

**T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HORSERADISH PEROXIDASE ENZİMİ
KULLANILARAK
AMPEROMETRİK FENOL
BİYOSENSÖRLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

**Şeyda ÖZÖNER
DOKTORA TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI**

**GEBZE
2010**

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HORSERADISH PEROXIDASE ENZİMİ
KULLANILARAK
AMPEROMETRİK FENOL
BİYOSENSÖRLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ

Şeyda ÖZÖNER
DOKTORA TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Elif ERHAN

GEBZE
2010



DOKTORA TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15.01.2010 tarih ve 2010/03 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 05/02/2010 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Şeyda ÖZÖNER'in tez çalışması Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE (TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Elif ERHAN

ÜYE : Prof. Dr. Bülent KESKİNLER

ÜYE : Doç. Dr. Erhan DEMİRBÂŞ

ÜYE : Prof. Dr. Dilek KAZAN

ÜYE : Doç. Dr. Faruk YILMAZ

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../20... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: Horseradish peroxidase Enzimi Kullanılarak Amperometrik Fenol Biyosensörlerinin Geliştirilmesi

YAZAR ADI: Şeyda ÖZÖNER

Bu çalışmada, atıksularda izlenmesi gereken en önemli toksik kirletici parametrelerden olan fenol ve türevlerinin güvenli, seçici, hassas ve hızlı ölçümü amacıyla farklı şekillerde hazırlanmış çalışma elektrotlarından oluşan fenol biyosensörleri geliştirilmiştir. Çalışma elektrotları yüzeyinde değişik kompozisyonlarda polimerik/kompozit filmler sentezlenmiş ve *horseradish peroxidase* enzimi bu filmlere, farklı teknikler kullanılarak bağlanmıştır. Söz konusu polimerik/kompozit filmlerin yapımında yeni sentezlenmiş iletken polimerler kullanılmıştır. Nanoteknolojik bir malzeme olan karbon nanotüp, bazı çalışma elektrotlarının film yapılarına katılmış ve karbon nanotüpün elektrot performansları üzerine etkisi incelenmiştir. Farklı şekillerde hazırlanmış çalışma elektrotları kullanılarak geliştirilen biyosensörler, kesikli ve sürekli sistemlerde 18 farklı fenol türünün ölçümünde kullanılmış, ölçüm için gerekli kalibrasyon eğrileri çizilmiş, bu kalibrasyon eğrileri kullanılarak ölçüm analitik parametreleri hesaplanmıştır. Hesaplanan analitik parametrelere göre biyosensörlerin performansı ve ölçüm güvenilirliği tartışılmıştır. Ayrıca biyosensörlerin ölçüm sonuçları, GC-MS fenol ölçümleri sonuçları ve geçmişte yapılmış fenol biyosensörleri ölçüm sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

SUMMARY

TITLE OF THE THESIS: Development of Amperometric Phenol Biosensors by Using The Enzyme Horseradish peroxidase

AUTHOR: Şeyda ÖZÖNER

In this study, phenol biosensors comprised of working electrodes prepared in various designs have been developed in order to get reliable, selective, sensitive and fast detection of phenol and its derivatives, the most important toxic parameters should be detected in wastewaters. Various compositions of polymeric/composite films were synthesized onto the surface of working electrodes, and the enzyme *horseradish peroxidase* was immobilized to these films by using different techniques. Newly synthesized conductive polymers were used for the fabrication of these polymeric/composite films. Carbon nanotube which is a nanotechnological material was added into the film structures of some working electrodes, and the effect of carbon nanotube on electrode performances was investigated. The developed biosensors using working electrodes prepared in various designs were operated at batch and continuous flow system for the measurement of 18 phenol derivatives, calibration curves necessary for measurement were constructed and the analytical measurement parameters were calculated from these calibration curves. The performance of the biosensors and the reliability of the measurements were discussed according to the calculated analytical parameters. Also, biosensor measurement results were compared with GC-MS phenol measurement and phenol biosensor measurement results of the reported papers in the past.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince kıymetli bilgisini ve desteğini yakinen hissettiğim danışman hocam Doç Dr. Elif ERHAN'a, saygı değer hocam Prof. Dr. Bülent KESKİNLER'e ve polimer sentezi çalışmalarıyla tezime katkıda bulunan Doç Dr. Faruk YILMAZ'a teşekkür ederim.

Birlikte geçirdiğimiz keyifli anlar için Arş. Gör. Mevra YALVAÇ'a ve Özlem TERZİ'ye, manevi destekleriyle beni yalnız bırakmayan değerli aileme ve eşim Oktay ÖZÖNER'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamı "Amperometrik Fenol Biyosensörlerinin Geliştirilmesi" başlıklı, 105Y130 numaralı proje kapsamında finanse eden TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Şeyda ÖZÖNER

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| ÖZET | iv |
| SUMMARY | v |
| TEŞEKKÜR | vi |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | xii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xiv |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xxi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. BİYOSENSÖRLER | 5 |
| 2.1. Biyosensör Tanımı ve Kullanım Alanları | 5 |
| 2.2. Biyosensör Çeşitleri | 9 |
| 2.2.1. Elektrokimyasal Çeviriciler | 10 |
| 2.2.1.1. Potansiyometrik Çevirici | 10 |
| 2.2.1.2. Amperometrik Çevirici | 13 |
| 2.2.1.3. Konduktometrik Çevirici | 13 |
| 2.2.1.4. Alan Etkili Transistörler (Field-effect transistors) | 15 |
| 2.2.2. Optik Çeviriciler | 18 |
| 2.2.2.1. Fotometrik Çevirici | 19 |
| 2.2.2.2. Florimetrik Çevirici | 20 |
| 2.2.2.3. Luminesans Esaslı Çevirici | 21 |
| 2.2.3. Kütle Değişimli Çeviriciler | 23 |
| 2.2.3.1. Piezo-elektrik Çevirici | 23 |
| 2.2.4. Isı Değişimli Çeviriciler | 27 |
| 2.2.4.1. Termistörler | 27 |
| 2.2.4.2. Katalitik Gaz Sensörleri | 29 |
| 2.3. Amperometrik Biyosensörler | 30 |
| 2.3.1. Amperometrik Biyosensörlerin Performans Kriterleri | 45 |
| 2.3.1.1. Kalibrasyon Karakteristikleri: Hassasiyet, Doğrusal Aralık, Belirleme Limiti | 46 |

| | |
|---|----|
| 2.3.1.2. Tekrarlanabilirlik, Kararlılık, Kullanım Ömrü, Yanıt Süresi | 48 |
| 2.3.2. Amperometrik Biyosensörlerde İletken Polimerlerin Kullanımı | 49 |
| 2.3.3. Amperometrik Biyosensörlerde Nanaopartiküllerin Kullanımı | 56 |
| 2.4. Amperometrik Fenol Biyosensörleri | 61 |
| 2.4.1. <i>Horseradish peroxidase</i> Tabanlı Fenol Biyosensörleri | 71 |
| 3. MATERYAL VE METOT | 75 |
| 3.1. Kullanılan Kimyasallar | 75 |
| 3.2. Enzim | 77 |
| 3.3. Elektrokimyasal Sistem ve Elektrotlar | 77 |
| 3.4. Polimerler | 78 |
| 3.5. Karbon nanotüp Çözeltisi | 80 |
| 3.6. Çalışma Elektrotlarının Hazırlanışı | 80 |
| 3.6.1. PPy/PGA/HRP/Au Çalışma Elektrodunun Hazırlanışı | 80 |
| 3.6.2. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au Çalışma Elektrodunun Hazırlanışı | 81 |
| 3.6.3. PPy/CNT/HRP/Au Çalışma Elektrodunun Hazırlanışı | 81 |
| 3.6.4. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au Çalışma Elektrodunun Hazırlanışı | 82 |
| 3.6.5. Poli(GMA-co-MTM) ile Farklı Çalışma Elektrotlarının Hazırlanışı | 83 |
| 3.6.5.1. Poli(GMA-co-MTM)/PPy~HRP/Au Çalışma Elektrodunun Hazırlanışı | 83 |
| 3.6.5.2. Poli(GMA-co-MTM) ~HRP/PPy/Au Çalışma Elektrodunun Hazırlanışı | 83 |
| 3.6.5.3. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au Çalışma Elektrodunun Hazırlanışı | 84 |
| 3.6.5.4. Poli(GMA-co-MTM)/HRP/Au Çalışma Elektrodunun Hazırlanışı | 84 |
| 3.6.5.5. PPy/HRP/Au Çalışma Elektrodunun Hazırlanışı | 84 |
| 3.6.5.6. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC Çalışma Elektrodunun Hazırlanışı | 85 |
| 3.6.6. PPy/PGA/HRP/GC Çalışma Elektrodunun Hazırlanışı | 85 |

| | |
|--|-----|
| 3.7. Amperometrik Ölçümlerin Yapılışı | 85 |
| 3.7.1. Kesikli Ölçümler | 85 |
| 3.7.2. Sürekli Ölçümler | 86 |
| 3.7.3. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması | 88 |
| 3.7.4. Analitik Ölçüm Parametrelerinin Hesaplanması | 88 |
| 3.7.4.1. Doğrusal Aralık | 88 |
| 3.7.4.2. Ölçüm Hassasiyeti | 89 |
| 3.7.4.3. Belirleme Limiti (LOD) | 90 |
| 3.7.4.4. İşletme Kararlılığı | 90 |
| 3.7.4.5. Depo Kararlılığı | 90 |
| 3.7.4.6. Verimlilik | 91 |
| 3.7.4.7. Yanıt Süresi | 91 |
| 3.8. Biyosensör İşletme Parametrelerinin Belirlenmesi | 92 |
| 3.8.1. Çalışma Potansiyeli Optimizasyonu | 92 |
| 3.8.2. pH Optimizasyonu | 92 |
| 3.8.3. Hidrojen peroksit Optimizasyonu | 93 |
| 3.9. Gaz Kromatografi Metodu (GC-MS) ile Fenolik Bileşiklerin Ölçümü | 93 |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA | 95 |
| 4.1. PPy/PGA/HRP/Au Çalışma Elektrodu Bulguları | 95 |
| 4.1.1. PPy/PGA/HRP/Au Çalışma Elektroduna Ait Film Karakterizasyonu | 95 |
| 4.1.2. PPy/PGA/HRP/Au Çalışma Elektrodu ile Fenol ve Türevlerinin Ölçümü | 97 |
| 4.2. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au Çalışma Elektrodu Bulguları | 102 |
| 4.2.1. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au Çalışma Elektroduna Ait Film Karakterizasyonu | 102 |
| 4.2.2. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au Çalışma Elektrodu İçin İşletme Parametrelerinin Optimizasyonu | 104 |
| 4.2.3. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au Çalışma Elektrodu ile Fenol ve Türevlerinin Ölçümü | 105 |
| 4.3. PPy/CNT/HRP/Au Çalışma Elektrodu Bulguları | 110 |
| 4.3.1. PPy/CNT/HRP/Au Çalışma Elektroduna Ait Film Karakterizasyonu | 110 |

| | |
|--|-----|
| 4.3.2. PPy/CNT/HRP/Au Çalışma Elektrodu İçin İşletme Parametrelerinin Optimizasyonu | 112 |
| 4.3.3. PPy/CNT/HRP/Au Çalışma Elektrodu ile Fenol ve Türevlerinin Ölçümü | 115 |
| 4.4. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au Çalışma Elektrodu Bulguları | 122 |
| 4.4.1. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au Çalışma Elektroduna Ait Film Karakterizasyonu | 122 |
| 4.4.2. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au Çalışma Elektrodu İçin İşletme Parametrelerinin Optimizasyonu | 127 |
| 4.4.3. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au Çalışma Elektrodu ile Fenol ve Türevlerinin Ölçümü | 129 |
| 4.5. Poli(GMA-co-MTM) ile Hazırlanmış Farklı Çalışma Elektrotlarının Film Karakterizasyonu | 135 |
| 4.5.1. Poli(GMA-co-MTM)/PPy~HRP/Au Çalışma Elektrodu Bulguları | 138 |
| 4.5.2. Poli(GMA-co-MTM)~HRP/PPy/Au Çalışma Elektrodu Bulguları | 141 |
| 4.5.3. PPy/HRP/Au Çalışma Elektrodu Bulguları | 143 |
| 4.5.4. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au Çalışma Elektrodu Bulguları | 145 |
| 4.5.5. Poli(GMA-co-MTM)/HRP/Au Çalışma Elektrodu Bulguları | 149 |
| 4.5.6. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC Çalışma Elektrodu Bulguları | 150 |
| 4.5.6.1. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC Çalışma Elektrodu İçin İşletme Parametrelerinin Optimizasyonu | 155 |
| 4.5.6.2. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC Çalışma Elektrodu ile Fenol ve Türevlerinin Ölçümü | 157 |
| 4.6. PPy/PGA/HRP/GC Çalışma Elektrodu Bulguları | 162 |
| 4.6.1. PPy/PGA/HRP/GC Çalışma Elektroduna Ait Film Karakterizasyonu | 162 |
| 4.6.2. PPy/PGA/HRP/GC Çalışma Elektrodu İçin İşletme Parametrelerinin Optimizasyonu | 163 |

| | |
|---|-----|
| 4.6.3. PPy/PGA/HRP/GC Çalışma Elektrodu ile Fenol ve Türevlerinin Ölçümü | 165 |
| 4.7. Gaz Kromatografi Metodu (GC-MS) ile Fenolik Bileşiklerin Ölçümü | 171 |
| 4.8. Literatürde Horseradish peroxidase Tabanlı Fenol Biyosensörleri İçin Rapor Edilmiş Analitik Parametreler | 175 |
| 5. SONUÇLAR | 177 |
| KAYNAKLAR | 182 |
| ÖZGEÇMİŞ | 197 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|--------------------|--|
| A | Amper |
| AIBN | α,α' -Azobisisobütironitril |
| Au | Altın |
| CE | Elektrokimyasal kapiler elektroforez |
| CHEMFET | Kimyasal alan etkili transistör |
| CNT | Karbon nanotüp |
| CPE | Karbon pastası elektrodu |
| CV | Dönüşümlü voltametri |
| DMF | Dimetilformamid |
| E | Potansiyel |
| ENFET | Enzim tabanlı alan etkili transistör |
| FAD | Flavin adenin dinükleotit |
| Fc | Ferrosin |
| FDH | <i>Formaldehyde dehydrogenase</i> |
| FET | Alan etkili transistör |
| FIA | Akışa enjeksiyon |
| FMN | Flavin mononükleotit |
| FMNH ₂ | İndirgenmiş flavin |
| FTIR | Fourier dönüşüm spektroskopisi |
| GC | Gaz kromatografisi |
| GCE | Camsı karbon elektrot |
| GMA | Glisidil metakrilat |
| GOD | <i>Glucose oxidase</i> |
| ¹ H-NMR | Proton nükleer manyetik rezonans |
| HPLC | Yüksek performans sıvı kromatografisi |
| HRP | <i>Horseradish peroxidase</i> |
| I | Akım |
| ISFET | İyon seçici alan etkili transistör |
| LOD | Belirleme limiti |
| MIP-ES | Mikrodalga indüklenmiş plazma emisyon spektroskopisi |
| MS | Kütle spektrometri |

| | |
|---------|-----------------------------------|
| MTM | 3-tiyenilmetil metakrilat |
| mV | Milivolt |
| MWCNT | Çok duvarlı karbon nanotüp |
| nA | Nanoamper |
| NAD | Nikotinamid adenin dinükleotitin |
| PGA | Poligluteralehit |
| PPy | Polipirol |
| PVDF | Poliviniliden florit |
| R | Direnç |
| RSD | Relatif standart sapma |
| S | Saniye |
| SDS | Sodyum dodesil sülfat |
| SEM | Taramalı elektron mikroskobu |
| SHE | Standart hidrojen elektrodu |
| SWCNT | Tek duvarlı karbon nanotüp |
| TBAFB | Tetrabütülamonyum tetrafloroborat |
| THF | Tetrahidrofuran |
| V | Volt |
| μ M | Mikromolar |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Sekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 1.1. Biyosensörün ana elemanları | 6 |
| 2.1. Potansiyometrik gaz probu | 12 |
| 2.2. Şematik bir CHEMFET gösterimi | 17 |
| 2.3. Piezo-elektrik sensör sistemi şematik gösterimi | 25 |
| 2.4. Termistörlü biyosensörün şematik gösterimi | 28 |
| 2.5. Potansiyel uygulandığında konsantrasyon-uzaklık profilinin gösterimi | 31 |
| 2.6. Polarize olmayan ortamda 2 elektrot arasındaki potansiyel düşüşü | 33 |
| 2.7. Elektrolit içeren ortamda 2 elektrot arasındaki potansiyel düşüşü | 33 |
| 2.8. Çözelti içerisinde bir direnç ve akan bir akım olduğu durumda 2 elektrot arasındaki potansiyel düşüşü | 34 |
| 2.9. Üçlü elektrot sisteminin potansiyostata yerleşimi | 37 |
| 2.10. Clark tipi glikoz elektrodunun şematik gösterimi | 40 |
| 2.11. Ferrosin medyatörlü bir glikoz biyosensörü için reaksiyon mekanizması | 43 |
| 2.12. Konjüge çift bağ | 51 |
| 2.13. Bazı iletken polimerlerin kimyasal yapıları | 53 |
| 2.14. Dop edilmiş polipirol | 54 |
| 2.15. Karbon nanotüp çeşitleri | 58 |
| 2.16. Çalışma elektrodu üzerinde <i>tyrosinase</i> enzimi ile fenol arasındaki etkileşim | 63 |
| 2.17. Çalışma elektrodu üzerinde <i>laccase</i> enzimi ile fenol arasındaki etkileşim | 64 |
| 2.18. <i>Horseradish peroxidase</i> enziminin aktif merkezindeki prostatik grup (ferrik protoporfirin IX) | 65 |
| 2.19. Çalışma elektrodu üzerinde <i>horseradish peroxidase</i> enzimi ile fenol arasındaki etkileşim | 66 |
| 3.1. Sürekli sistem akış hücresi ve üçlü elektrot sistemi | 78 |
| 3.2. Poli(GMA-co-MTM)'nin sentezi | 79 |
| 3.3. Kesikli sistem deney düzeneği | 86 |
| 3.4. Sürekli sistem enjeksiyon valfi ve akış hücresi | 87 |
| 3.5. Sürekli sistem deney düzeneği | 87 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 3.6. | Analitik eğriye ait doğrusal aralık (kalibrasyon eğrisi) | 89 |
| 3.7. | Biyosensör hassasiyet değerinin ölçümü | 89 |
| 3.8. | Biyosensörün yanıt süresi | 91 |
| 4.1. | PPy/PGA filmine ait dönüşümlü voltametri grafiği | 95 |
| 4.2. | Saf polipirrol filmin FTIR spektrumu | 96 |
| 4.3. | PGA/PPy kompozit filmine ait FTIR spektrumu | 97 |
| 4.4. | PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodundan fenol eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği | 98 |
| 4.5. | PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodundan <i>p</i> -benzokinon eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği | 98 |
| 4.6. | PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodundan <i>p</i> -kresol eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği | 99 |
| 4.7. | PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodundan 2-klorofenol eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği | 99 |
| 4.8. | PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodunda test edilen fenolik bileşiklerin kalibrasyon grafikleri | 100 |
| 4.9. | PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodunun test edilen fenolikler için işletme kararlılığı grafikleri | 102 |
| 4.10. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA kompozit filmine ait dönüşümlü voltametri grafiği | 103 |
| 4.11. | Çalışma potansiyelinin Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodu performansına etkisi | 104 |
| 4.12. | Ortam pH'sının Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodu performansına etkisi | 105 |
| 4.13. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodundan <i>p</i> -kresol eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği | 106 |
| 4.14. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodundan 2,4-dimetilfenol eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği | 107 |
| 4.15. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodunda test edilen fenolik bileşiklerin kalibrasyon grafikleri | 108 |
| 4.16. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodunun test edilen fenolikler için işletme kararlılığı grafikleri | 110 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.17. | PPy/CNT/HRP/Au (A) ve PPy/HRP/Au (B) çalışma elektrotlarına ait dönüşümlü voltametri grafikleri | 111 |
| 4.18. | Çalışma potansiyelinin PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu performansına etkisi | 112 |
| 4.19. | Ortam pH'sının PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu performansına etkisi | 113 |
| 4.20. | PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu için 8 μ M (A), 16 μ M (B) ve 32 μ M (C) hidrojen peroksit konsantrasyonlarında fenol eklemelerinden elde edilen akım-zaman grafikleri | 114 |
| 4.21. | PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu için farklı hidrojen peroksit konsantrasyonlarında akım-zaman grafiklerinden elde edilen fenol kalibrasyonları | 115 |
| 4.22. | PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodundan 2-aminofenol (A), hidrokinon (B) ve 4-metoksifenol (C) eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafikleri | 116 |
| 4.23. | PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunda fenol ve hidrokinon için elde edilen kalibrasyon eğrileri | 117 |
| 4.24. | PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunda katekol, pirogallol, guaiakol, <i>m</i> -kresol ve 4-asetamidofenol için elde edilen kalibrasyon eğrileri | 117 |
| 4.25. | PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunun 2-klorofenol, 2,6-dimetoksifenol ve <i>p</i> -kresol için işletme kararlılığı grafikleri | 120 |
| 4.26. | PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunun 4-klorofenol, fenol ve pirogallol için işletme kararlılığı grafikleri | 120 |
| 4.27. | PPy/HRP/Au (A) ve PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodundan (B) hidrokinon eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafikleri | 122 |
| 4.28. | Poly(GMA-co-MTM)'ye ait ¹ H-NMR spektrumu (çözücü: döterkloroform) | 123 |
| 4.29. | PPy (A), Poli(GMA-co-MTM)/PPy (B) ve Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT (C) filmlerine ait SEM görüntüleri. | 124 |
| 4.30. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği | 126 |
| 4.31. | Poli(GMA-co-MTM) film elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği | 126 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.32. | Çalışma potansiyelinin Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu performansına etkisi | 127 |
| 4.33. | Ortam pH'sının Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu performansına etkisi | 128 |
| 4.34. | Hidrojen peroksit konsantrasyonunun Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu performansına etkisi | 129 |
| 4.35. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodundan pirokatekol (A), 4-metoksifenol (B) ve 2-aminofenol (C) eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafikleri | 130 |
| 4.36. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodundan guaiakol (A) ve pirogallol (B) eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafikleri | 130 |
| 4.37. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunda fenol, katekol, <i>p</i> -benzokinon, 4-metoksifenol ve 2,6-dimetoksifenol için elde edilen kalibrasyon eğrileri | 131 |
| 4.38. | HRP'nin Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT kompozit film yüzeyine Poli(GMA-co-MTM)'nin epoksi grupları üzerinden (A), CNT'nin taşıdığı karboksil grupları üzerinden (B) muhtemel bağlanma mekanizmaları | 134 |
| 4.39. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunun fenol, 4-klorofenol, 2-aminofenol ve 4-metoksifenol için işletme kararlılığı grafikleri | 135 |
| 4.40. | Pirolün sulu ortamda (A) ve organik ortamda (B) altın elektrot yüzeyinde elektropolimerizasyonuna ait dönüşümlü voltametri grafikleri. | 136 |
| 4.41. | Sulu ortamda altın elektrot yüzeyinde Poli(GMA-co-MTM)/PPy kompozit filmin (A) ve saf polipirol filmin (B) elektropolimerizasyonuna ait dönüşümlü voltametri grafikleri | 137 |
| 4.42. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy~HRP/Au çalışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği | 138 |
| 4.43. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy~HRP/Au çalışma elektrodundan hidrokinon eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği | 139 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.44. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy~HRP/Au çalışma elektrodunda hidrokinon için elde edilen kalibrasyon eğrisi | 140 |
| 4.45. | Poli(GMA-co-MTM)~HRP/PPy/Au çalışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği | 141 |
| 4.46. | Poli(GMA-co-MTM)~HRP/PPy/Au çalışma elektrodundan hidrokinon eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği | 142 |
| 4.47. | Poli(GMA-co-MTM)~HRP/PPy/Au çalışma elektrodunda hidrokinon için elde edilen kalibrasyon eğrisi | 142 |
| 4.48. | PPy/HRP/Au çalışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği. | 143 |
| 4.49. | PPy/HRP/Au çalışma elektrodundan hidrokinon eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği | 144 |
| 4.50. | PPy/HRP/Au çalışma elektrodunda hidrokinon için elde edilen kalibrasyon eğrisi | 145 |
| 4.51. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği | 146 |
| 4.52. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektrodundan hidrokinon eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği | 146 |
| 4.53. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektrodunda hidrokinon için elde edilen kalibrasyon eğrisi | 147 |
| 4.54. | Aynı polimer filmlerle farklı immobilizasyon teknikleri kullanılarak hazırlanmış çalışma elektrotlarında hidrokinon için elde edilen kalibrasyon eğrileri | 148 |
| 4.55. | Farklı günlerde yapılmış Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektrotlarının aynı hidrokinon eklemelerinden elde edilen akım-zaman grafikleri | 149 |
| 4.56. | Poli(GMA-co-MTM)/HRP/Au çalışma elektrodundan hidrokinon eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği | 150 |
| 4.57. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği | 151 |
| 4.58. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodundan hidrokinon eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği | 152 |
| 4.59. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodunda hidrokinon için elde edilen kalibrasyon eğrisi | 152 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.60. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC ve Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektrotlarının hidrokinon eklemelerinden elde edilen akım-zaman grafikleri | 154 |
| 4.61. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC ve Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektrotlarının hidrokinon kalibrasyon grafikleri | 155 |
| 4.62. | Çalışma potansiyelinin Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodu performansına etkisi | 156 |
| 4.63. | Hidrojen peroksit konsantrasyonunun Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodu performansına etkisi | 157 |
| 4.64. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodundan katekol (A), <i>p</i> -benzokinon (B), <i>p</i> -kresol (C) ve <i>m</i> -kresol (D) eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafikleri | 158 |
| 4.65. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodundan 4-asetamidofenol (A) ve 4-metoksifenol (B) eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafikleri | 158 |
| 4.66. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodunda 4-metoksifenol, <i>p</i> -kresol, 4-asetamidofenol, guaiakol ve 4-klorofenol için elde edilen kalibrasyon eğrileri | 159 |
| 4.67. | Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodunun fenol, hidrokinon, 4-klorofenol ve 4-asetamidofenol için işletme kararlılığı grafikleri | 162 |
| 4.68. | PPy/PGA/HRP/GC (A) ve PPy/HRP/GC (B) çalışma elektrotlarına ait dönüşümlü voltametri grafikleri | 163 |
| 4.69. | Ortam pH'sının PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodu performansına etkisi | 164 |
| 4.70. | Hidrojen peroksit konsantrasyonunun PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodu performansına etkisi | 165 |
| 4.71. | PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodundan 0,25-6 mL/dak aralığındaki akış hızlarında elde edilen katekol sinyalleri | 166 |
| 4.72. | PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodundan 0,25-6 mL/dak aralığındaki akış hızlarında elde edilen <i>p</i> -benzokinon sinyalleri | 166 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.73. | PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodundan, farklı akış hızlarında katekol ve <i>p</i> -benzokinon için elde edilen hassasiyet değerleri | 168 |
| 4.74. | PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodundan 1 mL/dak akış hızında artan konsantrasyonda fenol enjeksiyonlarına verdiği tepki | 168 |
| 4.75. | PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodunun 1 mL/dak akış hızında artan konsantrasyondaki <i>p</i> -benzokinon enjeksiyonlarına verdiği sinyaller | 169 |
| 4.76. | PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodunda <i>p</i> -benzokinon için elde edilen kalibrasyon eğrisi | 170 |
| 4.77. | PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodunun <i>p</i> -benzokinon için işletme kararlılığı grafiği | 171 |
| 4.78. | Fenolik türlere ait GC-MS kromatogram görüntüsü | 172 |
| 4.79. | GC-MS ölçüm metodunda fenol, <i>p</i> -benzokinon, 2-klorofenol ve 3-klorofenol için elde edilen kalibrasyon eğrisi | 174 |
| 4.80. | GC-MS ölçüm metodunda 2,4-dimetilfenol, 4-metoksifenol, 2,6-dimetoksifenol ve hidrokinon için elde edilen kalibrasyon eğrisi | 174 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>Cizelge</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 2.1. Oksidaz sınıfı enzimleri içeren biyosensörler | 40 |
| 2.2. Bazı doğal ve yapay medyatörler ve pH 7'deki redoks potansiyelleri | 44 |
| 2.3. Bazı organik monomerlerin yükseltgenme potansiyelleri | 52 |
| 3.1. Deneyleerde kullanılan 18 fenol bileşiği ve molekül yapıları | 75 |
| 4.1. PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodu için fenol ve türevlerinin ölçümünde hesaplanan analitik parametreler | 100 |
| 4.2. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodu için fenol ve türevlerinin ölçümünde hesaplanan analitik parametreler | 108 |
| 4.3. PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu için fenol ve türevlerinin ölçümünde hesaplanan analitik parametreler | 119 |
| 4.4. GMA ve MTM serbest-radikal kopolimerizasyonuna ait kompozisyon verileri | 123 |
| 4.5. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu için fenol ve türevlerinin ölçümünde hesaplanan analitik parametreler | 132 |
| 4.6. Poli(GMA-co-MTM) tabanlı çalışma elektrotlarının hidrokinon ölçümü için hesaplanan analitik parametreleri | 154 |
| 4.7. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodu için fenol ve türevlerinin ölçümünde hesaplanan analitik parametreler | 160 |
| 4.8. GC-MS metodu ölçümleri sonuç tablosu | 172 |
| 4.9. <i>Horseradish peroxidase</i> tabanlı fenol biyosensörleri literatür bulguları | 176 |

