

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ENZİM TEMELLİ BİYOSENSÖRLERİN CEVABINA
ÇEŞİTLİ METAL OKSİT NANOPARTİKÜLLERİN ETKİSİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

İrem OKMAN KOÇOĞLU

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2019**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

İrem OKMAN KOÇOĞLU tarafından hazırlanan “Enzim Temelli Biyosensörlerin Cevabına Çeşitli Metal Oksit Nanopartiküllerin Etkisinin Karşılaştırılması” adlı tez çalışması 02/09/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Esmâ KILIÇ
Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı



Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Orhan ATAKOL
Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Esmâ KILIÇ
Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI
Selçuk Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Adnan KENAR
Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Pınar Esra ERDEN
Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Enstitü Müdürü V.

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

02/09/2019



İrem OKMAN KOÇOĞLU

ÖZET

Doktora Tezi

ENZİM TEMELLİ BİYOSENSÖRLERİN CEVABINA ÇEŞİTLİ METAL OKSİT NANOPARTİKÜLLERİN ETKİSİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

İrem OKMAN KOÇOĞLU

Ankara Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Esmâ KILIÇ

Bu tez kapsamında, çeşitli metal oksit nanopartiküllerin (MONP'ler; TiO_2NP , Co_3O_4NP , Fe_3O_4NP , SnO_2NP , Fe_2O_3NP , Al_2O_3NP , $CuONP$ ve $ZnONP$) elektrot yüzeyine modifikasyonu ile hazırlanan enzim temelli amperometrik biyosensörlerin cevaplarına MONP'lerin etkisi incelendi. Bu tez çalışması için söz konusu MONP'ler ile karboksilli çok duvarlı karbon nanotüpler (c-MWCNT) birlikte kullanılarak camı karbon elektrot (GCE) yüzeyi modifiye edildi. Elektrot modifikasyonunda kullanılan bu MONP'ler ve c-MWCNT miktarlarının optimizasyonu için merkezi kompozit tasarım (MKT) yaklaşımı kullanıldı. Bu yöntem ile modifikasyon malzemelerinin optimum miktarları ve birbirleri ile etkileşimleri incelendi. Biyosensör hazırlanması sırasında model enzim ve substrat olarak sırasıyla glukoz oksidaz (GOx) ve glukoz kullanıldı ve GOx'ın optimum miktarı belirlenerek söz konusu biyosensörlerin substrata duyarlılığı incelendi. Hazırlanan biyosensörlerin pH ve tampon derişimi gibi optimum çalışma koşulları araştırıldı. Belirlenmiş olan bu koşullarda, biyosensörlerin performans özellikleri incelendi ve gerçek numune uygulamaları yapıldı. Farklı MONP'ler ile hazırlanan biyosensörlerin performansı karşılaştırılarak incelenen her bir MONP'ün biyosensör cevabına etkisi değerlendirildi.

Eylül 2019, 205 sayfa

Anahtar Kelimeler: Amperometrik biyosensör, glukoz, glukoz oksidaz, metal oksit nanopartikül, karboksilli çok duvarlı karbon nanotüp, merkezi kompozit tasarım

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

COMPARISON OF THE EFFECT OF VARIOUS METAL OXIDE NANOPARTICLES TO RESPONSE OF ENZYME BASED BIOSENSORS

İrem OKMAN KOÇOĞLU

Ankara University

Graduate School Of Natural And Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Esmâ KILIÇ

In this thesis, the effect of MONPs on enzyme-based amperometric biosensors prepared by modification of various metal oxide nanoparticles (MONPs; TiO₂NP, Co₃O₄NP, Fe₃O₄NP, SnO₂NP, Fe₂O₃NP, Al₂O₃NP, CuONP and ZnONP) on electrode surface was examined. For this study, these MONPs were modified with carboxylated multi-walled carbon nanotube (c-MWCNT) on the surface of glassy carbon electrode (GCE). Central composite design (CCD) approach was used to optimize the amounts of these MONPs and c-MWCNT used in electrode modification. Optimum amounts of the modification materials and their interactions with each other were investigated with CCD. During the preparation of the biosensor, glucose oxidase (GOx) and glucose were used as the model enzyme and substrate, respectively, and after the optimization of GOx amount, the sensitivity of these biosensors to the substrate was determined. The optimum working conditions of the prepared biosensors such as pH and buffer concentration were investigated. In these conditions, performance characteristics of biosensors were examined and real sample applications were performed. By comparing the performance of biosensors prepared with different MONPs, the effect of each MONP on the biosensor response was examined.

September 2019, 205 pages

Key Words: Amperometric biosensor, glucose, glucose oxidase, metal oxide nanoparticles, carboxylated multi-walled carbon nanotube, central composite design

TEŞEKKÜRLER

Doktora tez konumu öneren, tez çalışmalarımın her aşamasında katkıda bulunan, akademik anlamda engin bilgi birikimi ile beni yönlendiren ve bu yolda manevi desteğini de esirgemeyen, çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Esmâ KILIÇ'a (Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı) teşekkürlerimi sunarım.

Tez İzleme Komitesi'nde bulunan ve bu süreçte engin bilgi birikimleri ile yaptıkları eleştiri ve katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Orhan ATAKOL (Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı) ve Sayın Doç. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI (Konya Selçuk Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı) hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın bilgi ve tecrübesi ile katkıda bulunan, desteğini ve yardımını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Pınar Esra ERDEN'e (Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı) teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım kapsamında, merkezi kompozit tasarım çalışmalarının yapılmasında ve değerlendirilmesinde, engin bilgi ve tecrübesiyle sağladığı katkılardan dolayı Sayın Prof. Dr. Adnan Kenar (Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı) hocama teşekkür ederim.

Doktora süresince her türlü desteğini gördüğüm Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki sevgili çalışma arkadaşlarıma ve elinden gelen her türlü yardımı yapmaktan kaçınmayan Erdal EMİR'e teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde desteğini hissettiğim, sabır ve anlayışını eksik etmeyen canım aileme; hiçbir koşulda beni yalnız bırakmayan ailemden farksız dostlarıma; bana olan güveni ve sonsuz desteği ile bu süreçte ve her zaman yanımda olan çok sevgili eşim Serhat KOÇOĞLU'na en içten ve samimi duygularıyla teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenen 116Z159 no'lu projeden temin edilen Design Expert yazılımı ve Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü'nce desteklenen 18L0430008 no'lu projeden temin edilen sarf malzemeler de kullanılarak tamamlandı.

İrem OKMAN KOÇOĞLU

Ankara, Eylül 2019

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜRLER	iv
SİMGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	6
2.1 Biyosensörler	6
2.1.1 Biyosensörlerin temel çalışma prensibi.....	6
2.1.2 Biyosensörlerin sınıflandırılması	8
2.1.3 Biyomoleküllerin immobilizasyonu	11
2.1.4 Glukoz biyosensörleri	13
2.2 Metal Oksit Nanomalzemeler.....	17
2.2.1 Metal oksit nanomalzemelerin biyosensör uygulamalarında kullanımı	17
2.2.2 Metal oksit nanomalzemelerin biyosensör uygulamalarında kullanımı ile ilgili kaynak özetleri	19
2.3 Cevap Yüzey Yöntemleri.....	26
2.3.1 Gerekli terimler	27
2.3.2 Teorisi ve uygulama basamakları.....	28
2.3.3 Deneysel tasarım seçimi.....	29
2.3.4 Uygun modelin değerlendirilmesi.....	30
2.3.5 Optimum koşulların belirlenmesi.....	33
2.3.6 Simetrik ikinci-dereceden deneysel tasarımlar	34
2.3.6.1 Üç seviyeli tam faktöriyel tasarımlar	34
2.3.6.2 Box-Behnken tasarımı	35
2.3.6.3 Merkezi kompozit tasarım	36
2.3.6.4 Doehlert tasarımı.....	37
2.3.7 Merkezi kompozit tasarımın biyosensör uygulamalarında kullanımı	37
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	43
3.1 Kullanılan Cihazlar ve Donanımı	43
3.2 Kullanılan Kimyasallar	44
3.3 Kullanılan Çözeltiler	45
3.3.1 D-Glukoz	45
3.3.2 Fosfat tamponu.....	45
3.3.3 Glukoz oksidaz	45
3.3.4 Hidrojen peroksit	46
3.3.5 Kitosan	46
3.3.6 Nafyon	46
3.3.7 Redoks probu.....	46
3.4 Camsı Karbon Elektrodun Temizlenmesi	46
3.5 Elektrotların Yüzey Bileşiminin Optimize Edilmesi.....	47
3.5.1 Tek seferde tek değişken yöntemi.....	47
3.5.2 2 ² -faktöriyel MKT yöntemi	48

3.5.3 2 ³ -faktöriyel MKT yöntemi	52
3.5.4 2 ⁴ -faktöriyel MKT yöntemi	54
3.5.5 2 ² -faktöriyel MKT ile MONP-c-MWCNT/GCE'lerin yüzey bileşimi optimizasyonu	56
3.6 Biyosensörlerin Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi.....	59
3.6.1 Tampon derişimi	59
3.6.2 pH	60
3.6.3 Sıcaklık.....	60
3.7 Biyosensörlerin Performans Faktörlerinin Belirlenmesi	60
3.7.1 Doğrusal çalışma aralığı ve duyarlık.....	60
3.7.2 Alt tayin sınırı ve gözlenebilme sınırı	61
3.7.3 Cevap süresi.....	61
3.7.4 Michaelis-Menten sabiti (K_M).....	61
3.7.5 Tekrar kullanılabilirlik.....	61
3.7.6 Tekrar üretilebilirlik.....	62
3.7.7 Tarama hızı.....	62
3.7.8 Çalışma kararlılığı	62
3.7.9 Bozucu türlerin etkisi.....	62
3.8 Gerçek Numune Analizi	63
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	64
4.1 GOx/TiO ₂ NP-c-MWCNT/GCE Biyosensörü ile İlgili Çalışmalar.....	65
4.1.1 Elektrot yüzey bileşiminin optimizasyonu	65
4.1.1.1 Tek seferde tek değişken yöntemi	66
4.1.1.2 2 ² -faktöriyel MKT	67
4.1.1.3 2 ³ -faktöriyel MKT	74
4.1.1.4 2 ⁴ -faktöriyel MKT	77
4.1.2 Yüzey karakterizasyonu	81
4.1.3 Elektrokimyasal karakterizasyon.....	83
4.1.4 Çalışma koşulları.....	86
4.1.5 Performans faktörlerinin karşılaştırılması.....	88
4.1.5.1 Doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı ve duyarlık	89
4.1.5.2 Cevap süresi.....	94
4.1.5.3 Michaelis-Menten sabiti (K_M).....	94
4.1.5.4 Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik	95
4.1.5.5 Kararlılık	95
4.1.5.6 Bozucu türlerin etkisi.....	96
4.2 GOx/Co ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE Biyosensörü ile İlgili Çalışmalar	97
4.2.1 Elektrot yüzey bileşiminin optimizasyonu	97
4.2.2 Yüzey karakterizasyonu	99
4.2.3 Elektrokimyasal karakterizasyon.....	101
4.2.4 Performans faktörleri	102
4.2.4.1 Doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı ve duyarlık	103
4.2.4.2 Cevap süresi.....	105
4.2.4.3 Michaelis-Menten sabiti (K_M).....	105
4.2.4.4 Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik	106
4.2.4.5 Kararlılık	106

4.2.4.6 Bozucu türlerin etkisi.....	107
4.3 GOx/Fe ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE ile İlgili Çalışmalar.....	108
4.3.1 Elektrot yüzey bileşiminin optimizasyonu	108
4.3.2 Yüzey karakterizasyonu	110
4.3.3 Elektrokimyasal karakterizasyon.....	112
4.3.4 Performans faktörleri	114
4.3.4.1 Doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı ve duyarlık	114
4.3.4.2 Cevap süresi.....	116
4.3.4.3 Michaelis-Menten sabiti (K_M).....	116
4.3.4.4 Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik	117
4.3.4.5 Kararlılık	117
4.3.4.6 Bozucu türlerin etkisi.....	118
4.4 GOx/SnO ₂ NP-c-MWCNT/GCE ile İlgili Çalışmalar	119
4.4.1 Elektrot yüzey bileşiminin optimizasyonu	119
4.4.2 Yüzey karakterizasyonu	120
4.4.3 Elektrokimyasal karakterizasyon.....	122
4.4.4 Performans faktörleri	124
4.4.4.1 Doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı ve duyarlık	124
4.4.4.2 Cevap süresi.....	126
4.4.4.3 Michaelis-Menten sabiti (K_M).....	127
4.4.4.4 Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik	127
4.4.4.5 Kararlılık	127
4.4.4.6 Bozucu türlerin etkisi.....	128
4.5 GOx/Fe ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE ile İlgili Çalışmalar.....	129
4.5.1 Elektrot yüzey bileşiminin optimizasyonu	129
4.5.2 Yüzey karakterizasyonu	131
4.5.3 Elektrokimyasal karakterizasyon.....	133
4.5.4 Performans faktörleri	135
4.5.4.1 Doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı ve duyarlık	135
4.5.4.2 Cevap süresi.....	137
4.5.4.3 Michaelis-Menten sabiti (K_M).....	137
4.5.4.4 Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik	138
4.5.4.5 Kararlılık	138
4.5.4.6 Bozucu türlerin etkisi.....	139
4.6 GOx/Al ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE ile İlgili Çalışmalar	140
4.6.1 Elektrot yüzey bileşiminin optimizasyonu	140
4.6.2 Yüzey karakterizasyonu	142
4.6.3 Elektrokimyasal karakterizasyon.....	144
4.6.4 Performans faktörleri	146
4.6.4.1 Doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı ve duyarlık	146
4.6.4.2 Cevap süresi.....	148
4.6.4.3 Michaelis-Menten sabiti (K_M).....	148
4.6.4.4 Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik	149
4.6.4.5 Kararlılık	149

4.6.4.6 Bozucu türlerin etkisi.....	150
4.7 GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE ile İlgili Çalışmalar	150
4.7.1 Elektrot yüzey bileşiminin optimizasyonu	150
4.7.2 Yüzey karakterizasyonu	152
4.7.3 Elektrokimyasal karakterizasyon.....	154
4.7.4 Performans faktörleri	155
4.7.4.1 Doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı ve duyarlık	155
4.7.4.2 Cevap süresi.....	157
4.7.4.3 Michaelis-Menten sabiti (K_M).....	158
4.7.4.4 Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik	158
4.7.4.5 Kararlılık	158
4.7.4.6 Bozucu türlerin etkisi.....	159
4.8 GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE ile İlgili Çalışmalar	160
4.8.1 Elektrot yüzey bileşiminin optimizasyonu	160
4.8.2 Yüzey karakterizasyonu	162
4.8.3 Elektrokimyasal karakterizasyon.....	164
4.8.4 Performans faktörleri	166
4.8.4.1 Doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı ve duyarlık	166
4.8.4.2 Cevap süresi.....	168
4.8.4.3 Michaelis-Menten sabiti (K_M).....	168
4.8.4.4 Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik	169
4.8.4.5 Kararlılık	169
4.8.4.6 Bozucu türlerin etkisi.....	170
4.9 Gerçek Numune Analizi	171
5. SONUÇLAR	173
KAYNAKLAR	187
ÖZGEÇMİŞ.....	204

SİMGELER DİZİNİ

BMIM-PF6	1-bütül-3-metilimidazolyum
BSA	Sığır serum albümin
c-MWCNT	Karboksilli çok duvarlı karbon nanotüp
CNT	Karbon nanotüp
CPE	Karbon pasta elektrot
CV	Dönüşümlü voltamogram
Cys	Sisteamin
CYY	Cevap yüzey yöntemi
FAD	Flavin adenin dinükleotit
Fc	Ferrosen
FePc	Demir ftalosiyonin
GCE	Camsı karbon elektrot
GDH	Glukoz-1-dehidrogenaz
GOx	Glukoz oksidaz
GR	Grafen
GRO	Grafen oksit
HRP	Horseradish peroksidaz
IONP	İyonik nanopartiküller
ITO	İndiyum kalay oksit
MAA	Merkaptoasetik asit
MKT	Merkezi kompozit tasarım
MONP	Metal oksit nanopartikül
MWCNT	Çok duvarlı karbon nanotüp
PANI	Polianilin
PB	Prusya mavisi
PDA	Polidopamin
pDAB	Poli(1,2-diaminobenzen)
PET	Polietilen tetraftalat
PHDT	Poli(1,6-Hekzanditiyol)
pPANI	Plazma polianilin
PPy	Polipirol
rGO	İndirgenmiş grafen oksit
RITC	Rodamin B izotiyosiyanat
SAM	Kendiliğinden oluşan tek tabakalar
SEM	Taramalı elektron mikroskopu
SPCE	Perde baskılı karbon elektrot
SPE	Perde baskılı elektrot

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Biyosensörün çalışma mekanizması	7
Şekil 2.2 İki değişkenin optimizasyonunda ikinci dereceden cevap yüzey eğrileri.....	34
Şekil 2.3 (a) iki değişken için (b) üç değişken için üç seviyeli tam faktöriyel tasarım ve (c) üç değişken için Box-Behnken tasarımı	35
Şekil 2.4 (a) iki değişkenin ($\alpha=1,41$) ve (b) üç değişkenin ($\alpha=1,68$) optimizasyonu için merkezi kompozit tasarım.	36
Şekil 3.1 GO _x /MONP-c-MWCNT/GCE biyosensörünün hazırlanma basamakları.....	52
Şekil 4.1 c-MWCNT/GCE'nin akım cevabına c-MWCNT miktarının etkisi.....	66
Şekil 4.2 TiO ₂ -c-MWCNT/GCE'nin akım cevabına TiO ₂ NP miktarının etkisi	67
Şekil 4.3 TiO ₂ NP-c-MWCNT/GCE'nin yüzey bileşimi optimizasyonunda elde edilen cevap yüzey eğrisi (+0,70 V ve $2,0 \times 10^{-4}$ M H ₂ O ₂ içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde)	70
Şekil 4.4 TiO ₂ NP-c-MWCNT/GCE'nin yüzey bileşimi optimizasyonunda elde edilen cevap yüzey eğrisi (+0,70 V ve $2,0 \times 10^{-4}$ M H ₂ O ₂ içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde)	71
Şekil 4.5 TiO ₂ NP-c-MWCNT/GCE'nin yüzey bileşimi optimizasyonunda elde edilen cevap yüzey eğrisi (+0,70 V ve $2,0 \times 10^{-4}$ M H ₂ O ₂ içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde)	73
Şekil 4.6 GO _x /TiO ₂ NP-c-MWCNT/GCE cevabına enzim miktarının etkisi (+0,70 V ve $2,0 \times 10^{-4}$ M glukoz içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde) ..	74
Şekil 4.7 GCE yüzeyini modifiye etmede kullanılan (A) c-MWCNT ve TiO ₂ NP, (B) c-MWCNT ve GO _x ve (C) TiO ₂ NP ve GO _x miktarlarının amperometrik cevapla ilişkisini gösteren cevap yüzey eğrileri (+0,70 V, $8,0 \times 10^{-5}$ M glukoz içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde).....	77
Şekil 4.8 GCE yüzeyini modifiye etmede kullanılan (A) c-MWCNT ve TiO ₂ NP, (B) c-MWCNT ve GO _x , (C) c-MWCNT ve Nafyon, (D) TiO ₂ NP ve GO _x , (E) TiO ₂ NP ve Nafyon ve (F) GO _x ve Nafyon miktarlarının amperometrik cevapla ilişkisini gösteren cevap yüzey eğrileri (+0,70 V, $8,0 \times 10^{-5}$ M glukoz içeren 0,025 M fosfat tamponu çözeltisinde).....	80
Şekil 4.9 SEM görüntüleri: (A) c-MWCNT/GCE, (B) TiO ₂ NP/GCE, (C) TiO ₂ NP-c-MWCNT/GCE ve (D) GO _x /TiO ₂ NP-c-MWCNT/GCE.....	82
Şekil 4.10 GO _x /TiO ₂ NP-c-MWCNT/GCE için EDX spektrumu ve elementel bileşim çizelgesi.....	82
Şekil 4.11 Dönüşümlü voltamogramlar: (a) TiO ₂ NP/GCE, (b) c-MWCNT/GCE, (c) TiO ₂ NP-c-MWCNT-/GCE ve (d) GO _x /TiO ₂ NP-c-MWCNT/GCE (50 mV s ⁻¹ tarama hızında 0,10 M KCl içeren 5,0 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks probunda)	84
Şekil 4.12 A. GO _x /TiO ₂ NP-c-MWCNT/GCE'nin çeşitli tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları ve B. pik akımlarının tarama hız ile değişimi (0,10 M KCl içeren 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde)	86
Şekil 4.13 GO _x /TiO ₂ NP-c-MWCNT/GCE'nin akım cevabına (A) pH, (B) tampon derişimi ve (C) sıcaklık etkisi (+0,70 V'ta)	88
Şekil 4.14 Yüzey bileşimi tek seferde tek değişken yöntemi ile optimize edilen GO _x /TiO ₂ NP-c-MWCNT/GCE cevabına glukoz derişiminin etkisi	89

Şekil 4.15 Yüzey bileşimi 2 ² -faktöriyel MKT ile optimize edilen GOx/TiO ₂ NP-c-MWCNT/GCE cevabına glukoz derişiminin etkisi	90
Şekil 4.16 Yüzey bileşimi 2 ³ -faktöriyel MKT ile optimize edilen GOx/TiO ₂ NP-c-MWCNT/GCE cevabına glukoz derişiminin etkisi	90
Şekil 4.17 Yüzey bileşimi 2 ⁴ -faktöriyel MKT ile optimize edilen GOx/TiO ₂ NP-c-MWCNT/GCE cevabına glukoz derişiminin etkisi	91
Şekil 4.18 Kalibrasyon grafikleri A. GOx/c-MWCNT/GCE ve B. GOx/TiO ₂ NP/GCE (N=3; 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,70 V)	94
Şekil 4.19 GOx/TiO ₂ NP-c-MWCNT/GCE'nin kararlılığı.....	96
Şekil 4.20 GOx/TiO ₂ NP-c-MWCNT/GCE'nin cevabına bozucu türlerin etkisi	97
Şekil 4.21 Co ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE'nin yüzey bileşimi optimizasyonunda elde edilen cevap yüzey eğrisi (+0,70 V ve 2,0×10 ⁻⁴ M H ₂ O ₂ içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde)	99
Şekil 4.22 SEM görüntüleri: (A) c-MWCNT/GCE, (B) Co ₃ O ₄ NP/GCE, (C) Co ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE ve (D) GOx/Co ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE.....	100
Şekil 4.23 GOx/Co ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE için EDX spektrumu ve elementel bileşim çizelgesi.....	100
Şekil 4.24 Dönüşümlü voltamogramlar: (a) Co ₃ O ₄ NP/GCE, (b) c-MWCNT/GCE, (c) Co ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE ve (d) GOx/Co ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE (50 mV s ⁻¹ tarama hızında 0,10 M KCl içeren 5,0 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks probunda)	101
Şekil 4.25 A. GOx/Co ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE'nin çeşitli tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları ve B. pik akımlarının tarama hızı ile değişimi (0,10 M KCl içeren 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde)	102
Şekil 4.26 GOx/Co ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE cevabına glukoz derişiminin etkisi	103
Şekil 4.27 Kalibrasyon grafikleri A. GOx/c-MWCNT/GCE ve B. GOx/Co ₃ O ₄ NP/GCE (N=3; 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,70 V)	105
Şekil 4.28 GOx/Co ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE'nin kararlılığı	107
Şekil 4.29 GOx/Co ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE'nin cevabına bozucu türlerin etkisi.....	108
Şekil 4.30 Fe ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE'nin yüzey bileşimi optimizasyonunda elde edilen cevap yüzey eğrisi (+0,70 V ve 2,0×10 ⁻⁴ M H ₂ O ₂ içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde)	110
Şekil 4.31 SEM görüntüleri: (A) c-MWCNT/GCE, (B) Fe ₃ O ₄ NP/GCE, (C) Fe ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE ve (D) GOx/Fe ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE	111
Şekil 4.32 GOx/Fe ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE için EDX spektrumu ve elementel bileşim çizelgesi.....	111
Şekil 4.33 Dönüşümlü voltamogramlar: (a) Fe ₃ O ₄ NP/GCE, (b) c-MWCNT/GCE, (c) Fe ₃ O ₄ NP-c-MWCNT-/GCE ve (d) GOx/Fe ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE (50 mV s ⁻¹ tarama hızında 0,10 M KCl içeren 5,0 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks probunda)	112
Şekil 4.34 A. GOx/Fe ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE'nin çeşitli tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları ve B. pik akımlarının tarama hızının karekökü ile değişimi (0,10 M KCl içeren 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde)	113
Şekil 4.35 GOx/Fe ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE cevabına glukoz derişiminin etkisi	114
Şekil 4.36 Kalibrasyon grafikleri A. GOx/c-MWCNT/GCE ve B. GOx/Fe ₃ O ₄ NP/GCE (N=3; 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,70 V)	116
Şekil 4.37 GOx/Fe ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE'nin kararlılığı.....	118

Şekil 4.38 GO _x /Fe ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE'nin cevabına bozucu türlerin etkisi	118
Şekil 4.39 SnO ₂ NP-c-MWCNT/GCE'nin yüzey bileşimi optimizasyonunda elde edilen cevap yüzey eğrisi (+0,70 V ve 2,0×10 ⁻⁴ M H ₂ O ₂ içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde)	120
Şekil 4.40 SEM görüntüleri: (A) c-MWCNT/GCE, (B) SnO ₂ NP/GCE, (C) SnO ₂ NP-c-MWCNT/GCE ve (D) GO _x / SnO ₂ NP-c-MWCNT/GCE	121
Şekil 4.41 GO _x /SnO ₂ NP-c-MWCNT/GCE için EDX spektrumu ve elementel bileşim çizelgesi.....	122
Şekil 4.42 Dönüşümlü voltamogramlar: (a) SnO ₂ NP/GCE, (b) c-MWCNT/GCE, (c) SnO ₂ NP-c-MWCNT-/GCE ve (d) GO _x /SnO ₂ -c-MWCNT/GCE (50 mV s ⁻¹ tarama hızında 0,10 M KCl içeren 5,0 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks probunda)	123
Şekil 4.43 A. GO _x /SnO ₂ NP-c-MWCNT/GCE'nin çeşitli tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları ve B. pik akımlarının tarama hızı ile değişimi (0,10 M KCl içeren 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde)....	124
Şekil 4.44 GO _x /SnO ₂ NP-c-MWCNT/GCE cevabına glukoz derişiminin etkisi	125
Şekil 4.45 Kalibrasyon grafikleri A. GO _x /c-MWCNT/GCE ve B. GO _x /SnO ₂ NP/GCE (N=3; 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu +0,70 V)	126
Şekil 4.46 GO _x /SnO ₂ NP-c-MWCNT/GCE'nin kararlılığı	128
Şekil 4.47 GO _x /SnO ₂ NP-c-MWCNT/GCE'nin cevabına bozucu türlerin etkisi.....	129
Şekil 4.48 Fe ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE'nin yüzey bileşimi optimizasyonunda elde edilen cevap yüzey eğrisi (+0,70 V ve 2,0×10 ⁻⁴ M H ₂ O ₂ içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde)	131
Şekil 4.49 SEM görüntüleri: (A) c-MWCNT/GCE, (B) Fe ₂ O ₃ NP/GCE, (C) Fe ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE ve (D) GO _x /Fe ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE	132
Şekil 4.50 GO _x /Fe ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE için EDX spektrumu ve elementel bileşim çizelgesi.....	132
Şekil 4.51 Dönüşümlü voltamogramlar: (a) Fe ₂ O ₃ NP/GCE, (b) c-MWCNT/GCE, (c) Fe ₂ O ₃ NP-c-MWCNT-/GCE ve (d) GO _x /Fe ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE (50 mV s ⁻¹ tarama hızında 0,10 M KCl içeren 5,0 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks probunda)	133
Şekil 4.52 A. GO _x /Fe ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE'nin çeşitli tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları ve B. pik akımlarının tarama hızının karekökü ile değişimi (0,10 M KCl içeren 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde)	134
Şekil 4.53 GO _x /Fe ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE cevabına glukoz derişiminin etkisi	136
Şekil 4.54 Kalibrasyon grafikleri A. GO _x /c-MWCNT/GCE ve B. GO _x /Fe ₂ O ₃ NP/GCE (N=3; 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,70 V)	137
Şekil 4.55 GO _x /Fe ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE'nin kararlılığı	139
Şekil 4.56 GO _x /Fe ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE'nin cevabına bozucu türlerin etkisi	140
Şekil 4.57 Al ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE'nin yüzey bileşimi optimizasyonunda elde edilen cevap yüzey eğrisi (+0,70 V ve 2,0×10 ⁻⁴ M H ₂ O ₂ içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde)	142
Şekil 4.58 SEM görüntüleri: (A) c-MWCNT/GCE, (B) Al ₂ O ₃ NP/GCE, (C) Al ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE ve (D) GO _x /Al ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE	143
Şekil 4.59 GO _x /Al ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE için EDX spektrumu ve elementel bileşim çizelgesi.....	143

Şekil 4.60 Dönüşümlü voltamogramlar: (a) Al ₂ O ₃ NP/GCE, (b) c-MWCNT/GCE, (c) Al ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE ve (d) GOx/Al ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE (50 mV s ⁻¹ tarama hızında 0,10 M KCl içeren 5,0 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks probunda)	144
Şekil 4.61 A. GOx/Al ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE'nin çeşitli tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları ve B. pik akımlarının tarama hızı ile değişimi (0,10 M KCl içeren 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde).....	145
Şekil 4.62 GOx/Al ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE cevabına glukoz derişiminin etkisi	146
Şekil 4.63 Kalibrasyon grafikleri A. GOx/c-MWCNT/GCE ve B. GOx/Al ₂ O ₃ NP/GCE (N=3; 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,70 V)	148
Şekil 4.64 GOx/Al ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE'nin kararlılığı.....	149
Şekil 4.65 GOx/Al ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE cevabına bozucu türlerin etkisi.....	150
Şekil 4.66 CuONP-c-MWCNT/GCE'nin yüzey bileşimi optimizasyonunda elde edilen cevap yüzey eğrisi (+0,70 V ve 2,0×10 ⁻⁴ M H ₂ O ₂ içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde).....	152
Şekil 4.67 SEM görüntüleri: (A) c-MWCNT/GCE, (B) CuONP/GCE, (C) CuONP-c-MWCNT/GCE ve (D) GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE	153
Şekil 4.68 GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE için EDX spektrumu ve elementel bileşim çizelgesi.....	153
Şekil 4.69 A. GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE'nin çeşitli tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları ve B. pik akımlarının tarama hızı ile değişimi (0,10 M KCl içeren 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde)	155
Şekil 4.70 GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE cevabına glukoz derişiminin etkisi	156
Şekil 4.71 Kalibrasyon grafikleri A. GOx/c-MWCNT/GCE ve B. GOx/CuONP/GCE (N=3; 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,70 V)	157
Şekil 4.72 GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE'nin kararlılığı.....	159
Şekil 4.73 GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE'nin cevabına bozucu türlerin etkisi	160
Şekil 4.74 ZnONP-c-MWCNT/GCE'nin yüzey bileşimi optimizasyonunda elde edilen cevap yüzey eğrisi (+0,70 V ve 2,0×10 ⁻⁴ M H ₂ O ₂ içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde).....	162
Şekil 4.75 SEM görüntüleri: (A) c-MWCNT/GCE, (B) ZnONP/GCE, (C) ZnONP-c-MWCNT/GCE ve (D) GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE.....	163
Şekil 4.76 GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE için EDX spektrumu ve elementel bileşim çizelgesi.....	163
Şekil 4.77 Dönüşümlü voltamogramlar: (a) ZnONP/GCE, (b) c-MWCNT/GCE, (c) ZnONP-c-MWCNT/GCE ve (d) GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE (50 mV s ⁻¹ tarama hızında 0,10 M KCl içeren 5,0 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks probunda)	164
Şekil 4.78 A. GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE'nin çeşitli tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları ve B. pik akımlarının tarama hızı ile değişimi (0,10 M KCl içeren 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde) ...	165
Şekil 4.79 GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE cevabına glukoz derişiminin etkisi	167
Şekil 4.80 Kalibrasyon grafikleri A. GOx/c-MWCNT/GCE ve B. GOx/ZnONP/GCE (N=3; 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,70 V)	168
Şekil 4.81 GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE'nin kararlılığı	170
Şekil 4.82 GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE'nin cevabına bozucu türlerin etkisi.....	170

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Glukoz biyosensörlerinin tarihsel gelişimi	15
Çizelge 2.2 Her bir varyasyon kaynağı için serbestlik derecesi ve ortalama kare değerleri	31
Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasal maddeler, saflık dereceleri ve markaları.....	44
Çizelge 3.2 c-MWCNT ile TiO ₂ NP miktarlarının üç farklı derişim aralığında optimizasyonu için 2 ² -MKT'daki deneysel faktörler ve seviyeler	49
Çizelge 3.3 2 ² -faktöriyel MKT ve TiO ₂ NP-c-MWCNT/GCE ile (i) tasarımımda elde edilen deneysel ve beklenen amperometrik cevap akımları (2,0×10 ⁻⁴ M H ₂ O ₂ içeren 0,025 M pH 8 fosfat tampon çözeltisinde).....	49
Çizelge 3.4 2 ² - faktöriyel MKT ve TiO ₂ NP-c-MWCNT/GCE ile (ii) tasarımımda elde edilen deneysel ve beklenen amperometrik cevap akımları (2,0×10 ⁻⁴ M H ₂ O ₂ içeren 0,025 M pH 8 fosfat tampon çözeltisinde).....	50
Çizelge 3.5 2 ² -faktöriyel MKT ve TiO ₂ NP-c-MWCNT/GCE ile (iii) tasarımımda elde edilen deneysel ve beklenen amperometrik cevap akımları (2,0×10 ⁻⁴ M H ₂ O ₂ içeren 0,025 M pH 8 fosfat tampon çözeltisinde).....	50
Çizelge 3.6 2 ³ -faktöriyel MKT ile c-MWCNT, TiO ₂ NP ve GOx miktarlarının optimizasyonu için MKT'deki deneysel faktörler ve seviyeler.....	53
Çizelge 3.7 2 ³ -faktöriyel MKT ve GOx/TiO ₂ NP-c-MWCNT/GCE ile elde edilen deneysel ve beklenen amperometrik cevap akımları (8,0×10 ⁻⁵ M glukoz içeren 0,025 M pH 8 fosfat tampon çözeltisinde)	53
Çizelge 3.8 2 ⁴ -faktöriyel MKT ile c-MWCNT, TiO ₂ NP, GOx ve Nafyon miktarlarının optimizasyonu için MKT'deki deneysel faktörler ve seviyeler ..	55
Çizelge 3.9 2 ⁴ -faktöriyel MKT ve GOx/TiO ₂ -c-MWCNT/GCE ile elde edilen deneysel ve beklenen amperometrik cevap akımları (8,0×10 ⁻⁵ M glukoz içeren 0,025 M pH 8 fosfat tampon çözeltisinde)	55
Çizelge 3.10 2 ² -faktöriyel MKT ile c-MWCNT ile MONP miktarlarının optimizasyonu için MKT'deki deneysel faktörler ve seviyeler.....	56
Çizelge 3.11 2 ² -faktöriyel MKT ve MONP-c-MWCNT/GCE ile elde edilen deneysel ve beklenen amperometrik cevap akımları (2,0×10 ⁻⁴ M H ₂ O ₂ içeren 0,025 M pH 8 fosfat tampon çözeltisinde)	57
Çizelge 4.1 c-MWCNT- TiO ₂ NP için 2 ² -faktöriyel MKT verileri ile elde edilen ANOVA sonuçları	68
Çizelge 4.2 c-MWCNT- TiO ₂ NP için 2 ² -faktöriyel MKT verileri ile elde edilen ANOVA sonuçları	70
Çizelge 4.3 c-MWCNT- TiO ₂ NP için 2 ² -faktöriyel MKT verileri ile elde edilen ANOVA sonuçları	72
Çizelge 4.4 2 ³ -faktöriyel MKT verileri ile edilen ANOVA sonuçları	75
Çizelge 4.5 2 ⁴ -faktöriyel MKT için elde edilen ANOVA sonuçları.....	78
Çizelge 4.6 Üç farklı MKT yöntemi ile elde edilen optimum miktarlar.....	81
Çizelge 4.7 c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP için 2 ² -faktöriyel MKT verileri ile elde edilen ANOVA	98
Çizelge 4.8 c-MWCNT-Fe ₃ O ₄ NP için 2 ² -faktöriyel MKT verileri ile elde edilen ANOVA	109
Çizelge 4.9 c-MWCNT-SnO ₂ NP için 2 ² -faktöriyel MKT verileri ile ANOVA	119

Çizelge 4.10 c-MWCNT-Fe ₂ O ₃ NP için 2 ² -faktöriyel MKT verileri ile elde edilen ANOVA	130
Çizelge 4.11 c-MWCNT-Al ₂ O ₃ NP için 2 ² -faktöriyel MKT verileri ile ANOVA	141
Çizelge 4.12 c-MWCNT-CuO için 2 ² -faktöriyel MKT verileri ile ANOVA	151
Çizelge 4.13 c-MWCNT-ZnO için 2 ² -faktöriyel MKT verileri ile ANOVA	161
Çizelge 4.14 Serum örneklerinde referans yöntem ve GOx/MONP-c-MWCNT /GCE ile elde edilen sonuçlar	172
Çizelge 5.1 GOx/MONP-c-MWCNT/GCE biyosensörleri için performans faktörleri	180
Çizelge 5.2 Glukoz tayini için metal oksit nanomalzemeler ile hazırlanan bazı amperometrik biyosensörler	181



1. GİRİŞ

Diyabet, karbonhidrat metabolizmasının en sık görülen endokrin hastalığıdır ve birçok gelişmiş toplum için büyük bir sağlık sorunudur (Yoo ve Lee 2010). Diyabetin çok yaygın hale gelmesinden dolayı, kanda ve diğer fizyolojik sıvılarda glukozun kalitatif ve kantitatif tayini tüm dünyada büyük ilgi görmektedir. Diğer yöntemlere göre daha hızlı, daha basit olması ve güvenilir sonuçlar vermesi, ayrıca küçültülebilir olduğu için daha az örnekle çalışmaya imkân vermesi gibi nedenlerle biyosensörler, glukoz tayininde oldukça fazla kullanılmaktadır (Davis ve Higson 2014).

Biyosensörler, biyolojik olayların elektriksel sinyallere dönüştürülmesini sağlayan analitik cihazlardır ve analit derişimi ile orantılı olarak ölçülebilir sinyal üretirler (Metkar ve Girigoswami 2019). Biyosensörler, üç temel bileşenden oluşur; (i) hedef moleküller ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyolojik tanıma bileşeni, (ii) bu etkileşimi ölçülebilir bir sinyale dönüştüren bir çevirici ve (iii) bu sinyallerin okunmasını sağlayan sinyal işleme sistemi. Biyosensörlerde biyolojik tanıma bileşenleri ve hedef bileşikler arasında seçimli ve güçlü bağlanmalar meydana gelir. Biyotanıyıcı tür olarak enzimler, hücreler, antikolar, mikroorganizmalar, DNA, RNA ve reseptör proteinler yaygın biçimde kullanılmaktadır. Elektrotlar, transistörler, termistörler ve optik fiberler ise, yaygın kullanılan çeviricilerdir. Biyosensörlerde, hedef analit varlığında, hedef analitin derişimine bağlı olarak biyolojik olaylar fiziksel sinyallere çevrilirler (Sassolas, 2012). Biyotanıyıcı bileşen olarak en yaygın kullanılan malzemeler enzimlerdir. Enzimler, genellikle tek bir substrata seçimli olmasından dolayı biyosensör uygulamalarında sıklıkla yer bulmaktadır. Literatürde en çok karşılaşılan enzim temelli biyosensörler glukoz biyosensörleridir. Glukoz oksidaz (GOx), glukozu spesifik bir enzimdir ve literatürde biyomolekül olarak GOx'in kullanıldığı birçok glukoz biyosensörü mevcuttur (Samphao vd. 2015, Wang vd. 2012, Sánchez-Obrero vd. 2009).

Bir biyosensörü karakterize eden onun çalışma niteliklerini ve verimini belirleyen özelliklere performans özellikleri denir. İdeal bir biyosensörde en önemli

parametrelerden bazıları seçicilik, yüksek duyarlık, düşük gözlenebilme sınırı, geniş ölçüm aralığı, basitlik ve ucuzluk gibi özelliklerdir (Erden 2010).

Biyosensörlerin performans özellikleri dikkate alındığında, elektrot modifikasyonunun çok büyük önemi vardır. Biyosensör performansını arttırmak amacı ile elektrot modifikasyonu yapılır (Chira vd. 2014, Revathi ve Kumar 2019). Elektrot modifikasyonu; elektrot yüzeyinin çeşitli malzemelerle kaplanarak, farklı özelliklere sahip yeni elektrotlar elde edilmesi yöntemidir. Biyosensörlerde elektrot modifikasyonu, immobilize edilecek olan biyotanıyıcı bileşen için de matriks oluşturur. Yüzey alanı geniş malzemelerin modifikasyonda kullanılması ile biyobileşenler için uygun ortam sağlanabilir (Durst vd. 1997).

Son yıllarda, biyosensör hazırlamada, elektrot modifikasyon malzemesi olarak nanomalzemeler sıklıkla kullanılmaktadır (Yu vd. 2016, Zappi vd. 2017, Kim vd. 2015, Zhang vd. 2015). Bunun nedeni, böyle malzemelerin yüksek yüzey etkileşimine, büyük yüzey/hacim oranına, iyi katalitik verime ve güçlü adsorpsiyon kabiliyetine sahip olması gibi özelliklerinden kaynaklanır. Bu özellikleri sayesinde biyotanıyıcı moleküllerin modifiye elektrot yüzeyine immobilizasyonu da kolaylaşır. Ayrıca, elektrot ile enzimin aktif bölgesi arasında hızlı elektron aktarımını gerçekleştirmesi nanopartiküllerin önemli bir diğer özelliğidir (Kaushik vd. 2008). Nanopartiküller, normal boyuttaki durumlarından çok farklı fiziksel, kimyasal ve elektronik özellikler gösterirler, bu nedenle de, sensör ve biyosensörlerde sıklıkla kullanılmaktadır (Dayakar vd. 2017, Dervisevic vd. 2017, Aydoğdu Tığ, 2017, Sharma ve Kumar, 2016). Metal nanopartiküller, metal oksit nanopartiküller, yarıiletken nanopartiküller ve kompozit nanopartiküller gibi çeşitli nanopartiküller elektrokimyasal sensör sistemlerinde farklı roller üstlenebilirler. Bunlar şöyle sıralanabilir:

- Biyomoleküllerin immobilizasyonu
- Elektrokimyasal reaksiyonların katalizlenmesi
- Elektron aktarımının hızlandırılması
- Biyomoleküllerin işaretlenmesi (Luo vd. 2006).

Metal oksit nanopartiküller (MONP), özellikle biyomolekül immobilizasyonu ve elektron aktarımını hızlandırması açısından oldukça yararlıdır. MONP'ler optik, manyetik ve elektronik özelliklerinden dolayı çok büyük öneme sahiptir (Shi vd. 2014). MONP'ler biyoyumlu olmaları ve geniş yüzey alanına sahip olmalarından dolayı, biyomoleküllerin immobilizasyonunda; iletkenlik ve küçük çaplarından dolayı da, elektron aktarımının hızlandırılmasında görev alırlar (Luo vd. 2006, Shi vd. 2014). Bu nanomalzemeler geniş spesifik yüzey alanı nedeniyle biyomolekülleri kuvvetle adsorplar ve biyomoleküllerin immobilizasyonunda önemli rol oynarlar. Biyomoleküller çıplak yüzeylere doğrudan adsorbe olduğunda, denatürasyona uğrayabilir ve aktivitelerini kısmen veya tamamen kaybedebilirler. Ancak, biyomoleküllerin, nanopartiküllerin yüzeyine adsorplanması durumunda, nanopartiküllerin pek çoğunun biyoyumlu bir matriks sağlamasından dolayı, biyoaktivitenin korunması sağlanabilir (Luo vd. 2006). Nanopartiküller, ayrıca, elektrot modifikasyonunda kullanılan diğer malzemelerin de immobilizasyonunu sağlayabilir. Sonuç olarak, nanopartiküller kullanılarak gerçekleştirilen biyomolekül immobilizasyonu biyoaktivitenin korunmasını sağlayarak biyosensörün kararlılığını artırır (Luo vd. 2006).

Enzim temelli biyosensörlerde, elektriksel iletkenlik en önemli noktalardan biridir. Enzimlerin aktif merkezleri oldukça kalın ve yalıtkan protein kabuklarla çevrili olduğundan ve elektrotlarla aktif merkezler arasındaki elektron aktarımı engellendiğinden, enzimlerin elektrot yüzeylerine doğrudan bağlanmasıyla elektron aktarımı azalır (Luo vd. 2006). MONP'ler iletken özellikleri dolayısıyla, enzim ve elektrot arasında elektron aktarımını kolaylaştırırlar (Luo vd. 2006, Kaushik vd. 2008).

MONP'ler, elektrot modifikasyonlarında sıklıkla başka malzemelerle birlikte kullanılırlar ve bu durum genellikle kullanılan malzemelerin sinerjik bir etkileşim ile birbirlerinin etkilerini arttırmalarına sebep olur (Dalkıran vd. 2017, Kaçar vd. 2017, Magar vd. 2017, Kacar vd. 2014). MONP'lerin birlikte kullanıldığı malzemeler arasında karbon nanotüpler (CNT) (Shamsipur vd. 2012), grafen (GR) (Karuppiah vd. 2014), grafen oksit (GRO) (Ensafi vd. 2013) gibi karbon nanomalzemeler ve iletken polimerler (Sethuraman vd. 2016) sayılabilir.

Bu tez çalışmasında, model enzim olarak kullanılan GOx, glukozu duyarlı bir enzimdir. GOx enzimi düşük maliyetle yüksek saflıkta ticari olarak elde edilebilir ve enzimin immobilizasyonu kolaylıkla gerçekleştirilebilir. Literatürde, GOx'ın kullanıldığı pek çok glukoz biyosensörü rapor edilmiştir (Wu vd. 2016, Susanto vd. 2013, Nor vd. 2017, Samphao vd. 2015, Pakapongpan ve Poo-arporn, 2017, Xue vd. 2014).

Biyosensörün performans özelliklerinin iyileştirilmesi için modifikasyon malzemelerinin türü kadar, bu modifikasyon malzemelerinin elektrot yüzeyindeki miktarları da önemlidir (Kaçar vd. 2017). Modifikasyon malzemelerinin elektrot yüzeyindeki miktarlarının, birden fazla modifikasyon malzemesi varsa, birbirleriyle etkileşimlerinin de belirlenmesi büyük önem taşır (Martins vd. 2009). Deneysel tasarımlar, bir yöntemde önemli değişkenlerin etkisini araştırmak ve optimize etmek için kullanılarak performansı arttırmayı ve deney sayısını düşürmeyi amaçlayan yaklaşımlardır (Bardajee vd. 2017). Deneysel tasarımlar içinde, matematiksel ve istatistiksel yöntemlerin bir birleşimi olan merkezi kompozit tasarım (MKT), önemli değişkenlerin ve optimum koşulların belirlenmesi için yaygın olarak uygulanır (Dastkhon vd. 2017, Alonso-Lomillo vd. 2005, Situmorang vd. 2000, Calvo vd. 2005). Zahmetli ve zaman alıcı geleneksel tek seferde değişken yöntemiyle karşılaştırıldığında, MKT yaklaşımıyla optimizasyon, deneysel araştırma sonuçlarının hızlı bir şekilde elde edilmesi için faydalı olabilir (Dashtian ve Zare-Dorabei 2017). Biyosensör çalışmalarında MKT, temel olarak sıcaklık, pH ve çalışma potansiyeli gibi deneysel değişkenlerin optimizasyonu için kullanılmaktadır (Alonso-Lomillo vd. 2009, Talat vd. 2011, Asturias-Arribas vd. 2011, Alonso-Lomillo vd. 2010, Retama vd. 2005). Ancak elektrot yüzey bileşiminin optimizasyonu için MKT kullanımı biyosensör üretiminde yaygın bir yaklaşım değildir ve sınırlı sayıda çalışma bildirilmiştir (Alonso-Lomillo vd. 2005, Ivanov vd. 2010, Martins vd. 2009, Del Torno-de Román vd. 2013).

Amperometrik bir biyosensörün hazırlanmasında, MKT yaklaşımının kullanılması bir çok avantaj sağlar: (i) çok fazla sayıda deney yapılması gereken optimizasyon işlemlerinde, en az sayıda deneyle daha fazla bilgi elde edilerek zaman ve maliyet açısından tasarruf edilmesi sağlanabilir; (ii) optimum deney koşulları veya elektrot bileşimi daha doğru bir şekilde belirlenebilir; (iii) bu yaklaşım, optimizasyon

parametrelerinin biyosensör cevabı üzerindeki doğrusal ve ikinci dereceden etkileri ile birbirleri ile etkileşimlerini belirlemeye izin verir.

Bu amaçla, bu tez çalışması kapsamında, modifikasyon malzemelerinin miktarlarının optimizasyonu ve malzemelerin birbirleriyle etkileşimini belirlemek amacıyla, merkezi kompozit tasarım (MKT) yaklaşımı uygulanmıştır. Optimizasyon basamağı, biyosensör cevabı için oldukça kritik bir aşamadır ve MKT modifikasyon malzemelerinin miktarları ile bu malzemelerin etkileşimlerinin, minimum sayıda deneyle belirlenmesine olanak sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında, 8 adet metal oksit nanopartikülün (MONP'ler; TiO_2NP , $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$, SnO_2NP , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NP}$, $\text{Al}_2\text{O}_3\text{NP}$, CuONP ve ZnONP) elektrot yüzeyine modifikasyonu ile hazırlanan enzim temelli biyosensörlerin cevaplarına MONP'lerin etkisinin karşılaştırılması amaçlandı. Literatürde MONP'lerin biyosensör cevabına etkisinin kapsamlı bir şekilde karşılaştırılması ile ilgili çalışmaya rastlanmadı. Bu amaçla, bu çalışma kapsamında camı karbon elektrot (GCE) yüzeyi karboksilli çok duvarlı karbon nanotüp (c-MWCNT) ve 8 farklı MONP ile modifiye edilerek (a) c-MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4/\text{GCE}$, (b) c-MWCNT- $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GCE}$, (c) c-MWCNT- SnO_2/GCE , (d) c-MWCNT- TiO_2/GCE , (e) c-MWCNT- $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{GCE}$, (f) c-MWCNT- $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{GCE}$, (g) c-MWCNT- CuO/GCE ve (h) c-MWCNT- ZnO/GCE hazırlandı. Bu modifiye elektrotların yüzey bileşimi optimizasyonun MKT yaklaşımı ile yapılması, böylece modifikasyon malzemelerinin ana etkilerinin ve birbirleriyle etkileşimlerinin en az sayıda deneyle belirlenerek malzeme ve zamandan tasarruf edilmesi amaçlandı. Optimum bileşimde hazırlanan modifiye elektrotlara GOx immobilize edilerek sekiz ayrı biyosensör hazırlanması; hazırlanan her bir elektrodun yüzey karakterizasyonu ve elektrokimyasal davranışlarının incelenmesi; biyosensörlerin optimum çalışma koşullarının ve performans faktörlerinin belirlenmesi düşünüldü. Her bir biyosensörün gerçek numunelerde kullanılabilirliğinin belirlenmesi için, insan kan serum numunelerinde glukoz tayinine uygulanabilirliğinin araştırılması hedeflendi.

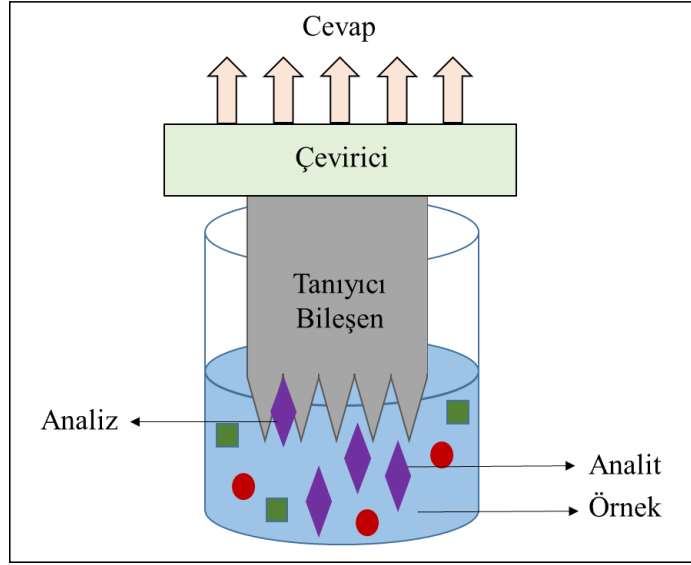
2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Biyosensörler

IUPAC tarafından biyosensörler, “kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar” olarak tanımlanmaktadır (Nagel vd. 1992). Biyosensörlerin temel işlevi, hedef analit varlığında, hedef analitin derişimi ile orantılı olan elektriksel sinyaller üretmektir (Metkar ve Girigoswami 2019, Sassolas vd. 2012). Biyosensörler düşük maliyet, kolay üretilebilirlik ve küçültülebilirlik gibi birçok avantaja sahiptir (Sassolas vd. 2012).

2.1.1 Biyosensörlerin temel çalışma prensibi

Bir biyosensör, “fizikokimyasal bir transdüserle entegre veya ilişkili bir biyolojik veya biyolojik olarak türetilmiş hassas tanıma elemanını içeren kompakt bir analitik cihaz veya birim” olarak tanımlanır (Yoo ve Lee 2010). Biyosensörün üç temel bileşenden oluşur: (i) hedef molekülleri çeşitli kimyasalların varlığında ayırt eden biyolojik tanıma bileşenleri, (ii) biyolojik tanıma olayını ölçülebilir bir sinyale dönüştüren bir çevirici ve (iii) sinyali okunabilir bir forma dönüştüren bir sinyal işleme sistemi. Biyosensörlerde tanıma bileşeni olarak enzim, antibadi, nükleik asit, doku, organ ve mikroorganizmalar gibi biyolojik malzemeler kullanılacağı gibi; analiti tanıyan ve seçici bir şekilde bağlanan yapay reseptörler de kullanılabilir. Analit ve tanıma bileşeni arasındaki bağlanma işlemini ölçülebilir bir büyüklüğe dönüştüren çevirici bileşeni ise elektrokimyasal, optik, termometrik ve piezoelektrik olmak üzere dört temel grupta toplanabilir (Yoo ve Lee 2010, Jothi ve Nageswaran 2019).



Şekil 2.1 Biyosensörün çalışma mekanizması

Biyosensörlerden beklenen bazı özellikler aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- Yüksek seçicilik
- Hızlı cevap süresi
- Kolay hazırlık / kullanım
- Düşük gözlenebilme sınırı
- Yüksek duyarlık
- Tekrarlanabilirlik / tekrar üretilebilirlik (Revathi ve Rajendra Kumar 2019).

Bir biyosensörün sahip olması gereken en önemli özelliklerden biri; seçiciliktir. Seçicilik, biyotanıyıcı bileşenin, çeşitli katkı maddeleri ve kirleticilerin olduğu bir örnekte, seçici olarak analiti tayin edebilmesidir (Bhalla vd. 2016). Bu nedenle biyosensör hazırlanması sırasında, tayin edilecek analite özgü biyomolekül, tanıyıcı bileşen olarak seçilmelidir.

Analit derişimine karşı biyosensörün cevabının grafiğe geçirilmesi ile elde edilen grafiğin doğrusal olduğu derişim aralığı, biyosensörün çalışma aralığını; doğrunun eğimi ise biyosensörün duyarlığını verir (Bhalla vd. 2016). Biyosensörün analite, geniş bir doğrusal aralıkta, iyi bir duyarlıkla cevap vermesi beklenir. Ayrıca analitin

gözlenebilme sınırı da biyosensörün duyarlılığı ile ilgili bir özelliktir. Biyosensörün algılayabileceği en düşük analit derişimi gözlenebilme sınırı olarak adlandırılır (Bhalla vd. 2016). Biyosensörün analiti mümkün olduğunca düşük derişimde tespit edebilmesi, biyosensörlerde arzu edilen bir özelliktir.

Tekrar üretilebilirlik, aynı yöntemle hazırlanan biyosensörlerin özdeş cevaplar verebilme yeteneğidir. Tekrar kullanılabilirlik, bir biyosensörün her ölçümde aynı cevabı verebilmesidir. Genel olarak tekrarlanabilir ölçümler, biyosensörün cevabının güvenilirliğinin bir ölçüsüdür (Bhalla vd. 2016).

Kararlılık, biyosensör sisteminin içindeki veya çevresindeki ortam bozulmalarına karşı duyarlılık derecesidir. Bu bozukluklar, biyosensörün cevabında kaymaya neden olabilir ve bu durum da ölçülen derişimde hataya neden olarak biyosensörün doğruluğunu etkileyebilir. Bu duruma çevresel koşullar sebep olabileceği gibi, biyolojik bileşenin zamanla bozulabilmesi de etkili olabilir. Ayrıca biyolojik bileşenin afinitesinin çok yüksek olduğu durumlarda, analite kovalent bağlarla veya elektrostatik etkileşimlerle çok kuvvetli bir şekilde bağlanması da kararlılığı azaltabilir. Biyosensörün uzun süreli kullanımını gerektiren durumlarda önemli bir özelliktir (Bhalla vd. 2016).

2.1.2 Biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler tanıma bileşeni veya çevirici türüne göre sınıflandırılabilirler. Çevirici türüne göre biyosensörler aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir (Korotkaya 2014):

Elektrokimyasal biyosensörler, analit derişimi gibi biyokimyasal bir bilgiyi potansiyel, akım, iletkenlik gibi bir sinyale çevirirler. Elektrokimyasal bir hücreden sıfır akım geçtiği durumda çalışma elektrodu ile referans elektrot arasındaki potansiyelin ölçüldüğü sistemler potansiyometrik (Khun vd. 2012); elektroaktif türlerin yükseltgenme veya indirgenme akımlarının ölçüldüğü sistemler voltametrik (Rassas vd. 2019); biyokimyasal reaksiyon sonucunda çözeltide meydana gelen iletkenliğin ölçüldüğü sistemler kondüktometrik (Shul'ga vd. 1994) ve sabit bir potansiyelde akım

şiddetinin ölçüldüğü sistemler amperometrik biyosensörler (Anusha vd. 2015) olarak tanımlanır.

Optik biyosensörler, absorpsiyon, floresans, lüminesans gibi spektroskopik yöntemlere dayanan biyosensörlerdir. Biyokimyasal bir olay sonucunda meydana gelen olaylar, spektroskopik olarak ölçülür (Cieslak vd. 2017).

Piezoelektrik biyosensörler, elektrik potansiyeli etkisi altında elastik deformasyona uğrayan kristalleri kullanır. Belli bir frekansta değişen bir potansiyel, kristalde sabit bir dalga oluşturur. Biyolojik tanıma elemanı ile kaplanmış kristal yüzeyindeki analit adsorpsiyonu, rezonans frekansını değiştirir ve bu, bağlanma meydana geldiğinin bir göstergesidir (Pohanka 2017).

Termometrik biyosensörler, biyokimyasal bir olay sonucunda meydana gelen ısı alışverişinin, hassas bir termistör ile ölçülerek analit derişiminin tayin edildiği sistemlerdir (Ramanathan ve Danielsson 2001).

Tanıma bileşenleri bir biyosensördeki en temel bileşendir. Bir biyosensörün, çok sayıda madde arasından bir veya daha fazla analite seçici olarak yanıt vermesi, tanıma bileşenine bağlıdır. Tanıma bileşenine göre biyosensörler, aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir (Korotkaya 2014):

Enzimatik biyosensörler, enzimatik reaksiyonların spesifik substratlarının belirlenmesi için tasarlanmıştır. En basit enzimatik biyosensör tasarımı, substrat veya enzimatik reaksiyonun ürününün elektrokimyasal olarak aktif olduğu, uygun bir potansiyel uygulanmasıyla elektrot yüzeyinde hızlı ve tersinir bir şekilde yükseltgenebildiği veya indirgenebildiği durumda kullanılır. Bu biyosensörlere, glukoz tayini için glukoz oksidaz bazlı biyosensör ve üre tayini için üreaz bazlı biyosensörler örnek olarak verilebilir (Gao vd. 2014, Meibodi ve Haghjoo 2014). Bunlar, en çok kullanılan enzimatik biyosensörlerdir.

İmmünoşensörler, antikor olarak bilinen immünoşobulinlerin, antijenlerle oluşturdukları güçlü komplekslere dayanan biyosensörlerdir. İmmünoşobulinler, organizmaya yabancı bileşiklerin (antijen) girişine karşılık olarak immün sistemi tarafından salgılanan, koruyucu proteinlerdir ve bu biyosensör sistemlerinde tanıyıcı bileşen olarak kullanılırlar. Herhangi bir bileşik için spesifik bir antikor olması durumunda, bu bileşik immünoşensörler tarafından yüksek seçicilik ile tayin edilebilir (Pollap ve Kochana 2019).

DNA biyosensörleri, biyokimyasal bileşeni nükleik asitler olan biyosensörlerdir. Bu biyosensörlerde bütün bir DNA zinciri değil, küçük parçaları kullanılır ve DNA probu olarak adlandırılan bu parçalar, DNA yapısının özgünlüğünü bir bütün olarak yansıtacak şekilde seçilirler. DNA probları, polimeraz zincir reaksiyonu yoluyla DNA amplifikasyonu ile sentezlenir. DNA sensörlerinde ayrıca; doğal analogu olmayan, belirli biyomoleküllerle etkileşime girme yeteneklerine göre seçilen oligonükleotit dizileri de kullanılabilir. Bu sentetik nükleik reseptörler aptamerlerin adını almıştır. Aptamerler neredeyse antikorlar kadar seçicidir ve kararlılığı antikorlardan daha fazladır. Aptamerlere dayanan DNA biyosensörleri aptasensörler olarak adlandırılır. Bu tip biyosensörler, genetik bozuklukların tayini ve genetiğı değiştirilmiş organizmalarla elde edilen ürünlerin tayini gibi amaçlar için kullanılabilirler (Rafique vd. 2019).

Mikrobiyal biyosensörler, tanıyıcı bileşen olarak mikroorganizmaların kullanıldığı biyosensörlerdir. Mikroorganizmalar çeşitli fonksiyonları yerine getirebilir. Metabolizmaları sırasında ortama salgıladıkları veya canlı hücrelerinde kalan enzimleri kullanarak analitin dönüştürülmesini sağlayabilirler. Bu biyosensörler enzim sensörlerine benzerler. Ancak enzim sensörlerinden farklı olarak, tek bir enzimin substratı dönüştürmesi yerine bir grup enzim dönüştürür. Ayrıca mikroorganizmaların ortamdaki kimyasal değişimlere karşı cevabı, madde aktarımı biyomembran vasıtası ile gerçekleştiğinden, enzim ve antikorların cevabına göre daha yavaştır. Bu yüzden çok yüksek derişimde canlı hücre gerektirir. Mikroorganizmaların etkisi, organik maddeleri yükseltgemeleri sırasında solunum aktivitelerini değiştirmelerine dayanır. Bu biyosensörler solunum biyosensörleri olarak adlandırılır (Su vd. 2011).

2.1.3 Biyomoleküllerin immobilizasyonu

Biyosensörlerin güvenilir bir şekilde çalışması için, biyolojik tanıma bileşeni çevirici yüzeyine bağlanması gerekir. Bu işleme biyolojik bileşenin immobilizasyonu denir. Immobilizasyon, biyomoleküllerin, inert bir ortam içine hapsedilerek ya da kimyasal veya fiziksel olaylarla çevirici yüzeyine bağlanması anlamına gelir. Biyomoleküllerin immobilizasyonunun yapılabilmesi için beş temel yöntem vardır (Korotkaya 2014):

Adsorpsiyon: Bu yöntem, biyosensör bileşenlerine önemli bir ön işlem yapılmasına veya özel amaçlı kimyasalların kullanılmasına ihtiyaç duyulmayan en basit immobilizasyon yöntemidir. Bu yöntemde hem fiziksel hem de kimyasal adsorpsiyon kullanılabilir. Fiziksel adsorpsiyonda, biyomolekül yüzeyde van der Waals kuvvetleri, iyonik etkileşimler veya hidrojen bağları ile tutulur. Biyomoleküller ile çevirici arasında daha kuvvetli bir bağlanma sağlamak için kimyasal bağlar ile kimyasal adsorpsiyon yapılır. Adsorpsiyon ile immobilizasyonun etkinliği genel olarak, çevirici yüzeyinin yükü, polar grupların varlığı, homojenliği ve redoks potansiyeli gibi özellikleri ile belirlenir. Adsorpsiyon ile biyomolekül, çevirici yüzeyine yüksek derişimlerde immobilize edilemez. Adsorbe edilen biyomolekül miktarını arttırmak için yüzey modifikasyonu ile veya çeşitli fonksiyonlaştırıcı yöntemler ile çeviricinin yüklü veya polar gruplara sahip olması sağlanır. Biyomoleküllerin adsorpsiyonu ile hazırlanan biyosensörler pH, sıcaklık, iyonik şiddet ve substrat derişimi gibi değişimlere karşı oldukça duyarlıdır. Bu yöntem genellikle biyomolekül ile çevirici arasında zayıf bir bağlanmanın bile yeterli olduğu, uzun süre çalışma gerektirmeyen durumlarda kullanılır (Korotkaya 2014).

Mikrokapsülleme: biyomoleküllerin immobilizasyonu için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Biyomalzeme, çözeltinin geri kalanından, analit moleküllerinin ve katalitik reaksiyonun ürünlerinin geçmesine izin veren yarı geçirgen bir zar ile ayrılır. Bu amaçla, organik çözücü içinde bulunan polimer çözeltisi ve biyobileşenin sulu çözeltisinden bir emülsiyon hazırlanır. Bu emülsiyon, polimerik matriksi içinde biyomolekülleri ve elektrolit iyonları barındıran mikrokapsüller içeren bir zar elde etmek için kurutulur. Bu immobilizasyon yöntemi, biyopolimerin hidrofilik ortamının,

tüm immobilizasyon aşamalarında bozulmadan kalmasını sağlar, böylece biyobiyoleşenin aktivitesi azalmaz. İmmobilize edilmiş biyobiyoleşen serbest halde olmakla birlikte, ölçüm hücrenin belirli bir bölümünde sınırlandırılmıştır. Bu yöntemde çok çeşitli membranlar kullanılmakta, ancak özellikle glukoz biyosensörlerinde nafyon polimeri gibi negatif yüklü membranlar tercih edilmektedir. Bu immobilizasyon yöntemi, çeşitli sensör modellerine kolayca uygulanabilir, enzimi kirlenmeye ve bozulmaya karşı korur. Genel olarak, mikrokapsüllenmiş enzimler, pH, sıcaklık, iyonik şiddet ve ortamın kimyasal bileşimindeki değişikliklere karşı dirençlidir. Bu yöntemle immobilizasyonda, gaz ve elektrolit gibi küçük moleküller membrandan geçebilir (Korotkaya 2014).

Hapsetme: polimer matrise biyomolekül hapsedilmesi yaygın yöntemlerden biridir. Polimer, organik çözücüdeki çözeltisinin çözeltinin suyla seyreltilmesi veya sensör yüzeyinde kurutulması ile elde edilebilir. Polimer ayrıca jelatin, ağar, poliakrilamid veya aljinat çözeltisinden jelleşme ile veya bazı organik esterlerin veya kloroanhidridlerin polikondensasyonu ile de elde edilebilir. İkinci tekniğe sol-gel immobilizasyonu denir. Biyomalzeme varlığında sentetik bir polimerden oluşan bir matriks hazırlanır. Ayrı polimer ipliklerini üç boyutlu bir ağda birleştirmek için genellikle bir çapraz bağlama maddesi eklenir. Biyolojik olarak aktif moleküller kendilerini polimer içinde hapsolmuş halde bulurlar. Bu yöntemin dezavantajı, ağır difüzyonu engellemesi ve analitin nüfuz etmesini zorlaştırmasıdır. Biyomoleküllerin poliyonik komplekslere hapsedilmesi, polielektrolitlerin çözeltiden tabaka tabaka biriktirilmesinde oluşan kompleksleşmeden kaynaklanmaktadır. Kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM) da bu yöntem içine dahil edilebilir. Tek tabaka oluşumu, ayrı moleküllerin polar (baş) kısmı ile destek yüzeyi arasındaki etkileşimle başlar. Destek yüzey olarak silikon, metaller ve oksitler gibi çeşitli malzemeler kullanılabilir. Moleküllerin tek tabaka halinde sıralanması, moleküllerin hidrofobik (kuyruk) kısımları arasındaki van der Waals etkileşimlerine bağlıdır. SAM'ler, biyopolimerlerin ve makromoleküler olmayan hidrofobik bileşiklerin hapsedilmesi için matriks olarak kullanılabilir (Korotkaya 2014).

Çapraz bağlama: Bu yöntemde biyomolekülün bağlanması, glutaraldehit gibi bifonksiyonel bir reaktif kullanılarak gerçekleştirilir. Glutaraldehitin çapraz bağlama

işlemine etkisine, proteinlerin ve nükleik asitlerin amino, hidroksil ve tiyol grupları ile Schiff bazları oluşturması örnek olarak verilebilir. Bu yöntemin en büyük dezavantajlarından biri, substrat difüzyonunun yavaş olabilmesidir. Ayrıca biyolojik olarak aktif bileşikler zamanla bozulabilir. Ancak yöntem, adsorbe edilmiş biyomalzemenin kararlılığının artırılmasında kullanılabilir (Korotkaya 2014).

Kovalent bağlama: Bu yöntem, biyomalzeme ve destek arasında kovalent bir bağ oluşumu anlamına gelir. Bu immobilizasyon yönteminde kullanılacak kimyasalların seçimi, bağlanacak olan moleküllere ve destek malzemeye bağlıdır. Kovalent bağlama genellikle üç adımda gerçekleştirilir: ilk adım, destek yüzeyinin temizlenmesi ve gerekli gruplarla fonksiyonlaştırılması, ikinci adım biyomalzemenin biriktirilmesi ve üçüncüsü zayıf bağlanmış moleküllerin saf bir çözücü ile uzaklaştırılmasıdır. Destek malzemelerin yüzeyini modifiye etmek için genellikle serbest $-NH_2$, $-SH$ veya $-COOH$ grupları içeren malzemeler kullanılabilir. Proteinler genellikle, yan aminoasit zincirlerinde bulunan ve biyolojik aktivitelerini etkilemeyen nükleofilik fonksiyonel grupları vasıtasıyla kovalent olarak bağlanırlar. Kovalent bağlamanın en büyük avantajı, biyomalzeme ile destek arasında güçlü bir bağlanma sağlayarak hem biyomalzeme kaybını önlemesi hem de uzun ömürlü sensörler üretilmesini sağlamasıdır (Korotkaya 2014).

2.1.4 Glukoz biyosensörleri

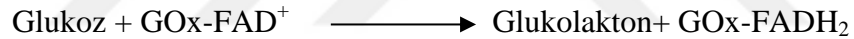
Dünyada diyabet oranlarının artmaya başlamasından dolayı, kanda glukoz tayini çalışmaları büyük önem kazanmıştır. Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında hızlı, duyarlılığı ve tekrarlanabilirliği yüksek ve düşük maliyetli olmalarından dolayı, literatürde biyosensörler ile glukoz tayini çalışmaları çok yaygındır.

Genel olarak, glukoz ölçümleri, üç enzim ile olan etkileşimlere dayanır. Bu enzimler GOx, heksokinaz ve glukoz-1-dehidrogenazdır (GDH). Bunlardan, genellikle GOx ve GDH, glukoz analizleri için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu enzimler, redoks

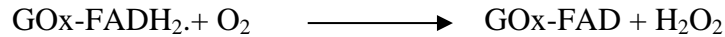
potansiyelleri, kofaktörler, devir hızı ve glukozu karşı seçicilik bakımından oldukça önemlidir (Heller ve Feldman 2008).

GOx, biyosensörler için standart enzimdir; glukoz için nispeten daha yüksek bir seçiciliğe sahiptir. GOx'in elde edilmesi kolaydır, ucuzdur ve diğer birçok enzimden daha fazla pH, iyonik şiddet ve sıcaklığa dayanabilir. Bu nedenle üretim süreci sırasında daha az sert koşullara ve serbest biyosensör kullanıcıları tarafından kullanılmak üzere nispeten rahat depolama normlarına uygundur (Heller ve Feldman 2008, Bankar vd. 2009).

Glukoz biyosensörleri, immobilize edilmiş GOx'ın, β -D-glukozun oksijen ile yükseltgenmesini katalizleyerek glukonik asit ve hidrojen peroksit oluşturması temeline dayanır. GOx'un, katalizör olarak çalışmak için bir redoks kofaktörü olan flavin adenin dinükleotide (FAD) ihtiyacı vardır. FAD ilk elektron alıcısı olarak çalışır ve FADH₂'ye indirgenir:



Kofaktör, oksijenle tepkimeye girerek yeniden üretilir ve hidrojen peroksitlerin oluşumuna neden olur:



Hidrojen peroksitin, anotta yükseltgenmesi ile elektrot, elektron transferlerinin sayısını kolayca tanır ve bu elektron akışı, kanda bulunan glukoz moleküllerinin sayısı ile orantılıdır (Yoo ve Lee 2010).



Glukoz biyosensörleri ilk olarak Clark ve Lyons (1962) tarafından, GOx enziminin O₂ elektrodu ile kombine edilerek kandaki glukoz seviyesinin ölçülmesi ile başlamıştır. O zamandan sonra, ticari olarak geliştirilen pek çok glukoz sensörü tipi mevcuttur ancak

Çizelge 2.1’de özetlendiği gibi, glukoz biyosensörleri için ilerlemeler yıldan yıla devam etmektedir (Yoo ve Lee 2010, Metkar ve Girigoswami 2019).

Çizelge 2.1 Glukoz biyosensörlerinin tarihsel gelişimi

Yıl	Gelişme
1962	Clark ve Lyons tarafından biyosensörün ilk tanımı yapıldı (Clark ve Lyons, 1962).
1967	Updike ve Hicks tarafından, ilk işlevsel enzim elektrodu üretildi (Updike ve Hicks, 1967).
1973	Hidrojen peroksit tayinine dayanan, glukoz enzim elektrotu (Guilbault ve Lubrano, 1973).
1975	İlk ticari biyosensör YSI analizörünün piyasaya sürülmesi (Newman ve Turner, 2005a).
1976	İlk başucu yapay pankreas (Bruttomesso ve Grassi, 2015).
1982	Shichiri tarafından gerçekleştirilen, deri altı implantasyonu için, ilk iğne tipi enzim elektrotu (Newman ve Setford, 2006)
1984	İlk ferrosen aracılı amperometrik glukoz biyosensörü (Cass vd, 1984)
1987	MediSense ExacTech kan şekeri biyosensörünün piyasaya sürülmesi (Newman ve Setford, 2006).
1999	Ticari bir in vivo glukoz sensörünün piyasaya sürülmesi (MiniMed)
2000	Giyilebilir non-invaziv glukoz monitörünün tanıtımı (GlucoWatch)

Birinci nesil glukoz biyosensörleri

Glukoz seviyelerini ölçmek için ilk kez 1962'de Cincinnati Çocuk Hastanesinden Clark ve Lyons tarafından önerilen glukoz biyosensörü, bir oksijen elektrotundan, bir iç oksijen yarı geçirgen zarından, ince bir GOx katmanından ve bir dış diyaliz zarından meydana gelmekteydi (Clark ve Lyons, 1962). Enzim, elektrokimyasal bir detektöre immobilize edilerek enzim elektrotlar hazırlanmıştı. Ölçülen oksijen konsantrasyonundaki, düşüş glukoz konsantrasyonuyla orantılıydı. Updike ve Hicks ise, GOx'u poliakrilamid jel içinde oksijen elektrodu üzerine bir immobilize ederek glukoz tayinini önemli ölçüde basitleştirmişlerdir (Updike ve Hicks, 1967).

Clark'ın teknolojisini kullanan ilk ticari olarak başarılı glukoz biyosensörü, 1975 yılında hidrojen peroksitin amperometrik tespitine dayanan glukozun doğrudan ölçümü için kullanılan Yellow Springs Instrument Company analizörü (Model 23A YSI analizörü) idi. Bu analizör, pahalı platin elektrot nedeniyle yüksek maliyeti nedeniyle neredeyse sadece klinik laboratuvarlarda kullanıldı (Yoo ve Lee 2010).

Birinci nesil glukoz biyosensörleri, oksijen kullanımına ve üretilen hidrojen peroksitin tespitine dayanıyordu. Peroksit oluşumunun ölçülmesi, özellikle minyatür cihazlar düşünüldüğünde daha basit olma avantajına sahiptir. Bununla birlikte, birinci nesil glukoz biyosensörleri ile ilgili ana problem, hidrojen peroksitin amperometrik ölçümünün, yüksek seçicilik için yüksek bir çalışma potansiyeli gerektirmesiydi. Askorbik asit, ürik asit ve bazı ilaçlar gibi elektroaktif türlerin girişimini en aza indirmek için 1980'lerin sonlarında kayda değer çabalar harcandı (Yoo ve Lee 2010).

İkinci nesil glukoz biyosensörleri

Birinci nesil glukoz biyosensörlerinin yukarıda belirtilen sıkıntıları, medyatörlü glukoz biyosensörleri, yani ikinci nesil glukoz sensörleri kullanarak aşılmıştır. Bu tip biyosensörlerde oksijen, redoks medyatörleri olarak adlandırılan ve elektronları enzimden çalışma elektrodunun yüzeyine taşıyan, fizyolojik olmayan elektron alıcıları ile yer değiştirmektedir. İyi bir medyatörün, oksijen ile tepkimeye girmeme, hem yükseltgenmiş hem de indirgenmiş formlarında kararlı olma, pH değişiminden etkilenmeme, tersinir elektron aktarım kinetiği gösterme ve enzimle hızla tepkimeye girme gibi özelliklere sahip olması gereklidir. Sensör performansını arttırmak için ferrosen, ferrisiyanür, kininler, tetratıalfulvalen (TTF), tetrasiyanokinodimetan (TCNQ), tiyonin, metilen mavisi ve metil viologen gibi çeşitli elektron araçları kullanılmıştır (Cass vd. 1984, Frew ve Hill 1987, Shichiri vd. 1982, Chaubey ve Malhotra 2002).

