


Şekil 4.42. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE için c) 50, d) 100 mVs<sup>-1</sup> tarama hızlarında 0,5 mM ATCh'a ait döngüsel voltammogramlar; Deneysel koşullar: Potansiyel aralığı; 0 ile 1,25 V, destek elektrolit; 50 mM fosfat tamponunu (pH 7,0)

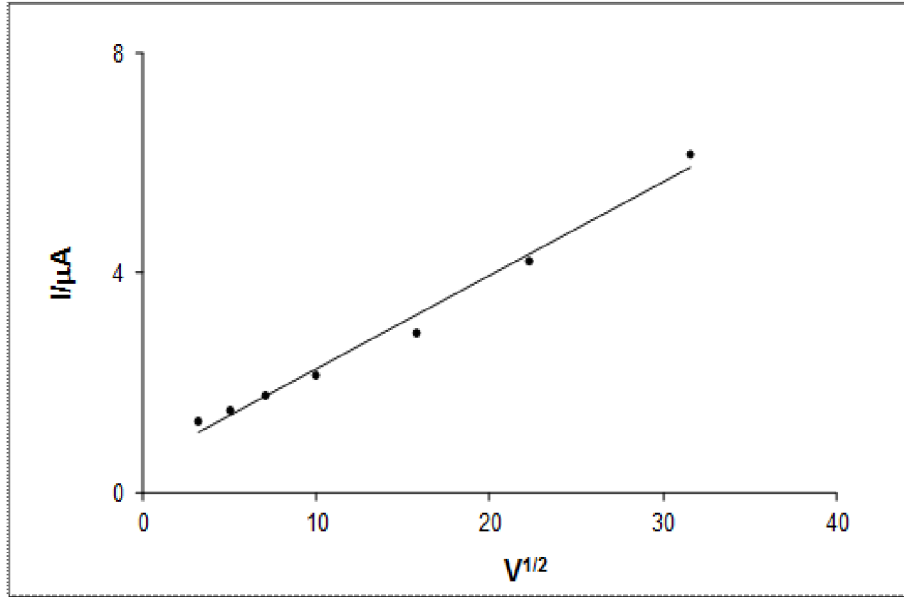




Şekil 4.43. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE için e) 250, f) 500 mVs<sup>-1</sup> tarama hızlarında 0,5 mM ATCh'a ait döngüsel voltammogramlar; Deneysel koşullar: Potansiyel aralığı; 0 ile 1,25 V, destek elektrolit; 50 mM fosfat tamponunu (pH 7,0)



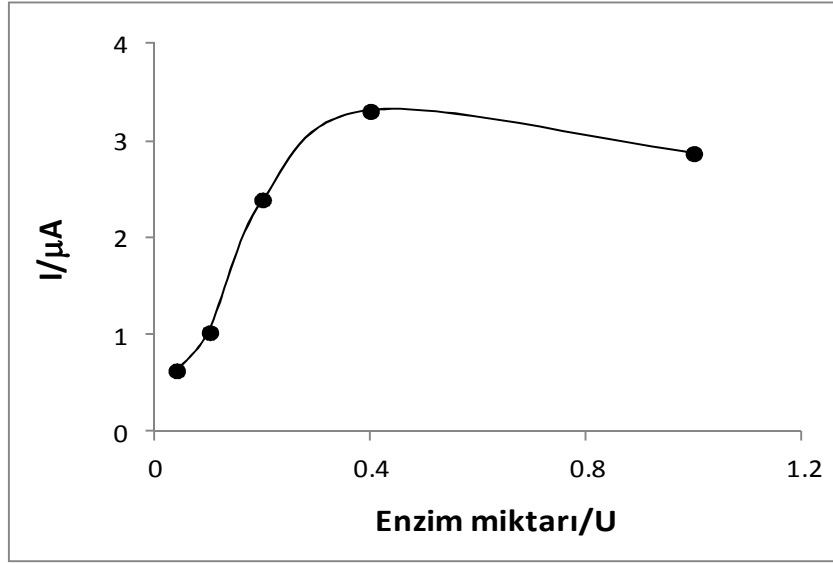
Şekil 4.44. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE için g)  $1000 \text{ mVs}^{-1}$  tarama hızında  $0,5 \text{ mM}$  ATCh'a ait döngüsel voltammogramlar; Deneysel koşullar: Potansiyel aralığı; 0 ile  $1,25 \text{ V}$ , destek elektrolit;  $50 \text{ mM}$  fosfat tamponunu ( $\text{pH } 7,0$ )



Şekil 4.45. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE için elde edilen tarama hızının kareköküne bağlı doğrusal grafik

#### 4.5.5. AChE miktarının etkisi

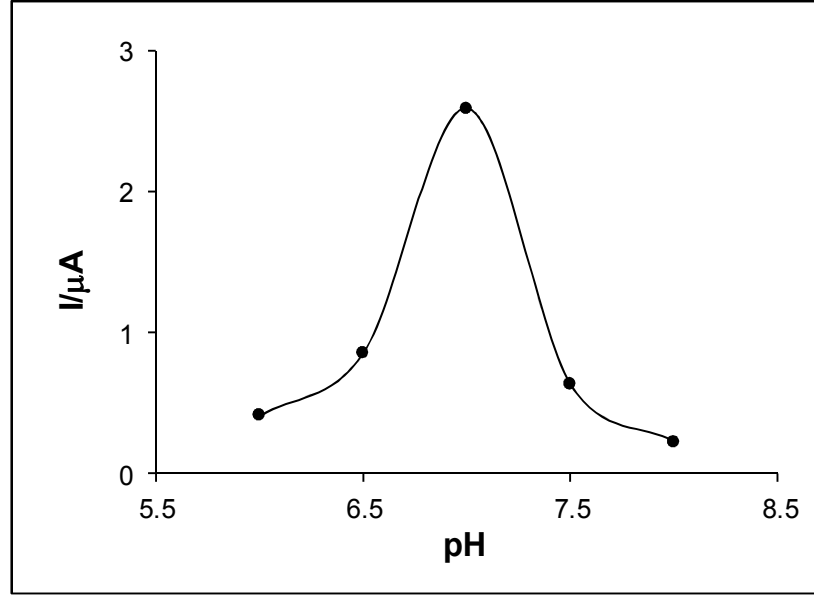
Elektrot yüzeyinde bulunan AChE miktarının etkisi biyosensör duyarlılığını etkileyen parametrelerden bir tanesidir. Bu amaçla 0,04-1 U arasında değişen AChE miktarları için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.46). Şekilden görüldüğü gibi akım değerlerinde 0,4 U miktarına kadar artış olmuştur. Bu miktardan sonra akım değerinde düşüş olmuştur. Bu düşüş, aynı zamanda difüzyon problemine neden olan yüksek miktarda protein miktarından dolayı elektrot pasivasyonundan kaynaklanabilir. Bundan dolayı bundan sonra yapılan çalışmalarda optimum AChE miktarı olarak 0,4 U kullanılmıştır.