1. GİRİŞ

Çevre çalışmalarının tarihsel gelişimine bakıldığında, 1990'lar itibariyle sanayi ve hizmet sektörlerinin giderek büyüdüğü ve buna bağlı olarak daha kapsamlı yaklaşımlara ihtiyaç duyulduğu bilinmektedir. Endüstriyel tesisler ve faaliyetlerden kaynaklanan çevre sorunları ile buna ilişkin çevresel uygunluk zinciri konusu, bu kapsamdaki çalışmaların büyük kısmını oluşturmaktadır. Söz konusu zincirin çevresel izin ile çevre denetimi arasındaki halkasını teşkil eden çevresel izleme konusu, teknoloji ile doğru orantılı olarak izleme tekniklerinin de gelişmesi ile çevre otoriteleri için en önemli çalışma alanlarından biri haline gelmiştir. Bir başka deyişle endüstriyel proseslerin, bu proseslerin havaya suya veya toprağa kirletici salınımlarının ve bu salınımların çevreye etkilerinin izlenmesi çevresel düzenleyici sistemin anahtar unsurudur. Alıcı ortamların kirlilik yükü kapasitelerinin belirlenmesi, buna dair önlemlerin yerinde ve zamanında doğru biçimde alınabilmesi ve çevre denetim sisteminin işleyebilmesi için iyi bir izleme tekniğinin oluşturulması şarttır. Alıcı ortama deşarj edilen herhangi bir kirletici parametrenin miktarının belirlenmesi, mevcut kirleticinin deşarj ve alıcı ortam standartlarına uygunluğunun tespiti açısından oldukça önemlidir. Çevresel kirleticilerin izlenmesi amacıyla kirletici parametrelerin yapılarına ve karakterlerine göre geliştirilmiş standart analiz metotları hali hazırda mevcuttur. Söz konusu analiz metotları farklı bileşenlerden oluşmuş numunelerin analiz edilmesinde ve bazı karışık numunelerin ön arıtıma tabi tutulma gereksinimlerine bağlı olarak hatalı sonuçlar verebilmektedir. Mevcut analiz metotlarında görülen bu sıkıntılardan dolayı araştırmacıların son yıllarda alternatif analiz metotlarının geliştirilmesi üzerine yaptıkları çalışmaları hız kazanmıştır. Alternatif analiz metotlarından biri olarak kullanılmaya başlanan biyosensörler hedefe yönelik hızlı, güvenilir ve anlık sonuçlar verebilmektedirler. Kirleticilerin anında analiz edilebilmesi özellikle arıtma reaktörlerinin otomatik kontrolünde rahatlıkla kullanılabilmekte veya ortamdaki kirleticinin sürekli izlenmesi ile gerekli önlemlerin alınabilmesine izin vermektedir. Amerika ve Avrupa'da giderek artan çevresel sınırlamalar hava, toprak ve özellikle sulardaki kirleticilerin güvenilir ve hızlı analizlenmesini zorunlu hale getirmiştir. Birçok standart analiz metodunda görülen girişim problemleri biyosensörlerin kullanımıyla numuneye ön arıtım işlemi uygulama gereği duyulmadan ortadan kaldırılabilmektedir. Biyosensör teknolojisi fizik, kimya ve biyoteknoloji alanlarını kapsayan çok disiplinli bir teknolojidir.

Biyosensörlerin çalışma prensibi olan elektron alış-verişi başlı başına fiziğin, biyosensör ana elemanlarından çalışma elektrotlarının kaplandığı iletken polimerlerin sentezi kimyanın, bu iletken polimerlere bağlanan enzim, doku ve mikroorganizma gibi materyaller biyoteknolojinin araştırma alanlarına girmektedir.

Çevre mühendisliğinde izlenmesi gereken en önemli parametrelerden biri fenol ve fenol türevleridir. Bu kimyasallar, plastikler, boyalar, ilaç ve antioksidan üretimi, kâğıt ve kâğıt hamuru gibi pek çok endüstriyel sürecin bir bileşeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Pek çok fenol bileşiği biyolojik sistemler üzerinde zehirli ve tehlikeli etkiye sahip olup, sular vasıtasıyla besin zincirine girmektedir. Fenollerin 1 ppb'den düşük seviyeleri bile suyun tat ve koku özelliklerini değiştirebilmektedir. Endüstriyel atıkların yüzey sularına karışması ile tabiatta doğal fenol polimerlerinin biyolojik parçalanma dengesi de olumsuz yönde etkilenmektedir. Bu anlamda daha çok çiftlik atıkları içerisinde bulunan humik asit, tannin ve lignin gibi doğal fenol polimeri yapıları ek olarak çeşitli pestisitlerden organofosforlu insektisitler, klorlu fenoksi asitlerin parçalanma ürünleri olarak klorlu ve nitrolu bileşikler sulara karışmaktadır. Fenoller doğal membran yapısına kolaylıkla nüfuz ederek toksik ve mutajenik etkiler göstermekte, respirasyon ve fotosentezin kataliz mekanizmasını olumsuz yönde etkilemektedir. Ayrıca, içinde fenol bulunan suların klorlanması sonucu oluşan klorofenollerin ppb mertebesinde bile canlı yaşama toksik etkisi olduğu bilinmektedir.

Fenollerin kantitatif analizi için kullanılan başlıca standart metotlar yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC), elektrokimyasal kapiler elektroforez (CE), spektrofotometrik metot, kağıt elektroforezi, ince tabaka kromatografisi, gaz kromatografisi (GC) (ECD, FID ile), gaz kromatografisi kütle spektrometri metodu (MS), UV ölçümlü ince tabaka kromatografisi ve mikrodalga indüklenmiş plazma emisyon spektroskopisi (MIP-ES) teknikleridir. Söz konusu analiz metotlarının çevre numunelerinde doğrudan kullanılmaları mümkün olmamaktadır. Çevre konularını ilgilendiren ölçümlerde fenol bileşikleri numuneler içerisinde genellikle iz seviyede ve oldukça karışık halde bulduklarından numuneler cihazlara alınmadan önce çeşitli ekstraksiyon, temizleme ve seyreltme aşamalarından geçirilmektedir. Bu işlemler zaman alıcı, zahmetli ve duyarlı değildir. Bu nedenle fenollerin kantitatif ölçümleri için daha güvenilir, daha duyarlı, seçici ve hızlı ölçüm yapabilen

biyosensörler geliştirilmektedir. Fenol ve fenol türevlerini ölçme amacıyla geliştirilmekte olan biyosensörler çoğunlukla polifenol oksidaz grubu (*tyrosinase*, *laccase*) ve *horseradish peroxidase* enzimlerini içeren çalışma elektrotları kullanılarak hazırlanır. Fenol ve fenol türevleri *horseradish peroxidase* enziminin tipik substratlarıdır. Bu enzim, fenolün oksidasyon reaksiyonunu katalizleyebilmek için reaksiyonun ilk basamağında hidrojen peroksit tarafından oksitlenir. Oksitlenen enzim daha sonra fenol ve fenol türevlerinin oksidasyon reaksiyonlarını katalizler. Fenolün oksidasyonu sonucu oluşan fenoksi radikalleri ise ortamda herhangi bir elektron vericisi olmadığı takdirde kendi aralarında birleşerek fenolik polimerik maddeleri oluştururlar. Oluşan polimerlerin çöktürme işlemi ile ortamdan uzaklaştırılması sonucu biyoteknolojik bir arıtma prosesinde fenol arıtımı gerçekleştirilmiş olur. Biyosensörlerde ise, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan fenoksi radikalleri elektrot yüzeyinden elektron kopararak elektronu enzime iletir, böylelikle enzim ve elektrot arasında elektron aracısı (medyatör) görevi görür. Elektrot yüzeyinden fenoksi radikale doğru gerçekleşen elektron akışı bir elektrokimyasal analiz cihazı (potansiyostat) aracılığıyla elektriksel akım sinyallerine çevrilir. Bu sinyaller ise ortama eklenen fenol/fenol türevi konsantrasyonu ile orantılı olarak gelişir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda *horseradish peroxidase* tabanlı fenol biyosensörlerinin *tyrosinase* ve *laccase* tabanlı biyosensörlere oranla daha az kullanıldığı görülmektedir. Bunun nedenlerinden biri; *laccase* ve *tyrosinase* enzimlerinin fenol kataliz reaksiyonu için sudaki moleküler oksijeni kullanması yeterli iken, *horseradish peroxidase* enziminin ilaveten hidrojen peroksit gereksinim duymasıdır. Hidrojen peroksit miktarının azlığı *horseradish peroxidase*-fenol arasındaki reaksiyonu kısıtlarken, aşırı miktarları enzimin inhibe olmasına sebep olur. Bu nedenle hidrojen peroksit *horseradish peroxidase* tabanlı bir fenol biyosensöründe kontrol edilmesi gerekli önemli bir parametredir. Ayrıca, *horseradish peroxidase* enziminin polifenol oksidazlara kıyasla farklı fenol türevlerine seçiciliğinin az olması da biyosensörlerde az kullanılmasına başka bir neden olarak sayılabilir. Buna rağmen, *horseradish peroxidase* enziminin fenol ve fenol türevleri ile polifenol oksidaz enzimlerine göre daha hızlı reaksiyon vermesi ve *horseradish peroxidase* tabanlı biyosensörlerin ölçüm hassasiyetinin polifenol oksidaz tabanlı biyosensörlere oranla yüksek olabilmesi bu enzimin fenol biyosensöründe kullanılması için yeterli nedenlerdir. Özellikle son yıllardaki fenol biyosensör çalışmaları elektroaktivitesi geliştirilmiş yeni çalışma elektrotlarının

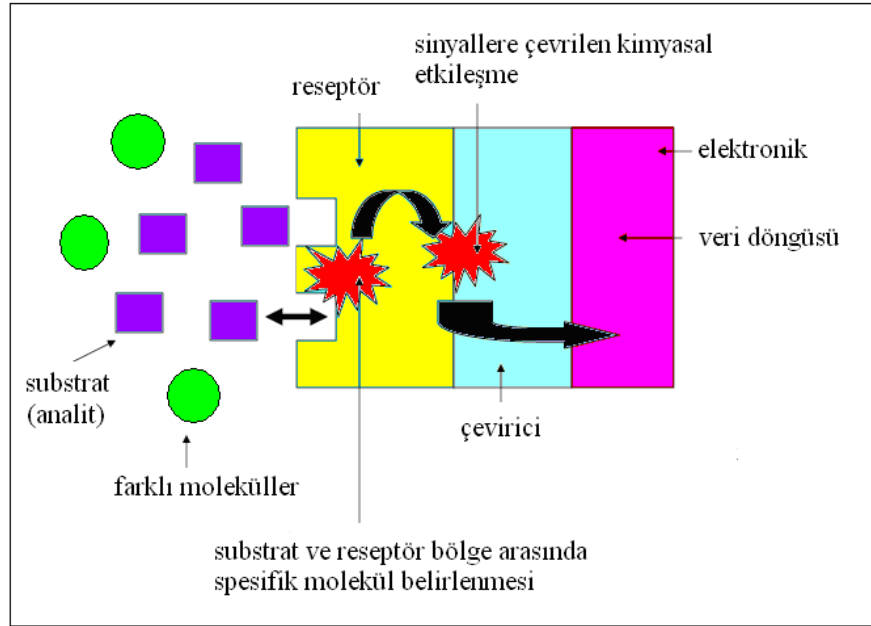
hazırlanması üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalar aynı zamanda biyosensörün kararlılığı ve duyarlılığı üzerinde de doğrudan etkili olduğundan, fenol biyosensörlerinin ticari kullanımını kolaylaştırmaya yöneliktir. Ayrıca yapılan çalışmalarda birbirinden farklı fenol bileşiklerinin spesifik olarak tayin edilmesi özelliği üzerinde durulmakta ve çevresel örneklerin uzun örnek hazırlama ve saflaştırma basamakları aşılmaya çalışılmaktadır. Sözü edilen konularda literatürde önemli eksiklikler bulunduğundan konu üzerindeki çalışmalar giderek daha da yoğunlaşmıştır.

Bu tez çalışmasının amacı çevre açısından önemini vurgulamaya çalıştığımız fenol ve fenol türevlerinin ölçülmesinde daha duyarlı, daha seçici özelliklere sahip biyosensörlerin geliştirilmesine yönelik orijinal iletken polimerlerin sentezlenmesi, sentezlenecek yeni polimerlerin ve literatürde mevcut bazı iletken polimerlerin iletkenlik özelliklerinin çeşitli teknikler (nanopartiküllerin polimerik film yapısına katılması vb.) kullanılarak geliştirilmesine, değişik tip ve özellikle *horseradish peroxidase* tabanlı kompozit çalışma elektrotlarının üretilmesine, hazırlanan elektrotların fenol ve 18 farklı fenol türevi için denenmesine, reaksiyon sonunda oluşan fenoksi radikallerinin biyosensör kararlılığını ve ömrünü azaltan etkilerine karşı dayanıklı ve daha nitelikli fenol biyosensörlerinin geliştirilmesine yöneliktir.

2. BİYOSENSÖRLER

2.1. Biyosensör Tanımı ve Kullanım Alanları

Kendine oldukça geniş uygulama alanı bulan biyosensörler biyokimyanın, mikroelektronığın, membran ve polimer teknolojisinin işbirliğinin sonucudur. Uygun bir sinyal dönüştürücüyle ilişkilendirilmiş biyolojik birimlerin (enzimler,antikorlar, ilaç reseptörleri, bakteriler, DNA vs.) elektronik parçalarla entegrasyonu sonucu oluşan biyosensörler, fizyolojik değişimler, toksik, kanserojen madde veya organizmaların konsantrasyon bilgileri gibi biyokimyasal sinyalleri ölçülebilir elektriksel verilere dönüştüren analitik sistemlerdir. Biyosensör sistemleri genel olarak üç temel bileşenden oluşur. Bunlar; seçici tanıma mekanizmasına sahip biyoajan (biyomolekül), bu biyoajanın analit ile etkileşimi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştüren çevirici (transduser) ve elektronik bölümler olarak sıralanabilir. Genel olarak bir biyosensörün ana elamanları Şekil 1.1’de gösterilmiştir. Bu ana elamanların en önemlisi analite karşı son derece seçimli ve tersinir etkileşmeye sahip biyoajandır. Biyoajantar biyoafinite ve biyokatalitik olmak üzere iki grupta toplanabilir. Biyoafinite ajanları (örneğin antikorlar) analitlerle kompleks oluşturarak analitin moleküler tanımlanmasında kullanılırlar. Bu kompleks oluşumu tabaka kalınlığı, kırılma indisi ve elektriksel yük gibi fizikokimyasal parametrelerin değişimine neden olur. Biyokatalitik ajanlar ise analitin molekül yapısında değişime neden olurlar ve bu dönüşüm sonucunda ortamda artan veya azalan madde miktarı takip edilerek değerlendirilir. Genelde biyokatalitik ajan olarak enzimler, mikroorganizmalar, organlar, tüm hücreler, bitki veya hayvansal doku parçaları kullanılmaktadır. Biyokatalitik ajanların arasında biyosensörlerde kullanılan en yaygın ajanlar enzimlerdir. Enzimlerin substratlarına karşı oldukça yüksek bir özgünlüğü ve afinitesi vardır. Enzimler, bir çok kimyasal arasından ilgili oldukları substratı seçer ve reaksiyonu katalizlerler. Tüm diğer reaksiyonlarda olduğu gibi enzimatik reaksiyonlarda da ortamın sıcaklığı, pH’sı, iyonik şiddeti ve diğer çevre şartları önemli rol oynar.



Şekil 1.1. Biyosensörün ana elemanları.

Bilimsel literatür “biyosensör” tanımıyla ilk defa 1962 yılında Clark ve Lyons sayesinde tanışmıştır [Clark and Lyons, 1962]. Clark ve Lyons’un tanımladığı biyosensör *glucose oxidase* enzimiyle Clark tipi bir oksijen elektrodunun kombinasyonundan oluşmuştur. Bu araştırmacılar *glucose oxidase* ve glikoz arasındaki reaksiyondan oluşan hidrojen peroksit konsantrasyonundaki artıştan veya ortamda enzim tarafından tüketilen oksijen konsantrasyonundaki azalıştan yola çıkarak ortamdaki glikoz miktarının tayin edilebileceğini saptamışlardır. Ardından, 1967 yılında Updike ve Hicks bir oksijen elektrodu yüzeyine *glucose oxidase* enzimi tutuklanmış polimer jel tabakası kaplayarak bir çalışma elektrodu hazırlamışlar ve bu elektroda ilk defa “enzim elektrodu” ismini vermişlerdir [Updike and Hicks, 1967]. Bu elektrodun glikoz ve oksijen içeren biyolojik bir ortama yerleştirilmesi durumunda, her iki bileşen de membran içerisine difüzlennmekte ve glikozun oksijen vasıtasıyla glukonik asite oksidasyonu gerçekleşmektedir ki böylece oksijen elektrodu, glikoz konsantrasyonu ile orantılı olarak gerçekleşen kısmi oksijen basıncındaki indirgenmeyi ölçmektedir. Bu buluş, biyolojik analizler açısından önemli bir adımdır. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonların tayini mümkün iken, sisteme biyomateryallerin de dâhil edilmesi diğer pek çok maddenin tayinini mümkün kılmıştır. Geliştirilen amperometrik enzim elektrotlarının yanı sıra ilk potansiyometrik enzim elektrodu Guilbault ve Montalvo tarafından 1969 yılında hazırlanmıştır [Guilbault and Montalvo, 1969]. 1970’li yıllarda ise biyosensörlerin

hem biyolojik hem de elektrokimyasal kısımlarında modifikasyonlar yapılarak ilk prototipleri geliştirilmeye başlanmıştır.