Üçüncü nesil glukoz biyosensörleri

Üçüncü nesil glukoz biyosensörleri, medyatörler olmadan, enzim ile elektrot arasındaki doğrudan elektron aktarımına dayanır. Yüksek toksisiteye sahip medyatörler yerine,

elektrot, yük aktarma komplekslerine dayanan iletken malzemeler kullanarak doğrudan elektron transferleri gerçekleştirebilir. Bu nedenle, üçüncü nesil glukoz biyosensörleri, kan glukozunun sürekli izlenmesi için implant edilebilen, iğne tipi cihazların gelişimine yol açmıştır. Medyatörlerin olmaması, biyosensörlere üstün seçicilik sağlamaktadır. Bununla birlikte, peroksidazlar dahil sadece birkaç enzimin normal elektrot yüzeylerinde doğrudan elektron transferi gösterdiği kanıtlanmıştır (Zhang ve Li 2004, Azevedo vd. 2003). Üçüncü nesil glukoz biyosensörleri ile ilgili doğrudan elektron transferi yaklaşımları için çeşitli çalışmalar rapor edilmiştir (Kahn vd. 1996, Palmisano vd. 2002, Retama vd. 2004, Vidal vd. 1998, Wu vd. 2006).

2.2 Metal Oksit Nanomalzemeler

Son yıllarda nanomalzemeler, temel bilimsel araştırmalardaki ve teknolojik uygulamalardaki önemlerinden dolayı büyük ilgi görmüştür. Bilimsel araştırmalar açısından, nanoboyuttaki malzemelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin, normal boyuttaki hallerinden oldukça farklı olduğu bilinmektedir. Bu da bu malzemelerin kuantum boyut etkisi, küçük boyut etkisi ve yüzey/arayüzey etkisi gibi sebeplerden kaynaklanmaktadır (Shi vd. 2014).

Geliştirilmiş olan çeşitli nano yapıları malzemeler arasında metal oksit nanomalzemeler, son zamanlarda biyosensör geliştirilmesinde biyomolekül immobilizasyonu için büyük ilgi görmektedir. Bu nanomalzemeler ayrıca, yüksek yüzey/hacim oranı, gelişmiş elektron aktarımı ve güçlü adsorpsiyon kabiliyeti gibi benzersiz optik ve elektronik özellikler sergileyerek, biyomoleküllerin immobilizasyonu için uygun ortam sağlar. Bu nedenlerden dolayı metal oksit nanomalzemeler, birim parçacık kütlesi başına düşen biyomolekülleri arttırmak için kullanılmaktadır (Solanki vd. 2011).

2.2.1 Metal oksit nanomalzemelerin biyosensör uygulamalarında kullanımı

Metal oksit nanomalzemeler, benzersiz optik, elektronik ve moleküler özellikleri sebebiyle biyomolekül immobilizasyonunda oldukça yararlı malzemelerdir (Luo vd

2006, Solanki vd. 2011). Metal oksit nanomalzemelere dayanan biyosensörlerin performansı, partikül büyüklüğü, etkin yüzey alanı, adsorpsiyon kabiliyeti ve elektron transfer özellikleri ile metal oksit-biyomolekül arayüzünün özellikleri geliştirilerek arttırılabilir (Solanki vd. 2011).

Biyosensör uygulamaları için metal oksit nanomalzemelerin optik ve elektrokimyasal özelliklerinin, katı-sıvı arayüzlerin ve nanobiyo arayüzlerin etkisine ilişkin araştırmalar yapılmaktadır. Verimli bir biyosensörü üretmek için, istenen biyomolekülün immobilizasyonu için uygun bir metal oksit nanomalzeme seçmek çok önemlidir. Metal oksit bir nanomalzeme ve bir biyomolekül arasındaki bağlanma nedeniyle oluşan ara yüzün, biyosensör performansını etkilediği bilinmektedir (Solanki vd. 2011). Bir nano biyoarayüzün oluşumu ve özellikleri metal oksit nanomalzemenin doğasına bağlıdır; etkin yüzey alanı, yüzey yükü, enerji, pürüzlülük ve gözeneklilik, değerlik/iletkenlik durumları, fonksiyonel gruplar, fiziksel haller ve higroskopik yapı gibi parametrelerin tümü biyoarayüzün oluşumunu etkiler (Solanki vd. 2011).

Genel olarak, biyomoleküller, metal oksit nanomalzemelere fiziksel adsorpsiyon veya kimyasal bağlanma yoluyla bağlanır. Bir biyomolekülün zayıf etkileşimlerden kaynaklanan fiziksel adsorpsiyonu; yüzey morfolojisi, reaksiyon ortamı ve net yüzey yüküne bağlıdır. Yük, sterik ve çözücü etkileşimleri gibi durumlarla ortaya çıkan kısa mesafeli kuvvetler, bir nano biyoarayüzün hazırlanmasında da önemli bir rol oynar. Bir biyomolekülün, metal oksit bir nanomalzemeye kovalent bağlanması, uygun kimyasal reaksiyonlar ile hazırlanabilen fonksiyonel grupların mevcudiyetine bağlıdır. Etkili bir metal oksit nanomalzeme biyoarayüzey, biyoyumlu bir mikroortam oluşturarak, bir biyolojik molekülün biyolojik aktivitesini yüksek kararlılık ile sürdürmesine yardımcı olabilir. Elektron aktarım oranı metal oksit nanomalzeme-biyomolekül etkileşimlerinin özelliklerine bağlıdır. Bu nedenle, metal oksit nanomalzemelerin kullanımı ile daha düşük maliyet, daha uzun raf ömrü gibi gelişmiş duyarlık ve tayin sınırlarına sahip biyosensörlerin geliştirilmesi mümkündür (Solanki vd. 2011).

2.2.2 Metal oksit nanomalzemelerin biyosensör uygulamalarında kullanımı ile ilgili kaynak özetleri

Glukoz tayini için, metal oksit nanomalzemeler kullanılarak geliştirilen amperometrik biyosensörler ile ilgili çalışmalar incelendi ve bir kısmı aşağıda kısaca özetlendi.

Guo vd. (2017) tarafından, TiO_2 oyuk nanolifler kullanılarak, glukoz tayinine yönelik biyosensör hazırlanmıştır. Bu amaçla, içi oyuk TiO_2 nanolifleri hazırlanmış, GCE yüzeyine modifiye edilmiş ve GOx enzimi immobilize edilerek biyosensör hazırlanmıştır. İçi oyuk TiO_2 nanoliflerinin, enzim immobilizasyonu için geniş yüzey alanı ve gözenekli yapı sağladığı belirtilmiştir. Amperometrik çalışmalar $-0,45 \text{ V}$ 'ta yapılmış; $2,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ - $3,17 \times 10^{-3} \text{ M}$ doğrusal çalışma aralığında duyarlık $32,6 \mu\text{A mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ olarak bulunmuştur. Altı farklı biyosensör ile hesaplanan tekrar üretilebilirlik için bağıl standart sapma %4,8 olarak rapor edilmiş; biyosensörün 2 hafta boyunca $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklanması ile biyoaktivitesinin %95,7'sini koruduğu belirtilmiştir.

Yang vd. (2014), GOx immobilizasyonu için, dikey şekilli TiO_2 nanoçubuklar sentezlemiştir. Hazırlanan nanoçubuklar, kitosan çözeltisinde dağıtılarak GCE yüzeyine modifiye edilmiş, ardından GOx immobilize edilerek biyosensör hazırlanmıştır. Dikey şekilli TiO_2 nanoçubukların enzim immobilizasyonu için geniş yüzey alanı sağladığı ve enzim ile elektrot yüzeyi arasında elektron aktarımını arttırdığı belirtilmiştir. Biyosensörün $-0,50 \text{ V}$ 'ta $5,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ - $1,32 \times 10^{-3} \text{ M}$ doğrusal çalışma aralığında $23,2 \mu\text{A mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ duyarlığa sahip olduğu kaydedilmiştir. Michaelis – Menten (K_M) sabiti 0,40 olarak hesaplanmış ve bulunan değerin düşük olması, modifiye elektroda immobilize edilen GOx'un glukozla ilgisinin yüksek olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Biyosensörün glukoz cevabına askorbik asit ve ürik asitin etkisi incelenmiş ve bu türlerin biyosensör cevabına belirgin bir etki yapmadığı belirtilmiştir. Hazırlanan biyosensör insan serumunda glukoz tayini için kullanılmış ve beş ölçüm için geri kazanımlar %1,2 bağıl standart sapma ile %103 ve %1,9 bağıl standart sapma ile %100 olarak rapor edilmiştir. Feng vd. (2013b), Ag modifiye TiO_2 nanotüplerine dayanan glukoz biyosensörü geliştirmişlerdir. TiO_2 nanotüpleri sentezlendikten sonra, Ag nanopartikülleri TiO_2 nanotüplerine fotokatalitik indirgenme ile modifiye edilmiş ve GOx immobilize edilerek

glukoz biyosensörü hazırlanmıştır. Biyosensörün +0,70 V'ta glukozu amperometrik cevabı ölçülmüş ve glukozu $0,39 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ duyarlılıkla cevap verdiği gözlenmiştir. Biyosensörün doğrusal cevap aralığı $1,0 \times 10^{-4} \text{ M} - 4,0 \times 10^{-3} \text{ M}$, gözlenebilme sınırı 0,1 mM ve cevap süresi 40 s olarak belirlenmiştir. Ag modifiye TiO_2 nanotüplerin geniş yüzey alanı sağladığı, bunun da duyarlılığı iyileştirdiği ve gözlenebilme sınırını düşürdüğü belirtilmiştir.

Kaushik vd. (2008) tarafından yapılan çalışmada, amperometrik glukoz tayini için kitosan- Fe_3O_4 nanopartiküllerine dayanan biyosensör geliştirilmiştir. Bu çalışmada $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ 'lerin, biyoyumlu olması, süperparamanyetik özelliğe ve düşük toksisiteye sahip olması gibi sebeplerle biyosensör yapımında kullanıldığı belirtilmiştir. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ 'lerin en büyük problemi kümelenme ve bir araya toplanma sorununu aşmak için ise; film yapma kabiliyeti, mekanik kuvveti, biyoyumluluğu gibi özelliklerinden dolayı kitosan kullanılmış ve nanopartiküller kitosan çözeltisinde dağıtılarak ITO yüzeyine modifiye edilmiştir. Bu modifiye elektrot üzerine de GOx immobilize edilerek, amperometrik glukoz biyosensörü hazırlanmıştır. Biyosensörün, glukozu $5,0 \times 10^{-4} - 2,2 \times 10^{-3} \text{ M}$ doğrusal çalışma aralığında, $9,3 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ duyarlılıkla cevap verdiği ve cevap süresinin 5 s civarında olduğu rapor edilmiştir. Girişim yapan türlerin etkisini belirlemek için 5,6 mM glukoz ile birlikte 5 mM kolesterol, 0,05 mM askorbik asit, 0,1 mM ürik asit ve 1 mM ürenin biyosensör cevabına etkisi incelenmiş ve bozucu türlerin neredeyse bir etkisinin olmadığı, yalnızca kolesterolün %6 kadar girişim yaptığı belirtilmiştir.

Wang vd. (2012) tarafından, GOx immobilizasyonu için Fe_3O_4 manyetik nanopartiküller sentezlenmiştir. Çıplak $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ 'lerin kümelenme sorununun düşük kararlılığa sebep olmasından dolayı, fonksiyonlu hale getirilmeleri önerilmiştir. Bu amaçla $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ 'ler, silanol grupları kararlılığı arttırdığı için silika ile ve geniş yüzey alanı, biyoyumlu olması, adsorpsiyon kabiliyetinin yüksek olması ve iletkenliğinin yüksek olması sebepleriyle AuNP'ler ile fonksiyonlaştırılmıştır. Elde edilen manyetik nanopartiküller GOx immobilizasyonu ile glukoz sensörü hazırlanması için yüzey olarak kullanılmıştır. Hazırlanan biyosensörün glukozu -0,40 V'ta $3,97 \times 10^{-3} \text{ M}$ ' kadar doğrusal cevap verdiği belirtilmiştir. Biyosensörün duyarlılığı $62,45 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ ve

gözlenebilme sınırı 0,23 μM olarak rapor edilmiştir. Bozucu türlerin etkisini incelemek için 0,4 mM glukoz varlığında 0,01 mM ürik asit ve 0,01 mM askorbik asit içeren pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde CV'leri alınmış ve belirgin bir girişim etkisi gözlenmemiştir. Biyosensörün kararlılığı da dönüşümlü voltametri ile incelenmiş, ard arda alınan 50 döngü sonunda GOx'a ait akımın %1,61 düştüğü belirlenmiştir. Ayrıca biyosensörün 0,13 mM glukozla cevabının beş ölçüm için bağıl standart sapması %5,75; beş farklı biyosensör ile 0,4 mM glukozla cevapların bağıl standart sapması da %5,46 bulunmuştur.

Wang vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada, grafen oksit Fe^{2+} iyonları ile tamamen indirgenmesi sağlanarak indirgenmiş grafen oksit - $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ 'lerden oluşan rGO/ Fe_3O_4 nanokompoziti, glukoz tayininde kullanılmıştır. Hazırlanan nanokompozit GCE yüzeyine modifiye edilmiş ve GOx immobilize edilerek glukoz biyosensörü hazırlanmıştır. Biyosensör ile -0,40 V'ta $5,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-2}$ M doğrusal çalışma aralığında, $2,645 \mu\text{A mM}^{-1}$ duyarlık elde edilmiştir. Biyosensörün saklama kararlılığı incelendiğinde, 1 hafta ve 2 hafta sonunda sırasıyla %97 ve %90 oranında aktivitesini koruduğu belirlenmiştir. Biyosensörün cevabına bozucu türlerin etkisini belirlemek için, -0,40 V'ta askorbik asit, dopamin ve ürik asit derişimi 1 mM olacak şekilde fosfat tampon çözeltisine eklenmiş ve ardından 0,2 mM glukoz eklenerek akım cevapları karşılaştırılmıştır. Üç bozucu türün yaptığı girişimlerin ihmal edilebilir seviyede olduğu belirtilmiştir.

Karupiah vd. (2014) tarafından, grafen ve $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ kompoziti hazırlanarak GCE yüzeyine modifiye edilmiştir. Model enzim olarak seçilen GOx, modifiye elektrot yüzeyine immobilize edilerek glukoz biyosensörü hazırlanmıştır. $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ 'lerin yüzey alanı/hacim oranının yüksek olması ve yüksek kimyasal kararlılığa sahip olması nedeniyle dikkat çektiği belirtilmiştir. Biyosensörün glukozla, $5,0 \times 10^{-4} - 1,6 \times 10^{-2}$ M doğrusal çalışma aralığında, $13,52 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ duyarlıkla cevap verdiği ve gözlenebilme sınırının 0,05 mM olduğu rapor edilmiştir. Geliştirilen biyosensörün kararlılığını belirlemek amacıyla, 5 mM glukoz içeren fosfat tampon çözeltisinde pik akım cevapları ölçülmüş ve biyosensörün +4 °C'de 9 gün saklanması sonunda başlangıç duyarlığının yaklaşık %89'unu koruduğu belirlenmiştir. Tekrar üretilebilirliği

belirlemek için dört ayrı biyosensör ile yapılan ölçümler sonucunda bağıl standart sapma %3,7 ve tekrar kullanılabilirliği belirlemek amacıyla aynı elektrotla 10 kez yapılan ölçümler sonucunda bağıl standart sapma %3,9 olarak rapor edilmiştir.

Ding vd. (2010) tarafından, Co_3O_4 nanolifler geliştirilerek elektrot modifikasyon malzemesi olarak kullanılmıştır. Co_3O_4 nanolifler, GCE yüzeyine modifiye edilip Nafyon çözeltisi ile kaplanarak enzimsiz glukoz biyosensörü geliştirilmiştir. Sensörün glukozla, +0,59 V'ta, $13,52 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ duyarlılıkla, $2,04 \times 10^{-2} \text{ M}$ 'a kadar doğrusal olarak cevap verdiği ve gözlenebilme sınırının 2,04 mM olduğu belirtilmiştir. Biyosensörün seçiciliğini belirlemek için, 4 mM glukoz çözeltisinde 0,125 mM askorbik asit ve 0,33 mM ürik asitin glukoz cevabına etkisi incelenmiş ve sırasıyla %14 ve %17 girişim yaptıkları belirlenmiştir. Ancak aynı bozucu türler, glukoz içermeyen çözeltiye ayrı ayrı aynı derişimlerde ilave edildiğinde, 4 mM glukoz cevabına karşı etkileri askorbik asit ve ürik asit için sırasıyla %23,16 ve %33,70 olarak kaydedilmiştir. Ayrıca klorür iyonunun, enzimatik olmayan glukoz sensörlerine genellikle bozucu etki yaptığının rapor edildiği belirtilmiş, bu nedenle sensörün 4 mM glukoz cevabına karşı 0,1 N NaCl'nin etkisi incelenmiş ve herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Hazırlanan sensör, kan serum numunesinde glukoz tayininde kullanılması düşünülmüştür. Hazırlanan sensör ile standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar, ticari bir glukoz sensörü ile elde edilenlerle karşılaştırılmış ve iki yöntemle elde edilen sonuçların birbiri ile uyumlu olduğu belirtilmiştir.

Fan vd. 2016 tarafından yapılan çalışmada, yumurta kabuğu membranları kullanılarak 3 boyutlu hiyerarşik gözenekli $\text{Co}_3\text{O}_4/\text{ZnO}$ film hazırlanmış ve GOx enzimi immobilize edilmiştir. ZnO'in n-tipi ve Co_3O_4 'in p-tipi yarı iletkenler olması sonucunda oluşan p-n bağlantısı sebebiyle, yapının benzersiz elektronik özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir. p-tipi Co_3O_4 ve n-tipi ZnO'nun kombinasyonunun, p-n bağlantı arayüzünde bir iç elektrik alanı oluşumuna yol açtığı, bu durumun da analitten elektroda yüksek bir elektron aktarım yolu sağlayabildiği ve elektronu aktarım oranını arttırdığı belirtilmiştir. Ayrıca ZnO'in izoelektrik noktasının yaklaşık 9,5 ve Co_3O_4 'in yaklaşık 8 olmasının, izoelektrik noktası 4,2 olan GOx'in immobilizasyonunu elektrostatik etkileşimler yoluyla güvenilir bir şekilde sağladığı ve yüksek bağlanma kararlılığı ve biyoaktiviteye

sahip olduğu belirtilmiştir. Hazırlanan biyosensörün +0,25 V'ta glukoz duyarlılığı 0,1 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ ve gözlenebilme sınırı 107,70 μM olarak rapor edilmiştir. Bozucu türlerin etkisini belirlemek için, 0,2 mM glukoz içeren çözeltide 0,02 mM ürik asit, askorbik asit, dopamin ve kolin klorürün cevabı incelenmiş ve glukoz cevabı ile karşılaştırıldığında bozucu türlerin belirgin bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Biyosensör ile ard arda alınan CV'ler ile, 20 döngü sonunda akım cevabının %20 azaldığı; ayrıca 3 hafta saklandıktan sonra da aktivitesinin %91'ini koruduğu rapor edilmiştir.

Wu vd. (2017) tarafından, glukoz tayini için plazma polianilin (pPANI), SnO_2NP ve 3 boyutlu indirgenmiş grafen oksit (rGO) nanokompoziti geliştirilmiştir. SnO_2NP 'in, rGO'ün fonksiyonlaştırılarak daha iyi dağılmasını sağlamak için kullanıldığı belirtilmiştir. SnO_2NP 'in rGO yüzeyine sabitlenmesi ile yapıya aktif adsorpsiyon bölgeleri eklenmiş ve grafen tabkalarının kümelenmesi engellenmiştir. Hazırlanan nanokompozit altın elektrot yüzeyine modifiye edilmiş ve GOx immobilize edilerek glukoz biyosensörü hazırlanmıştır. Biyosensörün 0,36 V'ta 0,1 ng mL^{-1} ve 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ doğrusal çalışma aralığında 1,124 $\mu\text{A (ng mL}^{-1})^{-1}$ duyarlıkla cevap verdiği, gözlenebilme sınırının ise 0,047 ng mL^{-1} olarak bulunduğu rapor edilmiştir. Aynı şartlarda hazırlanan 5 farklı biyosensör ile glukoz karşı amperometrik cevaplar ölçülerek biyosensörün tekrar üretilebilirliği incelenmiş ve bağıl standart sapma %5,3 olarak hesaplanmıştır. Biyosensörün kararlılığı, biyosensör ile belirli aralıklarla ölçüm alınıp, kullanılmadığında +4 °C'de saklanarak belirlenmiş ve 1 hafta sonunda aktivitesinin %92'sini; 1 ay sonunda ise %83'ünü koruduğu belirlenmiştir. Biyosensörün gerçek numunelere uygulanabilirliği kan serum numunelerinde glukoz tayini yapılarak belirlenmiştir. Çeşitli kan numunelerine standart katma yöntemi ile yapılan glukoz tayinlerinde geri kazanımlar %109 ile %117 arasında bulunmuştur.

Nor vd. (2017) tarafından, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{NP}$ 'ler sentezlenmiş ve fonksiyonlu gruplar elde etmek ve daha hidrofilik bir yüzey oluşturmak için sitrik asit ile fonksiyonlaştırılmıştır. Demir oksit nanopartiküllerin biyosensör uygulamalarında kimyasal ve biyolojik olarak inert olmaları, toksik olmamaları, süperparamanyetik özelliğe sahip olmaları, ucuz olmaları, yüksek iletkenliğe ve katalitik özelliklere sahip olmaları nedeniyle ilgi çektiği,

ancak kümelenme sorunu olduğu belirtilmiştir. Bu sorunu aşmak ve aynı zamanda enzim immobilizasyonu için fonksiyonlu bir yüzey sağlamak amacıyla karboksil gruplarına sahip küçük bir molekül olan sitrik asitle fonksiyonlaştırıldığı belirtilmiştir. Elde edilen fonksiyonlu γ -Fe₂O₃NP'ler perde baskılı elektrot yüzeyine modifiye edilerek GOx enzimi immobilize edilmiş ve enzim kaybını önlemek için koruyucu bir film tabakası olan Nafyon ile kaplanmıştır. Hazırlanan biyosensörün glukoz cevabı -0,43 V'ta kronoamperometrik yöntemle incelenmiştir. Biyosensörün $2,0 \times 10^{-5} - 2,5 \times 10^{-4}$ M doğrusal çalışma aralığında, $175 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ ve $2,5 \times 10^{-4} - 8,0 \times 10^{-3}$ M doğrusal çalışma aralığında, $5,31 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ duyarlığa sahip olduğu; gözlenebilme sınırının ise $7 \mu\text{M}$ olduğu rapor edilmiştir. Biyosensörün tekrarlanabilirliği, aynı elektrot ile 1 mM glukoz çözeltisinde ard arda CV'leri alınarak belirlenmiş ve 10 döngü sonunda pik akım değeri başlangıç değerinin %93'ünü korumuştur. Tekrar üretilebilirlik ise 7 farklı biyosensör hazırlanıp her birinin 1 mM glukoz çözeltisine cevabı incelenerek belirlenmiş ve bağıl standart sapma %4,2 olarak bulunmuştur. Ürik asit, askorbik asit ve L-sisteinin, biyosensör cevabına girişim etkisini belirlemek amacıyla, 2 mM glukoz çözeltisine her bir çözelti 0,1 mM olacak şekilde eklenmiş ve yalnızca L-sisteinin belirgin bir etkisi olduğu (%15 civarında) belirtilmiştir.

Lin vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada, gözenekli Al₂O₃/Al folyo yüzeyine nanotüy şeklinde Pt nanoyapılar modifiye edilmiştir. Bu modifiye elektroda GOx enzimi immobilize edilerek glukoz tayini için bir biyosensör geliştirilmiştir. Biyosensör glukozu, +0,60 V'ta $2,5 \times 10^{-4} - 8,0 \times 10^{-3}$ M doğrusal çalışma aralığında, $56,79 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ duyarlılıkla cevap vermiştir. Biyosensörün gözlenebilme sınırı $12,5 \mu\text{M cm}^{-2}$ olarak belirlenmiştir. Biyosensöre bozucu etki yapan türlerin etkisini belirlemek için, 5,6 mM glukoz içeren çözeltiliye 0,4 mM fruktoz, 4,3 mM üre ve 0,1 mM askorbik asit eklenmiş ve fruktozun glukoz cevabına belirgin bir etkisinin olmadığı; üre ve askorbik asitin ise sırasıyla %4,79 ve %8,30 girişim yaptığı belirlenmiştir. Biyosensörün kararlılığını belirlemek amacıyla 1 hafta boyunca 1 mM glukozu verdiği akım cevabı incelenmiş ve 1 hafta sonunda biyosensör cevabının %64,04 düştüğü gözlenmiştir. Bu durum, biyosensörün kararlılığının geliştirilmesi gerektiği şeklinde yorumlanmıştır.

Buk vd. (2016) tarafından, aljinat ve CuONP'lere dayanan bir biyosensör geliştirilmiş ve GOx immobilize edilerek glukoz tayininde kullanılmıştır. CuONP'lerin yüksek kararlılık ve düşük maliyete sahip olduğu, elektronik ve katalitik özelliklerinin dikkat çekici olduğu belirtilmiş; geliştirilen sensörde kararlılığı sağlamak ve katalitik özelliklerinden yararlanmak için kullanıldığı belirtilmiştir. Aljinat hidrojelinin ise GOx'ı çapraz bağlaması ile, immobilizasyon matrisi olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Geliştirilen biyosensörün +0,65 V'ta glukozu $4,0 \times 10^{-5} - 3,0 \times 10^{-3}$ M ve $4,0 \times 10^{-3} - 3,5 \times 10^{-2}$ M derişim aralıklarında doğrusal olarak cevap verdiği ve bu aralıklarda duyarlılıkların sırasıyla $30,443 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ ve $7,205 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ olarak bulunduğu belirtilmiştir. Biyosensörün gözlenebilme sınırı $1,6 \mu\text{M}$ olarak rapor edilmiştir. Biyosensörün seçiciliği, tampon çözeltiye askorbik asit, ürik asit, asetaminofen ve fenilalanin türlerinin her birinin derişimi $0,01 \text{ mM}$ olacak ard arda şekilde eklenip, sonrasında da $2,5 \text{ mM}$ ve $0,75 \text{ mM}$ glukoz eklenmesi ile belirlenmiştir. Bozucu etkisi araştırılan bu türlerin glukoz cevabına belirgin bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Biyosensörün tekrar üretilebilirliği, aynı şartlarda hazırlanan 6 biyosensörün, 40 mM glukoz çözeltisine cevabı ölçülerek belirlenmiş ve bağıl standart sapma $\%0,94$ olarak bulunmuştur. Biyosensörün kararlılığı, $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanan biyosensörün 15 gün boyunca glukoz cevabı ölçülmesi ile belirlenmiş ve 2, 4, 6, 10 ve 15. günlerde biyosensörün aktivitesinin sırasıyla $\%98$, $\%97$, $\%93$, $\%86$ ve $\%78$ 'ini koruduğu rapor edilmiştir. Biyosensörün analitik uygulanabilirliğini belirlemek için kan serum numunelerinde glukoz tayini yapılmış ve geri kazanımlar $\%97,9$ ile $\%99,4$ arasında bulunmuştur.

Hu vd. (2011) tarafından, MWCNT ve ZnONP'lere dayanan bir glukoz biyosensörü geliştirilmiştir. ZnONP'lerin biyoyumluluğu, toksik olmaması, katalitik verimliliği, kuvvetli adsorpsiyon kabiliyeti ve hızlı elektron aktarım oranı gibi özelliklere sahip olduğu; GOx immobilizasyonu için de uygun bir yüzey oluşturması ve GOx ile elektrot arasında başarılı bir şekilde elektron aktarımını gerçekleştirilmesi sebebiyle bu çalışmada tercih edildiği belirtilmiştir. Biyosensörü hazırlamak amacıyla önce MWCNT'nin kitosanda dağıtılması ile elde edilen süspansiyon, GCE yüzeyine damlatılarak kurutulmuş, bu modifiye elektroda GOx immobilize edilmiştir. Ardından hazırlanan GOx/MWCNTs/GCE yüzeyine ZnONP'leri elektrokimyasal olarak kaplanmış ve üzerine tekrar GOx immobilize edilmiştir. Bu yöntemle MWCNT'nin hem ZnONP'leri

sabit ve kararlı bir halde tuttuğu, hem de geniş yüzey alanı sayesinde GOx immobilizasyonunu iyileştirdiği belirtilmiştir. Geliştirilen biyosensörün -0,30 V'ta $6,67 \times 10^{-6} - 1,29 \times 10^{-3}$ M doğrusal çalışma aralığında, glukozu $10,03 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ duyarlılıkla cevap verdiği rapor edilmiştir. Biyosensörün gözlenebilirlik sınırı $2,22 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Biyosensörün kararlılığını belirlemek için 27 gün boyunca belirli aralıklarla $0,6 \text{ mM}$ glukozu karşı cevabı incelenmiş ve 10. gün ve 27. gün sonunda, biyosensörün başlangıçtaki aktivitesinin sırasıyla %6,4 ve %14,9'unu kaybettiği belirlenmiştir. Biyosensörün seçiciliği, $0,6 \text{ mM}$ glukoz içeren çözeltiye $1,0 \text{ mM}$ L-sistein, $1,0 \text{ mM}$ glisin, $1,0 \text{ mM}$ askorbik asit ve $1,0 \text{ mM}$ dopamin eklenerek incelenmiş ve bu türlerin belirgin bir bozucu etki yapmadığı gözlenmiştir.

2.3 Cevap Yüzey Yöntemleri

Optimizasyon; en yüksek faydayı elde etmek için bir sistemin, yöntemin veya ürünün performansını arttırmak anlamına gelir ve özellikle analitik kimyada, bir yöntemden en iyi cevabı alabilmek için uygun şartları belirlemek amacıyla optimizasyon işlemi sıklıkla kullanılır (Araujo ve Brereton 1996).

Analitik kimyada optimizasyon yöntemi genel olarak bir seferde bir faktörün deneysel bir cevap üzerindeki etkisinin incelenmesi ile gerçekleştirilir. Sadece bir parametre değiştirilirken diğerleri sabit tutulur. Bu optimizasyon yöntemi tek seferde tek değişken olarak adlandırılır (Bezerra vd. 2008). Bu yöntemin dezavantajı, çalışılan değişkenler arasındaki etkileşimlerin etkilerinin incelenememesidir. Bu yüzden bu yöntem değişkenin cevap üzerindeki etkilerini tam olarak gösteremez. Tek faktörlü optimizasyonun diğer bir dezavantajı, araştırmayı yürütmek için gereken deney sayısındaki artıştır, bu da zaman ve harcamaların yanı sıra reaktiflerin ve malzemelerin tüketiminin artmasına neden olmaktadır (Lundstedt vd. 1998, Bezerra vd. 2008).

Bu sorunun üstesinden gelmek için optimizasyon işlemi, çok değişkenli istatistik yöntemleri kullanılarak yapılmaya başlanmıştır. Analitik optimizasyonda kullanılan çok değişkenli teknikler arasında en çok kullanılanı cevap yüzey yöntemidir (CYY). CYY, deneysel verilerin bir polinom denklemine uygun hale getirilmesine dayanan

matematiksel ve istatistiksel yöntemler topluluğudur ve bir veri topluluğunun davranışını istatistiksel öngörüler yardımıyla tanımlar. İlgilenilen cevap veya cevap dizisi birden fazla değişkenden etkilendiğinde iyi uygulanan bir yöntemdir. Amaç, en iyi sistem performansını elde etmek için bu değişkenlerin seviyelerini eşzamanlı olarak optimize etmektir (Bezerra vd. 2008).

CYY uygulanmadan önce ilk olarak çalışılan deneysel alanda hangi deneylerin yapılması gerektiğini tanımlayacak deneysel bir tasarım seçilmelidir. Bunun için bazı deneysel matrisler vardır. Veri setinin eğrilik göstermediği durumlarda birinci dereceden modeller için deneysel tasarımlar (örneğin faktöriyel tasarımlar) kullanılabilir. Bununla birlikte, doğrusal fonksiyonlarla tanımlanamayan deneysel verilere bir cevap fonksiyonunu yaklaştırmak için, üç seviyeli faktöriyel tasarım, Box-Behnken tasarımı, merkezi kompozit tasarım ve Doehlert tasarımı gibi kuadratik cevap yüzeyleri için deneysel tasarımlar kullanılmalıdır (Bezerra vd. 2008).

2.3.1 Gerekli terimler

Deneysel alan, çalışılan deney değişkenlerinin minimum ve maksimum limitleriyle tanımlanır.

Deneysel tasarım, incelenen değişkenlerin farklı seviye kombinasyonlarından oluşan bir matris tarafından tanımlanan özel bir deney setidir.

Faktörler veya *bağımsız değişkenler*, birbirinden bağımsız olarak değiştirilebilen deneysel değişkenlerdir. Tipik bağımsız değişkenler, pH, sıcaklık, reaktif konsantrasyonu, akış hızı olabilmektedir.

Seviye, bir değişkenin incelendiği farklı değerleridir.

Cevaplar veya *bağımlı değişkenler*, deneylerden elde edilen sonuçların ölçülen değerleridir. Örneğin absorpsiyon, net emisyon yoğunluğu ve elektrik sinyali gibi analitik sinyaller tipik cevaplardır.

Artık, belirli koşullarda hesaplanan sonuç ile deneysel sonuç arasındaki farktır. Deneysel verilere uygun iyi bir matematiksel model, düşük artık değerleri göstermelidir (Lundstedt vd. 1998, Bezerra vd. 2008).

2.3.2 Teorisi ve uygulama basamakları

CYY ilk olarak Box ve Wilson tarafından 1951 yılında tanımlanmıştır (Box ve Wilson, 1951). Bu terim, matematiksel modelin uygunluğundan sonra oluşturulan grafiksel bakış açısıyla ortaya çıkmıştır ve kullanımı, kemometri ile ilgili metinlerde yaygın olarak kabul edilmiştir. CYY, deneysel tasarımla ilgili olarak elde edilen deneysel verilere ampirik modellerin uygunluğuna dayanan bir grup matematiksel ve istatistiksel teknikten oluşur.

CYY'nin optimizasyon yöntemi olarak uygulanmasındaki bazı aşamalar şunlardır:

1. Çalışmanın amacına ve araştırmacının deneyimine göre çalışmaların izlenmesi ve deneysel alanın sınırlandırılması yoluyla sistemdeki ana etkilere ait bağımsız değişkenlerinin seçimi
2. Deneysel tasarımının seçilmesi ve seçilen deney matrisine göre deneylerin yapılması
3. Elde edilen deneysel verilerin bir polinom fonksiyonuna uygun olarak matematiksel - istatistiksel olarak işlenmesi
4. Modelin uygunluğunun değerlendirilmesi
5. Optimum alana doğru bir yer değiştirme geręekleştirme gerekliliğinin ve olasılığının doğrulanması
6. Çalışılan her değişken için optimum değerlerin elde edilmesi (Bezerra vd. 2008).

Çok sayıda değişken, çalışılan sistemin cevabını etkileyebilir ve her birinin küçük katkılarını belirlemek ve kontrol etmek neredeyse imkansızdır. Bu nedenle, büyük etkileri olan bu değişkenleri seçmek gerekir. Hangi değişkenlerin ve etkileşimlerin daha önemli etkiler sunduğunu belirlemek için tarama tasarımları yapılmalıdır. Tam veya

kısmi tasarımlar verimli ve ekonomik olmaları sebebiyle bu amaç için kullanılabilirler (Bezerra vd. 2008).

2.3.3 Deneysel tasarım seçimi

RSM'de kullanılacak en basit model doğrusal bir fonksiyona dayanır. Uygulaması için, elde edilen cevapların aşağıdaki denkleme uygun şekilde yerleştirilmesi gereklidir:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon$$

Bu denkleme k değişken sayısını, β_0 sabit terimi, β_i doğrusal parametrelerin katsayılarını, x_i değişkenleri ve ε da artıkları ifade etmektedir.

Buna göre cevaplar herhangi bir eğrilik göstermemelidir. Eğriliği değerlendirmek için ikinci dereceden bir model kullanılmalıdır. İki seviyeli faktöriyel tasarımlar birinci dereceden etkilerin tahmininde kullanılır, ancak ikinci dereceden etkiler gibi ek etkiler önemli olduğunda başarısız olur. Bu nedenle, iki seviyeli faktöriyel tasarımlarda merkezi bir nokta, eğriliği değerlendirmek için kullanılabilir. Polinom modelinin bir sonraki seviyesi, farklı deney değişkenleri arasındaki etkileşimi tanımlayan ek terimler içermelidir. Bu şekilde, ikinci dereceden bir etkileşim için bir model aşağıdaki şekilde ifade edilir:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Burada β_{ij} etkileşim parametrelerinin katsayılarını ifade eder.

Kritik bir noktayı (maksimum veya minimum gibi) belirlemek için, polinom fonksiyonunun aşağıda sunulan denkleme göre ikinci dereceden terimler içermesi gerekir:

$$y = \beta_o + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i \leq j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Burada β_{ii} , kuadratik parametrenin katsayılarını temsil eder. Bu denklemdaki parametreleri tahmin etmek için, deneysel tasarım çalışılan tüm değişkenlerin en az üç faktör seviyesinde yapılmasını sağlamalıdır (Bezerra vd. 2008). Böylece simetrik cevap yüzey tasarımları mevcut olur. Bilinen ikinci dereceden simetrik tasarımlar arasında üç seviyeli faktöriyel tasarım, Box-Behnken tasarımı, merkezi kompozit tasarım ve Doehlert tasarımı bulunmaktadır. Bu simetrik tasarımlar birbirlerinden deneysel nokta seçimi, değişkenlerin seviye sayısı ve deney sayısı gibi yönlerden farklılık gösterirler (Bezerra vd. 2008).

2.3.4 Uygun modelin değerlendirilmesi

Fonksiyonun verilere uygun hale getirilmesinden sonra bulunan matematiksel model, çalışılan deneysel alanı bazen tatmin edici şekilde tanımlayamaz. Uygulanan modeli değerlendirmenin daha güvenilir yolu, varyans analizi (ANOVA) uygulamasıdır (Bezerra vd. 2008). ANOVA'nın ana fikri, işlemde kaynaklanan değişimi (değişken seviyelerin kombinasyonundaki değişiklik), üretilen yanıtların ölçümlerine özgü rastgele hatalardan kaynaklanan değişikliklerle karşılaştırmaktır. Bu karşılaştırmadan, deneysel varyans kaynaklarını göz önüne alarak yanıtları öngörmek için kullanılan regresyonun önemini değerlendirmek mümkündür (Bezerra vd. 2008).

ANOVA'da veri seti varyasyonunun değerlendirilmesi, dağılımı incelenerek yapılır (Bezerra vd. 2008). Her bir ölçüm veya tekrarlarına ait sapmanın karesine ait eşitlik aşağıda verilmiştir.

$$d_i^2 = (y_{ij} - \bar{y})^2$$

Tüm gözlem sapmalarının kareler toplamı toplam kareler toplamı (SS_{top}) olarak adlandırılır; uygun matematiksel modele yani regresyona bağlı kareler toplamı (SS_{reg}) ile model tarafından üretilen artıklara bağlı kareler toplamının (SS_{kay}) toplamına eşittir:

$$SS_{top} = SS_{reg} + SS_{kay}$$

Merkezi noktanın tekrarları yapıldığı için, tekrarlarla ilişkili saf hatayı tahmin etmek mümkündür. Bu nedenle, artıklara bağlı kareler toplamı ikiye ayrılabilir: saf hata ile ilgili kareler toplamı (SS_{sh}) ve uyumsuzluk ile ilgili kareler toplamı (SS_{lof}):

$$SS_{kay} = SS_{sh} + SS_{lof}$$

Her bir varyasyon kaynağı için (toplam, regresyon, artık, uyumsuzluk ve saf hata) kareler toplamlarının, kendi serbestlik derecelerine (df) bölünmesi ile “ortalama kare değerleri” (MS) elde edilir.

Çizelge 2.2 Her bir varyasyon kaynağı için serbestlik derecesi ve ortalama kare değerleri

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Ortalama kare değerleri
Regresyon	$p-1$	$MS_{reg} = SS_{reg}/p-1$
Artık	$n-p$	$MS_{kay} = SS_{kay}/n-p$
Uyumsuzluk	$m-p$	$MS_{reg} = SS_{lof}/m-p$
Saf hata	$n-m$	$MS_{sh} = SS_{sh}/n-m$
Toplam	$n-1$	

p matematiksel modelin katsayı sayısını, n toplam gözlem sayısını, m ise araştırmada kullanılan seviye sayısını göstermektedir.

Regresyonun anlamlılığı, regresyonun ortalama kare değeri (MS_{reg}) ile artıkların ortalama kare değeri arasındaki oran ile bu iki varyasyon kaynağının Fisher varyasyon testi yardımıyla karşılaştırılması ile değerlendirilebilir.

$$F = MS_{reg}/MS_{kay}$$

Bu oran için istatistiksel olarak anlamlı bir değer, F için verilen kritik tablo değerinden daha yüksek olmalıdır. Bu, matematiksel modelin deneysel verilere iyi bir şekilde uyduğunun bir göstergesidir.

Modeli değerlendirmenin diğer bir yolu da uyumsuzluk testidir. Matematiksel model deneysel veriler ile uyumluysa, MS_{lof} sadece sisteme özgü rastgele hataları yansıtmalıdır. Ek olarak, MS_{sh} bu rastgele hataların bir tahminidir ve bu iki değerin istatistiksel olarak farklı olmadığı varsayılmaktadır. Bu, uyumsuzluk testinin kilit fikridir. F testi, bu iki değer arasında istatistiksel olarak bir fark olup olmadığını, aynı şekilde regresyonun öneminin doğrulandığını değerlendirmek için kullanmak mümkündür.

$$F=MS_{lof}/MS_{sh}$$

Eğer bu oran F 'nin kritik değerinden yüksekse, uyumsuzluk olduğuna dair kanıtların olduğu ve modelin iyileştirilmesi gerektiği sonucuna varılır. Bununla birlikte, değer tablodaki değerden düşükse, model uygunluğu tatmin edici olabilir. Uyumsuzluk testi uygulamak için, deneysel tasarım en azından merkezi noktada güvenilir tekrarlarla yapılmalıdır.

Kısacası model, anlamlı bir regresyon ve anlamlı olmayan bir uyumsuzluk sunması halinde, deneysel verilere uyumlu durumda olacaktır. Başka bir deyişle, varyasyon gözleminin büyük kısmı regresyon denklemi ile tanımlanmalıdır ve varyasyonun geri kalan kısmı kesinlikle artıklardan kaynaklanacaktır. Kalıntılarla ilgili varyasyon uyumsuzluktan değil, çoğunlukla saf hatadan (ölçümlerin rastgele dalgalanmasından) kaynaklanır ve doğrudan model kalitesi ile ilişkilidir.

Artıkların grafiklerinin görsel olarak incelenmesi de modelin uygunluğu hakkında değerli bilgiler sağlayabilir. Matematiksel model uyumlu ise, artıkların grafiği, normal dağılım gösteren bir davranış sergiler. Model daha büyük artıklar oluşturuyorsa, çalışılan deney alanındaki veri davranışı hakkında kesin çıkarımlar yapmak uygun değildir. Ayrıca, model başka bir terime ihtiyaç duyuyorsa, artık grafiği modele eklenmesi gereken terim türünü gösteren bir davranış gösterecektir (Bezerra vd. 2008).

2.3.5 Optimum koşulların belirlenmesi

Doğrusal modellerin ürettiği yüzeyler, optimum koşullara ulaşmak için orijinal tasarımın yer değiştirmesi gereken yönü belirtmek için kullanılabilir. Ancak, fiziksel veya enstrümantal nedenlerle deney bölgesinin yeri değiştirilemezse, çalışılan deneysel durum içinde en iyi çalışma koşulunun görsel inceleme ile araştırmacının bulması gerekir (Bezerra vd. 2008).

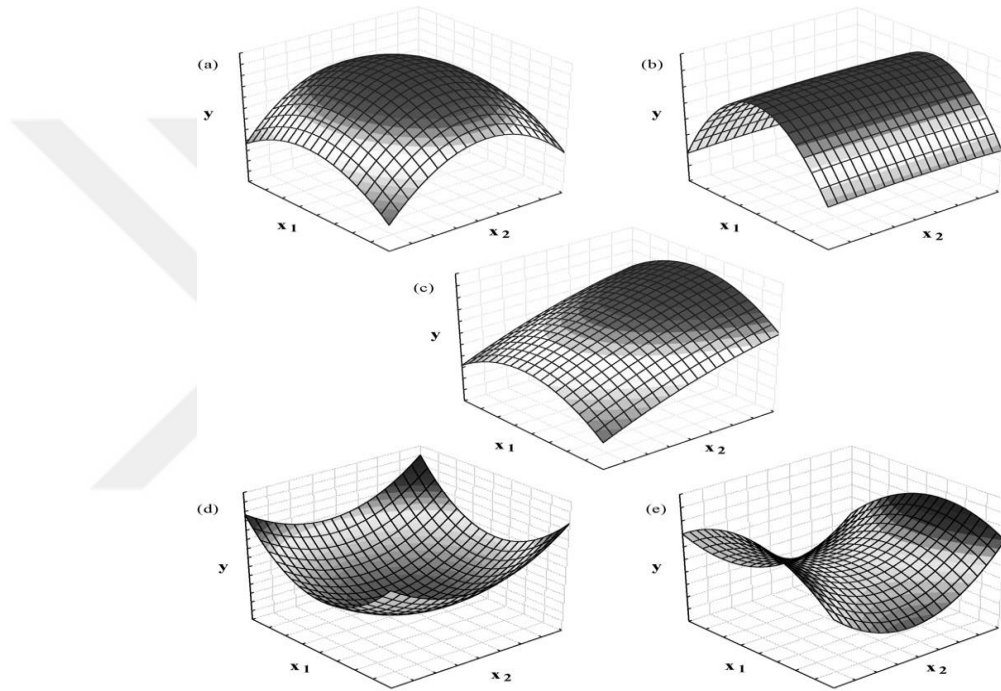
Kuadratik modeller için kritik nokta maksimum, minimum veya eyer olarak tanımlanabilir. Kritik noktanın koordinatlarını, matematiksel fonksiyonun ilk türevi üzerinden hesaplamak mümkündür. Matematiksel fonksiyonun ilk türevi cevap yüzeyi tanımlayan eşitliktir (Bezerra vd. 2008). İki değişken için elde edilen ikinci dereceden fonksiyon aşağıdaki örnekle açıklanabilir:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2$$
$$\frac{\partial y}{\partial x_1} = b_1 + 2b_{11}x_1 + 2b_{12}x_2 = 0$$
$$\frac{\partial y}{\partial x_2} = b_2 + 2b_{22}x_2 + 2b_{12}x_1 = 0$$

Bu nedenle, kritik noktanın koordinatını hesaplamak için, yukarıdaki denklemler tarafından oluşturulan sistemi çözmek ve x_1 ve x_2 değerlerini bulmak gerekir.

Tahmini model denkleminin görselleştirilmesi, yüzey yanıt grafiği ile elde edilebilir. Bu grafiksel gösterim, $(n + 1)$ boyutsal uzaydaki n boyutlu bir yüzeydir. Genellikle, üç boyutlu bir grafik, iki değişken için çizilebilir. Dolayısıyla, üç veya daha fazla değişken varsa, grafik çizimi yalnızca bir veya daha fazla değişken sabit bir değere ayarlandığında mümkündür. Şekil 2.2, iki değişkenin optimizasyonundaki ikinci dereceden cevap yüzeyi grafiği profillerini göstermektedir. Şekil 2.2.a ve b, maksimum noktanın deney bölgesi içinde bulunduğu yüzeyleri temsil eder. Şekil 2.2.b 'de gösterilen yüzeyde, x_2 değişkenine ilişkin bir plato bulunduğunu, bunun seviyelerindeki varyasyonun çalışılan sistemi etkilemediğini gösterdiğine dikkat etmek gerekir. Şekil 2.2.c 'de gösterilen yüzey, maksimum noktanın deneysel bölgenin dışında olduğunu ve

bir maksimum nokta elde etmek için mümkünse ilk tasarımın değiştirilmesi gerektiğini gösterir. Şekil 2.2.d 'de gösterilen yüzey minimum bir noktayı gösterir ve Şekil 2.2.e' de gösterilenler kritik nokta olarak bir eyer noktası sunar. Eyer noktası, bağıl maksimum ile bağıl minimum arasındaki bir bükülme noktasıdır. Amaç, çalışılan bir sisteme maksimum veya minimum bir yanıt elde etmekse, eyer noktası koordinatları optimum değerler olarak işlev görmez. Yani, yüzeylerin görsel olarak incelenmesiyle optimum bölgeyi bulmak mümkündür (Bezerra vd. 2008).



Şekil 2.2 İki değişkenin optimizasyonunda ikinci dereceden cevap yüzey eğrileri

2.3.6 Simetrik ikinci-dereceden deneysel tasarımlar

2.3.6.1 Üç seviyeli tam faktöriyel tasarımlar

Üç seviyeli tam faktöriyel tasarım, faktör sayısı 2'den büyük olduğunda cevap yüzey yöntemleri arasında sınırlı uygulamaya sahip bir deneysel matristir. Çünkü bu tasarım için gereken deney sayısı ($N = 3^k$ ifadesi ile hesaplanır, burada N , deney sayısı ve k , faktör sayısıdır) çok büyüktür, bu nedenle ikinci dereceden fonksiyonların modellenmesinde verimini kaybeder. Üç seviyeli tam faktöriyel tasarım, ikiden fazla

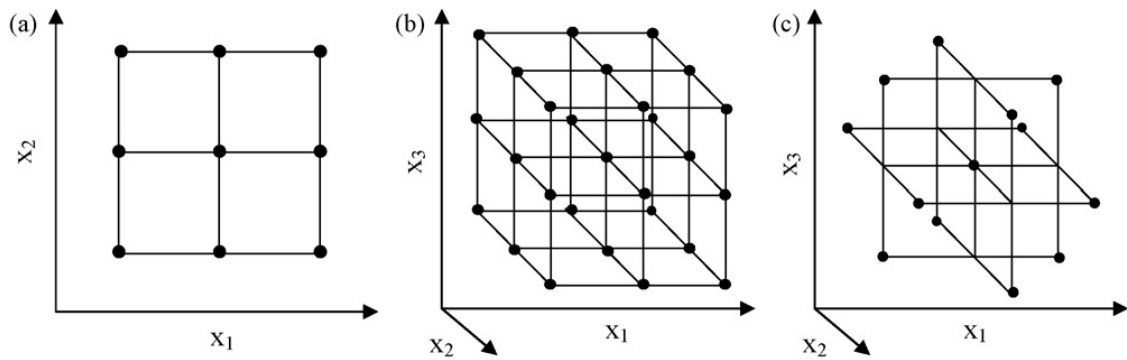
değişken için daha fazla deney sayısı gerektirdiğinden, Box – Behnken, merkezi kompozit ve Doehlert tasarımları gibi daha az sayıda deney noktası gerektiren tasarımlar daha sık kullanılmaktadır. Ancak iki değişken olduğu durumda verimlilik diğer tasarımlarla karşılaştırılabilir düzeydedir (Bezerra vd. 2008).

2.3.6.2 Box-Behnken tasarımı

Box ve Behnken (1960), matematiksel modelin birinci ve ikinci dereceden katsayılarının etkin bir şekilde tahmin edilmesini sağlayan, üç seviyeli faktöriyel tasarımdan noktaların nasıl seçileceğini önerdi. Bu tasarımlar, bu şekilde, özellikle çok sayıda değişken için, ilgili 3^k tasarımlarından daha verimli ve ekonomiktir.

Box-Behnken tasarımlarında, deneysel noktalar, merkezi noktadan eşit uzaklıkta bir hiper küre üzerinde konumlandırılmıştır. Başlıca özellikleri:

- (1) $N = 2k(k - 1) + m_n$ 'ye göre bir deney sayısı gerektirir, burada k faktörlerin sayısı ve (m_n) merkez noktaların sayısıdır;
- (2) Tüm faktör seviyelerinin sadece üç seviyede ayarlanması gerekir (-1, 0 +1) ve bu seviyeler arasında eşit aralıklar bulunmalıdır.



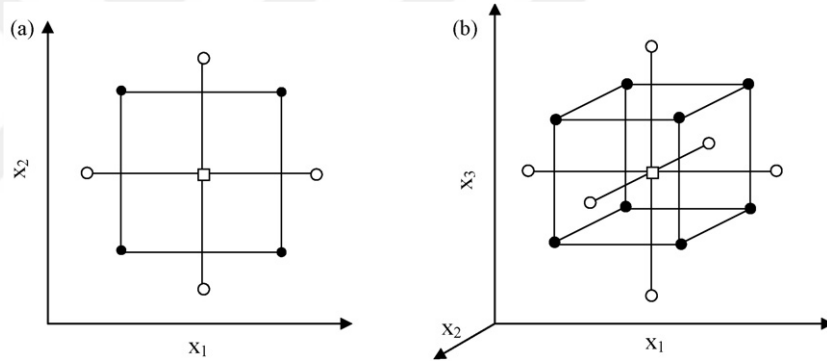
Şekil 2.3 (a) iki değişken için (b) üç değişken için üç seviyeli tam faktöriyel tasarım ve (c) üç değişken için Box-Behnken tasarımı

2.3.6.3 Merkezi kompozit tasarım

Merkezi kompozit tasarım, Box ve Wilson (1951) tarafından sunulmuştur. Bu tasarım şu bölümlerden oluşur:

- (1) tam faktoriyel veya kısmi faktoriyel tasarımı;
- (2) ek bir tasarım, genellikle deney noktalarının merkezinden α uzaklıkta olduğu bir yıldız tasarım;
- (3) bir merkezi nokta.

Şekil 2.4 (a) ve (b), iki ve üç değişkenin optimizasyonu için merkezi kompozit tasarımı göstermektedir.



Şekil 2.4 (a) iki değişkenin ($\alpha=1,41$) ve (b) üç değişkenin ($\alpha=1,68$) optimizasyonu için merkezi kompozit tasarım.

(●) noktaları faktöriyel tasarım noktaları, (○) aksiyel noktalar ve (□) merkez noktasını göstermektedir.

Tam olarak düzgün bir şekilde yönlendirilebilir merkezi kompozit tasarımlar, aşağıdaki özellikleri sunar:

(1) $N = k^2 + 2k + m_n$ 'ye göre bir deney sayısı gerektirir; burada k , faktör sayısıdır ve (m_n), merkezi noktanın tekrar sayısıdır.

(2) α -değerleri değişken sayısına bağlıdır ve $\alpha = 2^{(k-p)/4}$ ile hesaplanabilir. İki, üç ve dört değişken için bunlar sırasıyla 1,41; 1,68 ve 2,00'dir.

(3) tüm faktörler beş seviyede incelenir ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$).

2.3.6.4 Doehlert tasarımı

Doehlert (1970) tarafından geliştirilen tasarım, diğer ikinci dereceden deneysel matrislere pratik ve ekonomik bir alternatiftir. Bu tasarım, iki değişken için dairesel, üç değişken için küresel ve üçten fazla değişken için hiper küresel bir alan tanımlar; bu, çalışılan değişkenlerin deney bölgesindeki tutarlılığını gösterir. Matrisleri önceki tasarımlara göre yönlendirilebilir olmasa da uygulaması için az sayıda deney noktası gerektirmesi ve yüksek verim gibi bazı avantajlar sunar. Diğer özellikleri aşağıdaki gibidir:

(1) $N = k^2 + 2k + m_n$ 'ye göre bir deney sayısı gerektirir; burada k, faktör sayısıdır ve (m_n), merkezi noktanın tekrar sayısıdır.

(2) önemli bir özelliği her değişkenin farklı sayıda seviyelerde incelenmesidir, özellikle de bazı değişkenler maliyet ve/veya enstrümantal nedenler gibi kısıtlamalara maruz kaldığında veya bir değişkeni majör veya çok sayıda seviyede incelemek gerektiği durumlarda önemlidir;

(3) seviyeleri arasındaki aralıklar düzgün bir dağılım gösterir;

(4) deneysel matrisin başka bir deneysel bölgeye kaydırılması, önceki komşu noktalar kullanılarak gerçekleştirilebilir.

2.3.7 Merkezi kompozit tasarımın biyosensör uygulamalarında kullanımı

Merkezi kompozit tasarım (MKT), cevaba etki eden değişkenlerin etkisini veya birbirleri ile etkileşimlerini, mümkün olan en az sayıda deneyle incelemek için, sistematik bir çalışma yöntemi sağlayan bir yaklaşımdır (Bardajee, 2017). Kimyasal reaksiyonların, endüstriyel işlemlerin veya çalışma şartlarının optimizasyonu için yararlı

bir istatistiksel yöntem olan MKT, deneysel tasarımlar içinde yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır. Birden fazla değişkenin, cevaba etkisinin olduğu durumlarda, bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi değerlendirmek ve bunları optimize etmek için MKT yaklaşımı kullanılabilir. Geleneksel tek seferde tek değişken yaklaşımı ile yapılan optimizasyon işlemlerinin oldukça zaman alıcı olduğu göz önünde bulundurulduğunda, MKT, deneysel sonuçların daha hızlı elde edilmesini sağlayan bir yaklaşımdır (Dashtian ve Zare-Dorabei 2017).

Biyosensör çalışmalarında da çalışma şartlarının optimizasyonu ve elektrot yüzey bileşiminin optimizasyonu gibi çok fazla sayıda deney gerektiren optimizasyon işlemleri gereklidir. Bu işlemlerin MKT yaklaşımı kullanılarak yapıldığı biyosensörler ile ilgili bazı çalışmalar aşağıda özetlendi.

Oliveira vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada, karbamat pestisitlerinin tayini için, grafen ve Prusya mavisi katkılı karbon pasta elektroda lakkaz immobilizasyonu ile geliştirilen biyosensör kullanılmıştır. Biyosensör cevabına etki ettiği düşünülen değişkenlerden pH (x_1), enzim derişimi (x_2) ve inkübasyon süresi (x_3), 2^3 -faktöriyel MKT ile optimize edilmiştir. Tasarım, pH'nın 4 ile 6 arasında, enzim derişiminin 5 ile 15 U mL⁻¹ arasında ve inkübasyon süresinin 5 ile 25 dakika arasında değişeceği şekilde hazırlanmış ve α değeri 1,68 olarak belirlenmiştir. Toplamda 20 deney yapılmış ve tasarım sonuçları %95 güven seviyesinde ANOVA ile incelendiğinde modelin p değeri 0,0019 ve R^2 değeri 0,8086 olarak bulunmuştur. Ayrıca x_1^2 ($p<0,0001$), x_2^2 ($p<0,001$) ve x_3^2 ($p<0,001$) anlamlı terimler olarak belirlenmiştir. ANOVA verileri ve cevap yüzey eğrileri değerlendirildiğinde optimum miktarlar pH 5,0; enzim derişimi 10,2 U mL⁻¹ ve inkübasyon süresi 17,2 dakika olarak rapor edilmiştir. Optimum şartlarda hazırlanan biyosensör, domates ve patates örneklerinde, karbamat pestisitlerinin tayininde kullanılmıştır.

Mirmoghtadaie vd. (2013) tarafından, DNA modifiye edilmiş kalem grafit elektrot ile folik asit tayini için bir DNA biyosensörü geliştirilmiştir. DNA'nın kalem grafit elektroda immobilizasyonu, MKT ile optimize edilmiştir. Bu amaçla çözelti pH'sı,

DNA derişimi, DNA'yı kaplama süresi ve kaplama potansiyelini optimize etmek için 2⁴-faktöriyel MKT kullanılmıştır. Tasarımda düşük değer ve yüksek değer sırasıyla pH için 4,2 ve 4,8; DNA derişimi için 12 ve 28 µg mL⁻¹; kaplama süresi için 175 ve 425 s ve kaplama potansiyeli için 0,30 ve 0,50 V olacak şekilde belirlenmiştir. Deneysel tasarıma ait veriler ile elde edilen ANOVA sonuçlarına göre modelin *p* değerinin (*p*<0,001) oldukça küçük bulunması sebebiyle, modelin anlamlı olduğu sonucuna varıldığı belirtilmiştir. Cevap yüzey eğrileri ve ANOVA verileri değerlendirildiğinde, DNA immobilizasyonu için optimum şartlar pH 4,8; DNA derişimi 24 µg mL⁻¹; kaplama süresi 304 s ve kaplama potansiyeli 0,60 V olarak belirlenmiştir. Biyosensör optimum şartlarda hazırlandıktan sonra, beyaz unda folik asit tayini için kullanılabilirliği araştırılmış ve geri kazanımlar %99,1 ile %100,8 arasında bulunmuştur.

del Torno-de Román vd. (2013), perde baskılı elektrot yüzeyine glukonat kinaz (GK) ve 6-fosfo-D-glukonat dehidrogenaz (6PGDH) immobilize ederek, glukonik asit tayini için amperometrik bienzimatik biyosensör geliştirmişlerdir. Enzimler elektrot yüzeyine glutaraldehit (GA) ve sığır serum albümin (BSA) kullanılarak çapraz bağlama yöntemi ile immobilize edilmişlerdir. GK, 6PGDH, GA ve BSA derişimleri, glukonik asit tayini için elde edilen kronoamperometrik cevaba doğrudan etki eden değişkenler olarak düşünölmüştür. Bu amaçla, biyosensör hazırlanmasında, 6PGDH/GK ile GA/BSA hacim oranlarının, 64 µM glukonik asit çözeltisine cevabının etkisini belirlemek için, 2²-faktöriyel MKT kullanılmıştır. 6PGDH/GK ve GA/BSA hacim oranları için düşük değer 1 ve yüksek değer 3 olarak belirlenmiştir. Merkez nokta için 3 tekrar deneyi yapılarak toplamda 11 deney yapılmış ve tasarım sonuçları ANOVA ile değerlendirilmiştir. ANOVA sonuçları incelendiğinde 6PGDH/GK oranının veya bu oranla ilgili etkileşimlerin, amperometrik cevaba anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (*p*>0,05). Bu nedenle, bu oran, çalışılan alanda en yüksek kronoamperometrik cevap alınan teorik optimum değere karşılık gelen 3,4 değerine ayarlanmıştır ve GA/BSA hacim oranı da 0,1 olarak belirlenmiştir. Enzimlerin bu optimum şartlarda immobilize edilmesi ile hazırlanan biyosensörler, şarap örneklerinde glukonik asit tayini için kullanılmıştır.

Talat ve Singh (2011), amin-fonksiyonlu altın nanopartiküllerin yüzeyine üreaz enzimi immobilize etmeyi düşünmüşler ve bu immobilizasyon sırasında, enzim aktivitesine etki eden pH ve sıcaklık değişkenlerini optimize etmek için 2²-faktöriyel MKT yaklaşımını kullanmışlardır. İki değişken için en düşük ve en yüksek değerler sırasıyla pH için 5,5 ve 8,5; sıcaklık için ise 30 ve 85 °C olarak belirlenmiştir. α değerinin 1,414 olduğu tasarımda 14 deney yapılmıştır. MKT ile elde edilen verilerden, pH ve sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi, ANOVA ile değerlendirilmiş ve pH'nın ikinci dereceden teriminin, sıcaklığın ise birinci dereceden teriminin daha etkin olduğu belirlenmiştir. Bu durum da enzim aktivitesi ile pH arasındaki ilişkinin bir eğri oluşturacağı; sıcaklık ile enzim aktivitesinin ise doğrusal değişeceği şeklinde yorumlanmıştır. Cevap yüzey eğrileri ve ANOVA verileri değerlendirildiğinde, optimum değerler pH için 0,5080 ve sıcaklık için 75,4668 °C olarak rapor edilmiştir. Enzim immobilizasyonu için uygulanan bu yöntemin, çeşitli uygulamalarda kullanılabileceği belirtilmiştir.

Asturias-Arribas vd. (2011) tarafından, kokain tayini için elektrokimyasal bir biyosensör geliştirilmiştir. Perde baskılı karbon elektrotlara sitokrom P450 enziminin kovalant olarak immobilize edilmesiyle hazırlanan biyosensörler için pH ve çalışma potansiyeli, kronoamperometrik cevabı etkileyen değişkenler olarak belirlenmiş ve 2²-faktöriyel MKT yaklaşımı ile optimize edilmeleri düşünülmüştür. En düşük ve en yüksek değerler, pH için 6 ve 10; çalışma potansiyeli için -100 ve -400 mV olarak belirlenmiş ve merkez noktanın 3 tekrarlı çalışılması ile toplam 11 deney yapılmıştır. Cevap yüzey eğrisi incelendiğinde, kokainin elektrot yüzeyinde indirgenmesine ait en yüksek akım cevabının, pH 8,1 ve çalışma potansiyeli -250 mV olduğu durumda elde edildiği belirlenmiştir bu değerler, optimum çalışma şartları olarak kabul edilmiştir. Hazırlanan biyosensör, el koyulan kokain örneklerine uygulanmış ve elde edilen sonuçlar HPLC sonuçları ile karşılaştırılmış; iki yöntem arasında uyum olduğu rapor edilmiştir.

Ivanov vd. (2010) tarafından, asetil kolin tayini için biyosensör geliştirilmiştir. Bu biyosensör, asetilkolinesteraz enziminin poli-(akrilonitril-metil-metakrilat-sodyum vinilsülfonat) membran yüzeyine immobilizasyonuna dayanmaktadır. Enzimin

immobilizasyonu, çok katmanlı karbon nanotüp ve sığır serum albümin (MWCNT + BSA), glutaraldehyt ve konkanavalin A karışımı kullanılarak yapılmıştır. Enzim derişimi, konkanavalin A derişimi ve MWCNT derişimi, amperometrik cevabı etkileyen değişkenler olarak düşünölmüş ve enzim immobilizasyonunda bu üç değişkenin etkisi, 2³-faktöriyel MKT yaklaşımı ile optimize edilmiştir. En düşük ve en yüksek derişimler enzim için 10 ve 130 U mL⁻¹; konkanavalin A için 0,5 ve 2,5 mg mL⁻¹ ve MWCNT için 1 ve 11 mg mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Tasarım verileri ANOVA ile değerlendirilmiş ve modelin modelin *p* değeri <0,0001 ve *R*² değeri 0,984 olarak bulunmuştur. Cevap yüzey eğrileri incelendiğinde, en yüksek akım cevabının enzim derişimi için 70 U mL⁻¹; konkanavalin A derişimi 1,5 mg mL⁻¹ ve MWCNT derişimi 11 mg mL⁻¹ olduğu durumda elde edildiği belirlenmiş ve bu değerlerin optimum bileşim olarak seçildiği belirtilmiştir.

Alonso-Lomillo vd. (2010a) tarafından yapılan çalışmada, monoamin oksidaz (MAO)/horseradish peroksidaz (HRP) ile diamin oksidaz (DAO)/horseradish peroksidaz (HRP) enzimlerinin perde baskılı karbon elektrotlara immobilizasyonu ile, biyojenik amin tayini için biyosensörler geliştirilmiştir. Enzimler, aril diazonyum tuzu ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyine, N-hidroksisüksinimid (NHS) ve N-(3-dimetilaminpropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorür (EDC) kullanılarak immobilize edilmiştir. Enzimlerin başarılı bir şekilde immobilize edilmesinde etkili olan deneysel değişkenler, enzimlerin hacimce oranı (V_{AO}/V_{HRP}) ile EDC ve NHS çözeltilerini hazırlamak için kullanılan fosfat tamponunun derişimi olarak düşünölmüştür. Bu iki değişkenin ve birbirleri ile etkileşimlerinin, bir biyojenik amin olan histamine karşı amperometrik cevaba etkisini, mümkün olan en hızlı ve kesin bir şekilde belirlemek için, 2²-faktöriyel MKT yaklaşımı uygulandığı belirtilmiştir. V_{AO}/V_{HRP} için en düşük değer 1 ve en yüksek değer 5; pH için en düşük değer 4 ve en yüksek değer 8 olarak belirlenmiş ve toplamda 11 deney yapılmıştır. Tasarımda, 19,2 µM histamine karşı elde edilen cevaplarla oluşturulan cevap yüzey eğrileri değerlendirildiğinde, enzim immobilizasyonunda deneysel değişkenler için optimum değerler; fosfat çözeltilisinin pH'sı 6,7; DAO/HRP biyosensörü için $V_{DAO}/V_{HRP}=3,35$ ve MAO/HRP biyosensörü için $V_{MAO}/V_{HRP}=4,00$ olarak bulunmuştur. Biyosensörlerin optimum şartlarda hazırlanmasının ardından, histaminin elektrokimyasal tayini için, biyosensörlerin

performansına etki eden deneysel değişkenlerin optimizasyonu da MKT yaklaşımı ile yapılmıştır. Bu amaçla; tampon çözelti pH'sı, çalışma potansiyeli ve medyatör olarak kullanılan hidrosimetilferrosen (HOMeFc) derişiminin, biyosensörlerin 19,2 µM histamine karşı amperometrik cevabına etkisini incelemek için 2³-faktöriyel MKT uygulanmıştır. Her bir değişkenin en düşük ve en yüksek değerleri sırasıyla pH için 4,0 ve 8,0; çalışma potansiyeli için 100 ve 200 mV; medyatör derişimi için ise 5,9 ve 19,6 µM olarak belirlenmiştir. Her bir biyosensör için 17 deney yapılmış ve tasarım sonuçları değerlendirildiğinde optimum değerler DAO/HRP biyosensörü için pH 9,3; çalışma potansiyeli 250 mV ve medyatör derişimi 24,3 µM; MAO/HRP biyosensörü için ise pH 9,3; çalışma potansiyeli 250 mV ve medyatör derişimi 19,6 µM olarak bulunmuştur. Hazırlanan biyosensörler balık numunelerinde histamin tayininde kullanılmıştır. Gerektirdiği ön işlem çok az olduğundan, numunelerde histamin tayini için alternatif bir yöntem olarak önerilmiştir.

Alonso-Lomillo vd. (2010b) tarafından, HRP'nin polipirol matriks içinde perde baskılı karbon elektrot yüzeyine immobilizasyonu ile Okratoksin A (OTA) tayini için elektrokimyasal bir biyosensör geliştirilmiş ve biyosensörün H₂O₂ içeren fosfat tampon çözeltisinde OTA'ya karşı kronoamperometrik cevabı incelenmiştir. Seçici ve duyarlığı yüksek bir sensör hazırlamak için, sensör cevabına kuvvetle etki eden değişkenlerin optimizasyonunun, 2³-faktöriyel MKT yaklaşımı kullanılarak yapıldığı belirtilmiştir. Bu değişkenler; çözelti pH'sı, çalışma potansiyeli ve H₂O₂ derişimini olarak belirlenmiştir. En düşük ve en yüksek değerler pH için 5,0 ve 9,0; çalışma potansiyeli için -0,3 ve +0,1 V; H₂O₂ derişimi için ise 0,6 ve 1,4 mM seçilerek, merkez noktada 3 tekrar ile toplamda 17 deney yapılmıştır. Elde edilen veriler varyans analizi ile değerlendirildiğinde, tampon çözeltinin pH'sının anlamlı bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Ancak pH'sı 5,0 olan tampon çözeltide, kronoamperometrik cevapların yüksek olması nedeniyle, optimum pH 5,0 olarak seçilmiştir. Diğer değişkenler aynı aralıkta incelenerek cevap yüzey eğrisi değerlendirildiğinde, optimum değerler çalışma potansiyeli için -0,3 V ve H₂O₂ derişimi için 1,4 mM olarak belirlenmiştir. Optimum şartlarda hazırlanan biyosensör, standart ekleme yöntemi ile, birada ve kavrulmuş kahvede OTA tayininde kullanılmış ve ortalama geri kazanımlar sırasıyla %103,27 ve %99,28 olarak bulunmuştur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Cihazlar ve Donanımı

Elektrokimyasal çalışmalarda, Iviumstat marka elektrokimyasal analiz cihazı ve BASi marka C-3 hücre standı kullanıldı. Çalışma elektrodu olarak camsı karbon elektrottan (GCE) (BASi MF-2012); karşıt elektrot olarak Pt tel elektrottan (BASi MW-1032 ve Ag/AgCl referans elektrottan (BASi MF-2052 RE-3M KCl) oluşan üçlü elektrot sistemi kullanıldı.

Tüm katı maddeler 0,01 mg duyarlığa sahip analitik terazi (Mettler Toledo) kullanılarak tartıldı.

Çözeltiler, ELGA Purelab Classic Ultra Pure Water System cihazından elde edilen ultra saf su ile hazırlandı. Karışımlar ve çözeltiler, Elma (LC30H) marka ultrasonik banyo, Isolab (I.622.01.001) marka vorteks karıştırıcı ve Chiltern (MS21S) marka manyetik karıştırıcıdan yararlanılarak homojen hale getirildi. Çözeltiler, Axygen marka farklı hacimlerde mikro pipetler yardımıyla çalışma ortamına ilave edildi.

Çözeltilerin pH'ları, Thermo Orion (720A) marka pH-iyon metre ve Thermo Scientific Orion marka kombine cam pH elektrodu (912600) kullanılarak ayarlandı. Cihaz, Thermo Scientific Orion marka pH 4,01 ve pH 10,01 tampon çözeltileri ile kalibre edildi. Kombine cam pH elektrodu kullanılmadığında Thermo Scientific Orion marka saklama çözeltisi (910001) içinde muhafaza edildi.

Sabit sıcaklık çalışmalarında, Grant LTD GG marka termostatlı ve sirkülasyonlu su banyosu ile sıcaklık kontrol sistemine bağlı mantolu elektrokimyasal hücre (BASi MR-1212) kullanıldı.

Çalışmada hazırlanan elektrotların yüzey karakterizasyonu FEI, Quanta 450 FEG marka taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapıldı. Enerji dağılımlı X-ışınları spektroskopisi çalışmaları Bruker dedektörü kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2 Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan tüm kimyasal maddeler, saflık dereceleri ve markaları Çizelge 3.1’de verildi.

Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasal maddeler, saflık dereceleri ve markaları

Kullanılan kimyasal maddeler	Saflık derecesi veya derişimi	Marka
Al ₂ O ₃ nanopartiküller (Al ₂ O ₃ NP)	<	Aldrich
Asetik asit	%99,99	Oksan
Askorbik asit	≥%99	Sigma-Aldrich
Borik asit	%99,5-101,0	Merck
Co ₃ O ₄ nanopartiküller (Co ₃ O ₄ NP)	%99,8	Aldrich
CuO nanopartiküller (CuONP)		Aldrich
Glukoz	Saf	Fluka
Disodyum hidrojenfosfat-7-hidrat	Saf	Riedel-de Haën
Etanol	>%99,8	Sigma-Aldrich
Fe ₂ O ₃ nanopartiküller (Fe ₂ O ₃ NP)		Aldrich
Fe ₃ O ₄ nanopartiküller (Fe ₃ O ₄ NP)		Aldrich
Fosforik asit	%85	Sigma-Aldrich
Hidrojen peroksit	%35	Riedel-de Haën
Hidroklorik asit	%37	Merck
Glukoz oksidaz (GOx)	158900 U/g	Sigma-Aldrich
Karboksilli çok duvarlı karbon nanotüp (c-MWCNT)	%95	Cheaptubes
Nafyon	%5	Aldrich
Potasyum hekzasiyanoferrat (III)	%99	Sigma-Aldrich
Potasyum hekzasiyanoferrat (II) trihidrat	≥%99,5	Sigma-Aldrich
Potasyum klorür	%99,0–100,5	Merck
SnO ₂ nanopartiküller (SnO ₂ NP)	-	Aldrich
Sodyum dihidrojen fosfat	Saf	Riedel-de Haën

Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasal maddeler, saflık dereceleri ve markaları (devam)

Sodyum hidroksit	Saf	Riedel-de Haën
Sodyum klorür	Saf	Sigma-Aldrich
Temizleme kitleri	-	BASi (MF-2060)
TiO ₂ nanopartiküller (TiO ₂ NP)		Aldrich
Üre	≥%99,5	Sigma
Ürik asit	≥%99	Sigma
ZnO nanopartiküller (ZnONP)		Aldrich

3.3 Kullanılan Çözeltiler

3.3.1 D-Glukoz

Derişimi $1,0 \times 10^{-1}$ M olan 50,0 mL stok çözelti hazırlamak için, D-glukoz uygun miktarda tartıldı ve saf suda çözüldü. Bu stok çözelti, kullanılmadığı zaman buzdolabında +4°C’de saklandı.

3.3.2 Fosfat tamponu

Sodyum dihidrojenfosfat (NaH_2PO_4) ve disodyum hidrojenfosfat-7-hidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), toplam fosfat derişimi 0,025 M olacak şekilde tartılarak ultra saf suda çözüldü ve 1,0 L fosfat tamponu hazırlandı. pH’sını istenen değere ayarlamak için 0,1 M NaOH veya 0,1 M HCl çözeltileri kullanıldı. Tampon çözelti kullanılmadığında buzdolabında +4°C’de saklandı.

3.3.3 Glukoz oksidaz

GOx uygun miktarda tartılarak pH’sı 7,0 olan fosfat tamponunda çözüldü. Hazırlanan enzim çözeltileri kullanılmadığında buzdolabında -20 °C’ta saklandı.

3.3.4 Hidrojen peroksit

Derişimi $1,0 \times 10^{-2}$ M olacak şekilde 50,0 mL stok çözelti hazırlamak için %35'lik hidrojen peroksit çözeltisinden uygun miktarda alınıp saf su ile seyreltildi. Bu çözelti her kullanımda taze olarak hazırlandı ve koyu renkli şişede saklandı.

3.3.5 Kitosan

Kitosandan 5,0 g tartılarak asetat tamponu içerisinde berrak bir çözelti haline gelene kadar yaklaşık 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve hacmi aynı tamponla 50,0 mL'ye tamamlandı.