Şekil 4.46. Elde edilen akım değerlerine AChE miktarının (0.04-1 U) etkisi. Deneysel koşullar: destek elektrolit; 50 mM fosfat tamponunu (pH 7,0), tarama hızı; 50 mVs<sup>-1</sup>, ATCh derişimi; 1 mM

#### 4.5.6. pH etkisi

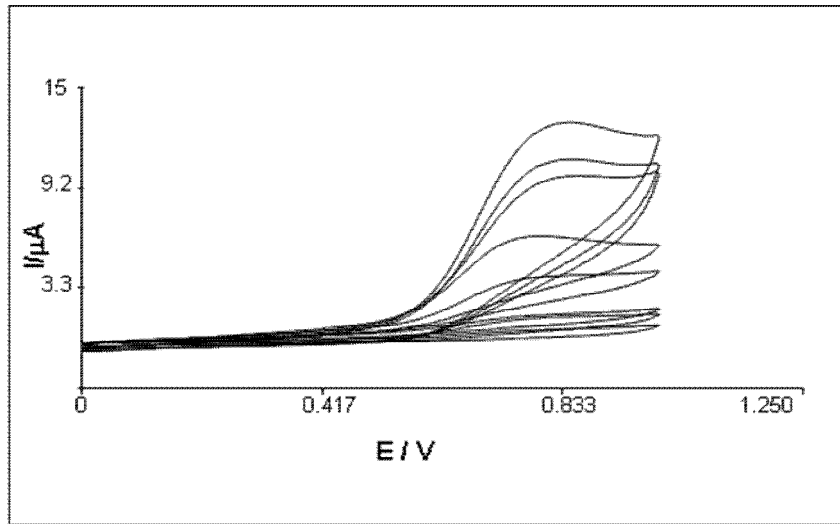
Destek elektrolit olarak kullanılan fosfat tomponunun (pH 7,0) biyosensör yanıtlarına etkisi incelenmiştir. Bunun için 0,5 birimlik artışlarla pH 6,0-8,0 değerlerinde 1 mM ATCh için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Şekil 4.47'den görüldüğü gibi pH 7,0 değerine kadar akım değerlerinde artış olduğu gözlenmiştir. pH 7,0 değerinden sonra düşüş olmuştur. Bundan dolayı bundan sonra yapılan çalışmalarda optimum pH olarak 7,0 kullanılmıştır.



Şekil 4.47. Biyosensör yanıtına pH etkisi. Deneysel koşullar: AChE miktarı; 0,4 U, tarama hızı;  $50 \text{ mVs}^{-1}$ , ATCh derişimi; 1 mM

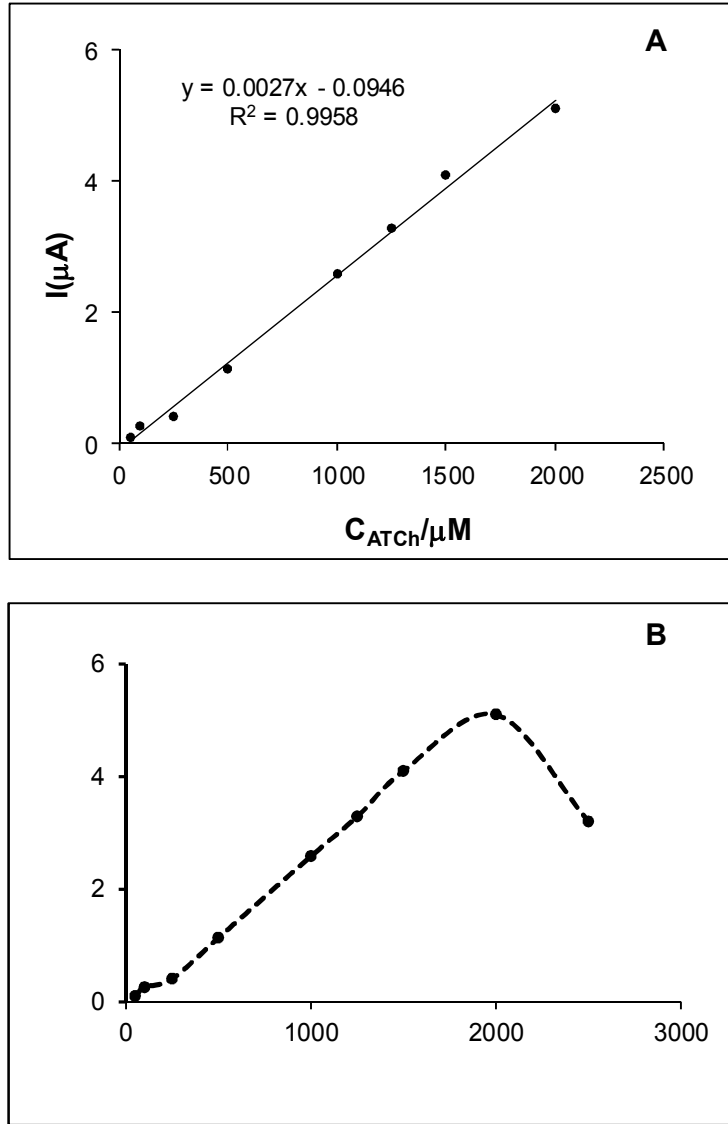
#### 4.5.7. ATCh için analitiksel karakteristik

Yukarıda belirtilen optimizasyon koşulları altında ATCh için analitiksel karakteristik çalışmaları yapılmıştır.  $5,0 \times 10^{-5}$  ile  $2,0 \times 10^{-3}$  M ATCh'ın artan derişimleri ile CV yanıtlarında doğrusal bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.48).



Şekil 4.48. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE ile  $5,0 \times 10^{-5}$ - $2,0 \times 10^{-3}$  M ATCh arasında elde edilen döngüsel voltammogramlar. Deneysel koşullar: AChE miktarı; 0,4 U, tarama hızı;  $50 \text{ mVs}^{-1}$ , destek elektrolit; 50 mM fosfat tamponunu (pH 7,0)

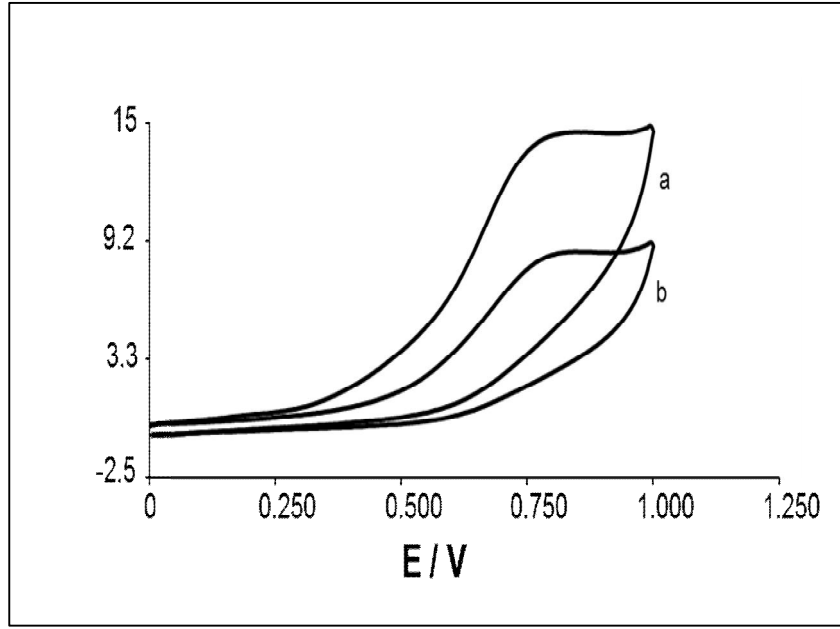
ATCh'ın artan derişimleri ile elde edilen akım değerleri arasında kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.  $5,0 \times 10^{-5}$  ile  $2,0 \times 10^{-3}$  M ATCh arasında  $R^2 = 0.9958$  değeri ile doğrusal bir aralık elde edilmiştir (şekil 4.49). Daha yksek derşimlerde doğrusallıktan sapmalar olmuştur. RSD değeri %3.49 (n=5) olarak bulunmuştur.