Bugüne baktığımızda biyosensörlerin 3 temel uygulama sahasıyla karşılaşmaktayız. Bunlar; çevresel, askeri ve medikal uygulamalardır. Elektroanalitik kimyasal teknikler çevre koruma ve kirlenmenin sürekli izlenmesi açısından giderek önem kazanmaktadır. Özellikle elektrokimyasal sensör ve dedektörler öncelikli kirleticilerin yerinde izlenmesi çalışmalarında önemli rol oynayan; elektroaktif türlere karşı seçici, duyarlı, hızlı, hassas, kompakt, taşınabilir ve ucuz sistemlerdir. Uzun yıllar pH ve oksijen elektrotları vb. gibi elektrokimyasal cihazların çevre analizlerinde kullanıldığı bilinmektedir. Elektrokimyasal sensör teknolojilerindeki son gelişmeler organik ve anorganik kirleticilerin uygun sensörler yardımı ile yerinde hızlı ve hassas bir şekilde ölçümüne izin vermektedir. Bu sensörlerden birisi de biyoajan kullanan biyosensörlerdir. EPA, çevresel izleme teknolojilerinin geliştirilmesini sağlamak amacıyla bu tür sensörlerin üretimi ve geliştirilmesini destekleyici teşvikler vermekte ve bu sensörlerin hava, su, toprak, atıksu ve yeraltı sularının sürekli izlenmesi çalışmalarında kullanılmasını desteklemektedir. Günümüzde biyosensörlerin çevresel uygulamalarda kullanılmasına verilebilecek örneklerden biri biyoremediasyon işlemleridir. Biyosensörler sayesinde modern moleküler genetik tekniklerle modifiye edilmiş bakterilerin toluen tüketimleri gözlenebilmektedir. Toluene, bakterice üretilen *luciferase* enzimi ile metabolize olurken yeşil floresan bir protein üretilmekte ve spektral emisyon analizleriyle toluene tüketimi görüntülenmektedir. Benzer şekilde bu biyoreportörler yoluyla petrol sızıntıları, yeraltı sularındaki uranyum miktarı, zehirli atıkların, kanserojenlerin ve içme sularını kirleten mikroorganizmaların konsantrasyonları belirlenmektedir. Askeri amaçlı uygulamaların ilki biyolojik savaşlarda kullanılan bakterilerin kendilerine özgü lipid karakterine dayanan tanımlamalara yöneliktir. Bir başka uygulama da askerlerin savaş esnasında fizyolojik durumlarını belirleyen ve bu bilgileri hem yaralılara müdahale edeceklere hem de strateji belirleme konumundaki birimlere ileten sistemlerin yapımına ilişkindir. Biyosensörlerin en geniş uygulama sahası medikal sahadır. "Medikal telesensörler" olarak da adlandırılan çipler vücut ısısını, nabzı, kan basıncını, kandaki şeker ve oksijen miktarlarını ve vücuttaki bazı metallerin konsantrasyonlarını ölçebilmektedir. Optik biyopsi sensörleri sayesinde ise ağrısız ve iyileşme süresi kısa operasyonlarla kanserli dokular teşhis edilmektedir.

Dokular 400-700 nm dalga boyu aralıklarında aydınlatılmakta, kanserli ve normal hücrelerin emisyon karakterleri karşılaştırılıp, kanserli dokular tanımlanmaktadır. Bu sahadaki en son yeniliklerden birisi medikal uygulamaların yanında diğer sahalarda da kullanılan "lab on a chip" şeklinde adlandırılan sistemlerdir. Çip, mikroskop slaydı üzerinde meydana getirilmiş 50-100 mm'lik kanalcıklardan oluşmaktadır. Kanallarda gereken maddeler karıştırılmakta, elektriksel potansiyel fark oluşturularak bunların kanal boyunca tepkime hızları ölçülmekte, meydana gelen ürünler ayrıştırılarak çeşitli görüntüleme sistemleriyle reaksiyon süreci gözlenmekte, böylelikle ayrıştırılan ürünlerin konsantrasyonu ölçülebilmektedir. Son olarak medikal uygulamalar başlığı altında ele alınması gereken yenilik ise "gene chip" teknolojisidir. Bu teknoloji sayesinde genomik ve polimorfik analizler yapılmakta organizmaların baz dizilimleri daha kolay belirlenebilmekte, hibridizasyonun yanısıra gen ifade sistemleri çalışılmaktadır [www.affymetrix.com; www.phys.uni.torun.pl/~jkob/physnews97/node2.html].

Özet olarak biyosensör teknolojisi, biyokimyanın ve gen mühendisliğinin kaydettiği gelişmelerle yeni boyutlar kazanmakta, buna bağlı olarak uygulamalar da çeşitlenmektedir. Hatta son yıllarda biyosensör kavram ve tanımlarında önemli değişme ve genişlemelere paralel olarak görme, işitme, koku alma, tat alma gibi algılama mekanizmaları ideal biyosensör olarak görülmekte ve bu mekanizmaların yapay olarak üretilmesi çalışmaları hızla devam etmektedir. Gelişim ölçüsünü izleyebilmek açısından, biyosensör sektörünün toplam satışları incelendiğinde 1990 yılında 35 milyon dolar olan toplam satış miktarı 1995 yılında 895 milyon dolara ve 2002 yılında 2,5 milyar dolara yükselmiştir. Biyosensör satışlarında meydana gelen baş döndürücü artışlar özellikle bu alandaki üretici firma sayılarını artırdığı gibi, firmaların biyosensörlerle ilgili araştırma ve geliştirme faaliyetlerini de etkilemiş ve son yıllarda firmalar tarafından patentlenmiş çalışmaların sayısında büyük artışlar meydana gelmiştir. Halen gerek akademik, gerekse firma bazında biyosensör çalışmaları artan bir hızda sürmektedir.

2.2. Biyosensör Çeşitleri

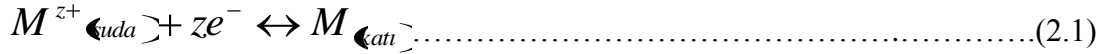
Biyosensörlerin çeşitli sınıflara ayrılması ana elemanlarından çevirici kısımlarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Kimyada kullanılan analitik metotlar genel olarak fotometrik, spektroskopik ve kolorimetrik çeviricilerin kullanıma dayalıdır. Fakat birçok sensör sisteminde basit uygulanabilirliğinden ve düşük maliyetinden dolayı elektrokimyasal çeviriciler tercih edilmektedir. Ayrıca elektrokimyasal çeviricilerde elektron akımlarının mikroişlemciler içerisinde gerçekleşmesi bu tip çeviricilerin kullanımını daha cazip hale getirmiştir. Telefonun icadı ile başlayan optik fiberlerin kullanıldığı foton sürücülü cihazların ve piezo-elektrik kristallerin kullanımına dayanan mikro-kütle kontrollü cihazların kullanılmaya başlanmasının yakın gelecekte elektrokimyasal çeviricilerle rekabet edeceği düşünülmektedir [Eggins, 2002]. Yukarıda özetle bahsedilen analitik cihazların güç çeviricileri genel olarak 4 ana başlıkta sınıflandırılmaktadır:

1. Elektrokimyasal çeviriciler;
 - Potansiyometrik çevirici
 - Amperometrik çevirici
 - Konduktometrik çevirici
 - Alan etkili transistörler (field-effect transistors)
2. Optik çeviriciler;
 - Fotometrik çevirici
 - Florimetrik çevirici
 - Luminesans esaslı çevirici
3. Kütle değişimli çeviriciler;
 - Piezo-elektrik çevirici
4. Isı değişimli çeviriciler;
 - Termistörler
 - Katalitik gaz sensörleri

2.2.1. Elektrokimyasal Çeviriciler

2.2.1.1. Potansiyometrik Çevirici

Bilindiği gibi bir M metali kendi iyonlarını içeren (M^{z+}) bir çözeltiye daldırıldığında, metal yüzeyinde bir elektrik potansiyeli meydana gelir;



reaksiyonu gereğince metal iyonlarının çözelti içerisindeki aktivitesine ve reaksiyona katılan elektron sayısına bağlı olarak gelişen bir elektrot potansiyeli (E) üretilir;

$$E_{\text{elektrot}} = E_{\text{elektrot}}^0 + \frac{RT}{zF} \ln a_{M^{z+}} \dots\dots\dots(2.2)$$

burada, E_{elektrot} Volt cinsinden elektrot potansiyelini, R gaz sabitini ($8,314 \frac{J}{mol.K}$), T Kelvin cinsinden sıcaklık değerini, z reaksiyona katılan elektron sayısını, F Faraday sabitini, $a_{M^{z+}}$ çözeltideki metal iyonu aktivitesini ve E_{elektrot}^0 standart elektrot potansiyelini ($a_{M^{z+}} = 1$ ve sıcaklık 25°C iken) göstermektedir. Bu eşitliğin logaritmik ifadesi ;

$$E_{\text{elektrot}} = E_{\text{elektrot}}^0 + \frac{59,16}{z} \log a_{M^{z+}} \dots\dots\dots(2.3)$$

şeklinde yazılır ve monovalent katyon aktivitesinde meydana gelen 10 katlık bir değişimde teorik potansiyel değişiminin $+59,16$ mV olacağını gösterir. Bu potansiyel değeri sadece stabil bir potansiyele sahip referans elektroduna karşı ölçülebilmektedir. Toplam hücre potansiyeli aşağıdaki gibi ifade edilir [Diamond, 1998];

$$E_{\text{hücre}} = E_{\text{elektrot}} - E_{\text{referans}} \dots\dots\dots(2.4)$$

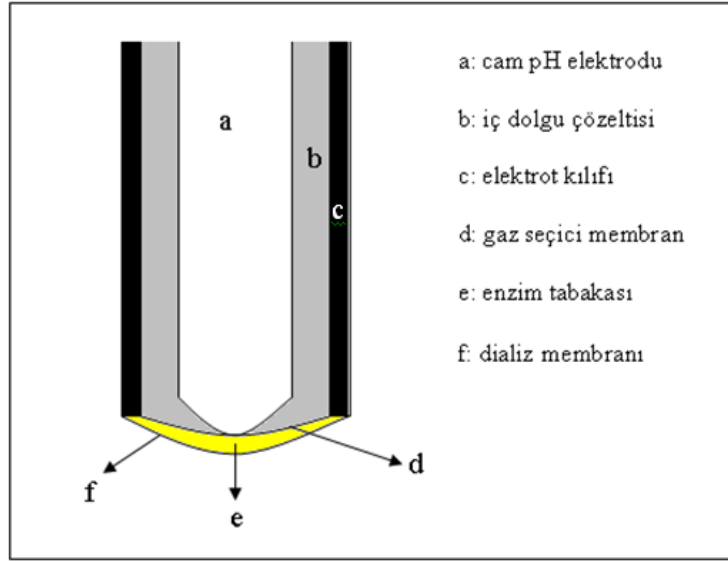
Şimdiye kadar ortamda yükseltgenen ve indirgenen madde konsantrasyonlarının 1 M olduğu durumdaki elektrot potansiyeli açıklanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda bulunan maddelerin elektrot potansiyeline etkisi potansiyometrik sensör sistemlerinde oldukça önemlidir. Elektrot potansiyelinin ortamdaki yükseltgenen/indirgenen madde konsantrasyonuna bağlı değişimini veren ifade Nernst eşitliğidir ve şu şekilde gösterilir;

$$E_{\text{elektrot}} = E_{\text{elektrot}}^0 + \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{a_{\text{ox}}}{a_{\text{red}}} \right) \dots \dots \dots (2.5)$$

Özetle; potansiyometri, bir çözelti içerisine daldırılmış iki elektrot arasında oluşan potansiyel farkı ölçer. Elektrotlardan bir tanesi referans olup, kendi çevresinde bağımsız sabit bir potansiyele sahiptir. Prob elektrot olarak adlandırılan diğer elektrodun potansiyeli ise redoks reaksiyonlarının olduğu sıvı faz ile katı yüzey arasındaki bölgede oluşan potansiyeli ifade etmektedir. İletken tel ve bir redoks sistemi arasındaki bölge düşünüldüğünde, indirgenen/yükseltgenen türler ve iletken arasında elektronların değişimi söz konusudur. İndirgenme ve yükseltgenme hızları eşitlendiğinde bir denge durumuna ulaşılacak ve elektrodu çevreleyen çözeltinin kompozisyonu sabitlenecektir. Bu durumda denge potansiyeli yukarıda verilen Nernst eşitliği ile ifade edilecektir.

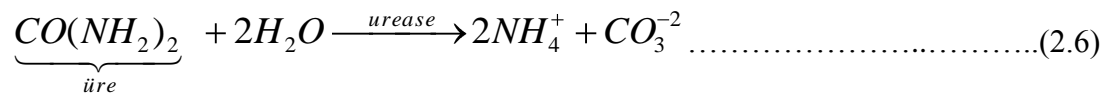
Potansiyometrik tip sensörde, bir katı, sıvı veya cam membran seçici olarak yüklü hedef analiti membran fazın içine alır. Bu mekanizma sonucu iç kısımdaki dolgu çözeltisi ve örnek çözelti arasında bir potansiyel fark oluşur ve bu fark referans elektroda karşı okunur. Oluşan bu potansiyel, yukarıda açıklandığı gibi analit konsantrasyonunun logaritması ile orantılıdır. Potansiyometrik biyosensörleri temel alan sistemlerin hazırlanması için farklı elektrotlar mevcuttur. Cam pH elektrodu bunlardan biri olup, hidrojen iyonlarının konsantrasyonunun (pH) ya da monovalent kationların izlenmesinde kullanılmaktadır. Şekil 2.1'de tipik bir biyokatalitik potansiyometrik gaz probu gösterilmektedir. Elektrot, pH camından, referans elektrotlarından ve gaz seçici membrandan oluşur. Gaz seçici membrana enzim immobilize edilmektedir. Cam elektrot ve membran arasında karbondioksit sensörü için sodyum bikarbonat çözeltisi, amonyak sensörü için amonyum klorid çözeltisi

ince bir tabaka halinde bulunur. Elektrot, analizi istenen çözeltiliye daldırıldığında, enzimatik reaksiyon sonucu karbondioksit veya amonyak gazı üretilir. Oluşan gaz, analizi yapılan çözeltiliden pH elektrotuna doğru difüze ederken, öncelikle gaz seçici membrandan geçer ve iç dolgu çözeltilisine ulaşarak burada çözünür. Çözünmeye bağlı olarak ortam pH'sı değişir ve sistemin potansiyometrik yanıtı artar [Telefoncu, 1997].



Şekil 2.1. Potansiyometrik gaz probu.

Cam membran yapısının modifikasyonu ile NH_4^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ gibi monovalent kationlara duyarlı elektrotların oluşturulması mümkündür ve bu elektrotlar enzim sensörlerinde kullanılabilirler. Bunlara örnek olarak glikoz, penisilin, oksalat, aspartam, adenozin, fenilalanin, kreatinin ve üre biyosensörleri verilebilir. Potansiyometrik bir biyosensör ile analiz edilen ilk önemli analit üredir. Kuan ve Guilbault tarafından geliştirilen sistemde, *urease* enzimi pH elektrodu üzerine jelatin ve gluteraldehit kullanılarak immobilize edilmiş, ürenin enzimatik hidrolizi aşağıdaki gibi gerçekleşmiştir;



reaksiyonu gereğince ortamdaki pH değişimi potansiyometrik olarak belirlenmiş ve buradan üre konsantrasyonu ölçülebilmştir [Kuan and Guilbault, 1987].

2.2.1.2. Amperometrik Çevirici

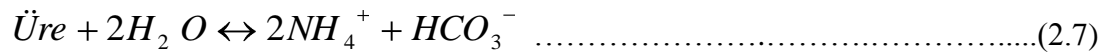
Bir çalışma elektrodu ile bir karşıt elektrot arasına dışarıdan denge geriliminden farklı bir gerilim uygulanırsa, sistem yeniden dengeye ulaşmaya çalışır, bu sırada bir elektrot tepkimesi gerçekleşirken bu iki elektrot arasından akım geçer. Bu yöntem “amperometri” adı verilir. Çalışma elektrodunda yükseltgenen ve indirgenen madde bir katyon, bir anyon ya da yüksüz bir bileşik olabilir. Çözeltide elektrotlar arasına uygulanan gerilim değerlerinde elektroaktif olmayan “destek elektrolit” adı verilen iyonların fazla miktarda bulunması çözeltinin elektriksel direncini azaltır [Yıldız, 1999]. Türlerin yükseltgenme ve indirgenmesi genelde çalışma elektrodunda gerçekleşir ve ikinci bir elektrot referans olarak kullanılır. Çalışma elektrodunun anot ya da katot olarak iş görmesi tamamen analitin yapısına bağlıdır. Buna örnek olarak *glucose oxidase* biyosensörü verilebilir. Burada enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksidin tayini mümkün olabildiği gibi, glikozun oksidasyonu süresince tüketilen oksijen de izlenebilir. Hidrojen peroksidin izlenmesi durumunda bir platin elektrot anot olabilmektedir ki +0,6 V (doğun Kalomel elektroda karşı) gibi pozitif bir değerde polarizasyonu olasıdır. Tüketilen oksijenin izlendiği durumda ise, kullanılacak çalışma elektrodunun negatif bir potansiyelde (-0,6 V) (doğun Kalomel elektroda karşı) polarize olması ve katot görevini görmesi gerekmektedir.

Oksijen problemleri platin bir katot ve gümüş klorür ile kaplı gümüş bir anodu içermektedir. Bunların her ikisi KCl çözeltisi içerisinde olup, analit, örnekten oksijen duyarlı membran vasıtasıyla ayrılmaktadır. Membran boyunca difüzleneren oksijen katotta indirgenir, oluşan akım ise örnek içerisindeki oksijen miktarıyla orantılıdır. Biyolojik sistemlerin bu tip elektrotlar üzerine immobilizasyonu ile biyosensörlerin hazırlanması mümkün olmuş ve enzimatik reaksiyonlarda oksijen tüketen ya da üreten enzimler bu tip sistemlerde biyolojik materyal olarak kullanılabilmiştir [Minh, 1993]. Amperometrik çeviricilerin kullanıldığı amperometrik biyosensörlerle ilgili detaylı teknik bilgi Bölüm 2.3’de verilmiştir.

2.2.1.3. Konduktometrik Çevirici

Ortamda analit varlığında dirençte meydana gelen değişime bağlı olarak çalışan sensörler genellikle seçici değildirler. Fakat bir sensör sisteminde, birbirinden farklı

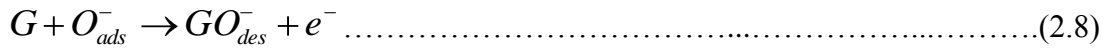
direnç tepkisi verebilen birçok algılayıcı elemanın bulunması sensörün karışık numunelerde kullanılabilmesine imkan sağlamaktadır. Her bir algılayıcı ya farklı bir iletken polimerle kaplanır ya da bu algılayıcılar sinterlenmiş metal oksitlerden yapılır. Farklı algılayıcıların bir arada bulunduğu sensör sistemleri genellikle bira, şarap ve kahve içerisinde bulunan farklı aroma kokularını ayrı ayrı algılayabilmek için kullanılır. Bu algılayıcı sisteme “elektronik burun” adı verilir ve bu sistem ticari hale getirilmiş bir kimyasal sensördür (*chemiresistor*). Bu tip sensörlerde bir biyolojik ajan kullanıldığında başka bir biyosensör çeşidi ortaya çıkmaktadır. Buna bir örnek verilecek olursa;



reaksiyonu gereğince iyonlardaki değişim konduktometrik olarak gözlemlenir. Burada iletkenlik ölçümleri ortamın renk ve bulanıklığından etkilenmemektedir. Benzer olarak enzimatik reaksiyon sonucu oluşan iletkenlik değişimlerinin algılandığı biyosensör sistemlerinde kullanılan diğer enzimler; iyonik gruplar oluşturan *amidase* enzimleri, farklı yüklerin ayrımını sağlayan *dehydrogenase* ve *decarboxylase* enzimleri, proton taşınımını sağlayan *esterase* enzimleri, iyon birleşme derecesinde değişikliklere yol açan *kinase* enzimleri, yük taşıyan grupların büyüklüklerinde değişime neden olan *phosphatase* ve *sulfatase* enzimleri olarak sıralanabilir.

Bazı geçiş metal oksitlerin iletkenlikleri, gazların yüzeylerine adsorpsiyonu ile değişmektedir. Bu tip metal oksitlere verilebilecek en iyi örnekler çinko oksit ve kalay dioksittir. Bu çalışma prensibine dayalı sensörler, 1-50 ppm konsantrasyon aralığında bulunan karbonmonoksit, karbondioksit, etanol ve diğer organik buharların tespitinde kullanılmaktadır. Bu tip sensörler, buhar biriktirme “*vapour deposition*” teknikleri kullanılarak hazırlanmaktadırlar. Söz konusu teknik kullanılarak hazırlanmış konduktometrik bir sensöre şöyle bir örnek verilebilir; demir bir metalin üst yüzeyinde bulunan silikon oksit tabaka üzerine 0,3 µm kalınlığında paladyum doplanmış bir kalay oksit tabakası oluşturulur. Demir metalin öteki yüzeyi kalın bir rutenyum oksit tabaka ile kaplıdır. Bu tabaka, sensörü yarı-iletken işletme sıcaklığında tutabilmek için ısıtıcı görevi görür. Sistem, kalay oksit tabaka üzerine

yerleşmiş iki altın parça arasındaki elektriksel direncin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Böyle bir sistemde n-tipi yarı-iletkenler tercih edilmektedir. Çünkü, bu yarı-iletkenler ortamda bir analit gaz varlığında yüksekten düşüğe doğru bir elektriksel direnç değişimi oluşturmaktadırlar. Atmosferik oksijenin bir kısmı kalay oksitten gelen fazla elektronlarla reaksiyona girerek yüzeye kimyasal olarak tutunurlar (kemisorpsiyon). Yüzeye tutunmuş oksijen anyonları (O_{ads}^-) iletkenlikte düşüşe, dolayısıyla dirençte artışa neden olurlar. Adsorbe olan gaz, yüzeye tutunmuş oksijen anyonları ile aşağıdaki gibi reaksiyona girer;



Analit gaz (G), yüzeye tutunmuş olan oksijeni desorbe eder ve oksitlenir. Reaksiyon sonucu üretilen elektronlar kalay oksitin iletkenliğinin artmasına sebep olmaktadır. Artış dirençteki düşüşle belirlenir ki bu da ortamda bulunan analit gaz konsantrasyonu ile orantılı olarak değişim göstermektedir. Çinko oksit de bir n-tipi yarı-iletkenlerdir ve sensör sistemlerinde kalay oksit ile benzer prensipte işlev görmektedir. Fakat, çinko oksitin kullanıldığı sensör sistemlerinin seçicilik özelliklerinin düşük olduğu bilinmektedir. Sensör seçiciliği, sistemi farklı sıcaklıklarda işleterek ve ortama bazı gazların oksidasyonunu katalizleyen platin, paladyum gibi metallerin eklenmesiyle artırılabilir.

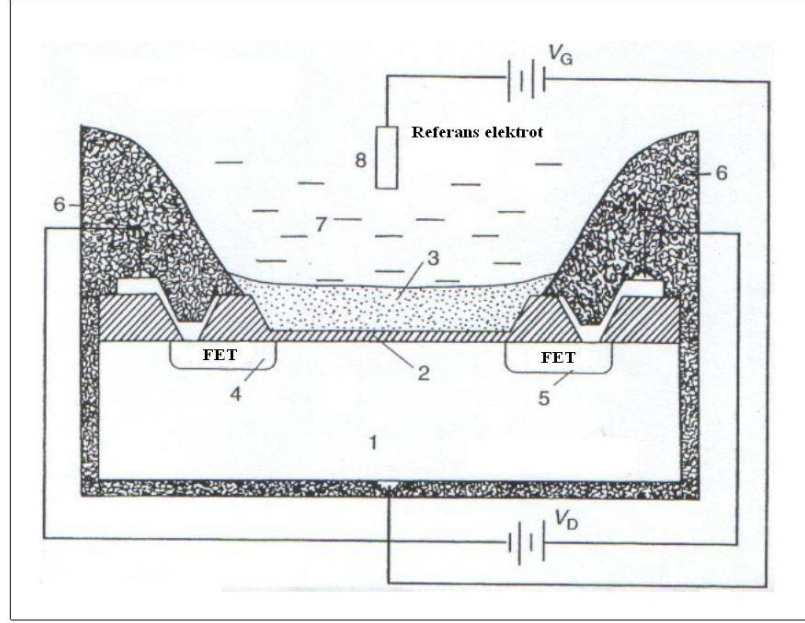
Bu tip sensörler ticarileştirilmiş olup, evlerde ve binalarda yanıcı gazların tespitinde kullanılmaktadır. Diğer bir uygulaması ise otomotiv endüstrisinde örneğin, titanyum dioksit tabanlı sensörlerin otomobillerin egzoz gazlarındaki oksijen içeriğinin tespitinde kullanılmasıdır. Bu sistemler ayrıca atmosferik nemdeki değişimi, su moleküllerinin sensör yüzeyine adsorbe oluşuyla belirleyebilmektedir [Eggins, 2002].

2.2.1.4. Alan Etkili Transistörler (Field-effect transistors)

Alan etkili transistörler (FETs), bir transistör yükseltgeci içeren ve metal-oksit-yarı iletken kısımları sayesinde potansiyometrik sinyaller verebilme özelliğine sahip olmalarından dolayı sensör sistemlerinde minyatür çevirici olarak kullanılabilen

elektronik parçalardır. Burada, yarı iletken özellikteki bir metal-oksit-yarı iletken sistemine voltaj uygulandığında, oksit bir yalıtkan olduğundan ayrıca metal/oksit ve oksit/yarı iletken ara yüzeylerinde yüzey yükleri indüklendiğinden sistem bir kapasitör gibi davranmaktadır. İndüklenmiş yüzey yükleri metal oksit üzerinde “alan etkisi” adı verilen bir elektriksel alan oluşturmaktadır. İşte, bu elektriksel alan etkilerinden dolayı FET’ler sensör sistemlerinde kullanılabilirler. FET’ler minyatür parçalar olduklarından devre donanımları da minyatürdür. Bu nedenle ölçümde gürültü en aza indirgenirken, hassasiyet artmaktadır [Eggins, 2002].