3.3.6 Nafyon

Nafyonun %5'lik çözeltisinden alınan uygun miktar hacimce %50 alkol-su karışımı ile seyreltildi ve %0,25'lik nafyon çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti kullanılmadığı zaman $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında muhafaza edildi.

3.3.7 Redoks probu

Analitik derişimleri 5 mM olacak şekilde potasyum hekzasiyanoferrat(III) $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ile potasyum hekzasiyanoferrit(II) trihidrat $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ ve analitik derişimi 0,1 M olacak şekilde KCl, uygun miktarlarda tartılarak ultra saf suda çözüldü ve hacmi 1,0 L'ye tamamlandı.

3.4 Camsı Karbon Elektrodun Temizlenmesi

GCE'lerin yüzeyi her modifikasyondan önce elektrot temizleme kiti kullanılarak aşağıdaki gibi temizlendi: 0,05 μm boyutunda alümina içeren süspansiyondan bir miktar temizleme pedine damlatılarak GCE'nin yüzeyi önce mekanik olarak temizlendi. Sonra,

elektrot saf su ile yıkandı, etil alkol çözeltisi içerisinde ultrasonik banyoda 5 dakika bekletildi ve oda sıcaklığında kurutuldu.

3.5 Elektrotların Yüzey Bileşiminin Optimize Edilmesi

Elektrot modifikasyonu için kullanılan modifikasyon malzemelerinin (MONP'ler, c-MWCNT, GOx ve Nafyon) miktarlarının optimizasyonu için TiO₂NP'ler model olarak seçilerek çeşitli yöntemler denendi. Bunlar tek seferde tek değişken ve 2ⁿ-faktöriyel merkezi kompozit tasarım (MKT) yöntemleri idi. Burada n, elektrot yüzeyinde bulunan bileşenlerin sayısını ifade etmektedir. Elektrot yüzeyindeki bileşen sayısının 2, 3 ve 4 olmasına bağlı olarak

- 2²-faktöriyel MKT
- 2³- faktöriyel MKT
- 2⁴- faktöriyel MKT

yöntemleri denendi ve bu dört yöntemin ayrıntıları aşağıda verildi.

3.5.1 Tek seferde tek değişken yöntemi

Tek seferde tek değişken yönteminde, tek seferde bir değişkenin miktarı sabit tutulup diğer bileşenlerin miktarları değiştirilerek optimum miktarlar belirlendi. Bu yöntem uygulanarak c-MWCNT ile TiO₂NP miktarlarının optimizasyonu için önce c-MWCNT miktarı 1,0 mL kitosan çözeltisinde 0,5–2,0 mg arasında 0,5 mg farklarla değiştirilerek dört adet elektrot hazırlandı. Bu elektrotların hazırlanması şu şekilde yapıldı: Belirtilen miktarlardaki c-MWCNT'ler 1 mL kitosan çözeltisinde dağıtıldı. Homojen bir karışım elde edebilmek için ultrasonik banyoda 2 saat; vortekste 5 dakika karıştırıldıktan hemen sonra bu karışımdan 6 µL alınarak GCE yüzeyine damlatıldı ve oda sıcaklığında kurularak karboksilli çok duvarlı karbon nanotüp modifiye elektrotlar (c-MWCNT/GCE) hazırlandı. Bu elektrotların 50 mV s⁻¹ tarama hızında dönüşümlü voltamogramları (CV) alınıp akım değerleri ölçüldü. En yüksek akım değerinin elde edildiği miktar optimum olarak kabul edildi. Daha sonra c-MWCNT için bulunan

optimum miktar sabit tutularak diğer değişken TiO_2NP miktarı 1,0 mL kitosan çözeltilisinde 1,0–3,0 mg arasında olacak şekilde değiştirilerek dört farklı $\text{TiO}_2\text{NP-c-MWCNT/GCE}$, yukarıda c-MWCNT/GCE'lerin hazırlanmasına benzer şekilde, hazırlandı. Bu elektrotların da 50 mV s^{-1} tarama hızında CV'leri alınarak en yüksek akım değerinin elde edildiği miktar optimum olarak kabul edildi.

3.5.2 2^2 -faktöriyel MKT yöntemi

2^2 -faktöriyel MKT, GCE yüzeyini modifiye etmede kullanılan c-MWCNT ve TiO_2NP miktarlarının optimizasyonunda kullanıldı. Bu amaçla, farklı TiO_2NP ve c-MWCNT miktarları kullanılarak üç ayrı tasarım yapıldı: (i) c-MWCNT ve TiO_2NP miktarları tek seferde tek değişken yönteminde kullanılan derişim aralığını içerecek şekilde her iki bileşenin miktarı da en düşük 2 mg mL^{-1} en yüksek 6 mg mL^{-1} ; (ii) aynı bileşenlerin miktarı en düşük 5 mg mL^{-1} ve yüksek derişim 15 mg mL^{-1} ve (iii) bu bileşenlerin miktarı en düşük 10 mg mL^{-1} ve en yüksek derişim 30 mg mL^{-1} olarak seçildi. Bu üç tasarım için de deneysel faktörler ve seviyeler Çizelge 3.2'de verildi. Her bir tasarımda 4 faktöriyel, 4 aksiyel ve 5 merkez nokta olmak üzere 13 deney yapıldı. Ortogonal ve döndürülebilir tasarımlar için α değeri 1,414 olarak kullanıldı. Tasarıma göre her bir değişken 5 seviyede incelendi (Çizelge 3.2). Tasarım matrisleri Çizelge 3.3 - 3.5'te gösterildi. Tasarımda belirtilen miktarlardaki c-MWCNT ve TiO_2NP içeren karışımdan 6 μL GCE yüzeyine damlatılarak 13 modifiye elektrot hazırlandı ($\text{TiO}_2\text{NP-c-MWCNT/GCE}$). Bu elektrotların amperometrik akım cevapları $+0,70 \text{ V}$ 'ta sabit derişimde ($2.0 \times 10^{-4} \text{ M}$) H_2O_2 çözeltilisi içeren 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltilisinde kaydedilerek deneysel tasarım için cevap olarak elde edildi (Çizelge 3.3 - 3.5).

Çizelge 3.2 c-MWCNT ile TiO₂NP miktarlarının üç farklı derişim aralığında optimizasyonu için 2²-MKT'daki deneysel faktörler ve seviyeler

	Faktör	Birim	Seviye				
			-α	-1	0	+1	+α
(i)	A: c-MWCNT	mg mL ⁻¹	1,17	2	4	6	6,82
	B: TiO ₂ NP	mg mL ⁻¹	1,17	2	4	6	6,82
(ii)	A: c-MWCNT	mg mL ⁻¹	2,93	5	10	15	17,07
	B: TiO ₂ NP	mg mL ⁻¹	2,93	5	10	15	17,07
(iii)	A: c-MWCNT	mg mL ⁻¹	5,86	10	20	30	34,14
	B: TiO ₂ NP	mg mL ⁻¹	5,86	10	20	30	34,14

Çizelge 3.3 2²-faktöriyel MKT ve TiO₂NP-c-MWCNT/GCE ile (i) tasarımında elde edilen deneysel ve beklenen amperometrik cevap akımları (2,0×10⁻⁴ M H₂O₂ içeren 0,025 M pH 8 fosfat tampon çözeltilinde)

Elektrot	A	B	Amperometrik cevap akımı, nA		
			Deneysel	Beklenen	Artık
1	-1	-1	253,5	253,0	0,5
2	1	-1	785,9	767,7	18,2
3	-1	1	261,7	203,0	58,7
4	1	1	777,9	701,4	76,5
5	0	-1,414	553,5	550,8	2,7
6	0	1,414	388,9	468,6	-79,7
7	-1,414	0	68,6	94,6	-26,0
8	1,414	0	760,0	811,0	-51,0
9	0	0	372,8	507,4	-134,6
10	0	0	527,1	507,4	19,7
11	0	0	528,3	507,4	20,9
12	0	0	573,4	507,4	66,0
13	0	0	535,3	507,4	27,9

Çizelge 3.4 2²- faktöriyel MKT ve TiO₂NP-c-MWCNT/GCE ile (ii) tasarımında elde edilen deneysel ve beklenen amperometrik cevap akımları (2,0×10⁻⁴ M H₂O₂ içeren 0,025 M pH 8 fosfat tampon çözeltisinde)

Elektrot	A	B	Amperometrik cevap akımı, nA		
			Deneysel	Beklenen	Artık
1	-1	-1	936,5	938,2	-1,7
2	1	-1	2756,3	2959,7	-203,4
3	-1	1	298,6	601,1	-302,5
4	1	1	2205,4	2709,5	-504,1
5	0	-1,414	1687,3	1647,0	40,3
6	0	1,414	1697,4	1231,8	465,6
7	-1,414	0	815,0	704,7	110,3
8	1,414	0	4020,5	3625,0	395,5
9	0	0	1549,3	1854,0	-304,7
10	0	0	2045,8	1854,0	191,8
11	0	0	1701,2	1854,0	-152,8
12	0	0	1928,8	1854,0	74,8
13	0	0	2045,0	1854,0	191,0

Çizelge 3.5 2²-faktöriyel MKT ve TiO₂NP-c-MWCNT/GCE ile (iii) tasarımında elde edilen deneysel ve beklenen amperometrik cevap akımları (2,0×10⁻⁴ M H₂O₂ içeren 0,025 M pH 8 fosfat tampon çözeltisinde)

Elektrot	A	B	Amperometrik cevap akımı, nA		
			Deneysel	Beklenen	Artık
1	-1	-1	2825,6	2607,8	217,8
2	1	-1	3281,9	3740,1	458,2
3	-1	1	1463,9	1340,4	123,5
4	1	1	3194,0	3746,5	-552,5
5	0	-1,414	2779,9	2679,2	100,7
6	0	1,414	2022,0	1787,6	234,4
7	-1,414	0	1924,2	2234,9	-310,7
8	1,414	0	5382,0	4736,5	645,5
9	0	0	5992,4	5903,1	89,3
10	0	0	5991,4	5903,1	88,3
11	0	0	6129,0	5903,1	225,9
12	0	0	6029,5	5903,1	126,4
13	0	0	5372,8	5903,1	-530,3

İki bağımsız değişkenin, ikinci dereceden polinom model ile ifade edilen bir matematiksel ilişkiye sahip olduğu varsayıldı:

$$Y=\beta_0+\beta_1[c\text{-MWCNT}]+\beta_2[\text{TiO}_2\text{NP}]+\beta_{11}[c\text{-MWCNT}]^2+\beta_{22}[\text{TiO}_2\text{NP}]^2+\beta_{12}[c\text{-MWCNT}][\text{TiO}_2\text{NP}]$$

Burada Y , amperometrik akım cevabını, β_0 model sabitini, β_1 , β_2 doğrusal; β_{11} , β_{22} ikinci derece etkileşim ve β_{12} yüzey bileşenlerinin birbiriyle etkileşim sabitlerini ifade eder.

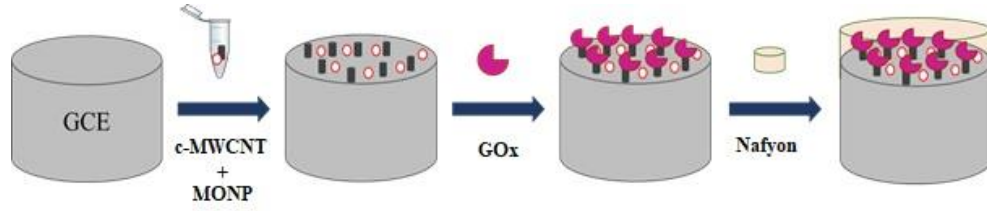
Her bir tasarım ile elde edilen cevaplar Design-Expert yazılımı ile incelendi. Model ve faktörler istatistiksel olarak varyans analizi (ANOVA) kullanılarak %95 güven seviyesinde ($p=0,05$) incelendi. Optimum yüzey bileşimini belirlemek amacıyla, aynı zamanda, regresyon analizi yapıldı ve cevap yüzey eğrileri çizildi.

c-MWCNT ve TiO_2NP miktarları 2^2 - faktöriyel MKT ile optimize edildikten sonra, GOx enziminin miktarını optimize etmek için, 10 μL tampon çözeltide 20, 30, 40 ve 50 U olmak üzere 4 farklı derişimde enzim çözeltileri hazırlandı ve modifiye elektroda immobilize edilip nafyon ile kaplandı (GOx/ TiO_2NP -c-MWCNT/GCE). Elektrotların amperometrik akım cevabı +0,70 V'ta sabit derişimde ($2,0 \times 10^{-4}$ M) glukoz içeren 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde kaydedildi. Elde edilen akım farkları, enzim miktarlarına karşı grafiğe geçirilerek, optimum enzim miktarı belirlendi.

Yukarıda belirtildiği şekilde c-MWCNT, TiO_2NP ve GOx için bulunan optimum miktarlar kullanılarak GOx/ TiO_2NP -c-MWCNT/GCE biyosensörü aşağıdaki gibi hazırlandı:

Önce, optimum miktarlardaki c-MWCNT ve TiO_2NP 1 mL kitosan çözeltisinde dağıtıldı. Homojen bir karışım elde edebilmek için ultrasonik banyoda 2 saat; vortekste 5 dakika karıştırıldıktan hemen sonra bu karışımdan 6 μL alınarak temizlenmiş GCE yüzeyine damlatıldı. Oda sıcaklığında kurutularak üzerine optimum derişimdeki GOx çözeltisinden 10 μL damlatıldı ve +4 °C'de kurutuldu. Sonra, hazırlanan biyosensör yüzeyi 7,5 μL %0,25'lik nafyon çözeltisi ile kaplandı ve kuruması için oda sıcaklığında bekletildi. Son olarak, biyosensör yüzeyi 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu ile yıkandı ve

kullanılmadığında +4 °C’de buzdolabında saklandı. Biyosensörlerin hazırlanışına ait şema Şekil 3.1’de verildi.



Şekil 3.1 GOx/MONP-c-MWCNT/GCE biyosensörünün hazırlanma basamakları

3.5.3 2³-faktöriyel MKT yöntemi

c-MWCNT, TiO₂NP ve GOx miktarlarını optimize etmek amacıyla 2³-faktöriyel MKT oluşturuldu. Bu tasarımla ilgili seviye değerleri Çizelge 3.6’da verildi. Tasarımda 8 faktöriyel, 6 aksiyel ve 8 merkez nokta olmak üzere 22 deney yapıldı. Ortogonal ve döndürülebilir tasarım için α değeri 1,68 olarak kullanıldı. Tasarıma göre her bir değişken 5 seviyede incelendi. Tasarım matrisi Çizelge 3.7’de gösterildi. Tasarıma göre belirlenen miktarlarda c-MWCNT ve TiO₂NP, 1 mL kitosanda dağıtıldı. Bu karışımlardan 6’şar μ L alınarak temizlenmiş GCE yüzeylerine damlatıldı ve oda sıcaklığında kurutularak 22 modifiye elektrot hazırlandı (TiO₂-c-MWCNT/GCE). Tasarımda belirlenen derişimlerde hazırlanan GOx çözeltilerinden, her bir modifiye elektrodun yüzeyine 10 μ L damlatılarak +4 °C’de kurutuldu ve nafyon ile kaplandı (GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE). Bu elektrotların amperometrik akım cevapları +0,70 V’ta sabit derişimde ($8,0 \times 10^{-5}$ M) glukoz içeren 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltilisinde kaydedilerek deneysel tasarım için cevap olarak elde edildi (Çizelge 3.7).

Üç bağımsız değişkenin, ikinci dereceden polinom model ile ifade edilen bir matematiksel ilişkiye sahip olduğu varsayılarak

$$Y = \beta_0 + \beta_1[c\text{-MWCNT}] + \beta_2[\text{TiO}_2\text{NP}] + \beta_3[\text{GOx}] + \beta_{11}[c\text{-MWCNT}]^2 + \beta_{22}[\text{TiO}_2\text{NP}]^2 + \beta_{33}[\text{GOx}]^2 + \beta_{12}[c\text{-MWCNT}] [\text{TiO}_2\text{NP}] + \beta_{13}[c\text{-MWCNT}] [\text{GOx}] + \beta_{23}[\text{TiO}_2\text{NP}] [\text{GOx}]$$

eşitliği yazıldı. Burada Y , amperometrik akım cevabını, β_0 model sabitini; $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ doğrusal, $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ ikinci derece etkileşim ve $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ yüzey bileşenlerinin birbiriyle etkileşim sabitlerini ifade eder. Elde edilen veriler Design-Expert yazılımı ile incelendi.

Çizelge 3.6 2^3 -faktöriyel MKT ile c-MWCNT, TiO₂NP ve GOx miktarlarının optimizasyonu için MKT'deki deneysel faktörler ve seviyeler

Faktör	Birim	Seviye				
		-1,68	-1	0	1	+1,68
A: c-MWCNT	mg mL ⁻¹	3,18	10	20	30	36,82
B: TiO ₂ NP	mg mL ⁻¹	3,18	10	20	30	36,82
C: GOx	Ünite/10 μ L	13,18	20	30	40	46,82

Çizelge 3.7 2^3 -faktöriyel MKT ve GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE ile elde edilen deneysel ve beklenen amperometrik cevap akımları ($8,0 \times 10^{-5}$ M glukoz içeren 0,025 M pH 8 fosfat tampon çözeltisinde)

Elektrot	A	B	C	Amperometrik Akım Cevabı, nA		
				Deneysel	Beklenen	Artık
1	-1	-1	-1	395	470,3	-75,3
2	1	-1	-1	700	663,2	36,8
3	-1	1	-1	594	508,8	85,2
4	1	1	-1	1105	1018,8	86,2
5	-1	-1	1	626	711,8	-85,8
6	1	-1	1	811	895,8	-84,8
7	-1	1	1	555	591,4	-36,4
8	1	1	1	1168	1092,3	75,7
9	-1,68	0	0	268	201,0	67,0
10	1,68	0	0	717	784,5	-67,5
11	0	-1,68	0	802	667,4	134,6
12	0	1,68	0	750	875,1	-125,1
13	0	0	-1,68	820	898,8	-78,8
14	0	0	1,68	1242	1163,7	78,3
15	0	0	0	1145	1141,2	3,8
16	0	0	0	1175	1141,2	33,8
17	0	0	0	1168	1141,2	26,8
18	0	0	0	935	1141,2	-206,2
19	0	0	0	1171	1141,2	29,8
20	0	0	0	1180	1141,2	38,8
21	0	0	0	1202	1141,2	60,8
22	0	0	0	1154	1141,2	12,8

3.5.4 2⁴-faktöriyel MKT yöntemi

c-MWCNT, TiO₂NP, GOx ve Nafyon miktarlarını optimize etmek amacıyla 2⁴-faktöriyel MKT oluşturuldu. Bu tasarım için deneysel faktörler ve seviye değerleri Çizelge 3.8'de verildi. Tasarımda 16 faktöriyel, 8 aksiyel ve 6 merkez nokta olmak üzere 30 deney yapıldı. Ortogonal ve döndürülebilir tasarım için α değeri 2,0 olarak kullanıldı. Tasarım matrisi Çizelge 3.9'da verildi. Tasarıma göre belirlenen miktarlarda c-MWCNT ve TiO₂NP, 1 mL kitosan çözeltisinde homojen dağıtılıp 6 µL temiz GCE yüzeyine damlatılarak modifiye elektrotlar hazırlandı (TiO₂NP-c-MWCNT/GCE). Her bir modifiye elektrodun yüzeyine tasarımda belirlenen derişimlerdeki GOx çözeltilerinden, 10 µL damlatılarak +4 °C'de kurutuldu ve belirlenen derişimlerdeki Nafyon çözeltileri ile kaplandı (GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE). Bu biyosensörlerin amperometrik akım cevapları +0,70 V'ta sabit derişimde ($8,0 \times 10^{-5}$ M) glukoz içeren 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde kaydedilerek deneysel tasarım için cevap olarak elde edildi (Çizelge 3.9).

Dört bağımsız değişken, ikinci dereceden polinom model ile ifade edilen bir matematiksel model şöyle yazılabilir:

$$Y = \beta_0 + \beta_1[\text{c-MWCNT}] + \beta_2[\text{TiO}_2\text{NP}] + \beta_3[\text{GOx}] + \beta_4[\text{Nafyon}] + \beta_{11}[\text{c-MWCNT}]^2 + \beta_{22}[\text{TiO}_2\text{NP}]^2 + \beta_{33}[\text{GOx}]^2 + \beta_{44}[\text{Nafyon}]^2 + \beta_{12}[\text{c-MWCNT}] [\text{TiO}_2\text{NP}] + \beta_{13}[\text{c-MWCNT}] [\text{GOx}] + \beta_{14}[\text{c-MWCNT}] [\text{Nafyon}] + \beta_{23} [\text{TiO}_2\text{NP}] [\text{GOx}] + \beta_{24} [\text{TiO}_2\text{NP}] [\text{Nafyon}] + \beta_{34} [\text{GOx}] [\text{Nafyon}]$$

Burada Y , amperometrik akım cevabını, β_0 model sabitini, $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$ doğrusal; $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}, \beta_{44}$ ikinci derece etkileşim ve $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{14}, \beta_{23}, \beta_{24}$ ve β_{34} yüzey bileşenlerinin birbiriyle etkileşim sabitlerini ifade eder. Elde edilen veriler Design-Expert yazılımı ile incelendi.

Çizelge 3.8 2⁴-faktöriyel MKT ile c-MWCNT, TiO₂NP, GOx ve Nafyon miktarlarının optimizasyonu için MKT'deki deneysel faktörler ve seviyeler

Faktör	Birim	Seviye				
		-2	-1	0	1	+2
A: c-MWCNT	mg mL ⁻¹	0	10	20	30	40
B: TiO ₂ NP	mg mL ⁻¹	0	10	20	30	40
C: GOx	Ünite/10µL	10	20	30	40	50
D: Nafyon	%	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30

Çizelge 3.9 2⁴-faktöriyel MKT ve GOx/TiO₂-c-MWCNT/GCE ile elde edilen deneysel ve beklenen amperometrik cevap akımları (8,0×10⁻⁵ M glukoz içeren 0,025 M pH 8 fosfat tampon çözeltisinde)

Elektrot	A	B	C	D	Amperometrik Akım Cevabı, nA		
					Deneysel	Beklenen	Artık
1	-1	-1	-1	-1	1245,9	1249,3	-3,4
2	1	-1	-1	-1	1508	1336,0	172,0
3	-1	1	-1	-1	1709	1416,3	292,7
4	1	1	-1	-1	1444	1172,8	271,2
5	-1	-1	1	-1	1889,5	1371,9	517,6
6	1	-1	1	-1	1210	1459,2	-249,2
7	-1	1	1	-1	1913,7	1654,3	259,4
8	1	1	1	-1	1326	1411,4	-85,4
9	-1	-1	-1	1	1553,4	1157,9	395,5
10	1	-1	-1	1	1143	1278,6	-135,6
11	-1	1	-1	1	1765	1392,0	373,0
12	1	1	-1	1	975	1182,4	-207,4
13	-1	-1	1	1	1009	1156,3	-147,3
14	1	-1	1	1	1295	1277,5	17,5
15	-1	1	1	1	1644	1505,8	138,2
16	1	1	1	1	1424	1296,8	127,2
17	-2	0	0	0	426,5	1122,4	-695,9
18	2	0	0	0	1262	1000,1	261,9
19	0	-2	0	0	1260,6	1327,2	-66,6
20	0	2	0	0	1146	1513,5	-367,5
21	0	0	-2	0	782	1144,0	-362,0
22	0	0	2	0	1309	1381,0	-72,0
23	0	0	0	-2	1318	1688,5	-370,5
24	0	0	0	2	1419	1482,5	-63,5
25	0	0	0	0	2257	2389,3	-132,3
26	0	0	0	0	2575	2389,3	185,7
27	0	0	0	0	2526	2389,3	136,7
28	0	0	0	0	2613	2389,3	223,7
29	0	0	0	0	2405	2389,3	15,7
30	0	0	0	0	1960	2389,3	-429,3

3.5.5 2²-faktöriyel MKT ile MONP-c-MWCNT/GCE'lerin yüzey bileşimi optimizasyonu

Bölüm 3.5.2'de belirtilen 2²-faktöriyel MKT kullanılarak bu tez çalışmasında incelenen c-MWCNT ve tüm MONP'lerden (Co₃O₄NP, Fe₃O₄NP, SnO₂NP, Fe₂O₃NP, Al₂O₃NP, CuONP ve ZnONP) oluşan diğer yedi modifiye GCE yüzey bileşimi de optimize edildi. Bu optimizasyonda her bir elektrot kullanılan deneysel faktör ve seviye değerleri Çizelge 3.10'de verildi. Çizelgedeki miktarlar kullanılarak 2²-faktöriyel MKT oluşturuldu (Çizelge 3.11)

Çizelge 3.10 2²-faktöriyel MKT ile c-MWCNT ile MONP miktarlarının optimizasyonu için MKT'deki deneysel faktörler ve seviyeler

Faktör	Birim	Seviye				
		- α	-1	0	1	+ α
A: c-MWCNT	mg mL ⁻¹	5,86	10	20	30	34,14
B: Co ₃ O ₄ NP	mg mL ⁻¹	2,93	5	10	15	17,07
B: Fe ₃ O ₄ NP	mg mL ⁻¹	5,86	10	20	30	34,14
B: SnO ₂ NP	mg mL ⁻¹	5,86	10	20	30	34,14
B: TiO ₂ NP	mg mL ⁻¹	5,86	10	20	30	34,14
B: Fe ₂ O ₃ NP	mg mL ⁻¹	5,86	10	20	30	34,14
B: Al ₂ O ₃ NP	mg mL ⁻¹	5,86	10	20	30	34,14
B: CuONP	mg mL ⁻¹	2,93	5	10	15	17,07
B: ZnONP	mg mL ⁻¹	2,93	5	10	15	17,07

Bu tasarıma göre her bir MONP ve c-MWCNT için belirlenen miktarlar 1 mL kitosanda homojen olarak dağıtıldı ve bu karışımdan alınan 6 μ L GCE yüzeyine damlatılarak 13'er modifiye elektrot oluşturuldu. Tüm elektrotların +0,70 V potansiyelde $2,0 \times 10^{-4}$ M H₂O₂ çözeltisi için amperometrik akım cevapları kaydedilerek deneysel tasarım için cevap olarak elde edildi (Çizelge 3.11)

Çizelge 3.11 2²-faktöriyel MKT ve MONP-c-MWCNT/GCE ile elde edilen deneysel ve beklenen amperometrik cevap akımları (2,0×10⁻⁴ M H₂O₂ içeren 0,025 M pH 8 fosfat tampon çözeltisinde)

Elektrot	Amperometrik cevap akımı, nA									
	A	B	Co ₃ O ₄ NP		Fe ₃ O ₄ NP		SnO ₂ NP		Fe ₂ O ₃ NP	
			deneysel	beklenen	deneysel	beklenen	deneysel	beklenen	deneysel	beklenen
1	-1	-1	1885,2	2210,0	2886,9	2848,8	3808,2	3302,3	2225,1	2134,3
2	1	-1	8123,0	7152,9	3955,2	3758,8	4913,0	3893,7	3579	4109,7
3	-1	1	6149,0	6369,3	1870,0	1706,6	1703,1	1575,7	2494,9	1897,9
4	1	1	9511,0	8436,5	3391,0	3069,3	5109,0	4468,2	2833,4	2857,9
5	0	-1,414	4102,0	4403,0	3799,6	3890,9	3729,6	4570,6	3704	3379,2
6	0	1,414	7803,0	8251,7	2327,3	2595,8	3450,2	3755,9	1935,9	2327,0
7	-1,414	0	3819,2	3278,5	1576,9	1644,9	1014,6	1224,9	1136,3	1608,9
8	1,414	0	6945,0	8235,5	2960,0	3251,9	2752,0	3688,4	4091	3684,6
9	0	0	8640,0	8886,4	4205,3	4614,9	5751,3	6106,0	4081,2	4652,4
10	0	0	7799,0	8886,4	4697,5	4614,9	5769,0	6106,0	4740	4652,4
11	0	0	9437,0	8886,4	4397,5	4614,9	6813,0	6106,0	4974	4652,4
12	0	0	9120,0	8886,4	5206,4	4614,9	5806,0	6106,0	4684,9	4652,4
13	0	0	9436,0	8886,4	4568,0	4614,9	6390,6	6106,0	4782	4652,4

Çizelge 3.11 2²-faktöriyel MKT ve MONP-c-MWCNT/GCE ile elde edilen deneysel ve beklenen amperometrik cevap akımları (2,0×10⁻⁴ M H₂O₂ içeren 0,025 M pH 8 fosfat tampon çözeltisinde) (devam)

Elektrot	Amperometrik cevap akımı, nA							
	A	B	Al ₂ O ₃ NP		CuONP		ZnONP	
			deneysel	beklenen	deneysel	beklenen	deneysel	beklenen
1	-1	-1	3659	3155,1	2843	3160,6	2391,5	2456,3
2	1	-1	5036	4721,5	2652	3076,6	4275,0	4099,3
3	-1	1	3492	3481,0	2004	1601,4	1781,8	1667,9
4	1	1	4132	4310,4	3971	3675,4	3436,0	3080,9
5	0	-1,414	4286	4797,3	3380,7	2860,4	4228,0	4246,3
6	0	1,414	4923	4737,2	1682,9	2181,2	2696,3	2968,3
7	-1,414	0	1923	2219,7	2468	2532,6	988,9	963,9
8	1,414	0	3885	3913,8	4026,4	3939,8	2810,0	3125,2
9	0	0	5208	5172,0	5189,6	5408,4	4250,2	4128,6
10	0	0	5326	5172,0	5366,4	5408,4	3272,0	4128,6
11	0	0	5965	5172,0	5018	5408,4	3531,0	4128,6
12	0	0	4404	5172,0	6074	5408,4	5158,0	4128,6
13	0	0	4957	5172,0	5394	5408,4	4432,0	4128,6

Her tasarımdaki iki bağımsız değişken, ikinci dereceden polinom model ile ifade edilen bir matematiksel ilişkiye sahiptir:

$$Y = \beta_0 + \beta_1[\text{c-MWCNT}] + \beta_2[\text{MONP}] + \beta_{11}[\text{c-MWCNT}]^2 + \beta_{22}[\text{MONP}]^2 + \beta_{12}[\text{c-MWCNT}][\text{MONP}]$$

Yukarıda belirtilen her bir terim 3.5.2’de belirtilen anlamları ifade eder. ANOVA’dan bulunan β değerleri kullanılarak elde edilen polinom modelin her bir değişken için yukarıdaki eşitliğin türevi alınıp sifıra eşitlenerek her bir MONP içeren elektrot için optimum c-MWCNT ve MONP miktarları hesaplandı. Bu optimum miktarlar kullanılarak her bir MONP’ü içeren yedi adet GO_x/MONP-c-MWCNT/GCE biyosensörü Bölüm 3.5.2’de anlatıldığı şekilde hazırlandı.

3.6 Biyosensörlerin Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

Biyosensörlerin optimum çalışma koşullarının belirlenmesi için 2²-faktöriyel MKT ile yapılan tasarıma göre hazırlanan modifiye elektrot (TiO₂NP-c-MWCNT/GCE) kullanıldı. Belirlenen optimum koşullar diğer modifiye elektrotlar için de kullanıldı.

3.6.1 Tampon derişimi

GO_x/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE’nin cevabına tampon derişiminin etkisini incelemek için pH’sı 8,0 olan 0,025; 0,050; 0,075 ve 0,100 M’lık dört ayrı derişimde fosfat tamponu hazırlandı. Her bir tampon çözelti ortamında biyosensörün amperometrik akım cevabı +0,70 V’ta sabit glukoz derişiminde (2,0×10⁻⁴ M) ölçüldü. En yüksek akım farkının gözlemlendiği tampon derişimi optimum değer olarak seçildi.

3.6.2 pH

GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin cevabına ortam pH'sının etkisini belirlemek için, pH'sı 6,0–9,5 aralığında değiştirilerek 0,025 M derişimde fosfat tampon çözeltileri hazırlandı. GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin sabit glukoz derişiminde ($2,0 \times 10^{-4}$ M) tüm pH'larda amperometrik akım cevapları ölçüldü. En yüksek akım farkının gözleendiği pH değeri optimum değer olarak belirlendi.

3.6.3 Sıcaklık

GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin cevabına sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla, 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponunda termostatlı ve sirkülasyonlu su banyosu kullanılarak 25–50 °C aralığında, sıcaklık 5,0 birim değiştirilerek sabit glukoz derişiminde ($2,0 \times 10^{-4}$ M) biyosensörün amperometrik akım cevapları kaydedilerek en yüksek akım farkının gözleendiği sıcaklık belirlendi.

3.7 Biyosensörlerin Performans Faktörlerinin Belirlenmesi

3.7.1 Doğrusal çalışma aralığı ve duyarlık

Her bir biyosensörün doğrusal çalışma aralığı ve duyarlığının belirlenmesi için, biyosensörlerin optimum çalışma koşulları altında glukozu amperometrik akım cevabı ölçüldü. Bu amaçla, biyosensörlerin her biri için 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponunda +0,70 V'ta kararlı hal akımı elde edildikten sonra ortama ard arda glukoz çözeltilerinden uygun miktarda ilave edildi. Zamana karşı akım değişimleri gözlenerek kronoamperometrik *i-t* grafikleri oluşturuldu ve bu grafiklerden yararlanılarak her bir biyosensör için ayrı ayrı, glukoz derişimine karşı gözlenen akım farkları grafiğe geçirildi. Elde edilen doğrusal kısımdan biyosensörün çalışma aralığı; doğrusal kısmın eğiminden de duyarlılığı belirlendi.

3.7.2 Alt tayin sınırı ve gözlenebilme sınırı

Her bir biyosensörün alt tayin sınırı (LOQ) ve gözlenebilme sınırının (LOD) belirlenmesi için optimum çalışma koşullarında doğrusal çalışma aralığının en alt noktasına karşılık gelen glukoz derişimindeki çözeltinin akım cevabı ard arda 10 kez ölçülüp standart sapması (s) hesaplandı. Aynı biyosensörlerle kalibrasyon eğrileri çizilerek doğrunun eğimi (m ; duyarlılık) bulundu. Elde edilen standart sapma ve eğim değerleri kullanılarak $10s/m$ ifadesinden LOQ; $3s/m$ ifadesinden ise LOD değerleri hesaplandı.

3.7.3 Cevap süresi

Optimum bileşimde hazırlanan her bir biyosensörün dinamik cevap süresi, $i-t$ grafiklerinden yararlanılarak belirlendi. Bu amaçla, optimum çalışma koşullarında kararlı hal akımına ulaştıktan sonra ortama uygun miktarda glukoz ilave edildi ve akım cevabının kararlı hale gelmesi için gereken süre belirlendi. Bu sürenin %95'ine karşı gelen süre, cevap süresi olarak kabul edildi.

3.7.4 Michaelis-Menten sabiti (K_M)

GOx/MONP-c-MWCNT/GCE biyosensörleri için, immobilize edilmiş GOx'in Michaelis-Menten sabitini (K_M) hesaplamak amacıyla, her bir biyosensörün optimum çalışma koşullarında, Bölüm 3.7.1'de anlatıldığı gibi belirlenen doğrusal derişim aralığındaki glukoz derişimindeki akım cevabı ölçüldü ve Lineweaver-Burk grafiğı ($1/[Glukoz]-1/[\Delta i]$) çizildi. Bu grafiğın $1/[\Delta i]$ değerinin sıfır olduğu noktadaki $1/[Glukoz]$ değerinden yararlanarak immobilize edilmiş GOx enzimi için K_M sabiti belirlendi.

3.7.5 Tekrar kullanılabilirlik

Optimum bileşimde hazırlanan her bir biyosensör için, aynı elektrodun optimum çalışma koşullarında ard arda üç kalibrasyon eğrisi çizildi. Bu kalibrasyon eğrilerinin

duyarlıklarının bağıl standart sapmaları (BSS) hesaplanarak tekrar kullanılabilirlik belirlendi.

3.7.6 Tekrar üretilebilirlik

Biyosensörlerin her biri optimum bileşimde üçer kez hazırlanarak optimum çalışma koşullarında kalibrasyon eğrileri çizildi ve kalibrasyon eğrilerinin duyarlıklarının bağıl standart sapmaları (BSS) hesaplanarak tekrar üretilebilirlik belirlendi.

3.7.7 Tarama hızı

Optimum bileşimde hazırlanan her bir biyosensörün, 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponunda, 5 ile 200 mV s⁻¹ arasında tarama hızlarında, -0,80 ile 0,00 V arasında dönüşümlü voltamogramları alındı. Her bir tarama hızında GOx'a ait pik akımı kaydedilerek elektron aktarım hız sabiti (*ks*) belirlendi.

3.7.8 Çalışma kararlılığı

Optimum bileşimde hazırlanan her bir biyosensörün amperometrik akım cevabı, optimum çalışma koşullarında sabit glukoz derişiminde (0,20 mM) belirli aralıklarla ölçümler yapılarak incelendi ve ölçüm sayısına karşı akım cevabı grafiğe geçirildi. 50 ölçüm süresince biyosensörlerin amperometrik akım cevaplarındaki % değişimlerden yararlanılarak elektrotların çalışma kararlılığı belirlendi.

3.7.9 Bozucu türlerin etkisi

Optimum bileşimde hazırlanan biyosensörlerin cevabı üzerine bozucu etki yapabileceği düşünölen çeşitli türlerin etkisini incelemek amacıyla, her bir elektrodun optimum çalışma koşullarında kararlı hal akımına gelmesi için beklendi. Ortama derişimi 1,0 mM olacak şekilde glukoz ilavesi yapıldı ve akımda gözlenen değişim belirlendi. Ardından aynı çözeltiye her birinin derişimi 0,02 mM olacak şekilde ard arda askorbik asit, ürik asit, üre ve sodyum klorür ilave edilerek, amperometrik akım cevapları ölçöldü ve *i-t*

grafikleri oluşturuldu. Glukoz için ölçülen akım değişimi Δi_1 , bozucu türlerden kaynaklanan akım değişimi Δi_2 olmak üzere % bozucu etki aşağıdaki gibi hesaplandı:

$$\% \text{ Bozucu etki} = \frac{\Delta i_1}{(\Delta i_1 + \Delta i_2)} \times 100$$

3.8 Gerçek Numune Analizi

Hazırlanan GOx/MONPc-MWCNT/GCE biyosensörlerinin her birinin gerçek numunelerin analizinde kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla, insan kan serumu numunelerinde glukoz tayini yapıldı.

Gönüllü yetişkin 6 bireyden kan numuneleri alındı. Bu numunelerdeki glukoz miktarı, uzman bir laboratuvarında standart spektrofotometrik yöntem ile tayin edildi. Aynı kan serum numunelerindeki glukoz miktarı, hazırlanan biyosensörler kullanılarak standart katma yöntemi ile de aşağıdaki gibi tayin edildi: Her bir biyosensör, optimum koşullardaki 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponun daldırılarak kararlı hal akımının elde edilmesi için beklendi. Bu çözeltiliye, yukarıda sözü edilen kan serum numunelerinden belli bir miktar ilave edilip akımda gözlenen değişim belirlendi. Sonra, standart glukoz çözeltilerinden ard arda ilaveler yapılarak standart katma eğrileri çizildi. Bu eğrilerden yararlanılarak kan serum numunelerinde glukoz derişimi hesaplandı.

Referans yöntem ile elde edilen sonuçlar sonuçlar ile, biyosensörler ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması için, veri çifti t testi kullanıldı. Elde edilen deneysel t değeri, %95 güven seviyesinde kritik t değeri ile karşılaştırılarak, bulunan sonuçların birbiri ile uyumu incelendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Literatürde çeşitli metal oksit nanopartiküllerin biyosensörlerde enzim ile elektrot arasındaki elektron aktarımını kolaylaştırarak ve/veya yüzey alanını arttırarak biyosensör cevabını iyileştirdiği ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Roychoudhury vd. 2016, Thandavan vd. 2015). Ancak, bu çalışmaların her birinde metal oksit nanopartiküllerden sadece biri seçilmiş olup, çeşitli MONP'lerin etkisinin karşılaştırılması ile ilgili çalışmalar yapılmamıştır. Ayrıca, karbon temelli nano malzemeler, özellikle de karbon nanotüpler, biyosensör hazırlanmasında geniş yüzey alanı, iyi elektrik iletkenliği, biyoyumluluğu ve yüksek mekanik direncine sahip olmaları gibi sebeplerle sıklıkla kullanılmaktadır (Mallakpour vd. 2016). Bu amaçla, bu tez çalışmasında, sekiz adet metal oksit nanopartikül (MONP'ler; TiO_2NP , Co_3O_4NP , Fe_3O_4NP , SnO_2NP , Fe_2O_3NP , Al_2O_3NP , $CuONP$ ve $ZnONP$) c-MWCNT ile birlikte GCE yüzeyine damlatılarak modifiye elektrotlar hazırlandı. Modifiye elektrotların yüzeyine biyokimyasal kararlılığa, düşük maliyete ve kullanım kolaylığına sahip olması sebebiyle model enzim olarak seçilen GOx immobilize edilerek glukozu duyarlı amperometrik biyosensörler hazırlandı. Son olarak elektrot yüzeyinde bir film tabakası oluşturularak enzimin yüzeyden uzaklaşmasını engelleyen Nafyon ile kaplandı.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında GCE yüzeyi, c-MWCNT ve sözü edilen MONP'ler ile modifiye edilerek

- $GOx/Co_3O_4NP-c-MWCNT/GCE$
- $GOx/Fe_3O_4NP-c-MWCNT/GCE$
- $GOx/SnO_2NP-c-MWCNT/GCE$
- $GOx/TiO_2NP-c-MWCNT/GCE$
- $GOx/Fe_2O_3NP-c-MWCNT/GCE$
- $GOx/Al_2O_3NP-c-MWCNT/GCE$
- $GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE$
- $GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE$

olmak üzere sekiz adet biyosensör hazırlandı. Her bir biyosensörün yüzey bileşimi MKT ile optimize edildi; elektrokimyasal davranışı incelendi ve yüzey karakterizasyonu yapıldı; çalışma koşulları ile performans faktörleri belirlendi. Ayrıca, bu biyosensörlerin gerçek numunelerde glukoz tayinine uygulanabilirliği araştırıldı. Her bir biyosensör için elde edilen bulgular ve tartışma aşağıda ayrıntılı biçimde verildi.

4.1 GO_x/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE Biyosensörü ile İlgili Çalışmalar

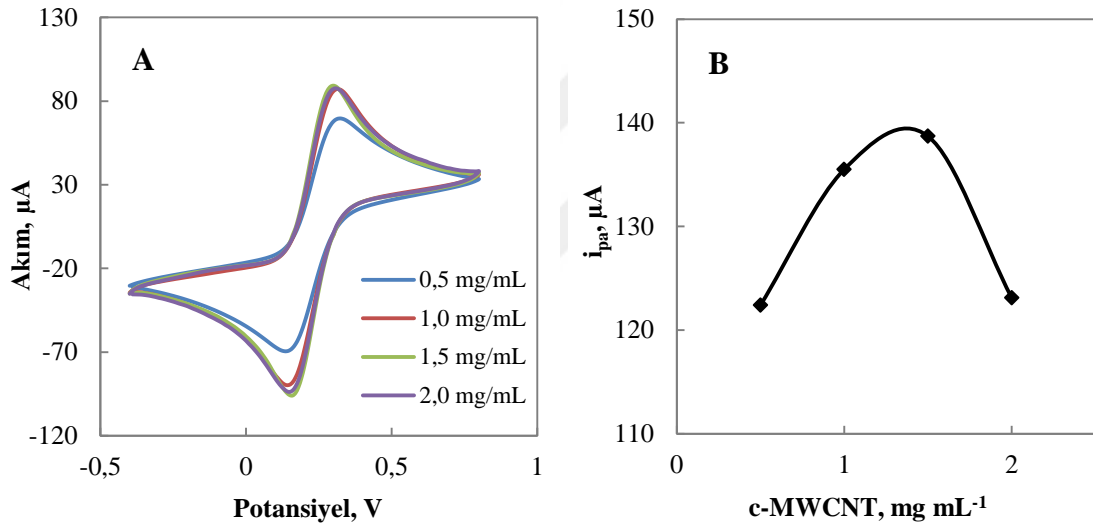
4.1.1 Elektrot yüzey bileşiminin optimizasyonu

Enzim temelli biyosensörlerin hazırlanması sırasında elektrot yüzey bileşiminin optimizasyonu, biyosensör performansının iyileştirilmesi için çok önemli bir basamaktır (Chira vd. 2014). Modifikasyon malzemelerinin türünün yanında, bu modifikasyon malzemelerinin elektrot yüzeyindeki miktarları da önemlidir. Bu miktarların belirlenmesinde tek seferde tek değişken yöntemi ve kemometrik yöntemler gibi çeşitli yöntemler kullanılabilir (Del Torno-de Román vd. 2013, Kaçar vd. 2017). Modifikasyon malzemelerinin elektrot yüzeyindeki miktarlarının, birden fazla modifikasyon malzemesi varsa, birbirleriyle etkileşimlerinin de belirlenmesi büyük önem taşır. Bu amaçla, bu tez çalışması kapsamında, modifikasyon malzemelerinin miktarlarının optimizasyonu ve malzemelerin birbirleriyle etkileşimini belirlemek amacıyla, MKT yaklaşımı kullanıldı. MKT, modifikasyon malzemelerinin miktarları ile bu malzemelerin etkileşimlerinin, en az sayıda deneyle belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Alonso-Lomillo vd. 2005).

Bu çalışmada, modifikasyon malzemelerinin (MONP'ler, c-MWCNT, GO_x ve Nafyon) optimum miktarlarını belirlemek için dört farklı yaklaşımdan yararlanıldı: (i) tek seferde tek değişken yöntemi, (ii) 2²-faktöriyel MKT, (iii) 2³-faktöriyel MKT ve (iv) 2⁴-faktöriyel MKT. Bu dört yöntemden elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde sadece TiO₂NP-c-MWCNT/GCE ve GO_x/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE kullanıldı ve dört yöntem ile elde edilen sonuçlar ve tartışmalar aşağıda ayrıntılı bir şekilde verildi.

4.1.1.1 Tek seferde tek değişken yöntemi

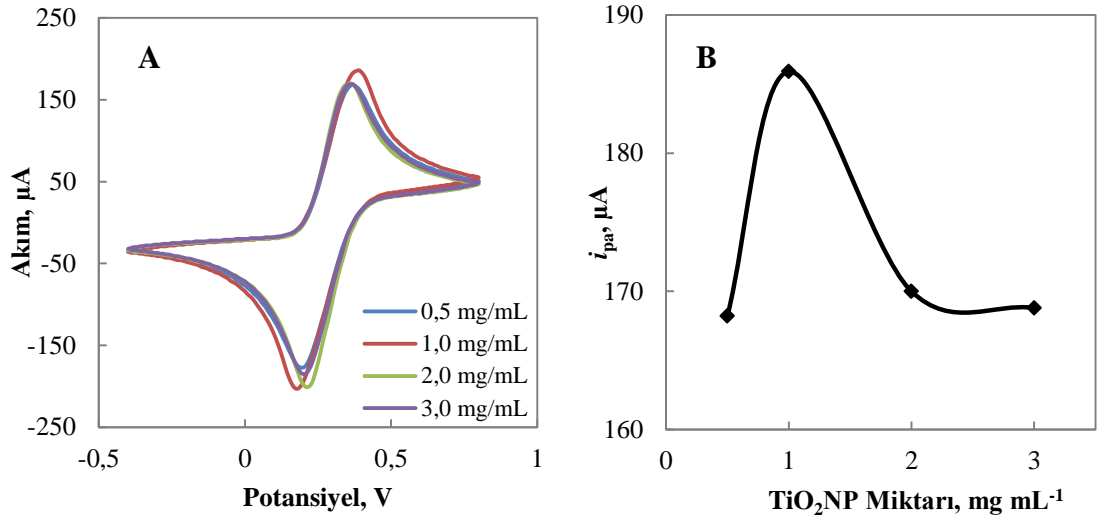
Bu yöntemde önce, 1 mL kitosan çözeltisinde dağıtılan dört farklı miktarda (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg) c-MWCNT ile GCE yüzeyi modifiye edildi (c-MWCNT/GCE). Bu elektrotların 0,10 M KCl içeren 5,0 mM Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks probunda 50 mV s⁻¹ tarama hızında CV'leri kaydedildi (Şekil 4.1.A). İlgili voltamogramlar incelenerek c-MWCNT derişimine karşı Fe(CN)₆^{3-/4-} çiftine ait yükseltgenme pik akımı grafiğe geçirildi (Şekil 4.1.B). Bu grafikte, c-MWCNT derişimi 1,5 mg mL⁻¹ olana kadar akım cevabının arttığı; derişim 2,0 mg mL⁻¹ olduğunda ise azaldığı görüldü. Bu yüzden en iyi cevabın alındığı 1,5 mg mL⁻¹ c-MWCNT derişimi, optimum derişim olarak belirlendi.



Şekil 4.1 c-MWCNT/GCE'nin akım cevabına c-MWCNT miktarının etkisi

A. Dönüşümlü voltamogramlar ve B. c-MWCNT miktarı ile anodik pik akımındaki değişim (50 mV s⁻¹ tarama hızında 0,10 M KCl içeren 5,0 mM Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks probunda)

Optimum TiO₂NP miktarını belirlemek için; c-MWCNT miktarı 1 mL kitosanda 1,5 mg olacak şekilde sabit tutularak bu çözeltiye 0,5; 1,0; 2,0 ve 3,0 mg TiO₂NP ilave edilerek hazırlanan karışım ile GCE yüzeyi modifiye edildi (TiO₂-c-MWCNT/GCE). Bu elektrotların redoks probunda CV'leri kaydedildi (Şekil 4.2.A). Voltamogramlardan elde edilen TiO₂NP derişimine karşı yükseltgenme pik akımı grafiğe geçirildiğinde (Şekil 4.2.B), en yüksek pik akımının TiO₂NP derişimi 1,0 mg mL⁻¹ olan elektrot ile elde edildiği görüldü ve bu değer optimum değer olarak seçildi.



Şekil 4.2 $\text{TiO}_2\text{-c-MWCNT/GCE}$ 'nin akım cevabına TiO_2NP miktarının etkisi

A. Dönüşümlü voltamogramlar ve B. TiO_2NP miktarı ile anodik pik akımındaki değişim (50 mV s^{-1} tarama hızında 0,10 M KCl içeren 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks probunda)

4.1.1.2 2^2 -faktöriyel MKT

MKT, bir işlem veya yöntemde performansı arttırmak ve hatayı en aza indirmek için, mevcut değişkenlerin etkisini belirleme ve optimize etmeye yardımcı olan yüzey yanıt yöntemlerinden biridir. MKT, önemli değişkenlerin ve optimum koşulların belirlenmesini sağlamak için kullanılan, matematik ve istatistiğin kombinasyonu olan bir yöntem olup ana etkilerin ve etkileşimlerin en az sayıda deneyle belirlenmesini sağlar (Kolaei vd. 2016, Bardajee vd. 2017). Literatürde, cevaba etki eden birden fazla değişken olduğu durumlarda, bağımlı ve bağımsız değişkenlerin birbiri ile etkileşiminin MKT ile başarılı bir şekilde belirlendiği çeşitli çalışmalar mevcuttur. (Dastian ve Zare-Dorabei, 2017, Govindan vd. 2017, Pezoti Junior vd. 2014, Dastkhon vd. 2017). Elektrokimyasal biyosensör geliştirme çalışmalarında, elektrot modifikasyonu için kullanılan malzemelerin optimum miktarlarının belirlenmesinde, genellikle dönüşümlü voltametri ya da amperometri yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak, bu yöntemler kullanıldığında optimum miktarlar için az sayıda olasılık değerlendirilebilmekte ve deneyler uzun vakit almaktadır. Literatürde, biyosensör uygulamalarında elektrot yüzeyinin optimum bileşiminin belirlenmesi için MKT'nin kullanıldığı bazı çalışmalar rapor edilmiş olsa da, bunlar sayıca oldukça azdır (Ivanov vd. 2010, Lomillo vd. 2005,

Martins vd. 2009, del Torno-de Román vd. 2013, Oliveira vd. 2013, Gonzalo-Ruiz vd. 2007, Mirmoghtadaie vd. 2013).

Biyosensörün performansı, biyolojik materyal elektrot yüzeyine immobilize edildiğinden, elektrodun yüzey bileşimi ile yakından ilgilidir (Chira vd. 2014). Bu yüzden, yüzey modifikasyonunda kullanılan malzemelerin miktarları dikkatli bir şekilde optimize edilmelidir. Bu çalışmada, c-MWCNT ile TiO₂NP miktarları, glukoz tayini için oluşturulan biyosensörün özelliklerini doğrudan etkileyen deneysel değişkenler olarak düşünüldü. Bu nedenle bu değişkenlerin tekil ve kümülatif etkileri istatistiksel ve matematiksel bir yöntem olan MKT ile incelendi.

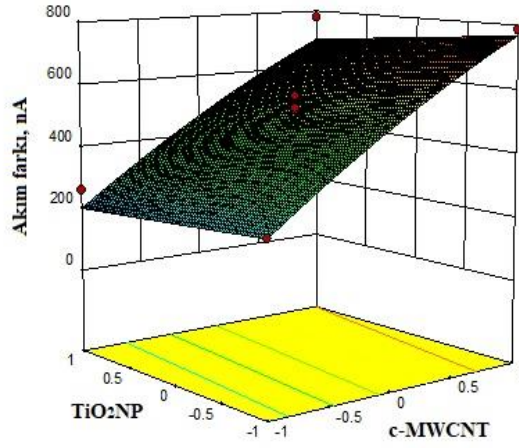
İlk olarak, tek seferde tek değişken yöntemi ile yapılan optimizasyonda uygulanan derişim aralığını kapsayan bir aralık, MKT ile yapılan tasarım ile denendi (Çizelge 3.2-(i)). Buna göre Çizelge 3.3'te verilen deneysel tasarımın sonuçları %95 güven seviyesinde varyans analizi (ANOVA) ile incelendi ve Çizelge 4.1'de verildi. Modelin anlamlılığı Fisher *F* testi ile belirlendi ve modelin *F* değeri 16,97 ve *p* değerinin 0,0009 olarak bulunması modelin anlamlı olduğunu gösterdi. Modelde yalnızca c-MWCNT ile ilgili terimin anlamlı etkisi olduğu belirlendi. Yani, bu derişim aralığındaki TiO₂NP miktarının elektrodun akım cevabı üzerine önemli bir etkisinin olmadığı görüldü.

Çizelge 4.1 c-MWCNT- TiO₂NP için 2²-faktöriyel MKT verileri ile elde edilen ANOVA sonuçları

Kaynak	β	SS	df	MS	F değeri	P değeri	
Model	507,35	5,25×10 ⁵	5	1,05×10 ⁵	16,97	0,0009	anlamlı
A	253,30	5,13×10 ⁵	1	5,13×10 ⁵	82,89	< 0,0001	anlamlı
B	-29,07	6,76×10 ³	1	6,76×10 ³	1,09	0,3309	
AB	-4,07	6,61×10 ¹	1	6,61×10 ¹	0,01	0,9206	
A ²	-27,27	5,17×10 ³	1	5,17×10 ³	0,84	0,3911	
B ²	1,18	9,67	1	9,67	0,002	0,9696	
Artık		4,33×10 ⁴	7	6,19×10 ³			
Uyumsuzluk		1,93×10 ⁴	3	6,42×10 ³	1,068	0,4565	anlamlı değil
Saf hata		2,41×10 ⁴	4	6,02×10 ³			
Toplam kor.		5,69×10 ⁵	12				
R² = 0,9050							

SS: kareler toplamı; df: serbestlik derecesi; MS: kareler ortalaması; $F_{\text{value}} = MS_{\text{faktor}}/MS_{\text{hata}}$; $P_{\text{değer}}$: olasılık seviyesi.

Şekil 4.3'te, GCE yüzeyini modifiye etmede kullanılan c-MWCNT ve TiO₂NP miktarlarının +0,70 V'ta 2,0×10⁻⁴ M H₂O₂ çözeltisine verdiği amperometrik cevapla ilişkisini gösteren cevap yüzey eğrisi verildi. Çalışılan derişim aralığında elde edilen ANOVA sonuçları incelendiğinde, yalnızca c-MWCNT'nin birinci dereceden teriminin anlamlı olduğu görülmektedir. Bu da amperometrik cevabın TiO₂NP miktarı ile bir değişim göstermeyeceği, yalnızca c-MWCNT miktarı değişimi ile değişeceğini ifade eder. Elde edilen cevap yüzey eğrisi incelendiğinde, c-MWCNT miktarı arttıkça amperometrik cevabın arttığı ve belirlenen sınırlar içinde bir maksimuma ulaşmadığı görüldü. Ayrıca, ANOVA'daki β katsayıları kullanılarak elde edilen 2. derece denklemin her bir değişken için türevi alınarak bulunan optimum değerler de anlamlı bir sonuç vermedi. Bu sebeple tasarımın tekrar oluşturularak daha yüksek miktarlarda ve daha geniş bir aralıkta çalışılması ve amperometrik cevabın maksimuma ulaştığı noktanın görülmesi hedeflendi. Bu amaçla, Çizelge 3.2-(ii)'deki derişim aralıkları kullanılarak yapılan MKT'de elde edilen sonuçlar (Çizelge 3.4) ANOVA ile incelendi ve Çizelge 4.2'de verildi. Bu çizelgeden görüldüğü gibi, çalışılan bu aralıkta da model anlamlı olmasına rağmen, TiO₂NP'lerin miktarının etkisinin anlamlı olmadığı bulundu. Elde edilen cevap yüzey eğrisinde (Şekil 4.4) de c-MWCNT miktarının artması ile cevap akımının bir maksimuma ulaşmadığı, TiO₂NP miktarının artması ile ise bir değişiklik olmadığı gözlemlendi. Tasarım için oluşturulan ikinci derece polinom modelden ve ANOVA sonuçlarından yararlanılarak elde edilen optimum derişimlerden de anlamlı bir sonuç elde edilemedi.

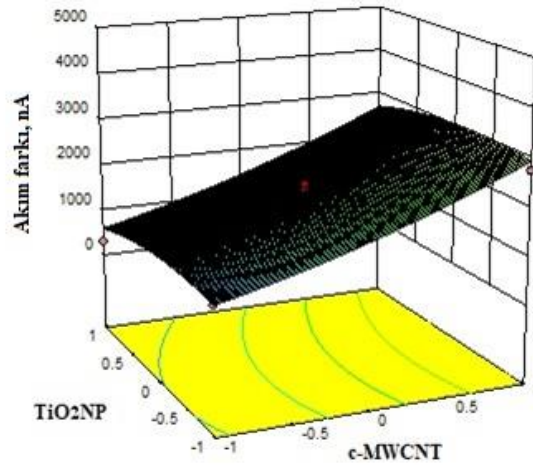


Şekil 4.3 TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin yüzey bileşimi optimizasyonunda elde edilen cevap yüzey eğrisi (+0,70 V ve 2,0×10⁻⁴ M H₂O₂ içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde)

Çizelge 4.2 c-MWCNT- TiO₂NP için 2²-faktöriyel MKT verileri ile elde edilen ANOVA sonuçları

Kaynak	β	SS	df	MS	F değeri	P değeri	
Model	1854,02	9,24×10 ⁶	5	1,85×10 ⁶	13,34	0,0018	anlamlı
A	1032,47	8,53×10 ⁶	1	8,53×10 ⁶	61,60	0,0001	anlamlı
B	-146,81	1,72×10 ⁵	1	1,72×10 ⁵	1,25	0,3013	
AB	21,74	1,89×10 ³	1	1,89×10 ³	0,01	0,9103	
A ²	155,41	1,68×10 ⁵	1	1,68×10 ⁵	1,21	0,3070	
B ²	-207,30	2,99×10 ⁵	1	2,99×10 ⁵	2,16	0,1852	
Artık		9,69×10 ⁵	7	1,38×10 ⁵			
Uyumsuzluk		7,74×10 ⁵	3	2,58×10 ⁵	5,29	0,0707	anlamlı değil
Saf hata		1,95×10 ⁵	4	4,88×10 ⁴			
Toplam kor.		1,02×10 ⁷	12				
R² = 0,9238							

SS: kareler toplamı; df: serbestlik derecesi; MS: kareler ortalaması; $F_{\text{value}} = MS_{\text{faktor}}/MS_{\text{hata}}$; $P_{\text{değer}}$: olasılık seviyesi.



Şekil 4.4 TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin yüzey bileşimi optimizasyonunda elde edilen cevap yüzey eğrisi (+0,70 V ve 2,0×10⁻⁴ M H₂O₂ içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde)

Bu bulguların ışığı altında c-MWCNT ve TiO₂NP miktarları Çizelge 3.2 – (iii)'ye göre tekrar değiştirildi ve elde edilen deneysel tasarımın sonuçları (Çizelge 3.5) %95 güven seviyesinde ANOVA ile incelendi ve Çizelge 4.3'te verildi. Modelin anlamlılığı Fisher *F* testi ile incelendi ve *F* değeri 34,55 olarak bulundu ve *p* değerinin oldukça düşük olması (*p*<0,0001) modelin anlamlı olduğunu gösterdi. Ayrıca, modelde *A* (*p*=0,0010), *A*² (*p*=0,0002) ve *B*² (*p*<0,0001) terimlerinin anlamlı olduğu tespit edildi. Anlamlı olmayan terimler çıkarıldığında, amperometrik akım cevabı (nA) ile bağımsız değişkenler arasındaki matematiksel model, aşağıda verilen ikinci dereceden eşitlik ile ifade edilir:

$$Y=5903,02+884,56[c\text{-MWCNT}]-1208,88[c\text{-MWCNT}]^2-1834,95 [\text{TiO}_2\text{NP}]^2$$

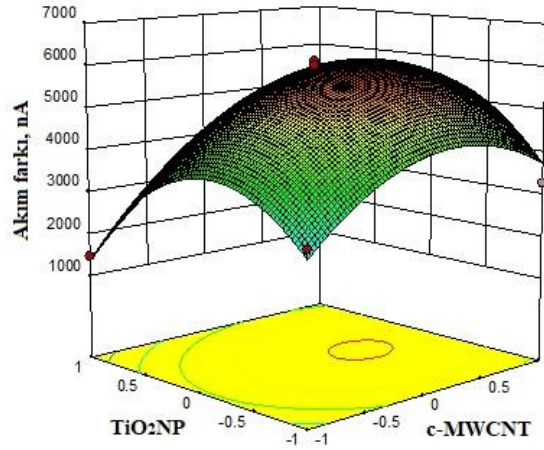
Geliştirilen modelin deneysel verilere uygun mu olduğu yoksa başka bir modelin mi uygulanması gerektiği uyumsuzluk testi ile incelendi. Çizelge 4.3'te uyumsuzluk değerinin 0,0984 (*p*>0,05) olarak bulunması modelin %95 güven seviyesinde deneysel verilere uygulanmasının uygun olduğunu gösterdi. *R*² değeri (0,9611) de elektrot cevabının model ile uyumlu olduğunu gösterdi.

Çizelge 4.3 c-MWCNT- TiO₂NP için 2²-faktöriyel MKT verileri ile elde edilen ANOVA sonuçları

Kaynak	β	SS	df	MS	F değeri	P değeri	
Model	5903,02	3,754×10 ⁷	5	7,507×10 ⁶	34,55	< 0,0001	anlamlı
A	884,56	6,260×10 ⁶	1	6,260×10 ⁶	28,81	0,0010	anlamlı
B	-315,18	7,947×10 ⁵	1	7,947×10 ⁵	3,66	0,0974	
AB	318,45	4,056×10 ⁵	1	4,056×10 ⁵	1,87	0,2141	
A ²	-1208,88	1,017×10 ⁷	1	1,017×10 ⁷	46,79	0,0002	anlamlı
B ²	-1834,95	2,342×10 ⁷	1	2,342×10 ⁷	107,80	< 0,0001	anlamlı
Artık		1,521×10 ⁶	7	2,173×10 ⁵			
Uyumsuzluk		1,157×10 ⁶	3	3,856×10 ⁵	4,24	0,0984	anlamlı değil
Saf hata		3,640×10 ⁵	4	90999,30			
Toplam kor.		3,906×10 ⁷	12				
R² = 0,9611							

SS: kareler toplamı; df: serbestlik derecesi; MS: kareler ortalaması; $F_{\text{value}} = MS_{\text{faktor}}/MS_{\text{hata}}$; $P_{\text{değer}}$: olasılık seviyesi.

Şekil 4.5, GCE yüzeyini modifiye etmede kullanılan c-MWCNT ve TiO₂NP miktarlarının +0,70 V'de 2,0×10⁻⁴ M H₂O₂ çözeltisine verdiği amperometrik cevapla ilişkisini gösteren cevap yüzey eğrisini göstermektedir. ANOVA çizelgesi incelendiğinde, c-MWCNT ve TiO₂NP'nin ikinci dereceden terimlerinin β değerleri, birinci dereceden terimlerin β değerlerinden yüksek olduğu için c-MWCNT ve TiO₂NP miktarlarının ikinci dereceden değerlerinin anlamlı olduğu görüldü. Bu da c-MWCNT ve TiO₂NP miktarları ile amperometrik akım cevabı arasındaki ilişkinin bir eğri oluşturacağını gösterir. Yani, amperometrik akım cevabı c-MWCNT ve TiO₂NP miktarları arttıkça artacak ve bir maksimuma ulaştıktan sonra da c-MWCNT ve TiO₂NP miktarlarının artışıyla azalacaktır. Sonuç olarak, elde edilen cevap yüzey eğrisi, en yüksek amperometrik cevabın 1 mL kitosan çözeltisinde 23,6 mg c-MWCNT ve 19,5 mg TiO₂NP içerdiğinde oluşturulan elektrotla elde edildiğini gösterdi. c-MWCNT ve TiO₂NP miktarlarının azaltılmasıyla amperometrik akım cevabının azaldığı görüldü; bu da, bu iki değişkenin elektrot cevabı üzerinde önemli bir etkisi olduğunu doğruladı. Bu koşullar H₂O₂ cevabının en yüksek olduğu durum olduğundan, elektrot yüzey bileşimi için optimum koşullar olarak belirlendi.

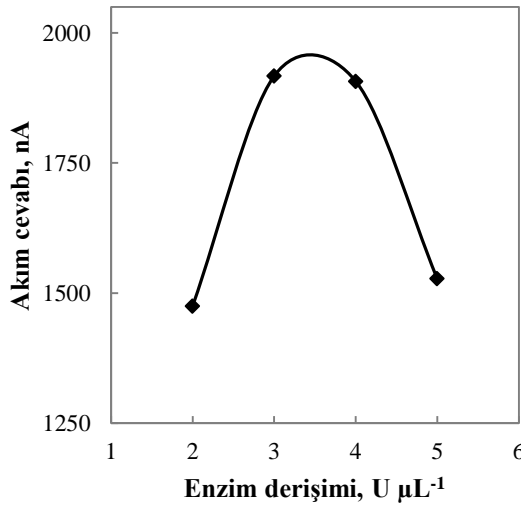


Şekil 4.5 TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin yüzey bileşimi optimizasyonunda elde edilen cevap yüzey eğrisi (+0,70 V ve 2,0×10⁻⁴ M H₂O₂ içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde)

Tek seferde tek değişken ve farklı derişim aralıklarında uygulanan MKT'dan elde edilen bulgulardan, elektrot yüzey bileşiminin MKT ile belirlenmesinde, her bir bileşenin derişim aralığının uygun seçilmesi gerektiği; tek seferde tek değişken yaklaşımında da, derişim aralığının mümkün olduğu kadar geniş tutulmasının önemli olduğu; elektrot yüzey modifikasyonunda MKT'nin kullanılması ile daha az sayıda deneyle optimum bileşime ulaşılabileceği ve bileşenler arasında etkileşimler olup olmayacağına görülmesinin mümkün olabileceği sonucuna varıldı.

Biyosensör cevabına, modifiye elektrot yüzeyine immobilize edilen enzim miktarının etkisi oldukça önemlidir. Bu amaçla, uygun derişim aralığında, 2²-faktöriyel MKT yöntemi ile modifiye edilen GCE yüzeyine dört farklı miktarda (10 µL tampon çözeltide 20, 30, 40 ve 50 U) GOx immobilize edildi ve biyosensörlerin yüzeyi %0,25 derişiminde Nafyon çözeltisi yüzeye kaplanarak GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE biyosensörleri hazırlandı. Bu biyosensörlerin amperometrik akım cevabı +0,70 V'ta sabit derişimde (2,0×10⁻⁴ M) glukoz içeren 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde ölçüldü ve GOx miktarının biyosensör cevabına etkisi Şekil 4.6'da verildi. 30 U'nin altındaki GOx miktarlarında biyosensör cevabının düşük olması, enzimatik reaksiyon sonucu daha az H₂O₂ oluştuğu; 40 U'den fazla olduğu durumlarda ise protein yapılı GOx'un elektrot yüzeyinde bir bariyer gibi davranarak oluşan H₂O₂'nin elektrot

yüzeyine difüzenmesini azalttığı şeklinde açıklanabilir (Söğüt Özdemir vd. 2019). Biyosensör yüzeyindeki GOx miktarı 30 ve 40 U olduğunda elde edilen akım değerleri arasında önemli bir fark olmadığı ve optimum değer 35 U olduğu görüldü. Ancak 30, 35 ve 40 U enzim kullanılmasıyla hazırlanan biyosensörlerin akım değerleri arasında önemli bir fark olmaması ve enzimlerin miktarlarının oldukça az olması nedeniyle daha az enzim kullanılmasının uygun olacağı düşünüldü. Bu nedenle çalışma koşullarının optimizasyonu ve biyosensör performansının incelenmesinde kullanılan GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE biyosensörü 30 U enzim kullanılarak hazırlandı.



Şekil 4.6 GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE cevabına enzim miktarının etkisi (+0,70 V ve $2,0 \times 10^{-4}$ M glukoz içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde)

4.1.1.3 2³-faktöriyel MKT

Biyosensör hazırlamada elektrot yüzeyinin modifikasyonunda kullanılan malzemelerin miktarları kadar immobilize edilen enzimin miktarının da biyosensör cevabına etkisi çok büyük olduğundan 3 faktörlü (c-MWCNT, TiO₂NP ve GOx) bir tasarım yapılması düşünüldü. Biyosensör cevabının doğrudan elektrot yüzeyindeki c-MWCNT ve TiO₂NP miktarları ile GOx enzim miktarı ve bunların sinerjetik etkileri ile ilgili olduğu düşünüldüğünden, yüzey bileşiminin optimizasyonu için 2³-faktöriyel MKT kullanıldı. Buradaki amaçlardan biri de, bu yöntemle bulunan c-MWCNT ve TiO₂NP miktarlarını,

2²-faktöriyel MKT ve tek seferde tek değişken yöntemleri ile bulunan sonuçlarla karşılaştırmaktı.

Çizelge 3.7’de verilen deneysel tasarımın sonuçları %95 güven seviyesinde ANOVA ile incelendi ve Çizelge 4.4’te verildi. Modelin anlamlılığı Fisher *F* testi ile incelendi modelin ve *F* değeri 15,13 olarak bulundu ve *p* değerinin oldukça düşük olması (*p*<0,0001) modelin anlamlı olduğunu gösterdi. Ayrıca modelde A (*p*<0,0001), C (*p*=0,0218) A² (*p*<0,0001) ve B² (*p*=0,0006) anlamlı terimlerdir. Anlamlı olmayan terimler çıkarıldığında amperometrik akım cevabı (nA) ile bağımsız değişkenler arasındaki matematiksel model, aşağıda verilen ikinci dereceden eşitlik ile ifade edilir:

$$Y=1141,24+173,48[\text{c-MWCNT}]+78,77[\text{GOx}]-229,27[\text{c-MWCNT}]^2-129,03[\text{TiO}_2\text{NP}]^2$$

Geliştirilen modelin deneysel verilere uygun mu olduğu yoksa başka bir modelin mi uygulanması gerektiği uyumsuzluk testi ile incelendi. Çizelge 4.4’te uyumsuzluk değerinin 0,1182 (*p*>0,05) olarak bulunması modelin %95 güven seviyesinde deneysel verilere uygulanmasının uygun olduğunu gösterdi. *R*² değeri (0,9190) de elektrot cevabının model ile uyumlu olduğunu gösterdi.

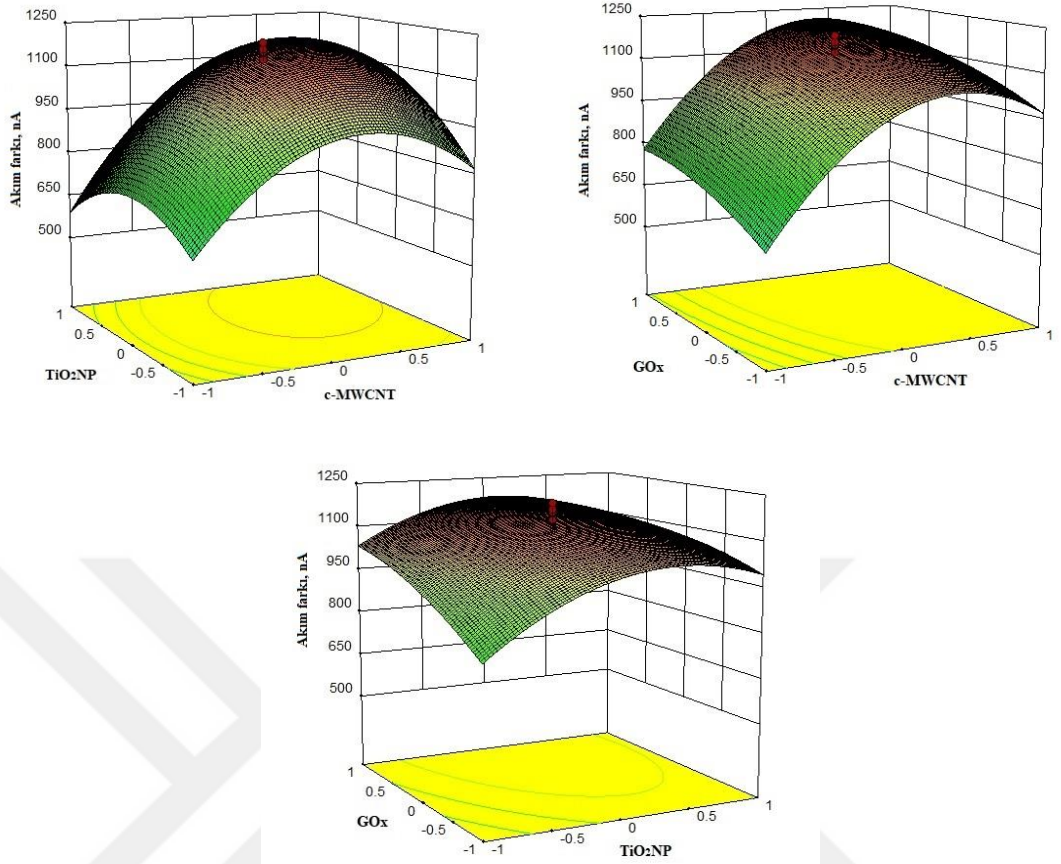
Çizelge 4.4 2³-faktöriyel MKT verileri ile edilen ANOVA sonuçları

Kaynak	β	SS	df	MS	F değeri	P değeri	
Model	1141,24	1,66×10 ⁶	9	1,85×10 ⁵	15,13	< 0,0001	anlamlı
A	173,48	4,11×10 ⁵	1	4,11×10 ⁵	33,66	< 0,0001	anlamlı
B	58,77	4,72×10 ⁴	1	4,72×10 ⁴	3,86	0,0729	
C	78,77	8,47×10 ⁴	1	8,47×10 ⁴	6,94	0,0218	anlamlı
AB	79,25	5,02×10 ⁴	1	5,02×10 ⁴	4,12	0,0653	
AC	-2,25	4,05×10 ¹	1	4,05×10 ¹	0,00	0,9550	
BC	-39,75	1,26×10 ⁴	1	1,26×10 ⁴	1,04	0,3290	
A ²	-229,27	8,14×10 ⁵	1	8,14×10 ⁵	66,70	< 0,0001	anlamlı
B ²	-129,03	2,58×10 ⁵	1	2,58×10 ⁵	21,13	0,0006	anlamlı
C ²	-38,88	2,34×10 ⁴	1	2,34×10 ⁴	1,92	0,1913	
Artık		1,47×10 ⁵	12	1,22×10 ⁴			
Uyumsuzluk		9,59×10 ⁴	5	1,92×10 ⁴	2,65	0,1182	anlamlı değil
Saf hata		5,06×10 ⁴	7	7,24×10 ³			
Toplam kor.		1,81×10 ⁶	21				
R² = 0,9190							

SS: kareler toplamı; df: serbestlik derecesi; MS: kareler ortalaması; *F*_{değeri} = *MS*_{faktor}/*MS*_{hata}; *P*_{değer}: olasılık seviyesi.

Şekil 4.7, GCE yüzeyini modifiye etmede kullanılan c-MWCNT–TiO₂NP, c-MWCNT–GOx ve TiO₂NP–GOx miktarlarının amperometrik cevapla ilişkisini gösteren cevap yüzey eğrileridir. ANOVA çizelgesi incelendiğinde, c-MWCNT ve TiO₂NP'nin ikinci dereceden terimlerinin β değerleri, birinci dereceden terimlerin β değerlerinden yüksek olduğu için c-MWCNT ve TiO₂NP miktarlarının ikinci dereceden değerlerinin anlamlı olduğu görülmektedir. Fakat GOx için ikinci dereceden terimin β değeri birinci dereceden teriminkinden düşük olduğu ve birinci dereceden terimin anlamlı olduğu görüldü. Bu da, c-MWCNT ve TiO₂NP miktarları ile amperometrik akım cevabı arasındaki ilişkinin bir eğri oluşturacağını gösterir. Yani, amperometrik akım cevabı c-MWCNT ve TiO₂NP miktarları arttıkça artacak ve bir maksimuma ulaştıktan sonra da c-MWCNT ve TiO₂NP miktarlarının artışıyla azalacaktır (Şekil 4.7.A). Fakat, amperometrik cevap GOx miktarı ile neredeyse doğrusal olarak değişmektedir (Şekil 4.7.B,C). Sonuç olarak, elde edilen cevap yüzey eğrileri, en yüksek amperometrik cevabın, 24,1 mg mL⁻¹ c-MWCNT, 22,2 mg mL⁻¹ TiO₂NP ve 3,89 U μ L⁻¹ GOx alındığında elde edildiğini gösterdi. Bu optimum değerler yukarıda verilen eşitliğin, her bir değişken için türevinin alınması ile elde edildi. c-MWCNT, TiO₂NP ve GOx miktarlarının azaltılmasıyla amperometrik akım cevabının azaldığı görüldü, bu da bu üç değişkenin biyosensör cevabı üzerinde önemli bir etkisi olduğunu doğruladı. Bu yüzey bileşimi ile en yüksek glukoz cevabı elde edildiğinden, elektrot yüzeyindeki her bir bileşen için optimum değerler olarak kabul edildi.