şekil 4.49. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE ile AChE için elde edilen kalibrasyon grafiği, B) Doğrusallıktan sapmayı gösteren grafik. Deneysel koşullar: AChE miktarı; 0,4 U, tarama hızı; 50 mVs<sup>-1</sup>, destek elektrolit; 50 mM fosfat tamponunu (pH 7,0)

#### 4.5.8. Monokrotofos belirlenmesi

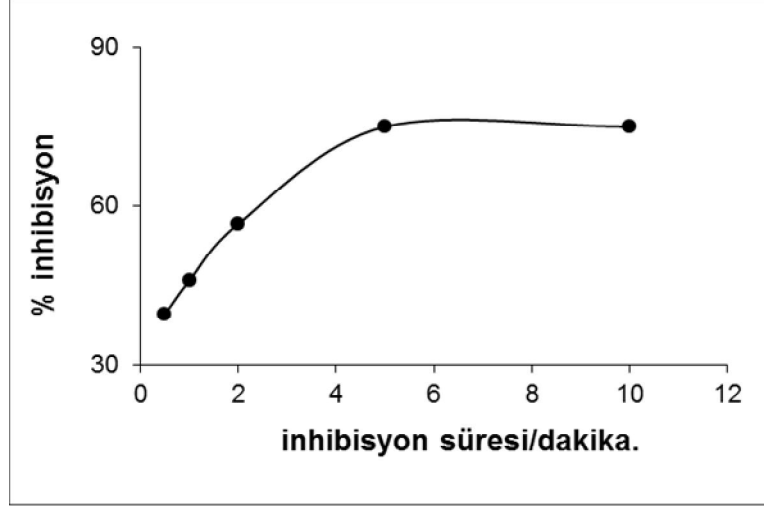
Şekil 4.50’de, AChE/PAH/f-MWCNT/CPE biyosensörünün 1 mM ATCh için 5 pg ml<sup>-1</sup> monokrotofos çözeltisi ile inkübasyonlu ve inkübasyonsuz elde edilen döngüsel voltammogramları verilmiştir. Şekil 5.48’den açıkça görüldüğü gibi monokrotofos ile 5 dakika inkübe edildikten sonra biyosensör yanıtında düşüş gözlenmiştir. Bu düşüş monokrotofosun AChE’nin aktif olan uçlarını inhibe etmesinden dolayı katalitik aktivitesini düşürmesine bağlanabilir (Liu vd., 2011).



Şekil 4.50. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE ile 1 M ATCh için a) monokrotofossuz, b) 5 dakika monokrotofosla inkübasyon sonucu elde edilen CV voltammogramları

#### 4.5.9. İnhibisyon süresinin etkisi

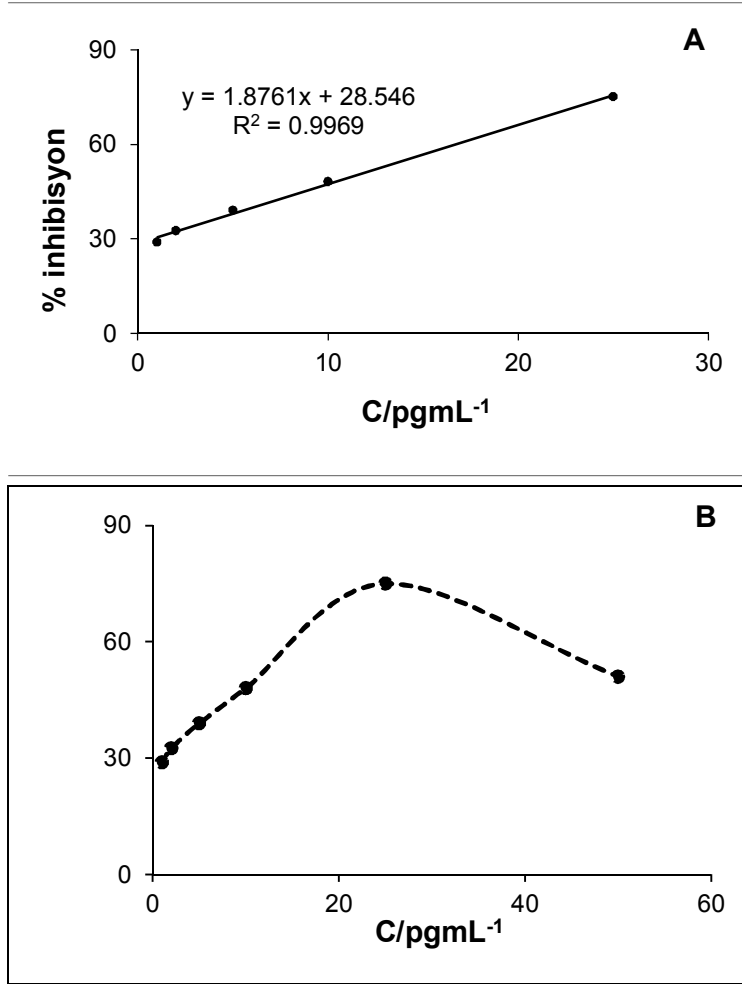
Pestisit belirlenmesinde inhibisyon süresi çok önemli bir parametredir. Bunun için 0,5 ile 10 dakika aralığında inhibisyon süresinin etkisi araştırılmıştır. Şekil 4.51’den görüldüğü gibi inhibisyon süresi arttıkça AChE için % inhibisyon değerlerinde artış gözlenmiştir. 5 dakikan sonra % inhibisyon değeri sabitlenmiştir. Maksimum % inhibisyon değeri %100 değildir. Bu durum AChE’de bulunan aktif uçlar ile monokrotofos arasında bir dengenin olmasından kaynaklanabilir (Wang vd., 2011). Bundan sonra ki çalışmalarda bu değer kullanılmıştır.



Şekil 4.51. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE yantlarına inhibisyon süresinin etkisi. Deneysel koşullar: AChE miktarı; 0,4 U, tarama hızı; 50 mVs<sup>-1</sup>, destek elektrolit; 50 mM fosfat tamponunu (pH 7,0), ATCh derişimi; 1 mM; monokrotofos derişimi; 25 pgml<sup>-1</sup>

#### 4.5.10. Monokrotofos analitiksel karakteristik

Yukarıda belirlenen optimum koşullar altında monokrotofos için analitiksel karakteristik çalışmaları yapılmıştır. Şekil 4.52’de görüldüğü gibi % inhibisyon ile monokrotofos derişimi arasında 1,0 pg ml<sup>-1</sup>’den to 25 pg ml<sup>-1</sup>’e kadar doğrusal bir ilişki elde edilmiştir. RSD değeri 3,16 (n=5) olarak hesaplanmıştır. LOD ve LOQ değerleri sırası ile 0,88 and 2,9 pg ml<sup>-1</sup>olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.52. % inhibisyon ile monokrotofos derişimi arasında elde edilen doğrusal ilişki, Doğrusallıktan sapmayı gösteren grafik. Deneysel koşullar: AChE miktarı; 0,4 U, tarama hızı; 50 mVs<sup>-1</sup>, destek elektrolit; 50 mM fosfat tamponunu (pH 7,0), ATCh derişimi; 1 mM; inhibisyon süresi; 5 dakika

Elde edilen doğrusal aralık ve LOD değerleri, AChE enzimi kullanılarak monokrotofos belirlenmesi için yapılan biyosensör çalışmaları ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.6).