FET’ler belli bir zamana kadar minyatürize sisteme adapte edilebilecek referans elektrotların olmayışından dolayı sensör sistemlerinde kullanılamamıştır. Zamanla bazı minyatür referans elektrotlar geliştirilip kullanılmaya başlanmıştır. Bu elektrotlar, gümüş veya platin tek bir telden yapılmış, içleri gümüş klorür çözeltisi ile doldurulmuş “screen-printed” tipindeki elektrotlardır. Fakat Janata, minyatürize edilmiş bir referans elektrodun çalışma prensibinin, normal referans elektrodun çalışma prensibine uymadığını ispatlamıştır [Janata, 1989]. Bu nedenle referans elektrotların minyatürize edilmesine alternatif olarak, FET’lerin sensör sistemlerinde kullanılabilmesi için iki adet FET diferansiyel modda çalıştırılmıştır. Bu FET’lerden bir tanesi ölçülmesi istenen analite karşı ihmal edilebilir sinyaller veren kör (blank), diğeri ise analit seçici bir membranla üzeri kaplanmış transistördür. Geliştirilen bu yapı kimyasal alan etkili transistör (CHEMFET) olarak adlandırılır ve sensör sistemlerinde rahatlıkla kullanılmaktadır. Şekil 2.2’de, şematik bir CHEMFET gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Şematik bir CHEMFET gösterimi.

Şekil 2.2’de 3 numaralı kısım analit çözeltisi ile temas halinde olan analit seçici membranı, 7 numaralı kısım analit çözeltisini, 8 numaralı kısım referans elektrodu, 1 numaralı kısım silikon bölgeyi, 2 numara yalıtkan kısmı, 4 ve 5 numara transistörleri, 6 numara izolasyonu göstermektedir. Bu sistem, ya sabit potansiyelde (V_G) devreden geçen akımı (I_D), ya da sabit akımda potansiyel ölçümünü gerçekleştirebilmektedir.

CHEMFET’den başka iyon seçici alan etkili transistörler (ISFETs) kimyasal sensörlerde, CHEMFET üzerindeki seçici membrana enzim immobilize edilerek hazırlanan enzim tabanlı alan etkili transistörler (ENFETs) ise biyosensörlerde kullanılmaktadır. ISFET’lerde genellikle “iyonofor” adı verilen iyon seçici polimerik malzeme kullanılmaktadır. ISFET’lerle hazırlanmış sensörler yaygın olarak pH, Na^+ , K^+ , Ca^{+2} ve Cl^- ölçümünde görev almaktadır. ISFET’ler laboratuvar şartlarında doğru ölçüm yapabilirken, Na^+ , K^+ , Ca^{+2} gibi iyonların ölçümlerinin gerçekleştirildiği klinik laboratuvarlarda kan örneklerinden kaynaklanan girişimler ISFET’lerin ölçüm güvenilirliğini olumsuz yönde etkilemektedir. ISFET’ler belli başlı biyokimyasal substratların tayin edilebilmesi için modifiye edilebilmektedirler. Bu amaçla ISFET’in oksit yüzeyi polimerik membranlarla kaplanarak enzim immobilizasyonuna olanak sağlamak üzere fonksiyonelleştirilir (ENFETs). Söz konusu polimere enzim immobilizasyonu, polimer ağları arasına enzimi hapsetme ya

da oksit yüzeyde enzim bağlayacak kimyasal fonksiyonel grupların oluşturulmasıyla gerçekleştirilmektedir. Bu şekilde hazırlanmış bir glikoz biyosensörünün çalışma prensibi şu şekilde açıklanabilir:



Yukarıdaki reaksiyonda oksit yüzeye immobilize edilen *glucose oxidase* enzimi ortamda bulunan glikozu glukonik aside çevirir. Burada, glikozun yanında hidrojen iyonu ve hidrojen peroksit üretilir. Hidrojen iyonu üretimi, sistemde tüketilen glikoz ile orantılı olarak gelişir. Böylelikle, çözelti içerisindeki pH değişimine duyarlı olan elektrot-oksit-yarı iletken sistem ortamdaki glikoz konsantrasyonunu rahatlıkla belirleyebilmektedir [Schmid, 2006]. Literatürde bu prensipte yapılmış pek çok biyosensör örneği mevcuttur. Bunlar; üre, penisilin, etanol, laktoz, sükroz, maltoz, askorbik asit, laktat, asetilkolin, organofosforlu pestisitler ve formaldehit biyosensörleridir [Schöning, 2002]. Ayrıca, bir tanesinde *glucose oxidase*, diğesinde ise *urease* enziminin bağlı bulunduğu iki ayrı ENFET kullanılarak hazırlanmış bir biyosensörde aynı anda hem glikoz hem de üre tayini yapılabilmektedir [Eggs, 2002].

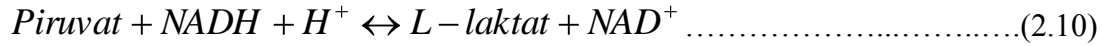
2.2.2. Optik Çeviriciler

Biyosensörün çevirici bölümünün optik değişimleri algıladığı ve elektrik sinyaline çevirdiği aygıtlara “optik biyosensörler” denir. Bu tip çeviricilerde iletici sistem olarak optik fiberler kullanılmaktadır. Dedektör veya ışık kaynağı ile analiz edilecek numune arasındaki ışığın, toplam refleksiyon prensibine uygun olarak fiberlerin iç kısmı boyunca taşınımı söz konusudur. Burada iletici olarak görev yapan fiberlerin üzerine enzim immobilizasyonu yapılarak optik esaslı biyosensörler hazırlanmaktadır. Optik biyosensörler, etkileşim sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü esas alırlar. Sinyal, ışık yansıması, saçılımı ya da yayımı sonucu meydana gelmektedir [Meriç, 2008]. Optik biyosensörlerin avantajları; referans elektroda ihtiyaç duyulmaması, hiçbir elektriksel girişimin oluşmaması, oksijen gibi bazı analitlerin denge şartlarında ölçülebilmesi ve farklı dalga boylarında birden fazla analitin ölçülebilmesidir. Dezavantajları arasında

ise, ölçülecek analitin elektrokimyasal sensörlere göre sınırlı doğrusal ölçüm aralığına, düşük yanıt süresine sahip olması ve büyük cihazlar olduğundan minyatürize edilme zorluğu sayılabilir [Eggins, 2002].

2.2.2.1. Fotometrik Çevirici

Biyolojik analizlerin bir çoğu fotometrik ölçümler üzerinden gerçekleştirilmektedir. Fotometrik analizlerin temel prensibi, ölçümü yapılacak maddenin fotometrik özelliğinin değişmesine dayalıdır. Bu ölçümlerden en iyi bilineni, NAD^+ ve $NADH$ 'ın biyokimyasal reaksiyonlara katılmasıyla gerçekleşen redoks reaksiyonlarını temel alan ölçümlerdir. NAD^+ ve $NADH$, sırasıyla nikotinamid adenin dinükleotitin (NAD) yükseltgenmiş ve indirgenmiş formlarıdır. Bu tip reaksiyonlara aşağıdaki gibi bir örnek verilebilir;



Yukarıdaki reaksiyonda $NADH$, 340 nm dalga boyunda yüksek bir absorbans değeri verirken, NAD^+ bu dalga boyunda absorbans göstermemektedir. Burada ölçülecek analit ve reaktantları spektrofotometre içine yerleştirilmiş bir küvet içerisinde karıştırmak suretiyle reaksiyon gerçekleştirilmektedir. Reaksiyon sonucu oluşan temel optik sinyal Beer-Lambert Kanunu'na dayalıdır ve şu şekilde ifade edilir;

$$\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = A = \varepsilon \times C \times l \dots\dots\dots(2.11)$$

Burada I_0 başlangıç ışık yoğunluğunu, I ışığın çözülden geçtikten sonraki yoğunluğunu, A absorbans değerini (genellikle cihaz tarafından direkt ölçülen değer), ε molar absorptivite katsayısını, C analit konsantrasyonunu, l ise ışığın çözelti içerisinde kattığı yolu belirtmektedir [Eggins, 2002].

Fotometrik tipteki çeviricilerle hazırlanmış biosensörlerde, enzimatik reaksiyon uyarınca renkli madde konsantrasyonundaki değişimler sonucu meydana gelen absorpsiyon farkları belirlenmektedir. Renkli madde konsantrasyonundaki değişimler genellikle enzimatik reaksiyon uyarınca oluşan pH farklılıklarından

kaynaklanmaktadır. Örnek olarak, optik bir lifin yüzeyinde *p*-nitrofenol ve amonyum klorür içeren bir çözelti hidrofobik teflon bir membranla çevrelenir. Analizlenecek örneklerdeki amonyak konsantrasyonuna bağlı olarak elektrot içerisindeki çözeltinin pH'sında oluşan fark, 404 nm dalga boyunda maksimum absorban veren *p*-nitrofenolün absorban değerinde değişikliğe neden olmaktadır. Bu temel ilke dikkate alındığında absorpsiyona dayalı optik sensörün dış membranında uygun bir enzimin immobilizasyonu ile optik enzim sensörü hazırlanabilmektedir. Kataliz reaksiyonları uyarınca pH'da değişikliğe yol açan *penicilinase*, *colin esterase*, *glucose oxidase*, *urease* gibi enzimler ile amonyak salınımına yol açan *urease*, *glutaminase*, *aminoacid oxidase* gibi enzimler bu tip enzim sensörlerinin hazırlanmasında rahatlıkla kullanılabilir. Doğal olarak indikatör seçimi *p*-nitrofenol ile sınırlı değildir. Bütün bunların yanı sıra ilgili enzimatik reaksiyonun substrat ya da ürünlerinden biri optik olarak absorban bir nitelik taşıyorsa ayrıca renkli bir reaktif kullanmaya gerek yoktur [Minh, 1993].

2.2.2.2. Florimetrik Çevirici

Yüksek enerji seviyelerine kadar uyarılan atomlar, moleküller ve katılar belli bir ışınım yaparak düşük enerji seviyelerine geçerler. Yüksek sıcaklıklı bir enerji kaynağı ile uyarılmış atomların ışık yayılımları atomik ya da optik yayılım, ışık enerjisi ile uyarılmış atomların düşük dalga boylarındaki ışık yayılımı ise “floresan” olarak adlandırılmaktadır. Söz konusu ışık yayılımının yoğunluğu, ışıma yapan madde konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Yayılan floresan ışması Beer-Lambert Kanunu'na bağlı olarak ölçülür. Uyarılmış bir atom veya molekül, düşük enerji seviyesine az miktarda ışıma yaparak geçerse, ortamda bulunan başka türlerle reaksiyona girerek kendi enerjisini bu türlere aktarabilir ve floresan ışması tamamen tüketebilir. Bu prosese “sönümlenme” denir ve başka bir flourimetrik ölçüm metodu olarak kullanılır. Floresan ve sönümlenme olayları aşağıdaki gibi verilmektedir;



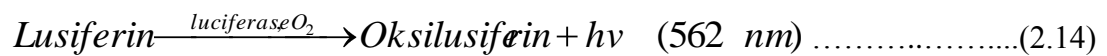
Enzim tabanlı florimetrik biyosensörler, herhangi bir pH değişimine yol açan ya da amonyak veya karbondioksit konsantrasyonunda farklılaşmaya neden olan bir enzimin uygun bir floresan madde ile birlikte optik bir sensörle birleştirilmesiyle oluşturulmaktadır. Penisilini penisilinik aside hidrolizleyen *penicilinase*, glutamati α -kateglutarata oksitlerken amonyak oluşturan *glutamat oxidase* tipik örnekler arasındadır. Glutamat ve penisilin gibi substratların yanı sıra, floresan esaslı optik enzim sensörleriyle pek çok enzimatik reaksiyonun koenzimi olan NADH'ın belirlenmesi de mümkündür [Dinçkaya, 1999]. Floresan esaslı optik enzim sensörlerinin, absorbans esaslı optik enzim sensörlerinden farkı floresan özellik gösteren indikatör maddeler kullanılmasıdır. Bu maddelere örnek olarak pH ölçümleri için kullanılan trisodyum 8-hidroksi-1,3,6-trisülfonat verilebilir. Bu indikatör, asit formunda 405 nm dalga boyunda, baz formunda 470 nm dalga boyunda absorbans verirken 520 nm dalga boyunda floresan özellik göstermektedir. Floresan özellik gösteren akridin ya da kinidin reaktantının cam bir desteğe karbodiimid üzereinden kovalent bağlanmasıyla geliştirilen ve floresan sönümlenme tekniğiyle çalışan optik bir sensörde Cl^- , Br^- ve I^- iyonlarının tayini gerçekleştirilmektedir. Yine hem floresan hem de floresan sönümlenme tekniğinin aynı anda gerçekleştirildiği optik bir sensör sistemde Na^+ iyonlarının, başka bir floresan madde olan 2-hidroksi-1,3-ksilil ile diazolanmış 4-nitroanilin optik fiberin ucuna immobilize edilmesiyle geliştirilmiş bir sensörde K^+ iyonlarının tayini yapılabilmektedir. Oksijen iyi bir floresan sönümleyici olduğundan bu özelliği florimetrik sensörlerde kullanılabilir. Bu amaçla, bir poliakrilamid desteğe perilenbütirik asit bağlanarak hazırlanmış bir prob, 0-150 mmHg basınç aralığında oksijene tepki verebilmektedir. Benzer şekilde hazırlanmış proba kükürtdioksit gazının oksijenin sıyrıldığı bir ortamda 84 ppm'e kadar ölçülebilmesi söz konusudur [Eggins, 2002].

2.2.2.3. Luminesans Esaslı Çevirici

Kimyasal bir reaksiyonda, ısı enerjisi olmadan sadece ışık yayılımı gerçekleşiyorsa buna "kimyasal luminesans" (chemiluminescence), aynı ışık yayılımı biyolojik sistemlerde gerçekleşiyorsa buna da "biyoluminesans" adı verilmektedir. Kimyasal luminesans, bazı maddelerin karanlık ve soğuk ortamlarda oksijen veya hidrojen peroksit ile oksidasyonu sonucu görünür bir ışık üretmeleriyle

gerçekleşmektedir. Bu maddelerin en bilineni luminoldür. Luminol, genellikle klinik çalışmalarda etiket (marker) madde olarak kullanılmaktadır. Öncelikle, antijen luminolle etiketlenir, daha sonra antijen-antikör eşleşmesi sonucu yapıda bulunan luminolün etkisiyle 460 nm dalga boyunda bir floresan ışığa gerçekleşmektedir. Luminol kullanılarak hidrojen peroksit ve *peroxidase* enziminin etkileşime girdiği biyosensör sistemleri de geliştirilmiştir. Bu sensörlerde hidrojen peroksit tayini için, luminol içeren bir poliakrilamid jel üzerine *peroxidase* enzimi immobilize edilmiş ve jel, fiberin ucuna tutturulmuştur. Bu sistemde dışarıdan bir ışık kaynağına ihtiyaç duyulduğundan sensör bir fotodiyoda bağlanmıştır. Sensör, reaksiyon sonucu oluşan luminesans sinyallerini 2 dakikalık bir sürede vererek hidrojen peroksiti 1-10 mM konsantrasyon aralığında tayin edebilmiştir. Kimyasal luminesansa dayalı olarak yeni geliştirilmiş sensörlere verilecek diğer bir örnek ise, bazı fosfat türlerinin (adamantyl dioxetine phosphate) *alkaline phosphatase* enzimi ile hidrolize edilip, floresan ışığa yapan adamantyl dioxetine anyonlarına dönüştürülmesi sonucu tayin edilmesidir [Eggins, 2002].

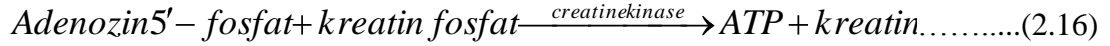
Biyoluminesans, ateş böceği, yıldız kurdu ve bazı değişik su canlıları gibi yaşayan organizmalardaki enzimatik reaksiyon sonucu ışık yayılması ile gerçekleşmektedir. Bu tip canlıların enzimlerinin katalizlediği maddelere lusiferin, bu reaksiyonlara giren enzimlerine ise *luciferase* enzimleri adı verilmektedir. Lusiferin maddelerinin enzimatik oksidasyonu sonucu meydana gelen luminesans aşağıdaki bağıntıda verilmektedir;



Bazı lusiferin türleri adenzin 5'-trifosfat (ATP), flavin mononükleotit (FMN) ve flavin-adenin dinükleotit (FADH) gibi bazı kofaktörlerle birleşerek de aşağıdaki gibi enzimatik oksidasyona uğrayabilmektedir;



Bu reaksiyon, lusiferin tipi maddelerin femtomol miktarlarda analiz edilmelerine olanak sağlamaktadır. Miyokard enfaktüs ve kas zayıflıklarına neden olan *creatine kinase* enzimi klinik testlerde aynı prensiple aşağıdaki gibi belirlenmektedir;



Bakteriyel *lusiferase* enzimleri ise (*Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio harveyi*) ateş böceği *lusiferase* enziminden farklı olarak lusiferine gereksinim duymazlar. Buradaki luminesans, *lusiferase*, indirgenmiş flavin (FMNH₂) ve yağ asit aldehitinden oluşan kompleksten meydana gelir. Ticari *lusiferase* enzimleri genellikle NADH-FMN *oxidoreductase* enzimini de içerirler. Bu durumda NADH üreten enzimatik bir reaksiyon ile ilişkili bileşiklerin tayininde, söz konusu enzim ve ticari bakteriyel *lusiferase* enziminin çiftlenerek immobilize edildiği bir optik sensör ile, hedef enzimin değiştirilmesi yoluyla pek çok farklı bileşiğin analizi mümkündür [Dinçkaya, 1999].

2.2.3. Kütle Değişimli Çeviriciler

2.2.3.1. Piezo-elektrik Çevirici

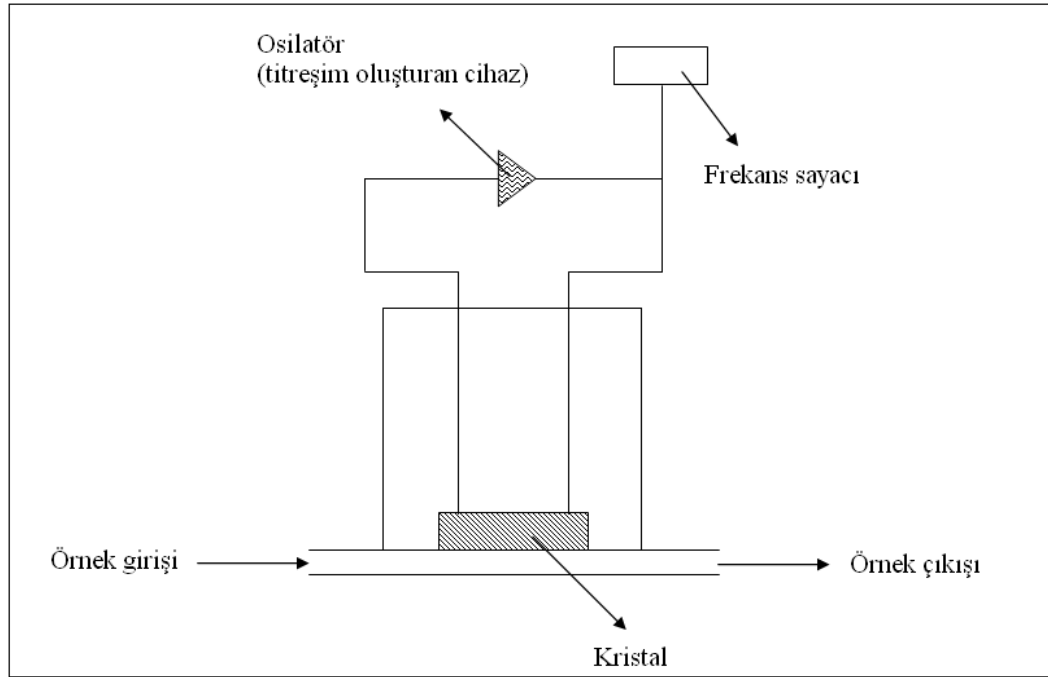
1880 yılında, Curie kardeşler kuartz ve turmalin gibi simetri merkezi olmayan anizotropik kristalleri keşfetmişlerdir. Keşfettikleri bu kristallerin mekanik bir gerilime maruz bırakıldığında elektriksel sinyal verdikleri gözlenmiştir. Tam tersine, bu kristallere elektriksel bir sinyal uygulandığında da yapılarında mekanik deformasyonların oluşumu söz konusudur. Böylelikle, elektriksel bir potansiyelin bu kristallere uygulanması sonucu kristal yapısında titreşimler meydana gelecektir. Her kristal, kendine özgü doğal bir titreşim frekansına sahiptir. Bu frekans değeri 10 MHz civarında bir değerdir (radyo frekansı). Bir titreşim frekansı, kristal üzerine kaplanmış bir madde ile beraber toplam kristal kütlesine bağlı olarak değişim göstermektedir. Herhangi bir analitin kristal üzerine adsorpsiyonu ile meydana gelen bu frekans değişimi yüksek bir hassasiyetle (500-2500 Hz/g) ölçülebilmektedir. Bu ölçüm prensibi ile, sensör sistemlerinde belli bir analit için pikogram mertebesinde

belirleme limitlerine (LOD) inilebilmektedir. Yüzey kütle değişimi (Δm) ile frekans değişimi (Δf) arasındaki ilişki Sauerbrey eşitliği ile açıklanmaktadır;

$$\Delta f = -2,3 \times 10^6 \times f^2 \times \frac{\Delta m}{A} \dots\dots\dots(2.17)$$

Yukarıda verilen eşitlikte, Δm kristalin sinyal bölgesi alanı (A) üzerine adsorbe edilmiş maddenin gram cinsinden kütleini, f ise toplam frekansı ifade etmektedir. 15 kHz'lik frekansa sahip bir kristalde, 2500 Hz/ μg 'lık bir çözünürlük elde edilebilmektedir ki, bu da 10^{-12} gramlık (1 pikogram) bir belirleme limitine tekabül etmektedir. Frekansta meydana gelen değişimler piezo-elektrik etkiyi oluşturmaktadırlar [Diamond, 1998]. Piezo-elektrik etki prensibi ile çalışan cihazlar, kütledeki ufak farklılaşmaların tayinine yönelik olarak kendi rezonans frekanslarında kullanılmaktadırlar. Bu farklılaşmalar, aynı zamanda enzim-inhibitör etkileşmeleri ve antikor bağlanmalarını kapsayan biyolojik reaksiyonlardan da kaynaklanabilmektedir [Timur, 2001].

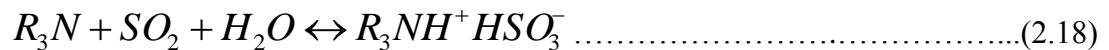
Yukarıda açıklanmaya çalışılan doğal kristaller dışında baryum ve kurşun titanatlar gibi piezo-elektrik etki gösteren seramik materyaller sensör sistemlerinde kullanılabilir. Ayrıca, poliviniliden florit (PVDF) $(-\text{CF}_2-\text{CH}_2-\text{CF}_2-)_n$ gibi bazı organik polimerler piezo-elektrik özellikte kristaller oluşturabilmektedirler. Tipik bir piezo-elektrik sensör sistemi Şekil 2.3'de gösterilmiştir;



Şekil 2.3. Piezo-elektrik sensör sistemi şematik gösterimi.

Piezo-elektrik sensör sistemleri, yüzeyi kaplanan kristal üzerine adsorbe edilen bazı buhar ve gazların analizlerinde kullanılmaktadırlar. Fakat, bu sensörlerin seçiciliği azdır. Jelatin, silikajel ve moleküler elekler gibi nem emici özellikteki maddelerle kristal yüzeyin kaplanması sonucu su buharı adsorpsiyonu gerçekleştirilir. Üstelik nem tutucu madde üzerine adsorplanmış su buharının desorpsiyonu kolay olduğundan, bu sensörler tekrardan kullanılabilirler. Bu tip sensör sistemleri ticari olarak geliştirilmiştir.