Burada c-MWCNT için elde edilen 24,1 mg mL⁻¹; TiO₂NP için elde edilen 22,2 mg mL⁻¹ değerleri 2²-faktöriyel MKT ile elde edilen sırası ile 23,6 ve 19,5 mg mL⁻¹ değerlerine oldukça yakındı. Ayrıca 2²-faktöriyel MKT sonucunda oluşturulan elektrot ile tek seferde tek değişken yöntemi ile bulunan GOx miktarı da (30-40 U arası) bu yöntemle bulunan 38,9 değeri ile uyum halindedir. Yukarıda elde edilen bulgular, enzimlerin miktarlarının çok az olması ve fiyatlarının oldukça pahalı olması nedeniyle, biyosensör oluşturmada yüzey bileşiminin optimizasyonunda enzim dışında diğer bileşenlerin miktarlarının MKT ile optimize edilmesinin ve enzim miktarının ise tek seferde tek değişken yöntemi ile optimize edilmesinin uygun olabileceği şeklinde değerlendirildi.



Şekil 4.7 GCE yüzeyini modifiye etmede kullanılan (A) c-MWCNT ve TiO_2NP , (B) c-MWCNT ve GOx ve (C) TiO_2NP ve GOx miktarlarının amperometrik cevapla ilişkisini gösteren cevap yüzey eğrileri ($+0,70\text{ V}$, $8,0 \times 10^{-5}\text{ M}$ glukoz içeren $0,025\text{ M}$ fosfat tampon çözeltisinde)

4.1.1.4 2^4 -faktöriyel MKT

Biyosensörler hazırlanırken, elektrot yüzeyinde bulunan enzimin yüzeyden uzaklaşmaması için, hazırlamanın son basamağında elektrot yüzeyi genellikle Nafyon gibi bir malzeme ile kaplanır (Kaçar vd. 2014). Bu tez çalışmasında GOx'un immobilizasyonu sonrası biyosensör yüzeyinden çözeltiliye enzim geçişini en aza indirmek için elektrot yüzeyinin Nafyon ile kaplanması düşünüldü. Bu nedenle Nafyonun da biyosensör cevabı üzerine etkisini belirleyebilmek için 4 faktörlü (c-MWCNT, TiO_2NP 'ler, GOx ve Nafyon) bir MKT yapılması düşünüldü ve yüzey bileşiminin optimizasyonunda 2^4 -faktöriyel MKT kullanıldı. Burada elde edilen sonuçların 2^2 - ve 2^3 -faktöriyel MKT ile elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılması amaçlandı.

Çizelge 3.9’da verilen deneysel tasarımın sonuçları %95 güven seviyesinde ANOVA ile incelendi ve Çizelge 4.5’te verildi. Modelin anlamlılığı Fisher F testi ile incelendi modelin F değeri 2,83 olarak bulundu ve p değerinin oldukça düşük olması ($p=0,0273$) modelin anlamlı olduğunu gösterdi. Ayrıca, modelde A^2 ($p=0,0005$), B^2 ($p=0,0054$) ve C^2 ($p=0,0018$) anlamlı terimlerdir. Anlamlı olmayan terimler çıkarıldığında amperometrik akım cevabı (nA) ile bağımsız değişkenler arasındaki matematiksel model, aşağıda verilen ikinci dereceden eşitlik ile ifade edilir:

$$Y=2889,33-332,02[\text{c-MWCNT}]^2-242,26[\text{TiO}_2\text{NP}]^2-281,71[\text{GOx}]^2$$

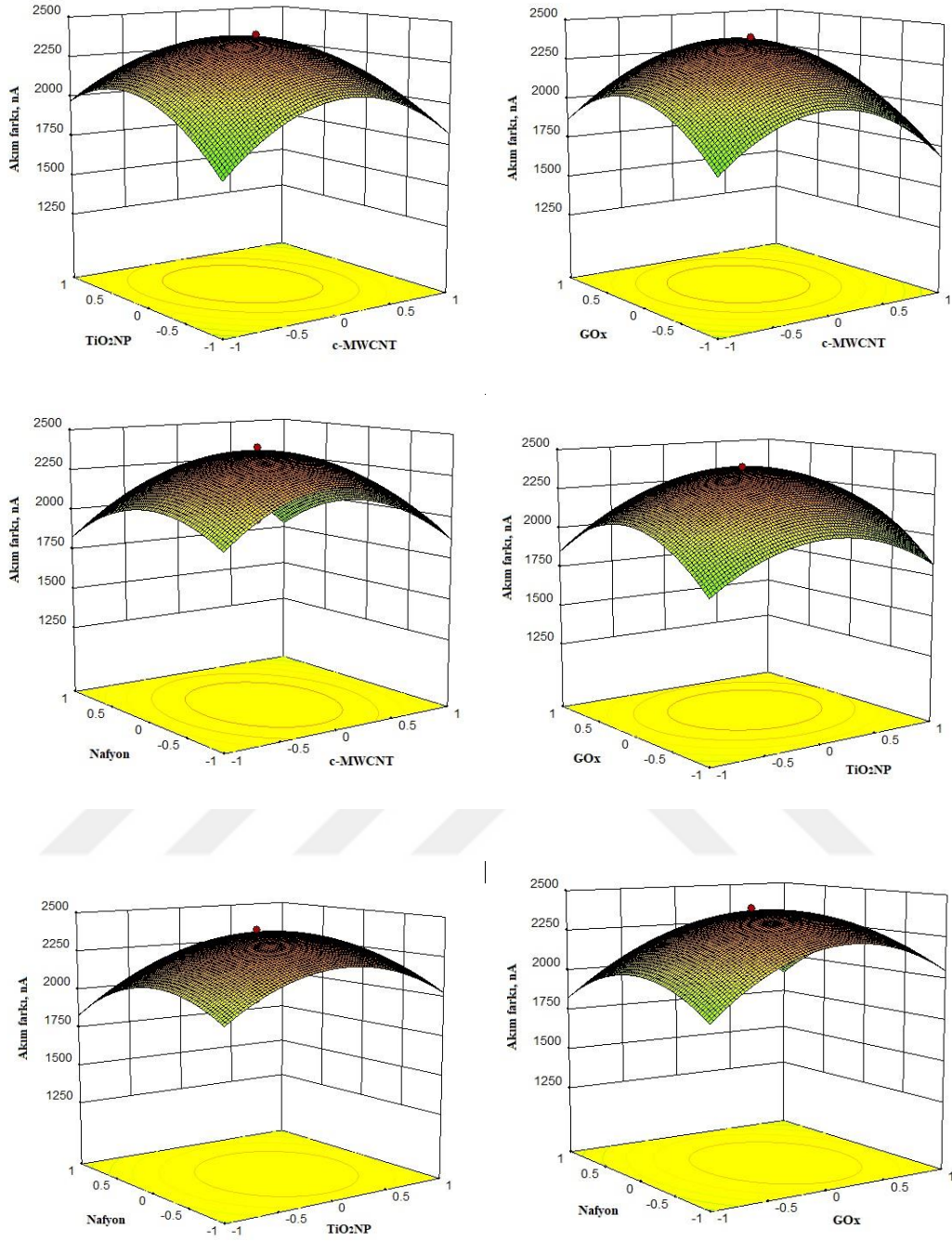
Geliştirilen modelin deneysel verilere uygun mu olduğu yoksa başka bir modelin mi uygulanması gerektiği uyumsuzluk testi ile incelendi. Çizelge 4.5’te uyumsuzluk değerinin 0,1033 ($p>0,05$) olarak bulunması modelin %95 güven seviyesinde deneysel verilere uygulanmasının uygun olduğunu gösterdi. R^2 değeri (0,7273) de elektrot cevabının model ile uyumlu olduğunu gösterdi.

Çizelge 4.5 2^4 –faktöriyel MKT için elde edilen ANOVA sonuçları

Kaynak	β	SS	df	MS	F değeri	P değeri	
Model	2389,33	$6,03 \times 10^6$	14	$4,31 \times 10^5$	2,83	0,0273	anlamlı
A	-30,56	$2,24 \times 10^4$	1	$2,24 \times 10^4$	0,15	0,7065	
B	46,57	$5,21 \times 10^4$	1	$5,21 \times 10^4$	0,34	0,5674	
C	59,25	$8,42 \times 10^4$	1	$8,42 \times 10^4$	0,55	0,4684	
D	-51,49	$6,36 \times 10^4$	1	$6,36 \times 10^4$	0,42	0,5277	
AB	-82,56	$1,09 \times 10^5$	1	$1,09 \times 10^5$	0,72	0,4106	
AC	0,13	$2,76 \times 10^{-1}$	1	$2,76 \times 10^{-1}$	$1,81 \times 10^{-6}$	0,9989	
AD	8,48	$1,15 \times 10^3$	1	$1,15 \times 10^3$	0,01	0,9319	
BC	28,84	$1,33 \times 10^4$	1	$1,33 \times 10^4$	0,09	0,7715	
BD	16,77	$4,50 \times 10^3$	1	$4,50 \times 10^3$	0,03	0,8658	
CD	-31,04	$1,54 \times 10^4$	1	$1,54 \times 10^4$	0,10	0,7546	
A^2	-332,02	$3,02 \times 10^6$	1	$3,02 \times 10^6$	19,87	0,0005	anlamlı
B^2	-242,26	$1,61 \times 10^6$	1	$1,61 \times 10^6$	10,58	0,0054	anlamlı
C^2	-281,71	$2,18 \times 10^6$	1	$2,18 \times 10^6$	14,30	0,0018	anlamlı
D^2	-200,96	$1,11 \times 10^6$	1	$1,11 \times 10^6$	7,28	0,0165	
Artık		$2,28 \times 10^6$	15	$1,52 \times 10^5$			
Uyumsuzluk		$1,98 \times 10^6$	10	$1,98 \times 10^5$	3,24	0,1033	anlamlı değil
Saf hata		$3,05 \times 10^5$	5	$6,11 \times 10^4$			
Toplam kor.		$8,31 \times 10^6$	29				
$R^2 = 0,7253$							

SS: kareler toplamı; df: serbestlik derecesi; MS: kareler ortalaması; $F_{\text{değeri}} = MS_{\text{faktor}}/MS_{\text{hata}}$; $P_{\text{değer}}$: olasılık seviyesi

Şekil 4.8, GCE yüzeyini modifiye etmede kullanılan c-MWCNT-TiO₂NP, c-MWCNT-GOx, c-MWCNT-Nafyon, TiO₂NP-GOx, TiO₂NP-Nafyon ve GOx-Nafyon miktarlarının amperometrik cevapla ilişkisini gösteren cevap yüzey eğrilerini göstermektedir. ANOVA çizelgesi incelendiğinde, c-MWCNT, TiO₂NP ve GOx için ikinci dereceden terimlerin β değerleri, birinci dereceden terimlerin β değerlerinden yüksek olduğu için c-MWCNT, TiO₂NP ve GOx miktarlarının ikinci dereceden değerlerinin anlamlı olduğu görülmektedir. Bu da c-MWCNT, TiO₂NP ve GOx miktarları ile amperometrik akım cevabı arasındaki ilişkinin bir eğri oluşturacağını gösterir. Yani, amperometrik akım cevabı c-MWCNT, TiO₂NP ve GOx miktarları arttıkça artacak ve bir maksimuma ulaştıktan sonra da c-MWCNT, TiO₂NP ve GOx miktarlarının artışıyla azalacaktır. Ancak, çalışılan Nafyon derişimi aralığında ANOVA sonuçlarında Nafyon için anlamlı bir terime rastlanmamıştır. Bu da amperometrik cevabın Nafyon miktarının değişiminden etkilenmeyeceği anlamına gelir. Önceki deneyimlere dayanarak, bundan sonraki çalışmalarda elektrot yüzeyinin kaplanması için %0,25'lik Nafyon çözeltisinin kullanılmasına karar verildi. Elde edilen cevap yüzey eğrileri incelendiğinde ve yukarıda verilen eşitliğin her bileşen cinsinden türevi alındığında en yüksek amperometrik cevabın TiO₂NP 22,6 mg mL⁻¹, c-MWCNT 18,4 mg mL⁻¹ ve GOx 3,27 U µL⁻¹ olduğunda elde edildiği görüldü.



Şekil 4.8 GCE yüzeyini modifiye etmede kullanılan (A) c-MWCNT ve TiO₂NP, (B) c-MWCNT ve GOx, (C) c-MWCNT ve Nafyon, (D) TiO₂NP ve GOx, (E) TiO₂NP ve Nafyon ve (F) GOx ve Nafyon miktarlarının amperometrik cevaplara ilişkisini gösteren cevap yüzey eğrileri (+0,70 V, 8,0×10⁻⁵ M glukoz içeren 0,025 M fosfat tamponu çözeltisinde).

Uygulanan üç MKT yöntemi ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında (Çizelge 4.6), yüzeyi modifiye etmede kullanılan c-MWCNT, TiO₂NP ve GOx miktarlarının birbiri ile

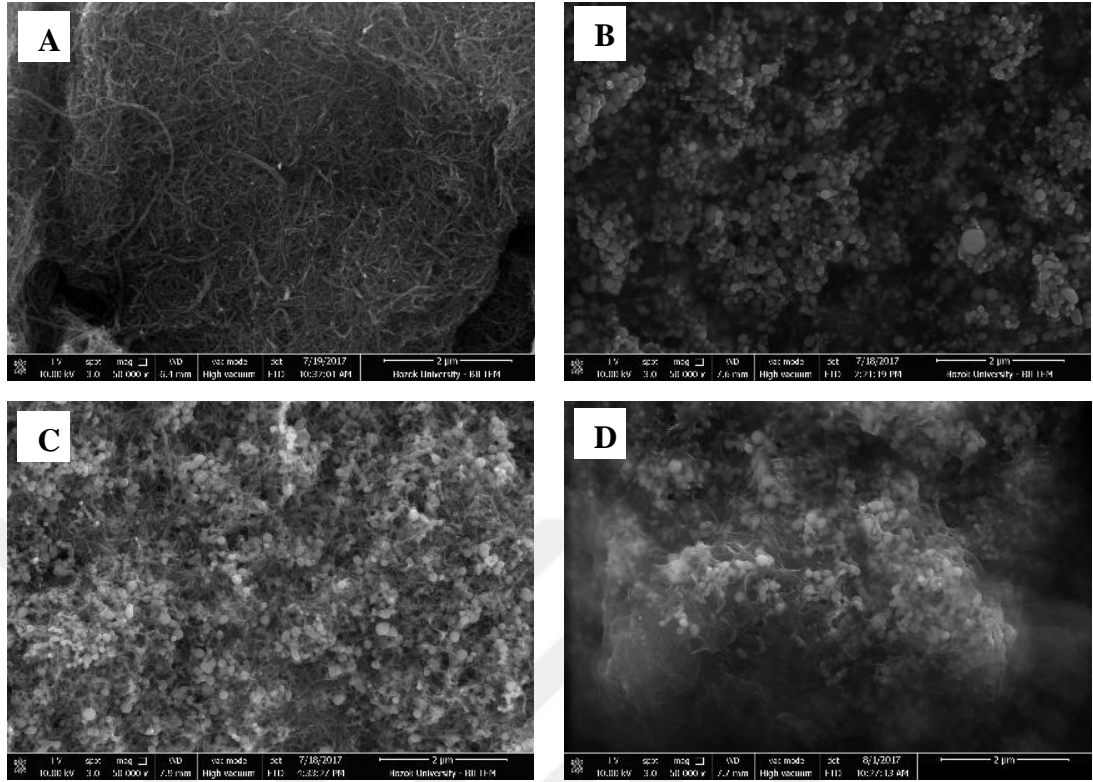
uyumlu olduğu görüldü ve bu bulgulardan da elektrot yüzey bileşimi optimizasyonunda enzim haricinde sadece diğer ana bileşen miktarlarının MKT ile optimize edilmesinin yeterli olabileceği sonucuna varıldı.

Çizelge 4.6 Üç farklı MKT yöntemi ile elde edilen optimum miktarlar

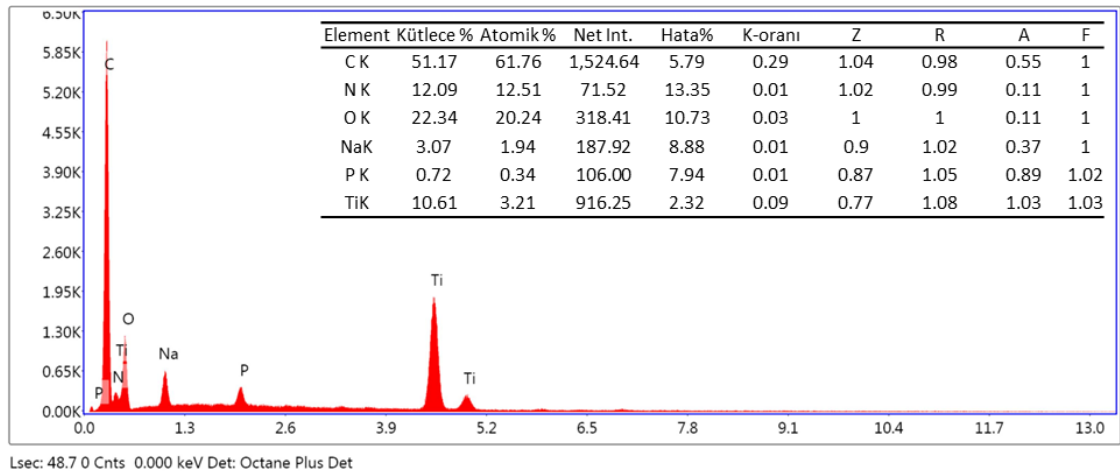
		2²-faktöriyel	2³-faktöriyel	2⁴-faktöriyel
		MKT	MKT	MKT
A: c-MWCNT	mg mL ⁻¹	23,6	24,1	18,4
B: TiO ₂ NP	mg mL ⁻¹	19,5	22,2	22,6
C: GOx	U/10µL	35,0	38,9	32,7

4.1.2 Yüzey karakterizasyonu

GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE biyosensörünün hazırlanmasında kullanılan her bir bileşenin ayrı ayrı veya bir arada GCE yüzeyinde nasıl dağıldığını görebilmek için (A) c-MWCNT/GCE, (B) TiO₂NP/GCE, (C) TiO₂NP-c-MWCNT/GCE ve (D) GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE yüzeylerinin SEM görüntüsü alındı (Şekil 4.9). Şekil incelendiğinde, c-MWCNT (Görüntü A) ve TiO₂NP (Görüntü B) bileşenlerinin GCE yüzeyinde homojen olarak dağıldığı gözlemlendi. Şekil 4.9.A'daki ipliksi yapıların c-MWCNT'ye, B'deki küresel yapıların TiO₂NP'ye ait olduğu düşünüldü. Şekil 4.9.C'de ise hem ipliksi hem de küresel yapıların gözlenmesi de TiO₂NP ve c-MWCNT'lerin elektrot yüzeyinde bir arada olduğunu; GCE yüzeyinde homojen dağıldığını ve elektrot hazırlamada kullanılan c-MWCNT ve TiO₂NP'nin kitosan içerisinde iyi bir şekilde dağıldığını gösterdi. Şekil 4.9.D'deki görüntü ise GOx'un modifiye GCE'nin gözenekli yüzeyine iyi bir şekilde immobilize olduğunu göstermektedir. Şekil 4.10'da ise, GCE yüzeyinin modifikasyonunda kullanılan GOx/TiO₂NP-c-MWCNT kompozitinin elementel bileşimini gösteren enerji dağılımlı X-ışınları spektrometri yöntemi (EDX) ile elde edilen spektrum ve element bileşim çizelge verilmektedir. Bu spektrum ve şekil içindeki çizelge incelendiğinde de, elektrot yüzeyinin c-MWCNT, TiO₂NP ve GOx ile modifiye olduğunu gösteren Ti, P, Na, O, N ve C pikleri görülmektedir.



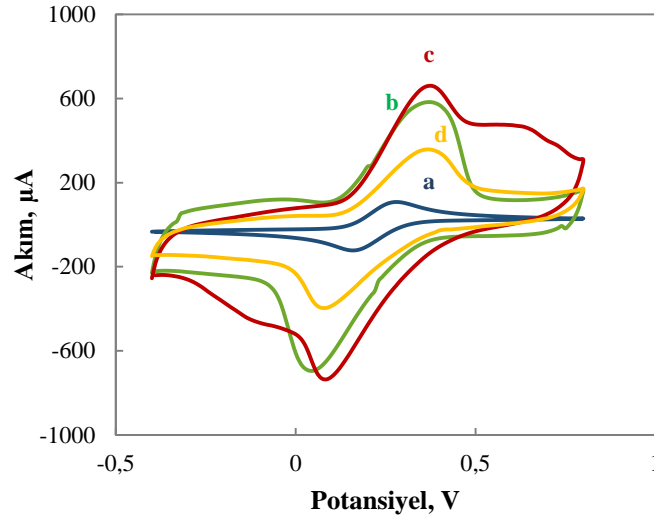
Şekil 4.9 SEM görüntüleri: (A) c-MWCNT/GCE, (B) TiO₂NP/GCE, (C) TiO₂NP-c-MWCNT/GCE ve (D) GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE



Şekil 4.10 GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE için EDX spektrumu ve elementel bileşim çizelgesi

4.1.3 Elektrokimyasal karakterizasyon

Glukoz tayini için GOx/TiO₂-c-MWCNT/GCE'nin hazırlanması sırasında, elektrot yüzeyine modifiye edilen her bir malzemenin ayrı ayrı ve bir arada iken gösterdikleri elektrokimyasal davranışları belirlemek amacıyla, dönüşümlü voltametri yönteminden yararlanıldı. 2²-faktöriyel MKT ile bulunmuş olan elektrot yüzeyindeki bileşenlerin optimum miktarları ile (a) TiO₂NP/GCE, (b) c-MWCNT/GCE, (c) TiO₂NP-c-MWCNT/GCE ve (d) GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'ler hazırlandı ve 50 mV s⁻¹ tarama hızında 0,10 M KCl içeren 5,0 mM Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks probunda CV'leri kaydedildi (Şekil 4.11). Şekil incelendiğinde, TiO₂NP/GCE'nin (eğri a) pik akımları oldukça düşük; c-MWCNT/GCE'nin (eğri b) ise daha yüksek olduğu görüldü. c-MWCNT'nin literatürde de belirtildiği gibi, geniş yüzey alanına sahip olması ve iletkenliğinin yüksek olması sebebiyle pik akımının yüksek olması beklenen bir durumdur (Yadav vd. 2011). c-MWCNT-TiO₂/GCE'nin pik akımının (eğri c) yüksek olması söz konusu malzemelerin bir arada olduğunda ortaya çıkan sinerjik etkiden kaynaklandığı şeklinde yorumlandı (Li vd. 2007, Arvinte vd. 2009). TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'ye GOx immobilizasyonu ile oluşturulan GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin pik akımının (eğri d) düşmesi, GOx'un iletken olmayan bir makromolekül olmasından ve elektriksel iletkenliği düşürmesinden kaynaklandığı düşünüldü (Tang vd. 2015, Nor vd. 2016). Bu durum, aynı zamanda GOx'ın elektrot yüzeyine başarılı bir şekilde immobilize olduğu düşüncesini güçlendirdi.

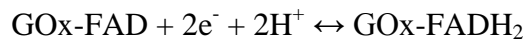


Şekil 4.11 Dönüşümlü voltamogramlar: (a) TiO₂NP/GCE, (b) c-MWCNT/GCE, (c) TiO₂NP-c-MWCNT-/GCE ve (d) GO_x/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE (50 mV s⁻¹ tarama hızında 0,10 M KCl içeren 5,0 mM Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks probunda)

GO_x/c-MWCNT-TiO₂NP/GCE için elektron aktarım hız sabitini (k_s) belirlemek amacıyla, bu biyosensörün çalışılan tampon çözelti ortamında 5-200 mV s⁻¹ tarama hızında CV'leri kaydedildi (4.12.A) ve aşağıda verilen Laviron eşitliğine göre hız sabiti belirlendi (Laviron, 1979).

$$\log ks = \alpha \log (1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log \alpha - \log (RT/nFv) - \alpha (1 - \alpha) nF\Delta E_p/2,303RT$$

Eşitlikte R gaz sabiti (8,314 j mol⁻¹K⁻¹), T oda sıcaklığını (298,15 K), F Faraday sabitini (96485,34 C mol⁻¹), n aktarılan elektron sayısını ve ΔE_p anodik ve katodik pik potansiyelleri farkını ifade etmektedir. Aşağıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi, GO_x'un aktif merkezinde FAD-FADH₂ dönüşümü için aktarılan elektron sayısı 2'dir (Kang, 2009).



Yük aktarım katsayısı α değeri 0,5 olarak alındığında; 50, 75, 100 ve 150 mV s⁻¹ tarama hızlarında GO_x/c-MWCNT-TiO₂NP/GCE için ortalama elektron aktarım hız sabiti 0,49 ($\pm 0,09$) s⁻¹ olarak hesaplandı. Literatürde benzer değerlerin elde edildiği çalışmalar

mevcuttur: 0,262 (Zhang vd. 2011), 0,30 (Liu vd. 2004), 0,026 (Jiang vd. 1995), 1,35 (Tang vd. 2015), 1,01 (Yao ve Shiu 2008), 1,98 (Hu vd. 2011), 1,32 (Oztekin vd. 2011), 1,16 (Deng vd. 2008), 1,60 (Fatemi vd. 2012), 0,64 (Prasad vd. 2015).

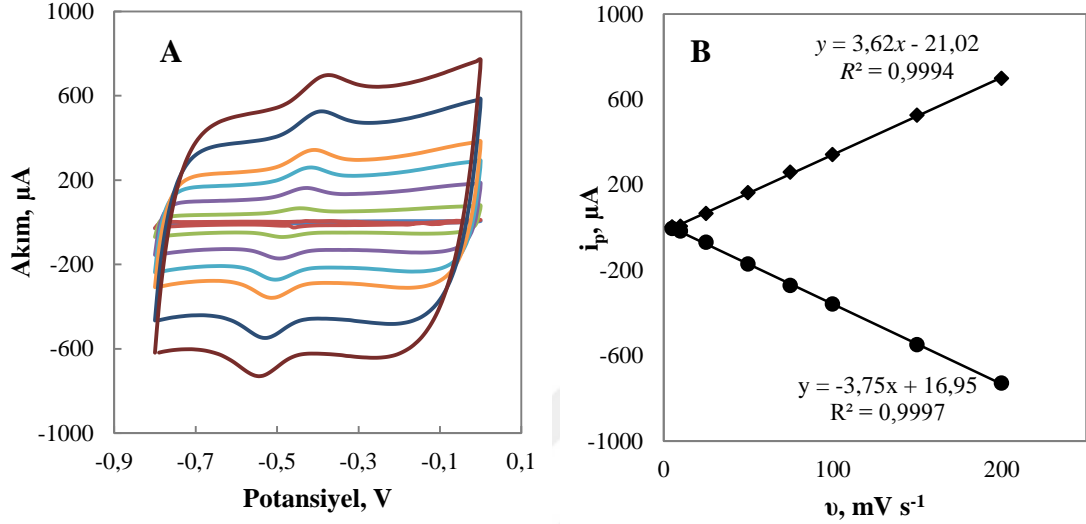
Şekil 4.12.B, farklı tarama hızlarında elde edilen anodik ve katodik pik akımlarının tarama hızına karşı değişimini göstermektedir. Bu değişimin doğrusal olması elektrot yüzeyindeki elektron aktarım mekanizmasının yüzey kontrollü olduğunu ve GOx enziminin aktif merkezi ile elektrot arasındaki elektron aktarımının başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir (Zhang, 2011).

Şekil 4.12.B'de, katodik pik akımları ile tarama hızı arasındaki doğrusal eşitlikten yararlanılarak, aşağıda verilen Laviron'un 2. eşitliğine göre (Laviron, 1979), TiO₂NP-c-MWCNT-/GCE yüzeyine immobilize edilen GOx miktarı (Γ) bulundu.

$$I_p = n^2 F^2 v A \Gamma / 4RT$$

A, elektrot yüzey alanı (Wang vd. 2018, Zhang vd. 2007, Huang vd. 2005, Liu ve Ju 2003) olmak üzere, GOx/c-MWCNT-TiO₂NP/GCE için Γ değeri $1,41 \times 10^{-8}$ mol cm⁻² olarak hesaplandı. Bu değer elektrot yüzeyinde elektron aktarımına katkıda bulunan, immobilize edilmiş GOx tek katmanını ifade ettiği literatürde belirtilmektedir (Eskandari vd. 2015). Bu çalışmada bulunan Γ değeri, literatürde GOx enzimi ile hazırlanan biyosensörler için bulunan Γ değerlerine göre yüksektir: $7,36 \times 10^{-10}$ (Wang vd. 2018), $1,68 \times 10^{-12}$ (Eskandari vd. 2015), $3,89 \times 10^{-10}$ (Karupiah vd. 2014), $2,22 \times 10^{-10}$ (Yu vd. 2014), $2,46 \times 10^{-10}$ (Kaushik vd. 2008), $3,92 \times 10^{-9}$ (Wang vd. 2012), $8,40 \times 10^{-11}$ (Peng vd. 2013), $4,95 \times 10^{-11}$ (Pakapongpan ve Poo-arporn 2012), $2,36 \times 10^{-11}$ (Nor vd. 2016), $1,12 \times 10^{-9}$ (Kang vd. 2009), $3,88 \times 10^{-9}$ (Periasamy vd. 2011), $7,50 \times 10^{-10}$ (Viticoli vd. 2006), $3,32 \times 10^{-11}$ (Yang vd. 2014), $9,68 \times 10^{-10}$ (Guo vd. 2017), $6,49 \times 10^{-10}$ (Hu vd. 2011), $8,50 \times 10^{-11}$ (Oztekin vd. 2011), $1,94 \times 10^{-9}$ (Deng vd. 2008), $3,57 \times 10^{-11}$ (Zhai vd. 2011), $8,00 \times 10^{-10}$ (Fatemi vd. 2012). Ayrıca bu değer, çıplak elektrot yüzeyine immobilize edilen GOx tek katmanı için teorik değer olan $2,86 \times 10^{-12}$ değerinden (Oztekin vd. 2011, Wang vd. 2018) de daha yüksektir. Bu durum, biyosensör hazırlamada kullanılan modifikasyon yöntemi ve malzemelerinin, enzim

immobilizasyonu için yararlı olduğunu, ayrıca biyoyumluluğunun yüksek olduğunu ve GOx'ın biyoaktivitesinin korunabildiğini göstermektedir.



Şekil 4.12 A. GO_x/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin çeşitli tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları ve B. pik akımlarının tarama hız ile değişimi (0,10 M KCl içeren 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde)

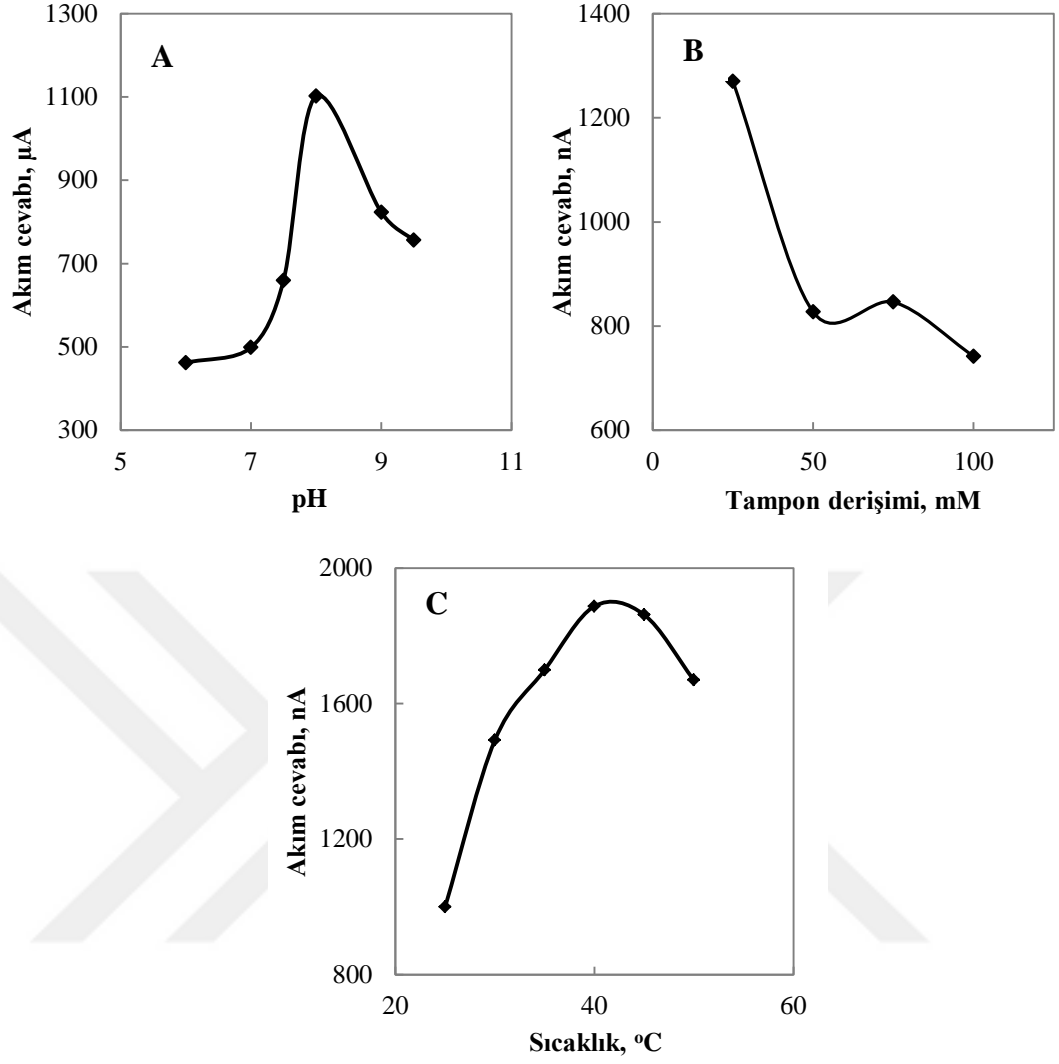
4.1.4 Çalışma koşulları

Bir biyosensör ile en iyi performansın elde edilebilmesi için pH, tampon derişimi ve sıcaklık gibi çeşitli deneysel parametrelerin optimize edilmesi gereklidi. Bu amaçla GO_x/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE biyosensörü ile çalışılırken öncelikle çalışma ortamının pH'sının biyosensör cevabına etkisi Bölüm 3.6.2'de anlatıldığı şekilde incelendi. Bu biyosensör için en yüksek akım cevabı, pH'sı 8,0 olan fosfat tampon çözeltisinde elde edildi (Şekil 4.13.A). Literatürde serbest GO_x çözeltisi için optimum pH değeri 5,5 civarında verilmekle birlikte (Bright ve Appleby 1969), modifiye elektrotlarla oluşturulan GO_x'ın kullanıldığı glukoz biyosensörlerinde çok farklı pH değerlerinin optimum olarak seçildiği literatürde rapor edilmiştir. Örneğin Yang vd. (2009) pH 7,2; Liv d. (2010) pH 7,0; He vd. (2016) 7,5; Gao vd. (2014) pH 6,0 ve Baratella vd. (2013) pH 5,1 olan tampon çözeltileri ile çalışmışlardır. Bu farklılığın, GO_x'in elektrot yüzeyine immobilizasyonu sırasında enzim konformasyonun değmesinden kaynaklanacağı şeklinde yorumlanmıştır (Rodrigues vd. 2013).

Biyosensörün performansını etkileyen önemli değişkenlerden biri de çalışılan ortamdaki tampon çözeltinin derişimidir. Söz konusu biyosensör cevabına tampon derişiminin etkisi, pH 8,0'de tampon derişimi 0,025 – 0,100 M arasında değiştirilip 0,20 mM glukoz içeren çözeltiliye verdiği amperometrik akım cevabı ölçülerek incelendi (Şekil 4.13.B). En yüksek akım cevabı 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde elde edildi ve bundan sonraki tüm ölçümlerde bu derişim kullanıldı. Tampon çözeltinin derişiminin artması ile amperometrik akım cevabının düşmesi, yüksek fosfat derişimlerinin enzim aktivitesini azaltabildiği şeklinde yorumlandı. Literatürde de benzer sonuçların bulunduğu belirtilmektedir (Crouch vd. 2005 ve Ghica ve Brett 2006).

Enzimlerin aktivitesi sıcaklıkla önemli ölçüde değişmektedir (Luo vd. 2004). Hazırladığımız biyosensörde GOx kullanıldığından, bu biyosensörün amperometrik akım cevabına sıcaklığın etkisi araştırıldı. Bu amaçla, GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE biyosensörünün amperometrik akım cevabı 25–50 °C aralığında sabit glukoz derişiminde (0,20 mM) incelendi (Şekil 4.13.C). En yüksek akım cevabının 40°C'de elde edilmesine rağmen, yüksek sıcaklıklardaki çalışmaların pratik olmaması sebebiyle çalışmalara oda sıcaklığında devam edildi. Yüksek sıcaklıklardaki akım cevabının düşmesinin enzimin denatürasyonundan kaynaklandığı literatürde verilmektedir (Wang vd. 2011).

Sonuç olarak, bu ve ileride belirtilecek diğer tüm glukoz biyosensörleri için pH 8,0; fosfat tampon çözeltisinin derişimi 0,025 M ve oda sıcaklığı optimum çalışma koşulları olarak seçildi.



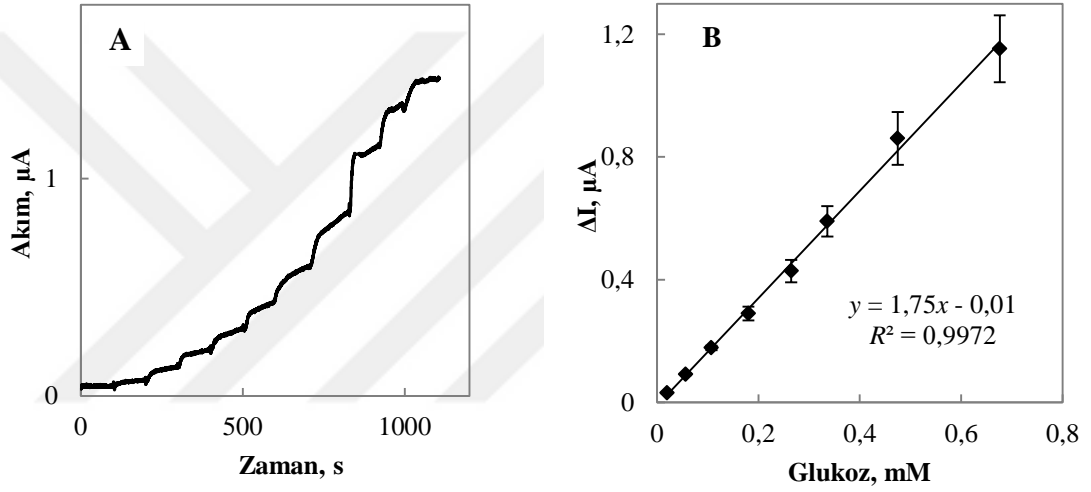
Şekil 4.13 GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin akım cevabına (A) pH, (B) tampon derişimi ve (C) sıcaklık etkisi (+0,70 V'ta)

4.1.5 Performans faktörlerinin karşılaştırılması

Glukoz biyosensörlerinin yüzey bileşimleri tek seferde tek değişken, 2²-, 2³- ve 2⁴- faktöriyel MKT yöntemleri kullanılarak optimize edildi (Bölüm 4.1.1) ve bu optimum yüzey bileşiminde hazırlanan dört farklı GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE biyosensörüne ait analitik performans karakteristikleri gözlenebilme sınırı, çalışma aralığı ve duyarlık açısından karşılaştırıldı ve elde edilen bulgular irdelendi.

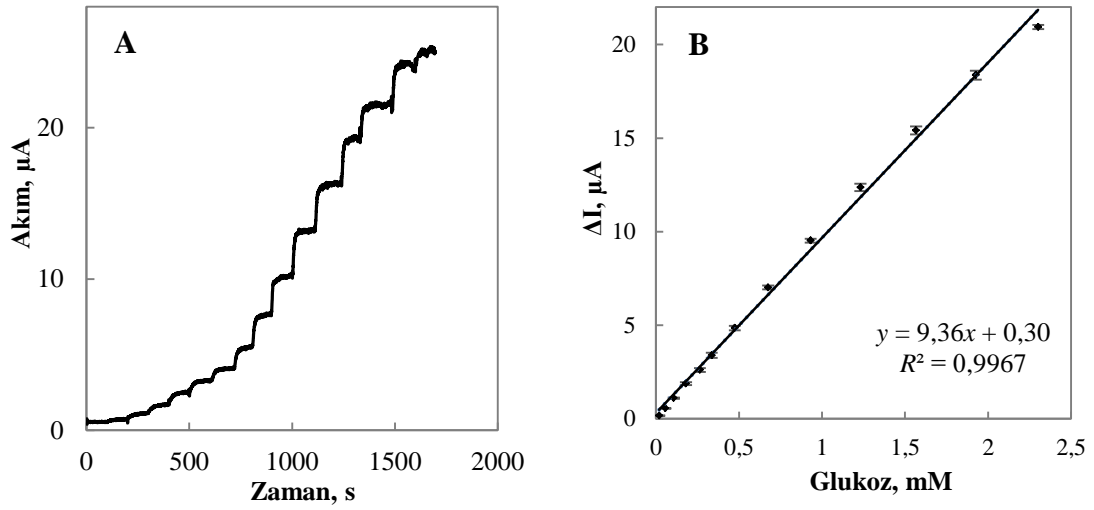
4.1.5.1 Doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı ve duyarlık

GO_x/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE biyosensörlerinin doğrusal çalışma aralığı ve duyarlığını belirlemek amacıyla, kronoamperometrik yöntem ile ard arda glukoz ilavelerinden sonra akım cevapları ölçüldü (Şekil 4.14-4.17.A) ve her bir ilaveden sonraki akım farklarının derişime karşı grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrileri çizildi (Şekil 4.14-4.17.B). Kalibrasyon grafiklerinden yararlanılarak her bir biyosensörün doğrusal çalışma aralığı ve duyarlığı belirlendi.



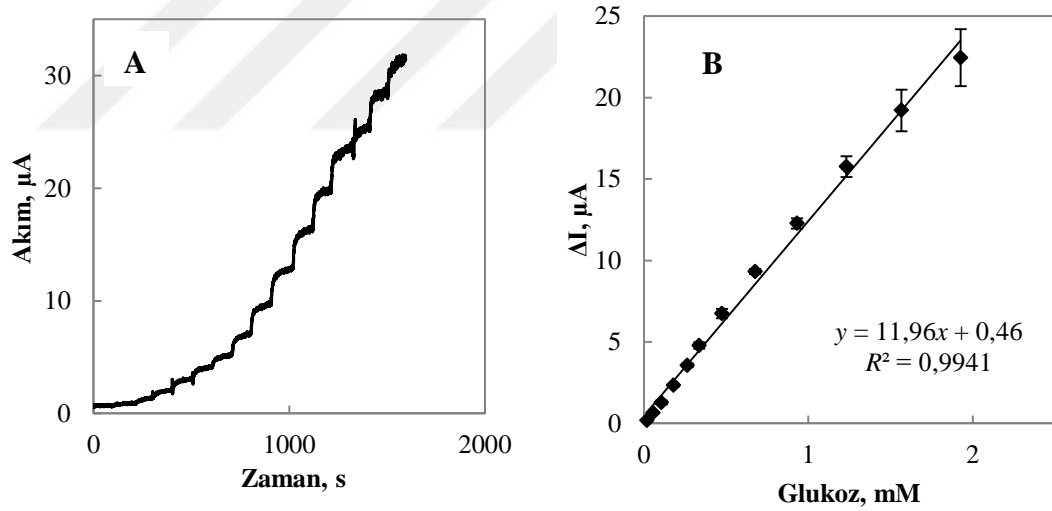
Şekil 4.14 Yüzey bileşimi tek seferde tek değişken yöntemi ile optimize edilen GO_x/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE cevabına glukoz derişiminin etkisi

A. Akım-zaman grafiği ve B. kalibrasyon grafiği ($N=3$; $+0,70$ V'ta $0,025$ M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde)



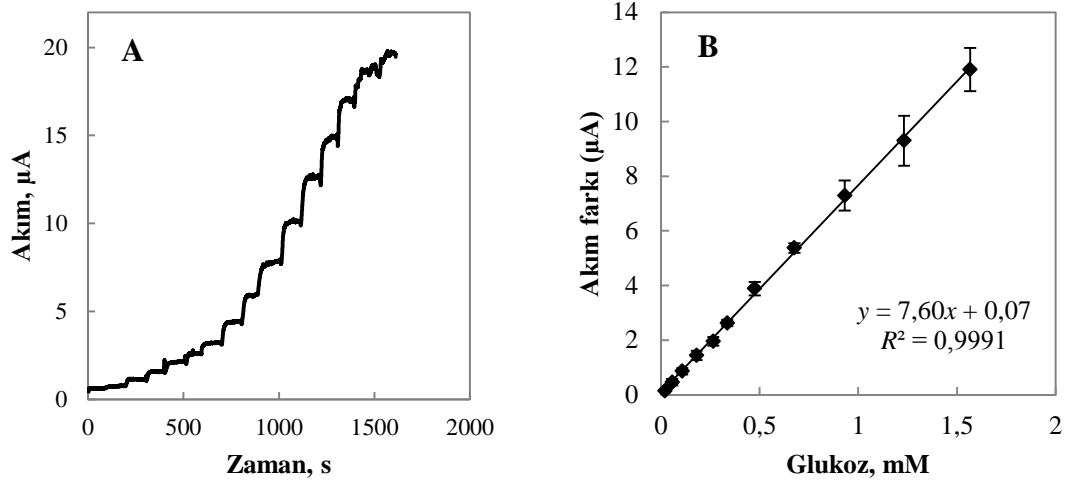
Şekil 4.15 Yüzey bileşimi 2^2 -faktöriyel MKT ile optimize edilen GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE cevabına glukoz derişiminin etkisi

A. Akım-zaman grafiği ve B. kalibrasyon grafiği ($N=3$; +0,70 V'ta 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde)



Şekil 4.16 Yüzey bileşimi 2^3 -faktöriyel MKT ile optimize edilen GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE cevabına glukoz derişiminin etkisi

A. Akım-zaman grafiği ve B. kalibrasyon grafiği ($N=3$; +0,70 V'ta 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde)



Şekil 4.17 Yüzey bileşimi 2^4 -faktöriyel MKT ile optimize edilen GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE cevabına glukoz derişiminin etkisi

A. Akım-zaman grafiği, B. Kalibrasyon grafiği ($N=3$; $+0,70$ V'ta $0,025$ M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde)

Yüzey bileşimi tek seferde tek değişken yöntemi ile optimize edilen biyosensör glukozu $2,0 \times 10^{-5} - 6,8 \times 10^{-4}$ M aralığında $8,3 \times 10^{-6}$ M gözlenebilme sınırı ve $1,75 \mu\text{A mM}^{-1}$ duyarlık ile cevap verdi (Şekil 4.14). Bu biyosensör ile elde edilen düşük duyarlığın elektrot modifikasyonunda kullanılan c-MWCNT ve TiO₂NP miktarlarının düşük olmasından kaynaklanabileceği düşünöldü. 2^2 -faktöriyel MKT ile yüzey bileşimi belirlenen biyosensör ile glukoz için doğrusal aralık $2,0 \times 10^{-5} - 2,3 \times 10^{-3}$ M, gözlenebilme sınırı $3,2 \times 10^{-6}$ M ve duyarlık $9,36 \mu\text{A mM}^{-1}$ olarak bulundu. Yüzey bileşimi 2^3 - faktöriyel MKT optimize edilen biyosensör için ise doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı ve duyarlık sırası ile $2,0 \times 10^{-5} - 1,9 \times 10^{-3}$ M, $2,1 \times 10^{-6}$ M ve $11,96 \mu\text{A mM}^{-1}$ olarak elde edildi. Yüzey bileşimi 2^4 - faktöriyel MKT optimize edilen biyosensör glukozu $2,0 \times 10^{-5} - 1,6 \times 10^{-3}$ M aralığında $6,8 \times 10^{-6}$ M gözlenebilme sınırı ve $7,60 \mu\text{A mM}^{-1}$ duyarlık ile cevap verdi.

Yüzey bileşimi farklı yöntemlerle optimize edilen biyosensörlerin duyarlılıkları karşılaştırıldığında, 2^3 -faktöriyel MKT ile optimize edilen biyosensörün glukozu en yüksek duyarlığı gösterdiği bulundu. 2^2 - ve 2^3 -faktöriyel MKT ile yüzey bileşimi optimize edilen biyosensörlerin duyarlılıkları arasında çok büyük bir fark olmaması ise, TiO₂NP ve c-MWCNT miktarlarının 2^2 -faktöriyel MKT ile, enzim miktarının ise

geleneksel tek seferde tek değişken yöntemi ile optimize edilebileceği ve bunun özellikle çok pahalı enzimlerin kullanıldığı biyosensörlerin hazırlanmasında uygun bir yaklaşım olabileceği düşünöldü. Bu nedenle, diğer MONP ile glukoz biyosensörü oluşturmak için MONP ve c-MWCNT'nin elektrot yüzeyindeki bileşimi 2²-faktöriyel MKT ile belirlendi ve biyosensör oluştururken ise TiO₂NP'lü biyosensör için bulunan GOx miktarı kullanıldı.

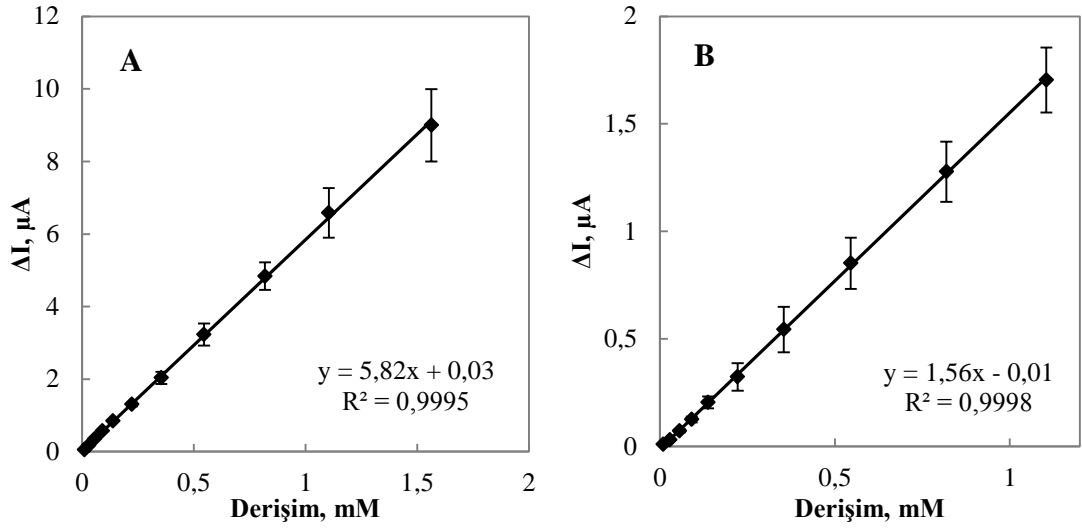
2²-faktöriyel MKT ile yüzey bileşimi belirlenen biyosensörlerin çalışma koşulları olarak GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE için elde edilen çalışma koşulları kullanıldı. Bu nedenle, GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE biyosensörünün diğer performans faktörlerini incelemek için 2²-faktöriyel MKT ile yüzey bileşimi belirlenen biyosensör kullanıldı.

Yüzey modifikasyonunda kullanılan optimum miktardaki c-MWCNT ve TiO₂NP kullanılarak ve her birinin yüzeyine GOx immobilize edilerek iki farklı glukoz biyosensörü hazırlandı (GOx/c-MWCNT/GCE ve GOx/TiO₂NP/GCE) ve bu iki biyosensörün glukoz duyarlıkları kalibrasyon eğrileri çizilerek belirlendi (Şekil 4.18). GOx/c-MWCNT/GCE için doğrusal çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-5} - 1,6 \times 10^{-3}$ M ve duyarlık $5,82 \mu\text{A mM}^{-1}$; GOx/TiO₂NP/GCE için ise doğrusal çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-5} - 2,2 \times 10^{-4}$ M ve duyarlık $1,56 \mu\text{A mM}^{-1}$ olarak belirlendi. Bu duyarlıklar ve çalışma aralıkları GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE ile karşılaştırıldı. Bu biyosensörün doğrusal çalışma aralığı $2,0 \times 10^{-5} - 2,3 \times 10^{-3}$ M ve duyarlığı $9,36 \mu\text{A mM}^{-1}$ ($131,83 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$) olarak bulunmuştu. İki bileşenin ayrı ayrı olduğu durumda hazırlanan biyosensörlerin duyarlıklarının daha düşük olduğu göröldü. Bu bilgiler ışığında, c-MWCNT ve TiO₂NP'in bir arada bulunduğu durumda sinerjik etki ile duyarlığı arttırdığı düşünöldü. Bu artış, TiO₂NP'nin c-MWCNT'nin elektrot yüzeyinde topaklanmasını büyük ölçüde azaltarak daha homojen dağılmasından ve elektrodun yüzey alanının artmasından kaynaklandığı şeklinde değerlendirildi.

GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE için bulunan duyarlığın, literatürde TiO₂ nanomalzemeleri ile glukoz tayini için hazırlanan diğer birçok biyosensörden yüksek olduğu göröldü: $0,39 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Feng vd. 2013b); $23,2 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Yang vd.

2014); 32,6 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (GuO vd. 2017); 0,94 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Feng vd. 2013a); 9,25 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Tang vd. 2010); 0,24 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Pang vd. 2009); 0,08 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Kang vd. 2008); 6,20 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Jang vd. 2012); 4,13 $\mu\text{A mM}^{-1}$ (Xu vd. 2012); 8,25 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Cui vd. 2013); 6,31 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Tang vd. 2015). Literatürde duyarlılığı, bu çalışmada GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE için elde edilen duyarlıktan daha yüksek olan çalışmalar da mevcuttur: 240 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Yao vd. 2011); 36 $\mu\text{A mM}^{-1}$ (Benvenuto vd. 2009) ve 248 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Gao vd. 2014).

Sonuç olarak, GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin duyarlık bakımından, literatürdeki pek çok çalışmada elde edilenden daha iyi olduğu söylenebilir. Biyosensörün LOD değerinin, literatürde verilen TiO₂ nanomalzemeleri ile glukoz tayini için hazırlanan diğer birçok biyosensörden düşük ($1,0 \times 10^{-4}$ M (Feng vd. 2013a), $1,0 \times 10^{-4}$ M (Kang vd. 2008), $1,0 \times 10^{-4}$ M (Feng vd. 2013b)) ve doğrusal çalışma aralığının ise, glukoz tayini için literatürdeki TiO₂ nanomalzemeleri ile hazırlanan biyosensörlerin pek çoğu için elde edilen doğrusal çalışma aralığından daha geniş ($1,0 \times 10^{-4} - 6 \times 10^{-4}$ M (Yao vd. 2011), $1,0 \times 10^{-4} - 8 \times 10^{-3}$ M (Feng vd. 2013a), $1,0 \times 10^{-3} - 1,2 \times 10^{-2}$ M (Xu vd. 2012), $4 \times 10^{-4} - 8 \times 10^{-3}$ M (Zhang vd. 2011), $1,0 \times 10^{-4} - 4 \times 10^{-3}$ M (Feng vd. 2013b), $5,0 \times 10^{-6} - 5,5 \times 10^{-4}$ M (Viticoli vd. 2006), $1 \times 10^{-5} - 7 \times 10^{-4}$ M (Gao vd. 2014)) olduğu görüldü. Literatürde, GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE ile bulunan çalışma aralığına yakın veya bu aralıktan daha geniş çalışma aralıkları da rapor edilmiştir: $1 \times 10^{-5} - 7 \times 10^{-3}$ M (Tang vd. 2010), $1,5 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-3}$ M (Benvenuto vd. 2009), $5 \times 10^{-6} - 1,3 \times 10^{-3}$ M (Yang vd. 2014).



Şekil 4.18 Kalibrasyon grafikleri A. GOx/c-MWCNT/GCE ve B. GOx/TiO₂NP/GCE ($N=3$; 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,70 V)

4.1.5.2 Cevap süresi

İdeal bir biyosensörün, analite kısa sürede cevap vermesi beklendiğinden, biyosensörler için cevap süresi önemli bir parametredir. Cevap süresi, GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE için çizilen kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kullanılan *i-t* grafiklerinden yararlanılarak hesaplandı. Çözeltiye yapılan her bir glukoz ilavesinden sonra, GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin kararlı hal akımına ulaşması için gereken süre belirlendi ve bu sürenin %95'ine ulaşıldığındaki durumda, cevap süresinin ortalama 20 s olduğu gözlemlendi. Bu süre, glukoz biyosensörleri için oldukça iyi bir süredir.

4.1.5.3 Michaelis-Menten sabiti (K_M)

Michaelis-Menten sabiti (K_M) substratın enzime bağlanma ilgisinin bir ölçüsüdür. K_M değeri ne kadar küçükse, substratın enzime olan ilgisi o kadar fazladır (Xu vd. 2012). GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'ye immobilize edilmiş olan GOx'ın glukozla karşı ilgisini bulabilmek amacıyla, Michaelis-Menten sabiti hesaplandı. Bu sabitin hesaplanması için Bölüm 3.7.4'te anlatıldığı gibi Lineweaver-Burk grafiği ($1/[\Delta i]$ - $1/[\text{Glukoz}]$) çizildi. Bu grafikten GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE için K_M değeri 0,29 mM olarak hesaplandı. Literatürde TiO₂ nanomalzemeleri ile glukoz tayini için hazırlanan

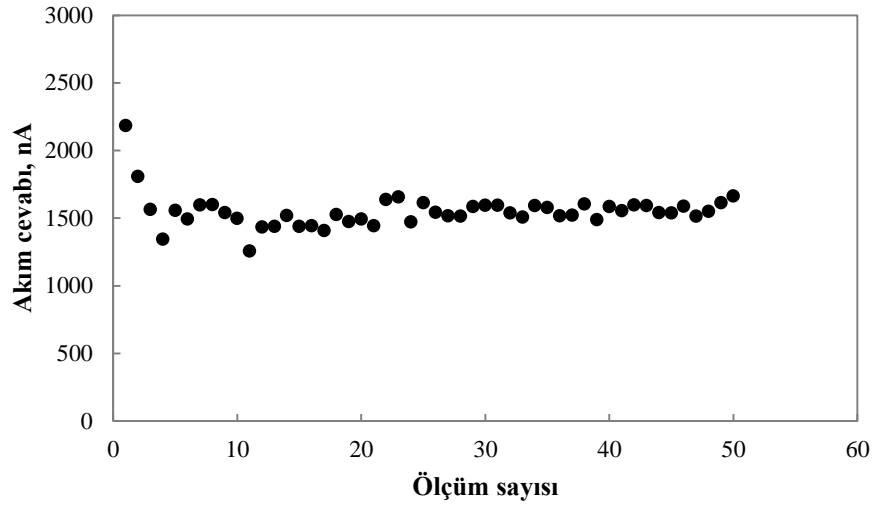
bazı biyosensörler ile bulunan K_M değerleri 11 mM (Yao vd. 2011), 7,3 mM (Xu vd. 2012), 7,2 mM (Zhang vd. 2011), 7,5 mM (Viticoli vd. 2006), 7,39 mM (Cui vd. 2013) ve 0,41 mM (Yang vd. 2014) olarak rapor edilmiştir. Bu değerler ile bu çalışmada bulunan K_M değeri karşılaştırıldığında, bulunan değerler literatürde verilen değerlerden düşük olmasındaki en büyük etkinin, modifikasyonda kullanılan malzemelerin ve bunların miktarlarının, enzim etkinliği üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu şeklinde yorumlanabilir.

4.1.5.4 Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik

Hazırlanan tek bir biyosensör ile çok sayıda analiz yapılabilmesi, biyosensörler için istenen bir özelliktir. Bu amaçla, Bölüm 3.7.5'te anlatıldığı gibi, aynı GOx/TiO₂-c-MWCNT/GCE biyosensörü ile arda arda üç kalibrasyon eğrisi çizilerek elde edilen eğrilerin duyarlıklarından, BSS %1,0 olarak bulundu. Ayrıca, tekrar üretilebilirliğini belirlemek için aynı şartlarda üç farklı GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE hazırlandı ve Bölüm 3.7.6'da anlatıldığı gibi, her bir GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE biyosensörü için çizilen kalibrasyon eğrilerinin duyarlıklarından, BSS %2,4 olarak hesaplandı. Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik için BSS değerlerinin düşük olması, GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin ard arda kullanılabilmesi ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilecek şekilde üretilebilmeye uygun olduğunu gösterdi.

4.1.5.5 Kararlılık

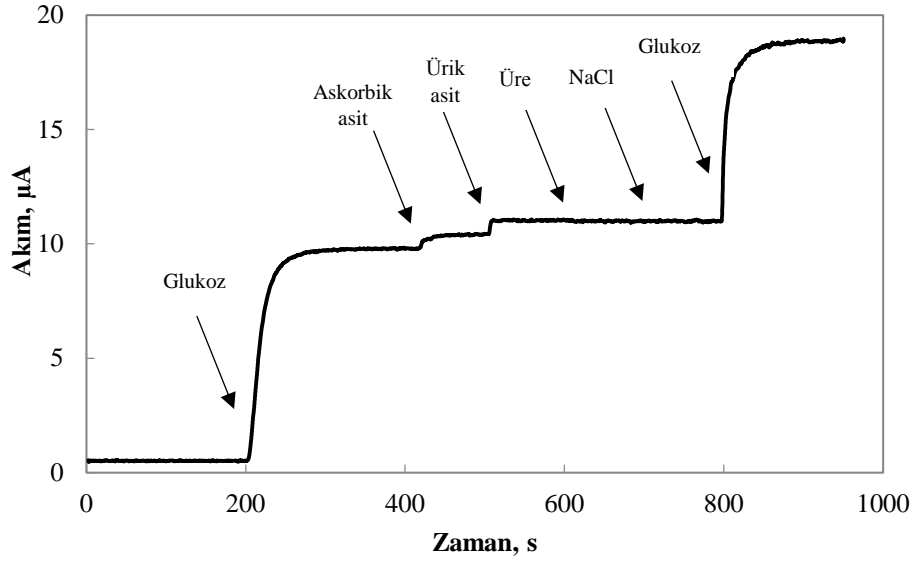
GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin cevabının, kullanım sıklığı ile nasıl değiştiğini belirlemek için, Bölüm 3.7.8'de anlatıldığı gibi, GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin optimum çalışma koşullarında sabit glukoz derişiminde ard arda amperometrik akım cevapları ölçüldü. GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin 50 ölçüm boyunca glukozu verdiği amperometrik cevaplar grafiğe geçirildi ve Şekil 4.19'da verildi. GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin glukoz cevabının, 50 ölçüm süresince elde edilen bağıl standart sapması %8,1 olarak hesaplandı.



Şekil 4.19 GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin kararlılığı

4.1.5.6 Bozucu türlerin etkisi

Glukoz biyosensörlerinin seçiciliği gerçek numune analizlerinde oldukça önemlidir. Kolaylıkla yükseltgenen maddeler insan kan serumunda glukozla birlikte bulunur. GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin substrat seçiciliğini belirlemek için askorbik asit, ürik asit, üre ve NaCl'nin biyosensörlerin cevabına etkisi Bölüm 3.7.9'da anlatıldığı gibi belirlendi. Kanda glukozun normal fizyolojik değerinin, sözü geçen bozucu türlerin 30-50 kat yüksek olduğu bilindiğinden (Dayakar, 2017), 1,00 mM glukoz cevabına karşı 0,02 mM askorbik asit, ürik asit, üre ve NaCl'nin etkisi, kronoamperometrik yöntem ile çizilen *i-t* grafiğinden yararlanılarak incelendi (Şekil 4.20). İncelenen bozucu türlerden üre ve NaCl'nin GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin cevabına önemli bir etkisinin olmadığı, askorbik asit ve ürik asite ise, sırası ile %6,7 ve %7,1 girişim yaptığı belirlendi. Sonuçlar hazırlanan bu biyosensörün yüksek bir seçiciliğe sahip olduğunu gösterdi.



Şekil 4.20 GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin cevabına bozucu türlerin etkisi

4.2 GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE Biyosensörü ile İlgili Çalışmalar

4.2.1 Elektrot yüzey bileşiminin optimizasyonu

Bölüm 4.1.1'de yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, elektrot yüzeyinde bulunan bileşenlerden enzim hariç diğer ana bileşenlerin optimum değerlerini bulabilmek için 2²-faktöriyel MKT yönteminin kullanılmasının yeterli olabileceğini gösterdi ve GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE biyosensörünün hazırlanmasında kullanılan Co₃O₄NP ve c-MWCNT'nin optimum miktarları 2²-faktöriyel MKT ile belirlendi. Bu amaçla, Çizelge 3.11'de verilen deneysel veriler %95 güven seviyesinde ANOVA ile incelendi ve Çizelge 4.7'de verildi. Modelin anlamlılığı Fisher *F* testi ile incelendi ve *F* değeri 14,58 olarak bulundu. *p* değerinin oldukça düşük olması (*p*=0,0014) modelin anlamlı olduğunu gösterdi. Ayrıca, modelde A (*p*=0,0013), B (*p*=0,0050), A² (*p*=0,0035) ve B² (*p*=0,0096) anlamlı terimler olarak bulundu. Anlamlı olmayan terimler çıkarıldığında amperometrik akım cevabı (nA) ile bağımsız değişkenler arasındaki matematiksel model, aşağıda verilen ikinci dereceden eşitlik ile ifade edilebilir:

$$Y=8886,40+1752,54[\text{c-MWCNT}]+1360,73[\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}]-1564,71[\text{c-MWCNT}]^2-1279,51[\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}]^2$$

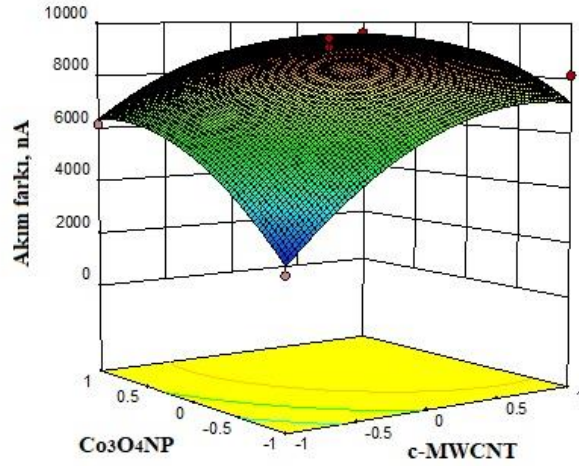
Geliştirilen modelin deneysel verilere uygun olup olmadığı uyumsuzluk testi ile incelendi. Çizelge 4.7’de uyumsuzluk değerinin 0,1482 ($p>0,05$) olarak bulunması modelin %95 güven seviyesinde deneysel verilere uygulanmasının uygun olduğunu gösterdi. R^2 değeri (0,9124) de elektrot cevabının model ile uyumunun iyi olduğunu bir göstergesidir.

Çizelge 4.7 c-MWCNT-Co₃O₄NP için 2²-faktöriyel MKT verileri ile elde edilen ANOVA

Kaynak	β	SS	df	MS	F değeri	P değeri	
Model	8886,40	$6,667 \times 10^7$	5	$1,333 \times 10^7$	14,58	0,0014	anamlı
A	1752,54	$2,457 \times 10^7$	1	$2,457 \times 10^7$	26,87	0,0013	anamlı
B	1360,73	$1,481 \times 10^7$	1	$1,481 \times 10^7$	16,20	0,0050	anamlı
AB	-718,95	$2,068 \times 10^6$	1	$2,068 \times 10^6$	2,26	0,1764	
A ²	-1564,71	$1,703 \times 10^7$	1	$1,703 \times 10^7$	18,62	0,0035	anamlı
B ²	-1279,51	$1,139 \times 10^7$	1	$1,139 \times 10^7$	12,45	0,0096	anamlı
Artık		$6,402 \times 10^6$	7	$9,146 \times 10^5$			
Uyumsuzluk		$4,499 \times 10^6$	3	$1,500 \times 10^6$	3,15	0,1482	anamlı değil
Saf hata		$1,903 \times 10^6$	4	$4,757 \times 10^5$			
Toplam kor.		$7,307 \times 10^7$	12				
$R^2 = 0,9124$							

SS: kareler toplamı; df: serbestlik derecesi; MS: kareler ortalaması; $F_{\text{value}} = MS_{\text{faktor}}/MS_{\text{hata}}$; P değeri: olasılık seviyesi.

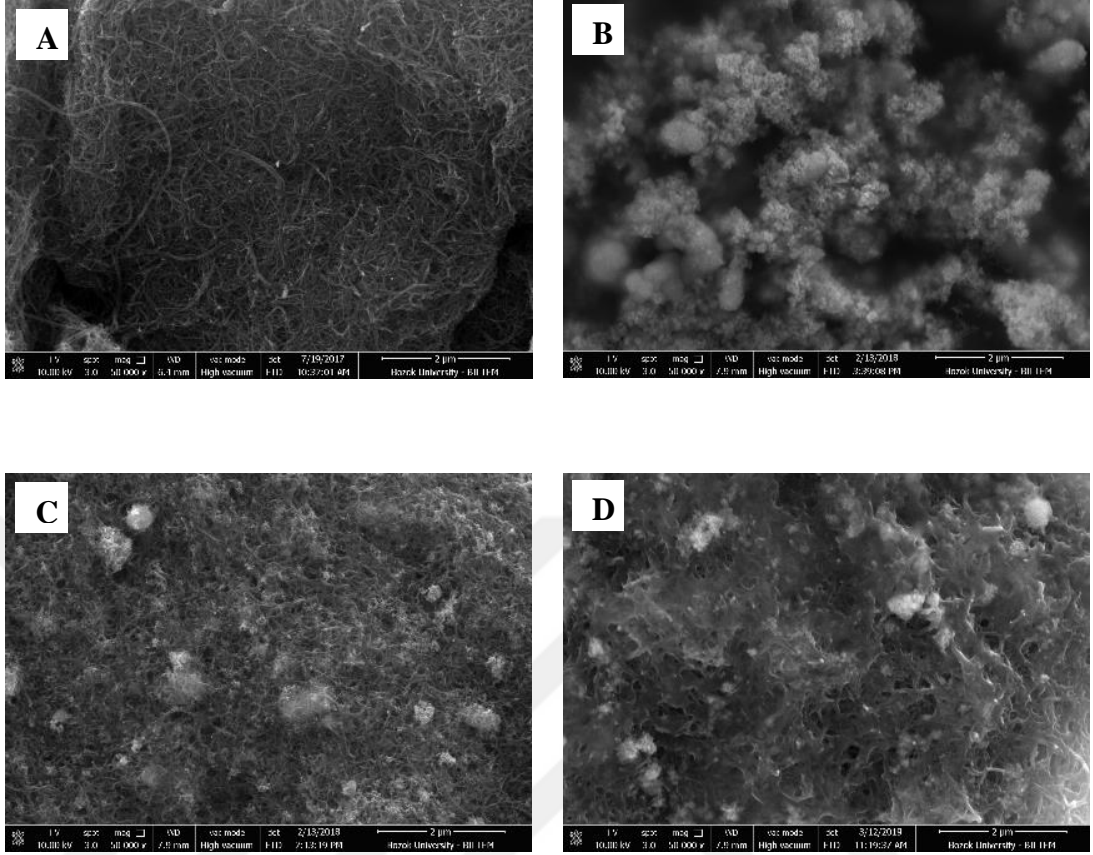
Şekil 4.21’de GCE yüzeyini modifiye etmede kullanılan c-MWCNT ve Co₃O₄NP miktarlarının +0,70 V’ta $2,0 \times 10^{-4}$ M H₂O₂ içeren fosfat tamponu çözeltisine verdiği amperometrik cevapla ilişkisini gösteren cevap yüzey eğrisi görülmektedir. Cevap yüzey eğrisi ve ANOVA çizelgesi değerlendirildiğinde, c-MWCNT ve Co₃O₄NP miktarları ile amperometrik akım cevabı arasındaki ilişkinin bir eğri oluşturduğu ve en yüksek amperometrik cevabın 1 mL kitosan çözeltisinde 28,5 mg c-MWCNT ve 12,9 mg Co₃O₄NP içeren çözelti ile modifiye edilen elektrotla elde edildiği görüldü. Bu çözelti, yüzey modifikasyonunda kullanılan optimum çözelti olarak belirlendi ve biyosensör, daha önce de belirtildiği gibi, yüzeyde 30 U GOx olacak şekilde hazırlandı.



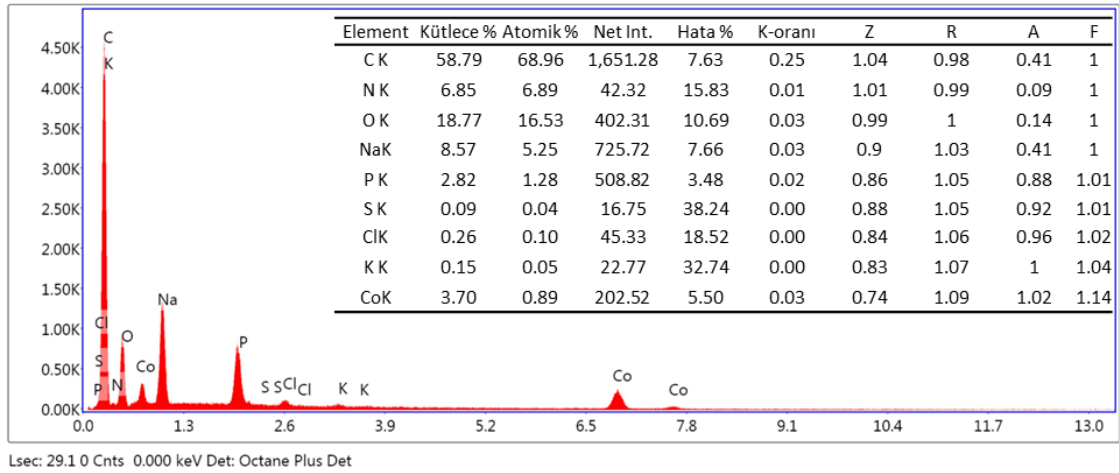
Şekil 4.21 Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin yüzey bileşimi optimizasyonunda elde edilen cevap yüzey eğrisi (+0,70 V ve 2,0×10⁻⁴ M H₂O₂ içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde)

4.2.2 Yüzey karakterizasyonu

Co₃O₄NP, c-MWCNT ve GOx'ın ayrı ayrı ve bir arada iken GCE yüzeyine kaplanması ile hazırlanan elektrotların yüzey karakterizasyonu SEM ile gerçekleştirildi ve elde edilen görüntüler Şekil 4.22'de verildi. Görüntü A'da c-MWCNT'nin karakteristik ipliksi yapısı ve Görüntü B'de Co₃O₄NP'lerin nanoboyuttaki küresel yapıları görüldü ve bu malzemelerin elektrot yüzeyinde homojen bir şekilde dağıldığı gözlemlendi. Görüntü C'de hem c-MWCNT'ye ait ipliksi yapıların, hem de bu yapı içerisinde homojen bir şekilde dağılmış küresel yapıların görülmesi ile, bu elektrot yüzeyinde her iki malzemenin bir arada olduğu düşünüldü. Ayrıca, bu görüntüde açık biçimde görülen gözenekli Co₃O₄NP-c-MWCNT yapısı, hazırlanan elektrodun enzim immobilizasyonu için uygun bir ortam sağlaması açısından da önemlidir. Görüntü D, GOx'ın gözenekli modifiye elektrot yüzeyine bir tabaka halinde kaplandığını gösterdi ve bu durum, enzim immobilizasyonunun başarılı olduğunu düşündürdü. GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT matriksinin elementel bileşimi, EDX ile incelendi ve Şekil 4.23'te verildi. Spektrumda ve çizelgede kompozitin içeriğinde bulunan Co, K, Cl, S, P, Na, O, N, ve C elementlere ait veriler elektrot yüzeyinde Co₃O₄NP, c-MWCNT ve GOx'ın varlığını gösterir.