**Çizelge 4.6. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE ile monokrotofos belirlenmesinin doğrusal aralık ve LOD açısından farklı AChE biyosensörleri ile karşılaştırılması**

Biosensor	Doğrusal Aralık	LOD	Referans
AChE/mesocellular silica foam/poli (vinil alkol)	0,05-10 ng/mL	0,05 ng/mL	Wu vd., 2011
AChE/silika sol- jel/CPE	50-950 ng/mL	47 ng/mL	Raghu vd., 2012
AChE/altın nanopartikül/sol- gel	0,01-1 and 2-15 µg/mL	0,6 ng/mL	Du vd., 2007
CdTe/ altın nanopartikül modifiye kitosan mikrokürecik	1-1000 ng/mL	0,3 ng/mL	Du vd., 2008
AChE/PAH/f- MWCNT/CPE	1-25 pg/mL	0,88 pg/mL	Bu çalışma

#### 4.5.11.AChE'nin aktivitesinin yenilenmesi ve örnek deneme

Biyosensör kullanımını sınırlandıran AChE inhibisyonu pratik uygulamalarda ciddi bir sorun oluşturur. AChE/PAH/f-MWCNT/CPE monokrotofos ile inhibe edildikten sonra 2-PAM gibi nükleofilik maddeler kullanılarak AChE enziminin tekrar aktivasyonu sağlanmıştır (Du vd., 2010). Bundan dolayı AChE/PAH/f-MWCNT/CPE, 2-PAM kullanılarak reaktivasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. AChE'nin aktivitesini yenileme çalışmaları 2-PAM kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elektrot, 5 pgml<sup>-1</sup> monokrotofos içeren 50 mM PBS (pH 7.0) çözeltisine 5 dakika daldırıldıktan sonra 1 mM ATCh için döngüsel voltammogramları kaydedilmiştir. Daha sonra AChE'nin tekrar aktivasyon için 5 dakika 2-PAM çözeltisine daldırılmış aşağıda verilen denklem kullanılarak tekrar aktivasyon değeri hesaplanmıştır.

$$\%R = \frac{I_r - I_{p,exp}}{I_{p,control} - I_{p,exp}} \times 100 \quad 4.1$$

Bu denklemde  $I_r$ , 2-PAM çözeltisine daldırıldıktan sonra AChE/PAH/f-MWCNT/CPE ile ATCh için elde edilen akım değeridir. Elde edilen sonuçlardan biyosensörün orijinal yanıtının %95'inin geri kazanıldığı hesaplanmıştır.

Geliştirilen biyosensör, çeşme suyu, maden suyu, domates ve üzüm örneklerinde standart katma metodu kullanılarak monokrotofos belirlenmesine uygulanmıştır. Örnekler, 2.5.4'de verildiği gibi hazırlanmıştır. Elde edilen geri kazanım değerleri Çizelge 4.7'de verilmiştir. Domates ve üzüm örneklerinde sırasıyla %2,5 ve %32,8 matriks etkisi bulunmuştur. Bu etkiler, monokrotofos ile elde edilen değerden matriks etkisi ile elde edilenlerden çıkarılması ile giderildi. Matriks etkileri ortam koşullarının denatüre olması ya da askorbik asit varlığından kaynaklanmış olabilir (Raghu vd., 2012). Bununla birlikte domates ve üzüm örneklerinde monokrotofos katımı olmadan oluşan inhibisyonu bu örneklerde daha önceden kullanılan monokrotofos ya da diğer pestisitlerden kaynaklanabilir.

**Çizelge 4.7. Farklı örneklerde monokrotofos belirlenmesi için elde edilen geri kazanım değerleri**

Örnek	Monokrotofosuz % inhibisyon	Monokrotofos ile % inhibisyon
Çeşme suyu	0	98.3
Maden suyu	0	100.75
Domates	2.5	98.5
Üzüm	32.8	101

#### 4.6. Sonuç

Bu doktora tezinin ilk bölümünde GCE üzerine modifiye edilen Au film ile ATCh tayini gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullar belirlendikten sonra ATCh için analitiksel karakteristik çalışmaları yapılmıştır.

Doktora tezinin ikinci bölümünde biyosentri-voltammetrik X tayini gerçekleştirilmiştir. Bunun için Şekil 3.4'de verilen biyosentri-voltammetrik hücrenin alt kısmında bulunan Pt elektrot üzerine XO enzimi glutaldehit kullanılarak

immobilize edilmiştir. Santrifüj hızı, santrifüj süresi ve enzim miktarı optimize edilmiştir. Elde edilen optimum koşullar altında X için analitiksel karakteristik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Biyosentri-voltammetrik yöntem, şarap örneğinde X tayinine uygulanmış ve iyi geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

Üçüncü bölümde ATCh tayini AChE aktivitesini tayin etmek için gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon süresi, santrifüj hızı, santrifüj süresi ve enzim miktarı gibi deneysel parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra ATCh için analitiksel karakteristik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Biyosentri-voltammetri yöntemi, AChE inhibisyon çalışması için Alzheimer hastalığında kullanılan Neurem (Donepezil HCl, 5 mg) ilacına uygulanmıştır.

Doktora tezinin dördüncü bölümünde ACh'nin biyosentri-voltammetri tayini gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla AChE ve CHOD enzimleri kullanılarak biyosensör sistemi oluşturulmuştur. Bunun için reaksiyon süresi, pH, AChE ve CHOD miktarları, santrifüj süresi ve santrifüj hızı gibi parametreler optimize edilmiştir. Optimize edilen koşullar altında ACh ve Ch için analitiksel karakteristik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan biyosensör Ch tayinine de uygulanmıştır. Bununla birlikte ACh tayinine biyosentri-voltammetrinin etkisinin anlaşılması için santrifüj parametreleri kullanılmaksızın ACh için bir doğrusal aralık oluşturulmuştur. Yöntem, sentetik serum örneklerinde ACh ve Ch belirlenmesine uyarlanmıştır.

Son kısımda ise MWCNT kullanılarak AChE temelli biyosensör sistemi oluşturulmuştur. Bu amaçla MWCNT, HNO<sub>3</sub> ile muamele edilmiştir.. Katyonik bir polielektrolit kullanılarak PAH kullanılarak CPE üzerine film oluşturulmuştur. AChE ve pH parametreleri optimize edildikten sonra ATCh için analitiksel karakteristik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen biyosensör sistemi monokrotofos tayinine uygulanmıştır. Pestisit tayininde önemli bir parametre olan inhibisyon süresi optimize edildikten sonra monokrotofos için analitiksel karakteristik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Biyosensör sistemi, çeşme suyu ve maden suyunda, domates ve üzüm örneklerine uygulanmış ve iyi geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Alexander, P.W., Rechnitz, G.A. (2000) Enzyme inhibition assays with an amperometric glucose biosensor based on thiolate self-assembled monolayer. *Electroanal*, 12:343–350.
- Andreescu, S. ve Sadik, O.A. (2004) *Trends And Challenges İn Biochemical Sensors For Clinical And Environmental Monitoring*, *Pure Appl Chem*, 76:86-878.
- Andreescu, S. ve Marty, J.L. (2006) Twenty years research in cholinesterase biosensors: from basic research to practical applications, *Biomol Eng*, 23:1–15.
- Andreescu, S., Bucur, B. and Marty, J.-L. (2006) *Affinity immobilization of tagged enzymes. In Immobilization of Enzymes and Cells*, Second edition (J.M. Guisan, ed.). Series: Methods in Biotechnology. Humana Press (ISBN 1-58829-290-8) pp. 97–106.
- Andreescu, S., Njagi, John. ve Ispas, C. (2008) *Nanostructured Materials For Enzyme İmmobilization And Biosensors*, 355-394, Erokhin, V., Ram, M.K. ve Yavuz O. (editörler), *The New Frontiers of Organic and Composite Nanotechnology*, Elsevier, USA, 504s.
- Anık, Ü., Çevik, S. ve Pumera, M. (2010) Effect of Nitric Acid “Washing” Procedure on Electrochemical Behavior of Carbon Nanotubes and Glassy Carbon  $\mu$ -Particles, *Nanoscale Res Let*, 5:846-852.
- Anık, U. (2012) Elektrokimyasal Biyosensörler, *Biyosensörler: Metodlar, Uygulamalar ve Son Gelişmeler*, 25 Haziran-01 Temmuz, Bodrum, Muğla, Ege Üniversitesi Basımevi, No: 5, 226s.
- Anık, U. (2013) Centri-voltammetry/Biocentri-voltammetry: A review, *Microchim Acta*, in press.
- Aminea, A., Mohammadi, H., Bourais, I., Paleschi, G. (2006) Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring, *Biosens Bioelectron*, 21:1405-1423.