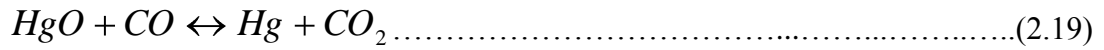
Otomobillerde egzoz gazlarından açığa çıkan ve fosil yakıtların yanması sonucu atmosfere bırakılan kükürt dioksit gazı havada oldukça önemli bir kirletici parametredir. Organik aminler, kükürt dioksit gazını geri dönüşümlü olarak adsorbe edebilme özelliğine sahiptirler;



Fakat, bu aminler aynı zamanda azot oksitler gibi bazı asidik gazları da beraberinde adsorbe eder.

İnsan burnunun algılayamadığı düşük konsantrasyonlarda bile oldukça toksik etkiye sahip ve pis kokulu bir gaz olan hidrojen sülfür için oldukça seçici piezo-elektrik sensörler geliştirilmiştir. Ayrıca, bakır, gümüş ve kurşun gibi metal asetatların kullanıldığı sensörler de hidrojen sülfür tayininde kullanılmaktadırlar.

Eksik yanma ürünü olan karbon monoksit, kokusuz olduğundan algılanması güç bir gazdır. Reaktif bir gaz olmamasına rağmen, indirgeme özelliğinden yararlanılarak piezo-elektrik sensörlerde kullanılabilirler. Karbon monoksit 210° C sıcaklıkta civa oksit ile reaksiyona girerek aşağıdaki gibi civa buharı oluşturmaktadır;



Oluşan civa, bir civa buhar sensörü ile analiz edilmektedir. Civa, laboratuvarlarda manometre, termometre ve elektrotlarda yaygın olarak kullanılmaktadır ve civa miktarında meydana gelen kayıplar ortamda toksik etki göstermektedir. Bu nedenle ölçümü oldukça yararlıdır. Bu amaçla altın kaplanmış kristal içeren bir piezo-elektrik sensörde, civa ile altının etkileşimi sonucu amalgam oluşmaktadır. Sıcaklığın 150° C'ye çıkarılmasıyla bu reaksiyon geri dönüşümlü gerçekleşmektedir.

Askorbik asit, hidroklorik asit, L-glutamik asit ve pridoksin (B₆ vitamini) gibi bazı asit kaplamaları ile bu tip sensörlerde amonyak analizi yapılmaktadır.

Piezo-elektrik biyosensörlerde kimyasal piezo-elektrik sensörlere göre seçicilik yüksektir. Örneğin; piezo-elektrik bir kristalin *formaldehyde dehydrogenase* enzimi (FDH) ve NAD⁺ ile kaplanmasıyla oluşturulmuş bir biyosensörde seçiciliği yüksek formaldehit tayini yapılabilmektedir;



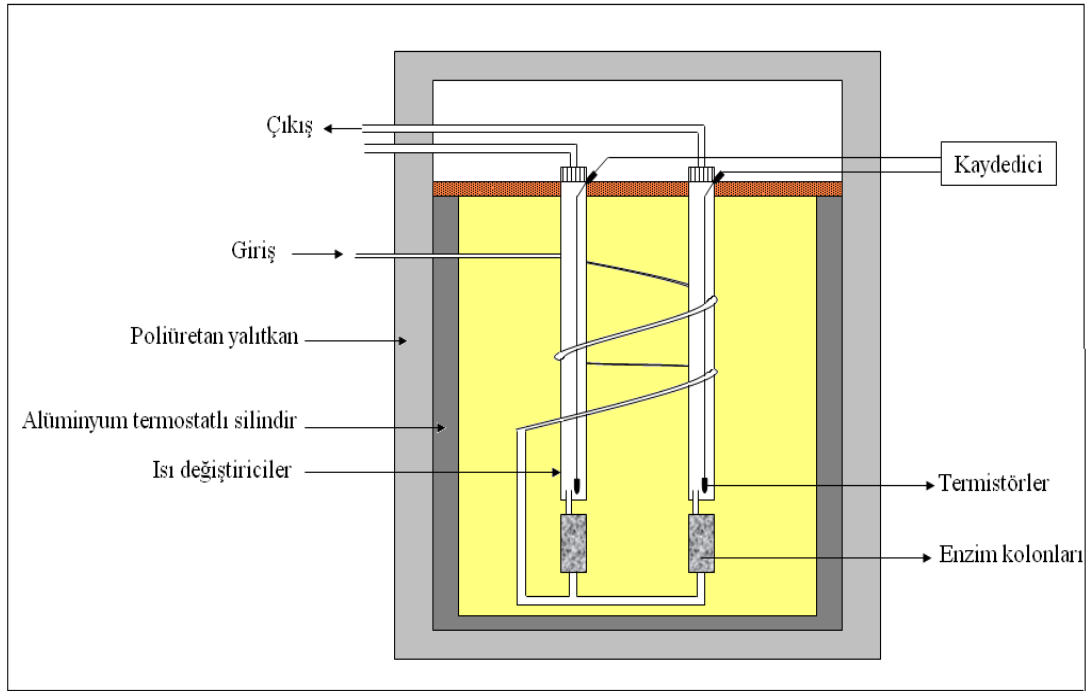
Piezo-elektrik sensörlerde demir klorür, bakır klorür ve nikel klorür gibi bazı metal tuzları kullanılarak organofosforlu pestisitlerin tayini yapılmaktadır. Burada metal tuzları ve pestisit arasındaki kompleksleşme reaksiyonundan

yararlanılmaktadır. Ayrıca, *cholin esterase* enzimleri seçici olarak bazı organofosforlu pestisitlerle reaksiyona girer. Örneğin; *acetylcholin esterase* enziminin glutraldehit ile bir kuartz kristali üzerine immobilizasyonu ile oluşturulmuş piezo-elektrik bir biyosensörde malathion (organofosforlu pestisit) tayini yapılmakta iken, anti-Parathion antikorunun kristal üzerine tutturulduğu başka bir piezo-elektrik biyosensörde ise parathion (organofosforlu pestisit) tayini yapılmaktadır [Eggins, 2002].

2.2.4. Isı Değişimli Çeviriciler

2.2.4.1. Termistörler

Termistör, sıcaklıktaki değişimi ölçmeye yarayan oldukça hassas bir aygıttır. Çalışma prensibi, sinterlenmiş bazı metal oksitlerin elektriksel dirençlerinin sıcaklıkla değişimini esas almaktadır. Bu metal oksitler, baryum oksit, kalsiyum oksit veya kobalt, nikel, mangan gibi bazı geçiş metallerinin oksitleridir. Sıcaklık meydana gelen 1°C'lik bir artış ($\pm 0,005$ °C doğrulukla), direncin %4-7 civarında azalmasına neden olmaktadır. Termistörler genellikle küçük cam boncuklar şeklinde tasarlandıklarından minyatürize sistemlerdir [Minh, 1993]. Kimyasal ya da biyokimyasal bir reaksiyondan açığa çıkan ısı miktarı bir mikroklorimetre aracılığıyla ölçülebilmektedir. Analit reaksiyonunun termistöre yakın bir bölgede gerçekleştirilmesi ölçüm seçiciliğini artırmaktadır. Üstelik bu sayede enzimatik bir reaksiyonda gerçekleşen entalpi değişimi ölçülebilmektedir. Termistörler, kolorimetrik ölçümlerin yapılamadığı oldukça yoğun renkteki veya bulanık numunelerde ölçüm yapabilmektedir. Termistörlü biyosensörlerde enzim, albumin ile birlikte termistöre çapraz bağlanırken, ikinci bir termistör sadece albumin ile kaplanmakta ve bu termistör referans olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Termistörlü biyosensörün şematik gösterimi.

Bu sistemden alınan sinyal direnç değişimidir. Sinyaller non-lineer (doğrusal olmayan) olarak değişim göstermektedir ve bu değişim aşağıdaki eşitliklerle açıklanabilir;

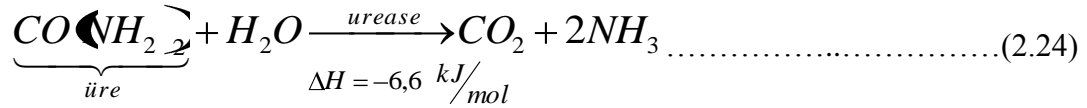
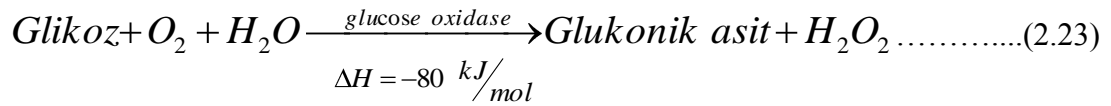
$$R_T = A \times e^{\beta/T} \dots\dots\dots(2.21)$$

veya

$$R_{T1} = R_{T0} \times e^{\left[\beta\left(\frac{1}{T1}\right) - \left(\frac{1}{T0}\right)\right]} \dots\dots\dots(2.22)$$

Bu reaksiyonda β 'nın değeri 3000 olarak alınır. Tipik olarak R değeri, 300 K sıcaklıkta ve kalibrasyon eğrisi eğiminin $1 \text{ k}\Omega/^\circ\text{C}$ olduğu durumlarda $10 \text{ k}\Omega$ 'dur. Termistörlere uygulanabilir sıcaklık -100°C ile 200°C aralığındadır.

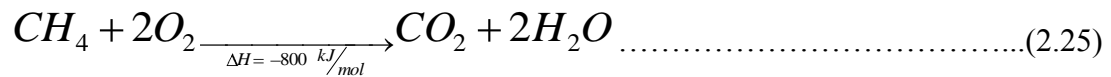
Glikoz ve üre ölçümlerinde termistörlü biyosensörler kullanılabilirler. Açığa çıkan ısı hem analit konsantrasyonuna, hem de reaksiyon entalpisine bağlıdır. Glikoz ve üre ölçümlerinde gerçekleşen enzimatik reaksiyonlar aşağıda verilmektedir;



Glikoz reaksiyonunun entalpi değeri daha fazla olduğundan, glikoz sensörü üre sensöründen çok daha hassastır [Eggins, 2002].

2.2.4.2. Katalitik Gaz Sensörleri

Katalitik gaz sensörlerinin termistörlerden tek farkı, enzimatik reaksiyondan ziyade bazı yanıcı gazların yanma reaksiyonlarından faydalanılmasıdır. Anlaşıldığı gibi katalitik gaz sensörleri, yanıcı gazların ölçümlerinde kullanılmaktadır. Bu tip sensörlerin işletilmesi, yanıcı gazın hava ortamında yakılması sonucu açığa çıkan ısı miktarının ölçümüne dayalıdır. Örneğin;



Prosesi hızlandırmak için, platin gibi bazı katalistler kullanılmaktadır. Burada platin bir çubuk, gaz karışımını yanma sıcaklığına getirebilmek için ısıtıcı görevi görmektedir. Bu amaçla platin çubuk boyunca bir elektrik akımı geçirilerek çubuk ısıtılır, ısınan çubuk gaz karışımını da beraberinde ısıtır. Yanmadan açığa çıkan ısı platin çubuğun sıcaklığını artırır. Platin çubuğun direnci sıcaklıktaki değişimlere duyarlı olduğundan değişen dirençlerin ölçümü yapılır. Metan gazı ile ısı daha fazla yayıldığından hidrokarbon analizi için daha hassas ölçümler yapılabilir. Bu tip sensörler “non-isotermal” (izotermik olmayan) modda işletilmektedirler.

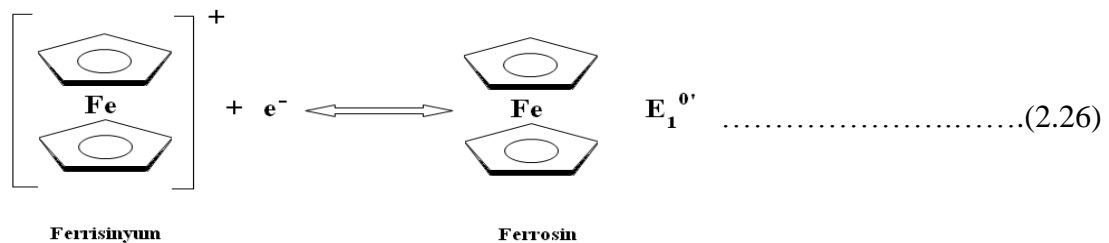
Başka bir alternatif metot ise, akımı düşürmek için geri beslemeli bir elektronik devre kullanımınıdır. Bu sayede katalist çubuğun sıcaklığı sabit kalacak ve reaksiyon ısısı dengelenecektir. Bu tip sensörlerin işletimine ise izotermal modda işletim adı

verilmektedir. Burada gazların yanması sonucu açığa çıkan ısıdan dolayı değişen akım değeri ölçülmektedir. Akım değişimi ortamda bulunan gazın miktarı ile orantılıdır. Katalist olarak platin kullanımı 1000 °C'lik bir sıcaklık gerektirirken, paladyum ve rodyum gibi katalistler için daha düşük sıcaklıklar yeterli olabilmektedir. Bu nedenle bu tip sensörlerde platin dışındaki katalistler tercih edilmektedir.

Katalitik gaz sensörlerinin değişik bir çeşidi de pellisterlerdir. Pellisterler de yukarıda açıklanan çalışma prensibine sahiptirler. Burada farklı olarak platin çubuk, seramik boncuklar içerisine yerleştirilmektedir. Genellikle paladyum olan katalist tabakası boncuk üzerine kaplanmaktadır. Sistem 500 °C sıcaklıkta çalıştırılarak metan gibi gazların ölçümünde kullanılmaktadır. Katalitik gaz sensörlerinde en sık karşılaşılan problem, kullanılan katalistin organo sülfür ya da organo fosforlu bileşiklerle ve bunların türevleriyle zarar görmesidir. Fakat bu sorun, katalistin içinde karıştığı boncukların poroz alüminyum oksitten yapılmasıyla ortadan kaldırılabilmektedir [Eggins, 2002].

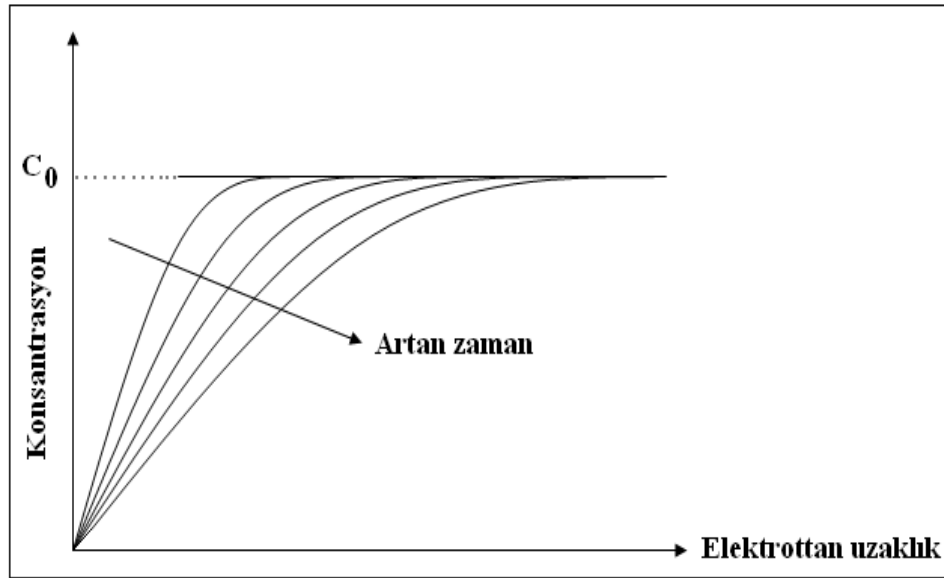
2.3. Amperometrik Biyosensörler

Potansiyometride olduğu gibi hiç akımın geçmediği dengedeki bir sistemden analitik bilgi almaktan ziyade, herhangi bir etki ile dengenin yön değiştirmesi sonucu elektrot çözeltisi ara yüzeyi boyunca transfer edilen elektron sayısının analit konsantrasyonu ile ilişkilendirildiği sistemlere “amperometrik sistemler” adı verilir. Bu tip sistemlerde sözü edilen mekanizmaya aşağıdaki gibi bir örnek verilebilir;



Sistem, bir ferrosin/ferrisinyum sistemidir ve reaksiyon oldukça stabil bir redoks denge reaksiyonudur. Ferrosin indirgenmiş form, ferrosinyum ise yükseltgenmiş formdur ve bu reaksiyon tek bir elektron transferi ile yürütülmektedir. Bu denge

reaksiyonunu dışarıdan $E_1^{0'}$ potansiyel değerinden daha yüksek bir potansiyelin platin elektroda uygulanmasıyla sola kaydırmak mümkündür. Bunun sonucu olarak elde edilen akım değeri ferrosin konsantrasyonuna bağlıdır. Bu yaklaşım, beraberinde önemli bir sıkıntı getirir ki bu da elektrot yüzeyinde analitin tükenmesidir (Şekil 2.5). Şekil 2.5'den de görüldüğü gibi platin elektroda böyle bir potansiyel uygulandığında, elektroda yakın olan ferrosin tamamen okside olmaktadır. Akım değeri, oksidasyon süresince elektroda yakın olan ferrosin tamamen kullanılana kadar yavaş yavaş azalır. Bu nedenle ilk bakışta bu metodun analitik bir ölçümde kullanılmasının uygun olmadığı anlaşılmaktadır.



Şekil 2.5. Potansiyel uygulandığında konsantrasyon-uzaklık profilinin gösterimi.

Akımın analit konsantrasyonu ile ilişkilendirilmesi iki sınırlayıcı duruma bağlıdır. Yukarıdaki sistemde ferrosinin elektrot yüzeyinde oksidasyonu sonucu oluşan akım, bu sınırlayıcı durumların ya ikisinden aynı anda, ya da sadece bir tanesinden etkilenmektedir. Sınırlayıcı durumlardan biri elektrot üzerinde elektron transfer kinetiği, diğeri ise ferrosinin elektrot yüzeyine doğru gerçekleşen kütle transferidir. Söz konusu kinetiklerin reaksiyon için hız belirleyici basamak oldukları durumlarda termodinamik kurallardan faydalanılarak akım için bir eşitlik geliştirmek mümkündür. Burada akım değeri, anodik (oksidasyon) ve katodik (indirgenme) akım değerleri arasındaki net akım farkı olarak ifade edilmektedir. Bu ifade aşağıdaki şekilde genişletilir;

$$i = nFAk^0 \left\{ \exp \left[\frac{\alpha nF}{RT} (E - E^0) \right] C_0(x,t) - \exp \left[\frac{-\alpha nF}{RT} (E - E^0) \right] C_r(x,t) \right\} \dots (2.27)$$

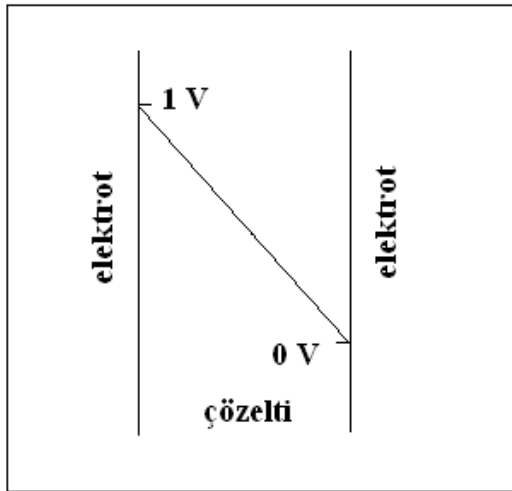
Yukarıdaki eşitlikte k^0 ; elektrot yüzeyindeki redoks reaksiyonuna ait standart heterojen hız sabitini, α ; reaksiyonu ilerletebilmek ve geri döndürebilmek amacıyla ne kadarlık bir potansiyelin uygulanması gerektiğinin bir ölçüsü olan transfer katsayısını (ideal bir redoks reaksiyonu için genellikle 0,5 olarak kabul edilmektedir), n ; transfer edilen elektron sayısını, A ; elektrot alanını ve F ; bir mol elektronun taşıdığı yük miktarını ifade etmektedir. Elektrot yüzeyindeki konsantrasyonlar şu şekilde belirtilmektedir; $C(x,t)$ t anında elektrottan x mesafede bulunan genel bir konsantrasyon terimidir. $C_0(x,t)$, elektrot yüzeyindeki ferrisinyum konsantrasyonunu, $C_r(x,t)$ ise elektrot yüzeyindeki ferrosin konsantrasyonunu ifade etmektedir. Elektrottaki elektron transfer hızı ya da kinetikleri k^0 (analit ve elektroda bağlı karakteristik bir değer) ve E ile E^0 arasındaki farkın kombinasyonu ile belirlenmektedir. Sadece kinetiklerin sınırladığı bir bölgede amperometrik bir analiz gerçekleştirilebilir oldukça güçtür. 2.27 eşitliği, akımın kinetiklerle mi (k^0 olarak verilen) yoksa analitin kütle transferiyle mi ($C_r(x,t)$ ve $C_0(x,t)$ terimleriyle ifade edilen) sınırlandırıldığı hakkında bilgi vermektedir. Oldukça büyük bir k^0 , ya da reaksiyon hızının yeteri kadar yüksek olabilmesi için seçilen bir E potansiyel değerinde, kütle transferi akım için sınırlayıcıdır. Bu olay deneysel olarak kontrol edilebilir ve bu durumda akım “Faraday Akımı” olarak adlandırılır;

$$i = nFAD \left. \frac{dC}{dx} \right|_{x=0} \dots (2.28)$$

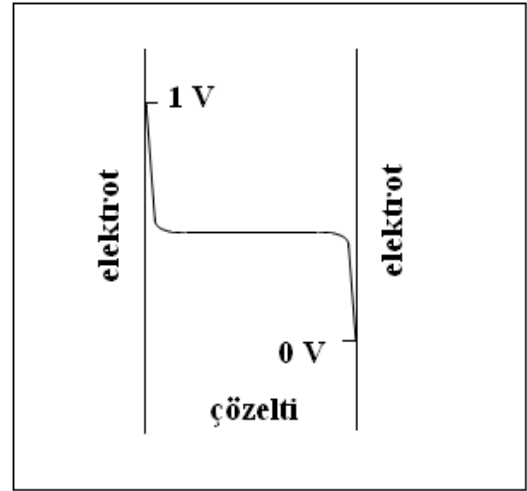
Bu reaksiyonda türevli terim, elektrot yüzeyindeki konsantrasyon profilinin eğimini ifade etmektedir (elektrot yüzeyinde konsantrasyon uzaklık noktasının tanjantı). D , difüzyon katsayısıdır, analit karakteristiğine bağlı olup, genellikle 10^{-6} - $10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ aralığında bir değer almaktadır.

Amperometrik bir ölçümde, optimum sinyalin alınabilmesi için bazı deneysel koşulların belirlenmesi gereklidir. Burada sözü edilen esas koşullar, elektrot

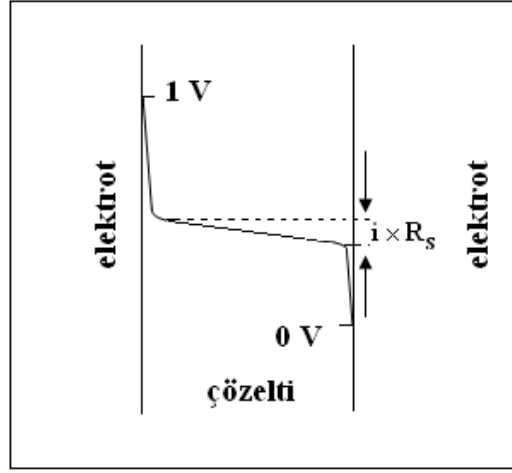
konfigürasyonu ve elektrolit madde ihtiyacıdır. Amperometrik ölçümde ortama eklenen elektrolitin görevi çözelti iletkenliğini artırmaktır. 2 adet elektrodun kullanıldığı bir sistemde, 2 elektrot arasında polarize olmayan (su) bir ortam bulunduğunda ve elektrotlardan bir tanesine 1V'luk bir potansiyel uygulandığında, 2 elektrot arasında lineer bir potansiyel düşüşü gerçekleşir (Şekil 2.6). 2 elektrot arasındaki ortamın elektrolit içeren (çözünmüş halde) bir ortam olması durumunda ise, bu potansiyel düşüşü çözeltinin her bir elektroda yakın olan ince tabakası boyunca gerçekleşmektedir ve bu tabaka "çift tabaka" olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.7). Elektrolit burada, çözelti sınırları boyunca küçük bir potansiyel değişim bölgesi oluşturarak, çözeltiyi çalışma elektroduna uygulanan yüksek potansiyelden korur. Bu bölge, elektrokimyasal olarak üretilmiş yüklü tanelerin aşırı hareketini önlemektedir. Yüklü taneciklerin aşırı hareketlenmesi kütle transferini zorlaştırmaktadır. Çözelti içerisinde akan bir akım ve direnç mevcutsa, 2 çift tabaka arasındaki potansiyel düşüşüne ilaveten $i \times R_s$ (i akımı, R_s çözelti direncini ifade etmektedir) kadar bir potansiyel düşüşü gözlenir (Şekil 2.8). Bu ortama elektrolit ilave edilerek direnç azaltılır ve buna bağlı olarak şiddetli potansiyel düşüşü engellenmiş olur. Çözelti içerisinde elektrolit ilavesi ile oluşturulmuş çift tabaka, elektrot yüzeyinde elektrostatik çekimle iyonları saran bir tabaka halini almaktadır. Bu durum, dış devrede analit konsantrasyonu ile ilişkili olan Faraday Akımı'na girişim yapacak ilave bir akım oluşturmaktadır. Bu nedenle kullanılacak elektrolitin miktarı amperometrik ölçümlerde önemli bir parametredir.