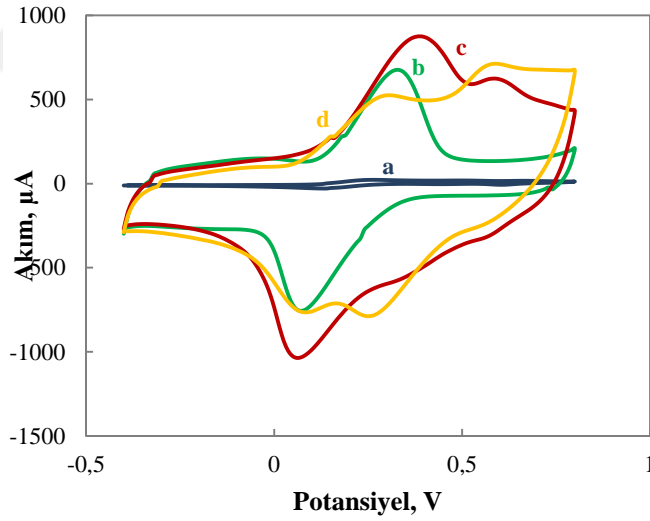
Şekil 4.22 SEM görüntüleri: (A) c-MWCNT/GCE, (B) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{GCE}$, (C) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-c-MWCNT}/\text{GCE}$ ve (D) $\text{GOx}/\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-c-MWCNT}/\text{GCE}$



Şekil 4.23 $\text{GOx}/\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-c-MWCNT}/\text{GCE}$ için EDX spektrumu ve elementel bileşim çizelgesi

4.2.3 Elektrokimyasal karakterizasyon

Optimum miktarlar kullanılarak hazırlanmış (a) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{GCE}$, (b) $c\text{-MWCNT}/\text{GCE}$, (c) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}-c\text{-MWCNT}/\text{GCE}$ ve (d) $\text{GOx}/\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}-c\text{-MWCNT}/\text{GCE}$ 'lerin CV'leri 50 mV s^{-1} tarama hızında $0,10 \text{ M KCl}$ içeren redoks probunda kaydedildi ve Şekil 4.24'te verildi. Şekil incelendiğinde, $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{GCE}$ 'ye ait a eğrisinin pik akımının oldukça düşük, $c\text{-MWCNT}/\text{GCE}$ 'ye ait b eğrisinin ise pik akımının oldukça yüksek olduğu görüldü. Bu durumun, $c\text{-MWCNT}$ 'nin geniş yüzey alanına ve yüksek iletkenliğe sahip olmasından kaynaklandığı düşünüldü. İki malzemenin bir arada olduğu durumda (eğri c) pik akımının daha da artmasından dolayı, $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}-c\text{-MWCNT}/\text{GCE}$ 'nin elektron aktarım özelliğinin, iki malzemenin bir arada bulunmasıyla ortaya çıkan sinerjik etkiden kaynaklandığı varsayıldı. $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}-c\text{-MWCNT}/\text{GCE}$ 'ye GOx immobilizasyonu ile pik akımlarının düşmesi, GOx 'ın yalıtkan özelliği ile iletkenliği düşürmesinden kaynaklandığı düşünüldü.

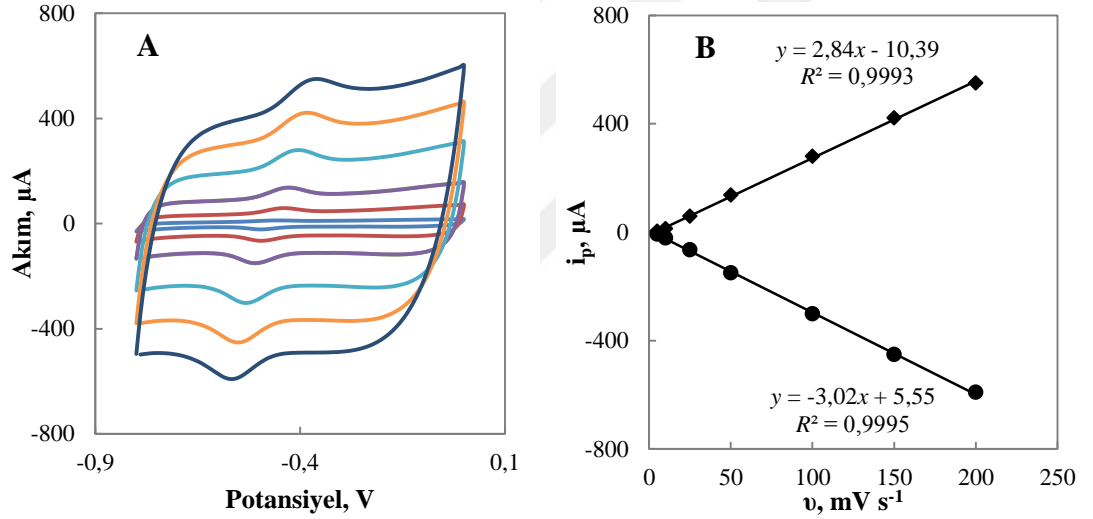


Şekil 4.24 Dönüşümlü voltamogramlar: (a) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{GCE}$, (b) $c\text{-MWCNT}/\text{GCE}$, (c) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}-c\text{-MWCNT}/\text{GCE}$ ve (d) $\text{GOx}/\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}-c\text{-MWCNT}/\text{GCE}$ (50 mV s^{-1} tarama hızında $0,10 \text{ M KCl}$ içeren $5,0 \text{ mM Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ redoks probunda)

Şekil 4.25.A'da, $\text{GOx}/\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}-c\text{-MWCNT}/\text{GCE}$ 'nin çalışılan tampon çözelti ortamında, $5\text{-}200 \text{ mV s}^{-1}$ tarama hızlarında kaydedilen CV'leri verildi. Bu grafiklerden yararlanılarak, $\text{GOx}/\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}-c\text{-MWCNT}/\text{GCE}$ için elektron aktarım hız sabiti Bölüm

4.1.3'te anlatıldığı gibi belirlendi ve 50, 75, 100 ve 150 mV s^{-1} tarama hızlarında ortalama k_s $0,37 \pm 0,11 \text{ s}^{-1}$ olarak hesaplandı.

Şekil 4.25.B, 5-200 mV s^{-1} tarama hızları arasında elde edilen anodik ve katodik pik akımlarının tarama hızına karşı değişimini göstermektedir. Bu değişimin doğrusal olması elektrot yüzeyindeki elektron aktarım mekanizmasının, bu biyosensör için de yüzey kontrollü olduğunu göstermektedir. Bu grafikteki katodik pik akımları ile tarama hızı arasındaki doğrusal eşitlikten ($y = -3,02x + 5,55$) yararlanılarak, $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-c-MWCNT/GCE}$ yüzeyine immobilize edilen GOx miktarı, Bölüm 4.1.3'te anlatıldığı gibi, belirlendi ve Γ değeri $1,14 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-2}$ olarak hesaplandı.



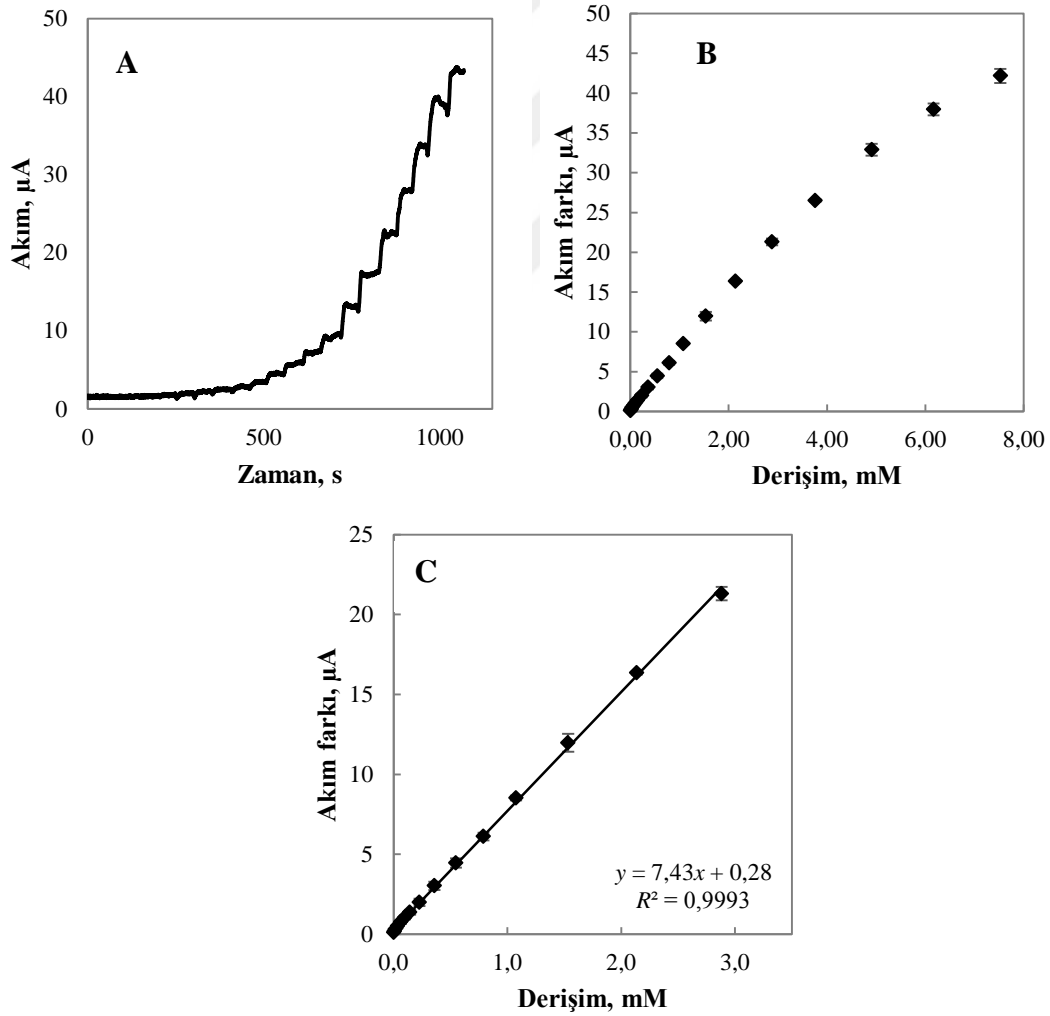
Şekil 4.25 A. GOx/ $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-c-MWCNT/GCE}$ 'nin çeşitli tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları ve B. pik akımlarının tarama hızı ile değişimi (0,10 M KCl içeren 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde)

4.2.4 Performans faktörleri

Optimum yüzey bileşiminde hazırlanan GOx/ $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-c-MWCNT/GCE}$ biyosensörünün performans faktörleri belirlendi ve aşağıda verildi.

4.2.4.1 Doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilirlik sınırı, alt tayin sınırı ve duyarlılık

GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin doğrusal çalışma aralığı ve duyarlılığını belirlemek amacıyla, kronoamperometrik yöntem ile ard arda glukoz ilavelerinden sonra akım cevapları ölçüldü (Şekil 4.26.A) ve her bir ilaveden sonraki akım farkları derişime karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.26.B). Şekil 4.26.C'de verilen kalibrasyon grafiklerinden yararlanılarak GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin doğrusal çalışma aralığı $3,0 \times 10^{-6}$ – $2,9 \times 10^{-3}$ M ve duyarlılığı $7,43 \mu\text{A mM}^{-1}$ ($104,51 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$) olarak belirlendi. Biyosensörün gözlenebilirlik sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) ise sırasıyla $1,0 \times 10^{-6}$ M ve $3,5 \times 10^{-6}$ M olarak hesaplandı.



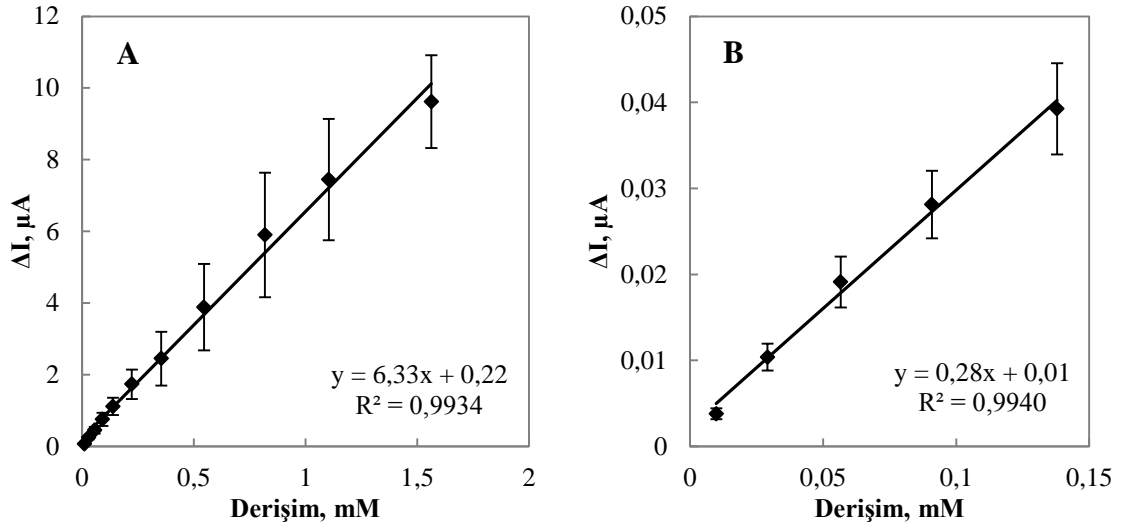
Şekil 4.26 GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE cevabına glukoz derişiminin etkisi

A. Akım-zaman grafiği. B. akım farkı-derişim grafiği ve C. kalibrasyon grafiği ($N=3$; 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,70 V)

Çalışmada GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE için bulunan duyarlık, literatürde Co₃O₄ nanomalzemeleri ile glukoz tayini için hazırlanan bazı biyosensörden yüksektir: 13,52 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Karuppiyah vd. 2014), 36,25 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Karuppiyah vd. 2014), 0,1 $\mu\text{A mM}^{-1}$ (Dhanjai vd. 2019); bazılarına ise çok yakındır: 102,77 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Ding vd. 2016) ve 116,64 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Fan vd. 2016). Literatürde Co₃O₄ nanomalzemeleri ile hazırlanan ve GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE için bulunandan daha yüksek bir duyarlık elde edilen bir çalışmada bu değer 929 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Rajeshkhanna vd. 2017) olarak rapor edilmiştir.

Biyosensörün LOD değerinin, literatürde verilen Co₃O₄ nanomalzemeleri ile glukoz tayini için hazırlanan diğer bazı biyosensörden düşük: $5,0 \times 10^{-5}$ M (Karuppiyah vd. 2014), $1,1 \times 10^{-4}$ M (Dhanjai vd. 2019), $1,8 \times 10^{-6}$ M (Ding vd. 2016) ve $1,4 \times 10^{-6}$ M (Fan vd. 2016) bazılarına ise çok yakın olduğu: $9,7 \times 10^{-7}$ M (Ding vd. 2010) ve $1,0 \times 10^{-6}$ M (Rajeshkhanna vd. 2017); doğrusal çalışma aralığının ise, glukoz tayini için literatürdeki Co₃O₄ nanomalzemeleri ile hazırlanan biyosensörlerin bazıları için elde edilen doğrusal çalışma aralığından daha geniş olduğu görüldü: $2,0 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-4}$ M ve $4,4 \times 10^{-4} - 2,0 \times 10^{-3}$ M (Rajeshkhanna, 2017), $1,0 \times 10^{-4} - 5,0 \times 10^{-3}$ M (Ding vd. 2016) ve $1,0 \times 10^{-5} - 5,0 \times 10^{-3}$ M (Fan vd. 2016).

Şekil 4.27’de, GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE’nin 2²-faktöriyel MKT ile yüzey bileşimi optimizasyonunda belirlenen miktarlarda c-MWCNT ve Co₃O₄NP’nin, GCE yüzeyine ayrı ayrı modifikasyonu ile hazırlanan modifiye elektrotlara GOx immobilize edilmesi ile oluşturulan A. GOx/c-MWCNT/GCE ve B. GOx/Co₃O₄NP/GCE’nin kalibrasyon grafikleri verildi. GOx/c-MWCNT/GCE için doğrusal çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-5} - 1,6 \times 10^{-3}$ M ve duyarlık $6,33 \mu\text{A mM}^{-1}$; GOx/Co₃O₄NP/GCE için ise doğrusal çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-5} - 1,4 \times 10^{-4}$ M ve duyarlık $0,28 \mu\text{A mM}^{-1}$ olarak belirlendi. İki bileşenin ayrı ayrı olduğu durumda hazırlanan biyosensörlerin duyarlıklarının, GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE’nin duyarlığından daha düşük olduğu görüldü. Bu durum, c-MWCNT ve Co₃O₄NP’in bir arada bulunmasının biyosensör performansını arttırdığı şeklinde yorumlandı. Bu kalibrasyon eğrilerinde hata çubuklarının büyük olması da, bu malzemeler tek tek olduğu durumda yüzeydeki dağılımlarının tekrarlanabilir şekilde olmadığını düşündürdü.



Şekil 4.27 Kalibrasyon grafikleri A. GOx/c-MWCNT/GCE ve B. GOx/Co₃O₄NP/GCE (N=3; 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,70 V)

4.2.4.2 Cevap süresi

Cevap süresi, Bölüm 3.7.3'te anlatıldığı şekilde, GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE için çizilen kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kullanılan *i-t* grafiklerinden yararlanılarak hesaplandı. Çözeltiye yapılan glukoz ilavelerinden sonra, GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin kararlı hal akımına ulaşması için gereken sürenin %95'ine ulaşıldığındaki durumda, cevap süresinin ortalama 20 s olduğu gözlemlendi. Bu süre hazırlanan biyosensör ile hızlı bir cevap elde edilebilmesi için oldukça uygundur.

4.2.4.3 Michaelis-Menten sabiti (K_M)

GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'ye immobilize edilmiş olan GOx'ın glukozla karşı ilgisini bulabilmek amacıyla, Michaelis-Menten sabitini (K_M) belirlemek için, Bölüm 3.7.4'te anlatıldığı gibi çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden ($1/[Glukoz]-1/[\Delta i]$), GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE için K_M değeri 0,30 mM olarak hesaplandı. Literatürde Co₃O₄ nanomalzemeleri ile glukoz tayini için hazırlanan biyosensör ile bulunan K_M değeri 1,18 mM (Ding vd. 2016) olarak rapor edilmiştir. Literatürde verilen bu değer ile bu çalışmada bulunan K_M değeri karşılaştırıldığında, bulunan değer literatürdeki değerden düşük olmasındaki en büyük etkenin, Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin enzim

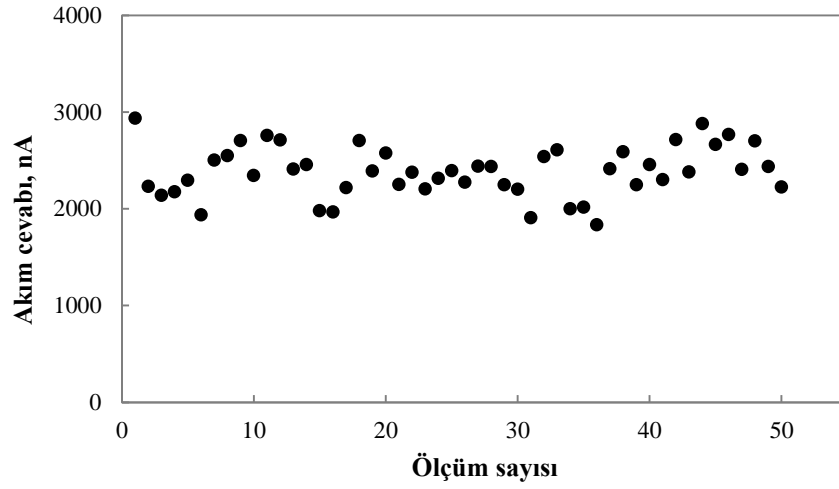
immobilizasyonu için uygun bir ortam oluřturması ve enzim etkinliđi üzerinde olumlu bir etki yapması olduđu dűřünülebilir.

4.2.4.4 Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik

Bölüm 3.7.5'te anlatıldığı gibi, GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE ile ard arda üç kalibrasyon eğrisi çizilerek elde edilen eğrilerin duyarlıklarından, BSS %1,8 olarak bulundu. Ayrıca, tekrar üretilebilirliğini belirlemek için aynı şartlarda üç farklı GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE hazırlandı ve Bölüm 3.7.6'da anlatıldığı gibi, her bir GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE ile çizilen kalibrasyon eğrilerinin duyarlıklarından, BSS %0,7 olarak hesaplandı. Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik için BSS değerlerinin düşük olması, GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin ard arda kullanılabilceği ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilecek şekilde üretilebilmeye uygun olduğunu gösterdi.

4.2.4.5 Kararlılık

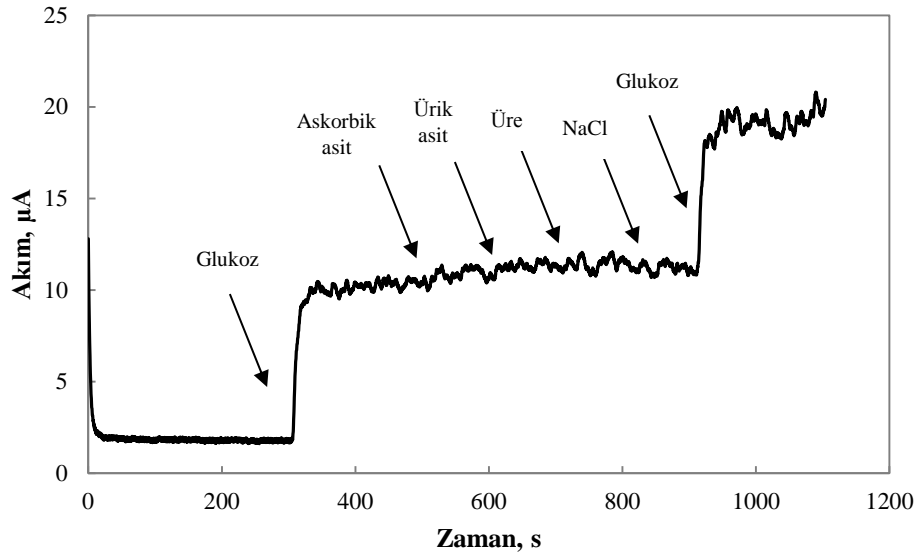
GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin cevabının, kullanım sıklığı ile nasıl değiştiğini belirlemek için, Bölüm 3.7.8'de anlatıldığı gibi, GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin optimum çalışma koşullarında sabit glukoz derişiminde ard arda ölçümler ile amperometrik akım cevabı ölçüldü. GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin 50 ölçüm boyunca glukoz verdiği amperometrik cevaplar grafiğe geçirildi ve şekil 4.28'de verildi. GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin glukoz cevabının, 50 ölçüm süresince elde edilen BSS %11,0 olarak hesaplandı. Bu sonuç da, biyosensörün cevabında büyük bir değişiklik olmadan ard arda ölçüm alınabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.28 GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin kararlılığı

4.2.4.6 Bozucu türlerin etkisi

GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin glukozu karşı seçiciliğini belirlemek için askorbik asit, ürik asit, üre ve NaCl'nin biyosensör cevabına etkisi Bölüm 3.7.9'da anlatıldığı gibi belirlendi. 1,00 mM glukoz cevabına karşı 0,02 mM askorbik asit, ürik asit, üre ve NaCl'nin etkisi, kronoamperometrik yöntem ile çizilen *i-t* grafiğinden yararlanılarak incelendi (Şekil 4.29). Askorbik asit, ürik asit, üre ve NaCl'nin GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin cevabına sırası ile %2,5, %2,6, %0,4 ve -%1,9 girişim yaptığı belirlendi. Sonuçlar hazırlanan bu biyosensörün yüksek bir seçiciliğe sahip olduğunu gösterdi.



Şekil 4.29 GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin cevabına bozucu türlerin etkisi

4.3 GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE ile İlgili Çalışmalar

4.3.1 Elektrot yüzey bileşiminin optimizasyonu

GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE biyosensörünün hazırlanmasında kullanılan Fe₃O₄NP ve c-MWCNT miktarları, 2²-faktöriyel MKT ile belirlendi. Bu amaçla Çizelge 3.11'de verilen deneysel veriler %95 güven seviyesinde ANOVA ile incelendi ve Çizelge 4.8'de verildi. Modelin *F* değeri 22,31, *p* değeri ise 0,0004 olarak bulundu. *p* değerinin oldukça düşük olması modelin anlamlı olduğunu gösterdi. Modelde A (*p*=0,0030), B (*p*=0,0089), A² (*p*< 0,0001) ve B² (*p*=0,0016) anlamlı terimlerdir. Anlamlı terimler dikkate alındığında amperometrik akım cevabı (nA) ile bağımsız değişkenler arasındaki matematiksel model, aşağıda verilen ikinci dereceden eşitlik ile ifade edilir:

$$Y=4614,94+568,16[c\text{-MWCNT}]-457,91[\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}]-1083,29[c\text{-MWCNT}]^2-685,79[\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}]^2$$

Geliştirilen model uyumsuzluk testi ile de incelendi. Çizelge 4.8'de uyumsuzluk değerinin 0,5589 (*p*>0,05) olarak bulunması modelin % 95 güven seviyesinde deneysel

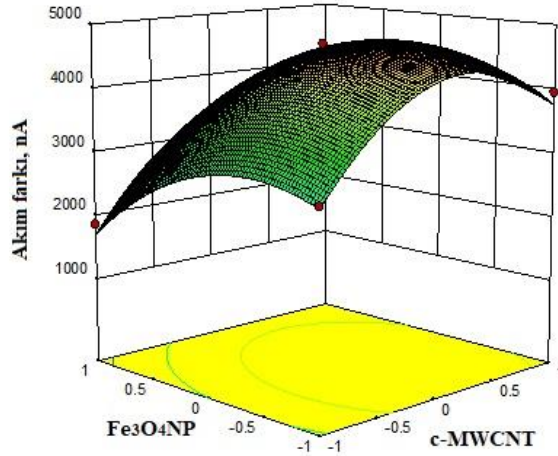
verilere uygulanmasının uygun olduğunu, R^2 değeri (0,9410) de elektrot cevabının model ile uyumlu olduğunu gösterdi.

Çizelge 4.8 c-MWCNT-Fe₃O₄NP için 2²-faktöriyel MKT verileri ile elde edilen ANOVA

Kaynak	β	SS	df	MS	F değeri	P değeri	
Model	4614,94	1,457×10 ⁷	5	2,915×10 ⁶	22,31	0,0004	anlamlı
A	568,16	2,582×10 ⁶	1	2,582×10 ⁶	19,77	0,0030	anlamlı
B	-457,91	1,677×10 ⁶	1	1,677×10 ⁶	12,84	0,0089	anlamlı
AB	113,17	5,123×10 ⁴	1	5,123×10 ⁴	0,39	0,5510	
A ²	-1083,29	8,164×10 ⁶	1	8,164×10 ⁶	62,50	< 0,0001	anlamlı
B ²	-685,79	3,272×10 ⁶	1	3,272×10 ⁶	25,05	0,0016	anlamlı
Artık		9,144×10 ⁵	7	1,306×10 ⁵			
Uyumsuzluk		3,405×10 ⁵	3	1,135×10 ⁵	0,79	0,5589	anlamlı değil
Saf hata		5,739×10 ⁵	4	1,435×10 ⁵			
Toplam kor.		1,549×10 ⁷	12				
R² = 0,9410							

SS: kareler toplamı; df: serbestlik derecesi; MS: kareler ortalaması; $F_{\text{value}} = MS_{\text{faktor}}/MS_{\text{hata}}$; P değeri: olasılık seviyesi.

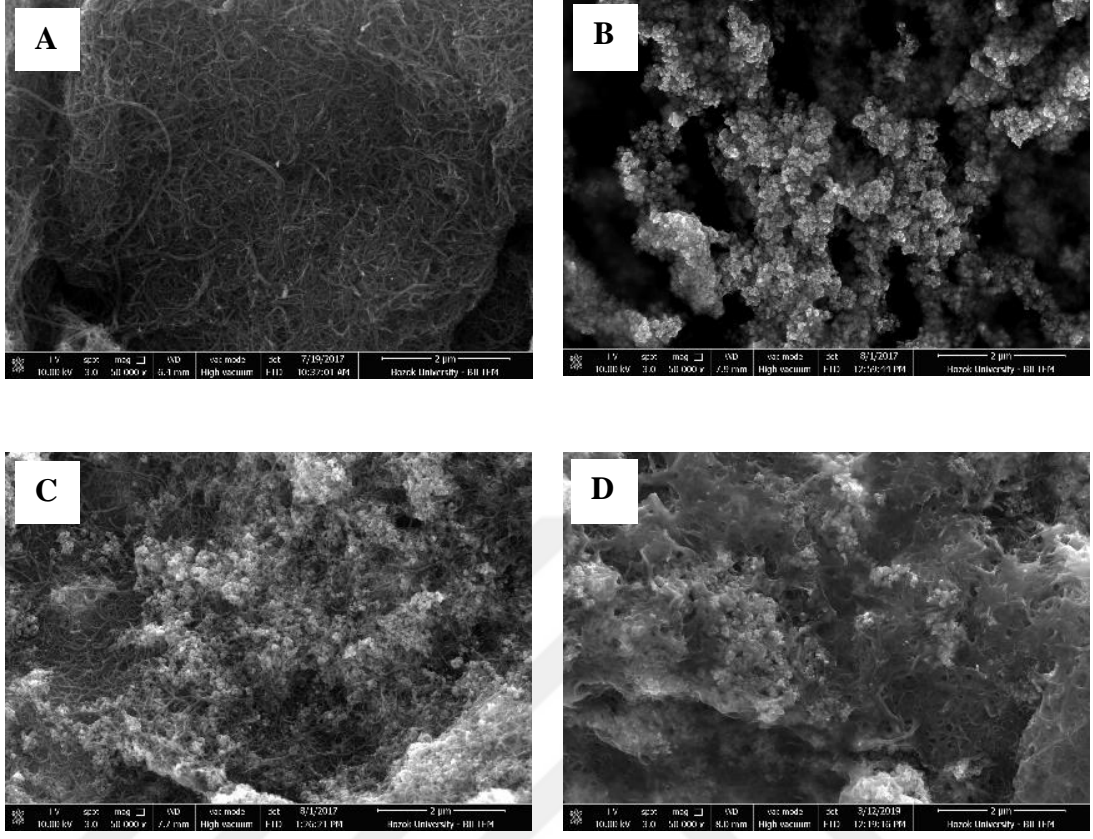
Şekil 4.30, GCE yüzeyini modifiye etmede kullanılan c-MWCNT ve Fe₃O₄NP miktarlarının +0,70 V potansiyelde 2,0×10⁻⁴ M H₂O₂ çözeltisine verdiği amperometrik cevapla ilişkisini gösteren cevap yüzey eğrisini göstermektedir. Cevap yüzey eğrisi ve ANOVA çizelgesi değerlendirildiğinde, c-MWCNT ve Fe₃O₄NP miktarları ile amperometrik akım cevabı arasındaki ilişkinin bir eğri oluşturduğu ve en yüksek amperometrik cevabının 1 mL kitosan çözeltisinde, 24,6 mg c-MWCNT ve 14,1 mg Fe₃O₄NP kullanılarak hazırlanan elektrot ile elde edildiği görüldü ve bu çözelti ve yüzeyde 30 U GOx olacak şekilde modifiye edilen glukoz biyosensörü hazırlandı ve diğer tüm çalışmalar bununla yapıldı.



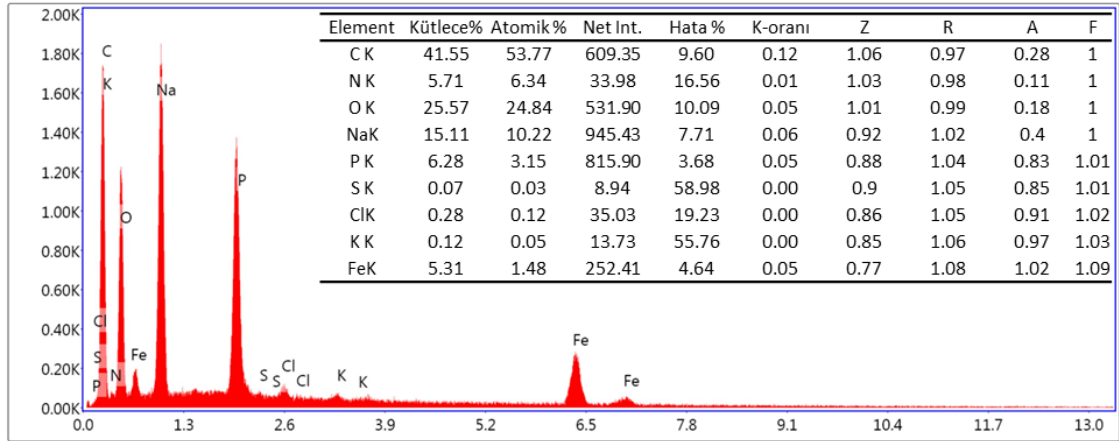
Şekil 4.30 Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin yüzey bileşimi optimizasyonunda elde edilen cevap yüzey eğrisi (+0,70 V ve 2,0×10⁻⁴ M H₂O₂ içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde)

4.3.2 Yüzey karakterizasyonu

GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'lerin hazırlanmasında kullanılan her bir modifikasyon malzemesinin elektrotların yüzey morfolojisini nasıl değiştirdiği SEM ile belirlendi. Şekil 4.31'de (A) c-MWCNT/GCE, (B) Fe₃O₄NP/GCE, (C) Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE ve (D) GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE için SEM görüntüleri verildi. Şekil 4.31.A ve B'de, sırasıyla c-MWCNT ve Fe₃O₄NP'nin yüzeyde homojen biçimde dağıldığı görüldü. Şekil 4.31.C'de Fe₃O₄NP-c-MWCNT kompozitinin, her iki malzemeyi de içeren gözenekli bir yapıya sahip olduğu ve bu gözenekli yapının enzim için uygun bir ortam sağlayacağı; Şekil 4.31.D'de ise yapıya GOx katılmasıyla değişen morfolojinin, GOx'ın başarılı bir şekilde yüzeye immobilize olmasından kaynaklandığı düşünüldü. GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT kompozitinin elementel bileşimi, EDX ile incelendi ve Şekil 4.32'de verildi. Spektrum ve çizelge incelendiğinde, kompozitin içeriğinde bulunan Fe, K, Cl, S, P, Na, O, N ve C elementlere ait veriler, elektrot yüzeyinin başarılı bir şekilde modifiye edildiğini gösterdi.



Şekil 4.31 SEM görüntüleri: (A) c-MWCNT/GCE, (B) Fe₃O₄NP/GCE, (C) Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE ve (D) GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE

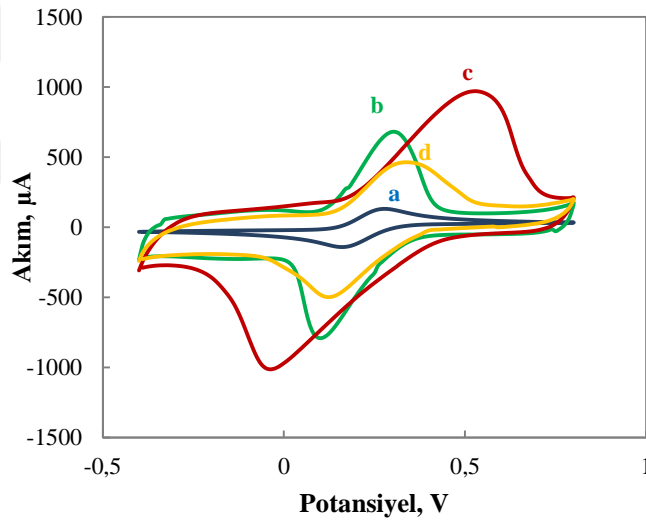


Lsec: 28.90 Cnts 0.000 keV Det: Octane Plus Det

Şekil 4.32 GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE için EDX spektrumu ve elemental bileşim çizelgesi

4.3.3 Elektrokimyasal karakterizasyon

Şekil 4.33, optimum miktarlar kullanılarak hazırlanmış (a) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{GCE}$, (b) c-MWCNT/GCE, (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP-c-MWCNT}/\text{GCE}$ ve (d) $\text{GOx}/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP-c-MWCNT}/\text{GCE}$ elektrotların 50 mV s^{-1} tarama hızında redoks probunda elde edilen CV'lerini göstermektedir. Şekil incelendiğinde, c-MWCNT/GCE'nin pik akımının (eğri b), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{GCE}$ 'nin pik akımından (eğri a) daha büyük olduğu görüldü. Eğri c'de, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP-c-MWCNT}/\text{GCE}$ 'nin en yüksek akıma sahip olmasının, iki malzemenin bir arada elektrot yüzey alanını ve iletkenliğini artırarak, elektron aktarım hızını iyileştirmesinden kaynaklandığı düşünüldü. Yalıtkan özellik gösteren GOx enziminin yapıya katılmasıyla hazırlanan $\text{GOx}/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP-c-MWCNT}/\text{GCE}$ ile ise beklendiği üzere daha düşük pik akımları elde edildi.

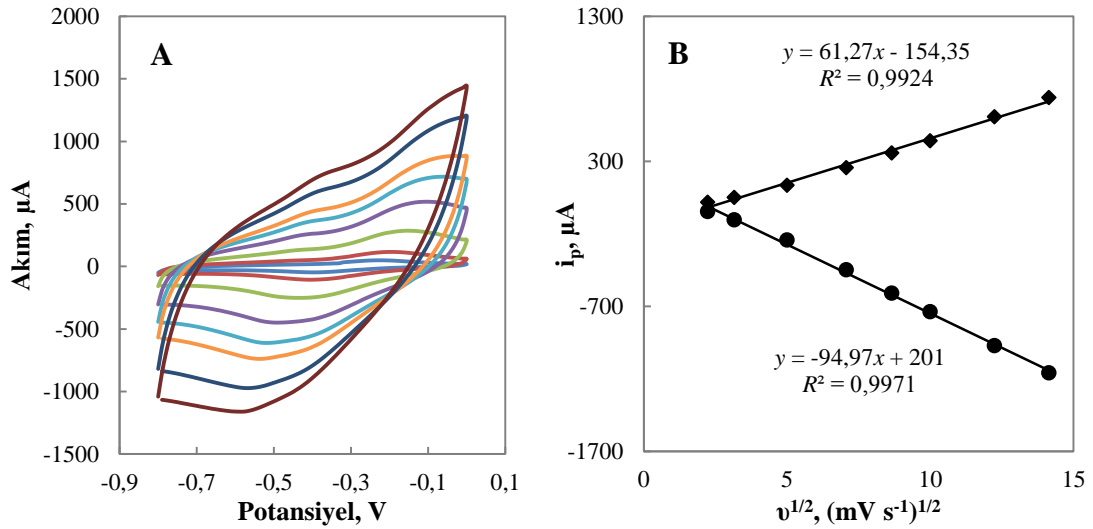


Şekil 4.33 Dönüşümlü voltamogramlar: (a) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{GCE}$, (b) c-MWCNT/GCE, (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP-c-MWCNT}/\text{GCE}$ ve (d) $\text{GOx}/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP-c-MWCNT}/\text{GCE}$ (50 mV s^{-1} tarama hızında $0,10 \text{ M KCl}$ içeren $5,0 \text{ mM Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks probunda)

$\text{GOx}/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP-c-MWCNT}/\text{GCE}$ 'nin akım cevabına tarama hızının etkisini incelemek amacıyla, bu biyosensörün çalışılan tampon çözelti ortamında $5-200 \text{ mV s}^{-1}$ arasında çeşitli tarama hızlarında CV'leri kaydedildi (Şekil 4.34.A). Bu grafiklerden ve Laviron eşitliğinden faydalanılarak biyosensörün, Bölüm 4.1.3'te ayrıntılı bir şekilde anlatıldığı gibi, elektron aktarım hız sabiti (k_s) belirlendi. $50, 75, 100$ ve 150 mV s^{-1} tarama

hızlarında GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE için ortalama k_s , $0,28 \pm 0,08 \text{ s}^{-1}$ olarak hesaplandı. Ayrıca Şekil 4.34.A’da verilen grafikte, katodik pik akımlarının tarama hızı ile değişimine ait eşitlikten ($y = -5,71x - 102,20$; $R^2=0,9724$) yararlanılarak, Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE yüzeyine immobilize edilen GOx miktarı, Bölüm 4.1.3’te anlatıldığı gibi, belirlendi. Lavironun 2. eşitliğine göre, Γ değeri $2,15 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-2}$ olarak hesaplandı.

Şekil 4.34 B’de, farklı tarama hızlarında elde edilen anodik ve katodik pik akımlarının, tarama hızının kareköküne karşı değişimi verildi. Bu değişimin doğrusal olması elektrot yüzeyindeki elektron aktarım mekanizmasının difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir. Bu durum, diğer MONP’lerle oluşturulan glukoz biyosensörlerinininkinden sadece yüzey kontrollü bir mekanizma olmaması açısından farklıdır. Bunun nedeni, Fe₃O₄NP’de bulunan Fe(II) ve Fe(III)’ten kaynaklanabileceği; yani enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan elektronların ayrıca Fe(II)-Fe(III) arasında difüzyon yoluyla da iletilebileceği şeklinde yorumlandı.

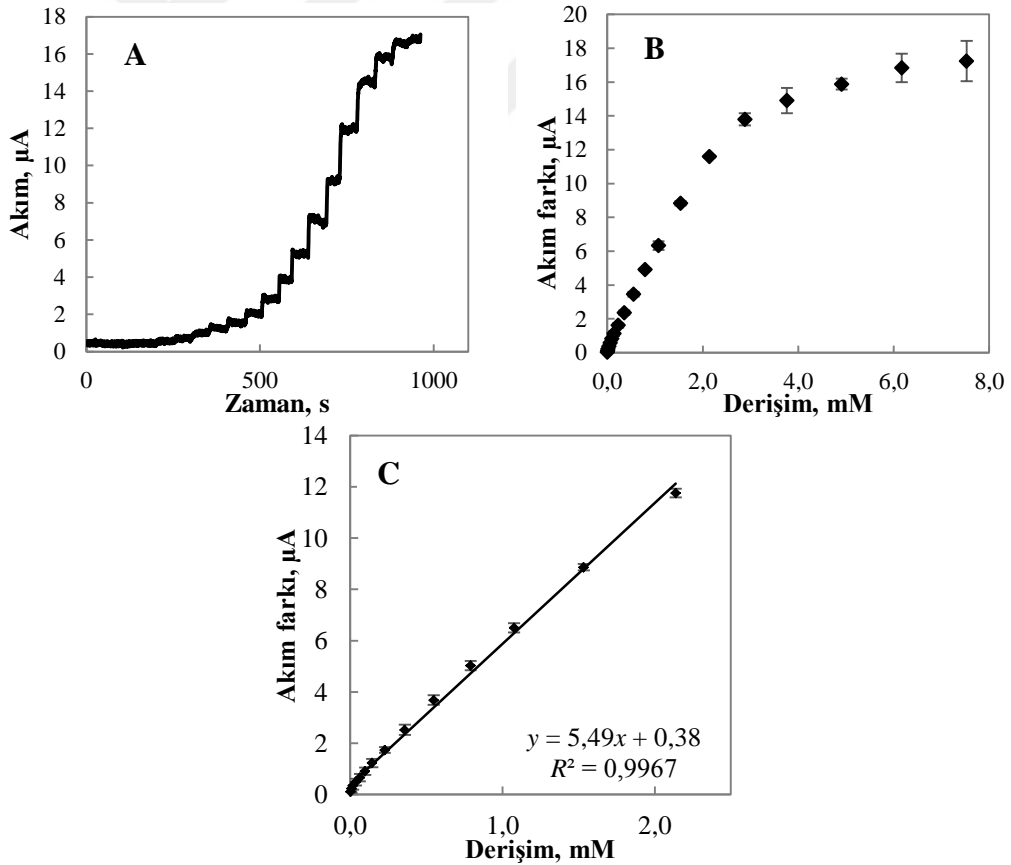


Şekil 4.34 A. GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE’nin çeşitli tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları ve B. pik akımlarının tarama hızının karekökü ile değişimi (0,10 M KCl içeren 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde)

4.3.4 Performans faktörleri

4.3.4.1 Doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı ve duyarlık

GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin cevabına glukoz derişiminin etkisini belirlemek amacıyla, kronoamperometrik yöntem ile ard arda glukoz ilavelerinden sonra akım cevapları ölçüldü (Şekil 4.35.A). Her bir ilaveden sonraki akım farkları derişime karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.35.B) ve kalibrasyon grafikleri çizildi (Şekil 4.35.C). Bu grafiklerden yararlanılarak GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin doğrusal çalışma aralığı ve duyarlığı sırasıyla $3,0 \times 10^{-6} - 2,1 \times 10^{-3}$ M ve $5,49 \mu\text{A mM}^{-1}$ ($77,32 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$) olarak belirlendi. Biyosensörün gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) ise Bölüm 3.7.2'de anlatıldığı gibi hesaplandı ve sırasıyla $2,2 \times 10^{-6}$ M ve $7,4 \times 10^{-6}$ M olarak bulundu.



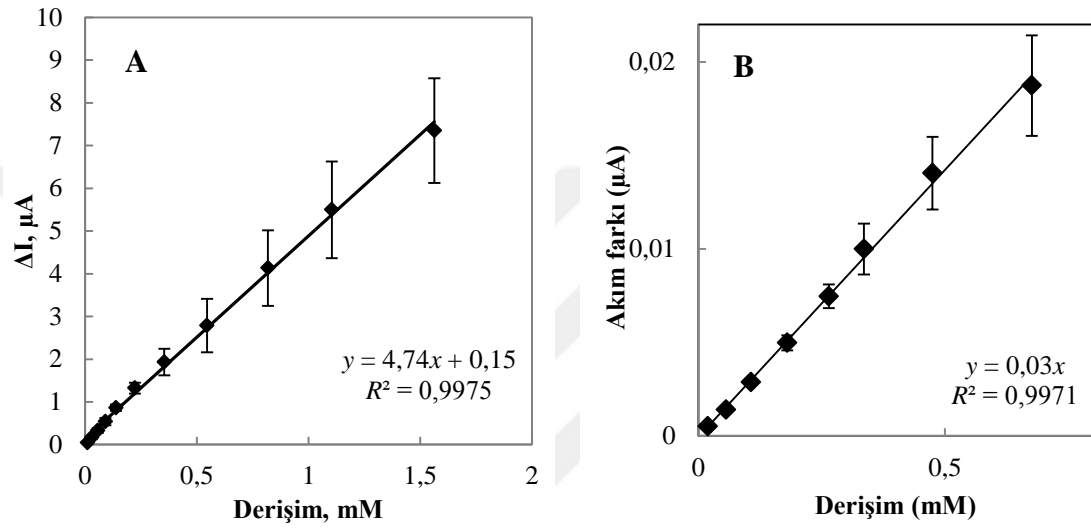
Şekil 4.35 GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE cevabına glukoz derişiminin etkisi A. Akım-zaman grafiği. B. Akım farkı-derişim grafiği ve C. kalibrasyon grafiği (N=3; 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,70 V)

Çalışmada GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE için bulunan duyarlık, literatürde Fe₃O₄ nanomalzemeleri ile glukoz tayini için hazırlanan birçok biyosensörden yüksektir: 1,74 µA mM⁻¹ (Lu ve Chen 2006), 9,30 µA mM⁻¹ cm⁻² (Kaushik vd. 2008), 11,54 µA mM⁻¹ cm⁻² (Yang vd. 2009), 58,9 µA mM⁻¹ cm⁻² (Baby vd. 2010); 62,45 µA mM⁻¹ cm⁻² (Wang vd. 2012); 0,436 µA mM⁻¹ (Jedrzak vd. 2018); 2,65 µA mM⁻¹ (Wang vd. 2018); bazılarına ise çok yakındır: 5,90 µA mM⁻¹ (Pakapongpan ve Poo-arporn, 2017). Literatürde Fe₃O₄ nanomalzemeleri ile hazırlanarak daha yüksek duyarlık elde edilen çalışmalar da mevcuttur: 7,50 µA mM⁻¹ (Li vd. 2010); 110 µA mM⁻¹ cm⁻² (Zou vd. 2010); 92,14 µA mM⁻¹ cm⁻² (Chen vd. 2011); 115,3 µA mM⁻¹ cm⁻² (He vd. 2016) ve 16,0 µA mM⁻¹ cm⁻² (Hou vd. 2018). Sonuç olarak, GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE biyosensörünün, literatür ile karşılaştırılabilecek duyarlılığa sahip olduğu görüldü.

Bu çalışmada GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE için elde edilen LOD değeri, literatürde verilen Fe₃O₄ nanomalzemeleri ile glukoz tayini için hazırlanan diğer bazı biyosensörden düşüktür: 5,0×10⁻⁴ M (Kaushik vd. 2008), 1,0×10⁻⁵ M (Chen vd. 2011), 3,2×10⁻⁶ M (Qui vd. 2007), 6,0×10⁻⁶ M (Yang vd. 2009), 6,5×10⁻⁶ M (Peng vd. 2013) ve 3,5×10⁻⁶ M (He vd. 2016); bazılarına çok yakındır: 2,0×10⁻⁶ M (Li vd. 2010); bazılarında ise yüksektir: 3,3×10⁻⁷ M (Zou vd. 2010) ve 2,3×10⁻⁷ M (Wang vd. 2012). Doğrusal çalışma aralığının ise, glukoz tayini için literatürdeki Fe₃O₄ nanomalzemeleri ile hazırlanan biyosensörlerin bazıları için elde edilen doğrusal çalışma aralığından daha geniş olduğu görüldü: 1,0×10⁻⁵ – 4,0×10⁻³ M (Qiu vd. 2007), 5,0×10⁻⁵ – 1,0×10⁻³ M (Chen vd. 2011), 2,0×10⁻⁵ – 1,9×10⁻³ M (Peng vd. 2013) ve 5,0×10⁻⁵ – 1,0×10⁻³ M (Pakapongpan ve Poo-arporn, 2017). Hazırladığımız biyosensörün çalışma aralığının genel olarak literatürde verilenlere göre daha geniş; LOD değerinin de oldukça düşük olduğu görüldü.

Ayrıca, GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin 2²-faktöriyel MKT ile optimizasyonu ile elde edilen Fe₃O₄NP ve c-MWCNT'nin optimum miktarları ile hazırlanan modifiye elektrotlara GOx immobilize edilmesi ile hazırlanan A. GOx/c-MWCNT/GCE ve B. GOx/Fe₃O₄NP/GCE'nin kalibrasyon grafikleri Şekil 4.36'da verildi. GOx/c-MWCNT/GCE için doğrusal çalışma aralığı 1,0×10⁻⁵ – 1,6×10⁻³ M ve duyarlık 4,74 µA mM⁻¹; GOx/Fe₃O₄NP/GCE için ise doğrusal çalışma aralığı 2,0×10⁻⁵ – 6,8×10⁻⁴ M ve

duyarlık $0,03 \mu\text{A mM}^{-1}$ olarak belirlendi. Bu biyosensörlerin duyarlıklarının, $\text{GOx/Fe}_3\text{O}_4\text{NP-c-MWCNT/GCE}$ 'nin duyarlılığından daha düşük; çalışma aralığının ise daha dar olduğu görüldü. Bu durum, c-MWCNT ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ 'in bir arada bulunduğu biyosensörün performansını olumlu yönde etkilediği şeklinde yorumlanabilir. Bu kalibrasyon grafiklerinde hata çubuklarının, $\text{GOx/Fe}_3\text{O}_4\text{NP-c-MWCNT/GCE}$ 'ye ait kalibrasyon eğrisindekilerden çok daha büyük olması da bu durumu desteklemektedir.



Şekil 4.36 Kalibrasyon grafikleri A. GOx/c-MWCNT/GCE ve B. $\text{GOx/Fe}_3\text{O}_4\text{NP/GCE}$ ($N=3$; $0,025 \text{ M}$ pH 8,0 fosfat tamponu, $+0,70 \text{ V}$)

4.3.4.2 Cevap süresi

$\text{GOx/Fe}_3\text{O}_4\text{NP-c-MWCNT/GCE}$ için çizilen kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kullanılan $i-t$ grafiklerinden yararlanılarak biyosensörün cevap süresi hesaplandı ve 20 s olarak belirlendi. Bu sürenin glukoz tayini için iyi bir süre olduğu düşünüldü.

4.3.4.3 Michaelis-Menten sabiti (K_M)

Michaelis-Menten sabitini (K_M) belirlemek için, Bölüm 3.7.4'te anlatıldığı gibi Lineweaver-Burk grafiği ($1/[\text{Glukoz}]-1/[\Delta i]$) çizildi. Bu grafikten $\text{GOx/Fe}_3\text{O}_4\text{NP-c-MWCNT/GCE}$ için K_M değeri $0,40 \text{ mM}$ olarak hesaplandı. Literatürde Fe_3O_4 nanomalzemeleri ile glukoz tayini için hazırlanan biyosensörler ile bulunan bazı K_M

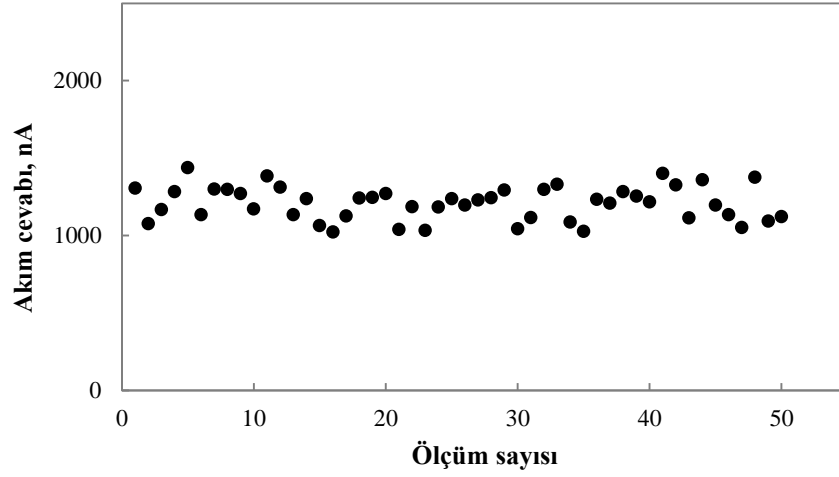
değerleri 0,611 mM (Yang vd. 2009), 9,0 mM (Li vd. 2010), 13 mM (Baby vd. 2010), 13,02 mM (Wang vd. 2012), 1,67 mM (Peng vd. 2013) ve 27 mM (Jędrzak vd. 2018) olarak rapor edilmiştir. Literatürde verilen bu değerler ile bu çalışmada bulunan K_M değeri karşılaştırıldığında, bulunan değerlerin literatürde verilen değerlerden düşük olması, enzimin substrata ilgisinin yüksek olduğunu; GOx'ın aktivitesinin immobilizasyon sonrasında da önemli ölçüde azalmadığını gösterir (Yang vd. 2009). Literatürde bulunan daha küçük K_M değerleri mevcuttur: 0,141 mM (Kaushik vd. 2008) ve 0,16 mM (Pakapongpan ve Poo-arporn, 2017). Farklı modifikasyon ve immobilizasyon yöntemleri, bu değeri düşürebilir.

4.3.4.4 Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik

Bölüm 3.7.5'te anlatıldığı gibi, GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE ile arda arda üç kalibrasyon eğrisi çizilerek elde edilen eğrilerin duyarlıklarından, BSS %3,0 olarak bulundu. Aynı şartlarda üç farklı GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE hazırlandı ve biyosensörün tekrar üretilebilirliği Bölüm 3.7.6'da anlatıldığı gibi belirlendi. Üç farklı GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE ile çizilen kalibrasyon eğrilerinin duyarlıklarından hesaplanan BSS %1,6 olarak bulundu. Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik için BSS değerlerinin düşük olması, GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin yüksek bir tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirliğe sahip olduğunu gösterdi.

4.3.4.5 Kararlılık

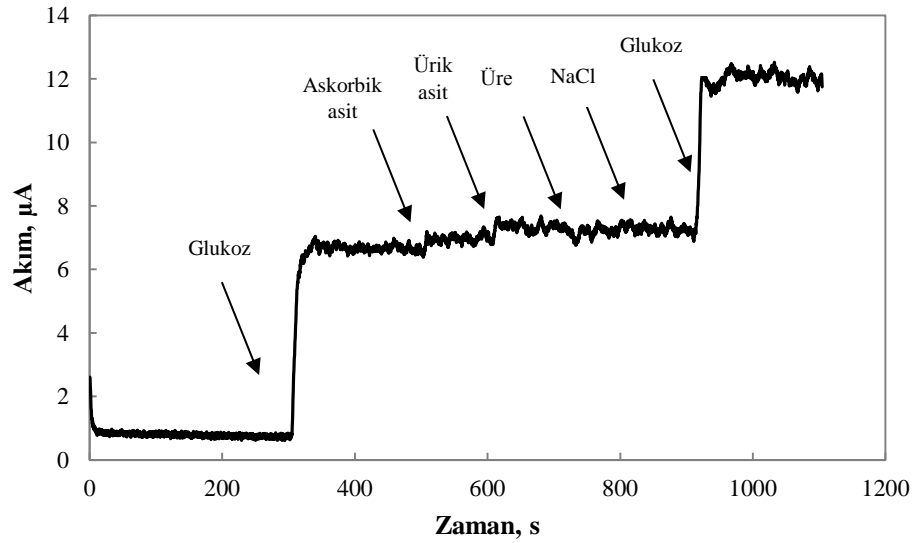
GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE biyosensörünün kararlılığı, Bölüm 3.7.8'de anlatıldığı gibi, GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin optimum çalışma koşullarında sabit glukoz derişiminde ard arda ölçümler ile amperometrik akım cevabı ölçülerek belirlendi (Şekil 4.37). GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin glukoz cevabının, 50 ölçüm süresince elde edilen bağıl standart sapması %9,0 olarak hesaplandı. Biyosensörün iyi bir kararlılık gösterdiği görüldü.



Şekil 4.37 GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin kararlılığı

4.3.4.6 Bozucu türlerin etkisi

GOx/Fe₃O₄-c-MWCNT/GCE'nin substrat seçiciliğini belirlemek için askorbik asit, ürik asit, üre ve NaCl'nin biyosensörlerin cevabına etkisi, Bölüm 3.7.9'da anlatıldığı gibi, belirlendi (Şekil 4.38). Askorbik asit, ürik asit, üre ve NaCl'nin GOx/Fe₃O₄-c-MWCNT/GCE'nin cevabına sırası ile %2,9, %4,6, %0,9 ve -%2,0 girişim yaptığı belirlendi. Bu sonuçlar, biyosensörün cevabına biyolojik sıvılarda yaygın olarak bulunan bozucu türlerin önemli bir etkisinin olmadığını gösterdi.



Şekil 4.38 GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE'nin cevabına bozucu türlerin etkisi

4.4 GOx/SnO₂NP-c-MWCNT/GCE ile İlgili Çalışmalar

4.4.1 Elektrot yüzey bileşiminin optimizasyonu

GOx/SnO₂NP-c-MWCNT/GCE biyosensörünün hazırlanmasında kullanılan SnO₂NP ve c-MWCNT miktarlarının, 2²-faktöriyel MKT ile belirlenmesi amacıyla, Çizelge 3.11'de verilen deneysel veriler %95 güven seviyesinde ANOVA ile incelendi ve Çizelge 4.9'da verildi. Modelin anlamlılığını belirlemek için yapılan Fisher *F* testinde, *F* değeri 11,26; *p* değeri 0,0030 olarak bulundu. Sonuçlar modelin anlamlı olduğunu gösterdi ve modelde A (*p*=0,0168), A² (*p*=0,0005) ve B²'nin (*p*=0,0141) anlamlı terimler olduğu bulundu. Anlamlı olmayan terimler çıkarıldığında amperometrik akım cevabı (nA) ile bağımsız değişkenler arasındaki matematiksel model, aşağıdaki gibi ikinci dereceden bir eşitlik ile verilir:

$$Y = 6105,98 + 870,97[\text{c-MWCNT}] - 1824,66[\text{c-MWCNT}]^2 - 971,36 [\text{SnO}_2\text{NP}]^2$$

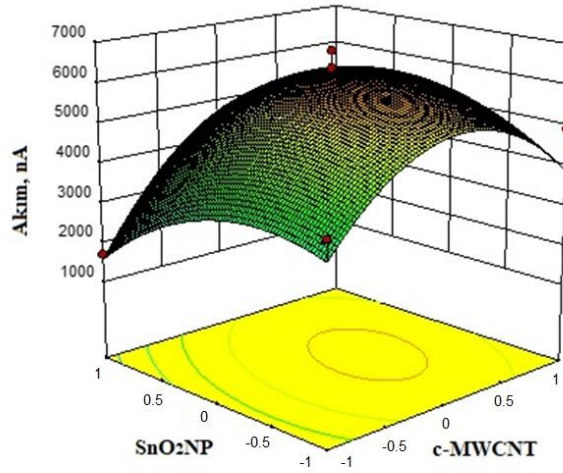
Modelin deneysel verilere uygun olup olmadığı uyumsuzluk testi ile incelendi. Çizelge 4.9'da uyumsuzluk değerinin 0,0760 (*p*>0,05) olarak bulunması modelin %95 güven seviyesinde deneysel verilere uygulanmasının uygun olduğunu gösterdi. *R*² değeri (0,8894) de elektrot cevabının model ile uyumlu olduğunu gösterdi.

Çizelge 4.9 c-MWCNT-SnO₂NP için 2²-faktöriyel MKT verileri ile ANOVA

Kaynak	β	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i> değeri	<i>P</i> değeri	
Model	6105,98	3,502×10 ⁷	5	7,005×10 ⁶	11,26	0,0030	anlamlı
A	870,97	6,069×10 ⁶	1	6,069×10 ⁶	9,76	0,0168	anlamlı
B	-288,03	6,637×10 ⁵	1	6,637×10 ⁵	1,07	0,3360	
AB	575,28	1,324×10 ⁶	1	1,324×10 ⁶	2,13	0,1880	
A ²	-1824,66	2,316×10 ⁷	1	2,316×10 ⁷	37,24	0,0005	anlamlı
B ²	-971,36	6,564×10 ⁶	1	6,564×10 ⁶	10,55	0,0141	anlamlı
Artık		4,354×10 ⁶	7	6,220×10 ⁵			
Uyumsuzluk		3,444×10 ⁶	3	1,148×10 ⁶	5,04	0,0760	anlamlı değil
Saf hata		9,102×10 ⁵	4	2,276×10 ⁵			
Toplam kor.		3,938×10 ⁷	12				
<i>R</i>² = 0,8894							

SS: kareler toplamı; *df*: serbestlik derecesi; *MS*: kareler ortalaması; *F*_{value} = *MS*_{faktor}/*MS*_{hata}; *P*_{değer}: olasılık seviyesi.

SnO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin yüzey bileşimi optimizasyonunda c-MWCNT ve SnO₂NP miktarlarının +0,70 V'ta 2,0×10⁻⁴ M H₂O₂ çözeltisine verdiği amperometrik cevapla ilişkisini gösteren cevap yüzey eğrisi Şekil 4.39'da verildi. Bu cevap yüzey eğrisi ve ANOVA çizelgesi değerlendirildiğinde, c-MWCNT ve SnO₂NP miktarları ile amperometrik akım cevabı arasındaki ilişkinin bir eğri oluşturduğu ve en yüksek amperometrik cevabın 1 mL kitosan çözeltisinde 24,7 mg c-MWCNT ve 19,8 mg SnO₂NP bulunduğu görüldü ve bu miktarlar elektrot yüzey bileşimi için optimum olarak belirlendi.

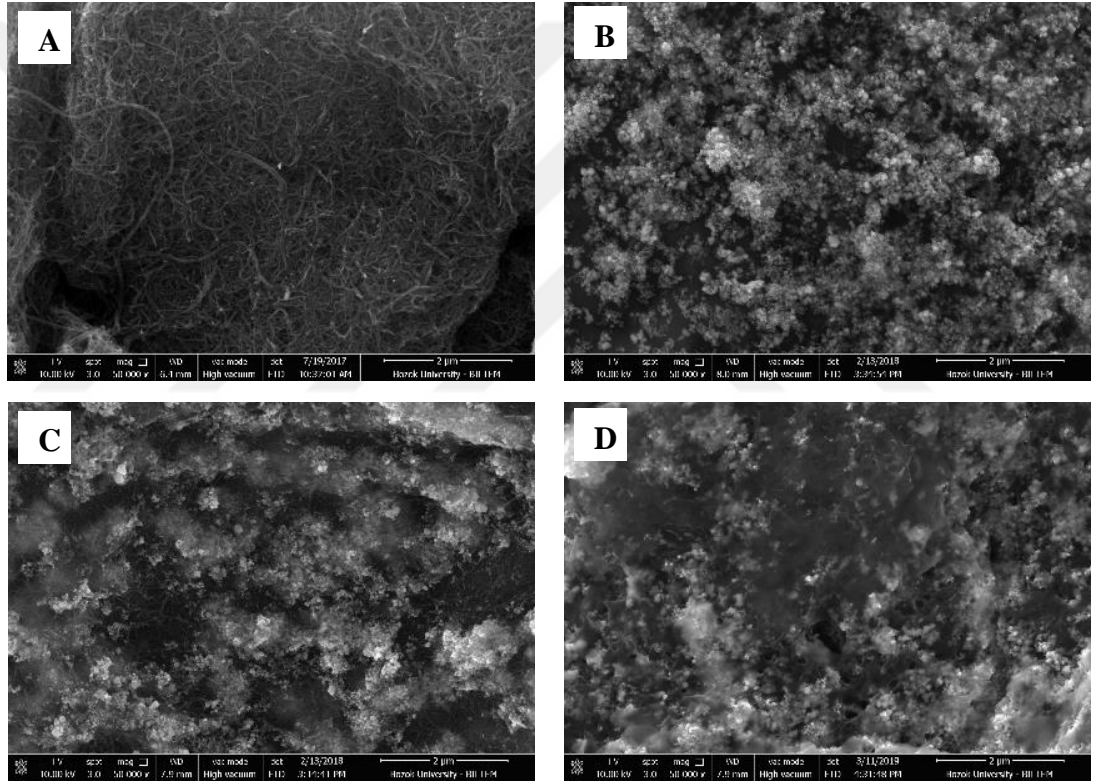


Şekil 4.39 SnO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin yüzey bileşimi optimizasyonunda elde edilen cevap yüzey eğrisi (+0,70 V ve 2,0×10⁻⁴ M H₂O₂ içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde)

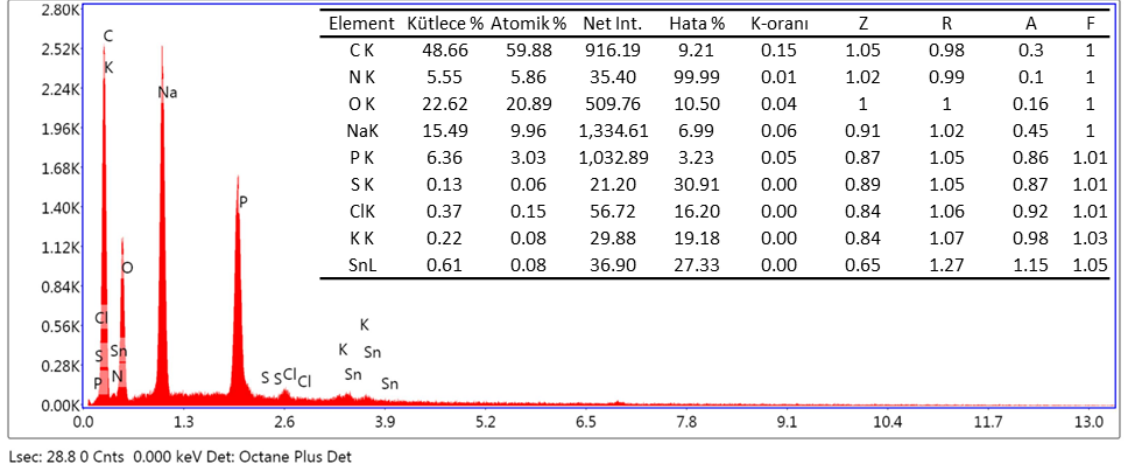
4.4.2 Yüzey karakterizasyonu

GOx/SnO₂NP-c-MWCNT/GCE'lerin hazırlanmasında kullanılan nanomalzemelerin yüzey morfolojisine etkisi SEM yöntemi ile belirlendi. Şekil 4.40'ta (A) c-MWCNT/GCE, (B) SnO₂NP/GCE, (C) SnO₂NP-c-MWCNT/GCE ve (D) GOx/SnO₂NP-c-MWCNT/GCE için SEM görüntüleri verildi. Şekil incelendiğinde, Görüntü A'da c-MWCNT'nin iplikli yapısı; Görüntü B'de SnO₂NP'nin tanecikli yapısı ve Görüntü C'de ikisinin bir arada bulunduğu iplikli ve tanecikli yapı açık bir şekilde görülmektedir. Ayrıca SnO₂NP ve c-MWCNT'nin yüzeyde homojen biçimde dağıldığı

ve elde edilen gözenekli yüzey morfolojisinin de enzim immobilizasyonuna uygun olduğu düşünüldü. GOx'ın yapıya katılmasıyla elde edilen görüntü Şekil 4.40.C'de verildi ve SnO₂NP-c-MWCNT kompozitinin gözenekli yüzeyi üzerinde görülen tabaka halindeki yapı, GOx'ın başarılı bir şekilde modifiye elektrot yüzeyine immobilize olduğu düşünüldü. Şekil 4.41, GOx/SnO₂NP-c-MWCNT kompozitinin elemental bileşimini belirlemek amacıyla yapılan EDX sonuçlarını göstermektedir. Spektrumda ve çizelgede kompozitin içeriğinde bulunan Sn, K, Cl, S, P, Na, O, N ve C elementlere ait veriler, GCE yüzeyinin GOx, SnO₂NP ve c-MWCNT ile başarılı bir şekilde modifiye edildiğini göstermektedir.



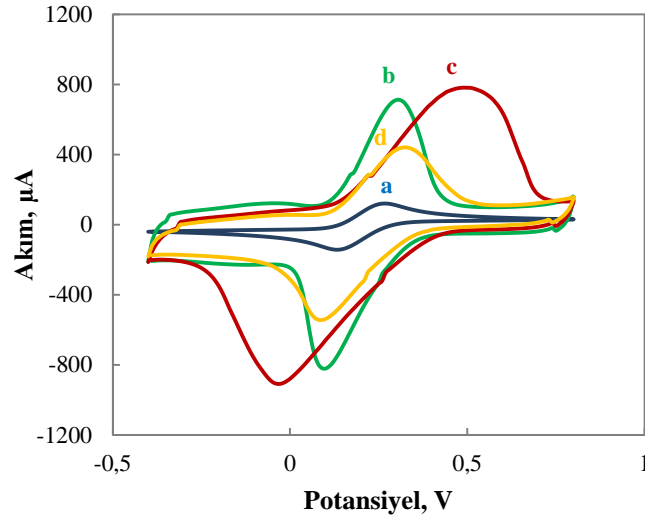
Şekil 4.40 SEM görüntüleri: (A) c-MWCNT/GCE, (B) SnO₂NP/GCE, (C) SnO₂NP-c-MWCNT/GCE ve (D) GOx/ SnO₂NP-c-MWCNT/GCE



Şekil 4.41 GOx/SnO₂NP-c-MWCNT/GCE için EDX spektrumu ve elementel bileşim çizelgesi

4.4.3 Elektrokimyasal karakterizasyon

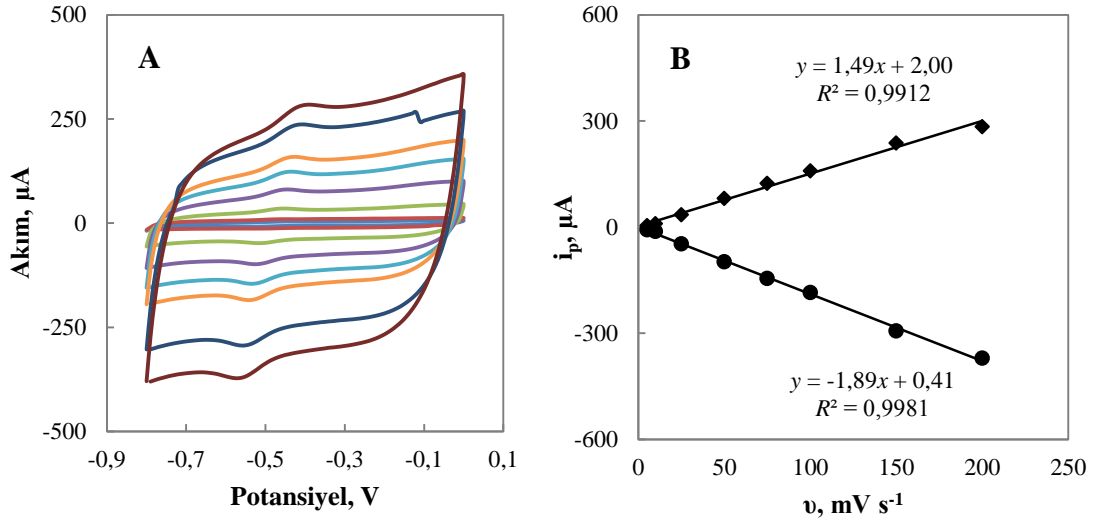
GOx/SnO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin hazırlanması sırasında elektrot yüzeyine modifiye edilen her bir malzemenin elektrokimyasal davranışını belirlemek amacıyla, (a) SnO₂NP/GCE, (b) c-MWCNT/GCE, (c) SnO₂NP-c-MWCNT/GCE ve (d) GOx/SnO₂NP-c-MWCNT/GCE'lerin, 50 mV s⁻¹ tarama hızında redoks probunda CV'leri kaydedildi ve Şekil 4.42'de verildi. Şekil incelendiğinde, SnO₂NP/GCE'nin (eğri a) pik akımının, c-MWCNT/GCE'nin (eğri b) pik akımından düşük olduğu; ancak ikisinin bir arada bulunduğu SnO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin (eğri c) oldukça yüksek pik akımına sahip olduğu görüldü. Bunun da, bu iki türün bir arada, elektron aktarımını iyileştirmelerinden kaynaklandığı düşünüldü. GOx/SnO₂NP-c-MWCNT/GCE'ye ait eğride (eğri d) pik akımlarının düşmesi, GOx'ın büyük moleküllü ve yalıtkan yapısının, iletkenliği düşürmesinden kaynaklandığı düşünüldü.



Şekil 4.42 Dönüşümlü voltamogramlar: (a) SnO₂NP/GCE, (b) c-MWCNT/GCE, (c) SnO₂NP-c-MWCNT-/GCE ve (d) GOx/SnO₂-c-MWCNT/GCE (50 mV s⁻¹ tarama hızında 0,10 M KCl içeren 5,0 mM Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks probunda)

GOx/SnO₂-c-MWCNT/GCE'nin farklı tarama hızlarındaki elektrokimyasal davranışını incelemek için, bu biyosensörün çalışılan tampon çözelti ortamında 5-200 mV s⁻¹ arasındaki tarama hızında CV'leri kaydedildi ve Şekil 4.43.A'da verildi. Bu grafiklerde elde edilen anodik ve katodik pik akımlarının tarama hızına karşı değişimi ise Şekil 4.43.B'de verildi. Şekil 4.43.A'daki CV'lerden ve Laviron eşitliğinden yararlanılarak, Bölüm 4.1.3'te anlatıldığı şekilde belirlenen k_s değeri; 50, 75, 100 ve 150 mV s⁻¹ tarama hızlarında ortalama $0,48 \pm 0,02$ s⁻¹ olarak hesaplandı.

Şekil 4.43.B'de görülen, anodik ve katodik pik akımlarının tarama hızına karşı değişimin doğrusal olması, elektrot yüzeyindeki elektron aktarım mekanizmasının yüzey kontrollü olduğunu göstermektedir. Bölüm 4.1.3'te anlatıldığı şekilde, katodik pik akımları ile tarama hızı arasındaki doğrusal eşitlik kullanılarak, SnO₂-c-MWCNT/GCE yüzeyine immobilize edilen GOx miktarı (Γ), $7,14 \times 10^{-9}$ mol cm⁻² olarak hesaplandı.

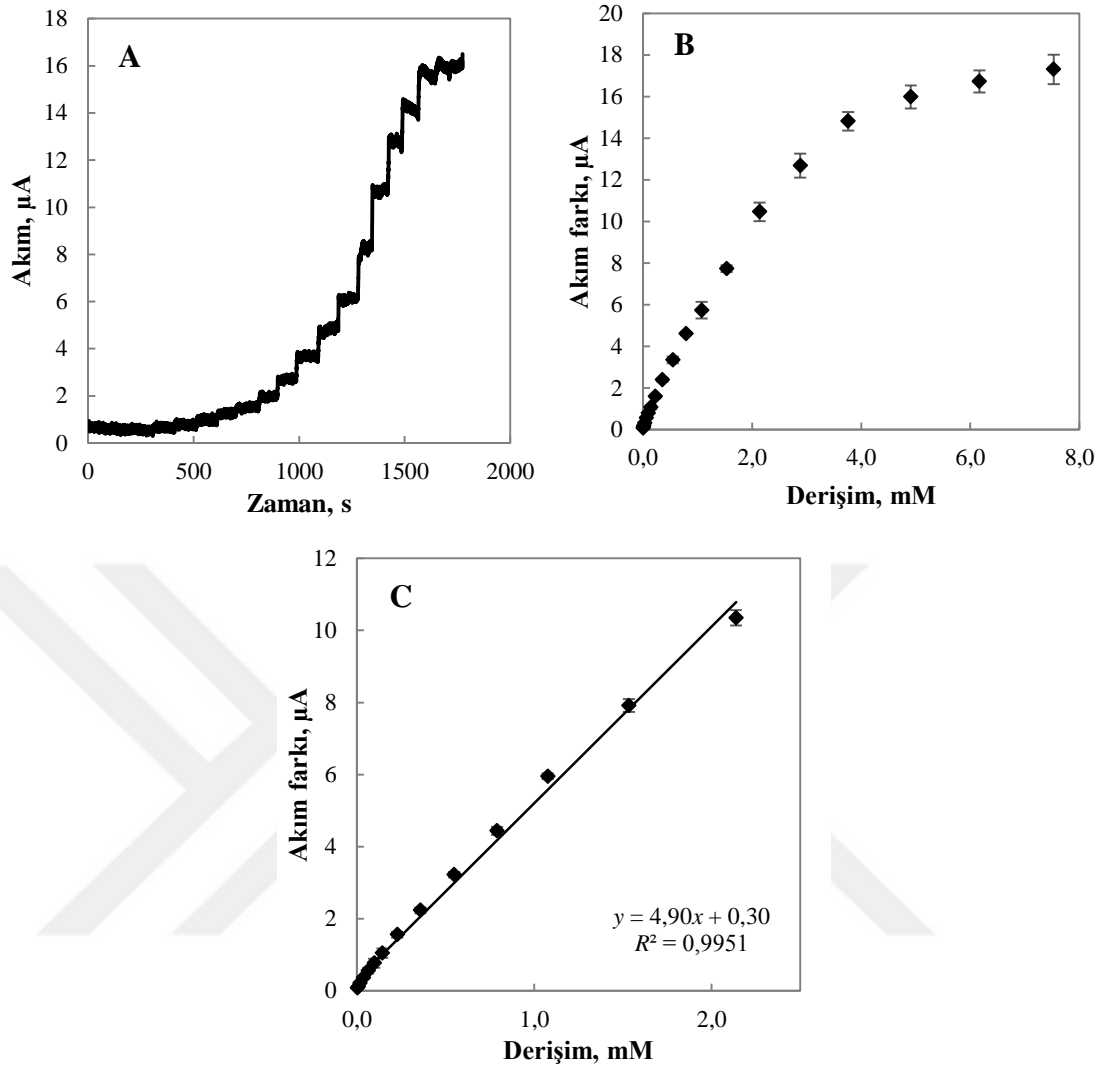


Şekil 4.43 A. GOx/SnO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin çeşitli tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları ve B. pik akımlarının tarama hızı ile değişimi (0,10 M KCl içeren 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde)

4.4.4 Performans faktörleri

4.4.4.1 Doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı ve duyarlık

GOx/SnO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin glukoz cevabını belirlemek amacıyla, pH 8,0 olan fosfat tampon çözeltisine ard arda glukoz ilaveleri yapılarak akım cevapları kronoamperometrik yöntem ile ölçüldü (Şekil 4.44.A). Her bir ilaveden sonraki akım farkları derişime karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.44.B). Elde edilen kalibrasyon grafiklerinden (Şekil 4.44.C) yararlanılarak GOx/SnO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin doğrusal çalışma aralığı ve duyarlığı sırasıyla $3,0 \times 10^{-6} - 2,1 \times 10^{-3}$ M ve $4,90 \mu\text{A mM}^{-1}$ ($69,01 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$) olarak belirlendi. Biyosensörün LOD değeri $2,5 \times 10^{-6}$ M ve LOQ değeri $8,4 \times 10^{-6}$ M olarak hesaplandı.