- Arduini, F., Ricci, F., Tuta, C.S., Moscone, D., Amine, A. ve Palleschi, G. (2006) Detection of carbamic and organophosphorous pesticides in water samples using a cholinesterase biosensor based on Prussian Blue-modified screen-printed electrode, *Anal Chim Acta*, 580:155–162.
- Arslan, F., Yaşar, A. ve Kilic, E. (2006) An amperometric biosensor for xanthine determination prepared xanthine oxidase immobilized in polypyrrole film, *Artif Cells Blood Subst Biotechnol* 34:113-128.
- Banks, C. E.; Crossley, A.; Salter, C.; Wilkins, S. J. ve Compton, R. G. (2006) Carbon Nanotubes Contain Metal Impurities Which Are Responsible for the “Electrocatalysis” Seen at Some Nanotube-Modified Electrodes, *Angew Chem., Int Ed*, 45:2533-2537.
- Bernstein, E.R. (1990) *Atomic and Molecular Clusters*, Elsevier Science B.V., New York, USA, 806s.
- Bonanni, A., Loo, A.H. ve Pumera M. (2012) Graphene for impedimetric biosensing, *Trends Anal Chem*, 37:12-21.
- Cesarino, I., Moraes, F.C. ve Machado, S.A.S. (2011) A Biosensor Based on Polyaniline-Carbon Nanotube Core-Shell for Electrochemical Detection of Pesticides, *Electroanal*, 23:2586-2593.
- Chen, S., Yuan, R., Chai, Y., Xu, Y., Min, L. ve Li, N. (2008) A new antibody immobilization technique based on organic polymers protected Prussian blue nanoparticles and gold colloidal nanoparticles for amperometric immunosensors, *Sens Actuators B*, 135:236–244.
- Chena, X., Zhua, J., Chena, Z., Xua, C., Wang, Y. ve Yao, C. (2011) A novel bienzyme glucose biosensor based on three-layer Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> magnetic nanocomposite, *Sens Actuators B* 159:220– 228.
- Colbert, T.D., Zhang, J., McClure, M.S., Nikolaev, P., Chen, Z., Hafner, H.J., Owens, W.D., Kotula, G.P., Carter, B.C., Weaver, H.J., Rinzler, G.A. ve Smalley E.R. (1994) Growth and sintering of fullerene nanotubes, *Science* 266:1218-1222.
- Copeland, R.A. (2000) *Enzymes*, John Wiley & Sons VCH, New York, 412s.

- Cosnier, S. (2005) Affinity biosensors based on electropolymerized films, *Electroanal*, 17:1701–1715.
- Cosnier, S., Mousty, C., Gondran, C. ve Lepellec A. (2006) Entrapment of enzyme within organic and inorganic materials for biosensor applications: Comparative study, *Mater Sci Eng C*, 26:442–447.
- Cubukcu, M., Timur, S. ve Anik, U. (2007) Examination of performance of glassy carbon paste electrode modified with gold nanoparticle and xanthine oxidase for xanthine and hypoxanthine detection, *Talanta*, 74:434–439.
- Çubukcu, M. (2008) *Nanokompozitler Ve Elektrokimyasal Biyosensör Uygulamaları* (Yüksek Lisans), Muğla Üniversitesi, Muğla, 89 s.
- Dai, X., Wildgoose, G.G., ve Compton, R.G. (2006) Apparent ‘electrocatalytic’ activity of multiwalled carbon nanotubes in the detection of the anaesthetic halothane occluded copper nanoparticles, *Analyst*, 131:901–906.
- Daniel, S., Rao, P.T., Rao, S.K., Rani, U.S., Naidu, G.R.K., Lee, H. ve Kawai, T. (2007) A review of DNA functionalized/grafted carbon nanotubes and their characterization, *Sens Actuators B* 122:672–682.
- De Melo, J.V., Cosnier, S., Mousty, S., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N. (2002) Urea biosensors based on immobilization of urease into two oppositely charged clays (laponite and Zn–Al layered double hydroxides), *Anal Chem* 74:4037–4043.
- Devi, R., Thakur, M. ve Pundir, C.S. (2011) Construction and application of an amperometric xanthine biosensor based on zinc oxide nanoparticles–polypyrrole composite film, *Biosens Bioelectron*, 26:3420–3426.
- Devi, R., Yadav, S. ve Pundir, C.S. (2012) Au-colloids–polypyrrole nanocomposite film based xanthine biosensor, *Colloid Surfaces Physicochem Eng Aspect*, 394:38–45.
- Dodevska, T., Horozova, E. ve Dimcheva, N. (2010) Design of an amperometric xanthine biosensor based on a graphite transducer patterned with noble metal microparticles, *Cent Eur J Chem*, 8:19–27.

- Du, D., Chen, S., Cai, J. ve Zhang, A. (2007) Immobilization of acetylcholinesterase on gold nanoparticles embedded in sol-gel film for amperometric detection of organophosphorous insecticide, *Biosens Bioelectron*, 23:130-134.
- Du, D., Chen, S., Song, D., Li, H. ve Chen, X. (2008) Development of acetylcholinesterase biosensor based on CdTe quantum dots/gold nanoparticles modified chitosan microspheres interface, *Biosens Bioelectron*, 24:475-479.
- Dua, D., Ye, X., Cai, Ji., Liu, J. ve Zhang A. (2010) Acetylcholinesterase biosensor design based on carbon nanotube-encapsulated polypyrrole and polyaniline copolymer for amperometric detection of organophosphates, *Biosens Bioelectron*, 25:2503–2508.
- Duana, X., Ma, F., Yuan, Z., Chang, L. ve Jin X. (2012) Lauryl benzene sulfonic acid sodium-carbon nanotube-modified PbO<sub>2</sub> electrode for the degradation of 4-chlorophenol, *Electrochim Acta*, 76:333– 343.
- Eigler, M.D. ve Schweizer, E.K. (1990) Positioning single atoms with a scanning tunnelling microscope, *Nature*, 344 524–526.
- Emerich, D.F. ve Thanos, C.G. (2003) Nanotechnology and medicine, *Expert Opin Biol Ther*, 3:655 -663.
- Gan, N., Yang X., Xie D., Wu Y. ve Wen Wç (2010) A Disposable Organophosphorus Pesticides Enzyme Biosensor Based on Magnetic Composite Nano-Particles Modified Screen Printed Carbon Electrode, *Sensors*, 10: 625-638.
- Gao, Y., Shen, C., Di, J. ve Tu, Y. (2009) Fabrication of amperometric xanthine biosensors based on direct chemistry of xanthine oxidase, *Mater Scien Eng*, 29:2213–2216.
- Gerard, M., Chaubey, A. ve Malhotra, B.D. (2002) Application of conducting polymers to biosensors, *Biosens Bioelectron*, 5:345-359.
- Gooding, J.J. ve Hibbert, D.B. (1999) The application of alkanethiol selfassembled monolayers to enzyme electrodes, *Trends Anal Chem*, 18:525-533.

- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J. ve Reimhult, E. (2008) Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures, *Sensors*, 8:1400-1458.
- Guerrieri, A., Monaci, L., Quinto, M., Palmisano, F., (2002) A disposable amperometric biosensor for rapid screening of anticholinesterase activity in soil extracts, *Analyst*, 127:5-7.
- Guilbault, G.G. ve Lubrano, G.L. (1973) An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose, *Anal Chim Acta*, 64:439-455.
- Gulla, K.C., Gouda, M.D., Thakur, M.S. ve Karanth, N.G. (2002) Reactivation of immobilized acetylcholinesterase in an amperometric biosensor for organophosphorus pesticide, *Biochim Biophys Acta*, 1597:133-139.
- Guo, J., Goasguen, S., Lundstrom, M. ve Datta S. (2002) Metal-insulator-semiconductor electrostatics of carbon nanotubes, *Appl Phys Lett*, 81:1486-1488.
- Fenik, J., Tankiewicz, M. ve Biziuk, M. (2011) Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables, *Trends Anal Chem*, 30:814-826.
- Fernandez-Sanchez, C., McNeil, J.C. ve Rawson, K. (2005) Electrochemical impedance spectroscopy studies of polymer degradation: application to biosensor development, *Trends Anal Chem*, 24:37-48.
- Hajšlová, J. ve Zrostlíková J. (2003) Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices, *J Chromatogr A*, 1000:181-197.
- Han, S., Zhu, M., Yuan, Z., Li, X. (2001) A methylene blue-mediated enzyme electrode for the determination of trace mercury(II), mercury(I), methylmercury, and mercury-glutathione complex, *Biosens Bioelectron*, 16:9-16.
- Hou, S., Ou, Z., Chen, Q. ve Wu, B. (2012) Amperometric acetylcholine biosensor based on self-assembly of goldnanoparticles and acetylcholinesterase on the sol-gel/multi-walled carbon nanotubes/choline oxidase composite-modified platinum electrode, *Biosens Bioelectron*, 33:44-49.



- Iijima, S. ve Ichihashi, T. (1993) Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter, *Nature*, 363:603-605.
- Ion, A.C., Ion, I., Culetu, A., Gherase, D., Moldovan, C.A., Iosub, R. ve Dinescu, A. (2010) Acetylcholinesterase voltammetric biosensors based on carbon nanostructure-chitosan composite material for organophosphate pesticides *Mater Sci Eng C*, 30:817-821.
- Ivanov, A., Evtugyn, G., Budnikov, H.C., Ricci, F., Moscone, D., Palleschi, G. (2003) Cholinesterase sensors based on screen-printed electrode for detection of organophosphorus and carbamic pesticides, *Anal Bioanal Chem*, 377:624–631.
- Jaffrezic-Renault, Nicole (2001) New Trends in Biosensors for Organophosphorus Pesticides, *Sensors*, 1:60-74.
- Jokanović, M. (2001) Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides, *Toxicology Letters*, 190:107–115.
- Jokanović, M. (2009) Biotransformation of organophosphorus compounds, *Toxicology*, 166:139–160.
- Khan, A. ve Ghani, A.S. (2011) Multienzyme microbiosensor based on electropolymerized o-phenylenediamine for simultaneous in vitro determination of acetylcholine and choline, *Biosens Bioelectron*, 31:433–438.
- Kirgöz, Ü.A., Tural, H. ve Ertas, F.N. (2004), A New Procedure for Voltammetric Lead Determination Based on Coprecipitation and Centrifugation Preconcentration, *Electroanal*, 16:765-768.
- Kirgöz, Ü.A., Tural, H. ve Ertas, F.N. (2005) Centri-voltammetric study with amberlite XAD-7 resin as a carrier system, *Talanta*, 65:48–53.
- Koç, M.B. (2003) *Nanotüpler*, (Bitirme Tezi), Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Koçak, S. ve Ertas F.N. (2013) Centri-voltammetric determination of molybdenum, *Anal. Methods*, 5:741-747.

- Krawczyk, T.K., Moszezynska, M., Trojanowicz, M. (2000) Inhibitive determination of mercury and other metal ions by potentiometric urease biosensor, *Biosens Bioelectron*, 15:681–691.
- Kuswandi, B. (2003) Simple optical fibre biosensor based on immobilized enzyme for monitoring of trace heavy metal ions, *Anal Bioanal Chem*, 376:1104–1110.
- Lee, M.M., Russel, D.A. (2003) Novel determination of cadmium ions using an enzyme self assembled monolayer with surface plasmon resonance, *Anal Chim Acta*, 500:119–125.
- Lin, T., Huang K. ve Liu C. (2006) Determination of organophosphorous pesticides by a novel biosensor based on localized surface plasmon resonance, *Biosens Bioelectron*, 22:513-518.
- Liu, T., Su, H., Qu, X., Ju, P., Cui, L. ve Ai, S. (2011) Acetylcholinesterase biosensor based on 3-carboxyphenylboronic acid/reduced graphene oxide–gold nanocomposites modified electrode for amperometric detection of organophosphorus and carbamate pesticides, *Sens Actuators B*, 160:1255–1261.
- Marinov, I., Ivanov, Y., Gabrovska, K. ve Godjevargova, T. (2010) Amperometric acetylthiocholine sensor based on acetylcholinesterase immobilized on nanostructured polymer membrane containing gold nanoparticles, *J Mol Catal B Enzym*, 62:66-74.
- Merkoci, A., Pumera, M., Llopis, X., Perez, B., del Valle, M. ve Alegret S. (2005) New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes, *Trends in Anal Chem*, 24:826-838.
- Moreno, F.J.L., Liébanas, A.F.J., Frenich, G.A. ve Vidal, M.J.L. (2006) Evaluation of different sample treatments for determining pesticide residues in fat vegetable matrices like avocado by low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1111-97-105.
- Mourzina, I.G., Yoshinobu, T., Ermolenko, Y.E., Vlasov, Y.G., Schoning, M.J., Iwasaki, H. (2004) Immobilization of urease and cholinesterase on the surface of semiconductor transducer for the development of light-addressable potentiometric sensors, *Microchim Acta*, 144:41–50.

- Nenkova, R., Ivanova, D., Vladimirova, J. ve Godjevargova, T. (2010) New amperometric glucose biosensor based on cross-linking of glucose oxidase on silica gel/multiwalled carbon nanotubes/polyacrylonitrile nanocomposite film, *Sens Actuators B* 148:59–65.
- Niwa, O., Horiuchi, T., Kurita, R. ve Torimitsu, K. (1998) On-Line electrochemical sensor for selective continuous measurement of acetylcholine in cultured brain tissue, *Anal Chem*, 70:1126-1132.
- Noyan, A., (1989) *Fizyoloji*, Ankara Üniversitesi Basımevi, 1157 s.
- Raghu, P., Swamy, B.E.K, Reddy, T.M., Chandrashekar, B.N. ve Reddaiah K. (2012) Sol-gel immobilized biosensor for the detection of organophosphorous pesticides: A voltammetric method, *Bioelectrochem*, 83:19-24.
- Rao, R.R. ve Chatt, A. (1993) Preconcentration neutron activation analysis of trace elements in seawater by coprecipitation with 1-(2-thiazolylazo)-2-naphthol, pyrrolidinedithiocarbamate and N-nitroso-phenylhydroxylamine, *Journ of Radional and Nucl Chem*, 168:439-448.
- Özdemir Ç. (2010) *Farklı Nanomalzemeler İle Glukoz Biyosensörlerinin Hazırlanması Ve Uygulama Potansiyellerinin Araştırılması*, (Yüksek Lisans), Ege Üniversitesi, İzmir, 69 Sayfa.
- Öztürk, G., Alp, S. ve Timur, S. (2007) A fluorescent biosensor based on acetylcholinesterase and 5-oxazolone derivative immobilized in polyvinylchloride (PVC) matrix, *J Mol Catal B Enzym*, 47:111-116.
- Öztürk, G., Alp, S. ve Timur, S. (2008) Photophysical characterization of fluorescent oxazol-5-one derivatives in PVC and their application as biosensors in the detection of ACh and AChE inhibitor: Donepezil, *Dyes Pigm*, 76:792-798.
- Pei, J. ve Li, X. (2000) Xanthine and hypoxanthine sensors based on xanthine oxidase immobilized on a CuPtCl<sub>6</sub> chemically modified electrode and liquid chromatography electrochemical detection, *Anal Chim Acta*, 414:205–213.
- Pirvutoiu, S., Estera, D., Bhand, S., Ciucu, A., Magearu, V., Danielsson, B. (2002) Application of the enzyme thermistor for determination of mercury and other heavy metals using free and immobilised alcohol oxidase, *Roum Biotechnol Lett*, 7, 975-980.