Şekil 2.6. Polarize olmayan ortamda 2 elektrot arasındaki potansiyel düşüşü.



Şekil 2.7. Elektrolit içeren ortamda 2 elektrot arasındaki potansiyel düşüşü.



Şekil 2.8. Çözelti içerisinde bir direnç ve akan bir akım olduğu durumda 2 elektrot arasındaki potansiyel düşüşü.

Bir reaksiyon hücresinde, difüzyona (belli bir konsantrasyon gradyanında türlerin hareketi) ve yüklü tanelerin potansiyel bölgede hareketine ek olarak gerçekleşen başka bir kütle taşınım olayı “konveksiyon”dur. Konveksiyon, çözeltinin çalışma elektrodundan kontrollü bir şekilde geçirilmesiyle oluşmaktadır. Bu durum, yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ve akışa enjeksiyon (FIA) analizlerinde gerçekleşmektedir. Viskoziteye bağlı olarak, çözeltinin hızı elektrot yüzeyine yakın bölgede önemli ölçüde düşmektedir. Böylelikle, akış kontrollü sistemlerde kütle transferini, konveksiyon difüzyonla birlikte belirlemektedir.

Bu kısma kadar, çalışma elektrodunun bir referans elektrotla birlikte kullanıldığı genel bir elektrokimyasal ölçümde gerçekleşen olaylar açıklanmaya çalışıldı. Pratikte böyle bir sistemde 2 tip problemle karşılaşmaktadır. Bunlardan ilki, çalışma elektrodundan geçen akımın referans elektroda doğru ilerlemesidir. Çoğu referans elektrodun potansiyeli bu akım girişini tolere ederek değişim göstermemektedir. Fakat bazen referans elektroda gelen akım elektrodun iç çözelti kompozisyonunu değiştirdiği için, referans elektrodun potansiyel değeri de değişir. Bu istenmeyen bir durumdur, çünkü elektrokimyasal hücrenin toplam potansiyeli, referans elektrodun potansiyel değerini baz almaktadır. İkili elektrot sisteminin diğer problemi ise, çalışma elektrodu ile referans elektrot arasında direnç oluşumudur. Daha önce, referans elektroda akan bir akım ve direnç olması durumunda potansiyel değerinin $i \times R_s$ kadar düştüğü belirtilmişti. Çalışma elektroduna 1V’luk bir

potansiyel uygulandığında aslında çalışma elektrodunun potansiyeli $(1 - i \times R_s)$ V olacak ve sistemden geçen akım değeri de bu potansiyelde ölçülmüş olacaktır. Ancak uygulamada akım değerinin 1V'luk bir potansiyelde ölçüldüğü kabul edilmektedir. İkili elektrot sisteminde yaşanan bu sorunlar, yardımcı bir üçüncü elektrodun (karşıt elektrot) hücreye eklenmesiyle ortadan kaldırılabilmektedir. Karşıt elektrot, genellikle grafit ya da platin çubuk şeklinde olup, çalışma elektrodundan daha büyük bir yüzey alanına sahiptir. Böyle bir üçlü elektrot sisteminde bir potansiyostat kullanmak suretiyle, çalışma elektroduna referans elektroda göre bir potansiyel uygulanır, aynı zamanda da ikili elektrot sisteminde referans elektroda giden akımın yönü karşıt elektroda çevrilir. İşte bu işletim sistemi, amperometrik bir biyosensörün elektriksel donanımını oluşturmaktadır.

Amperometrik biyosensörler, biyolojik katalist olarak kullanılan biyolojik bir materyalin elektriksel bir çevirici ile kombinasyonundan oluşmuş analitik cihazlardır. Bir biyosensör örnek içerisindeki analite yanıt verir, analit konsantrasyonunu biyolojik bir tanıma sistemi ve elektriksel bir çevirici üzerinden elektrik sinyallerine çevirir. Biyosensörlerde kullanılan biyokatalistler; enzimler, antikorlar, kemoreseptörler, hücre organelleri ve hücre dokularıdır. Biyosensörlerin en üstün özelliği karışık bir örnek içerisinde hedef analitin seçici olarak tanınmasıdır. Bu anlamda en başarılı biyosensörler, spesifik moleküler tanıma bölgesine sahip olan enzimlerin kullanıldığı biyosensörlerdir. Elektrokimyasal sensörler yaklaşık 40 yıldır geliştirilmekte ve günümüze kadar oldukça fazla çeşitlilik göstermektedir.

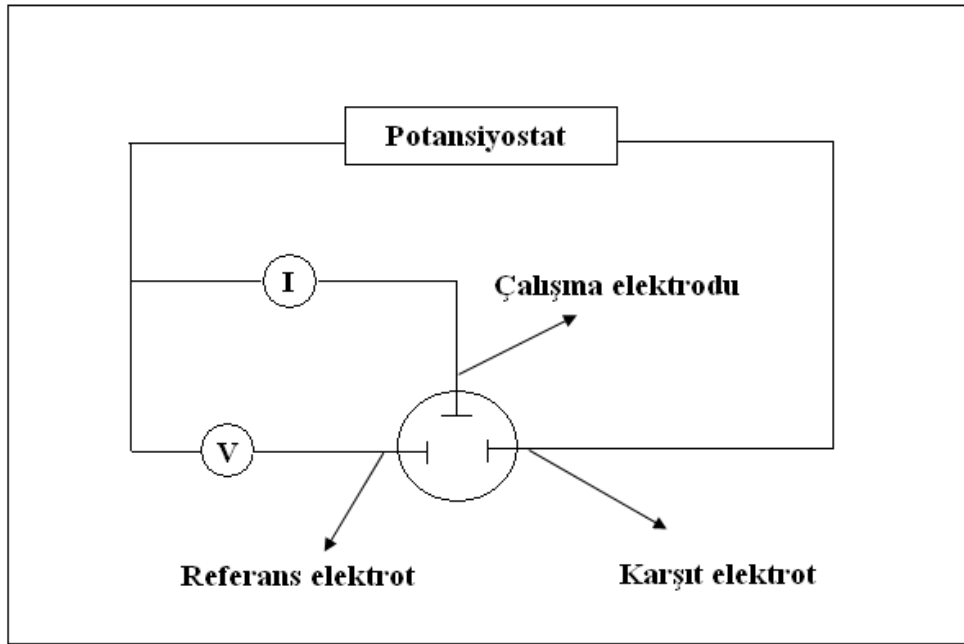
Amperometrik bir biyosensörün sinyal büyüklüğü, enzimatik reaksiyon kinetiği, enzim elektrodu fabrikasyonu ve elektrot işletim modu parametrelerine bağlıdır. Çalışma elektrodunun analite olan tepkisi difüzyon ya da kinetik kontrollüdür. Kinetik kontrollü enzim elektrotları ile oldukça düşük miktarlarda enzim kullanılır, elektrot yanıtı enzim konsantrasyonuna ve enzimatik reaksiyon kinetiğine bağlıdır. Bu tip elektrotların analitik ölçümler için kullanılması, düşük substrat konsantrasyonlarında sinyal doygunluğuna ulaşıldığı için uygun olmamaktadır. Difüzyon kontrollü elektrotlarda ise, enzim miktarı oldukça yüksek ve akım, enzim miktarında meydana gelebilecek en ufak bir değişimden bağımsızdır.

Sonuç olarak amperometrik akımın, difüzyonun ve analit konsantrasyonunun bir fonksiyonu olduğu söylenebilir.

Bir enzim elektrodu fabrikasyon metodunun biyosensör tepkisi üzerine önemli etkisinin olduğundan bahsedilmiştir. Enzim konsantrasyonu, enzim tabakasının kalınlığı, yarı-geçirgen membran türleri gibi elektrot fabrikasyon parametreleri ile birlikte pH, sıcaklık, konsantrasyon ve analit difüzyonu gibi bazı işletim parametreleri biyosensör sinyallerini kuvvetlendirebilmek için çalışılmakta olan parametrelerdir. Bu anlamda genel olarak, enzim konsantrasyonunun yüksek olduğu, hidrofilik membranların kullanıldığı, analitin kütle transferini kolaylaştırmak için çözeltinin karıştırıldığı veya elektrodun çözelti içerisinde döndürüldüğü biyosensör konfigürasyonları önerilmektedir.

Enzim elektrotları birçok ölçüm modunda çalıştırılmaktadır. Bunlar; dinamik, kararlı hal, potansiyel-basamak ve akışa enjeksiyon (FIA) metotlarıdır. Kararlı hal modu, analitik sinyal elde edilmeden önce reaksiyonun denge ulaştığı işletim modu iken, dinamik modda, elektrot örnekle temas eder etmez sinyal alınır. FIA ve potansiyel-basamak modlarında çalışma prosedürüne bağlı olarak anlık ve geçici sinyaller elde edilmektedir [Diamond, 1998].

Amperometrik biyosensörlerde daha önce de bahsedildiği gibi çalışma elektrodu, karşıt elektrot ve referans elektrottan oluşan üçlü elektrot sistemi kullanılmaktadır (Şekil 2.9). Çalışma elektrodu, yüzeyinde analitin yükseltgendiği veya indirgendiği elektrottur. Biyolojik katalist bu elektroda immobilize edilmektedir. Yapımında iletken malzemeler kullanılmaktadır. Bu iletken malzemeler örnek olarak; platin veya altın gibi inert bir metal, karbon, pirolitik grafit ya da camsı karbon; kalay oksit ya da indiyum oksit gibi yarı iletken veya bir civa filmi ile kaplanmış bir metal olabilmektedir. Kullanılacak elektrotlar, farklı şekil ve büyüklüklerde hazırlanarak, tasarımı yapılacak olan biyosensör sistemine en uygun biçimde geliştirilebilmektedirler.



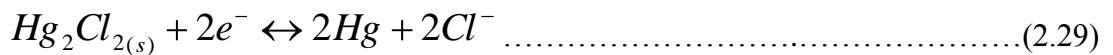
Şekil 2.9. Üçlü elektrot sisteminin potansiyostata yerleşimi.

Karbon elektrotlar çok ucuz olmaları ve geniş potansiyel aralığında çalışmasına olanak sağlamaları açısından, elektrokimyasal analizlerde sıklıkla tercih edilmektedirler. Hidrojen, hidroksil, karboksil grupları ve kinonlar ile karbon yüzey arasında kimyasal bağlar oluşabilmektedir. Bu fonksiyonel grupların varlığına bağlı olarak karbon yüzeye çok sayıda değişik madde tutturulabilmektedir. Karbon pastası elektrodu (CPE), %70 grafit, %30 Nujol (mineral yağ), parafin yağı, silikon yağı ve bromonaftalen gibi bir bağlayıcı maddenin homojen olarak karıştırılması ve karışımın 2-4 mm çapındaki cam ya da teflon özellikteki borulara sıkıştırılmasıyla hazırlanmaktadır. Pasta bileşimi elektrot aktivitesi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Elektriksel iletkenlik, bu borunun 2/3'üne kadar uzatılan iletken bir tel aracılığı ile sağlanmaktadır. Grafit tozunda bulunan karbon molekülleri düzlemsel ve aromatik halkalar halinde birbirlerine zayıf π bağı ile bağlanırlar. Bu tabakalar arasında hızlı bir elektron alışverişi olabilmekte ve böylece iletkenlik sağlanabilmektedir. Elektron transfer hızı, bağlayıcı organik sıvı oranıyla ters orantılıdır. Ucuz olması, yüzey yenilenme işleminin kolay olması ve düşük artık akımlar oluşturması nedeniyle tercih edilmektedir. Camsı karbonun, fenol/formaldehit polimerlerinin veya poliakrilonitrilin, 1000-3000⁰ C arasında, basınç altında, karbonizasyona uğratarak, inert malzemeden yapılmış elektrot gövdesi içerisine sıkıştırılmasıyla camsı karbon elektrot (GCE) elde edilmektedir. Elde edilen yüzeyin çok daha pürüzsüz ve düzgün

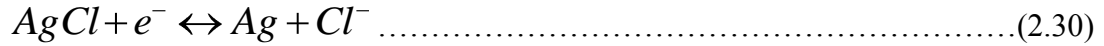
olmasından ötürü bu tip elektrotlarla elde edilen elektrokimyasal yanıt, karbon pastası elektrotlarına göre daha iyi ve tekrarlanabilir. Hem yüksek fiziksel dayanıklılığa sahiptir, hem de kimyasal tepkimelere katılmaz. Ayrıca geniş bir potansiyel aralığında çalışılmasına olanak sağlamaktadır. Metallerden yapılmış çalışma elektrotlarından en sık kullanılanı platin ve altın elektrotlardır. Bu tip elektrotlar sadece saf metalden elde edilip, düz bir levha şeklinde ya da çubuk şeklinde dizayn edilmektedirler.

Karşıt elektrot, elektriğin çözelti ortamından geçerek çalışma elektroduna aktarılmasını sağlar. Bu elektrot, çalışma elektrotu ile bir çift oluşturmakta ancak ölçülen potansiyelin büyüklüğünün tayininde rol oynamamaktadır. Karşıt elektrot, yardımcı elektrot olarak da bilinir, tepkimeye katılmaz. Genellikle platinden yapılmış bir elektrot yardımcı elektrot olarak kullanılmaktadır [Meriç, 2008].

Referans elektrot, deney süresince potansiyeli sabit kalan bir elektrottur. Çalışılan çözeltilere ait bileşenlere duyarlı olmayan, elektrokimyasal analiz uygulamaları sırasında potansiyeli dış ortamdan etkilenmeyen ve analiz süresince sabit kalan elektrotlardır. İdeal bir referans elektrot kolay hazırlanabilmeli, tersinir davranmalı ve Nernst eşitliğine uymalıdır (Bkz. 2.5 eşitliği). Standart hidrojen elektrodu (SHE), elektrokimyada kullanılan ilk referans elektrot çeşitidir. Hazırlanması oldukça güç olduğundan, pratik çalışmayı zorlaştıran bu elektrot uygulamada fazla tercih edilmemektedir. Kalomel elektrot, kalomel (Hg_2Cl_2) ve civadan oluşmuş bir karışım olup, metalik civa ve potasyum klorür çözeltisinden meydana gelmektedir. Hazırlanması oldukça kolaydır. Bu elektrodun potansiyeli, klorür iyonlarının aktifliğine bağlıdır. Doygun kalomel elektrodun elektrot potansiyeli, standart hidrojen elektroduna göre $25\text{ }^\circ\text{C}$ ' de $+0,244\text{ V}$ ' dur. Burada gerçekleşen elektrot tepkimesi;



şeklindedir. Gümüş/Gümüş klorür ($Ag/AgCl$) referans elektrot, en yaygın kullanım alanına sahip olan referans elektrottur. Gümüş bir telin, elektrolitik yoldan gümüş klorür ile kaplanarak klor iyonu içeren bir çözeltilere daldırılmasıyla elde edilmektedir. Oluşan elektrot tepkimesi;



şeklindedir. Doymuş potasyum klorür çözeltisi kullanıldığında; 25 °C’ de standart hidrojen elektroduna göre potansiyeli +0,222 V’ dur. Doymuş kalomel elektrottan üstün olarak, daha yüksek sıcaklıklarda kullanılabilir. Aynı zamanda gümüş iyonları civa (I) iyonlarına göre daha az sayıda analitle reaksiyona girdiklerinden bu tip referans elektrotların kullanımı çalışma açısından daha avantajlıdır [Kılıç ve Köseoğlu, 1996; Chiti et al., 2001; Yıldız ve Genç, 1993; Service, 1998; Tomschik et al., 1999].

Oksidasyon reaksiyonlarının 3 farklı şekilde gerçekleştiği amperometrik biyosensörler ;

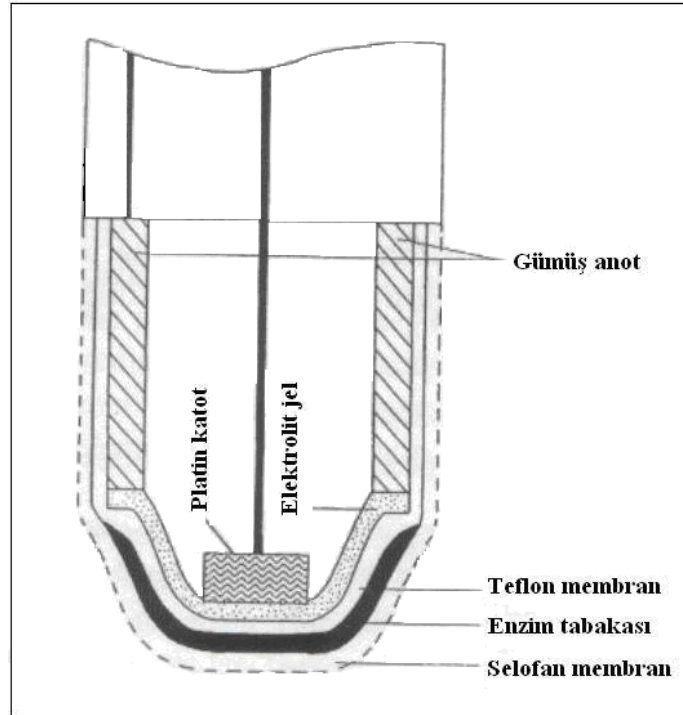
- Birinci jenerasyon- Oksijen elektrodu içeren biyosensörler
- İkinci jenerasyon- Medyatör (aracı) tabanlı biyosensörler
- Üçüncü jenerasyon- Enzimin elektrodada direkt bağlı olduğu biyosensörler

olarak sınıflandırılmaktadırlar.

Birinci jenerasyon- Oksijen elektrodu: Moleküler oksijeni okside edici madde olarak kullanan bir glikoz enzim elektrodunda gerçekleşen reaksiyon mekanizması aşağıda verilmiştir;



Bu reaksiyonda oksijen tüketimi Clark tipi bir oksijen elektroduyla ölçülür ve bu tüketim ortamına eklenen glikoz konsantrasyonu ile ilişkilendirilir. Bu tip bir elektrot ilk defa 1953 yılında geliştirilmiş, oksijenin hücre akımıyla elektrokimyasal olarak indirgenmesi voltametrik yoldan gözlemlenmiştir. Yukarıdaki reaksiyonun gerçekleştirildiği hücrede, *glucose oxidase* enzimi (GOD) gaz geçirimli membranla kaplı Clark tipi elektrot üzerinde sentezlenmiş bir poliakrilamid jel tabakasına immobilize edilmiştir. Clark tipi elektrot, platin katot ve gümüş anottan oluşmuştur. Şekil 2.10 bu şekilde dizayn edilmiş tipik bir glikoz biyosensörünü göstermektedir;



Şekil 2.10. Clark tipi glikoz elektrodunun şematik gösterimi.

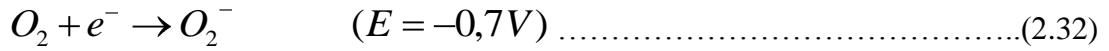
Bu tip bir elektrot sisteminin medikal alanlarda kullanımı yararlı olmuş, üstelik diğer biyosensörlerin dizaynında model olarak kullanılmıştır. Oksidaz sınıfı enzimleri ve oksijeni içeren biyosensörlerden bazıları Çizelge 2.1’de verilmiştir;

Çizelge 2.1. Oksidaz sınıfı enzimleri içeren biyosensörler.

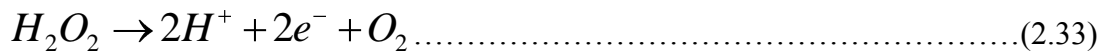
| <i>Analit</i> | <i>Enzim</i> |
|---------------|----------------------------|
| Glikoz | <i>Glucose oxidase</i> |
| Kolesterol | <i>Cholesterol oxidase</i> |
| Monoaminler | <i>Monoamine oxidase</i> |
| Oksalat | <i>Oxalate oxidase</i> |
| Laktat | <i>Lactate oxidase</i> |
| Formaldehit | <i>Aldehyde oxidase</i> |
| Etanol | <i>Alcohol oxidase</i> |
| Glikolat | <i>Glycollate oxidase</i> |
| NADH | <i>NADH oxidase</i> |

Bu tip elektrotlar iyi çalışabiliyor olmalarına rağmen, kullanımlarıyla birlikte bazı sıkıntılar ortaya çıkmıştır. Bunlardan biri, ortamdaki oksijen miktarının sabit kalması

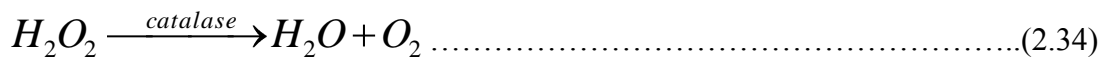
ve kontrol edilme gerekliliğidir. Bu kontrolün sağlanamadığı durumlarda oksijen miktarındaki düşüş, glikoz konsantrasyonundaki azalma ile orantılı olmayacaktır. Diğer problem ise, oksijenin indirgenmesi için yüksek potansiyellere ihtiyaç duyulmasıdır. Bu durum aşağıdaki reaksiyonda verilmiştir;



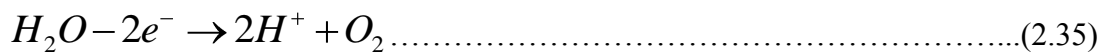
Bu durumda ortamda bulunan başka materyaller girişim yapabilmektedir. Sözü edilen problemlerin çözümü için araştırmacılar tarafından bazı çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan biri; ürünlerden hidrojen peroksitin oksidasyonunun ölçümüne dayalıdır;



reaksiyonu için +0,65 V'luk bir potansiyel gerekmektedir ve bu değer de oldukça yüksektir. Üstelik burada, biyolojik sistemlerde yaygın olarak bulunan ve +0,65 V'luk potansiyelde okside olabilen glukonik asitin girişim problemi de söz konusudur. Ortamdaki oksijen miktarını dengede tutabilmek için yapılmış bir çalışmada, *catalase* enziminin ortama eklenmesiyle hidrojen peroksitin aşağıdaki gibi su ve oksijene ayrışması sağlanmıştır;



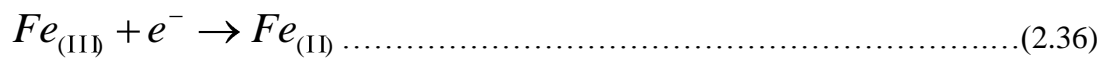
Fakat burada, reaksiyon için gerekli olan oksijen miktarının ancak yarısının üretilebildiği anlaşılmış ve bu da çözüm olmamıştır. Buna alternatif bir yaklaşım olarak, oluşan su ve oksijen anotta tekrar aşağıdaki şekilde okside edilmiştir;



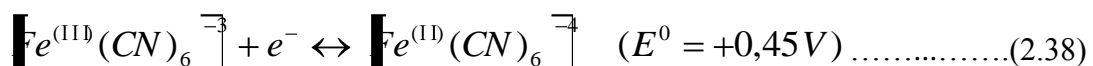
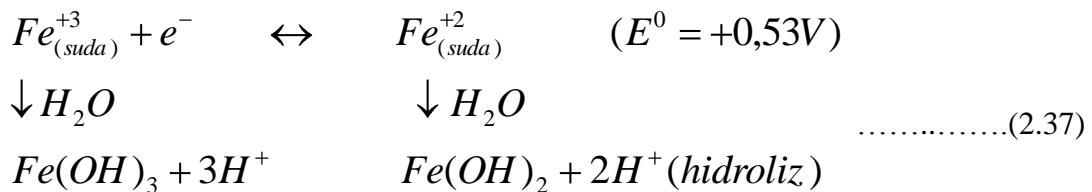
Ancak, bu reaksiyonda da standart elektrot potansiyeli diğer maddelerin okside edilmesini sağlayacak kadar yüksektir (+1,23 V). Bu alanda, ortam oksijenini stabil tutan bir elektrot geliştirilerek başarı sağlanmıştır. Bu elektrodun içerisine ayrı bir oksijen üretici devre yerleştirilmiş ve bu devre geri beslemeli bir amplifikatör

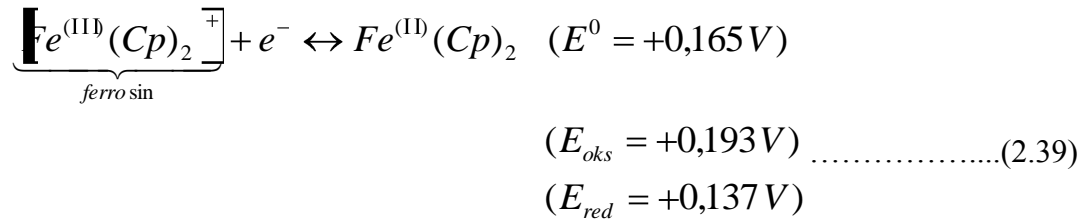
(amplifier) ile kontrol edilmek suretiyle oksijen miktarı sabit tutulabilmiştir. Amplifikatör, ortamda oksijen varlığından kaynaklanan akım ölçümünü standart bir potansiyel ile kıyaslamaktadır. Bu sistemde *glucose oxidase* enzimi *catalase* enzimi ile birlikte platin bir tel yüzeyine tutturulmuştur. Daha sonra bu tipte geliştirilen biyosensörlerde, oksijen içeren tampon çözeltinin elektrottan sürekli olarak belli bir hızda geçirilmesiyle oksijen miktarı dengede tutulmuştur [Eggins, 2002].