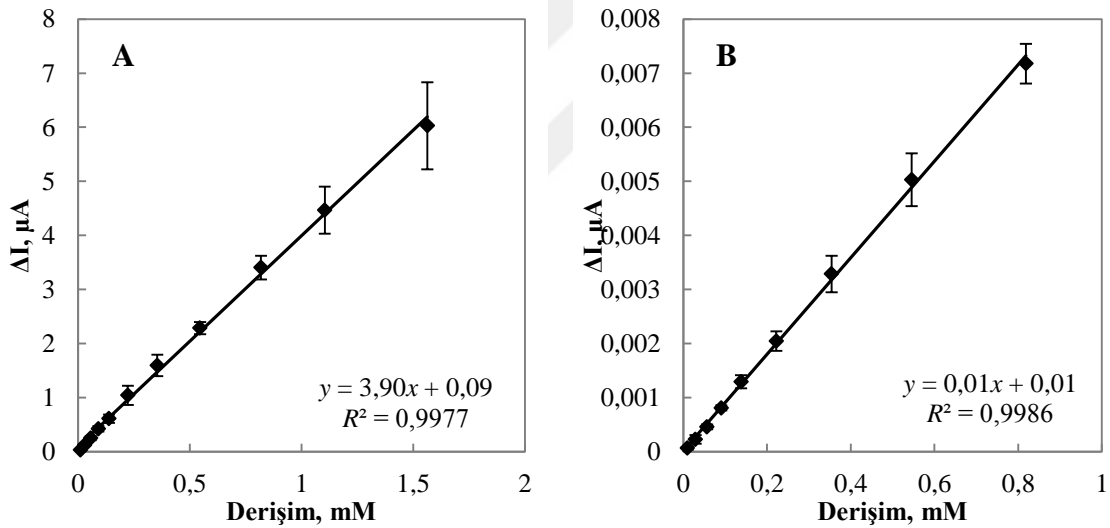


Şekil 4.44 GOx/SnO₂NP-c-MWCNT/GCE cevabına glukoz derişiminin etkisi A. Akım-zaman grafiği. B. Akım farkı-derişim grafiği ve C. kalibrasyon grafiği ($N=3$; 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,70 V)

Literatürde SnO₂ nanomalzemeleri ile glukoz tayini için hazırlanan biyosensörlerde duyarlık değeri verilmediği için karşılaştırma yapılmamıştır. Bu çalışmada bulunan doğrusal çalışma aralığının, glukoz tayini için literatürdeki SnO₂ nanomalzemeleri ile hazırlanan biyosensörler için elde edilen doğrusal çalışma aralığından daha geniş olduğu görüldü: $4,0 \times 10^{-3} - 2,4 \times 10^{-2}$ M (Liv vd. 2009) ve $5,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$ M (Alim vd. 2019). GOx/SnO₂NP-c-MWCNT/GCE ile elde edilen LOD değerin de literatürde verilenlerden daha düşük ($5,0 \times 10^{-6}$ M (Liv vd. 2009)) veya bu değere yakın olduğu ($1,8 \times 10^{-6}$ M (Alim vd. 2019)) görüldü. Sonuç olarak, glukoz tayini için, SnO₂ nanomalzemeleri ile ilgili az sayıda biyosensör çalışması olduğundan; GOx/SnO₂NP-c-

MWCNT/GCE ile düşük bir LOD değeri ve literatürde verilenlerden daha geniş bir çalışma aralığı elde edildiğinden, literatüre katkı sağlanabileceği düşünüldü.

Ayrıca, c-MWCNT ve SnO₂NP'nin optimum miktarları ile hazırlanan modifiye elektrotlara GOx immobilize edilmesi ile hazırlanan A. GOx/c-MWCNT/GCE ve B. GOx/SnO₂NP/GCE'nin kalibrasyon grafikleri Şekil 4.45'te verildi. GOx/c-MWCNT/GCE için doğrusal çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-5} - 1,6 \times 10^{-3}$ M ve duyarlık $3,90 \mu\text{A mM}^{-1}$; GOx/SnO₂NP/GCE için ise doğrusal çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-5} - 8,2 \times 10^{-4}$ M ve duyarlık $0,01 \mu\text{A mM}^{-1}$ olarak belirlendi. Bu biyosensörlerin glukozu GOx/SnO₂NP-c-MWCNT/GCE biyosensöründen daha düşük bir duyarlık göstermesi, iki modifikasyon malzemesinin bir arada kullanılmasının, biyosensörün cevabına olumlu bir etki yaptığı şeklinde yorumlandı.



Şekil 4.45 Kalibrasyon grafikleri A. GOx/c-MWCNT/GCE ve B. GOx/SnO₂NP/GCE (N=3; 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu +0,70 V)

4.4.4.2 Cevap süresi

Cevap süresi, GOx/SnO₂NP-c-MWCNT/GCE için çizilen kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kullanılan *i-t* grafiklerinden yararlanılarak 20 s olarak hesaplandı. Bu sürenin literatürdeki diğer glukoz biyosensörlerinin cevap süreleri incelendiğinde, uygun olduğu görüldü.

4.4.4.3 Michaelis-Menten sabiti (K_M)

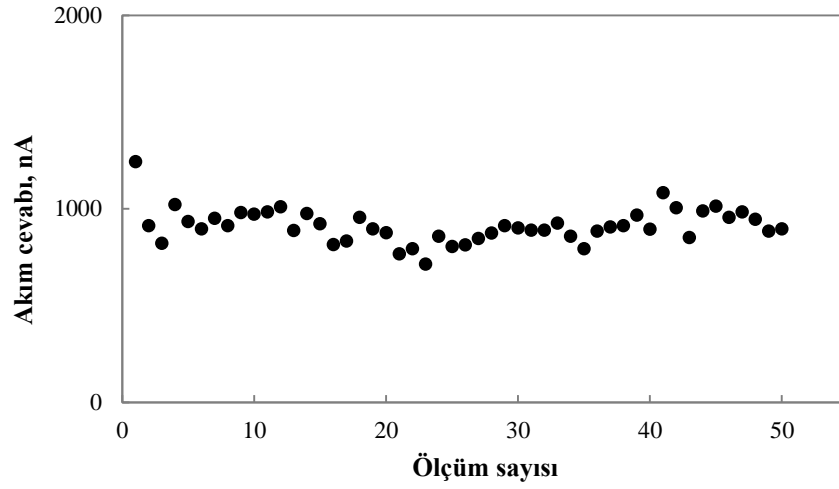
GOx/SnO₂NP-c-MWCNT/GCE biyosensörü için Michaelis-Menten sabiti (K_M) Bölüm 3.7.4'te anlatıldığı şekilde belirlendi ve Lineweaver-Burk grafiğinden ($1/[Glukoz]-1/[\Delta i]$), 0,51 mM olarak hesaplandı. Literatürde, SnO₂ nanomalzemeleri ile hazırlanan biyosensörler için herhangi bir K_M değeri rapor edilmediğinden, karşılaştırma yapılamadı; ancak bu değer pek çok glukoz biyosensörü için verilen değerden daha düşük olduğu görüldü.

4.4.4.4 Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik

GOx/SnO₂NP-c-MWCNT/GCE biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için aynı elektrot ile arda arda üç kalibrasyon eğrisi çizildi. Bu eğrilerin duyarlıklarından, BSS %0,9 olarak bulundu. Bu sonuç, biyosensörün yüksek bir tekrar kullanılabilirliğe sahip olduğunu gösterdi. Biyosensörün tekrar üretilebilirliğini belirlemek için aynı şartlarda üç farklı GOx/SnO₂NP-c-MWCNT/GCE hazırlandı ve her birinin glukoz cevabı ölçülerek kalibrasyon eğrileri çizildi. Eğrilerin duyarlıklarından hesaplanan BSS %0,3 olarak bulundu. Tekrar üretilebilirlik için elde edilen BSS değerinin çok düşük olması, bu biyosensörün yüksek bir hazırlama tekrarlanabilirliğine sahip olduğunu gösterdi.

4.4.4.5 Kararlılık

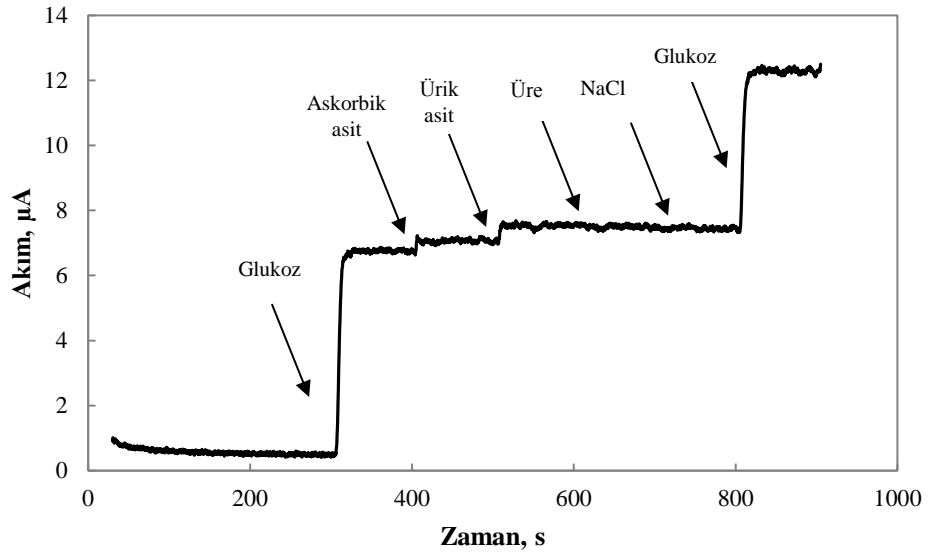
GOx/SnO₂-c-MWCNT/GCE'nin cevabına, kullanım sıklığının etkisini belirlemek için, GOx/SnO₂-c-MWCNT/GCE'nin optimum çalışma koşullarında sabit glukoz derişiminde ard arda ölçümler ile amperometrik akım cevabı ölçüldü. GOx/SnO₂-c-MWCNT/GCE'nin 50 ölçüm boyunca glukoz verdiği amperometrik cevaplar grafiğe geçirildi ve Şekil 4.46'da verildi. Biyosensörün glukoz cevabının, 50 ölçüm süresince elde edilen bağıl standart sapması %9,6 olarak bulunması, bu biyosensörün çok sayıda ölçüm için kararlı cevaplar verdiğinin bir göstergesidir.



Şekil 4.46 GOx/SnO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin kararlılığı

4.4.4.6 Bozucu türlerin etkisi

Biyolojik sıvılarda yaygın bulunan bozucu türlerin GOx/SnO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin cevabına etkisi, Bölüm 3.7.9'da anlatıldığı gibi belirlendi. Bu amaçla 1,00 mM glukoz cevabına, 0,02 mM askorbik asit, ürik asit, üre ve NaCl'nin etkisi, kronoamperometrik yöntem ile çizilen *i-t* grafiğinden yararlanılarak incelendi (Şekil 4.47). Biyosensörün cevabına askorbik asitin %4,0; ürik asitin %6,0; ürenin %0,5 ve NaCl'nin -%1,9 girişim yaptığı belirlendi. Çalışma potansiyeli olarak +0,70 V kullanılmasına rağmen, bozucu türlerin bu kadar düşük girişim etkisi göstermesi, biyosensörün seçiciliğinin yüksek olduğu şeklinde yorumlandı.



Şekil 4.47 GOx/SnO₂NP-c-MWCNT/GCE'nin cevabına bozucu türlerin etkisi

4.5 GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE ile İlgili Çalışmalar

4.5.1 Elektrot yüzey bileşiminin optimizasyonu

GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE biyosensörünün hazırlanmasında kullanılan optimum Fe₂O₃NP ve c-MWCNT miktarları, 2²-faktöriyel MKT yöntemi kullanılarak belirlendi. Bu yöntemin uygulanması için Çizelge 3.11'de verilen deneysel veriler %95 güven seviyesinde ANOVA ile incelendi ve sonuçlar Çizelge 4.10'da verildi. Uygulanan Fisher *F* testi sonucu modelin *F* değeri 13,49, *p* değeri ise 0,0018 olarak bulundu. *p* değerinin oldukça düşük olması modelin anlamlı olduğunu gösterdi. Modelde *A* (*p*=0,0043), *A*² (*p*=0,0011) ve *B*² (*p*=0,0021) anlamlı terimler olarak belirlendi. Bu anlamlı terimler kullanılarak amperometrik akım cevabı (nA) ile bağımsız değişkenler arasındaki matematiksel model, şu şekilde verilebilir:

$$Y = 4652,42 + 733,87[\text{c-MWCNT}] - 1002,81[\text{c-MWCNT}]^2 - 899,66[\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NP}]^2$$

Deneysel verilerin geliştirilen model ile değerlendirilmesinin uygun olup olmadığını belirlemek amacıyla uyumsuzluk değeri incelendi. Çizelge 4.10'da uyumsuzluk değerinin 0,1154 (*p*>0,05) olarak bulunması modelin %95 güven seviyesinde deneysel

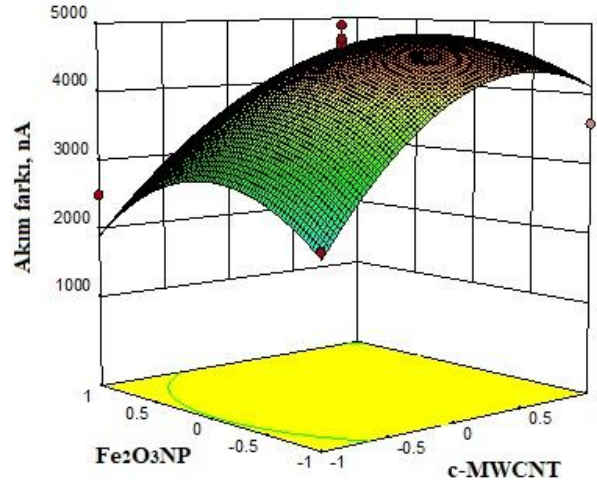
verilere uygulanmasının uygun; elde edilen R^2 değeri (0,9060) de elektrot cevabının model ile uyumlu olduğunu gösterdi.

Çizelge 4.10 c-MWCNT-Fe₂O₃NP için 2²-faktöriyel MKT verileri ile elde edilen ANOVA

Kaynak	β	SS	df	MS	F değeri	P değeri	
Model	4652,42	1,685×10 ⁷	5	3,371×10 ⁶	13,49	0,0018	anlamlı
A	733,87	4,309×10 ⁶	1	4,309×10 ⁶	17,24	0,0043	anlamlı
B	-372,03	1,107×10 ⁶	1	1,107×10 ⁶	4,43	0,0733	
AB	-253,85	2,578×10 ⁵	1	2,578×10 ⁵	1,03	0,3436	
A ²	-1002,81	6,996×10 ⁶	1	6,996×10 ⁶	28,00	0,0011	anlamlı
B ²	-899,66	5,631×10 ⁶	1	5,631×10 ⁶	22,53	0,0021	anlamlı
Artık		1,749×10 ⁶	7	2,499×10 ⁵			
Uyumsuzluk		1,294×10 ⁶	3	4,313×10 ⁵	3,79	0,1154	anlamlı değil
Saf hata		4,552×10 ⁵	4	1,138×10 ⁵			
Toplam kor, R² = 0,9060		1,860×10 ⁷	12				

SS: kareler toplamı; df: serbestlik derecesi; MS: kareler ortalaması; $F_{\text{value}} = MS_{\text{faktor}}/MS_{\text{hata}}$; P değeri: olasılık seviyesi.

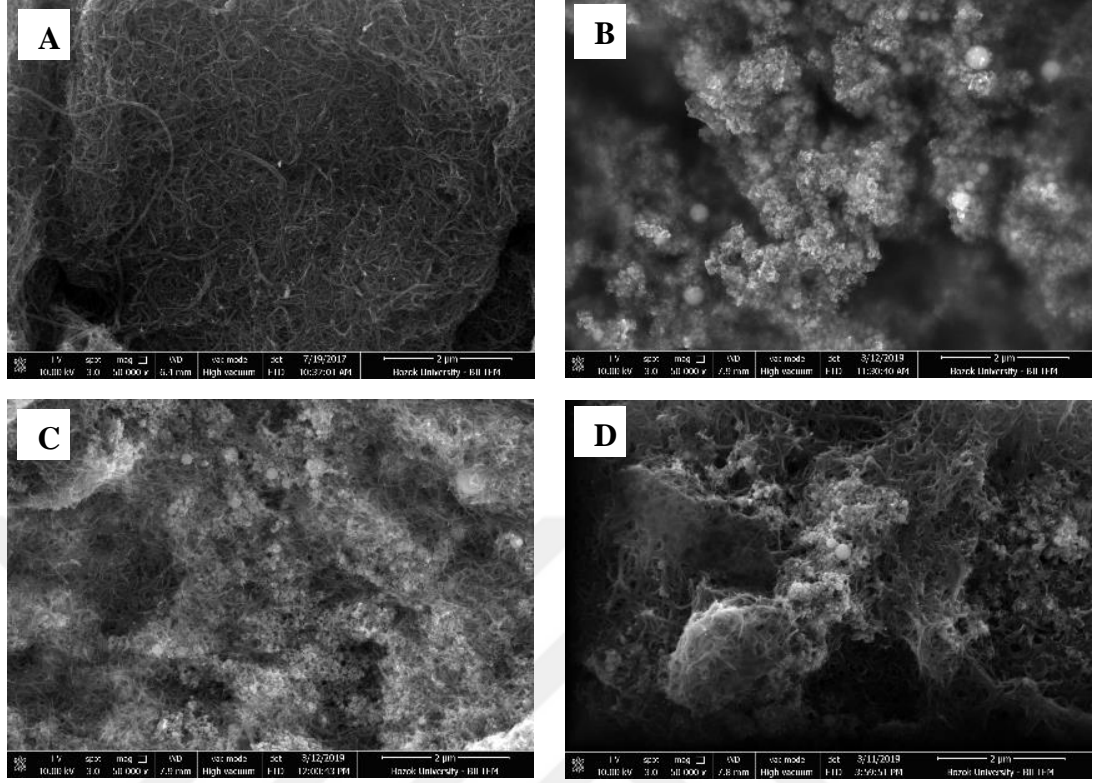
Şekil 4.48, GCE yüzeyini modifiye etmede kullanılan c-MWCNT ve Fe₂O₃NP miktarlarının +0,70 V'ta 2,0×10⁻⁴ M H₂O₂ içeren fosfat tamponu çözeltisine verdiği amperometrik cevapla ilişkisini gösteren cevap yüzey eğrisini göstermektedir. Cevap yüzey eğrisi ve ANOVA çizelgesi değerlendirildiğinde en yüksek amperometrik cevabın 29,0 mg mL⁻¹ c-MWCNT ve 13,3 mg mL⁻¹ Fe₂O₃NP içeren çözelti ile hazırlanan elektrot ile elde edildiği görüldü ve bu değerler elektrot yüzey bileşimi için optimum değerler olarak belirlendi. Bu optimum değerlerle modifiye edilen GCE yüzeyine GOx immobilize edilerek biyosensör hazırlandı ve tüm diğer çalışmalar bu biyosensör ile yapıldı.



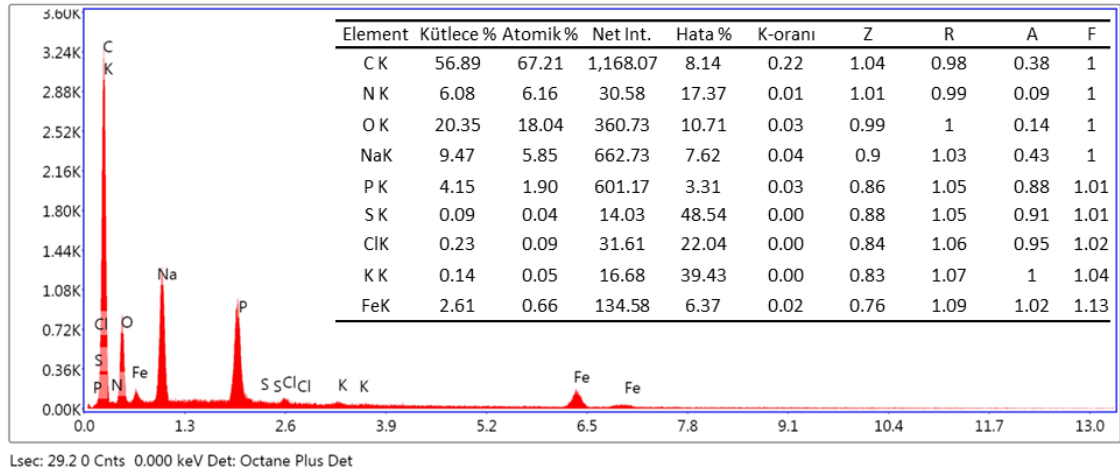
Şekil 4.48 Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin yüzey bileşimi optimizasyonunda elde edilen cevap yüzey eğrisi (+0,70 V ve 2,0×10⁻⁴ M H₂O₂ içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde)

4.5.2 Yüzey karakterizasyonu

GOx, Fe₂O₃NP ve c-MWCNT'lerin, biyosensörün yüzey morfolojisine etkisini incelemek amacıyla alınan (A) c-MWCNT/GCE, (B) Fe₂O₃NP/GCE, (C) Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE ve (D) GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'ye ait SEM görüntüleri Şekil 4.49'da verildi. Bu görüntüler incelendiğinde, Fe₂O₃NP ve c-MWCNT'nin yüzeyde homojen biçimde dağıldığı; c-MWCNT'nin ipliksi ve Fe₂O₃NP'nin tanecikli bir yapıya sahip olduğu görüldü. Görüntü C incelendiğinde, ipliksi ve tanecikli yapıların bir arada bulunması Fe₂O₃NP-c-MWCNT kompozitinin elektrot yüzeyine başarıyla modifiye edildiği, Görüntü D'de gözlenen yüzey morfolojisindeki değişim ise, enzimin elektrot yüzeyine immobilize edildiği şeklinde yorumlandı. GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT kompozitinin elementel bileşimi, EDX ile incelendi ve sonuçlar Şekil 4.50'de verildi. Spektrumda ve çizelgede kompozitin içeriğinde bulunan Fe, K, Cl, S, P, Na, O, N ve C elementlere ait veriler, SEM görüntüleri ile uyumlu bir şekilde modifikasyonun gerçekleştirildiğini gösterdi.



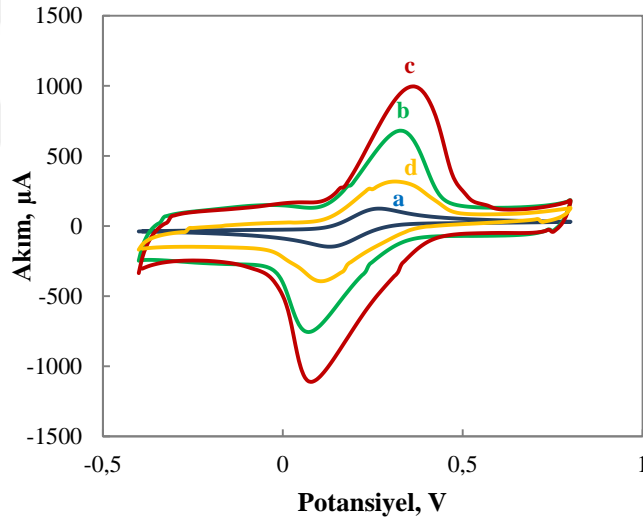
Şekil 4.49 SEM görüntüleri: (A) c-MWCNT/GCE, (B) Fe₂O₃NP/GCE, (C) Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE ve (D) GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE



Şekil 4.50 GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE için EDX spektrumu ve elementel bileşim çizelgesi

4.5.3 Elektrokimyasal karakterizasyon

Modifiye elektrotların elektrokimyasal davranışlarını belirlemek amacıyla, optimum miktarları ile hazırlanmış olan (a) Fe₂O₃NP/GCE, (b) c-MWCNT/GCE, (c) Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE ve (d) GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'lerin CV'leri 50 mV s⁻¹ tarama hızında redoks probunda kaydedildi ve Şekil 4.51'de verildi. Şekilde, c-MWCNT/GCE'nin pik akımının beklenildiği gibi yüksek olduğu; Fe₂O₃NP/GCE'nin pik akımının ise oldukça düşük olmasına rağmen, c-MWCNT ile birlikte kullanıldığında c-MWCNT/GCE'nin pik akımını arttırdığı görüldü. İki malzemenin bir arada olduğu durumda elektronik özelliklerinin iyileşmesinin, biyosensör performansına olumlu yönde etki yapacağı düşünüldü. İletkenliği düşük olan GOx'ın yapıya katılması ile pik akımının düşmesi, GOx'ın immobilizasyonun başarılı olduğu konusundaki düşüncüyü güçlendirdi.



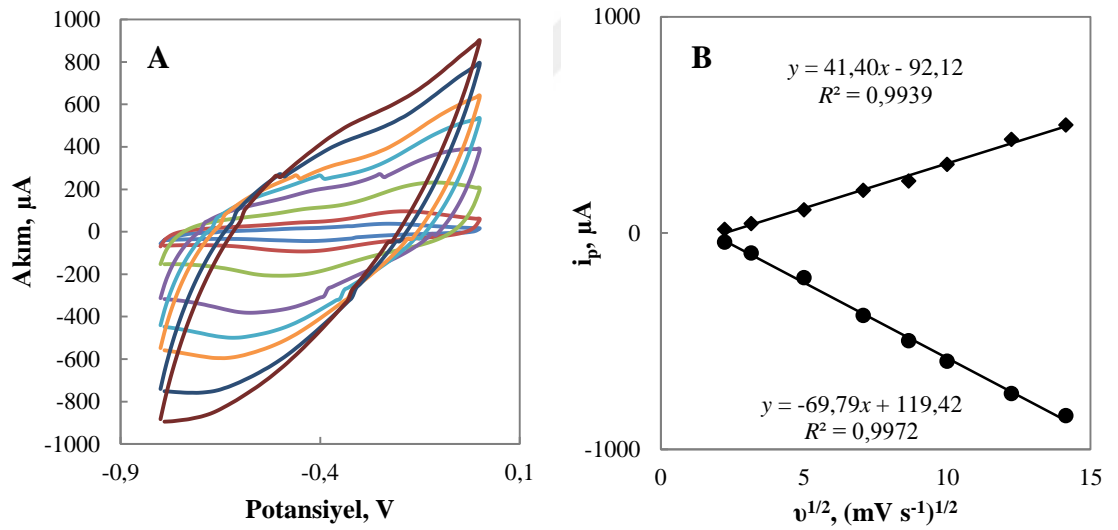
Şekil 4.51 Dönüşümlü voltamogramlar: (a) Fe₂O₃NP/GCE, (b) c-MWCNT/GCE, (c) Fe₂O₃NP-c-MWCNT-/GCE ve (d) GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE (50 mV s⁻¹ tarama hızında 0,10 M KCl içeren 5,0 mM Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks probunda)

Tarama hızının, GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin elektrokimyasal davranışına etkisini belirlemek için, bu biyosensörün çalışılan tampon çözelti ortamında 5 ile 200 mV s⁻¹ arasında çeşitli tarama hızlarında CV'leri incelendi (Şekil 4.52.A). Biyosensörün elektron aktarım hız sabitini belirlemek amacıyla, Bölüm 4.1.3'te anlatılan Laviron

eşitliği ve Şekil 4.52.A'daki veriler kullanıldı. 50, 75, 100 ve 150 mV s⁻¹ tarama hızlarında ortalama k_s 0,10±0,05 s⁻¹ olarak hesaplandı.

Anodik ve katodik pik akımlarının tarama hızının kareköküne karşı değişim grafiği Şekil 4.52.B'de verildi. Bu değişimin doğrusal olması elektrot yüzeyindeki elektrot aktarımının yüzey ve difüzyon kontrollü bir mekanizma ile birlikte yürüdüğünü göstermektedir.

Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE yüzeyine immobilize edilen GOx katmanının derişimini belirlemek amacıyla, Bölüm 4.1.3'te anlatılan Lavironun 2. eşitliği ile, Şekil 4.52.A'daki CV'lerin katodik pik akımlarının tarama hızına karşı doğrusal eşitliğinden ($y = -4,13x - 108,28$; $R^2 = 0,9431$) yararlanıldı ve Γ değeri $1,56 \times 10^{-8}$ mol cm⁻² olarak hesaplandı.



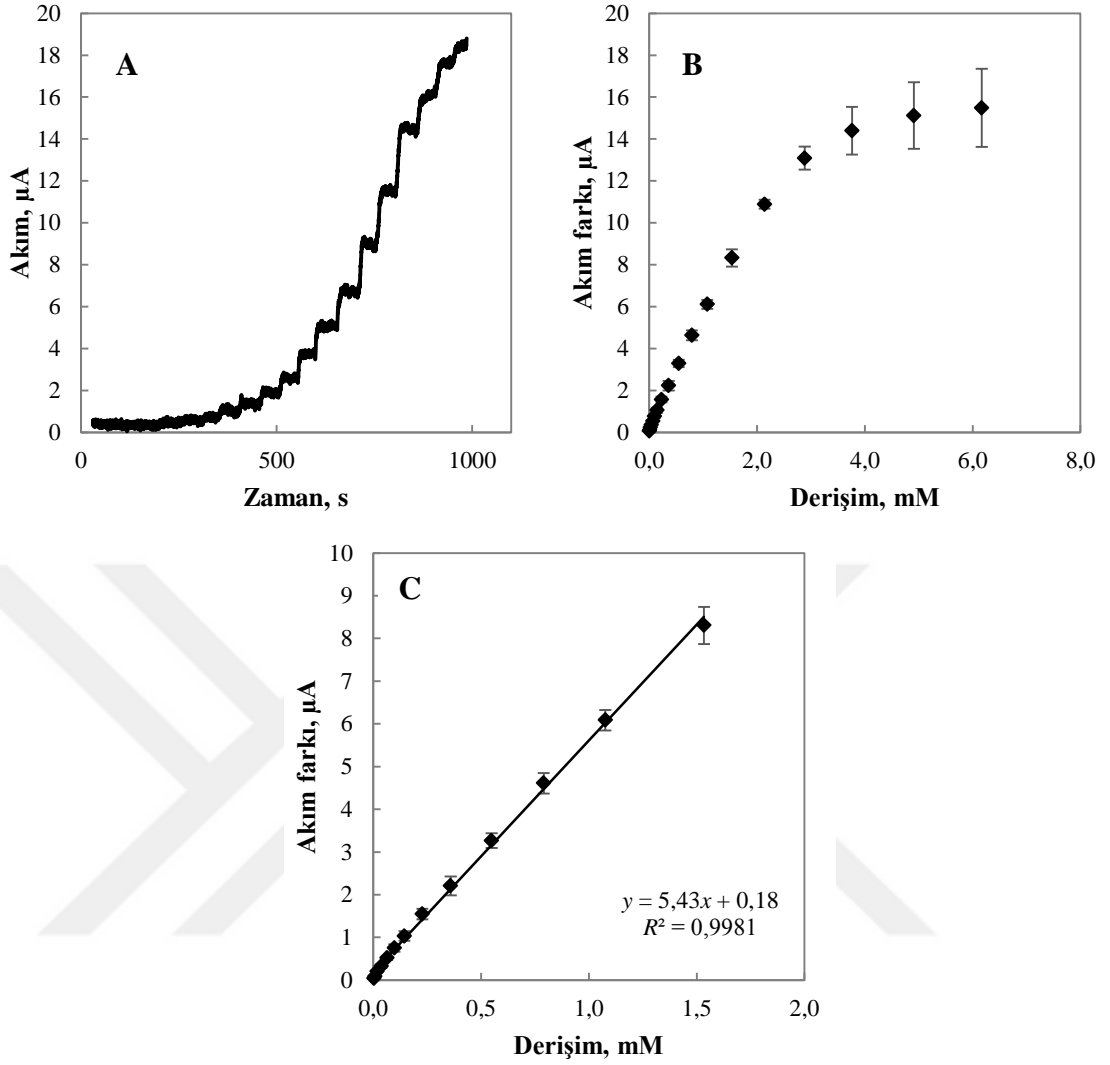
Şekil 4.52 A. GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin çeşitli tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları ve B. pik akımlarının tarama hızının karekökü ile değişimi (0,10 M KCl içeren 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde)

4.5.4 Performans faktörleri

4.5.4.1 Doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı ve duyarlık

Optimum bileşimde hazırlanan GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin cevabının, glukoz derişimi ile değişimini belirlemek amacıyla, kronoamperometrik yöntem ile ard arda glukoz ilavelerinden sonra akım cevapları ölçüldü ve glukoz cevabına ait akım-zaman ve akım farkı-derişim Şekil 4.53.A ve B'de verildi. Şekil 4.53.C'de verilen kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin doğrusal çalışma aralığı $3,0 \times 10^{-6} - 1,5 \times 10^{-3}$ M ve duyarlığı $5,43 \mu\text{A mM}^{-1}$ ($76,48 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$) olarak belirlendi. LOD ve LOQ değerleri ise Bölüm 3.7.2'de anlatıldığı gibi sırasıyla $2,6 \times 10^{-6}$ M ve $8,6 \times 10^{-6}$ M olarak hesaplandı.

GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE için bulunan duyarlık, literatürde Fe₂O₃ nanomalzemeleri ile glukoz tayini için hazırlanan bazı biyosensörlerinkinden yüksek olduğu belirlendi: $45,85 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Baratella vd. 2013) ve $5,31 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Nor vd. 2017). Literatürde bu malzemeler ile hazırlanan yüksek duyarlığa sahip biyosensör çalışmaları da mevcuttur: $726,9 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Cao ve Wang, 2011) ve $1382,8 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Chen vd. 2014). Doğrusal çalışma aralığının ise, glukoz tayini için literatürdeki Fe₂O₃ nanomalzemeleri ile hazırlanan biyosensörlerin bazıları için elde edilen doğrusal çalışma aralığından daha geniş olduğu görüldü: $2,5 \times 10^{-6} - 5,8 \times 10^{-4}$ M (Chen vd. 2014), $2,0 \times 10^{-5} - 2,5 \times 10^{-4}$ M ve $2,5 \times 10^{-4} - 8,0 \times 10^{-3}$ M (Nor vd. 2017). Bazı çalışmalarda ise GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE ile elde edilen çalışma aralıklarına yakın sonuçlar rapor edilmiştir: $1,5 \times 10^{-5} - 5,8 \times 10^{-3}$ M (Chen vd. 2014) ve $1,0 \times 10^{-6} - 1,5 \times 10^{-3}$ M (Chen vd. 2014). GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE ile elde edilen LOD değeri, literatürde rapor edilen bazı LOD değerlerinden daha düşük: 6×10^{-6} M (Cao ve Wang, 2011) ve 7×10^{-6} M (Nor vd. 2017); bazılarından ise yüksektir: 9×10^{-7} M (Baratella vd. 2013), $5,8 \times 10^{-7}$ M (Chen vd. 2014) ve 4×10^{-7} M (Liu vd. 2016). Literatürde Fe₂O₃ nanomalzemeleri ile glukoz tayini için az sayıda çalışma olduğundan, bu biyosensör ile elde edilen sonuçların literatüre katkı yapabilecek düzeyde olduğu düşünöldü.

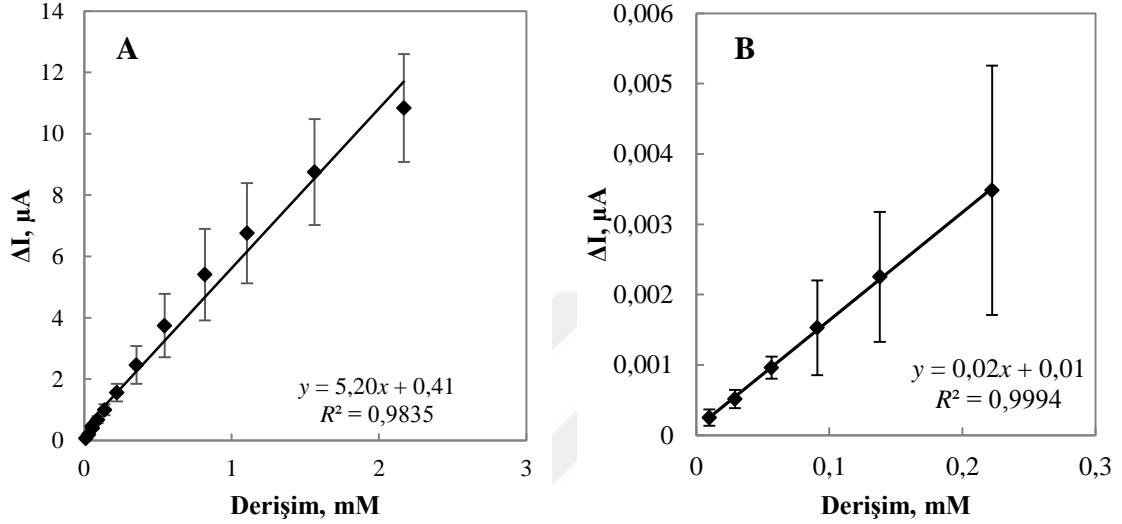


Şekil 4.53 GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE cevabına glukoz derişiminin etkisi

A. Akım-zaman grafiği. B. Akım farkı-derişim grafiği ve C. kalibrasyon grafiği ($N=3$; 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,70 V)

c-MWCNT ve Fe₂O₃NP'nin ayrı ayrı olduğu durumdaki glukoz cevaplarını GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE biyosensörünün cevabıyla karşılaştırmak amacıyla A. GOx/c-MWCNT/GCE ve B. GOx/Fe₂O₃NP/GCE hazırlandı ve kalibrasyon grafikleri Şekil 4.54'te verildi. GOx/c-MWCNT/GCE ve GOx/Fe₂O₃NP/GCE için doğrusal çalışma aralıkları sırasıyla $1,0 \times 10^{-5} - 2,2 \times 10^{-3}$ M ve $1,0 \times 10^{-5} - 2,2 \times 10^{-4}$ M; duyarlılıkları ise sırasıyla $5,20 \mu\text{A mM}^{-1}$ ve $0,02 \mu\text{A mM}^{-1}$ olarak belirlendi. GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE için bulunan sonuçların, bu iki biyosensör ile bulunanlardan daha iyi olduğu görüldü. Bu durum, iki malzemenin bir araya geldiğinde aralarındaki etkileşimin, biyosensör performansını arttırdığı şeklinde yorumlandı. Ayrıca

Fe₂O₃NP'lerinin biyosensörün duyarlılığı üzerine önemli bir katkı yapmadığı; ancak kalibrasyon eğrilerinin tekrarlanabilirliği üzerine çok önemli bir katkısı olduğu görüldü. Bunun da, bu MONP'nin c-MWCNT'nin dağılımını homojen hale getirmesinden kaynaklandığı düşünüldü.



Şekil 4.54 Kalibrasyon grafikleri A. GOx/c-MWCNT/GCE ve B. GOx/Fe₂O₃NP/GCE (N=3; 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,70 V)

4.5.4.2 Cevap süresi

GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin cevap süresi, Bölüm 3.7.3'te anlatıldığı şekilde, $i-t$ grafiklerinden yararlanılarak hesaplandı. Biyosensör için cevap süresinin ortalama 20 s olduğu gözlemlendi.

4.5.4.3 Michaelis-Menten sabiti (K_M)

GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'ye immobilize edilmiş olan GOx'ın glukozla karşı ilgisi, Bölüm 3.7.4'te anlatıldığı gibi belirlendi. Bu amaçla, Lineweaver-Burk grafiğinden ($1/[Glukoz]-1/[\Delta i]$) yararlanılarak Michaelis-Menten sabiti, K_M , hesaplandı. GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE için K_M değeri 0,84 mM olarak bulundu. Literatürde Fe₂O₃ nanomalzemeleri ile glukoz tayini için yapılan çalışmalar az olduğu ve bu çalışmalarda K_M değeri verilmediği için yeterli bir karşılaştırma yapılamadı. Yalnızca

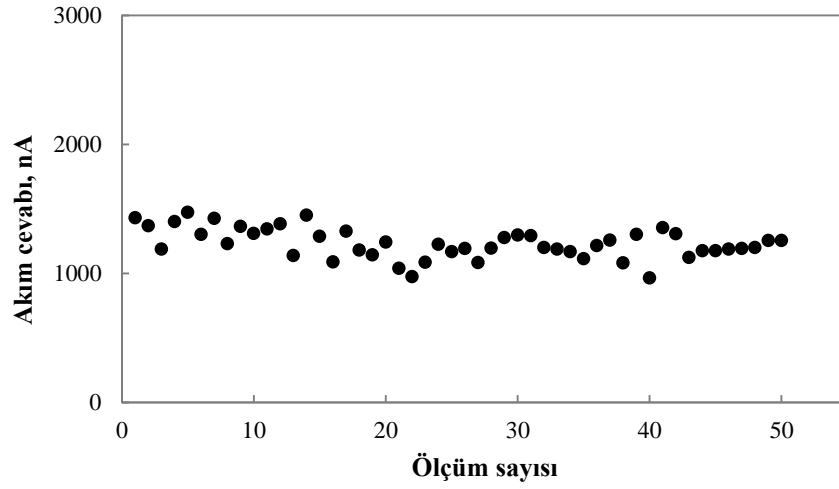
Nor vd. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada 0,021 mM olan K_M değeri rapor edilmiştir. Ancak GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE için bulunan K_M değeri, literatürdeki diğer glukoz tayini için elde edilen değerler göz önüne alındığında oldukça düşük bir değerdir. Bu da, kullanılan modifikasyon malzemelerinin enzim immobilizasyonu için uygun olduğunu gösterir.

4.5.4.4 Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik

GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin tekrar kullanılabilirliği, Bölüm 3.7.5'te anlatıldığı gibi, aynı biyosensör ile arda arda üç kalibrasyon eğrisi çizilerek elde edilen eğrilerin duyarlıklarından yararlanılarak bulundu. Tekrar üretilebilirliği ise Bölüm 3.7.6'da anlatıldığı gibi, her bir GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE ile çizilen kalibrasyon eğrilerinin duyarlıklarından hesaplandı. Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik için hesaplanan bağıl standart sapmalar sırası ile %3,7 ve %3,4 olarak belirlendi. Bağıl standart sapma değerlerinin düşük olması, GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin ard arda kullanılabilmesi ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilecek şekilde üretilebilmeye uygun olduğunu gösterdi.

4.5.4.5 Kararlılık

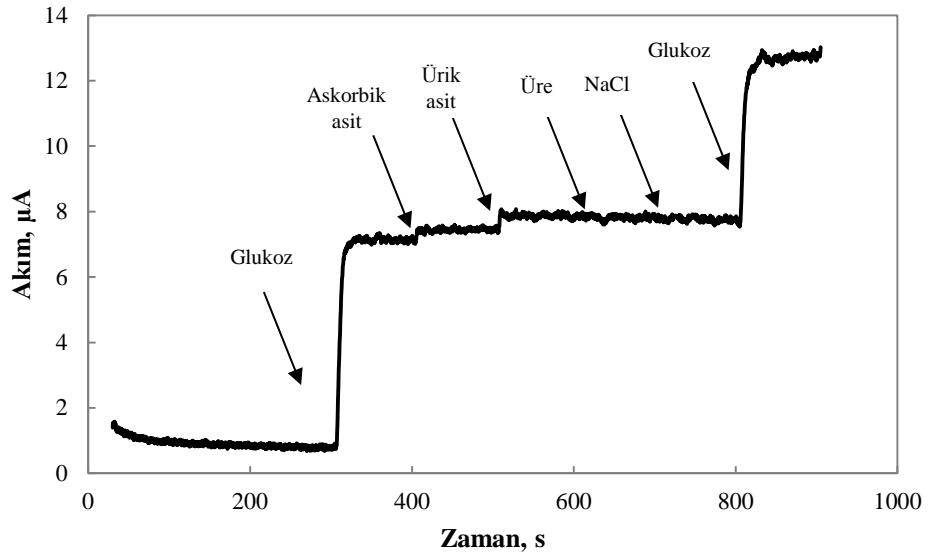
GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin cevabının, kullanım sıklığı ile nasıl değiştiği, Bölüm 3.7.8'de anlatıldığı gibi belirlendi. GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin optimum çalışma koşullarında sabit glukoz derişiminde ard arda ölçümler ile amperometrik akım cevabı ölçülerek biyosensörün 50 ölçüm boyunca glukozu verdiği amperometrik cevaplar grafiğe geçirildi ve Şekil 4.55'te verildi. GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin glukoz cevabının, 50 ölçüm süresince elde edilen bağıl standart sapması %9,6 olarak hesaplandı.



Şekil 4.55 GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin kararlılığı

4.5.4.6 Bozucu türlerin etkisi

Askorbik asit, ürik asit, üre ve NaCl'nin GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin glukoz cevabına etkisi Bölüm 3.7.9'da anlatıldığı gibi belirlendi. GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin 1,00 mM glukoz karşı cevabı belirlendikten sonra, aynı çözeltiye 0,02 mM askorbik asit, ürik asit, üre ve NaCl ard arda ilave edilerek, kronoamperometrik yöntem ile *i-t* grafiği çizildi (Şekil 4.56). Askorbik asit, ürik asit, üre ve NaCl'nin GOx/Fe₂O₃-c-MWCNT/GCE'nin cevabına sırası ile %5,1, %5,1, %0,9 ve -%1,7 girişim yaptığı belirlendi.



Şekil 4.56 GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin cevabına bozucu türlerin etkisi

4.6 GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE ile İlgili Çalışmalar

4.6.1 Elektrot yüzey bileşiminin optimizasyonu

GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE biyosensörünün hazırlanmasında, 2²-faktöriyel MKT ile c-MWCNT ve Al₂O₃NP miktarları, Bölüm 3.5.5'te anlatıldığı gibi, belirlendi. Bu amaçla Çizelge 3.11'de verilen deneysel veriler %95 güven seviyesinde ANOVA ile incelendi ve Çizelge 4.11'de verildi. Modelin anlamlılığı Fisher *F* testi ile incelendi. Modelin *F* değeri 7,31 olarak bulundu ve *p* değerinin oldukça düşük olması (*p*=0,0106) modelin anlamlı olduğunu gösterdi. Ayrıca modelde *A* (*p*=0,0168) ve *A*² (*p*=0,0014) anlamlı terimlerdir. Anlamlı olmayan terimler çıkarıldığında amperometrik akım cevabı (nA) ile bağımsız değişkenler arasındaki matematiksel model, aşağıda verilen ikinci dereceden eşitlik ile ifade edilir:

$$Y = 5172,00 + 598,96[c\text{-MWCNT}] - 1052,62[c\text{-MWCNT}]^2$$

Geliştirilen modelin deneysel verilere uygun mu olduğu yoksa başka bir modelin mi uygulanması gerektiği uyumsuzluk testi ile incelendi. Çizelge 4.12'de uyumsuzluk değerinin 0,5569 (*p*>0,05) olarak bulunması modelin %95 güven seviyesinde deneysel

verilere uygulanmasının uygun olduğunu gösterdi. R^2 değeri (0,8392) de elektrot cevabının model ile uyumlu olduğunu gösterdi.

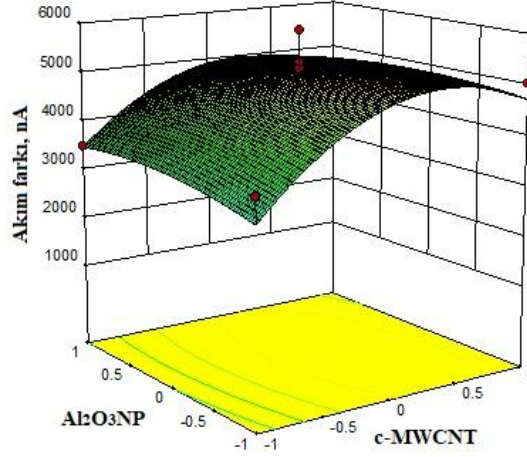
Çizelge 4.11 c-MWCNT- Al_2O_3NP için 2²-faktöriyel MKT verileri ile ANOVA

Kaynak	β	SS	df	MS	F değeri	P değeri	
Model	5172,00	$1,075 \times 10^7$	5	$2,149 \times 10^6$	7,31	0,0106	anlamlı
A	598,96	$2,870 \times 10^6$	1	$2,870 \times 10^6$	9,75	0,0168	anlamlı
B	-21,27	3618,71	1	3618,71	0,012	0,9148	
AB	-184,25	$1,358 \times 10^5$	1	$1,358 \times 10^5$	0,46	0,5187	
A ²	-1052,62	$7,708 \times 10^6$	1	$7,708 \times 10^6$	26,20	0,0014	anlamlı
B ²	-202,37	$2,849 \times 10^5$	1	$2,849 \times 10^5$	0,97	0,3579	
Artık		$2,060 \times 10^6$	7	$2,942 \times 10^5$			
Uyumsuzluk		$7,697 \times 10^5$	3	$2,566 \times 10^5$	0,80	0,5569	Anlamlı değil
Saf hata		$1,290 \times 10^6$	4	$3,225 \times 10^5$			
Toplam kor,		$1,281 \times 10^7$	12				
$R^2 = 0,8392$							

SS: kareler toplamı; df: serbestlik derecesi; MS: kareler ortalaması; $F_{\text{value}} = MS_{\text{faktor}}/MS_{\text{hata}}$; P değeri: olasılık seviyesi.

Şekil 4.57, GCE yüzeyini modifiye etmede kullanılan c-MWCNT ve Al_2O_3NP miktarlarının +0,70 V potansiyelde $2,0 \times 10^{-4}$ M H_2O_2 çözeltisine verdiği amperometrik cevapla ilişkisini gösteren cevap yüzey eğrisini göstermektedir. Cevap yüzey eğrisi ve ANOVA çizelgesi değerlendirildiğinde, c-MWCNT'nin birinci ve ikinci dereceden terimlerinin anlamlı olduğu görüldü. Bu durum, c-MWCNT miktarı ile amperometrik akım cevabı arasındaki ilişkinin bir eğri oluşturacağını gösterir. Ancak çalışılan Al_2O_3NP derişimi aralığında Al_2O_3NP 'nin miktarı ile ilgili bir terimin anlamlı olmadığı görüldü. Bu da amperometrik cevabın Al_2O_3NP miktarı ile önemli ölçüde değişmeyeceğini gösterir. Ancak, ilerideki bölümlerde görüleceği gibi, çalışılan derişim aralığında Al_2O_3NP miktarının anlamlı bir etkisinin olmamasına rağmen, c-MWCNT ve Al_2O_3NP 'lerin bir arada bulunması ile hazırlanan elektrotların, sadece c-MWCNT ile hazırlanan elektrotlara göre akım cevabını kısmen iyileştirdiği belirlendi. Her ne kadar Al_2O_3NP 'nin akım cevabı üzerine önemli bir etki yapmadığı belirlense de, ANOVA çizelgesindeki β katsayıları kullanılarak elde edilen ve tüm terimlerin yer aldığı ikinci dereceden eşitliğin her bileşen cinsinden türevi alındığında en yüksek amperometrik cevabın 1 mL kitosan çözeltisi içinde 27,0 mg c-MWCNT ve 12,6 mg Al_2O_3NP

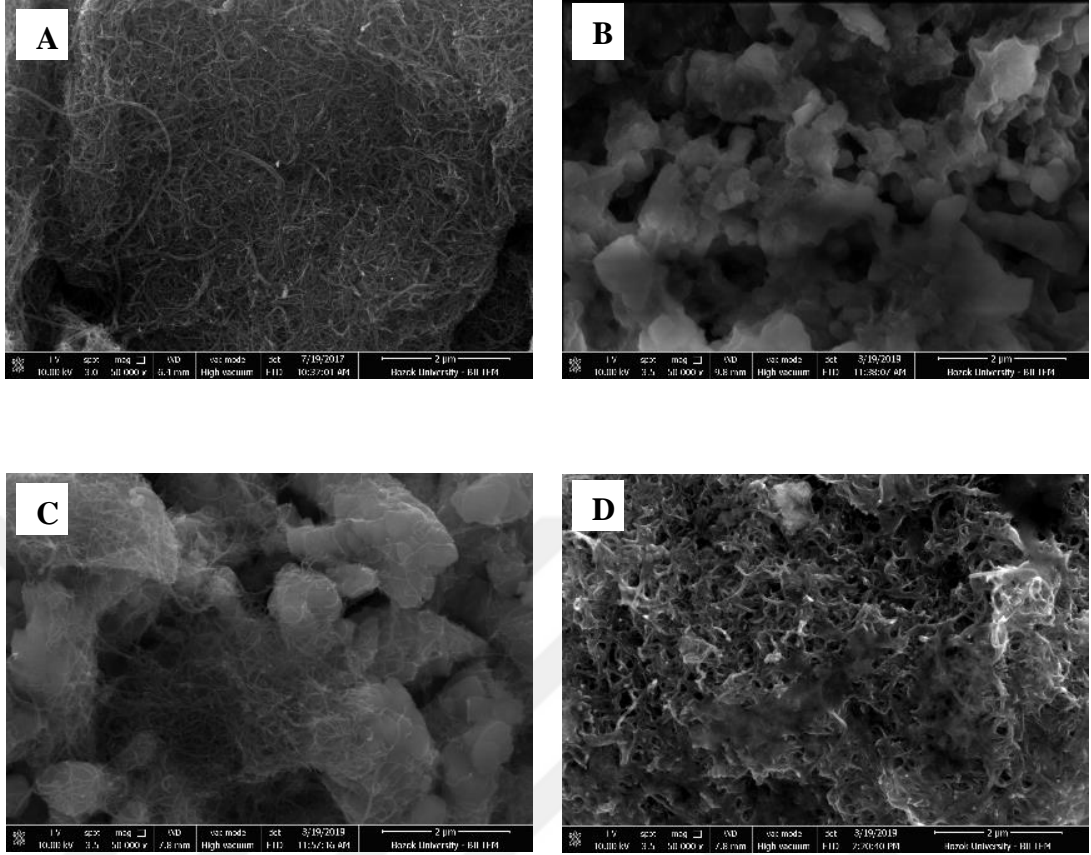
içerdiğinde elde edildiği görüldü. Bu değerler, H₂O₂ cevabının en yüksek olduğu durum olduğundan, elektrot yüzey bileşimi için optimum miktarlar olarak belirlendi.



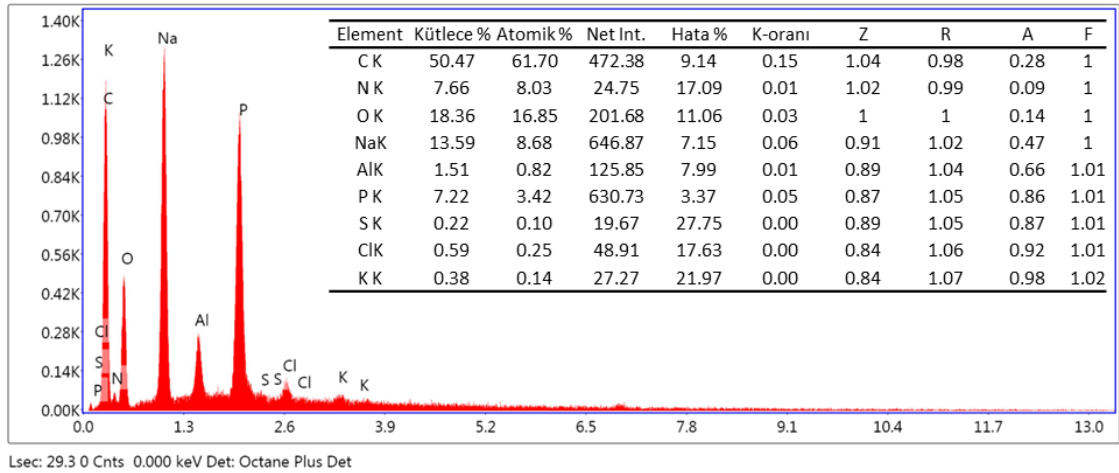
Şekil 4.57 Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin yüzey bileşimi optimizasyonunda elde edilen cevap yüzey eğrisi (+0,70 V ve 2,0×10⁻⁴ M H₂O₂ içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde)

4.6.2 Yüzey karakterizasyonu

GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'lerin hazırlanması sırasında kullanılan her bir malzemenin ayrı ayrı ve bir arada iken GCE yüzeyinde dağıtılması ile hazırlanan elektrotların yüzey karakterizasyonu SEM ile belirlendi. Bu amaçla Şekil 4.58'de (A) c-MWCNT/GCE, (B) Al₂O₃NP/GCE, (C) Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE ve (D) GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE için SEM görüntüleri verildi. Görüntüler incelendiğinde, Görüntü A'da c-MWCNT'nin ipliksi yapısı, Görüntü B'de Al₂O₃NP'nin tanecikli yapısı görülmekle birlikte Al₂O₃NP'ler kümeler oluşturmaktadır. Görüntü C'de, c-MWCNT'nin ipliksi yapısının bir ağ gibi Al₂O₃NP'leri sardığı gözlemlendi. Bu iki malzemenin yüzeyde bir arada bulunduğu anlaşıldı. Görüntü D'de Al₂O₃NP-c-MWCNT yapısının GOx tabakası ile kaplanması, enzimin yüzeye iyi bir şekilde immobilize olduğu belirlendi. GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT kompozitinin elemental bileşimi, EDX ile incelendi ve Şekil 4.59'da verildi. Spektrumda görülen ve çizelgede verilen element pikleri, kompozitin içerdiği Al, K, Cl, S, P, Na, O, N ve C pikleridir. Bu veriler elektrot yüzeyinde Al₂O₃NP, c-MWCNT ve GOx bulunduğunu göstermektedir.



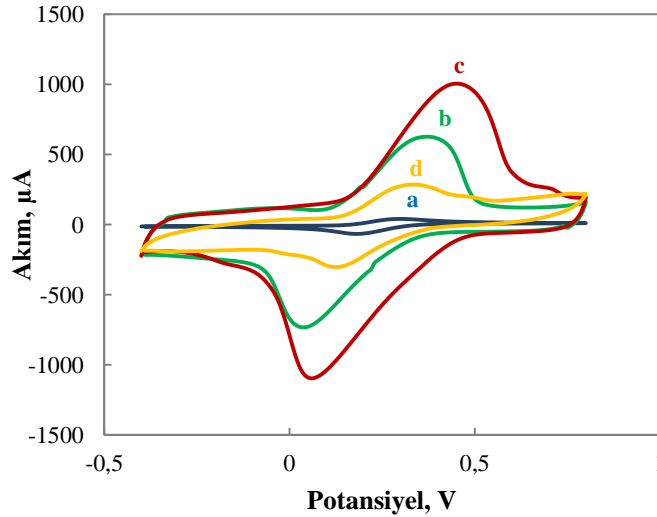
Şekil 4.58 SEM görüntüleri: (A) c-MWCNT/GCE, (B) Al₂O₃NP/GCE, (C) Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE ve (D) GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE



Şekil 4.59 GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE için EDX spektrumu ve elementel bileşim çizelgesi

4.6.3 Elektrokimyasal karakterizasyon

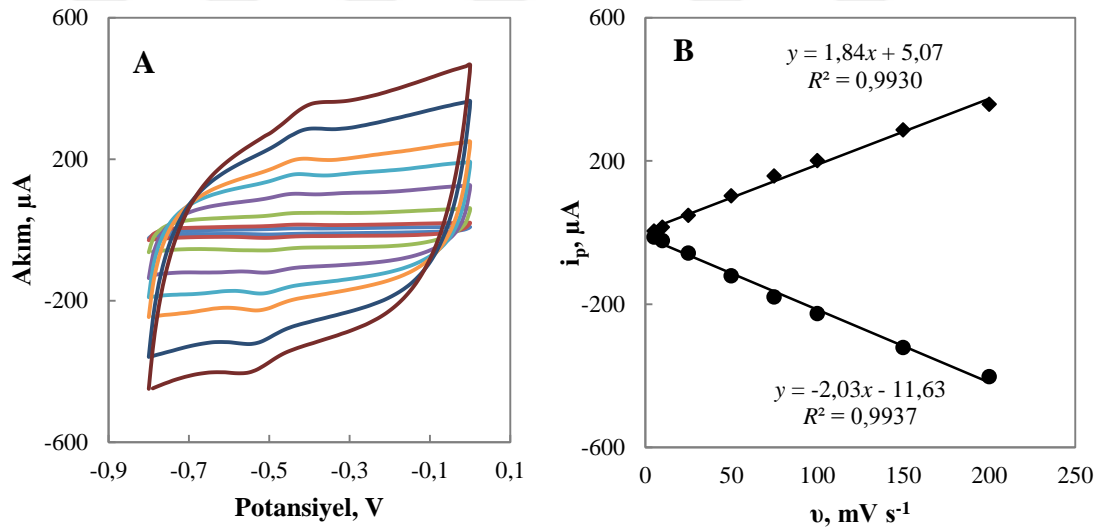
Şekil 4.60'ta, GCE yüzeyini modifiye etmede kullanılan c-MWCNT, Al₂O₃NP ve GOx'ın elektrokimyasal davranışlarını belirlemek amacıyla, optimum miktarları ile hazırlanmış olan (a) Al₂O₃NP/GCE, (b) c-MWCNT/GCE, (c) Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE ve (d) GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin, 50 mV s⁻¹ tarama hızında redoks probunda kaydedilen CV'leri verildi. Şekil incelendiğinde, Al₂O₃NP/GCE'nin (eğri a) pik akımı oldukça düşük olduğu görüldü. c-MWCNT'nin iletkenliğinin yüksek olduğu bilindiğinden, c-MWCNT/GCE'ye ait b eğrisinin pik akımı ise, beklenildiği gibi yüksektir. Bunların yanında Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin (eğri b) pik akımının yüksek olmasının, iki malzemenin bir arada kullanılmasıyla ortaya çıkan sinerjik etkiden kaynaklandığı düşünüldü. Ancak bu durum 2²-faktöryel MKT yönteminden elde edilen Al₂O₃NP'nin akım cevabı üzerinde önemli etkisi olmadığı gözlemiyle uyumlu olmaması ile ilgili bir açıklama yapılamadı. Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'ye GOx immobilizasyonu ile pik akımının düşmesi ise, GOx'ın yalıtkan yapısından kaynaklandığı düşünüldü.



Şekil 4.60 Dönüşümlü voltamogramlar: (a) Al₂O₃NP/GCE, (b) c-MWCNT/GCE, (c) Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE ve (d) GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE (50 mV s⁻¹ tarama hızında 0,10 M KCl içeren 5,0 mM Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks probunda)

GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE biyosensörünün farklı tarama hızlarındaki elektrokimyasal davranışını incelemek için, bu biyosensörün çalışılan tampon çözelti ortamında 5-200 mV s⁻¹ tarama hızlarında CV'leri kaydedildi ve Şekil 4.61.A'da verildi. Bu grafiklerden yararlanılarak, biyosensörün elektron aktarım hız sabiti, Bölüm 4.1.3'te anlatıldığı gibi belirlendi. Laviron eşitliğine göre, 50, 75, 100 ve 150 mV s⁻¹ tarama hızlarında GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE için ortalama k_s 0,46±0,04 s⁻¹ olarak hesaplandı.

Şekil 4.61 B, anodik ve katodik pik akımlarının tarama hızına karşı değişimini göstermektedir. Bu değişimin doğrusal olması elektrot yüzeyindeki elektrot aktarım mekanizmasının yüzey kontrollü olduğunu göstermektedir. Bu grafikte görülen, katodik pik akımının tarama hızına karşı değişiminin doğrusal eşitliği kullanılarak Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE yüzeyine immobilize edilen GOx miktarı, Bölüm 4.1.3'te anlatılan Lavironun 2. eşitliği ile belirlendi. GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE için Γ değeri $7,66 \times 10^{-9}$ mol cm⁻² olarak hesaplandı.

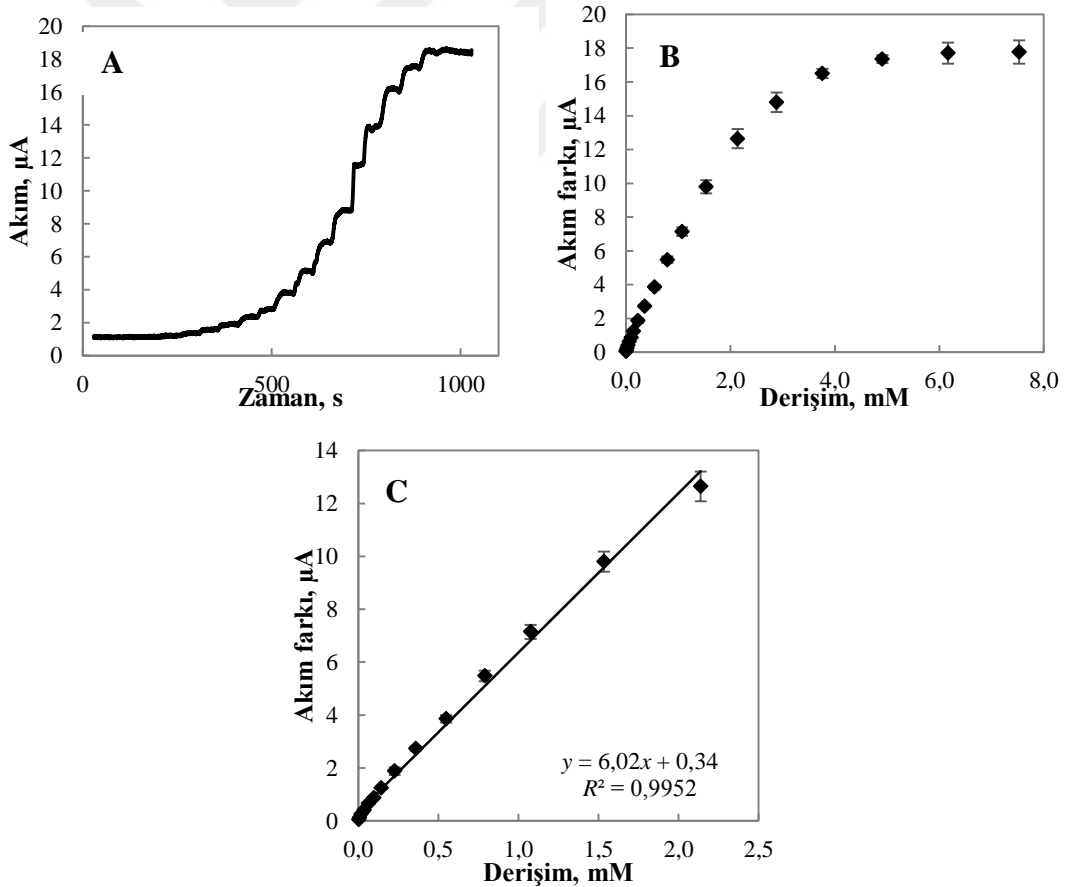


Şekil 4.61 A. GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin çeşitli tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları ve B. pik akımlarının tarama hızı ile değişimi (0,10 M KCl içeren 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde)

4.6.4 Performans faktörleri

4.6.4.1 Doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı ve duyarlık

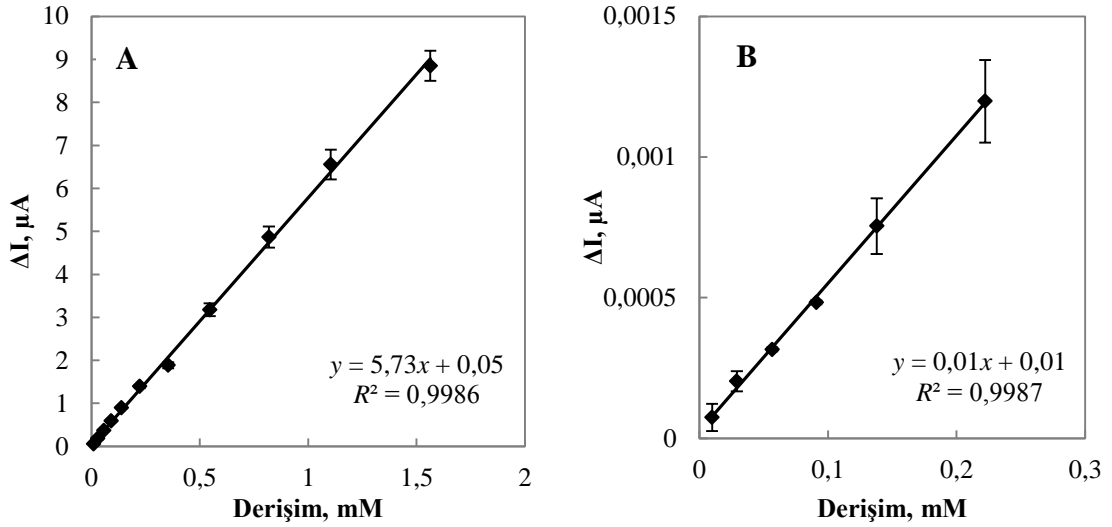
GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin glukoz cevabı, kronoamperometrik yöntem ile ard arda glukoz ilavelerinden sonra akım cevapları ölçülerek belirlendi (Şekil 4.62.A). Her bir ilaveden sonraki akım farkları derişime karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.62.B) ve bu grafikte elde edilen doğrusal değişim dikkate alınarak kalibrasyon grafiği çizildi (Şekil 4.62.C). GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin doğrusal çalışma aralığı ve duyarlığı, kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak sırasıyla $3,0 \times 10^{-6} - 2,1 \times 10^{-3}$ M ve $6,02 \mu\text{A mM}^{-1}$ ($84,79 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$) olarak bulundu. Biyosensörün LOD ve LOQ değerleri ise Bölüm 3.7.2'de anlatıldığı şekilde, sırasıyla $2,9 \times 10^{-6}$ M ve $9,8 \times 10^{-6}$ M olarak hesaplandı.



Şekil 4.62 GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE cevabına glukoz derişiminin etkisi A. Akım-zaman grafiği. B. Akım farkı-derişim grafiği ve C. kalibrasyon grafiği (N=3; 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,70 V)

Bu çalışmada GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE için bulunan duyarlık, literatürde Al₂O₃ nanomalzemeleri ile glukoz tayini için hazırlanan bazı biyosensörlerden yüksektir: 1,04 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Chen vd. 2002), 56,79 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Lin vd. 2011); Tsai ve Tsai (2009) tarafından yapılan çalışmada ise daha yüksek bir duyarlık rapor edilmiştir (113,13 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$). Biyosensörün doğrusal çalışma aralığının, glukoz tayini için literatürdeki Al₂O₃ nanomalzemeleri ile hazırlanan biyosensörlerin bazıları için elde edilen doğrusal çalışma aralığından daha geniş olduğu görüldü: $4,0 \times 10^{-5} - 2,19 \times 10^{-2}$ M (Liu, vd. 1999), $5,0 \times 10^{-5} - 1,1 \times 10^{-2}$ M (Tsai ve Tsai 2009) ve $2,5 \times 10^{-4} - 8,0 \times 10^{-3}$ M (Lin vd. 2011). GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE için elde edilen LOD değeri ise, literatürde rapor edilen diğer bazı biyosensörlerden yüksektir: $1,0 \times 10^{-5}$ M (Liu vd. 1999), $6,2 \times 10^{-6}$ M (Tsai ve Tsai 2009). Bulunan sonuçların, literatürde Al₂O₃ nanomalzemeleri ile hazırlanan az sayıda glukoz biyosensörü olduğu da göz önünde bulundurulduğunda, literatüre katkı sağlayabilecek düzeyde olduğu düşünüldü.

Şekil 4.63'te, optimum miktarlarla hazırlanan A. GOx/c-MWCNT/GCE ve B. GOx/Al₂O₃NP/GCE'nin kalibrasyon grafikleri verildi. GOx/c-MWCNT/GCE için doğrusal çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-5} - 1,6 \times 10^{-3}$ M ve duyarlık $5,73 \mu\text{A mM}^{-1}$; GOx/Al₂O₃NP/GCE için ise doğrusal çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-5} - 2,2 \times 10^{-4}$ M ve duyarlık $0,01 \mu\text{A mM}^{-1}$ olarak belirlendi. İki malzemenin bir arada olduğu durumda, doğrusal çalışma aralığı ve duyarlığının GOx/c-MWCNT/GCE biyosensörünükine göre kısmen iyileştiği görüldü. Bu durum da Al₂O₃NP'lerin biyosensör cevabı üzerinde çok önemli bir etki yapmadığı şeklinde yorumlandı.



Şekil 4.63 Kalibrasyon grafikleri A. GOx/c-MWCNT/GCE ve B. GOx/Al₂O₃NP/GCE (N=3; 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,70 V)

4.6.4.2 Cevap süresi

Cevap süresi, Bölüm 3.7.3'te anlatıldığı gibi belirlendi ve GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE için cevap süresinin ortalama 20 s olduğu gözlemlendi. Bu sürenin, literatürde rapor edilmiş diğer glukoz biyosensörleri dikkate alındığında, glukoz tayini için uygun bir süre olduğu düşünüldü.

4.6.4.3 Michaelis-Menten sabiti (K_M)

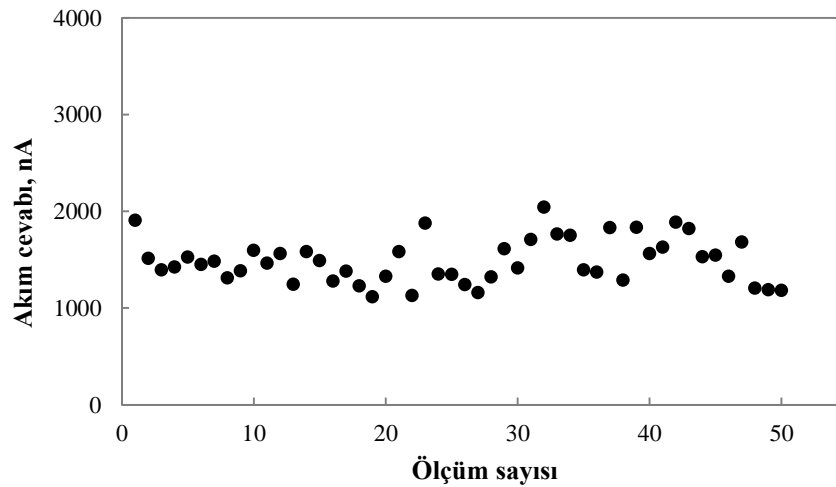
Biyosensöre immobilize edilmiş olan GOx'ın glukozla karşı ilgisini bulabilmek amacıyla, K_M , Bölüm 3.7.4'te anlatıldığı gibi belirlendi ve GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE için K_M değeri 0,87 mM olarak hesaplandı. Literatürde Al₂O₃ nanomalzemeleri ile glukoz tayini için hazırlanan bazı biyosensörler ile bulunan K_M değerleri 11,02 mM (Tsai ve Tsai 2009) ve 7,35 mM (Lin vd. 2011) olarak rapor edilmiştir. GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE ile elde edilen K_M değerinin, literatürde verilen bu değerlerden düşük olması, bu çalışmada hazırlanan modifiye elektroda immobilize edilmiş olan GOx'un glukozla ilgisinin, bahsedilen çalışmalardaki biyosensörlerinkinden fazla olduğu şeklinde yorumlandı.

4.6.4.4 Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik

GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE için, aynı biyosensör ile arda arda üç kalibrasyon eğrisi çizilerek elde edilen eğrilerin duyarlıklarından, bağıl standart sapma %4,8 olarak bulundu. Bu değer küçük olması, bu biyosensör ile ard arda ölçümler yapılabileceğini gösterdi. Ayrıca, tekrar üretilebilirliğini belirlemek için aynı şartlarda üç farklı GOx/Al₂O₃-c-MWCNT/GCE hazırlandı ve her bir GOx/Al₂O₃-c-MWCNT/GCE ile çizilen kalibrasyon eğrilerinin duyarlıklarından hesaplanan bağıl standart sapma %5,6 olarak bulundu. Bu değer, GOx/Al₂O₃-c-MWCNT/GCE'nin tekrarlanabilir sonuçlar elde edilecek şekilde üretilebilmeye uygun olduğunu gösterdi.