- Pumera M. (2007) Carbon Nanotubes Contain Residual Metal Catalyst Nanoparticles after Washing with Nitric Acid at Elevated Temperature Because These Metal Nanoparticles Are Sheathed by Several Graphene Sheets, *Langmuir*, 23:6453-6458.
- Radi, R., Tan, S., Prodanov, E., Evans, R.A. ve Parks D. (1992) Inhibition of xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical production, *Biochim Biophys Acta Prot Struct Mol Enzymol*, 1122:178–182.
- Rao, R.N.C., Sen, R., B.C. Satishkumar, C.B. ve Govindaraj, A. (1998) Large aligned-nanotube bundles from ferrocene pyrolysis, *Chem Commun*, 15:1525-1526.
- Ronkainen, J.N., Halsallb, H.B. ve Heineman, W.R. (2010) Electrochemical biosensors, *Chem Soc Rev*, 39:1747–1763.
- Sartori, E.R., Takeda, H.H. ve Fatibello-Filho, O. (2011) Glassy Carbon Electrode Modified with Functionalized Carbon Nanotubes Within a Poly(allylamine hydrochloride) Film for the Voltammetric Determination of Sulfite in Foods, *Electroanal*, 23: 2526 – 2533.
- Sartori, E.R. ve Fatibello-Filho, O. (2012) Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid and sulfite in beverages employing a glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes within a poly(allylamine hydrochloride) film, *Electroanal*, 24: 627 – 634.
- Scouten, W.H., Luong, J.H.T. ve Brown, R.S. (1995) Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensors design, *Tibtech*, 13:178–185.
- Shervedani, R.K., Mehrjardi, A.H. ve Zamiri N. (2006) A novel method for glucose determination based on electrochemical impedance spectroscopy using glucose oxidase self-assembled biosensor, *Bioelectrochem*, 69:201–208.
- Simonian, A.L., Efremenko, E.N. ve Wild, J.R. (2001) Discriminative detection of neurotoxins in multi-component samples, *Anal Chim Acta* 444:179–186.
- Snape, M.F., Misra, A., Murray, T.K., De Souza, R.J., Williams, J.L., Cross, A.J. ve Green, A.R. (1999) A comparative study in rats of the in vitro and in vivo pharmacology of the acetylcholinesterase inhibitors tacrine, donepezil and NXX-066, *Neuropharma*, 38: 181-193.

- Stronga, L.K., Anderson, P.D, Lafdi, K. ve John, N.K. (2003) Purification process for single-wall carbon nanotubes, *Carbon*, 41:1477–1488.
- Subramani, K. ve Ahmed, W. (2012) Nanotechnology and the Future of Dentistry, 1-14, Subramani, K., Ahmed, W. (editörler), *Emerging Nanotechnologies in Dentistry*, Elsevier, USA, 410s.
- Sun, Z.Z., Yan, Z., Yao, J., Beitler, E., Zhu, Y. ve Tour J.M. (2010) Growth of graphene from solid carbon sources, *Nature*, 468:549-552.
- Syljukic, B.; Banks, C. E. ve Compton, R. G. (2006) Iron Oxide Particles Are the Active Sites for Hydrogen Peroxide Sensing at Multiwalled Carbon Nanotube Modified Electrodes, *Nano Lett*, 6, 1556-1558.
- Telefoncu, A. (1997), Enzimoloji, Ege Üniversitesi, İzmir, 446s.
- Thévenot, D.R., Toth, K. ve Durst, R.A. (2001) Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosens Bioelectron*, 16:121–31.
- Tural, H., Ertaş, F. N., Gökçel, H. 2006. Enstrümental Analiz ve Elektroanalitik Yöntemler, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir, 339s.
- Turdean, G. L. (2011) Design and development of biosensors for the detection of heavy metal toxicity, *Int J Electroche*, 2011:1-15.
- Wang, S.G., Zhang, Q., Wang, R. ve Yoon, S.F. (2003) A novel multi-walled carbon nanotube-based biosensor for glucose detection, *Biochem Biophy Research Commun*, 311:572–576.
- Upadhyay, B.S.L. ve Verma N. (2013) Enzyme inhibition based biosensors: a review, *Anal Letters*, 46:225-241
- Updike, S.J. ve Hicks, G.P. (1967) The enzyme electrode, *Nature*, 214:986–988.
- Ürkmez, İ., Gökçel, H.İ., Ertaş F.N. ve Tural, H. (2009) Centrifugation: an efficient technique for preconcentration in anodic stripping voltammetric analysis of mercury using a gold film electrode, *Microchim Acta*, 167:225–230
- Wang J (1985) Stripping analysis: principles instrumentation and applications. VCH Publishing, Florida.

- Wang, J. (2006) *Analytical Electrochemistry*, John Wiley & Sons VCH, Hoboken, New Jersey, USA, 262s.
- Wang, K., Li, H., Wu, J., Ju, C., Yan, J., Liu, Q. ve Qiu, B. (2011) TiO<sub>2</sub>-decorated graphene nanohybrids for fabricating an amperometric acetylcholinesterase biosensor, *Analyst*, 136:3349-3354.
- Wang, K., Liu, Q., Dai, L., Yan, J., Ju, C., Qiu, B. ve Wu, X. (2011) A highly sensitive and rapid organophosphate biosensor based on enhancement of CdS-decorated graphene nanocomposite, *Anal Chim Acta*, 695:84–88.
- Wei, W., Wei, M., Kang, X., Deng, H. ve Lu, Z. (2009) A novel method developed for acetylcholine detection in royal jelly by using capillary electrophoresis coupled with electrogenerated chemiluminescence based on a simple reaction, *Electrophor*, 30:1949–1952.
- Wu, S., Zhang, L., Qi, L., Tao, S., Lan, X., Liu, Z. ve Meng, C. (2011) Ultra-sensitive biosensor based on mesocellular silica foam for organophosphorous pesticide detection, *Biosens Bioelectron*, 26:2864-2869.
- Yang, M., Yang, Y., Yang, Y., Shen, G. ve Yu, R. (2005) Microbiosensor for acetylcholine and choline based on electropolymerization/sol-gel derived composite membrane, *Anal. Chim Acta*, 530:205–211.
- Yun, Y., Dong, Z., Shanov, V., Heineman, R.W., Halsall, B.H., Bhattacharya, A., Conforti, L., Narayan, K.R., Ball, S.W. ve Schulz J.M. (2007) Nanotube electrodes and biosensors, *Nano Today*, 2:30-37.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Serdar ÇEVİK  
Uyruk : T.C.  
Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul 26/01/1985  
Medeni Hali : Bekar  
Telefon : 0 531 500 71 79  
E-posta : sercevik@yahoo.com

### Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Gülizar ve Zeki Obdan Lisesi, İstanbul	2003
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2008
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2009
Doktora	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2013

### SCI-EXPANDED KAPSAMINDAKİ DERGİLERDE

- U. Anık, **S.Cevik** “Double Walled Carbon Nanotube based Carbon Paste Electrode as Xanthine Biosensor”, *Microchimica Acta* 69 (2009) 209-213.
- U. Anık, **S. Cevik**, M. Cubukcu, S.Timur, ”Usage of Bismuth Film Electrode as Biosensor Transducer for Alkaline Phosphatase Assay - *Electroanalysis* 22 (2010) 1519-1523.
- A. Merkoci, U. Anık, **S. Cevik**, M. Cubukcu, M. N. Noguera, Bismuth Film Combined With Screen-Printed Electrode As Biosensing Platform For Phenol Detection” *Electroanalysis* 22 (2010) 1429-1436.
- U. Anık, **S. Cevik**, M. Pumera, “Effect of Nitric Acid “Washing” Procedure on Electrochemical Behavior of Carbon Nanotubes and Glassy Carbon  $\mu$ -Particles” *Nanoscale Research Letters* 16 (2010) 846.

- U. Anik, **S.Cevik** “Banana Tissue-Nanoparticle/Nanotube Based Glassy Carbon Paste Electrode Biosensors for Catechol Detection”, *Sensor Letters* 8 (2010) 667-671.
- U. Anik, **S. Cevik** “Centri-voltammetry for Biosensing Systems: Biocentri-Voltammetric Xanthine Detection”, *Microchimica Acta* 174 (2011) 207-212.
- U. Anik, **S. Cevik**, S.Timur “Bismuth Film Electrode as Sensing Platform for IgE-anti IgE Interactions” *Electroanalysis* 23 (2011) 2379-2385.
- **S. Cevik**, S.Timur, U. Anik “Biocentri-voltammetry for the Enzyme Assay: a Model Study” *RSC Advances* 2 (2012) 4299-4303.
- **S. Cevik**, S.Timur, U. Anik “Biocentri-voltammetric biosensor for acetylcholine and choline” *Microchimica Acta* 179 (2012) 299-305.
- B. Demir, M. Selecı, D. Ag, **S. Cevik**, E.E. Yalcinkaya, D.O. Demirkol, U. Anik, S. Timur, “Amine Intercalated Clay Surfaces for Microbial Cell Immobilization and Biosensing Applications” *RSC Advances* (Baskıda)

#### **Uluslararası Kongreler**

- Ülkü Anık, Meliha Çubukçu, **Serdar Çevik**, “ Comparison of Electroanalytic Performances of SWCNT and MWCNT Nafion Film Electrodes” Satellite Symposium to ESEAC 2008, Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins, June 19-22 2008 Brno, Czech Republic, **(poster)**
- Ülkü Anık, **Serdar Çevik**, “Banana Tissue-Nanoparticle/Nanotube Based GCPE biosensors for Catechol Detection, 13 th International Conference on Electroanalysis, June 20-24 2010, Gijon (Asturias), Spain **(poster)**).
- Sema Özcan, **Serdar Çevik**, Ülkü Anık, Özgül Haklı Birel, Kasım Ocakoğlu, Mustafa Can, “ Electropolymerization of Thiophene Containing Polyoxy Group” 9th Interntional Electrochemistry Meeting in Turkey, September 25-29 2011, Çeşme, İzmir **(poster)**.
- **Serdar Çevik**, Suna Timur, Ülkü Anık, “A Sensitivite Acetylcholine Biosensor Based On Biocentri-Voltammetry” 63rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, August 19-24 2012, Czech Republic **(poster)** .



### **Ulusal Kongreler**

- Ülkü Anık, Meliha Çubukçu, **Serdar Çevik**, “ Fenolik Bileşiklere Yönelik Enzimatik Olmayan ( non-enzimatik) Sensörlerin Geliştirilmesi“ IV. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Haziran 25-27 2008 Elazığ-Türkiye (**Poster**).
- Yeliz Yavuz, **Serdar Çevik**, Meliha Çubukcu, Bülent Arıkan, Ülkü Anık “Au-Nanopartikül Sentezlenmesi Ve Elektrokimyasal Biyosensörlerde Kullanımı”; 24. Ulusal Kimya Kongresi, 29 Haziran- 2 Temmuz 2010, Zonguldak/ Türkiye (**Poster**).
- Ülkü Anık, **Serdar Çevik**, Suna Timur, “Asetilkolin Esteraz Aktivitesinin Belirlenmesinde Biyosentri-voltammetri Yönteminin Kullanılması” 25. Ulusal Kimya Kongresi, 27 Haziran – 2 Temmuz 2011, Erzurum, Türkiye (**Poster**).
- **Serdar Çevik**, Suna Timur, Ülkü Anık, “Poly(Allylamine Hidroklorit)-Çok Duvarlı Karbon Nanotüp (MWCNT) Film İle Modifiye Karbon Pasta Elektroda Dayalı Asetilkolin Esteraz Biyosensörle Pestisit Tayini” VI. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 03-07 Eylül 2012, Hatay, Türkiye (**Sözlü Sunum**).
- Serdar Çevik, Oğuz Akpolat, Ülkü Anık, “ MnO<sub>2</sub> Modifiye GCPE ile Askorbik Asit Tayini” 26. Ulusal Kimya Kongresi, 01-06 Ekim 2012, Fethiye, Muğla, Türkiye (**Poster**).

### **Projeler**

- “Bazı Önemli Biyolojik Bileşiklerin Tayinine Yönelik Etkin Elektrokimyasal Yöntemlerin Geliştirilmesi” TÜBİTAK, Proje no: 109T885; (bursiyer, bitiş tarihi, Kasım 2012).
- “Enzimatik Biyoanalizlerin İzlenmesine Yönelik Etkin Elektrokimyasal Yöntemlerin Geliştirilmesi: Biyosentri-voltammetri ve Nanoyapı Temelli Sistemler” Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi BAP, Proje no: 12/08; (Araştırmacı, bitiş tarihi, Haziran 2013) .

### **Ulusal Kitap Bölümü**

- “Bizmut Film Elektrot Kullanılarak Pb(II) ve Cd(II) Katyonlarının ASV ile Tayini”, Anık Ü., Çevik S., Emin Dikman 1. Ulusal Lisansüstü Uygulamalı Elektrokimya Yaz Okulu II, sayfa 314-316, 14-17 EYLÜL 2010, İzmir.

**Burslar**

- Erasmus Staj Hareketliliği kapsamında Institut Catala de Nanotecnologia'da (Barselona-İspanya) Prof. Arben Merkoçi koordinatörlüğünde olan çalışma grubu ile 3 ay ( 15 Haziran-15 Eylül 2011) araştırma.

**Kullanılan Cihazlar**

- AUTOLAB PGSTAT 12 electrochemical measurement system (ECO CHEMIE Instruments B.V., The Netherlands).
- FRA 2  $\mu$ -AUTOLAB Type III electrochemical measurement system from ECO CHEMIE Instruments B.V., (Netherlands) driven by GPES software.
- CH Instruments Electrochemical Analyzer Model 600C Series, USA.
- Laboratuvar Cihazları( İnkübatör,santfirüj,Sonikatör vb.)

**Hobiler**

- 1.Spor
- 2.Müzik
3. Kitap okumak