İkinci jenerasyon- Medyatör tabanlı biyosensörler: Bu jenerasyonda, birinci jenerasyon biyosensörlerde okside edici madde olarak kullanılan oksijenin yerine geri dönüşümlü, konsantrasyonu kontrol edilebilen ve makul bir oksidasyon potansiyeline sahip başka elektron transfer aracı maddeler kullanılmaya başlanmıştır. Geçiş metalleri ve bunların kompleksleri elektron transfer aracı olarak biyosensörlerde yer almıştır. Bu materyallere genel olarak “medyatör” denir. Medyatörlerin çoğu demir tabanlıdır; ya demir iyonlarını, ya da demir komplekslerini ihtiva etmektedirler. Genel reaksiyon şu şekildedir;

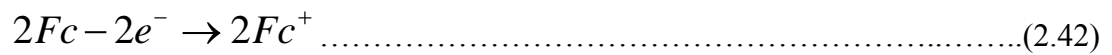
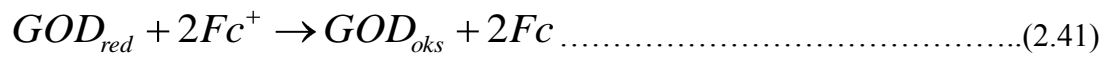
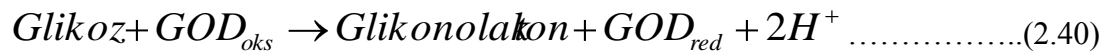


Fe^{+3} iyonları hem hidroliz olduğundan hem de demir hidroksit $[Fe(OH)_3]$ şeklinde çökelek oluşturduğundan iyi bir medyatör olmamıştır. Bunun yerine bir demir kompleksi olan hekzasiyanoferrat $[Fe(CN)_6]^{-3}$ veya diğer adıyla ferrisiyanid yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Fakat daha sonra en başarılı medyatörlerin ferrosin (Fc) kompleksleri olduğu belirlenmiştir. Ferrosin, iki adet siklopentadienil (Cp) arasında bir demir katyonunun bulunduğu sandviç yapıda bir moleküldür. Demir ve demir komplekslerinin medyatör olarak biyosensörlerde kullanılma mekanizmaları aşağıdaki eşitliklerde verilmiştir;

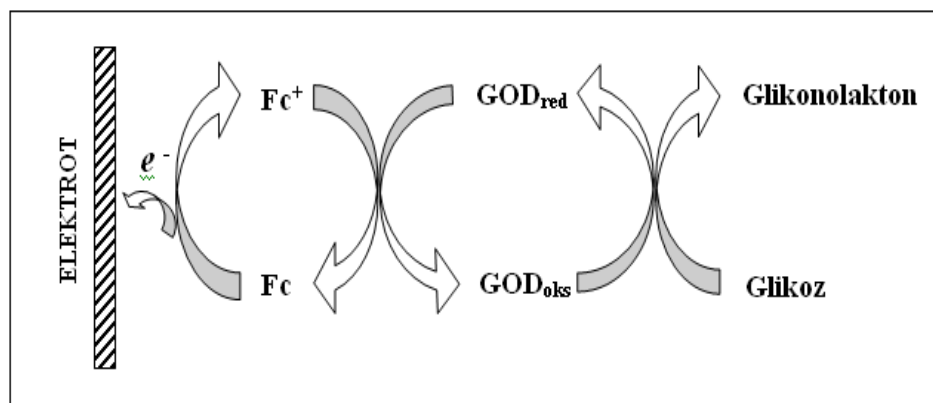




Glikozu örnek alarak, ferrosin medyatörünün kullanıldığı bir biyosensörde reaksiyon mekanizması aşağıdaki gibi verilmiştir;



Glikozun oksidasyonu *glucose oxidase* enzimi (GOD) yapısında bulunan flavin adenin dinükleotit (FAD) tarafından gerçekleştirilmektedir. FAD, bu reaksiyon sonucu FADH₂ yapısına dönüşür. FADH₂, Fc⁺ aracısı ile tekrar okside edilirken, Fc⁺, Fc formuna indirgenmiş olur. Daha sonra Fc, elektrot yüzeyinde direkt olarak oksidasyona uğrar. Bu mekanizma Şekil 2.11'de gösterilmiştir.



Şekil 2.11. Ferrosin medyatörlü bir glikoz biyosensörü için reaksiyon mekanizması.

Medyatörlerin biyosensörlere uygulanması farklı metotlarla olmaktadır. Bunlardan en başarılı olanı medyatörün enzimle birlikte elektrot yüzeyine

immobilize edilmesidir. Böylelikle medyatör, hem elektrot hem de enzimle temas halinde olacak ve elektron transferi kolaylaşacaktır. Medyatörler “doğal” ve “yapay” olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadırlar. Çizelge 2.2’de bu gruplara ait bazı medyatörler gösterilmektedir. Doğal medyatörler biyolojik kaynaklardan elde edilirken, yapay medyatörler çoğunlukla boya grupları içeren sentetik medyatörlerdir. İyi bir medyatör; enzimle hızlı bir şekilde reaksiyona girebilmeli, geri dönüşümlü bir elektron transfer mekanizmasına sahip olmalı, pH’dan bağımsız olmalı, hem oksitlenmiş hem de indirgenmiş formu kararlı olmalı, oksijenle reaksiyon vermemeli, rejenerasyonu için düşük bir potansiyele sahip olmalı ve toksik özellik göstermemelidir [Eggins, 2002].

Çizelge 2.2. Bazı doğal ve yapay medyatörler ve pH 7’deki redoks potansiyelleri.

| <i>Doğal medyatör</i> | <i>E (V)</i> | <i>Yapay medyatör</i> | <i>E (V)</i> |
|--------------------------|---------------------|-----------------------|--------------|
| Sitokrom a ₃ | +0,29 | Hekzasiyanoferrat | +0,45 |
| Sitokrom c ₃ | +0,24 | 2,6-diklorofenol | +0,24 |
| Ubikinon | +0,10 | İndofenol | +0,24 |
| Sitokrom b | +0,08 | Ferrosin | +0,17 |
| Vitamin K ₂ | -0,03 | Fenazin metasülfat | +0,07 |
| Rubredoksin | -0,05 | Metilen mavisi | +0,04 |
| Flavoproteinler | (-0,4)-(+0,2) arası | Fitalosiyenin | -0,02 |
| FAD/FADH ₂ | -0,23 | Fenosafuranin | -0,23 |
| FMN/FMNH ₂ | -0,23 | Benzil viyalojen | -0,36 |
| NAD ⁺ /NADH | -0,32 | Metil viyalojen | -0,46 |
| NADP ⁺ /NADPH | -0,32 | | |
| Ferridoksin | -0,43 | | |

Üçüncü jenerasyon- Enzimin elektroda direkt bağlı olduğu biyosensörler:

Bu jenerasyondaki enzim elektrotları, enzimlerin aktif redoks merkezleri ile elektrot arasında direkt elektriksel bağlantı kurmak için tasarlanmıştır. Enzimlerin direkt olarak (medyatör kullanılmaksızın) elektrot yüzeyine bağlanması, yüzeyde denatüre olmalarını sağlamaktadır. Buna ilaveten, bu tip bir sistemde elektron transfer reaksiyonu yavaş ve geri dönüşümsüz olabilmektedir. Bu nedenle, reaksiyonun gerçekleşebilmesi için elektroda oldukça yüksek bir potansiyel uygulanmaktadır. Söz konusu problemlerin çözümüne bazı yüzey modifikasyonları yapılarak ulaşılmıştır.

Örneğin; altın elektrot yüzeyi 4,4'-bipiridil ile modifiye edilebilmektedir. 4,4'-bipiridil ne bir mediyatör ne de elektroaktif bir maddedir. Fakat, 4,4'-bipiridil enzimde bulunan lizin grupları üzerinde zayıf hidrojen bağları oluşturmak suretiyle enzimin elektroda direkt bağlanmasını sağlamaktadır. Daha iyi bir çözüme organik-iletken tuz elektrotları kullanılarak ulaşılmıştır [Alberty and Cranston, 1987; Bartlett, 1987]. Bu sistemde, tetrathiafulvalene (TTF) geri dönüşümlü olarak okside edilirken, tetrasiyanokinodimetan (TCNQ) benzer şekilde geri dönüşümlü olarak indirgenmiştir. Bu iki molekül, bir yük transfer kompleksi oluşturmuştur. Üstelik bu kompleks elektroda bağlandığında, elektrot yüzeyi birçok enzim için stabil ve geri dönüşümlü elektron transferine müsait hale gelmiştir. N-dimetilfenotiyazin gibi başka iletken tuzlar da bu moleküllere alternatif olarak kullanılmışlardır. Bu iletken tuzlar farklı yollarla elektroda yerleştirilmektedir; peletlerin içerisine bastırılmış tek kristal şeklinde ya da grafit tozu ile beraber pasta elektrot şeklinde sisteme dahil olmaktadır. Özellikle kristal yapıda sisteme dahil edilmeleriyle yüksek oranda geri dönüşümlü elektron transfer mekanizmasına ulaşılabilmektedir.

Son yıllarda, hızlı elektron transferine ve yüksek akım yoğunluğuna ulaşmayı sağlamak adına enzimin elektroda direkt bağlanması, immobilizasyon tekniklerinin geliştirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu teknikler genellikle bir redoks polimerinin kullanılmasıyla yerinde polimerizasyon prosesini gerektirmektedir. Glikoz için geliştirilmiş bir biyosensör, bu prosese örnek olarak verilebilir. Burada redoks merkezi içeren bir *glucose dehydrogenase* enzimi, poli(vinilpiridin) redoks polimeri üzerinden camsı karbon bir elektroda immobilize edilmiştir. Polietilenglikol 400 maddesi kullanılarak enzim polimere çapraz bağlanmıştır [Eggins, 2002].

2.3.1. Amperometrik Biyosensörlerin Performans Kriterleri

Moleküler tanıma esaslı tüm biyosensörler için biyosensör yanıtının karakterize edilmesi önemli bir husustur. Hatta bu parametre hız sınırlayıcı adımların ve biyosensörün optimizasyonunun belirlenmesi açısından da önemlidir. Dolayısıyla, önemli performans kriterlerinin ve bunların bir elektrokimyasal biyosensörün çeviricisi ve reseptörüyle ilişkilerinin tartışılması faydalı olacaktır. Aslında biyosensör türlerinin çok hızlı bir şekilde artması ve bunların kendi içindeki farklılıkları, performans kriterlerinin çok dikkatli ve güvenilir bir şekilde

belirlenmesini yetersiz kılmıştır. Her bir sensör sadece özel bir uygulama için karakterize ediliyor olmasına rağmen, performans kriterlerinin incelenmesi için standart protokollerin kullanılması uygun görünmektedir. Bu protokoller birçok farklı parametreyi içermektedir ve aşağıdaki başlıklarda açıklanmıştır.

2.3.1.1. Kalibrasyon Karakteristikleri: Hassasiyet, Doğrusal Aralık, Belirleme Limiti

Genel olarak amperometrik bir biyosensörün kalibrasyonu, standart analit çözeltilerinin ilavesi ve elde edilen durgun hal yanıtlarının eklenen analit konsantrasyonuna veya konsantrasyonunun logaritmasına karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilmektedir. Ortama eklenen analitin konsantrasyonu söz konusu kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak belirlenmektedir. İdeal bir biyosensörün sıklıkla kalibre edilmesi istenmeyen bir durumdur. Fakat, teoride planlanan bu özellik günümüzde gerçekleştirilememiştir. Biyosensörlerin kullanım ömürleri boyunca sıkça ya da belirli aralıklarla kalibre edilerek duyarlılıklarından bir şey kaybedip kaybetmedikleri araştırılmalıdır. Bunun yanı sıra, yeni imal edilmiş bir parti biyosensörün, bir parti elektrot içerisinde aynı konsantrasyondaki analite farklı yanıt veren elektrotları bulunacağından, tek tek kalibre edilmesi gerektiği düşünülürse bu problemin çözümünde aslında emekleme aşamasında olduğumuz anlaşılmaktadır.

Belli bir konsantrasyon değerinden sonra enzim aktivitesinin azalması, elektrot yüzeyinin oluşan bazı radikallerle kaplanması gibi nedenlerle akım değişimlerinin azalması ve bu konsantrasyondan büyük konsantrasyon değerlerinde analit ilavesinden sonra ortam kararlılığının bozulması gibi nedenlerden dolayı oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi bozulmaktadır. Doğru ölçümün yapılabilmesi için akım değişimlerinin doğrusal eğilim gösterdiği doğrusal ölçüm aralığını tanımlamak gereklidir. Biyosensör ölçümleri için gerekli analitik hesaplamalar bu doğrusal aralıkta yapılmaktadır. Doğrusal aralığın geniş olması biyosensör ölçümünün yüksek analit konsantrasyonlarında doğru sonuç verdiğini gösterdiğinden istenen bir durumdur. Elektrokimyasal biyosensörler daima daha geniş bir doğrusal konsantrasyon aralığına sahiptirler. Bunun sebebi, biyokimyasal ya da biyolojik reseptörün biyokatalitik veya biyokompleksleşme özellikleriyle doğrudan ilişkili

olmasıdır. Hatta enzim tabanlı biyosensörlerde bu aralık, substrat için bir dış difüzyon bariyer membranı kullanımıyla ciddi anlamda genişletilebilmektedir. Ancak bu genişlemenin sensör hassasiyetinde de bir azalmaya neden olabileceği açıktır. Reaksiyon tabakasındaki bölgesel substrat konsantrasyonu, çalışma çözeltisindekinden 2 kat daha düşük olabilir. Enzim temelli biyosensörler, Michaelis-Menten kinetikleri açısından ilişkilendirildiğinde, K_m ve V_{max} değerleri ile karakterize edilirler. K_m bilindiği gibi maksimum hızın yarısındaki substrat konsantrasyonunu ifade etmektedir, V_{max} değeri ise sonsuz substrat konsantrasyonunu göstermektedir. Eğer görünen K_m değeri, aynı enzimin çözünür formu için K_m değerinden daha büyükse bunun iki anlamı olabilmektedir. Bunlardan birincisi; örnek ve reaksiyon tabakası arasında ciddi bir substrat difüzyon bariyerinin varlığı söz konusudur. İkincisi ise; kosubstratın, enzimle olan reaksiyon hızı artmıştır. Enzim kinetiğinde görünen K_m genellikle, Lineweaver-Burk diyagramları kullanılarak belirlenmektedir ($1/V$ ye karşı $1/C$ grafikleri). Her elektrokimyasal sensörde olduğu gibi, kullanılan standartların sayısı, bileşimi ve örnek matrisinin nasıl olduğu mutlaka dikkate alınmalıdır. Bu amaca yönelik olarak, her bir biyosensör tipi ve uygulama için kullanılacak prosedürlerin değiştirilmesi gerekli olabilmektedir.

Biyosensörün hassasiyeti, oluşturulan analitik eğrinin doğrusal konsantrasyon aralığının eğimidir. Bir başka tanımla biyosensörün ne kadar küçük bir değişimi ölçebildiğinin ölçüsüdür. Bu sebeple, hassasiyet değerinin büyük olması konsantrasyondaki küçük bir değişimin ölçülebildiğinin göstergesidir.

Tasarlanmış bir biyosensörün ideal biyosensör tanımına uyabilmesi için, tayin sınırının belli bir konsantrasyon değerinin altında olması gerekmektedir. Belirtilen bu tayin sınırına “belirleme limiti” (LOD) denir. Genel ifadeyle LOD, bir biyosensörün yanıt verebildiği en küçük konsantrasyon değeridir. Düşük belirleme limiti biyosensör için bir avantajdır. LOD, elektrot tipine, elektrot yüzey alanına, enzimin tayin edilecek analite olan ilgisine, immobilize edilen enzim miktarına, enzim immobilizasyonunda kullanılan polimerin tabaka kalınlığına ve cinsine bağlı olarak değişmektedir.

2.3.1.2. Tekrarlanabilirlik, Kararlılık, Kullanım Ömrü, Yanıt Süresi

Elektrokimyasal biyosensörler için tekrarlanabilirliğin tanımı, diğer analitik cihazlarınkıyla aynıdır. Tekrarlanabilirlik, belirli bir zaman periyodu içerisinde elde edilen sonuçlardaki farklılıkların yada dağılımların bir ifadesidir. Tekrarlanabilirlik genellikle kullanılan bir doğrusal aralıktaki analit konsantrasyonları için belirlenir.

Bir biyosensörün işletme kararlılığı önemli düzeyde sensör geometrisine, hazırlanma metoduna ve tabi ki reseptör ve çeviriciye bağlıdır. Bunların yanı sıra, substratın iç veya dış difüzyonu veya biyolojik tanıma reaksiyonu gibi cevap hızını sınırlayıcı faktörler de işletme kararlılığını etkilemektedir. Son olarak, işletme koşullarının da, işletme kararlılığını değiştirdiği söylenebilir. İşletme kararlılığının belirlenebilmesi için, analit konsantrasyonu, biyosensörün analit çözeltisiyle sürekli ya da aralıklarla teması, sıcaklık, pH, tampon bileşimi, organik çözücülerin varlığı ve örnek matriksinin bileşimi gibi parametrelerin tartışılması gerekmektedir. Bazı biyosensörlerin laboratuvar koşullarında bir yıldan fazla kullanım sürelerinin olduğu rapor edilse de, endüstriyel proseslerde veya implante biyosensörlerde pratik kullanım ömürleri günler veya haftalarla ifade edilmektedir. Depo kararlılığını etkileyen en önemli parametreler ise depolama ortamının kuru veya nemli oluşu, atmosferik bileşimi (hava veya azot oranları) pH, tampon bileşimi ve katkı maddelerinin varlığıdır.

Biyosensörlerin laboratuvar koşullarındaki, hem depolama hem de analit varlığındaki işletme kararlılıklarının belirlenmesi nispeten kolay olmasına rağmen, endüstriyel reaktörlerde kullanılan biyosensörlerin bu tür kararlılıklarının incelenmesi ve karakterize edilmesi daha kompleks ve zordur. Her iki durumda da biyosensörün (laboratuvar ve endüstriyel koşullar) depo ve işletim ömrünün nasıl saptandığı (rafta saklanılarak mı yoksa kullanılarak mı), depo ve çalışma koşullarının nasıl olduğu hususları çok önemlidir.

Son olarak, kullanım ömrünün neye göre değerlendirildiği belirlenmelidir. Burada referans olarak, başlangıç hassasiyeti, kalibrasyon grafiğinin doğrusal tayin aralığının üst sınırı, doğruluk veya tekrarlanabilirlik gibi parametreler alınabilir. Biyosensör ömrü, kabul edilebilir hassasiyet düzeyi için geçerli, depo veya işletme

süresi olarak nitelendirilebilir ve bir doğrusal konsantrasyon aralığı içindeki sonuçların %10 veya %50 düşüşü şeklinde gösterilebilir. Depo ömrünün belirlenebilmesi için, aynı koşullarda ve kişi tarafından hazırlanmış fakat farklı sürelerde depolanmış biyosensörlerin bu süreler sonundaki hassasiyetlerinin kıyaslanması gerekmektedir [Sezgintürk, 2007].

Yanıt süresi, bazı uygulamalarda geriye dönme zamanı ile aynı anlama gelse de genellikle bu tanımdan farklıdır. Amperometrik uygulamalarda, analizlenecek örneği çalışma ortamına eklemekten önce elektrot yüzeyinde oluşan akımın sabit kalması istenmektedir (kararlı-hal akımı). Akım sabit kaldıktan sonra, analizlenecek madde ortama eklenerek akım değişimi kaydedilir. İkinci bir eklemekten önce akım değişiminin sabit kalması beklenir. İşte, ilk eklemekten sonra akımın tekrar sabit kalmasına kadar geçen zamana “yanıt süresi” denir. Kararlı-hal yanıt süresi, kararlı-hal yanıtının %95 düzeyine ulaşması için gereken süre olarak da ifade edilmektedir. Yanıt süresinin kısa ya da hızlı oluşu ideal bir biyosensör özelliğidir. İkinci ve onu takip eden diğer analizlerin daha hızlı yapılmasını sağladığından avantajdır. Bir biyosensörün yanıt süresi elde edilen akım-zaman grafiğinden anlaşılabilir.

Genel olarak biyosensörlerin bazı karakteristikleri, farklı tiplerdeki elektrokimyasal sensörler için de geçerlidir. Ancak söz konusu karakteristikler çoğu zaman biyosensörün prensibine spesifik olabilmektedir. Biyosensörlerin cevapları, tanıma kinetikleri ve transdüksiyon reaksiyonları veya kütle transfer hızları tarafından kontrol edilmektedir. Biyosensör performans kriterlerinin kontrolü, optimizasyonu ve değerlendirilmesi için hız sınırlayıcı adımın belirlenmesi kaçınılmazdır.

2.3.2. Amperometrik Biyosensörlerde İletken Polimerlerin

Kullanımı

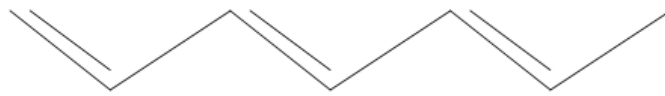
Polimerler, ilk kullanımlarından bu yana elektriksel yalıtkanlığı iyi maddeler olarak bilinirler. Bu özelliklerinden dolayı elektriksel yalıtkanlığın arandığı, kabloların kılıflandırılması gibi alanlarda önemli kullanım yeri bulmuşlardır. Kolay işlenmeleri, esneklikleri, estetik görünüşleri, hafiflikleri ve kimyasal açıdan inert

olmaları diğ er bazı üstün özellikleridir. Metaller ise; elektriksel iletkenliğ i yüksek, üstün mekaniksel özelliklere sahip bir baş ka madde grubunu oluşturur. Ancak, metaller polimerlerden ağ ırdır, pahalıdır ve polimerler gibi kolayca şek illendirilemezler. Korozyon, metaller için önemli bir baş ka sorundur. Metallerin elektriksel iletkenlik ve mekaniksel özelliklerini, polimerlerin özellikleriyle birleştirerek bir tek malzemede toplayabilmek daima ilgi çeken bir araştırma alanıdır. Bu amaçla yapılan ilk yaklaşımlar, polimerin uygun iletken maddelerle karışımlarının hazırlanmasına yöneliktir. Denenen yöntemlerden biri, polimerlere metal tozları gibi parçacıkların katılması ve iletkenliğ in polimer örgüsüne sokulan metal faz üzerinden sağ lanması olmuştur. Polimer içerisinde uygun bir toz çözüp iyonik iletkenlikten yararlanmak bir baş ka yaklaşımdır. Her iki yöntemde de polimer, iletkenliğ i sağ layan parçacıklar için bir bağ layıcı faz olarak işlev yapar ve kendisi elektrik iletimine katılmaz. Sözü edilen yöntemlerle polimerlere ancak belli düzeyde iletkenlik kazandırılabilmektedir [Saçak, 2004].