4.6.4.5 Kararlılık

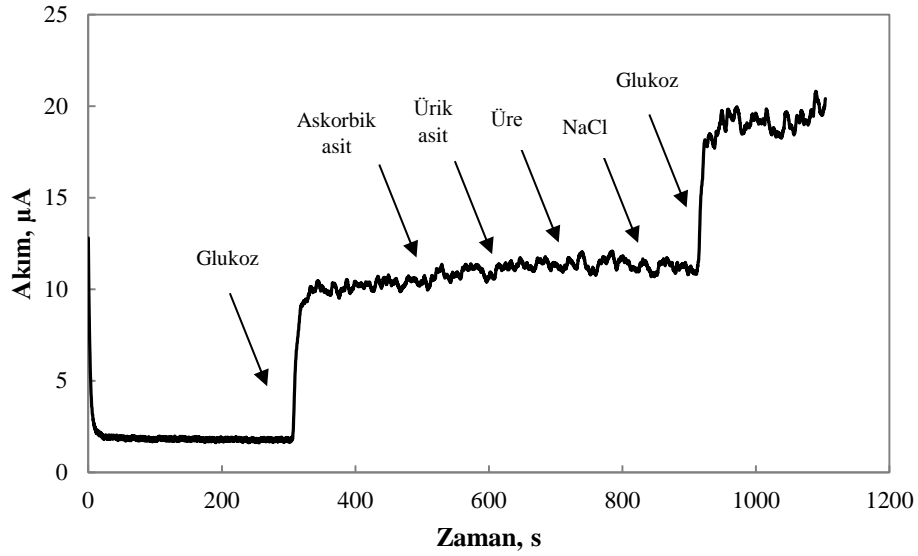
GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin kararlılığını belirlemek için, GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin optimum çalışma koşullarında sabit glukoz derişiminde ard arda ölçümler ile amperometrik akım cevabı ölçüldü. GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin 50 ölçüm boyunca glukoz verdiği amperometrik cevaplar grafiğe geçirildi ve Şekil 4.64'te verildi. Bu grafikten yararlanılarak, biyosensörün glukoz cevabının, 50 ölçüm süresince elde edilen bağıl standart sapması %15,5 olarak hesaplandı.



Şekil 4.64 GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin kararlılığı

4.6.4.6 Bozucu türlerin etkisi

GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin substrat seçiciliğini belirlemek için askorbik asit, ürik asit, üre ve NaCl'nin biyosensörlerin cevabına etkisi Bölüm 3.7.9'da anlatıldığı gibi belirlendi. 1,00 mM glukoz cevabına karşı 0,02 mM askorbik asit, ürik asit, üre ve NaCl'nin etkisi, kronoamperometrik yöntem ile çizilen *i-t* grafiğinden yararlanılarak incelendi (Şekil 4.65). Askorbik asit, ürik asit, üre ve NaCl'nin GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE'nin cevabına sırası ile %3,4, %2,8, %1,0 ve -%0,4 girişim yaptığı belirlendi.



Şekil 4.65 GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE cevabına bozucu türlerin etkisi

4.7 GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE ile İlgili Çalışmalar

4.7.1 Elektrot yüzey bileşiminin optimizasyonu

GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE biyosensörünün hazırlanmasında kullanılan CuONP ve c-MWCNT miktarları için 2²-faktöriyel MKT ile belirlendi. Bu amaçla Çizelge 3.11'de verilen deneysel veriler %95 güven seviyesinde ANOVA ile incelendi ve Çizelge 4.12'de verildi. Modelin anlamlılığı Fisher *F* testi ile incelendi modelin ve *F* değeri 19,53 ve *p* değeri 0,0006 olarak bulundu. *p* değerinin oldukça düşük olması, modelin

anlamli olduğunu gosterdi. Ayrıca modelde A ($p=0,0247$), A^2 ($p=0,0007$) ve B^2 ($p=0,0001$) anlamli terimler olarak bulundu. Anlamli olmayan terimler çıkarıldığında amperometrik akım cevabı (nA) ile bağımsız değişkenler arasındaki matematiksel model, aşığıda verilen ikinci dereceden eşitlik ile ifade edilir:

$$Y = 5408,40 + 497,49[c\text{-MWCNT}] - 1086,10[c\text{-MWCNT}]^2 - 1443,80[\text{CuONP}]^2$$

Geliştirilen modelin deneysel verilere uygun olup olmadığı uyumsuzluk testi ile incelendi. Çizelge 4.13'de uyumsuzluk değerinin 0,2314 ($p>0,05$) olarak bulunması modelin %95 güven seviyesinde deneysel verilere uygulanmasının uygun olduğunu gosterdi. R^2 değeri (0,9331) de elektrot cevabının model ile uyumlu olduğunu gosterdi.

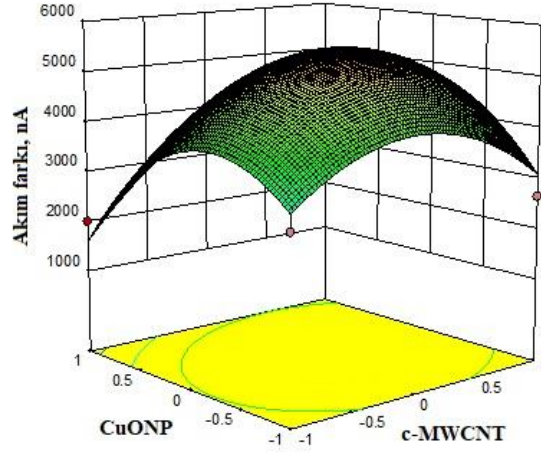
Çizelge 4.12 c-MWCNT-CuO için 2^2 -faktöriyel MKT verileri ile ANOVA

Kaynak	β	SS	df	MS	F değerı	P değerı	
Model	5408,40	$2,381 \times 10^7$	5	$4,762 \times 10^6$	19,53	0,0006	anlamli
A	497,49	$1,980 \times 10^6$	1	$1,980 \times 10^6$	8,12	0,0247	anlamli
B	-240,13	$4,613 \times 10^5$	1	$4,613 \times 10^5$	1,89	0,2114	
AB	539,50	$1,164 \times 10^6$	1	$1,164 \times 10^6$	4,78	0,0651	
A^2	-1086,10	$8,206 \times 10^6$	1	$8,206 \times 10^6$	33,66	0,0007	anlamli
B^2	-1443,80	$1,450 \times 10^7$	1	$1,450 \times 10^7$	59,48	0,0001	anlamli
Artık		$1,707 \times 10^6$	7	$2,438 \times 10^5$			
Uyumsuzluk		$1,061 \times 10^6$	3	$3,538 \times 10^5$	2,19	0,2314	anlamli değil
Saf hata		$6,453 \times 10^5$	4	$1,613 \times 10^5$			
Toplam kor, $R^2 = 0,9331$		$2,552 \times 10^7$	12				

SS: kareler toplamı; df: serbestlik derecesi; MS: kareler ortalaması; $F_{\text{value}} = MS_{\text{faktor}}/MS_{\text{hata}}$; $P_{\text{değer}}$: olasılık seviyesi.

Şekil 4.66, GCE yüzeyini modifiye etmede kullanılan c-MWCNT ve CuONP miktarlarının +0,70 V potansiyelde $2,0 \times 10^{-4}$ M H_2O_2 çözeltisine verdiği amperometrik cevapla ilişkisini gösteren cevap yüzey eğrisini göstermektedir. ANOVA çizelgesi değerlendirildiğinde, c-MWCNT ve CuONP'nin her ikisinin de ikinci dereceden terimlerinin anlamli olduğu görüldü. Bu durum, c-MWCNT ve CuONP miktarları ile amperometrik akım cevabı arasındaki ilişkinin, bir maksimum verecek şekilde bir eğri oluşturacağını gösterir. Elde edilen cevap yüzey eğrisi ve ANOVA verileri, en yüksek

amperometrik cevabın 1 mL kitosan çözeltisi içinde 24,6 mg c-MWCNT ve 10,0 mg CuONP içerdiğinde elde edildiği gösterdi. Bu değerler H₂O₂ cevabının en yüksek olduğu durum olduğundan, elektrot yüzey bileşimi için optimum miktarlar olarak belirlendi.

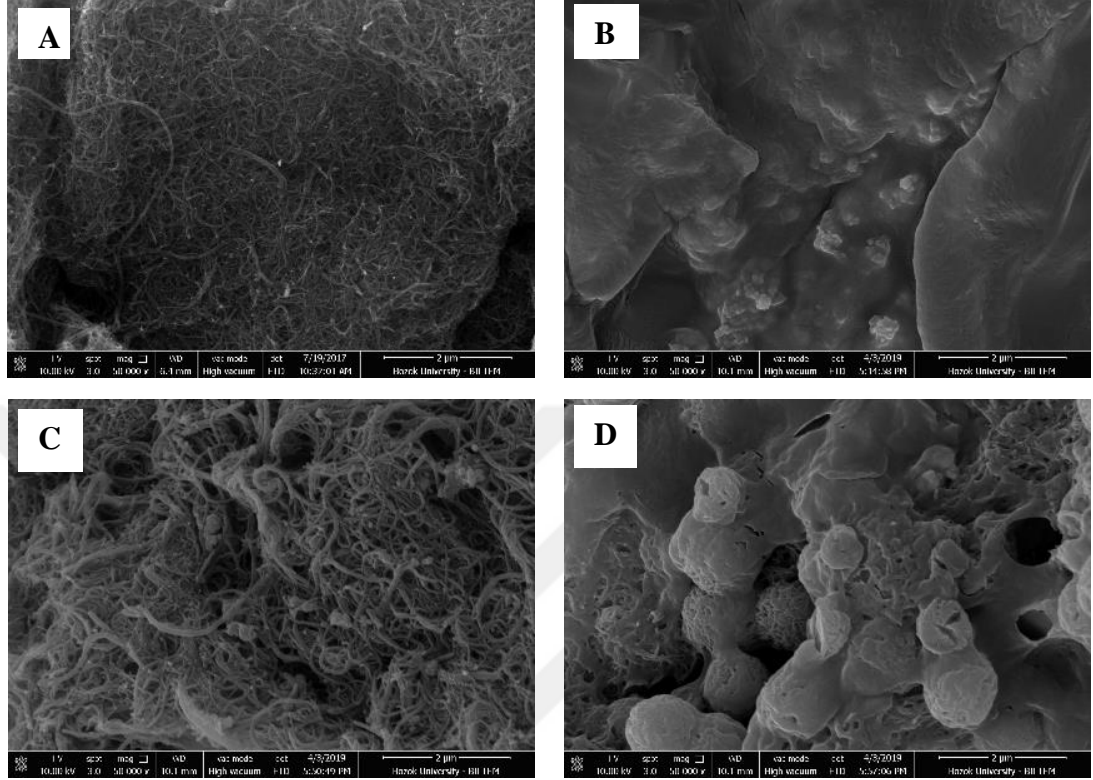


Şekil 4.66 CuONP-c-MWCNT/GCE'nin yüzey bileşimi optimizasyonunda elde edilen cevap yüzey eğrisi (+0,70 V ve $2,0 \times 10^{-4}$ M H₂O₂ içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde)

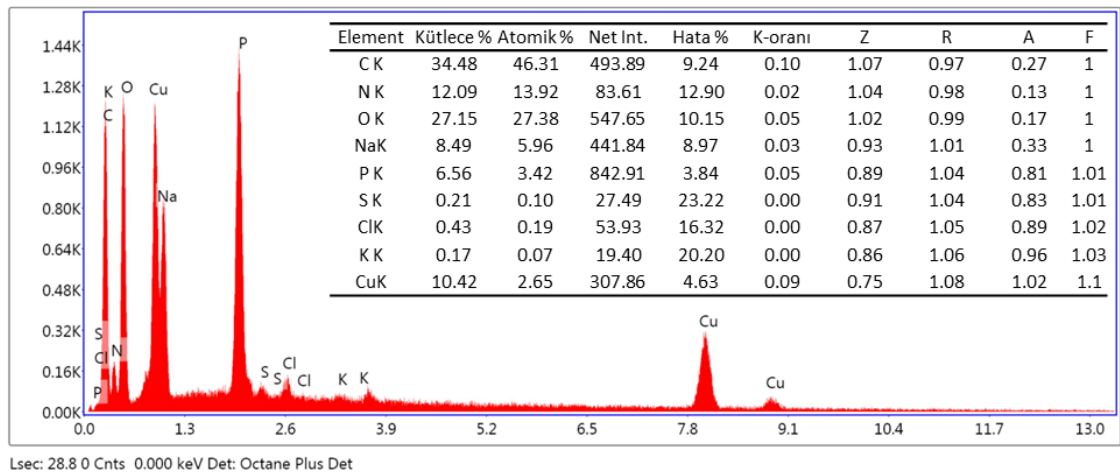
4.7.2 Yüzey karakterizasyonu

Şekil 4.67'de (A) c-MWCNT/GCE, (B) CuONP/GCE, (C) CuONP-c-MWCNT/GCE ve (D) GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE'lere ait SEM görüntüleri verildi. Bu görüntüler elektrot yüzeyini modifiye etmede kullanılan malzemelerin tek başına ve bir arada iken yüzey morfolojisini nasıl değiştirdiğini göstermektedir. Şekil incelendiğinde Görüntü A ve B, sırasıyla c-MWCNT ve CuONP'nin ayrı ayrı iken elektrot yüzeyindeki karakteristik yapılarını göstermektedir. Görüntü C'de, CuONP-c-MWCNT kompozitinin her iki malzemeyi de içerdiği ve yüzeyde homojen biçimde dağıldığı; Görüntü D'de ise bu kompozitin yüzeyine kaplanan GOx'ın modifiye elektrot yüzeyine başarılı bir şekilde immobilize olduğu görülmektedir. GOx/CuONP-c-MWCNT kompozitinin elemental bileşimini incelemek amacıyla EDX spektrumundan yararlanıldı. Şekil 4.68'de verilen EDX spektrumu ve şekil içinde verilen element bileşim çizelgesi incelendiğinde, elektrot yüzeyinin GOx, CuONP ve c-MWCNT ile

modifiye olduğunu gösteren Cu, K, Cl, S, P, Na, O, N ve C pikleri ve bu piklere ait veriler görülmektedir.



Şekil 4.67 SEM görüntüleri: (A) c-MWCNT/GCE, (B) CuONP/GCE, (C) CuONP-c-MWCNT/GCE ve (D) GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE



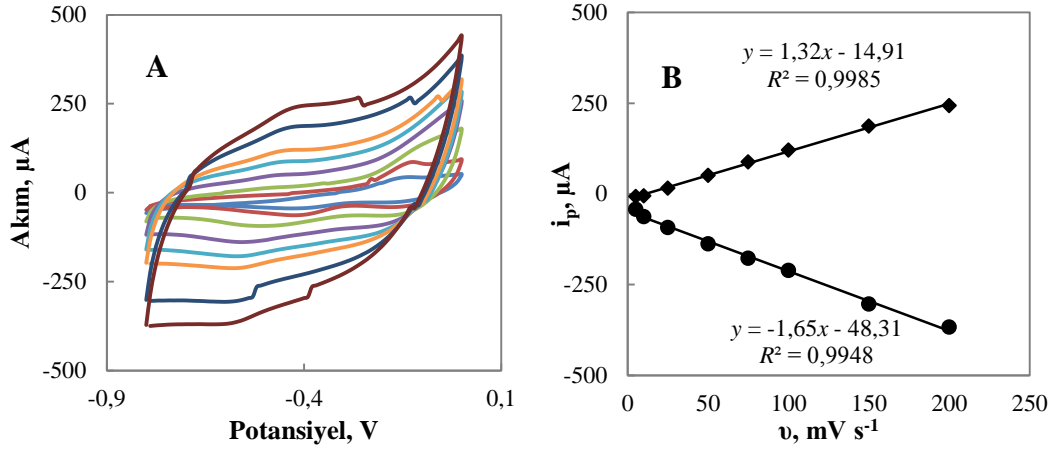
Şekil 4.68 GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE için EDX spektrumu ve elementel bileşim çizelgesi

4.7.3 Elektrokimyasal karakterizasyon

Bu tez çalışmasında, 8 adet MONP ile c-MWCNT kullanılarak GCE yüzeyi modifiye edildi ve bunların elektrokimyasal davranışlarını belirlemek amacıyla, CV'leri 50 mV s^{-1} tarama hızında redoks probunda kaydedildi. Ancak CuONP kullanılarak hazırlanan elektrotların bu şekilde karakterizasyonunun yapılması mümkün olmadı. Çünkü literatürde bu nanomalzeme ile hazırlanan elektrotlardaki CuONP'nin redoks probunda bulunan $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ile reaksiyona girdiği belirtilmektedir (Yang vd. 2010).

Çalışmada sadece GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE'nin elektrokimyasal davranışına tarama hızının etkisi incelendi. Bu biyosensörün çalışılan tampon çözelti ortamında $5-200 \text{ mV s}^{-1}$ tarama hızında CV'leri kaydedildi (Şekil 4.69.A). Bu grafiklerden yararlanılarak, GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE için elektron aktarım hız sabiti Bölüm 4.1.3'te anlatıldığı gibi belirlendi. $50, 75, 100$ ve 150 mV s^{-1} tarama hızlarında ortalama $k_s, 0,33 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ olarak hesaplandı.

Farklı tarama hızlarında elde edilen anodik ve katodik pik akımlarının tarama hızına karşı değişimini belirlemek için Şekil 4.69.B'deki grafik oluşturuldu. Bu grafikte doğrusal bir değişimin olması, elektrot yüzeyindeki elektrot aktarım mekanizmasının yüzey kontrollü olduğunu göstermektedir. Katodik pik akımının tarama hızına karşı değişiminden elde edilen doğrusal eşitlikten ve Laviron'un 2. eşitliğinden yararlanılarak, CuONP-c-MWCNT/GCE yüzeyine immobilize edilen GOx miktarı belirlendi. Bölüm 4.1.3'te anlatıldığı şekilde, Γ değeri $6,20 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$ olarak hesaplandı.



Şekil 4.69 A. GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE'nin çeşitli tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları ve B. pik akımlarının tarama hızı ile değişimi (0,10 M KCl içeren 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde)

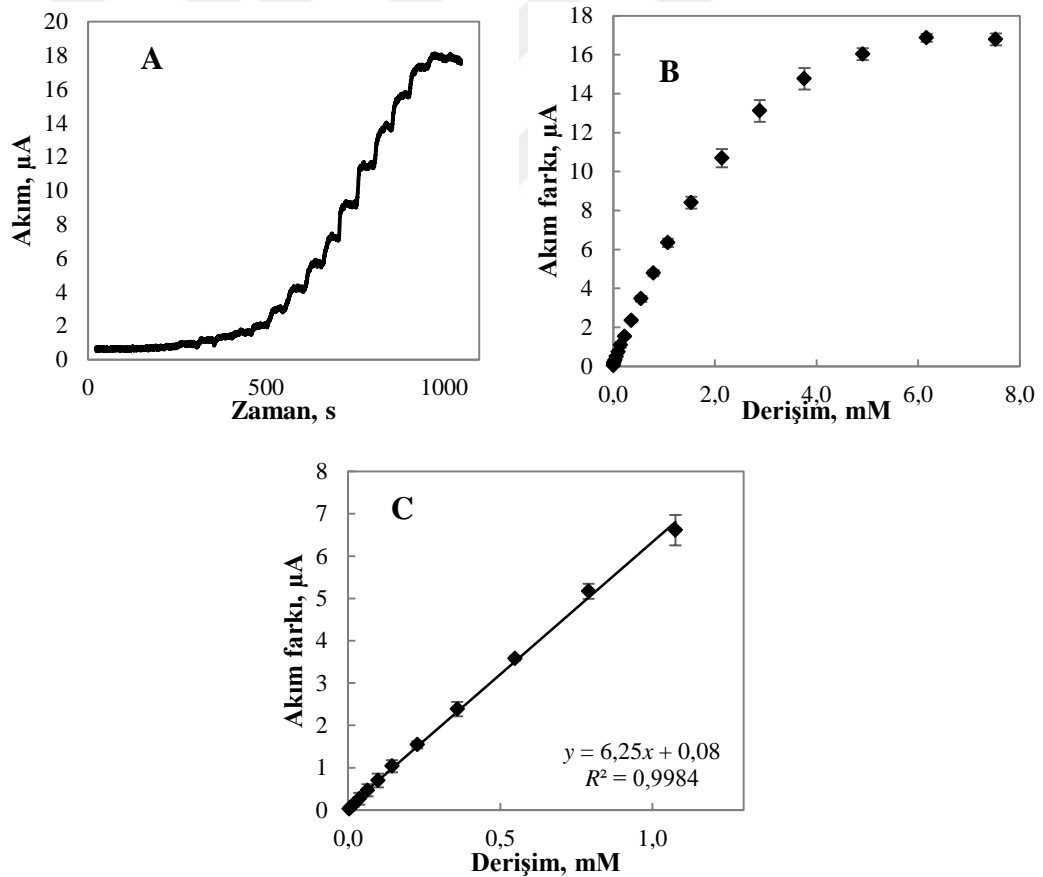
4.7.4 Performans faktörleri

4.7.4.1 Doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı ve duyarlık

GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE'nin doğrusal çalışma aralığı ve duyarlığı, Bölüm 3.7.1'de anlatıldığı gibi belirlendi. Bu amaçla, kronoamperometrik yöntem ile ard arda glukoz ilavelerinden sonra akım cevapları ölçüldü (Şekil 4.70.A) ve her bir ilaveden sonraki akım farkları derişime karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.70.B). Elde edilen kalibrasyon grafiklerinden (Şekil 4.70.C) yararlanılarak GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE'nin doğrusal çalışma aralığı $3,0 \times 10^{-6} - 1,1 \times 10^{-3}$ M ve duyarlığı $6,25 \mu\text{A mM}^{-1}$ ($88,03 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$) olarak belirlendi. Biyosensörün LOD ve LOQ değerleri, optimum çalışma koşullarında Bölüm 3.7.2'de anlatıldığı gibi belirlendi. GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE için LOD değeri $2,8 \times 10^{-6}$ M ve LOQ değeri $9,3 \times 10^{-6}$ M olarak hesaplandı.

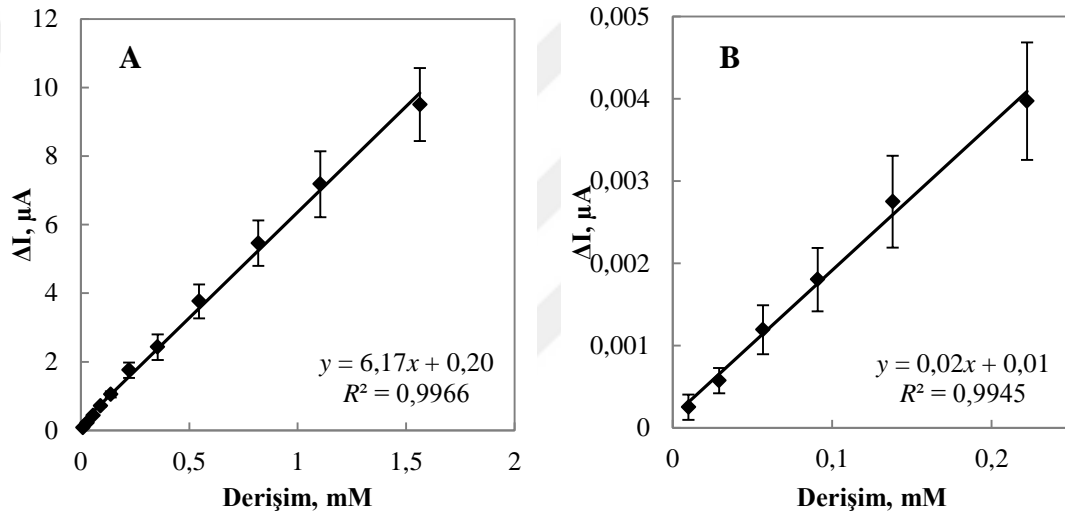
Çalışmada GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE için bulunan duyarlık, literatürde CuO nanomalzemeleri ile glukoz tayini için hazırlanan bazı biyosensörlerden yüksek olduğu görüldü: $30,44 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ ve $7,205 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Buk vd. 2016). Ancak literatürde yüksek duyarlığa sahip çalışmalar da mevcuttur: $431,3 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Wang vd. 2009); $246 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Li vd. 2011); $664,3 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Yang vd. 2012).

GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE'nin doğrusal çalışma aralığının, glukoz tayini için literatürdeki CuO nanomalzemeleri ile hazırlanan biyosensörlerin bazıları için elde edilen doğrusal çalışma aralığından daha geniş veya bu aralıklara yakın olduğu görüldü: $6,0 \times 10^{-6} - 2,5 \times 10^{-3}$ M (Wang vd. 2009), $4,0 \times 10^{-6} - 8,0 \times 10^{-3}$ M (Wang vd. 2010), $1,0 \times 10^{-6} - 1,7 \times 10^{-4}$ M (Li vd. 2011), $2,0 \times 10^{-6} - 4,0 \times 10^{-3}$ M (Luo vd. 2012), $5,0 \times 10^{-6} - 2,3 \times 10^{-3}$ M (Liu vd. 2012) ve $4,0 \times 10^{-5} - 3,0 \times 10^{-3}$ M (Buk vd. 2016). Bu çalışmada elde edilenden biraz daha geniş çalışma aralığına sahip biyosensörler de rapor edilmiştir: $8,0 \times 10^{-7} - 2,3 \times 10^{-6}$ M (Tian ve Liu, 2013); $5,0 \times 10^{-7} - 2,3 \times 10^{-3}$ M (Zhang vd. 2015) ve $1,0 \times 10^{-7} - 3,0 \times 10^{-3}$ M (Liu vd. 2018). GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE için elde edilen LOD değeri ise, literatürde verilen CuO nanomalzemeleri ile glukoz tayini için hazırlanan diğer bazı biyosensörler ile yakın değerdedir: $4,0 \times 10^{-6}$ M (Wang vd. 2010), $5,7 \times 10^{-6}$ M (Yang vd. 2012) ve $1,6 \times 10^{-6}$ M (Buk vd. 2016).



Şekil 4.70 GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE cevabına glukoz derişiminin etkisi A. Akım-zaman grafiği. B. Akım farkı-derişim grafiği ve C. kalibrasyon grafiği ($N=3$; 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,70 V)

Ayrıca Şekil 4.71’de, optimum miktarlarla hazırlanan A. GOx/c-MWCNT/GCE ve B. GOx/CuONP/GCE’nin kalibrasyon grafikleri verildi. GOx/c-MWCNT/GCE için doğrusal çalışma aralığı ve duyarlık sırasıyla $1,0 \times 10^{-5} - 1,6 \times 10^{-3}$ M ve $6,17 \mu\text{A mM}^{-1}$; GOx/CuONP/GCE için ise doğrusal çalışma aralığı ve duyarlık sırasıyla $1,0 \times 10^{-5} - 2,2 \times 10^{-4}$ M ve $0,02 \mu\text{A mM}^{-1}$ olarak belirlendi. GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE için bulunan duyarlığın, bu iki biyosensörle bulunanlardan çok az yüksek; çalışma aralığının ise daha geniş olduğu görüldü. Sonuç olarak, CuONP ve c-MWCNT’nin bir arada bulunmasıyla, daha iyi performans özelliklerine sahip bir biyosensör hazırlanacağı düşünüldü.



Şekil 4.71 Kalibrasyon grafikleri A. GOx/c-MWCNT/GCE ve B. GOx/CuONP/GCE (N=3; 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,70 V)

4.7.4.2 Cevap süresi

GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE için cevap süresi, bu biyosensör için çizilen kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kullanılan *i-t* grafiklerinden yararlanılarak ortalama 20 s olarak belirlendi. Bu sürenin literatürde elde edilenlerle karşılaştırılabilir bir süre olduğu düşünüldü.

4.7.4.3 Michaelis-Menten sabiti (K_M)

GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE için Michaelis-Menten sabiti (K_M) Bölüm 3.7.4'te anlatıldığı şekilde belirlendi ve K_M değeri 2,27 mM olarak hesaplandı. Literatürde CuO nanomalzemeleri ile glukoz tayini için hazırlanan bazı biyosensörler için rapor edilen K_M değerleri 2,82 mM (Buk vd. 2016), 26,8 mM (Liu vd. 2018) ile bu çalışmada bulunan K_M değeri karşılaştırıldığında, bulunan değerlerin literatürde verilen değerlerden düşük olduğu görüldü. Bu çalışmada hazırlanan CuONP-c-MWCNT/GCE'ye immobilize edilen GOx'ın glukozla olan ilgisinin yüksek olduğu, bu durumun da, CuONP-c-MWCNT kompozitinin, enzim etkinliği üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olmamasından kaynaklandığı şeklinde yorumlanabilir. Literatürde Li vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada bulunan 0,29 mM değeri gibi düşük değerler de rapor edilmiştir.

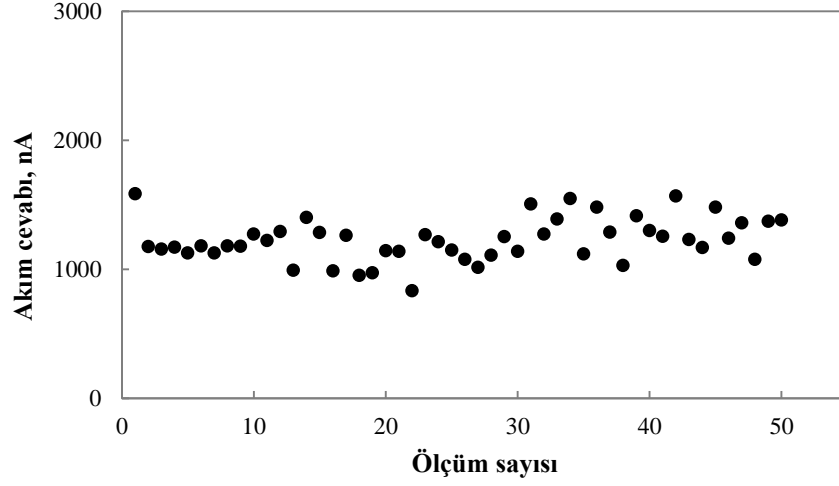
4.7.4.4 Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik

Bölüm 3.7.5'te anlatıldığı gibi, GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE ile ard arda üç kalibrasyon eğrisi çizilerek elde edilen eğrilerin duyarlıklarından, bağıl standart sapma %4,0 olarak bulundu. Ayrıca, tekrar üretilebilirliğini belirlemek için aynı şartlarda üç farklı GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE hazırlandı ve Bölüm 3.7.6'da anlatıldığı gibi, her bir GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE ile çizilen kalibrasyon eğrilerinin duyarlıklarından hesaplanan bağıl standart sapma %4,0 olarak hesaplandı. Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik için bağıl standart sapma değerlerinin düşük olması, GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE'nin ard arda kullanılabilmesi ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilecek şekilde üretilebilmeye uygun olduğunu gösterdi.

4.7.4.5 Kararlılık

GOx/CuO-c-MWCNT/GCE'nin cevabının, kullanım sıklığı ile nasıl değiştiğini belirlemek için, Bölüm 3.7.8'de anlatıldığı gibi, GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE'nin optimum çalışma koşullarında sabit glukoz derişiminde ard arda amperometrik akım cevabı ölçüldü. GOx/CuO-c-MWCNT/GCE'nin 50 ölçüm boyunca glukozla verdiği

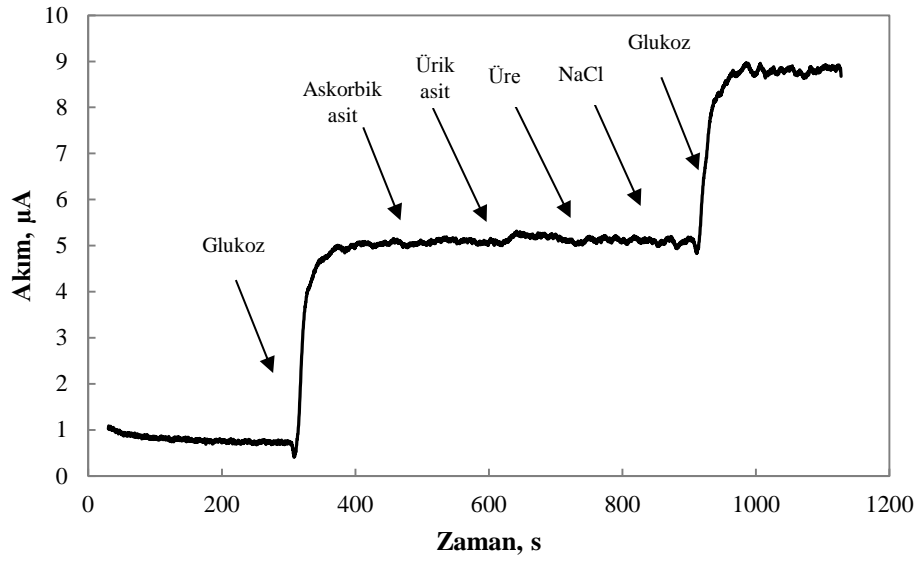
amperometrik cevaplar grafiğe geçirildi ve Şekil 4.72’de verildi. GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE’nin glukoz cevabının, 50 ölçüm süresince elde edilen bağıl standart sapması %13,6 olarak hesaplandı.



Şekil 4.72 GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE’nin kararlılığı

4.7.4.6 Bozucu türlerin etkisi

GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE’nin substrat seçiciliğini belirlemek için askorbik asit, ürik asit, üre ve NaCl’nin biyosensörlerin cevabına etkisi, Bölüm 3.7.9’da anlatıldığı gibi belirlendi. 1,00 mM glukoz cevabına karşı 0,02 mM askorbik asit, ürik asit, üre ve NaCl’nin etkisi, kronoamperometrik yöntem ile çizilen *i-t* grafiğinden yararlanılarak incelendi (Şekil 4.73). Askorbik asit, ürik asit, üre ve NaCl’nin GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE’nin cevabına sırası ile %1,0, %1,1, %0,2 ve -%0,4 olmak üzere çok az girişim yaptığı belirlendi.



Şekil 4.73 GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE'nin cevabına bozucu türlerin etkisi

4.8 GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE ile İlgili Çalışmalar

4.8.1 Elektrot yüzey bileşiminin optimizasyonu

GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE biyosensörünün hazırlanmasında kullanılan ZnONP ve c-MWCNT miktarları, 2^2 -faktöriyel MKT ile belirlendi. Bu amaçla Çizelge 3.11'de verilen deneysel veriler %95 güven seviyesinde ANOVA ile incelendi ve Çizelge 4.13'te verildi. Modelin anlamlılığı Fisher F testi ile incelendi modelin ve F değeri 7,51 olarak bulundu. p değerinin oldukça düşük olması ($p=0,0098$) modelin anlamlı olduğunu gösterdi. Ayrıca modelde A ($p=0,0094$) ve A^2 ($p=0,0028$) anlamlı terimlerdir. Anlamlı olmayan terimler çıkarıldığında amperometrik akım cevabı (nA) ile bağımsız değişkenler arasındaki matematiksel model, aşağıdaki gibi ikinci dereceden bir eşitlik olduğu görülür:

$$Y = 4128,64 + 764,14[c\text{-MWCNT}] - 1042,03[c\text{-MWCNT}]^2$$

Geliştirilen modelin deneysel verilere uygun mu olduğu yoksa başka bir modelin mi uygulanması gerektiği uyumsuzluk testi ile incelendi. Çizelge 4.14'de uyumsuzluk değerinin 0,8875 ($p>0,05$) olarak bulunması modelin %95 güven seviyesinde deneysel

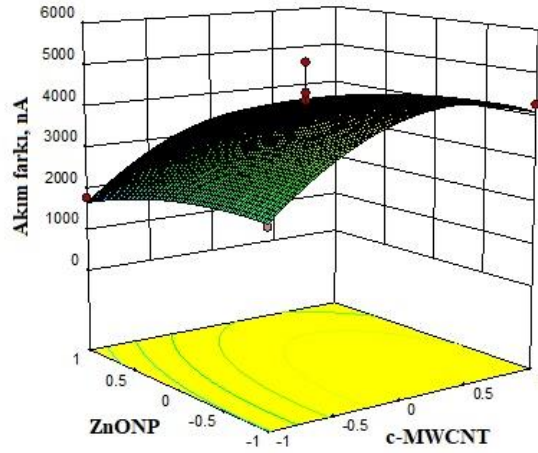
verilere uygulanmasının uygun olduğunu gösterdi. R^2 değeri (0,8429) de elektrot cevabının model ile uyumlu olduğunu gösterdi.

Çizelge 4.13 c-MWCNT-ZnO için 2²-faktöriyel MKT verileri ile ANOVA

Kaynak	β	SS	df	MS	F değeri	P değeri	
Model	4128,64	1,398×10 ⁷	5	2,796×10 ⁶	7,51	0,0098	anlamlı
A	764,14	4,671×10 ⁶	1	4,671×10 ⁶	12,55	0,0094	anlamlı
B	-451,86	1,633×10 ⁶	1	1,633×10 ⁶	4,39	0,0745	
AB	-57,33	1,314×10 ⁴	1	1,314×10 ⁴	0,035	0,8563	
A ²	-1042,03	7,554×10 ⁶	1	7,554×10 ⁶	20,29	0,0028	anlamlı
B ²	-260,68	4,727×10 ⁵	1	4,727×10 ⁵	1,27	0,2970	
Artık		2,606×10 ⁶	7	3,723×10 ⁵			
Uyumsuzluk		3,486×10 ⁵	3	1,162×10 ⁵	0,21	0,8875	anlamlı değil
Saf hata		2,257×10 ⁶	4	5,643×10 ⁵			
Toplam kor,		1,659×10 ⁷	12				
R² = 0,8429							

SS: kareler toplamı; df: serbestlik derecesi; MS: kareler ortalaması; $F_{\text{value}} = MS_{\text{faktor}}/MS_{\text{hata}}$; P değeri: olasılık seviyesi.

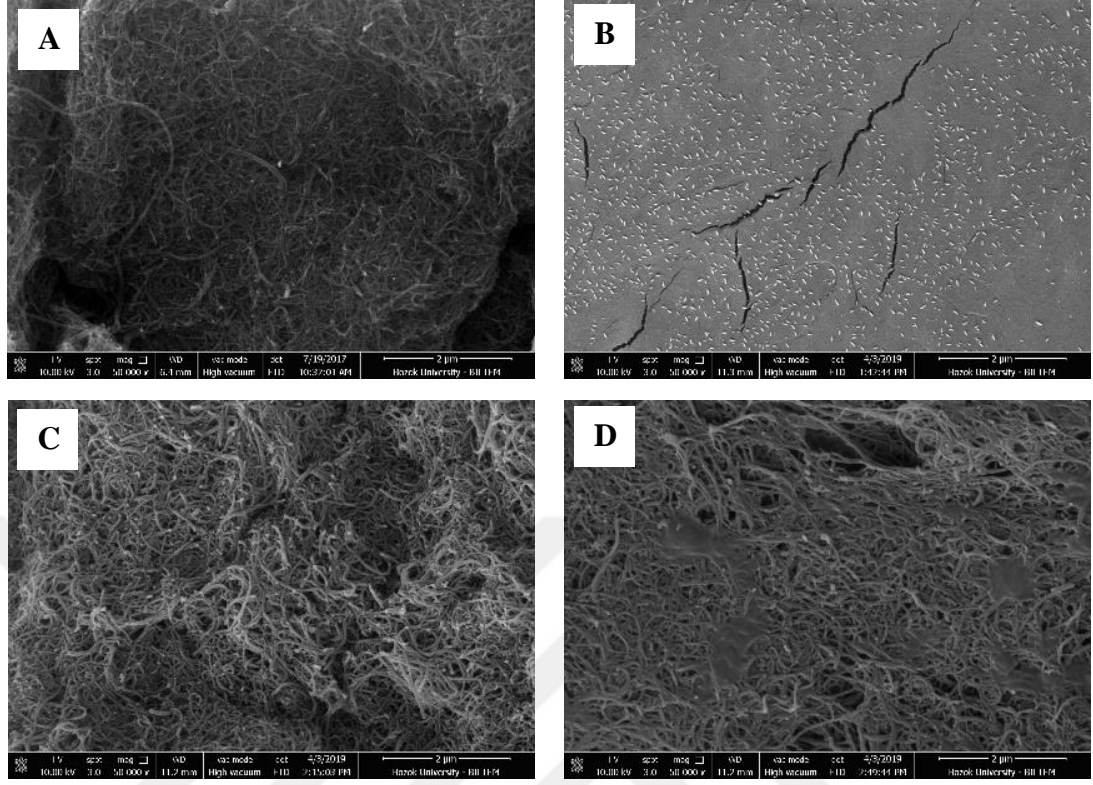
Şekil 4.74, GCE yüzeyini modifiye etmede kullanılan c-MWCNT ve ZnONP miktarlarının +0,70 V potansiyelde $2,0 \times 10^{-4}$ M H₂O₂ çözeltisine verdiği amperometrik cevapla ilişkisini gösteren cevap yüzey eğrisini göstermektedir. ANOVA çizelgesi incelendiğinde, c-MWCNT miktarının birinci ve ikinci dereceden terimlerinin anlamlı olduğu görüldü. Bu durum, amperometrik akım cevabının, c-MWCNT miktarı ile bir eğri oluşturacak şekilde değiştiğini göstermektedir. ZnONP ile ilgili terimlerin ise, ZnONP ile çalışılan derişim aralığında doğrusal olarak değiştiği ve ANOVA çizelgesinde cevap akımı üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı görüldü. İki değişkenin de yer aldığı ikinci derece denklemin her bir değişken için türevinin alınması ile 1 mL kitosan çözeltisinde c-MWCNT ve ZnONP için sırasıyla 28,4 mg ve 0,4 mg değerleri elde edildi. Elde edilen bu değerler H₂O₂ cevabının en yüksek olduğu duruma karşı geldiğinden elektrot yüzey bileşimi için optimum miktarlar olarak kabul edildi.



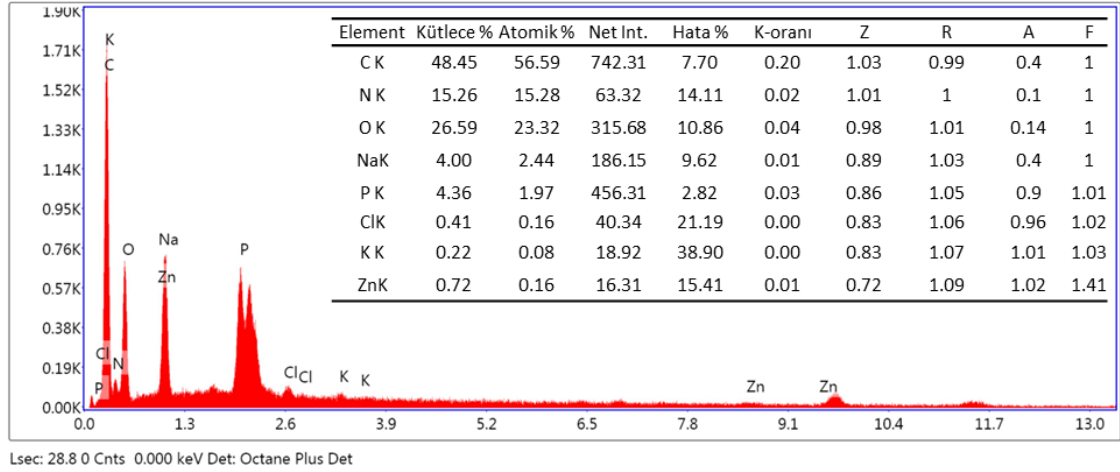
Şekil 4.74 ZnONP-c-MWCNT/GCE'nin yüzey bileşimi optimizasyonunda elde edilen cevap yüzey eğrisi (+0,70 V ve $2,0 \times 10^{-4}$ M H_2O_2 içeren 0,025 M fosfat tampon çözeltisinde)

4.8.2 Yüzey karakterizasyonu

ZnONP, c-MWCNT ve GOx'ın GCE yüzeyine modifikasyonu sırasında, kullanılan malzemelerin ayrı ayrı ve bir arada olduğu durumların yüzey morfolojisine etkisini belirlemek için Şekil 4.75'de verilen SEM görüntülerinden yararlanıldı. Şekil 4.75.A'da c-MWCNT'nin karakteristik yapısı ve Şekil 4.75.B'de ZnONP'nin iğne şeklinde tanecik yapısı görülmektedir. Şekil 4.75.C'de ağ şeklindeki ipliksi yapıların içinde iğne şeklinde taneciklerin bulunması, yüzeyde iki bileşenin bir arada bulunduğunu ve homojen biçimde yüzeye kaplandığını göstermektedir. Şekil 4.75.D ise enzimin modifiye elektrot yüzeyine başarılı bir şekilde immobilize olduğunu göstermektedir. Bu görüntü, ZnONP-c-MWCNT/GCE'nin GOx immobilizasyonu için uygun bir ortam oluşturduğu şeklinde yorumlandı. Şekil 4.76'de, GOx/ZnONP-c-MWCNT kompozitine ait EDX spektrumu ve elementel bileşim çizelgesi verildi. Spektrum ve çizelge incelendiğinde, elektrot yüzeyinde Zn, K, Cl, S, P, Na, O, N ve C elementlerinin bulunduğu görülmektedir. Bu durum, elektrot yüzeyinin GOx/ZnONP-c-MWCNT kompoziti ile başarılı bir şekilde kaplandığını göstermektedir.



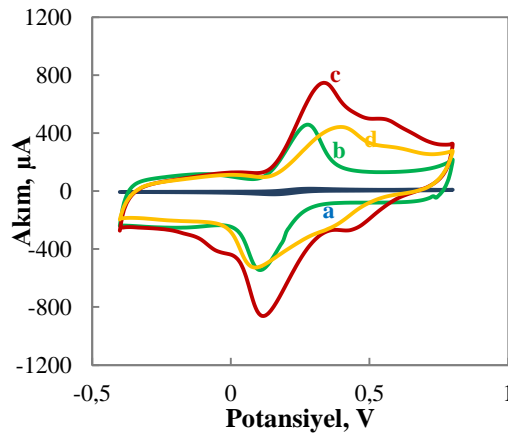
Şekil 4.75 SEM görüntüleri: (A) c-MWCNT/GCE, (B) ZnONP/GCE, (C) ZnONP-c-MWCNT/GCE ve (D) GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE



Şekil 4.76 GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE için EDX spektrumu ve elementel bileşim çizelgesi

4.8.3 Elektrokimyasal karakterizasyon

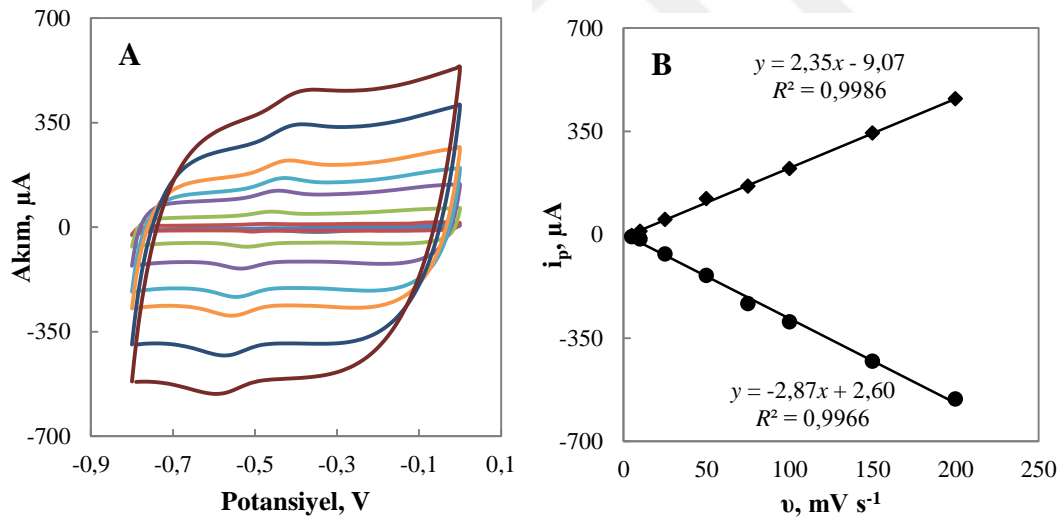
Elektrokimyasal davranışlarını belirlemek amacıyla, (a) ZnONP/GCE, (b) c-MWCNT/GCE, (c) ZnONP-c-MWCNT/GCE ve (d) GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE'lerin CV'leri 50 mV s^{-1} tarama hızında redoks probunda kaydedildi (Şekil 4.77). Şekilden görüldüğü gibi, c-MWCNT/GCE'nin (eğri b) pik akımı, ZnONP/GCE'nin (eğri a) pik akımına göre oldukça yüksektir. Bu, c-MWCNT'nin iyi bir elektrik iletkenliğine sahip olduğu bilindiğinden, beklenen bir durumdur. c-MWCNT-ZnONP/GCE'nin pik akımının (eğri c) oldukça yüksek olduğu görüldü. ZnONP/GCE'ye ait eğride oldukça düşük bir akım görülmesine rağmen, c-MWCNT ile birlikte kullanıldığında, zaten yüksek olan c-MWCNT/GCE pik akımının daha da artması, iki malzemenin bir arada oldukça iyi elektrokimyasal özellikler sergilemesinden kaynaklandığı düşünüldü. Bu durum da, çalışılan derişim aralığında 2^2 -faktöriyel MKT ile ZnONP miktarlarının akım cevabı üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığına görülmüş olmasına rağmen, söz konusu malzemelerin bir arada olduğunda ortaya çıkan sinerjik etkiden kaynaklandığı şeklinde yorumlanabilir. c-MWCNT-ZnONP/GCE'ye GOx immobilizasyonu ile oluşturulan GOx/c-MWCNT-ZnONP/GCE'nin pik akımının düşmesi, GOx'ın yalıtkan yapısı ile elektriksel iletkenliği azalttığı şeklinde değerlendirildi.



Şekil 4.77 Dönüşümlü voltamogramlar: (a) ZnONP/GCE, (b) c-MWCNT/GCE, (c) ZnONP-c-MWCNT/GCE ve (d) GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE (50 mV s^{-1} tarama hızında $0,10 \text{ M KCl}$ içeren $5,0 \text{ mM Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ redoks probunda)

Biyosensörün elektrokimyasal davranışının tarama hızı ile nasıl değiştiğini belirlemek amacıyla, bu biyosensörün çalışılan tampon çözelti ortamında 5-200 mV s^{-1} tarama hızında CV'leri kaydedildi ve Şekil 4.78.A'da verildi. Bölüm 4.1.3'te anlatılan Laviron eşitliği, bu grafikler kullanılarak biyosensörün elektron aktarım hızının belirlenmesine olanak tanır. Bu yöntemle, 50, 75, 100 ve 150 mV s^{-1} tarama hızlarında, GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE için ortalama k_s , $0,29 \pm 0,08 \text{ s}^{-1}$ olarak hesaplandı.

Şekil 4.78.B farklı tarama hızlarında elde edilen anodik ve katodik pik akımlarının tarama hızı ile değişimini göstermektedir. Bu değişimin doğrusal olması elektrot yüzeyindeki elektrot aktarım mekanizmasının yüzey kontrollü olduğunu göstermektedir. Bu grafikte elde edilen, katodik pik akımının tarama hızına karşı değişiminin doğrusal eşitliği kullanılarak c-MWCNT-ZnONP/GCE yüzeyine immobilize edilen GOx miktarı, Bölüm 4.1.3'te anlatılan Lavironun 2. eşitliği ile belirlendi. GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE için Γ değeri $1,08 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-2}$ olarak hesaplandı.



Şekil 4.78 A. GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE'nin çeşitli tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogramları ve B. pik akımlarının tarama hızı ile değişimi (0,10 M KCl içeren 0,025 M pH 8,0 fosfat tampon çözeltisinde)

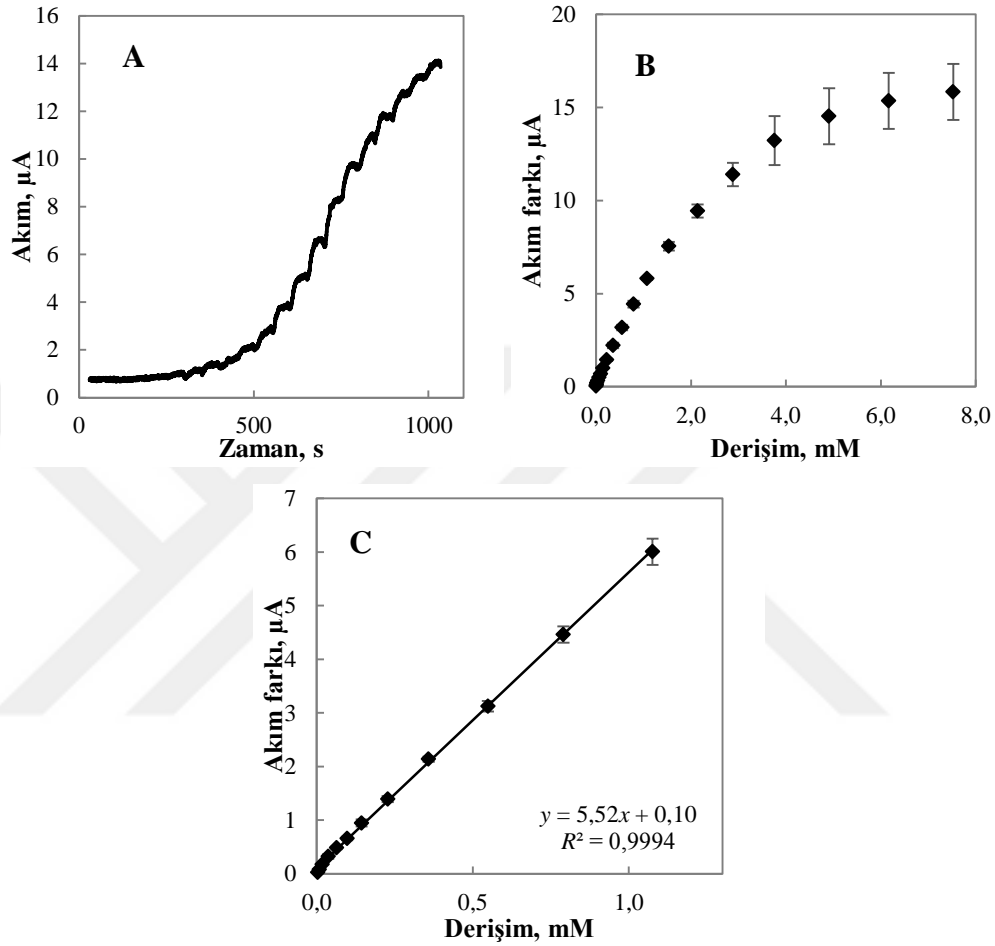
4.8.4 Performans faktörleri

4.8.4.1 Doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı ve duyarlık

GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE'nin glukoz cevabını belirlemek amacıyla, bu biyosensör ile kronoamperometrik olarak belirlenen glukoz cevabına ait akım-zaman ve akım farkı-derişim grafikleri sırasıyla Şekil 4.79.A ve Şekil 4.79.B'de verildi. Kalibrasyon grafiklerinden (Şekil 4.79.C) yararlanılarak GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE'nin doğrusal çalışma aralığı ve duyarlığı bulundu. GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE'nin doğrusal çalışma aralığı $3,0 \times 10^{-6} - 1,1 \times 10^{-3}$ M ve duyarlığı $5,52 \mu\text{A mM}^{-1}$ ($77,75 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$) olarak belirlendi. GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE için bulunan duyarlık, literatürde ZnO nanomalzemeleri ile glukoz tayini için hazırlanan birçok biyosensörden yüksektir: $13,3 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Zhao vd. 2007); $21,7 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Kong vd. 2009); $25,7 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Yang vd. 2010); $10,03 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Hu vd. 2011); $17,72 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Jung ve Lim, 2013); $3,26 \mu\text{A mM}^{-1}$ (Zhang vd. 2013) ve $3,90 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Zhou vd. 2019). Ayrıca ZnO nanomalzemeler ile hazırlanan daha yüksek duyarlığa sahip biyosensörler de rapor edilmiştir: $110,76 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Ahmad vd. 2012); $210,8 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Ahmad vd. 2016); $116,64 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Fan vd. 2016) ve $231,7 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (Muthuchamy vd. 2018). Bu çalışmada bulunan doğrusal çalışma aralığının, glukoz tayini için literatürdeki ZnO nanomalzemeleri ile hazırlanan biyosensörlerin birçoğu için elde edilen doğrusal çalışma aralığından daha geniş veya bu aralıklara yakın olduğu görüldü: $5,0 \times 10^{-6} - 3,0 \times 10^{-4}$ M (Liu vd. 2009); $1,0 \times 10^{-5} - 2,5 \times 10^{-4}$ M ve $3,0 \times 10^{-4} - 7,0 \times 10^{-4}$ M (Yang vd. 2010); $6,67 \times 10^{-6} - 1,29 \times 10^{-3}$ M (Hu vd. 2011); $1,0 \times 10^{-4} - 9,0 \times 10^{-3}$ M (Zhai vd. 2011); $1,0 \times 10^{-5} - 5,0 \times 10^{-3}$ M (Fan vd. 2016) ve $2,0 \times 10^{-4} - 1,2 \times 10^{-2}$ M (Muthuchamy vd. 2018).

GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE'nin LOD değeri $2,9 \times 10^{-6}$ M ve LOQ değeri $9,8 \times 10^{-6}$ M, olarak belirlendi. LOD değeri, literatürde verilen ZnO nanomalzemeleri ile glukoz tayini için hazırlanan diğer bazı biyosensörün LOD değerlerinden düşük ($2,0 \times 10^{-5}$ M (Zhao vd. 2007); $1,0 \times 10^{-5}$ M (Yang vd. 2010); $< 2,0 \times 10^{-5}$ M (Jung ve Lim, 2013); $5,0 \times 10^{-5}$ M (Ahmad vd. 2016) ve $6,3 \times 10^{-6}$ M (Muthuchamy vd. 2018)) veya bu değerler ile yakın değerde ($3,0 \times 10^{-6}$ M (Liu vd. 2009) ve $2,2 \times 10^{-6}$ M (Hu vd. 2011)) olduğu

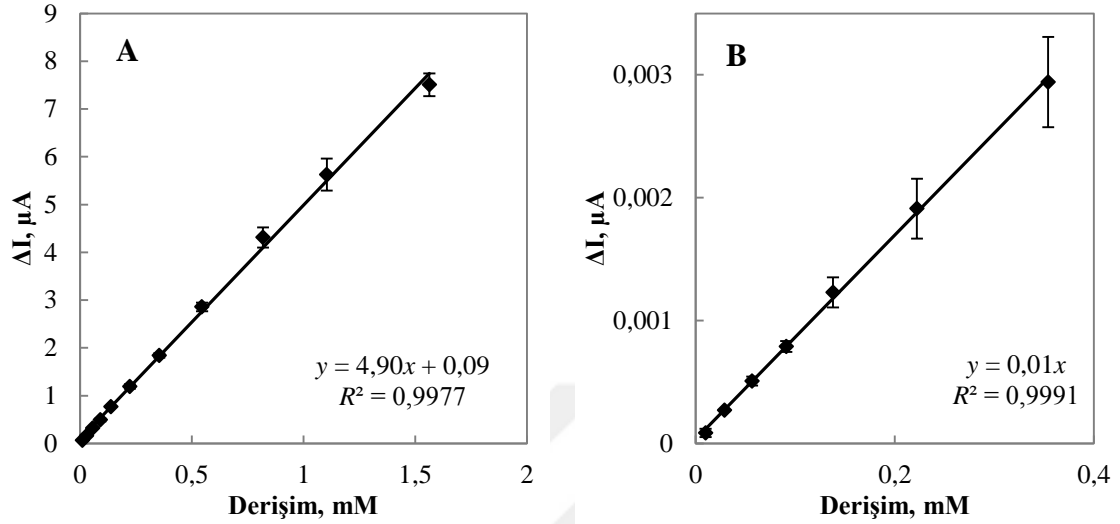
görüldü. Literatürde bu çalışmada bulunandan daha yüksek LOD değerleri de mevcuttur: 1×10^{-7} M (Ahmad vd. 2012), 6×10^{-7} M (Zhang vd. 2013) ve 5×10^{-7} M (Zhou vd. 2019). Elde edilen sonuçların literatüre katkı yapabileceği düşünüldü.



Şekil 4.79 GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE cevabına glukoz derişiminin etkisi A. Akım-zaman grafiği. B. Akım farkı-derişim grafiği ve C. kalibrasyon grafiği ($N=3$; 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,70 V)

ZnONP ve c-MWCNT'nin bir arada olmasının biyosensör cevabına olumlu bir etki yapıp yapmadığını belirlemek amacıyla, optimum miktarları ile hazırlanan A. GOx/c-MWCNT/GCE ve B. GOx/ZnONP/GCE'nin kalibrasyon grafikleri çizildi ve Şekil 4.80'de verildi. GOx/c-MWCNT/GCE için doğrusal çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-5} - 1,6 \times 10^{-3}$ M ve duyarlık $4,90 \mu\text{A mM}^{-1}$; GOx/ZnONP/GCE için ise doğrusal çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-5} - 3,5 \times 10^{-4}$ M ve duyarlık $0,01 \mu\text{A mM}^{-1}$ olarak belirlendi. GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE'nin duyarlık ve çalışma aralığının, bu iki biyosensörden daha iyi olduğu

görüldü. Bu durumda, bu iki malzemenin bir arada kullanılmasının, biyosensör cevabı açısından avantajlı olduğu düşünüldü.



Şekil 4.80 Kalibrasyon grafikleri A. GOx/c-MWCNT/GCE ve B. GOx/ZnONP/GCE (N=3; 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,70 V)

4.8.4.2 Cevap süresi

GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE'nin glukoz cevabını belirlemek için oluşturulan *i-t* grafiklerinden yararlanılarak, bu biyosensörün cevap süresi hesaplandı. Bölüm 3.7.3'te anlatıldığı gibi belirlenen cevap süresinin ortalama 20 s olduğu gözlemlendi.

4.8.4.3 Michaelis-Menten sabiti (K_M)

Michaelis-Menten sabitini (K_M) belirlemek için, Bölüm 3.7.4'te anlatıldığı gibi, Lineweaver-Burk grafiğinden ($1/[\text{Glukoz}] - 1/[\Delta i]$) yararlanıldı ve GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE için hesaplanan K_M değeri 0,39 mM olarak bulundu. Literatürde ZnO nanomalzemeleri ile glukoz tayini için hazırlanan bazı biyosensörler ile bulunan K_M değerleri 21 mM (Zhao vd. 2007); 19 mM (Kong vd. 2009); 1,95 mM (Yang vd. 2010); 2,48 mM (Hu vd. 2011); 3,11 mM (Zhai vd. 2011); 2,09 mM, 3,09 mM ve 1,37 mM (Jung ve Lim, 2013); 0,41 mM (Zhang vd. 2013); ~3,2 mM (Ahmad vd. 2016) ve 6,26 mM (Zhou vd. 2019) olarak rapor edilmiştir. Literatürde verilen bu değerler ile bu

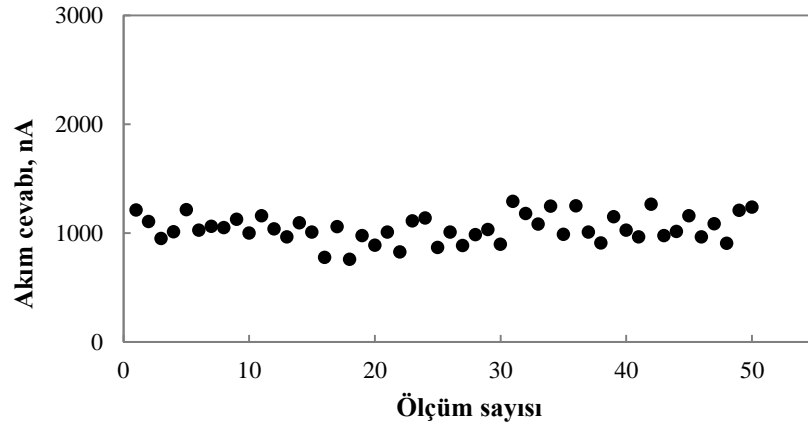
çalışmada bulunan K_M değeri karşılaştırıldığında, bulunan değerin literatürde verilen değerlerden düşük olmasındaki en büyük etkinin, GCE yüzeyini modifiye etmede kullanılan ZnONP-c-MWCNT kompozitinin, GOx'ın glukozu karşı ilgisine olumlu bir etki yaptığı şeklinde yorumlanabilir.

4.8.4.4 Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik

Bölüm 3.7.5'te anlatıldığı gibi, GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE ile ard arda üç kalibrasyon eğrisi çizilerek elde edilen eğrilerin duyarlıklarından, bağıl standart sapma %3,1 olarak bulundu. Ayrıca, tekrar üretilebilirliğini belirlemek için aynı şartlarda üç farklı GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE hazırlandı ve Bölüm 3.7.6'da anlatıldığı gibi, her bir GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE ile çizilen kalibrasyon eğrilerinin duyarlıklarından hesaplanan bağıl standart sapma %3,1 olarak bulundu. Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik için bağıl standart sapma değerlerinin düşük olması, GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE'nin ard arda kullanılabilmesi ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilecek şekilde üretilebilmeye uygun olduğunu gösterdi.

4.8.4.5 Kararlılık

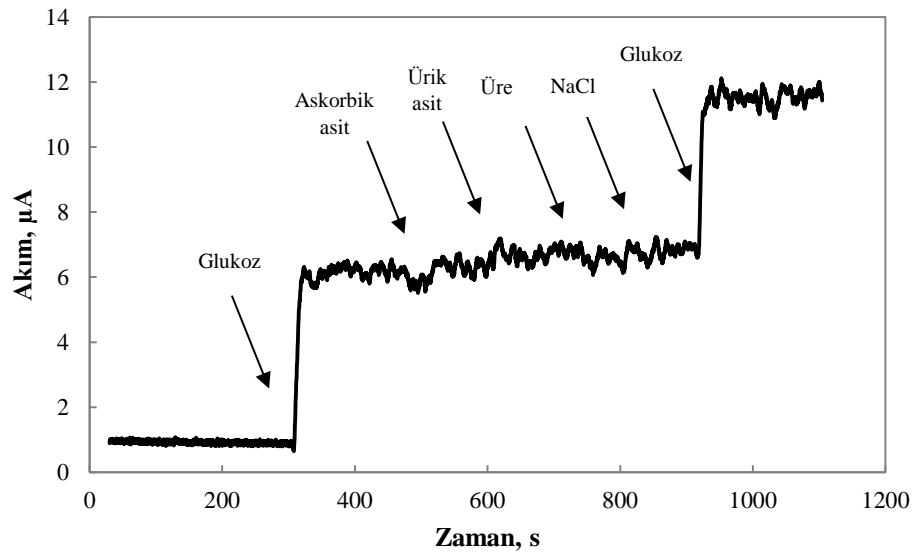
GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE'nin cevabının, kullanım sıklığı ile nasıl değiştiğini belirlemek için, biyosensörün optimum çalışma koşullarında sabit glukoz derişiminde ard arda ölçümler ile amperometrik akım cevabı ölçüldü. GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE'nin 50 ölçüm boyunca glukozu verdiği amperometrik cevaplar grafiğe geçirildi ve Şekil 4.8.21'de verildi. GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE'nin glukoz cevabının, 50 ölçüm süresince elde edilen bağıl standart sapması %12,2 olarak hesaplandı.



Şekil 4.81 GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE'nin kararlılığı

4.8.4.6 Bozucu türlerin etkisi

GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE'nin substrat seçiciliğini belirlemek için askorbik asit, ürik asit, üre ve NaCl'nin biyosensörlerin cevabına etkisi, Bölüm 3.7.9'da anlatıldığı gibi, belirlendi. 1,00 mM glukoz cevabına karşı 0,02 mM askorbik asit, ürik asit, üre ve NaCl'nin etkisi, kronoamperometrik yöntem ile çizilen *i-t* grafiğinden yararlanılarak incelendi (Şekil 4.83). Askorbik asit, ürik asit, üre ve NaCl'nin GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE'nin cevabına sırası ile %2,2, %4,3, %0,2 ve %3,8 girişim yaptığı belirlendi.



Şekil 4.82 GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE'nin cevabına bozucu türlerin etkisi

4.9 Gerçek Numune Analizi

Serum numunelerinde yaygın olarak bulunan bozucu türlerin biyosensör cevabı üzerine etkisi belirlendikten ve bu türlerin biyosensörlerin cevabı üzerine belirgin bir etkisinin olmadığı görüldükten sonra, her bir biyosensör kan serum örneklerinde glukoz tayininde kullanıldı ve elde edilen sonuçlar spektrofotometrik yöntemle elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı.

Serum numunelerinde glukoz tayini için standart katma yöntemi kullanıldı. Bu amaçla, biyosensörlerin her biri için 10 µL serum numunesi içeren 5,0 mL 0,025 M pH 8,0 fosfat tamponunda +0,70 V'ta akım cevapları kaydedildikten sonra, ortama ard arda glukoz çözeltilerinden uygun miktarda ilave edildi. Elde edilen kalibrasyon grafikleri kullanılarak serum numunelerinde glukoz derişimi belirlendi ve biyosensörlerle elde edilen sonuçlar, spektrofotometrik referans yöntem ile karşılaştırıldı. Çizelge 4.14, referans yöntem ve her bir biyosensör ile elde edilen sonuçları göstermektedir. Bu sonuçlar, üç ölçümün ortalaması olarak verildi. Her bir biyosensörle elde edilen glukoz sonuçlarına karşı referans yöntemle elde edilen sonuçlara ait doğrusal eşitlikler de aynı çizelgede verildi. Bu eşitlikler incelendiğinde referans yöntemle elde edilen sonuçlarla biyosensörlerle elde edilenler arasında iyi bir ilişki (eğimlerin 1 civarında olması) olduğu gözlemlendi.

Ayrıca, her bir biyosensör ile elde edilen glukoz sonuçları ile, referans yöntem ile elde edilenler arasında anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek için veri çifti *t* testi kullanıldı. Deneysel *t* değerleri her bir biyosensör için Çizelge 4.14'te verildi. %95 güven seviyesinde, serbestlik derecesi 4 için 2,78 olan kritik *t* değeri ile karşılaştırıldığında, deneysel *t* değerlerinin bu değerden küçük olduğu görüldü. Bu durum da, her bir biyosensör ile elde edilen sonuçlarla, referans yöntem ile elde edilen sonuçlar arasında %95 güven seviyesinde anlamlı bir fark olmadığını gösterdi. Sonuç olarak, hazırlanan 8 biyosensörün serumda glukoz tayini için başarılı bir şekilde kullanılabileceği kanaatine varıldı.

Çizelge 4.14 Serum örneklerinde referans yöntem ve GOx/MONP-c-MWCNT/GCE ile elde edilen sonuçlar

	Glukoz mg mL ⁻¹					<i>t</i> _{deneysel}
	Referans değerler ^a	83	89	88	94	
Biyosensör/ Regresyon eşitliği^b						
GOx/TiO₂NP-c-MWCNT/GCE <i>y</i> = 1,11 <i>x</i> - 8,53 (<i>R</i> ² = 0,9644)	83,4±0,2	90,2±0,5	88,6±0,7	98,2±4,9	101,3±0,5	2,08
GOx/Co₃O₄NP-c-MWCNT/GCE <i>y</i> = 1,00 <i>x</i> + 0,02 (<i>R</i> ² = 0,9977)	83,6±0,3	89,5±0,1	87,8±0,2	94,3±0,5	100,5±0,3	2,51
GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE <i>y</i> = 0,94 <i>x</i> + 5,75 (<i>R</i> ² = 1)	83,9±0,4	89,5±0,3	88,6±0,6	94,3±0,3	99,9±0,3	2,70
GOx/SnO₂NP-c-MWCNT/GCE <i>y</i> = 1,02 <i>x</i> - 1,61 (<i>R</i> ² = 0,9973)	83,3±0,3	88,6±1,2	88,4±0,7	94,2±0,7	100,6±0,5	1,36
GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE <i>y</i> = 1,01 <i>x</i> - 0,77 (<i>R</i> ² = 0,9973)	82,9±1,0	89,7±0,6	88,7±0,4	94,4±0,6	100,3±0,6	2,53
GOx/Al₂O₃NP-c-MWCNT/GCE <i>y</i> = 0,92 <i>x</i> + 7,72 (<i>R</i> ² = 0,9992)	84,3±0,6	89,5±0,4	88,5±0,6	94,4±0,1	99,8±1,1	2,14
GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE <i>y</i> = 0,99 <i>x</i> + 0,88 (<i>R</i> ² = 0,9980)	83,5±0,4	89,6±0,5	87,9±0,8	94,4±0,3	100,3±0,8	2,59
GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE <i>y</i> = 0,93 <i>x</i> + 7,08 (<i>R</i> ² = 0,9920)	83,6±0,2	90,4±0,8	88,7±0,5	94,6±0,1	99,4±1,2	1,65

^a Referans değerler kan numunelerinin alındığı laboratuvarında spektrofotometrik yöntemle elde edilmiştir.

^b biyosensörle bulunan glukoz değerlerine karşı referans değerler arasındaki regresyon eşitliği

5. SONUÇLAR

Glukoz biyosensörlerinin hazırlanmasında, c-MWCNT ile birlikte sekiz adet MONP (TiO_2NP , $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$, SnO_2NP , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NP}$, $\text{Al}_2\text{O}_3\text{NP}$, CuONP ve ZnONP) ve GOx kullanıldı. Bu bileşenlerin yüzeydeki miktarlarının optimizasyonu önemli olduğundan denenen çeşitli optimizasyon yöntemlerinden elde edilen sonuçlardan çıkarılan yorumlar aşağıda verildi.

- Tek seferde tek değişken yöntemi ile yapılan optimizasyonda, modifikasyon malzemelerinin miktarlarını optimize etmek için belirlenen derişim aralığında, miktarlara karşı akım ölçüldüğünde, bir maksimum elde edildiği ve miktar arttırıldığında akımın düşmeye başladığı görüldüğünden, optimum miktarların elde edildiği düşünöldü. Bu nedenle farklı bir derişim aralığı belirlemeye ihtiyaç duyulmadı ve elektrot modifikasyonu bu optimum bileşimde yapılarak biyosensör hazırlandı ve performans özellikleri belirlendi. Ancak, bu yöntemle elde edilen optimum miktarlar, 2^2 -faktöriyel MKT yaklaşımı ile doğrulanmak istendiğinde, ANOVA verilerinden elde edilen sonuçlar ile cevap yüzey eğrileri değerlendirildiğinde, çalışılan aralıkta MONP ve c-MWCNT miktarlarının akım cevabı üzerindeki etkisinin anlamlı olmadığı ve dolayısıyla bu aralığın değiştirilmesi gerektiği sonucuna varıldı.
- Tek seferde tek değişken yönteminde çalışılan TiO_2NP ve c-MWCNT derişim aralıklarında anlamlı sonuçlar elde edilemediğinden, çok daha geniş derişim aralıklarında çalışılarak, 2^2 -faktöriyel MKT yaklaşımı ile optimum miktarlar belirlendi. Tek seferde tek değişken yöntemi ile elde edilen optimum miktarlarla karşılaştırıldığında, bu derişim aralığının oldukça geniş bir aralığı kapsadığı görüldü. Sonuç olarak, elektrot yüzey bileşimi modifikasyonunda MKT'ın çok daha uygun olduğu kanaatine varıldı. Bu yolla yüzey bileşimi belirlenen elektrot ile glukoz biyosensörü oluşturmak için, yüzeye immobilize edilecek GOx miktarını belirlemede geleneksel tek seferde tek değişken yöntemi uygulandı. Tek seferde tek değişken yöntemi ile 2^2 -faktöriyel MKT yaklaşımı ile belirlenen optimum bileşimlerde hazırlanan biyosensörlerin performans özellikleri karşılaştırıldığında,

MKT ile yüzey bileşimi optimize edilen elektrottan oluşan biyosensörün performans özelliklerinin oldukça iyi olduğunun gözlenmesi, MKT'nin yüzey bileşimi optimizasyonunda etkin bir yöntem olduğu şeklinde değerlendirildi.

- Biyosensör hazırlanmasında, immobilize edilen enzim miktarının da biyosensör cevabına etkisinin önemli olduğu bilindiğinden, immobilize edilecek GOx miktarının da diğer bileşenler ile birlikte MKT yöntemi ile belirlenmesinden elde edilen sonuçların değerlendirilmesi gerektiği düşünüldü ve 2^3 -faktöriyel MKT yaklaşımı ile 3 bileşenin aynı anda elektrot yüzeyindeki miktar optimizasyonu yapıldı. Bu yöntemle elde edilen optimum miktarlar, 2^2 -faktöriyel MKT ile elde edilenlerle karşılaştırıldığında, c-MWCNT ve TiO_2NP 'lerin optimum miktarlarının birbirine çok yakın olduğu görüldü. Ayrıca, tek seferde tek değişken yöntemi ile bulunan GOx miktarı da 2^3 -faktöriyel MKT ile elde edilen miktara oldukça yakındı. Bu nedenle, 2^3 -faktöriyel MKT yöntemi ile bulunan optimum miktarlar kullanılarak hazırlanan biyosensörün performansı, diğer biyosensörün performansından biraz daha iyi olmasına rağmen, 2^3 -faktöriyel MKT ile, tasarımın her bir deneyinde enzim miktarı da değiştiğinden ve bu yöntemle tasarımda daha çok deney olduğundan, miktarı az ve pahalı olan enzimlerle çalışılacağı durumlarda, yüzey bileşimi optimizasyonunda daha çok enzim harcanan 2^3 -faktöriyel MKT'nin kullanılması yerine, 2^2 -faktöriyel MKT'nin kullanılmasının daha uygun olacağı şeklinde yorumlandı.
- Her bir biyosensör hazırlandığında, enzimin elektrot yüzeyinden uzaklaşmasını engellemek için yüzeye kaplanan Nafyonun da miktarının etkisini incelemek için, Nafyon miktarını da yeni bir değişken olarak düşünerek 2^4 -faktöriyel MKT yaklaşımı ile dört bileşenin (TiO_2NP , c-MWCNT, GOx ve Nafyon) de aynı anda elektrot yüzeyindeki miktarlarının optimizasyonu yapıldığında, Nafyon miktarının, çalışılan derişim aralığında anlamlı bir etkisinin olmadığı, bu nedenle tasarım oluştururken Nafyonun bir değişken olarak ele alınmasının gerekli olmadığı kanaatine varıldı. Bu yöntemle elde edilen optimum bileşimde hazırlanan biyosensörün duyarlılığının da, 2^2 - ve 2^3 -faktöriyel MKT ile elde edilenlere göre daha düşük olduğu belirlendi. Ayrıca, değişken sayısı arttıkça MKT yaklaşımları ile

elde edilen R^2 değerlerinin düştüğünün (2^4 -faktöriyel MKT ile R^2 değeri 0,7253) görülmesi, sonuçların doğruluktan uzaklaşabileceğini ve elde edilen sonuçların güvenilirliğinin azalabileceğini düşündürdü. Bu tasarım ile elde edilen sonuçlar kullanılarak hazırlanan biyosensörün performans özelliklerinin kısmen kötüleşmesi de bu düşünceyi güçlendirdi.

- Sekiz farklı MONP'ün kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin performansının karşılaştırılmasının amaçlandığı bu tez çalışmasında, yukarıda verilen yorumlar ışığında, diğer tüm biyosensörlerin yüzey bileşiminin optimizasyonunda 2^2 -faktöriyel MKT yönteminin kullanılmasının uygun olacağı değerlendirildi.

CuONP içeren glukoz biyosensörü hariç diğer GOx/MONP-c-MWCNT/GCE biyosensörlerinin her birinin yüzeyinde yer alan bileşenler dikkate alınarak hazırlanan (a) MONP/GCE, (b) c-MWCNT/GCE, (c) MONP-c-MWCNT/GCE ve (d) GOx/MONP-c-MWCNT/GCE'lerin, redoks probu ortamında dönüşümlü voltamogramlarından çıkarılan yorumlar şöyledir:

- MONP/GCE'lere ait CV'lerdeki pik akımlarının oldukça düşük; c-MWCNT/GCE için ise, oldukça yüksek pik akımlarına sahip olması MONP'lerin iletkenliğinin c-MWCNT'nin iletkenliğinden çok daha düşük olmasından kaynaklandığı şeklinde yorumlandı.
- MONP-c-MWCNT/GCE'ye ait pik akımlarının oldukça yüksek olması, bu iki malzemenin bir araya gelmesi ile bir sinerjik etkinin ortaya çıkmasından kaynaklandığı sonucuna varıldı. Bu sinerjik etkinin nedeninin, (i) sadece c-MWCNT ile modifiye edilen elektrotta malzemenin daha çok kümelenmesi sonucu yüzey alanının daha düşük olması; (ii) MONP'lerin c-MWCNT'nin kümelenmesini kısmen de olsa engellenmesi; elektrot yüzey alanının ve dolayısıyla iletkenliğinin daha da artması ve (iii) GOx'ın immobilizasyonu için MONP'lerin daha uygun bir ortam sağlaması olduğu düşünüldü.

- MONP-c-MWCNT/GCE'lerin yüzeyine GOx immobilize edilmesiyle hazırlanan GOx/MONP-c-MWCNT/GCE'lere ait eğrilerde ise pik akımlarının düşmesi GOx'ın yalıtkan ve büyük bir molekül olmasından dolayı elektriksel iletkenliği azaltmasından kaynaklandığı şeklinde açıklandı.
- GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE'lerin elektrokimyasal davranışının redoks probu ortamında incelenememesi redoks probundaki bileşenler ile CuONP'lerin reaksiyonundan ve redoks probuna ait olan tersinir piklerin kaybolmasının da oluşan yeni piklerin pik akımlarının oldukça yüksek olmasından ileri geldiği düşünüldü.

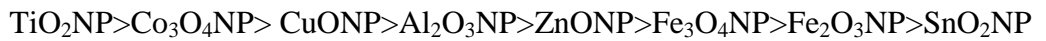
Ayrıca biyosensörlerin elektrokimyasal cevabına tarama hızının etkisinin incelenmesinden elde edilen yorumlar şöyledir:

- GOx/Fe₃O₄NP-c-MWCNT/GCE ve GOx/Fe₂O₃NP-c-MWCNT/GCE biyosensörlerinin çalışılan tampon çözelti ortamında alınan dönüşümlü voltamogramlarındaki GOx'a ait indirgenme ve yükseltgenme pik akımlarının tarama hızının karekökü ile doğrusal olarak değişmesi nedeniyle bu yüzey boyunca elektron aktarımının difüzyon kontrollü olduğu ve bunun yüzeyde bulunan Fe(III) türlerinin elektronların difüzenmesini kolaylaştırdığı şeklinde açıklandı.
- Diğer GOx/MONP-c-MWCNT/GCE'lerin çeşitli tarama hızlarında elde edilen pik akımlarının tarama hızına karşı grafiklerinin doğrusal olması ise elektron aktarımının yüzey kontrollü olduğu şeklinde değerlendirildi.
- Tüm biyosensörler için, tarama hızı ile pik akımı ve pik potansiyellerinin değişiminden yararlanılarak Laviron eşitliğinden, hesaplanan elektron aktarım hız sabitlerinin (Çizelge 5.1) literatürde verilen değerlerden çok daha düşük olması, MKT yöntemi ile belirlenen ve yüzeyde bulunan maddelerin miktarlarının oldukça fazla olması, oluşturulan biyosensörlerdeki modifikasyon tabakasının kalın ve dolayısıyla elektron aktarımının daha yavaş olmasından kaynaklanabileceği varsayıldı.

- GOx/MONP-c-MWCNT/GCE'ler için bulunan I değerleri, çıplak elektrot yüzeyine immobilize edilen GOx tek katmanı için teorik değer olan $2,86 \times 10^{-12}$ değerinden daha yüksek olması, modifikasyon malzemelerinin geniş yüzey alanı sağlamasına ve elektron aktarım kabiliyetlerinin yüksek olmasına bağlanabilir. Bu durum, her bir biyosensör için kullanılan modifikasyonun enzim immobilizasyonu için yararlı olduğu; biyouyumluluğunun yüksek olduğu ve GOx'ın biyoaktivitesinin korunabileceği şeklinde yorumlandı.

Yüzey bileşimi 2^2 -faktöriyel MKT ile optimize edilen tüm GOx/MONP-c-MWCNT/GCE glukoz biyosensörleri için bulunan performans faktörleri (Çizelge 5.1) ve çeşitli MONP'ler kullanılarak hazırlanan biyosensörlerinki (Çizelge 5.2) ile karşılaştırılarak yorumlanması aşağıda verildi:

- Her bir MONP ile hazırlanan glukoz biyosensörlerinin duyarlılığının literatürde bulunan pek çok glukoz biyosensörününkinden daha iyi; çalışma aralığının daha geniş olması, MONP ve c-MWCNT'den oluşan kompozit materyalin elektrot modifikasyonu için iyi bir malzeme olduğunun göstergesidir. Ayrıca, ilgili performans özelliklerindeki bu iyileşmenin, elektrot modifikasyonunda kullanılan malzemelerin optimum miktarlarının doğru bir şekilde belirlenmesinde etkin bir yöntem olan 2^2 -faktöriyel MKT yönteminin kullanılmasından da kaynaklanabileceği varsayıldı.
- Çalışmada hazırlanan ve Çizelge 5.1'de verilen glukoz biyosensörlerinin duyarlılıkları karşılaştırılması ve MONP'lere göre biyosensörlerin duyarlılıklarının değişiminin aşağıdaki gibi olduğu görüldü:



Bu çalışmada kullanılan MONP'lerden TiO_2NP ve $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ ile oluşturulan glukoz biyosensörlerinin en iyi performans özelliklerine sahip olduğu gözlemi, literatürdeki bu iki nanomalzemenin performans özelliklerini iyileştirdiği şeklindeki yorumlarla uyumludur. Duyarlık sırasının bu şekilde değişimine ayrıntılı bir açıklama getirilmemiş

olmasına rağmen, bu sıranın nanomalzemelerin boyutlarından; yapısal özelliklerinden; her birinin iletkenliğinin farklı olmasından; GOx'ın yüzeye immobilizasyonu sırasında bu nanomalzemelerle etkileşiminden; bu nanomalzemeleri çözmede kullandığımız –NH₂ grupları içeren polimerik yapıdaki kitosanın MONP'lerdeki metal iyonlarıyla farklı şekilde etkileşmesinden ve elektron aktarım mekanizmalarının farklı olmasından kaynaklanabilir.

- Bazı MONP'lerin miktarlarının biyosensör cevabı üzerine anlamlı etkisinin olmadığı, MKT ile belirlenmiş olmasına rağmen, bu MONP'lerin de c-MWCNT ile birlikte kullanılması durumunda biyosensörün performansının iyileşmesinin, MONP ile c-MWCNT bir arada olduğunda her bir bileşenin kümelenmesinin daha az olabileceği ve daha homojen bir süspansiyon elde edileceği; yani iki malzemenin bir arada bulunduğu kaynaklanan sinerjik etkiden ileri geldiği şeklinde değerlendirildi.
- GOx/MONP-c-MWCNT/GCE'lerin glukozu cevap sürelerinin 20 s gibi düşük bir süre olması, bu biyosensörlerin rutin glukoz tayininde kolaylıkla kullanılabileceğini gösterir.
- Tüm biyosensörlerin tekrarlanabilirliğinin ve tekrar üretilebilirliğinin yüksek olması, her birinin arda arda kullanılmaya ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilecek şekilde üretilebilmeye uygun olduğu şeklinde değerlendirildi.
- Kan serumunda bulunan ve bazılarının elektroaktif olduğu bilinen bazı türlerin (askorbik asit, ürik asit, üre ve NaCl) bu çalışmada hazırlanan sekiz biyosensörün cevabına da önemli bir etki yapmamasının hem kullanılan MONP-c-MWCNT kompozit materyalinden uygunluğundan, hem de GOx'ın izoelektrik noktası 4,2 olduğundan çalışılan pH'da elektrot yüzeyinin negatif yüklü olması ve bu pH'da ürik asit ve askorbik asitin de anyonik formda bulunması nedeniyle, bu türlerin elektrot yüzeyine elektrostatik itmelerden dolayı yaklaşmamasından kaynaklandığı sonucuna varıldı.

- Her bir biyosensör kullanılarak serumda tayin edilen glukoz miktarları ile referans yöntemle bulunanlar arasında oldukça iyi bir ilişki (eğimlerin 1 civarında) olması ve veri çifti t testi ile irdelenen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmaması, hazırlanan sekiz biyosensörün serumda glukoz tayininin başarılı bir şekilde rutin tayininde kullanılabileceğini gösterdi.
- Hazırlanan her bir biyosensör ile glukoz tayini için geliştirilen yöntemin duyarlık, seçicilik, kararlılık ve hızlı cevap gibi performans faktörlerinin iyi olması ve serum numunelerine herhangi bir ön işlem uygulanmasına gerek olmaması referans yöntem için iyi bir alternatif sunabileceğini gösterdi.



Çizelge 5.1 GOx/MONP-c-MWCNT/GCE biyosensörleri için performans faktörleri

Biyosensör	Duyarlık ($\mu\text{A mM}^{-1}$)	Doğrusal aralık (mol L^{-1})	TK (%BSS)	TÜ (%BSS)	LOD (mol L^{-1})	Kararlılık (%BSS)	K_M (mM)	k_s (s^{-1})	Γ (mol cm^{-2})
GOx/TiO ₂ NP-c-MWCNT/GCE	9,36	$2,0 \times 10^{-5} - 2,3 \times 10^{-3}$	1,04	2,39	$3,2 \times 10^{-6}$	10,95	0,28	0,49±0,09	$1,41 \times 10^{-8}$
GOx/Co ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE	7,42	$3,0 \times 10^{-6} - 2,9 \times 10^{-3}$	1,79	0,70	$1,0 \times 10^{-6}$	9,00	0,30	0,37±0,11	$1,14 \times 10^{-8}$
GOx/Fe ₃ O ₄ NP-c-MWCNT/GCE	5,49	$3,0 \times 10^{-6} - 2,1 \times 10^{-3}$	3,04	1,62	$2,2 \times 10^{-6}$	9,56	0,40	0,28±0,08	$2,15 \times 10^{-8}$
GOx/SnO ₂ NP-c-MWCNT/GCE	4,90	$3,0 \times 10^{-6} - 2,1 \times 10^{-3}$	0,94	0,32	$2,5 \times 10^{-6}$	8,12	0,51	0,48±0,02	$7,14 \times 10^{-9}$
GOx/Fe ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE	5,43	$3,0 \times 10^{-6} - 1,5 \times 10^{-3}$	3,70	3,39	$2,6 \times 10^{-6}$	9,56	0,84	0,10±0,05	$1,56 \times 10^{-8}$
GOx/Al ₂ O ₃ NP-c-MWCNT/GCE	6,02	$3,0 \times 10^{-6} - 2,1 \times 10^{-3}$	4,81	5,55	$2,9 \times 10^{-6}$	15,45	0,87	0,46±0,04	$7,66 \times 10^{-9}$
GOx/CuONP-c-MWCNT/GCE	6,25	$3,0 \times 10^{-6} - 1,1 \times 10^{-3}$	3,99	4,00	$2,8 \times 10^{-6}$	13,62	2,27	0,33±0,02	$6,20 \times 10^{-9}$
GOx/ZnONP-c-MWCNT/GCE	5,52	$3,0 \times 10^{-6} - 1,1 \times 10^{-3}$	3,12	1,29	$2,9 \times 10^{-6}$	12,24	0,39	0,29±0,08	$1,08 \times 10^{-8}$

TK: tekrar kullanılabilirlik, TÜ: tekrar üretilebilirlik, LOD: gözlenebilirlik sınırı, K_M : Michelis Menten sabiti, k_s : elektron aktarım hız sabiti

Çizelge 5.2 Glukoz tayini için metal oksit nanomalzemeler ile hazırlanan bazı amperometrik biyosensörler

Elektrot modifikasyonu	Çalışma potansiyeli, V	Duyarlık	Doğrusal çalışma aralığı, M	LOD, M	K _M , mM	Referans
TiO ₂ nanomalzemelerle ilgili çalışmalar						
GOx/Ag/TiO ₂ nanotüpler/Ti substrat	0,70	0,39 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	1,0×10 ⁻⁴ -4,0×10 ⁻³	1×10 ⁻⁴	-	Feng vd. 2013b
GOx/TiO ₂ sol-gel film/Nafyon/PET/kontakt lens	0,40	240 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	1,0×10 ⁻⁴ -6,0×10 ⁻⁴	1×10 ⁻⁵	11	Yao vd. 2011
GOx/PtNP/GR/TiO ₂ nanotüpler/Pt	0,70	0,94 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	1,0×10 ⁻⁴ -8,0×10 ⁻³	1×10 ⁻⁴	-	Feng vd. 2013a
GOx/Kitosan/TiO ₂ nanolifler/Pt	0,60	9,25 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	1×10 ⁻⁵ -6,98×10 ⁻³	1×10 ⁻⁵	-	Tang vd. 2010
GOx/TiO ₂ NP/CNT/Pt	0,40	0,24 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	6×10 ⁻⁶ -1,5×10 ⁻³	5,7×10 ⁻⁶	-	Pang vd. 2009
GOx/Pt-Au/TiO _x nanotüp	-0,20	0,084 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	0-1,8×10 ⁻³	1×10 ⁻⁴	-	Kang vd. 2008
GOx/TiO ₂ NP/GR/GCE	-0,60	6,2 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	0-8×10 ⁻³	-	-	Jang vd. 2012
GOx/NiONP/TiO ₂ NP-GR/GCE	-0,30	4,129 µA mM ⁻¹	1×10 ⁻³ -12×10 ⁻²	1,2×10 ⁻⁶	7,3	Xu vd. 2012
GOx/MAA/AuNP/TiO ₂ nanotüpler/Ti	-0,25	-	4×10 ⁻⁴ -8×10 ⁻³	3,1×10 ⁻⁴	7,2	Zhang vd. 2011
GOx/TiO ₂ nanokatman/Si	-0,45	-	5×10 ⁻⁶ -5,5×10 ⁻⁴	~1×10 ⁻⁶	7,5	Viticoli vd. 2006
GOx/Au/PB/TiO ₂ nanotüp/Ti	-0,10	36 µA mM ⁻¹	1,5×10 ⁻⁵ -4×10 ⁻³	5×10 ⁻⁶	-	Benvenuto vd. 2009.
Nafyon/GOx/TiO ₂ NP/FePc-CNT/Ta substrat	0,50	8,25 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	5×10 ⁻⁵ -4×10 ⁻³	3×10 ⁻⁵	7,39	Cui vd. 2013
GOx/pDAB-PB/AuNP/Ti nanotüpler	-0,35	248 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	1×10 ⁻⁵ -7×10 ⁻⁴	3,2×10 ⁻⁶	-	Gao vd. 2014
GOx/TiO ₂ nanoçubuklar/kitosan/GCE	-0,50	23,2 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	5,0×10 ⁻⁶ -1,32×10 ⁻³	2,0×10 ⁻⁶	0,41	Yang vd. 2014
Nafyon/GOx/PtNP/TiO ₂ nanotüpler	0,40	-	1×10 ⁻⁷ -5×10 ⁻³	1×10 ⁻⁷	-	Liao vd. 2015

Çizelge 5.2 Glukoz tayini için metal oksit nanomalzemeler ile hazırlanan bazı amperometrik biyosensörler (devam)

Elektrot modifikasyonu	Çalışma potansiyeli, V	Duyarlık	Doğrusal çalışma aralığı, M	LOD, M	K_M , mM	Referans
GOx/TiO ₂ oyuk nanofiberler/GCE	-0,45	32,6 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	2×10^{-6} - $3,17 \times 10^{-3}$	8×10^{-7}	-	GuO vd. 2017
GOx/TiO ₂ NP/PANI/GCE	-0,45	6,31 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	2×10^{-5} - $6,0 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-5}$	-	Tang vd. 2015
Co₃O₄ nanomalzemeler ile ilgili çalışmalar						
GOx/GF/Co ₃ O ₄ NP/GCE		13,52 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	5×10^{-4} - $1,65 \times 10^{-2}$	5×10^{-5}	-	Karupiah vd. 2014
GOx/Co ₃ O ₄ /GCE	0,35	102,77 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (7,261 $\mu\text{A mM}^{-1}$)	1×10^{-4} - 5×10^{-3}	$1,8 \times 10^{-6}$	1,18	Ding vd. 2016
GOx/Co ₃ O ₄ /ZnO nanofiber/GCE	0,25	116,64 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (8,2409 $\mu\text{A mM}^{-1}$)	1×10^{-5} - 5×10^{-3}	$1,4 \times 10^{-6}$	-	Fan vd. 2016
GOx/Co ₃ O ₄ -kitosan/GCE		0,1 $\mu\text{A mM}^{-1}$	-	$1,1 \times 10^{-4}$	-	Dhanjai vd. 2019
Co ₃ O ₄ nanofiber-Nafyon/GCE	0,59	36,25 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	$2,0 \times 10^{-3}$ 'e kadar	$9,7 \times 10^{-7}$	-	Ding vd. 2010
Co ₃ O ₄ /GCE	0,6	- 929 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ - 293 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	- 2×10^{-5} - 4×10^{-4} - $4,4 \times 10^{-4}$ - $2,0 \times 10^{-3}$	$\sim 1 \times 10^{-6}$	-	Rajeshkhanna vd. 2017
Fe₃O₄ nanomalzemeler ile ilgili çalışmalar						
GOx/Fe ₃ O ₄ /SPE		1,74 $\mu\text{A mM}^{-1}$	$3,3 \times 10^{-2}$ 'e kadar	-	-	Lu ve Chen 2006
GOx/Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ /CPE	0,35	-	$1,0 \times 10^{-5}$ - $4,0 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-6}$	-	Qiu vd. 2007

Çizelge 5.2 Glukoz tayini için metal oksit nanomalzemeler ile hazırlanan bazı amperometrik biyosensörler (devam)

Elektrot modifikasyonu	Çalışma potansiyeli, V	Duyarlık	Doğrusal çalışma aralığı, M	LOD, M	K _M , mM	Referans
GOx/kitosan-Fe ₃ O ₄ /ITO	-	9,3 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	5×10 ⁻⁴ -2,2×10 ⁻²	5×10 ⁻⁴	0,141	Kaushik vd. 2008
GOx/Fe ₃ O ₄ /kitosan/Pt	0,4	11,54 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	6,0×10 ⁻⁶ -2,2×10 ⁻³	6,0×10 ⁻⁶	0,611	Yang vd. 2009
GOx/Pt/Fe ₃ O ₄ -MWCNT/CS/GCE	0,3	7,5 µA mM ⁻¹	6,0×10 ⁻⁶ -6,2×10 ⁻³	2,0×10 ⁻⁶	9,0	Li vd. 2010
GOx/Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ /MWNTs/GCE	-	58,9 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	1×10 ⁻⁶ -3,0×10 ⁻²	8×10 ⁻⁷	13,0	Baby vd. 2010
GOx/Fe ₃ O ₄ -Au-PHDT/Au	0,7	110 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	2×10 ⁻⁶ -2,6×10 ⁻³	3,3×10 ⁻⁷	-	Zou vd. 2010
GOx-HRP/Nafyon/Au-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ /ITO.	-0,2	92,14 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	5×10 ⁻⁵ -1,0×10 ⁻³	1×10 ⁻⁵	-	Chen vd. 2011
GOx/Cys/Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -Au/GCE	-0,4	62,45 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	3,97×10 ⁻³ , a kadar	2,3×10 ⁻⁷	13,02	Wang vd. 2012
GOx-PDA-Au-Fe ₃ O ₄ /GCE	-0,5	-	2×10 ⁻⁵ -1,9×10 ⁻³	6,5×10 ⁻⁶	1,67	Peng vd. 2013
GOx/AuNP/BSA/Fe ₃ O ₄ /Pt	0,4 V	115,3 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	2,5×10 ⁻⁴ -7,0×10 ⁻³	3,54×10 ⁻⁶	15,0	He vd. 2016
GOx/RGO-Fe ₃ O ₄ /MSPE	-0,45 V	5,9 µA mM ⁻¹	5×10 ⁻⁵ -1,0×10 ⁻³	1×10 ⁻⁷	0,16	Pakapongpan ve Poo-arporn, 2017
GOx/Fc/Fe ₃ O ₄ /Lignin/CPE	0,35 V	0,436 µA mM ⁻¹	5×10 ⁻⁴ -4,5×10 ⁻³	-	-	Jędrzak vd. 2018
GOx/Fc/Fe ₃ O ₄ /Lignin/PDA/CPE	-	0,057 µA mM ⁻¹	5×10 ⁻⁴ -9,0×10 ⁻³	-	27	Wang vd. 2018
GOx/rGO/Fe ₃ O ₄ /GCE	-0,4	2,645 µA mM ⁻¹	5×10 ⁻⁴ -1,0×10 ⁻²	106.5 (µAmM ⁻¹)	-	Hou vd. 2018
GOx/Fe ₃ O ₄ /PPy@ZIF-8/GCE	0,6 V	16 µA mM ⁻¹	1×10 ⁻⁶ -2×10 ⁻³	3,3×10 ⁻⁷	-	Hou vd. 2018
SnO ₂ nanomalzemeler ile ilgili çalışmalar						
GOx/MWCNT-SnO ₂ -Au	-	-	4,0×10 ⁻³ -2,4×10 ⁻²	5×10 ⁻⁶	-	Liv vd. 2009

Çizelge 5.2 Glukoz tayini için metal oksit nanomalzemeler ile hazırlanan bazı amperometrik biyosensörler (devam)

Elektrot modifikasyonu	Çalışma potansiyeli, V	Duyarlık	Doğrusal çalışma aralığı, M	LOD, M	K_M , mM	Referans
GOxSnO ₂ @3D-rGO@pPANI/AE	0,36	1,124 $\mu\text{A} (\text{ng mL}^{-1})^{-1}$	-	-	-	Wu vd. 2017
GOx-HRP/PANI/SnO ₂ -NFs/kitosan/GCE	-0,35	-	5×10^{-6} - 1×10^{-4}	$1,8 \times 10^{-6}$	-	Alim vd. 2019
Fe₂O₃ nanomalzemeler ile ilgili çalışmalar						
n-FeGe elektrot (Fe ₂ O ₃ nanotel/GCE)	0,521	726,9 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	$1,5 \times 10^{-5}$ - 8×10^{-3}	6×10^{-6}	-	Cao ve Wang, 2011
BMIM-PF6- γ -Fe ₂ O ₃ -RITC-GOx/CPE	-0,10	45,85 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	1×10^{-6} - $1,5 \times 10^{-3}$	9×10^{-7}	-	Baratella vd. 2013
Fe ₂ O ₃ -NPs/P4VP-co-PAN/GCE	0,70	1382,8 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	$2,5 \times 10^{-6}$ - $5,8 \times 10^{-4}$	$5,8 \times 10^{-7}$	-	Chen vd. 2014
g-C3N4/ α -Fe ₂ O ₃ composites/GCE	0,50	-	$2,0 \times 10^{-6}$ - $2,4 \times 10^{-3}$	4×10^{-7}	-	Liu vd. 2016
Nafyon/GOx/CA-IONP/SPCE	-0,43	175 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ 5,31 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	2×10^{-5} - $2,5 \times 10^{-4}$ $2,5 \times 10^{-4}$ - $8,0 \times 10^{-3}$	7×10^{-6}	0,021	Nor vd. 2017
Al₂O₃ nanomalzemeler ile ilgili çalışmalar						
GOD-Al ₂ O ₃ sol-jel/platinlenmiş GCE	0,60	-	$4,0 \times 10^{-5}$ - $2,19 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-5}$	-	Liu, vd. 1999
Pt/Alsg-GOx-BSA/PPH/ATS/PU	0,65	10,4 nA mM ⁻¹ mm ⁻² -1,04 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	4×10^{-2} 'a kadar	-	-	Chen vd. 2002
GOx-Pt-MWCNT-ACS/GCE	0,50	113,13 mA M ⁻¹ cm ⁻² 113,13 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	5×10^{-5} - $1,05 \times 10^{-2}$	$6,18 \times 10^{-6}$	11,02	Tsai ve Tsai 2009
Pt nanotüy/Al ₂ O ₃ /Al folyo	0,60	56,79 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	$2,5 \times 10^{-4}$ - 8×10^{-3}	12,5 ($\mu\text{M cm}^{-1}$) ²	7,35	Lin vd. 2011

Çizelge 5.2 Glukoz tayini için metal oksit nanomalzemeler ile hazırlanan bazı amperometrik biyosensörler (devam)

Elektrot modifikasyonu	Çalışma potansiyeli, V	Duyarlık	Doğrusal çalışma aralığı, M	LOD, M	K _M , mM	Referans
CuO nanomalzemeler ile ilgili çalışmalar						
CuO-NFs-GCE	+0,40	431,3 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	6×10^{-6} - $2,5 \times 10^{-3}$	8×10^{-7}	-	Wang vd. 2009
CuO nanorods/G elektrot	+0,60	371,43 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	4×10^{-6} - 8×10^{-3}	4×10^{-6}	-	Wang vd. 2010
CuO flowers/G elektrot		709,52 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	(daha dar)	4×10^{-6}		
CuO-MWCNTs/Ta elektrot	+0,55	2190 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	$3,0 \times 10^{-3}$ 'a kadar	8×10^{-7}		Yang vd. 2010
Nafion/GOD/CuO/GCE	+0,60	246 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	1×10^{-6} - $1,7 \times 10^{-4}$	$9,1 \times 10^{-7}$	0,29	Li vd. 2011
CuONL/MWCNTs electrode	+0,35	664,3 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	9×10^{-4} 'a kadar	$5,7 \times 10^{-6}$		Yang vd. 2012
CuO nanoküp-Grafen-GCE	+0,55	1360 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	2×10^{-6} - 4×10^{-3}	7×10^{-7}		Luo vd. 2012
CuO/GCE	+0,55	1397 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	5×10^{-6} - $2,3 \times 10^{-3}$	5×10^{-7}		Liu vd. 2012
CuO NSs elektrot	+0,50	2792,64 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	8×10^{-7} - $2,2 \times 10^{-3}$	8×10^{-7}		Tian ve Liu, 2013
CuONPs-CSs/GCE	+0,55	2981 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	5×10^{-7} - $2,3 \times 10^{-3}$	1×10^{-7}		Zhang vd. 2015
Aljinat-CuO-GOD/Pt	+0,65	30,443 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	4×10^{-5} - 3×10^{-3}	$1,6 \times 10^{-6}$	2,82	Buk vd. 2016
RGO-Au NCs@CuO/GCE	+0,31	-	$7,205 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ $4,0 \times 10^{-3}$ - $3,5 \times 10^{-2}$ 1×10^{-7} - 3×10^{-3}	3×10^{-8}	26,8	Liu vd. 2018
ZnO nanomalzemeler ile ilgili çalışmalar						
PET/Ti/Au/ZnO:Co/GOx		13,3 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$		2×10^{-5}	21	Zhao vd. 2007
Nafyon/GOD/ZnO nanoçubuk film/ITO	-0,10	-	5×10^{-6} - 3×10^{-4}	3×10^{-6}	-	Liu vd. 2009
GOx/ZnONT/Au	+0,80	21,7 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	5×10^{-5} - $1,2 \times 10^{-2}$	1×10^{-6}	19	Kong vd. 2009
CHIT/GOx/ZnO/GCE	+0,80	25,7 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	1×10^{-5} - $2,5 \times 10^{-4}$ 3×10^{-4} - 7×10^{-4}	1×10^{-5}	1,95	Yang vd. 2010
GOx/ZnO/GOx/MWCNTs/GCE	-0,30	10,03 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	$6,67 \times 10^{-6}$ - $1,29 \times 10^{-3}$	$2,2 \times 10^{-6}$	2,48	Hu vd. 2011

Çizelge 5.2 Glukoz tayini için metal oksit nanomalzemeler ile hazırlanan bazı amperometrik biyosensörler (devam)

Elektrot modifikasyonu	Çalışma potansiyeli, V	Duyarlık	Doğrusal çalışma aralığı, M	LOD, M	K_M , mM	Referans
GOx/(PSS/PDDA) ₃ /ZnO/ITO	-0,20		1×10^{-4} - 9×10^{-3}	$1,9 \times 10^{-6}$	3,11	Zhai vd. 2011
Si/Ag/ZnONRs/GOx/Nafyon	+0,60	$110,76 \mu A mM^{-1} cm^{-2}$	$0,1 \times 10^{-4}$ - $23,0 \times 10^{-3}$	1×10^{-7}	0,137	Ahmad vd. 2012
GOx/ZnO nanotel-APTMS/Cr-Si	+0,70	$6,07 \mu A mM^{-1} cm^{-2}$	-	$< 2 \times 10^{-5}$	2,09	Jung ve Lim,
GOx/ZnO nanotel-APTES/Cr-Si		$11,07 \mu A mM^{-1} cm^{-2}$	-	$< 2 \times 10^{-5}$	3,09	2013
GOx/ZnO nanotel-APS/Cr-Si		$17,72 \mu A mM^{-1} cm^{-2}$	-	$< 2 \times 10^{-5}$	1,37	
GOD/ConA/pAu/Pt-Au@ZnONRs/GCE	+0,45	$3,26 \mu A mM^{-1}$	$1,8 \times 10^{-6}$ - $5,15 \times 10^{-3}$	6×10^{-7}	0,41	Zhang vd. 2013
ZnO nanolavha mikroküreler/Si/Ag	+0,54	$210,8 \mu A mM^{-1} cm^{-2}$	5×10^{-5} - $2,3 \times 10^{-2}$	5×10^{-5}	~3,2	Ahmad vd. 2016
GOx/Co ₃ O ₄ /ZnO nanolif/GCE	0,25	$116,64 \mu A mM^{-1} cm^{-2}$ ($8,2409 \mu A mM^{-1}$)	1×10^{-5} - 5×10^{-3}	$1,38 \times 10^{-6}$	-	Fan, 2016
GCE/ZnO@NDCS/GOx	+0,57	$231,7 \mu A mM^{-1} cm^{-2}$	2×10^{-4} - $1,2 \times 10^{-2}$	$6,3 \times 10^{-6}$		Muthuchamy vd. 2018
Nafion/GOx/ZnO/rGO/ITO	+0,80	$3,90 \mu A mM^{-1} cm^{-2}$	$0-4,0 \times 10^{-3}$	5×10^{-7}	6,26	Zhou vd. 2019

PET: Polietilen tetraftalat, CNT: karbon nanotüp, GR: grafen, MAA: merkaptasetik asit, FePc: demir ftalosiyonin, pDAB: poli(1,2-diaminobenzen), PB: Prusya mavisi, PANI: polianilin

KAYNAKLAR

- Ahmad, R., Tripathy, N., Kim, J. H., Hahn, Y. B., 2012. Highly selective wide linear-range detecting glucose biosensors based on aspect-ratio controlled ZnO nanorods directly grown on electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 174; 195-201.
- Ahmad, R., Tripathy, N., Khan, M. Y., Bhat, K. S., Ahn, M. Khang, G., Hahn, Y. B. 2016. Hierarchically assembled ZnO nanosheets microspheres for enhanced glucose sensing performances. *Ceramics International*, 42; 13464 -13469.
- Alim, S., Kafi, A. K. M., Rajan, J., Yusoff, M. M. 2019. Application of polymerized multiporous nanofiber of SnO₂ for designing a bienzyme glucose biosensor based on HRP/GOx. *Journal of Biological Macromolecules*, 123; 1028-1034.
- Alonso-Lomillo, M.A., Domínguez-Renedo, O., Ferreira-Gonçalves, L., Arcos-Martínez, M.J. 2010b. Sensitive enzyme-biosensor based on screen-printed electrodes for Ochratoxin A. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(6); 1333–1337.
- Alonso-Lomillo, M.A., Domínguez-Renedo, O., Hernández-Martín, A., Arcos-Martínez, M.J. 2009. Horseradish peroxidase covalent grafting onto screen-printed carbon electrodes for levofloxacillin chronoamperometric determination. *Analytical Biochemistry*, 395(1); 86–90.
- Alonso-Lomillo, M.A., Domínguez-Renedo, O., Matos, P., Arcos-Martínez, M.J. 2010a. Disposable biosensors for determination of biogenic amines. *Analytica Chimica Acta*, 665; 26-31.
- Alonso-Lomillo, M.A., Ruiz, J.G., Pascual, F.J.M., 2005. Biosensor based on platinum chips for glucose determination. *Analytica Chimica Acta*, 547(2); 209–14.
- Anusha, J.R., Raj, C.J., Cho, B.B., Fleming, A.T., Yu, K.H., Kim, B.C. 2015. Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized over chitosan nanoparticles from gladius of *Uroteuthis duvauceli*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 215; 536-543.
- Araujo, P.W. ve Brereton, R.G. 1996. Experimental design III. Quantification. *Trends in Analytical Chemistry*, 15(3); 156-163.
- Arvinte, A., Rotariu, L., Bala, C. and Gurban, A.M. 2009. Synergistic effect of mediator–carbon nanotube composites for dehydrogenases and peroxidases based biosensors. *Bioelectrochemistry*, 76; 107–114.
- Asturias-Arribas, L., Alonso-Lomillo, M.A., Domínguez-Renedo, O., Arcos-Martínez, M.J., 2011. CYP450 biosensors based on screen-printed carbon electrodes for the determination of cocaine. *Analytica Chimica Acta*, 685(1); 15–20.
- Aydoğdu Tığ G. 2017. Highly sensitive amperometric biosensor for determination of

- NADH and ethanol based on Au-Ag nanoparticles/poly(L-Cysteine)/reduced graphene oxide nanocomposite. *Talanta*, 175; 382-389.
- Azevedo, A.M., Martins, V.C., Prazeres, D.M., Vojinovic, V., Cabral, J.M., Fonseca, L.P. 2009. Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. *Biotechnology Annual Review*, 9; 199-247.
- Baby, T.T. and Ramaprabhu, S. 2010. SiO₂ coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticle dispersed multiwalled carbon nanotubes based amperometric glucose biosensor. *Talanta*, 80; 2016-2022.
- Bankar, S. B., Bule, M.V., Singhal, R.S., Ananthanarayan, L. 2009. Glucose oxidase – an overview. *Biotechnology Advances*, 27; 489-501.
- Bardajee, G.R., Azimi, S., Sharifi, M.B.S., 2017. Application of central composite design for methyl red dispersive solid phase extraction based on silver nanocomposite hydrogel: microwave assisted synthesis. *Microchemical Journal*, 133; 358–69.
- Baratella, D., Magro, M., Sinigaglia, G., Zboril, R., Salviulo, G., Vianello, F. 2013. A glucose biosensor based on surface active maghemite nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 45; 13-18.
- Barsan, M.M., Matei, E., Enculescu, M., Costescu, R., Preda, N., Enache, T.A., Enculescu, I., Diclescu, V. 2019. Nanostructured palladium doped nickel electrodes for immobilization of oxidases through nickel nanoparticles. *Electrochimica Acta*, 315; 102 – 113.
- Benvenuto, P., Kafi, A.K.M., Chen, A. 2009. High performance glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase onto modified titania nanotube arrays. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 627; 76-81.
- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escalera, L.A. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76; 965-977.
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., Estrela, P. 2016. Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60; 1-8.
- Box, G.E.P. and Behnken, D.W. 1960. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2(4); 455-475.
- Box, G.E.P. and Wilson, K. B. 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 13(1); 1-45.
- Bruttomesso, D. and Grassi, G. 2015. Technological advances in the treatment of type 1 diabetes. *Front. Diabetes*, 24; 166–189.

- Buk, V., Emregul, E., Emregul, K.C. 2017. Alginate copper oxide nano-biocomposite as a novel material for amperometric glucose biosensing. *Materials Science and Engineering C*, 74; 307-314.
- Calvo, M.E.B., Renedo, O.D., Martínez, M.J.A. 2005. Optimization of the experimental parameters in the determination of lamotrigine by adsorptive stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, 549(1–2); 74–80.
- Cao, X. and Wang, N. 2011. A novel non-enzymatic glucose sensor modified with Fe₂O₃ nanowire arrays. *Analyst*, 136; 4241-4246.
- Cass, A.E., Davis, G., Francis, G.D., Hill, H.A., Aston, W.J., Higgins, I.J., Plotkin, E.V., Scott, L.D., Turner, A.P. 1984. Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Analytical Chemistry*, 56 (4); 667–671.
- Castillo, J., Gáspár, S., Leth, S., Niculescu, M., Mortari, A., Bontidean, I., Soukharev, V., Dorneanu, S. A., Ryabov, A. D. and Csöregi, E. 2004. Biosensors for life quality design, development and applications. *Sensors and Actuators B*, 102; 179–194.
- Chaubey, A. and Malhotra, B.D., 2002. Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 17; 441-456.
- Chen, X., Zhu, J., Chen, Z., Xu, C., Wang, Y., Yao, C. 2011. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 159; 220-228.
- Chen, X., Yibai, H., Wilson, S., 2002. Glucose microbiosensor based on alumina sol-gel matrix/electropolymerized composite membrane. *Biosensors and Bioelectronics*, 17; 1005-1013.
- Chen, Y., Zhang, H., Xue, H., Hu, X., Wang, G., Wang, C. 2014. Construction of a non-enzymatic glucose sensor based on copolymer P4VP-co-PAN and Fe₂O₃ nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 35; 420-425.
- Chira A., Bucur B., Radulescu M.C., Galaon T., Radu G. L. 2014. Study of Electrochemically Modified Electrode with Synthesized N-benzyl-4,4'-bipyridine with Anti-Fouling Properties for Oxygen and Hydrogen Peroxide Detection. *International Journal of Electrochemical Science*, 9; 4493 - 4511.
- Chu, X., Zhu, X., Dong, Y., Chen, T., Ye, M., Sun, W. 2012. An amperometric glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase on the platinum electrode modified with NiO doped ZnO nanorods. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 676; 20 – 26.
- Cieslak, M.B., Alqurashi, Y., Elshereif, M.I., Yetisen, A.K., Hassan, M.U., Butt, H. 2017. Optical glucose sensors based on hexagonally-packed 2.5-dimensional photonic concavities imprinted in phenylboronic acid functionalized hydrogel films. *Royal Society of Chemistry*, 7(85); 53916-53924.

- Clark Jr. L.C. and Lyons, C. 1962. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102; 29–45.
- Cui, H.F., Zhang, K., Zhang, Y.F., Sun, Y.L., Wang, J., Zhang, W.D., Luong, J.H.T. 2013. Immobilization of glucose oxidase into a nanoporous TiO₂ film layered on metallophthalocyanine modified vertically-aligned carbon nanotubes for efficient direct electron transfer. *Biosensors and Bioelectronics*, 46; 113-118.
- Dalkıran B., Erden P. E., Kılıç E. 2017. Amperometric biosensors based on carboxylated multiwalled carbon nanotubes-metal oxide nanoparticles-7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane composite for the determination of xanthine. *Talanta*, 167; 286-295.
- Dashtian, K. and Zare-Dorabei, R. 2017. Synthesis and characterization of functionalized mesoporous SBA-15 decorated with Fe₃O₄ nanoparticles for removal of Ce(III) ions from aqueous solution: ICP–OES detection and central composite design optimization. *Journal of Colloid and Interface Science*, 494; 114-123.
- Dastkhooon, M., Ghaedi, M., Asfaram, A., Arabi, M., Ostovan, A., Goudarzi, A. 2017. Cu@SnS/SnO₂ nanoparticles as novel sorbent for dispersive micro solid phase extraction of atorvastatin in human plasma and urine samples by high-performance liquid chromatography with UV detection: Application of central composite design (CCD). *Ultrasonics Sonochemistry*, 36; 42-49.
- Davis, F. and Higson, P.J. 2014. Electrochemical nanosensors for blood glucose analysis, In: *Nanosensors for Chemical and Biological Applications. Sensing with Nanotubes, Nanowires and Nanoparticles*. Honeychurch, K.C. (eds), Woodhead Publishing, 28-53.
- Dayakar, T., Venkateswara, R.K, Bikshalu, K., Rajendar, V., Si-Hyun, P. 2017. Novel synthesis and structural analysis of zinc oxide nanoparticles for the non enzymatic glucose biosensor. *Materials Science and Engineering C*, 75; 1472-1479.
- Del Torno-de Román, L., Alonso-Lomillo, M.A., Domínguez-Renedo, O., Arcos-Martínez, M.J. 2013. Gluconic acid determination in wine by electrochemical biosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 176; 858-862.
- Deng, C., Chen, J., Chen, X., Xiao, C., Nie, L., Yao, S. 2008. Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on boron-doped carbon nanotubes modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 23; 1272-1277.
- Dervisevic, M., Dervisevic, E., Çevik, E., Şenel, M. 2017. Novel electrochemical xanthine biosensor based on chitosan-polypyrrole-gold nanoparticles hybrid bio-nanocomposite platform. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25; 510-519.

- Dhanjai, Balla P., Sinha A., Wu L., Lu X., Tan D., Chen J. 2019. Co₃O₄ nanoparticles supported mesoporous carbon framework interface for glucose biosensing. *Talanta*, 203; 112-121.
- Ding, L., Zhao, M., Fan, S., Ma, Y., Liang, J., Wang, X., Song, Y., Chen, S. 2016. Preparing Co₃O₄ urchin-like hollow microspheres self-supporting architecture for improved glucose biosensing performance. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 235; 162-169.
- Ding, U., Wang, Y., Su, L., Bellagamba, M., Zhang H., Lei, Y. 2010. Electrospun Co₃O₄ nanofibers for sensitive and selective glucose detection *Biosensors and Bioelectronics*, 26; 542-548.
- Ding, Y., Liu, Y., Parisi, J., Zhang, L., Lei, Y. 2011. A novel NiO–Au hybrid nanobelts based sensor for sensitive and selective glucose detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 28; 393-398.
- Doehlert, D.H. 1970. Uniform Shell Designs. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C*, 19(3), 231-239.
- Durst R. A., Baumner A. J., Murray R. W., Buck R. P., Andrieux C. P., 1997. Chemically Modified Electrodes: Recommended Terminology And Definitions (IUPAC Recommendations 1997). *Pure and Applied Chemistry*, 69; 1317-1323.
- Ensafi A.A., Jafari M., Rezaei B., 2013. A novel enzyme-free amperometric sensor for hydrogen peroxide based on Nafion/exfoliated graphene oxide–Co₃O₄ nanocomposite. *Talanta*, 103; 322–329.
- Erden, P.E. 2010. Ksantin ve Ürik Asit Tayini İçin Farklı Medyatörlü Modifiye Karbon Pasta Enzim Elektrotların Hazırlanması. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 169, Ankara.
- Eskandari, K., Zarei, H., Ghourchian, H., Amoozadeh, S.M. 2015. The Electrochemical Study of Glucose Oxidase on Gold-Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Journal of Analytical Chemistry*, 71(10); 1254-1260.
- Fan S., Zhao M., Ding L., Ma Y., Liang J., Wang X., Song Y., Chen S. 2016. Introducing p-n junction interface into enzyme loading matrix forenhanced glucose biosensing performance. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 237; 373-379.
- Fatemi, H., Khodadadi, A., Firooz, A.A., Mortazavi, Y. 2012. Apple-biomorphic synthesis of porous ZnO nanostructures for glucose direct electrochemical biosensor. *Current Applied Physics*, 12; 1033-1038.
- Feng, C., Xu, G., Liu, H., Lv, J., Zheng, Z., Wu, Y. 2013a. Facile fabrication of Pt/graphene/TiO₂ NTAs based enzyme sensor for glucose detection. *Journal of The Electrochemical Society*, 161; B1–B8.

- Feng, C., Xu, G., Liu, H., Lv, J., Zheng, Z., Wu, Y. 2013b. Glucose biosensors based on Ag nanoparticles modified TiO₂ nanotube arrays. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 18; 163-171.
- Frew, J.E. and Hill, H.A., 1987. Electrochemical biosensors. *Analytical Chemistry*, 59; 933A-944A.
- Gao, Z.-D., Qu, Y., Li, T., S, N. K., Song, Y.Y. 2014. Development of Amperometric Glucose Biosensor Based on Prussian Blue Functionized TiO₂ Nanotube Arrays. *Scientific Reports*, 4; 6891-6897.
- Ghica, M.E. and Brett, C.M.A. 2006. Development of Novel Glucose and Pyruvate Biosensors at Poly(Neutral Red) Modified Carbon Film Electrodes. Application to Natural Samples. *Electroanalysis*, 18(8); 748-756.
- Gonzalo-Ruiz, J., Alonso-Lomillo, M.A., Munoz, F.J. 2007. Screen-printed biosensors for glucose determination in grape juice. *Biosensors and Bioelectronics*, 22; 1517-1521.
- Govindan, K., Chandran, H.T., Raja, M., Maheswari, S.U., Rangarajan, M. 2017. Electron scavenger-assisted photocatalytic degradation of amido black 10B dye with Mn₃O₄ nanotubes: A response surface methodology study with central composite design. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 341; 146-156.
- Guilbault, G.G. and Lubrano, G.J. 1973. An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose. *Analytica Chimica Acta*, 64; 439-455.
- He, C., Xie, M., Hong, F., Chai, X., Mi, H., Zhou, X., Fan, L., Zhang, Q., Ngai, T., Liu, J. 2016. A Highly Sensitive Glucose Biosensor Based on Gold Nanoparticles/Bovine Serum Albumin/Fe₃O₄ Biocomposite Nanoparticles. *Electrochimica Acta*, 222; 1709-1715.
- Heller, A. and Feldman, B. 2008. Electrochemical glucose sensors and their applications in diabetes management. *Chemical Reviews*, 108; 2482-2505.
- Heyser, C., Schrebler, R., Grez, P. 2019. New route for the synthesis of nickel (II) oxide nanostructures and its application as non-enzymatic glucose sensor. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 832; 189 – 195.
- Hou, C., Zhao, D., Wang, Y., Zhang, S., Li, S. 2018. Preparation of magnetic Fe₃O₄/PPy@ZIF-8 nanocomposite for glucose oxidase immobilization and used as glucose electrochemical biosensor. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 822; 50-56.
- Hu, F., Chen, S., Wang, C., Yuan, R., Chai, Y., Xiang, Y., Wang, C. 2011. ZnO nanoparticle and multiwalled carbon nanotubes for glucose oxidase direct electron transfer and electrocatalytic activity investigation. *Journal of Molecular Catalysis*

B: Enzymatic, 72; 298-304.

- Huang, Y., Zhang, W., Xizo, H., Li, G. 2005. An electrochemical investigation of glucose oxidase at a CdS nanoparticles modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 21; 817-821.
- Ivanov Y., Marinov I., Gabrovska K., Dimcheva N., Godjevargova T. 2010. Amperometric biosensor based on a site-specific immobilization of acetylcholinesterase via affinity bonds on a nanostructured polymer membrane with integrated multiwall carbon nanotubes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63; 141-148.
- Jang, H.J., Kim, S.K., Chang, H., Roh, K.M., Choi, J.W., Huang, J. 2012. A glucose biosensor based on TiO₂-Graphene composite. *Biosensors and Bioelectronics*, 38; 184-188.
- Jędrzak, A., Rębiś, T., Nowicki, M., Synoradzki, K., Mrówczyński, R., Jesionowski, T., 2018. Polydopamine grafted on an advanced Fe₃O₄/lignin hybrid material and its evaluation in biosensing. *Applied Surface Science*, 455; 455-464.
- Jiang, L., McNeil, C.J., Cooper, J.M., 1995. Direct Electron Transfer Reactions of Glucose Oxidase Immobilised at a Self-assembled Mono layer. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 12; 1293-1295.
- Jothi, L. And Nageswaran, G., 2019. Plasma Modified Polymeric Materials for Biosensors/Biodevice Applications. In: *Non-Thermal Plasma Technology for Polymeric Materials*. Thomas, S., Mozetič, M., Cvelbar, U., Špatenka, P. and Praveen K.M. (eds), Elsevier, 409-437.
- Jung, J. and Lim, S. 2013. ZnO nanowire-based glucose biosensors with different coupling agents. *Applied Surface Science*, 265; 24-29.
- Kaçar C., Dalkıran B., Erden P. E., Kiliç E. 2014. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on Co₃O₄ nanoparticles and multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Applied Surface Science*, 311; 139-146.
- Kaçar C., Erden P. E., Kılıç E. 2017. Amperometric l-lysine biosensor based on carboxylated multiwalled carbon nanotubes-SnO₂ nanoparticles-graphene composite. *Applied Surface Science*, 419; 916-923.
- Kang, Q., Yang, L., Cai, Q., 2008. An electro-catalytic biosensor fabricated with Pt-Au nanoparticle-decorated titania nanotube array. *Bioelectrochemistry*, 74; 62-55.
- Kang, X., Wang, J., Wu, H., Aksay, I.A., Liu, J., Lin, Y. 2009. Glucose Oxidase-graphene-chitosan modified electrode for direct electrochemistry and glucose sensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 25; 901-905.

- Karuppiyah C., Palanisamy S., Chen S. M., Veeramani V., Periakaruppan P., 2014. A novel enzymatic glucose biosensor and sensitive non-enzymatic hydrogen peroxide sensor based on graphene and cobalt oxidenanoparticles composite modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 196; 450-456.
- Kaushik, A., Khan, R., Solanki, P. R., Pandey, P., Alam, J., Ahmad, S., Malhotra, B.D. 2008. Iron oxide nanoparticles–chitosan composite based glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 24; 676-683.
- Khan, G.F., Ohwa, M., Wernet, W. 1996. Design of a stable charge transfer complex electrode for a thirdgeneration amperometric glucose sensor. *Analytical Chemistry*, 68; 2939-2945.
- Khun, K., Ibupoto, Z.H., AlSalhi M.S., Atif, M., Ansari, A.A., Willander, M. 2012. Potentiometric glucose sensor based on the glucose oxidase immobilized iron ferrite magnetic particle/chitosan composite modified gold coated glass electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 173; 698-703.
- Kim G., Moon J.H., Moh C.Y., Lim J.G. 2015. A microfluidic nano-biosensor for the detection of pathogenic Salmonella. *Biosensors and Bioelectronics*, 67; 243-247.
- Kolaei, M., Dashtian, K., Rafiee, Z., Ghaedi, M 2016. Ultrasonic-assisted magnetic solid phase extraction of morphine in urine samples by new imprinted polymer-supported on MWCNT-Fe₃O₄-NPs: Central composite design optimization. *Ultrasonics Sonochemistry*, 33; 240-248.
- Kong, T., Chen, Y., Ye, Y., Zhang, K., Wang, Z., Wang, X. 2009. An amperometric glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase on the ZnO nanotubes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 138; 344-350.
- Korotkaya E.V. 2014. Biosensors: design, classification, and applications in the food industry. *Foods and Raw Materials*, 2; 161-171.
- Laviron, E. 1979. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 101; 19-28.
- Li, C., Liu, Y., Li, L., Du, Z., Xu, S., Zhang, M., Yin, X., Wang, T. 2008. A novel amperometric biosensor based on NiO hollow nanospheres for biosensing glucose. *Talanta*, 77; 455-459.
- Li, F., Song, J., Li, F., Wang, X., Zhang, Q., Han, D., Ivaska, A., Niu, L. 2009. Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on carbon nanotubes@SnO₂-Au composite. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009; 883-888.
- Li, J., Qiu, J.D., Xu, J.J., Chen, H.Y. and Xia, X.H. 2007. The Synergistic Effect of Prussian-Blue-Grafted Carbon Nanotube/Poly(4-vinylpyridine) Composites for

Amperometric Sensing. *Advanced Functional Materials*, 17; 1574–1580.

- Li, J., Yuan, R., Chai, Y., Che, X. 2010. Fabrication of a novel glucose biosensor based on Pt nanoparticles-decorated iron oxide-multiwall carbon nanotubes magnetic composite. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66; 8-14.
- Li, S.J., Xia, N., Lv, X.L., Zhao, M.M., Yuan, B.Q., Pang, H. 2014. A facile one-step electrochemical synthesis of graphene/NiO nanocomposites as efficient electrocatalyst for glucose and methanol. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 190; 809-817.
- Li, Y., Wei, Y., Shi, G., Xian, Y., Jin, L. 2011. Facile Synthesis of Leaf-Like CuO Nanoparticles and Their Application on Glucose Biosensor. *Electroanalysis*, 23(2); 497-502.
- Liao, J., Lin, S., Yang, Y., Liu, K., Du, W. 2015. Highly selective and sensitive glucose sensors based on organicelectrochemical transistors using TiO₂ nanotube arrays-based gateelectrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 208; 457-463.
- Lin, C., Xiong, Z., Xue, H., Chen, S., Qiu, H. 2011. Amperometric Biosensor with Al₂O₃/Al Foil Electrodes Modified by Pt Nanofuzz for Glucose Detection. *Sensors and Materials*, 23 (5), 293-302.
- Liu, J., Chou, A., Rahmat, W., Paddon-Row, M.N., Gooding, J. 2004. Achieving Direct Electrical Connection to Glucose Oxidase Using Aligned Single Walled Carbon Nanotube Arrays. *Electroanalysis*, 17; 38-46.
- Liu, L., Wang, J., Wang, C., Wang, G. 2016. Facile synthesis of graphitic carbon nitride/nanostructured α -Fe₂O₃ composites and their excellent electrochemical performance for supercapacitor and enzyme-free glucose detection applications. *Applied Surface Science*, 390; 303-310.
- Liu, Q., Jiang, Z., Tang, Y., Yang, X., Wei, M., Zhang, M. 2018. A facile synthesis of a 3D high-index Au NCs@CuO supported on reduced graphene oxide for glucose sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 255; 454-462.
- Liu, S. and Ju, H. 2003. Reagentless glucose biosensor based on direct electron transfer of glucose oxidase immobilized on colloidal gold modified carbon paste electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 19; 177-183.
- Liu S., Tian, J., Wang, L., Qin, X., Zhang, Y., Luo, Y., Asiri, A. M., Al-Youbi, A. O., Sun, X. 2012. A simple route for preparation of highly stable CuO nanoparticles for nonenzymatic glucose detection. *Science and Technology*, 2; 813-817.
- Liu, X., Hu, Q., Wu, Q., Zhang, W., Fang, Z., Xie, Q. 2009. Aligned ZnO nanorods: A useful film to fabricate amperometric glucose biosensor. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74; 154-158.

- Liu, Z., Liu, B., Zhang, M., Kong, J., Deng, J. 1999. Al₂O₃ sol-gel derived amperometric biosensor for glucose. *Analytica Chimica Acta*, 392; 135-141.
- Lu, B.W. and Chen, W.C. 2006. A disposable glucose biosensor based on drop-coating of screen-printed carbon electrodes with magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 304; e400-e402.
- Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, A., Pettersen, J., Bergman, R. 1998. Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory System*, 42; 3-40.
- Luo, L., Zhu, L., Wang, Z. 2012. Nonenzymatic amperometric determination of glucose by CuO nanocubes-graphene nanocomposite modified electrode. *Bioelectrochemistry*, 88; 156-163.
- Luo X., Morrin A., Killard A. J., Smyth M. R. 2006. Application of Nanoparticles in Electrochemical Sensors and Biosensors. *Electroanalysis*, 18; 319-326.
- Luo X.L., Xu, J.J., Du, Y., Chen, H.Y. 2004. A glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidase-gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition. *Analytical Biochemistry*, 334; 284-289.
- Magar H. M., Ghica M. E., Abbas M. N., Brett C. M. A. 2017. A novel sensitive amperometric choline biosensor based on multiwalled carbon nanotubes and gold nanoparticles. *Talanta*, 167; 462-469.
- Mao, W., Cai, B., Ye, Z., Huang, J. 2018. A nanostructured p-NiO/n-Bi₄Ti₃O₁₂ heterojunction for direct GOx electrochemistry and high-sensitivity glucose sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 261; 385-391.
- Martins S.A.M., Prazeres D.M.F., Fonseca L.P., Monteiro G.A. 2009. Application of central composite design for DNA hybridization onto magnetic microparticles. *Analytical Biochemistry*, 391; 17-23.
- Meibodi, A.S.E and Haghjoo, S. 2014. Amperometric urea biosensor based on covalently immobilized urease on an electrochemically polymerized film of polyaniline containing MWCNTs. *Synthetic Metals*, 194; 1-6.
- Metkar, S.K. and Girigoswami, K. 2019. Diagnostic biosensors in medicine – A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17; 271-283.
- Mirmoghtadaie L., Ensafi A. A., Kadivar M., Norouzi P. 2013. Highly selective electrochemical biosensor for the determination of folic acid based on DNA modified-pencil graphite electrode using response surface methodology. *Materials Science and Engineering C*, 33; 1753-1758.
- Muthuchamy, N., Atchudan, R., Edison, T.N.J.I., Perumal, S., Lee, Y. R. 2018. High-performance glucose biosensor based on green synthesized zinc oxide

nanoparticle embedded nitrogen-doped carbon sheet. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 816; 195 – 204.

- Nagel B., Dellweg H., Gierasch M. 1992. Glossary for Chemists of Terms Used In Biotechnology (IUPAC Recommendations 1992). *Pure and Applied Chemistry*; 64, 143-168.
- Newman, J.D., Setford, S.J. 2006. Enzymatic biosensors. *Molecular Biotechnology*, 32 (3); 249-268.
- Newman, J.D., Turner, A.P. 2005. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (12); 2435–2453.
- Nor N. M., Lockman Z., Razak K. A. 2016. Study of ITO glass electrode modified with iron oxide nanoparticles and Nafion for glucose biosensor application. *Procedia Chemistry*, 19; 50-56.
- Nor, N. M., Razak, K. A., Lockman, Z. 2017. Physical and Electrochemical Properties of Iron Oxide Nanoparticles-modified Electrode for Amperometric Glucose Detection. *Electrochimica Acta*, 248; 160-168.
- Oliveira T. M. B. F., Barroso M. F., Morais S., Araújo M., Freire C., deLima-Neto P., Correia A. N., Oliveira M. B. P. P., Delerue-Matos C, 2013. Laccase–Prussian blue film–graphene doped carbon paste modified electrode for carbamate pesticides quantification. *Biosensors and Bioelectronics*, 47; 292-299.
- Oztekin, Y., Ramanaviciene, A., Yazicigil, Z., Solak, A.O., Ramanavicius, A. 2011. Direct electron transfer from glucose oxidase immobilized on polyphenanthroline-modified glassy carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 26; 2541-2546.
- Pakapongpan, S. and Poo-arporn, R. P. 2017. Self-assembly of glucose oxidase on reduced graphene oxide-magnetic nanoparticles nanocomposite-based direct electrochemistry for reagentless glucose biosensor. *Materials Science and Engineering C*, 76; 398-405.
- Palmisano, F., Zambonin, P.G., Centonze, D., Quinto, M. 2002. A disposable, reagentless, third generation glucose biosensor based on overoxidized poly(pyrrole)/tetrathiafulvalene tetracyanoquinodimethane composite. *Analytical Chemistry*, 74; 5913-5918.
- Pang X, He D, Luo S, Cai Q. 2009. An amperometric glucose biosensor fabricated with Pt nanoparticle-decorated carbon nanotubes/TiO₂ nanotube arrays composite. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 137(1); 134-138.
- Peng, H.P., Liang, R.P., Zhang, L., Qiu, J.D. 2013. Facile preparation of novel core–Shell enzyme–Au–polydopamine–Fe₃O₄ magnetic bionanoparticles for glucose sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 42; 293-299.

- Periasamy, A.P., Chang, Y.J., Chen, S.M. 2011. Amperometric glucose sensor based on glucose oxidase immobilized on gelatin-multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry*, 80; 114-120.
- Pezoti Junior O., Cazetta A.L., Gomes R.C., Barizão É.O., Souza I.P.A.F., Martins A.C., Asefa T., Almeida V.C. 2014. Synthesis of ZnCl₂-activated carbon from macadamia nut endocarp (*Macadamia integrifolia*) by microwave-assisted pyrolysis: Optimization using RSM and methylene blue adsorption. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 105; 166-176.
- Pohanka, M. 2017. The Piezoelectric Biosensors: Principles and Applications, a Review. *International Journal of Electrochemical Science*, 12; 496-506.
- Pollap, A. and Kochana, J. 2019. Electrochemical Immunosensors for Antibiotic Detection. *Biosensors*, 9(2); 61-88.
- Prasad, R. and Bhat, B.R. 2015. Multi-wall carbon nanotube–NiO nanoparticle composite as enzyme-free electrochemical glucose sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 220; 81-90.
- Qiu, J., Peng, H., Liang, R. 2007. Ferrocene-modified Fe₃O₄@SiO₂ magnetic nanoparticles as building blocks for construction of reagentless enzyme-based biosensors. *Electrochemistry Communications*, 9; 2734-2738.
- Rafique, B., Iqbal, M., Mehmood, T. and Shaheen, M. 2019. "Electrochemical DNA biosensors: a review", *Sensor Review*, 39(1); 34-50.
- Rajeshkhanna G., Umeshbabu E., Rao G.R. 2017. Charge storage, electrocatalytic and sensing activities of nest-like nanostructured Co₃O₄. *Journal of Colloid and Interface Science*, 487; 20-30.
- Ramanathan, K. and Danielsson, B. 2001. Principles and applications of thermal biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(6); 417-423.
- Rassas, I., Braiek, M., Bonhomme, A., Bessueille, F., Raffin, G., Majdoub, H., Jaffrezic-Renault, N. 2019. Voltammetric glucose biosensor based on glucose oxidase encapsulation in a chitosan-kappa-carrageenan polyelectrolyte complex. *Materials Science and Engineering: C*, 95; 152-159.
- Retama, R.J. Lopez Cabarcos, E.; Mecerreyes, D., Lopez-Ruiz, B. 2004. Design of an amperometric biosensor using polypyrrole-microgel composites containing glucose oxidase. *Biosensors and Bioelectronics*, 20; 1111-1117.
- Retama, J.R., López, M.S.P, Pérez, J.H., Cabanillas, G.F., López-Cabarcos, E., López-Ruiz, B. 2005. Biosensors based on acrylic microgels: a comparative study of immobilized glucose oxidase and tyrosinase. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(11); 2268-2275.

- Revathi, C. ve Rajendra Kumar, R.T. 2019. Enzymatic and Nonenzymatic Electrochemical Biosensors, In: Fundamentals and Sensing Applications of 2D Materials. Rout, C., Late, D. ve Morgan, H. (eds), Woodhead Publishing, Chennai, 259-300.
- Salimi, A., Sharifi, E., Noorbakhsh, A., Soltanian, S. 2007. Immobilization of glucose oxidase on electrodeposited nickel oxide nanoparticles: Direct electron transfer and electrocatalytic activity. *Biosensors and Bioelectronics*, 22; 3146-3153.
- Samphao, A., Butmee, P., Jitcharoen, J., Svorc, L., Raber, G., Kalcher, K. 2015. Flow-injection amperometric determination of glucose using a biosensor based on immobilization of glucose oxidase onto Au seeds decorated on core Fe₃O₄ nanoparticles. *Talanta*, 142; 35-42.
- Sánchez-Obrero, G., Cano, M., Ávila, J.L., Mayén, M., Mena, M.L., Pingarrón, J.M., Rodríguez-Amaro, R. 2009. A gold nanoparticle-modified PVC/TTF-TCNQ composite amperometric biosensor for glucose determination. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 634; 59-63.
- Sassolas, A., Blum, L.C., Leca-Bouvier, B.D. 2012. Research review paper Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30; 489-511.
- Sethuraman, V., Muthuraja, P., Raj J. A., Manisankar P. 2016. A highly sensitive electrochemical biosensor for catechol using conducting polymer reduced graphene oxide–metal oxide enzyme modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 84; 112-119.
- Shamsipur, M., Asgari, M., Mousavi, M.F., Davarkhah, R. 2012. A Novel Hydrogen Peroxide Sensor Based on the Direct Electron Transfer of Catalase Immobilized on Nano-Sized NiO/MWCNTs Composite Film. *Electroanalysis*, 24(2); 357-367.
- Sharma, A. and Kumar, A. 2016. Study of structural and electro-catalytic behaviour of amperometric biosensor based on chitosan/polypyrrole nanotubes-gold nanoparticles nanocomposites. *Synthetic Metals*, 220; 551-559.
- Shi, X., Gu, W., Li, B., Chen, N., Zhao, K., Xian, Y. 2014. Enzymatic biosensors based on the use of metal oxide nanoparticles. *Microchimica Acta*, 181; 1-22.
- Shichiri, M., Kawamori, R., Yamasaki, Y., Hakui, N., Abe, H. 1982. Wearable artificial endocrine pancreas with needle-type glucose sensor. *Lancet*, 2; 1129-1131.
- Shul'ga, A.A., Soldatkin, A.P., El'skaya, A.V., Dzyadevich, S.V., Patskovsky, S.V., Strikha, V.I., 1994. Thin-film conductometric biosensors for glucose and urea determination. *Biosensors and Bioelectronics*, 9; 217-223.

- Situmorang, M., Hibbert, D.B., Gooding, J.J. 2000. An experimental design study of interferences of clinical relevance of a polytyramine immobilized-enzyme biosensor. *Electroanalysis*, 12(2); 111-119.
- Solanki, P.R., Kaushik, A., Agrawal, V.V., Malhotra, B.D. 2011. Nanostructured metal oxide-based biosensors. *NPG Asia Materials*, 3(1); 17-24.
- Söğüt Özdemir, D., Kaçar, C., Dalkıran, B., Küçükkolbaşı, S., Erden, P.E., Kılıç, E. 2019. Effect of hexaammineruthenium chloride and/or horseradish peroxidase on the performance of hydrogen peroxide (bio)sensors: a comparative study. *Journal of Materials Science*, 54; 5381-5398.
- Su, L., Jia, W., Hou, C., Lei, Y. 2011. Microbial biosensors: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5); 1788-1799.
- Susanto, H., Samsudin, A.M., Rokhati, N., Widiassa, I.N. 2013. Immobilization of glucose oxidase on chitosan-based porous composite membranes and their potential use in biosensors. *Enzyme and Microbial Technology*, 52; 386– 392.
- Talat, M., Singh, A.K., Srivastava, O.N. 2011. Optimization of process variables by central composite design for the immobilization of urease enzyme on functionalized gold nanoparticles for various applications. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(6); 647-657.
- Tang, H., Yan, F., Tai, Q., Chan, H. L. 2010. The improvement of glucose bioelectrocatalytic properties of platinum electrodes modified with electrospun TiO₂ nanofibers. *Biosensors and Bioelectronics*, 25; 1646-1651.
- Tang, W., Li, Lei., Zeng, X. 2015. A glucose biosensor based on the synergistic action of nanometer-sized TiO₂ and polyaniline. *Talanta*, 131; 417-423.
- Tian, L. and Liu, B. 2013. Fabrication of CuO nanosheets modified Cu electrode and its excellent electrocatalytic performance towards glucose. *Applied Surface Science*, 283; 947-953.
- Tsai, M.T. and Tsai Y.C. 2009. Adsorption of glucose oxidase at platinum-multiwalled carbon nanotube-alumina-coated silica nanocomposite for amperometric glucose biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 141; 592-598.
- Updike, S.J., Hicks, G.P. 1967. The enzyme electrode. *Nature*, 214; 986-988.
- Vidal, J.C.; Garcia, E.; Castillo, J.R. 1998 Electropolymerization of pyrrole and immobilization of glucose oxidase in a flow system: influence of the operating conditions on analytical performance. *Biosensors and Bioelectronics*, 13; 371-382.

- Viticoli, M., Curulli, A., Cusma, A., Kaciulis, S., Nunziante, S., Pandolfi, L., Valentini, F., Padeletti, G. 2006. Third-generation biosensors based on TiO₂ nanostructured films. *Materials Science and Engineering*, 26; 947-951.
- Wang, A.J., Li, Y.F., Feng, J.J., Sun, Y.L., Chen, J.R. 2012. Amperometric glucose sensor based on enhanced catalytic reduction of oxygen using glucose oxidase adsorbed onto core-shell Fe₃O₄@silica@Au magnetic nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 32; 1640-1647.
- Wang, H., Ohnuki, H., Endo, H., Izumi, M. 2012. Effects of self-assembled monolayers on amperometric glucose biosensors based on an organic-inorganic hybrid system. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 168; 249-255.
- Wang, W., Zhang, L., Tong, S., Li, X., Song, W. 2009. Three-dimensional network films of electrospun copper oxide nanofibers for glucose determination. *Biosensors and Bioelectronics*, 25; 708-714.
- Wang, X., Hu, C., Liu, H., Du, G., He, X., Xi, Y. 2010. Synthesis of CuO nanostructures and their application for nonenzymatic glucose sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 144; 220-225.
- Wang, Y., Liu, X., Xu, X., Yang, Y., Huang, L., He, Z., Xu, Y., Chen, J., Feng, Z. 2018. Preparation and characterization of reduced graphene oxide/Fe₃O₄ nanocomposite by a facile in-situ deposition method for glucose biosensor applications. *Materials Research Bulletin*, 101; 340-346.
- Wolfbeis, O.S., Oehme, I., Papkovskaya, N., Klimant, I., 2000. Sol/gel based glucose biosensors employing optical oxygen transducers, and a method for compensating for variable oxygen background. *Biosensors and Bioelectronics*, 15; 69-76.
- Wu, J. and Qu, Y. 2006. Mediator-free amperometric determination of glucose based on direct electron transfer between glucose oxidase and an oxidized boron-doped diamond electrode. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385; 1330-1335.
- Wu, L., Wu, S., Xu, Z., Qiu, Y., Li, S., Xu, H. 2016. Modified nanoporous titanium dioxide as a novel carrier for enzyme immobilization. *Biosensors and Bioelectronics*, 80; 59-66.
- Wu, S., Su, F., Dong, X., Ma, C., Pang, L., Peng, D., Wang, M., He, L., Zhang, Z. 2017. Development of glucose biosensors based on plasma polymerization-assisted nanocomposites of polyaniline, tin oxide, and three-dimensional reduced graphene oxide. *Applied Surface Science*, 401; 262-270.
- Xu, C.X., Huang, K.J., Chen, X.M., Xiong, X.Q. 2012. Direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on TiO₂-graphene/nickel oxide nanocomposite film and its application. *Journal of The Electrochemical Society*, 16; 3747-3752.

- Xue, K., Zhou, S., Shi, H., Feng, X., Xin, H., Song, W. 2014. A novel amperometric glucose biosensor based on ternary gold nanoparticles/polypyrrole/reduced graphene oxide nanocomposite. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013; 412-416.
- Yang, J., Jiang, L.C., Zhang, W.D., Gunasekaran, S. 2010. A highly sensitive non-enzymatic glucose sensor based on a simple two-step electrodeposition of cupric oxide (CuO) nanoparticles onto multi-walled carbon nanotube arrays. *Talanta*, 82; 25-33.
- Yang, L., Ren, X., Tang, F., Zhang, L. 2009. A practical glucose biosensor based on Fe₃O₄ nanoparticles and chitosan/nafion composite film. *Biosensors and Bioelectronics*, 25; 889-895.
- Yang, Z., Feng, J., Qiao, J., Yan, Y., Yu, Q., Sun, K. 2012. Copper oxide nanoleaves decorated multi-walled carbon nanotube as platform for glucose sensing. *Analytical Methods*, 4; 1924-1926.
- Yang, Z., Ye, B., Zong, X., Wang, P. 2010. A rapid response time and highly sensitive amperometric glucose biosensor based on ZnO nanorod via citric acid-assisted annealing route. *Physica E*, 42; 1830-1833.
- Yao, H., Shum, A.J., Cowan, M., Lähdesmäki I, Parviz, B.A. 2011. A contact lens with embedded sensor for monitoring tear glucose level. *Biosensors and Bioelectronics*, 26; 3290-3296.
- Yao, Y.L. ve Shiu, K.K. 2008. Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase at Carbon Nanotube-gold Colloid Modified Electrode with Poly(diallyldimethylammonium chloride) Coating. *Electroanalysis*, 2014, 1542-1548.
- Yava, S., Kumar, A., Pundir, C.S. 2011. Amperometric creatinine biosensor based on covalently coimmobilized enzymes onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes/polyaniline composite film. *Analytical Biochemistry*, 419; 277-283.
- Yoo, E.H. and Lee, Y.S. 2010. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors*, 10; 4558-4576.
- Yu, G., Zhao, Q., Wu, W., Wei, X., Lu, Q. 2016. A facile and practical biosensor for choline based on manganese dioxide nanoparticles synthesized in-situ at the surface of electrode by one-step electrodeposition. *Talanta*, 146; 707-713.
- Yu, Y., Chen, Z., He, S., Zhang, B., Li, X., Yao, M. 2014. Direct electron transfer of glucose oxidase and biosensing for glucose based on PDDA-capped gold nanoparticle modified graphene/multi-walled carbon nanotubes electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 52; 147-152.

- Zappi, D., Caminiti, R., Ingo, G.M., Sadun, C., Tortolini, C., Antonelli, M.L. 2017. Biologically friendly room temperature ionic liquids and nanomaterials for the development of innovative enzymatic biosensors. *Talanta*, 175; 566-572.
- Zhang, J., Feng, M., Tachikawa, H. 2007. Layer-by-layer fabrication and direct electrochemistry of glucose oxidase on single wall carbon nanotubes. *Biosensors and Bioelectronics*, 22; 3036-3041.
- Zhang, J., Ma, J., Zhang, S., Wang, W., Chen, Z. 2015. A highly sensitive nonenzymatic glucose sensor based on CuO nanoparticles decorated carbon spheres. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 211; 385-391.
- Zhang, J., Wang, C., Chen, S., Yuan, D., Zhong, X. 2013. Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase–lectin biospecific interaction. *Enzyme and Microbial Technology*, 52; 134-140.
- Zhang, W., Du, Y., Wang, M.L. 2015. Noninvasive glucose monitoring using saliva nano-biosensor. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 4; 23-29.
- Zhang, W. and Li, G. 2004. Third-generation biosensors based on the direct electron transfer of proteins. *Analytical Sciences*, 20; 603-609.
- Zhang, Z., Xie, Y., Liu, Z., Rong, F., Wang, Y., Fu, D. 2011. Covalently immobilized biosensor based on gold nanoparticles modified TiO₂ nanotube arrays *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 650; 241-247.
- Zhao, Z.W., Chen, X.J., Tay, B.K., Chen, J.S., Han, Z.J., Khor, K.A. 2007. A novel amperometric biosensor based on ZnO:Co nanoclusters for biosensing glucose. *Biosensors and Bioelectronics*, 23; 135-139.
- Zhou, F., Jing, W., Xu, Y., Chen, Z., Jiang, Z. Wei, Z. 2019. Performance enhancement of ZnO nanorod-based enzymatic glucose sensor via reduced graphene oxide deposition and UV irradiation. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 284; 377- 385.
- Zou, C., Fu, Y., Xie, Q., Yao, S. 2010. High-performance glucose amperometric biosensor based on magnetic polymeric bionanocomposites. *Biosensors and Bioelectronics*, 25; 1277-1282.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : İrem OKMAN KOÇOĞLU

Doğum Yeri : Çorlu/TEKİRDAĞ

Doğum Tarihi : 15/04/1986

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Çorlu Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesi (2004)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (2009)

Yüksek Lisans : Karabük Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı (2012)

Doktora : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı (Eylül 2012 – Eylül 2019)

SCI Yayınlar

1. Erden P.E.; Erdoğan, Z.Ö.; Öztürk, F.; **Okman Koçoğlu, İ.**; Kiliç, E. 2019. Amperometric Biosensors for Tyramine Determination Based on Graphene Oxide and Polyvinylferrocene Modified Screen- printed Electrodes. Electroanalysis, DOI: 10.1002/elan.201900369.
2. **Okman Koçoğlu, İ.**, Erden P.E.; Kenar, A.; Kiliç, E. 2019. Application of central composite design for the optimization of electrode surface composition for glucose biosensor fabrication. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 411, 413-425.
3. **Okman Koçoğlu, İ.**; Karagöz, S.; Tay, T.; Erdem, M. 2014. Activated Carbons From Grape Seeds By Chemical Activation With Potassium Carbonate And Potassium Hydroxide. Applied Surface Science, 293, 138-142.

Uluslararası Kongre

- 1 Euroanalysis (2017) Stockholm; **İrem Okman Koçoğlu**, Pınar Esra Erden, Adnan Kenar, Esmâ Kılıç “Optimization of c-MWCNT and TiO₂ nanoparticles amounts to construct amperometric glucose biosensor by using central composite design” Poster Sunumu.

- 2 Biosensors 2016, Gothenburg, Sweden; **İrem Okman Kocoğlu**, Pınar Esra Erden, Esmā Kılıç. “Electrochemical biosensing platforms based on different metal oxide nanoparticles: a comparative study for the detection of histamine.” Poster Sunumu.

Projeler

- 1 “Enzim Temelli Biyosensörlerin Cevabına Çeşitli Metal Oksit Nanopartiküllerin Etkisinin Karşılaştırılması” **Araştırmacı** (Ankara Üniversitesi - Bilimsel Araştırma Projesi; Proje No: 18L0430008).
- 2 “Gıdalarda Biyojenik Aminlerin Eşzamanlı Tayini İçin Tek Kullanımlık Amperometrik Sıralı Biyosensör Grubu Geliştirilmesi”-” **Bursiyer** (TÜBİTAK - Temel Bilimler Araştırma Projesi - 1001; Proje No: 116Z159,).