Yukarıda değ inilen iki yaklaşımda da polimerin kendisi yalıtkanlık özelliğ ini korur ve yalnız iletkenliğ i sağ layan diğ er bileş en için taşıyıcı faz işlevi yapar. Bir polimerin kendisinin doğ rudan elektriğ i elektronlar üzerinden iletebileceğ i, ilk defa poliasetilen üzerine yapılan çalışmalarla anlaşılmıştır. Poliasetilen, uzun yıllardır iletken olmadığ ı bilinen, normalde siyah toz halinde bir polimerdir. Ito ve arkadaşları, 1974 yılında Ziegler-Natta katalizörü kullanarak metalik görünteüde ancak yeterince iletken olmayan gümüş rengine poliasetilen filmler hazırlamıştır [Ito et al., 1974]. 1977 yılında Shirakawa ve arkadaşları sözü edilen poliasetilen filmlerin iyot, flor veya klor buharlarına tutularak yükseltgendiğ inde, iletkenliğ in 10^9 kat artıp 10^5 S/cm düzeyine ç ıktığ ını gözlemişlerdir. Bu değ er, yalıtkan karakterli teflonun iletkenliğ i olan 10^{-18} S/cm'den çok yüksektir ve gümüş, bakır gibi metallerin iletkenliğ i olan 10^6 S/cm düzeyine yakındır [Shirakawa et al., 1977]. Shirakawa ve arkadaşları bu çalışmalarından ötürü 2000 yılı Kimya Nobel Ödülü'nü almışlardır.

İletken polimer kavramı, kendi örgüsü içerisindeki elektronlarla yeterli düzeyde elektriksel iletkenliğ i sağ layan polimerler için kullanılmaktadır. Polimerin elektronik iletkenlik gösterebilmesi için, polimer örgüsünde, elektronların zincir boyunca taşınmasını sağ layan uygun yerlerin bulunması gerekir. Bu koşulu ana zincirinde

konjüğe çift bağlar bulunan polimerler sağlar (Şekil 2.12). Konjügasyon, yüksek düzeyde iletkenlik için tek başına yeterli değildir. Dop işlemiyle (polimere elektron verme ya da koparma) polimer yapısına iletkenliği sağlayacak olan elektronlar verilerek veya alınarak polimer örgüsünde artı yüklü boşluklar oluşturulur. İletken polimerlerde iletkenliğin nasıl sağlandığı çok basit bir yaklaşımla bu boşluklar üzerinden açıklanabilir. Artı yüklü bir boşluğa başka bir yerden atlayan elektron, geldiği yerde de artı yüklü boşluk oluşturacaktır. Bu işlemler ard arda zincir boyunca veya zincirler arasında yinelenerek elektrik iletimi sağlanacaktır [Saçak, 2004].



Şekil 2.12. Konjüğe çift bağ.

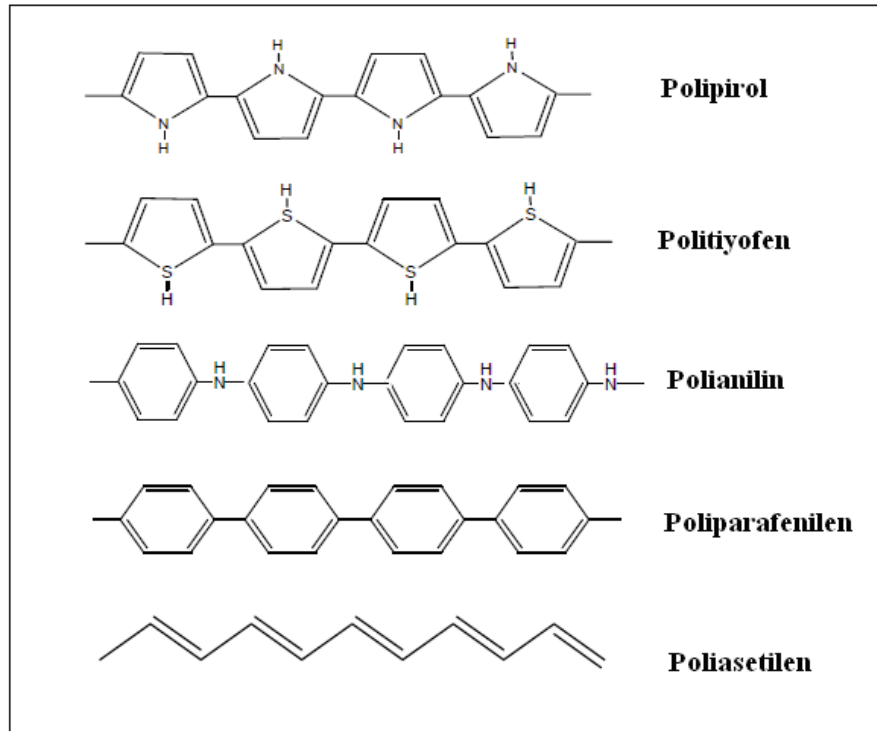
İletken polimerler kimyasal ve elektrokimyasal olmak üzere 2 yolla sentezlenmektedir. Elektrokimyasal sentezde polimerizasyonu başlatmak için elektroda belli bir potansiyel uygulanarak monomerin okside olması sağlanır. Uygulanacak potansiyel değerini monomerin özelliği belirler. Bazı organik monomerlerin yükseltgenme pik potansiyelleri Çizelge 2.3'de gösterilmektedir [Gurunathan et al., 1999]. Elektrokimyasal sentezde elektropolimerizasyon ortamında bir destek elektrolit bulunmalıdır. Destek elektrolit, elektriksel iletkenliği sağlayabilmek için kullanılmaktadır. Destek elektrolit, iyonlarından birini monomer ile bağlayarak polimeri doplar. Dopant anyonun türü kullanılan destek elektrolite bağlıdır. Elektropolimerizasyon süresince, kullanılan elektrolitin cinsi iletken polimerin elektrokimyasal özelliğini ve morfolojisini önemli ölçüde etkilemektedir [Tourillon and Garnier, 1982]. İletken polimerlerin elektropolimerizasyonu genellikle lityum içeren ya da ClO_4^- , BF_4^- iyonlarının tetraalkilamonyum tuzlarını içeren ortamlarda gerçekleştirilmektedir [Reynolds et al., 1989]. Elektropolimerizasyon potansiyostatik ya da galvanostatik metotlarla yapılabilir. Bu teknikler kantitatif olarak tanımlama yapmada ve çekirdek mekanizmalarını ve makroskopik büyümeyi incelemeye kullanışlıdır. Dönüşümlü voltametri gibi potansiyodinamik teknikler, elektrot yüzeyine tekrarlanan üçlü potansiyel dalgası uygulanarak yapılır ve daha çok polimerizasyon reaksiyonunun ilk basamaklarındaki

redoks prosesi hakkında kalitatif bilgi almak için ve polimerin elektrokimyasal olarak biriktirilmesinden sonraki elektrokimyasal davranışını kontrol etmek için kullanılır.

Çizelge 2.3. Bazı organik monomerlerin yükseltgenme potansiyelleri.

| <i>Monomer</i> | <i>Yükseltgenme potansiyeli (V)</i> <i>(Doymun Kalomel elektroda karşı)</i> |
|----------------|--|
| Pirol | +1,20 |
| Bipirol | +0,55 |
| Terpirol | +0,26 |
| Tiyofen | +2,07 |
| Bitiyofen | +1,31 |
| Tertiyofen | +1,05 |
| Azulen | +0,91 |
| Piren | +1,30 |
| Karbazol | +1,82 |
| Anilin | +0,71 |

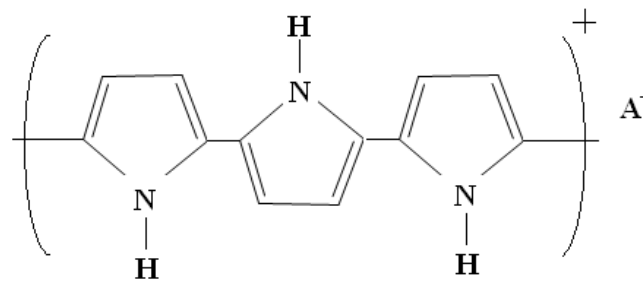
Biyosensörlerde, biyomoleküllerin elektrot yüzeyine immobilize edilmeleri, iletken polimerlerin immobilizasyon matrisi olarak kullanılmasıyla gerçekleşmektedir. Biyomolekül ve elektrot arasında bağlantı sağlayan ve destek görevi gören bu polimerlerin elektriksel iletkenliklerinin iyi olması, elektrot yüzeyindeki elektron transfer mekanizması bakımından oldukça önemlidir. Günümüzde polipirol, polianilin, politiyofen, polifuran, poli(*N*-vinilkarbazol) gibi çok sayıda polimerin iletken olduğu bilinmekte; bazılarının toz, süspansiyon, film veya levhalar halinde ticari üretimi yapılmaktadır. Bazı iletken polimerlerin yapıları Şekil 2.13'de verilmiştir. Ana bileşeni polipirol olan lifler, polipirol ve polianilin kaplı karbon tozları, polipirol kaplı lifler diğer ticari ürünlere örneklerdir. Yukarıda sözü edilen iletken polimerler amperometrik biyosensörlerde enzim immobilizasyon matrisi olarak oldukça sık kullanılmaktadır. Yarı iletken çipler, entegre devreler, hafif pil bileşenleri, sensörler, antistatik kaplama, antistatik ambalaj ve paketlenme, transistör, diod, düz televizyon ekranı ve güneş ışığı paneli yapımları da iletken polimerlerin kullanıldığı alanlar arasındadır.



Şekil 2.13. Bazı iletken polimerlerin kimyasal yapıları.

Polipirol 20 yıldan fazla süredir iletken polimerler içerisinde en çok çalışılmıştır. Pirol ilk kez 1916'da H_2O_2 ile yükseltgenerek, pirol siyahı olarak bilinen amorf bir toz olarak polimerleştirilmiştir [Angeli, 1916]. Polipirol, elektrokimyasal olarak ince film halinde sentezlendiğinde bu konuya olan ilgi daha da artmıştır. Polipirol siyahı platin elektrot üzerinde sülfirik asitli ortamda elektrokimyasal olarak ilk kez Dall'Ollio ve arkadaşları tarafından sentezlenmiştir [Dall'Ollio et al., 1968]. 1979 yılında elektrokimyasal teknikler, yüksek iletkenlik özelliği gösteren polipirol sentezlemek için oldukça kullanışlı metotlar haline gelmiştir [Diaz et al., 1979]. Polipirol sentezinde kullanılan kimyasal ve elektrokimyasal yöntemler bu materyalin fiziksel ve kimyasal özelliklerini iyileştirmek için geliştirilmeye çalışılmaktadır. Kimyasal yöntemde, örneğin Fe^{+3} gibi bir yükseltgen kullanılırsa toz halinde polipirol elde edilir. Erimez ve çözünmez olduğu için bu yolla elde edilen toz polipirolün işlenmesi söz konusu değildir, presleme gibi yöntemlerle ancak belli şekillere sokulabilir. Polipirol filmler, biyosensör uygulamalarında yaygın olarak pirolün elektrokimyasal polimerizasyonu ile hazırlanır. Bu amaçla farklı elektrot tipleri yüzeyinde, farklı boyutlarda ve kalınlıklarda polipirol filmler elde edilir. Polipirol filmlerin mekanik

özellikleri diğer iletken polimerlerden iyidir, atmosfer koşullarında daha kararlıdır. Laboratuvar koşullarında polipirol filmler, basit bir elektroliz hücresi ve farklı tipte elektrotlarla, destek elektrolit içeren uygun polimerizasyon ortamlarında yaklaşık +1 V'luk potansiyel altında oluşturulurlar. İletken karakterinden dolayı elektrot yüzeyinde oluşan polipirol film, pirolün ileri polimerizasyonunu engellemez, elektroliz zamanı değiştirilerek film kalınlığını kontrol etmek mümkündür. Pirol, yukarıda verilen sentez koşullarında yükseltgenerek anotta radikal katyon verir. Radikal katyonlar birleşerek önce dimerlere sonra da Şekil 2.14'de gösterildiği gibi her üç pirol monomerine karşı bir dopant anyonunun bulunduğu iletken polipirole dönüşürler. Polipirolün yükseltgenme-indirgenme reaksiyonu esnasında filmde renk değişimi (elektrokromik özellik) gözlenmektedir. Polimer indirgenmiş durumda açık kahverengi/sarı renkte iken, yükseltgenmiş konumda siyah kadifemsi bir görünüme sahip olmaktadır. Genel olarak polipirolün elektriksel iletkenliği 100 S/cm düzeyindedir ve değişik formlarda ticari polipirol üretimi yapılmaktadır [Saçak, 2004]. Biyosensör uygulamalarında pirolün elektropolimerizasyonu daha çok, pH değerlerini ılımlı şartlarda tutabilmek için sulu ortamda gerçekleştirilir. Bu şartlarda enzimler elektrot üzerinde şekillenen polimerin büyüyen filmi içinde tutuklanmaktadır. Farklı şekilde, elektrot yüzeyinde polipirol sentezlendikten sonra yüzey modifiye edilerek polimer üzerinde fonksiyonel gruplar oluşturulabilmekte ve enzimler bu fonksiyonel gruplar üzerinden dışarıdan elektroda kimyasal olarak bağlanabilmektedir.



Şekil 2.14. Dop edilmiş polipirol.

İletken polimerler biyosensörlerde genellikle kompozit ya da kopolimer şeklinde kullanılırlar. İletken polimerler oldukça yüksek bir iletkenliğe sahip oldukları halde, mekanik ve işlenebilme özellikleri bakımından pek uygun değildir. Bu kusurlarını iyileştirmek veya tümünden yok etmek için, iletken

polimerlerle kompozitler hazırlanmaktadır. Kompozit hazırlanırken iletken bir polimer filmi diğer bir iletken veya yalıtkan polimer üzerine kaplanmaktadır. Ancak bu iki polimer tabakası üst üste değişik şekillerde yerleşebilmektedir. Bunlardan birincisinde yüzeyler arasında herhangi bir kimyasal bağ yoktur. Bu tür yerleşmeye “bilayer” veya “ikili tabaka” denir. İkincisinde polimer tabakaları arasında kimyasal bağlanma olur. Bu türe de “blok kopolimer” denir. Üçüncü halde ise iç tabaka içine dış tabaka difüzlenererek kompozit oluşturulmaktadır [Eyrik, 2007]. İki ayrı maddenin fiziksel karışımında yapılan ürünler bazı durumlarda, kendini oluşturan maddelerin saf hallerinden daha iyi özellikler taşıyabilmektedir. Örneğin; tunç gibi metal alaşımları, alaşımı oluşturan saf metallere göre üstün mekaniksel özelliklere sahiptirler. Ancak, metallerde başarıyla uygulanan bu yöntem polimerlerde çoğu kez olumlu sonuç vermemektedir. Polimerler genelde birbirleriyle uyumlu değildirler ve fiziksel karışımlarında ayrı fazlar halinde bulunmaya eğilimlidirler. Buna karşın, uyumlu olmayan iki polimerin monomerlerinin bir polimer zincirinde birlikte bulunması polimerin bazı özelliklerini geliştirebilmekte veya polimere yeni özellik katabilmektedir [Saçak, 2004]. Yeni oluşan bu yapıya “kopolimer” denir. Kopolimerlerin fiziksel özellikleri homopolimerlerden farklıdır ve bu farkın ölçüsü kopolimerin bileşimine bağlıdır. Genelde rastgele ve alternatif kopolimerler kendilerini oluşturan homopolimerlerin özellikleri arasında özelliklere sahiplerken, blok ve graft kopolimerler homopolimerlerinin her ikisinin özelliklerini de gösterirler. Çünkü onların segmentleri polimer zincir boyunca düzensiz olarak yerleşmiş olup kopolimerler düzenli bir şekle sahip değildir. Bu nedenle de; pekçok kopolimer amorfudur. Kopolimerlerin homo polimerlerden farklı özellikte olmaları, üzerinde enzim bağlayıcı grupların olabilmesi ve aynı zamanda iletkenlik özelliği sağlamalarından dolayı farklı polimerlerle sentezlenmiş kopolimerler biyosensörlerde son yıllarda oldukça sık kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan bir tanesi bu tez çalışmasında kullanılan yeni sentezlenmiş Poli(glisidil metakrilat-co-3-tiyenilmetil metakrilat) (Poli(GMA-co-MTM)) polimeridir. Bu polimer, glisidilmetakrilat ve 3-tiyenilmetil metakrilat monomerlerinin kopolimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Polimerin yapısında bulunan 3-tiyenilmetil metakrilat (MTM), yan gruplarında elektroaktif tiyofen gruplarını içermektedir. Politiyofen, geri dönüşümlü redoks kontrolü, non-lineer optik özelliği, doplanmış ve doplanmamış durumlarında çevresel kararlılığı ve elektriksel özelliğinden dolayı birçok iletken polimer arasında özel bir yere sahiptir. Tiyofenin iyi bir esnekliğe sahip olması bir çok polimerizasyon

metotlarında kullanılmasına ve bir çok yan zincir reaksiyonuna katılabilmesine olanak sağlamaktadır [Yılmaz et al, 2005]. Ayrıca, polimer yapısında bulunan tiyofen üzerinden bu polimer başka bir iletken polimer ile birlikte elektropolimerize edilebilmekte, bu sayede elektriksel iletkenlik kazanmakta ve çalışma elektrotlarında kullanıma uygun yeni kompozit polimer malzemeler oluşturulabilmektedir. Poly(GMA-co-MTM)'nin yapısındaki glisidil metakrilat (GMA) epoksi grubu taşımakta ve enzimler bu gruplar üzerinden polimere direkt olarak kimyasal bağlanabilmektedir.

2.3.3. Amperometrik Biyosensörlerde Nanopartiküllerin Kullanımı

Nanoteknoloji ölçü olarak “nanometre” adı verilen (kısa şekli nm) bir ölçme birimini kullanmaktadır. “Nano” sözcük olarak, bir fiziksel büyüklüğün bir milyarda biri anlamına gelir. Bir nanometreyse, metrenin bir milyarda birine eşit bir uzunluk birimidir. İnsan saç teli çapının yaklaşık 100,000 nanometre olduğu düşünülürse ne kadar küçük bir ölçekten bahsedildiği daha rahat anlaşılır. Bir başka deyişle, bir nanometre içine yan yana ancak 2-3 atom dizilebilir; yaklaşık 100-1000 atom biraraya gelerek nano ölçeklerde bir materyali oluşturur [<http://www.nanoteknoloji.net.tc/>].

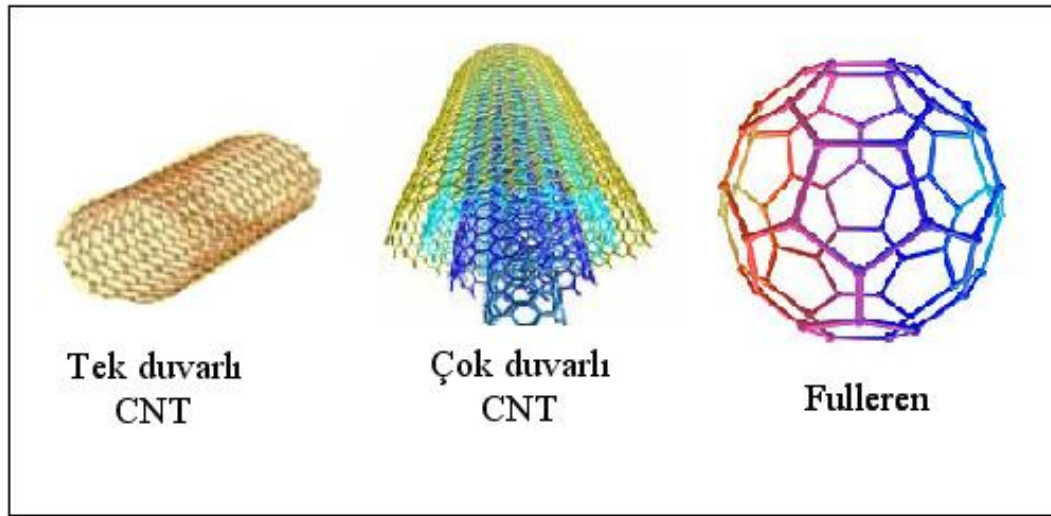
Nano partiküller, ince filmler ve nanotüpler olarak elde edilen malzemeler, gösterdikleri çok ilginç fiziksel özellikler ve çok küçük boyutları nedeniyle teknolojide önemli bir kullanım alanına sahiptir. Nanoteknolojinin hayatımızda kullanımının artmasıyla birlikte nanomalzemeler üzerine çalışmalar artmıştır. Nanometre boyutundaki farklı nanopartiküllerin kontrol edilebilir elektronik ve katalitik özellikleri bu partiküllerin elektrot fabrikasyonunda ve modifikasyonunda kullanılabilmesine olanak sağlamıştır. Çok tabakalı iletken nanopartiküllerle (Altın gibi metalik nanopartiküller) modifiye edilen elektrotlar gözenekli ve yüzey alanı geniş yapıya kavuşurlar. Ayrıca metalik nanopartiküller analitiksel öneme sahip bazı elektrokimyasal tepkimelerin aşırı potansiyelini düşürerek metalik elektrotlarda tersinmez olan redoks tepkimelerine de tersinirlik sağlamaktadır [<http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bdergi/yeniufuk/icerik/ekDokuMuhNano.pdf>].

Nanoteknolojinin hayatımıza girmesiyle birlikte çeşitli alanlarda kompozitler gibi daha hafif ve daha kullanışlı malzemeler geliştirilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca veri iletimi için bakır kablolar, altın çipler kullanılırken, nanoteknolojiye geçişle birlikte daha hafif, daha hızlı iletim ve daha az enerji sağlayan malzemeler üretilmeye başlanmıştır. İşte nanoteknolojinin en önemli konularından ve malzemelerinden biri karbon nanotüptür (CNT). CNT, grafitin bal peteğini andıran atom düzleminin bir silindir üzerine hiçbir kusur oluşturmadan kesiksiz olarak sarılmış bir şekli olarak düşünülebilir [<http://www.itab.anadolu.edu.tr/itab/pdf/nylp.pdf>]. CNT' ler ilk olarak tek boyutlu kuantum teller için prototip olarak düşünüldüğünden çok büyük bir ilgi çekmiştir. Diğer kullanışlı özelliklerin keşfedilmesiyle (özellikle dayanıklılığı) potansiyel kullanım alanları artmıştır. Örneğin, CNT' ler nanometrik boyutlardaki elektronik devrelerde ya da kuvvetlendirilmiş polimer malzemelerde kullanılabilir [<http://physicsworld.com/cws/article/print/1761>].

CNT' lerin bilimsel macerası, 60 ya da daha fazla karbon atomunun birleştirilmesiyle oluşan futbol topu şeklindeki moleküllerin keşfiyle başlamıştır. Bu topların diğer atom veya moleküllerle yaptığı bileşiklere “fulleren” denir (Şekil 2.15). Bu keşiften sonra birçok laboratuvar sıcak karbon buharını yoğunlaştırarak futbol topu şeklindeki molekülleri elde etmeye çalışmış; bu elde etme işleminden küçük değişikliklerle çeşitli şekil ve boyutlarda küreye benzer yapılar elde edilmiştir. İlk tüp şeklindeki molekülleri 1991’de elektron mikroskobu uzmanı Sumia Iijima, fullerenlerin ark buharlaşması sentezi sırasında katotta biriken malzemeyi araştırma sırasında bulmuştur [Çubukçu, 2008]. CNT’ler, 1990’lı yılların başındaki keşiflerinden sonra olağanüstü özelliklerinin farkedilmesi ile yoğun biçimde araştırılmaya başlanmış ve ilerleyen zamanda bu ilgi, söz konusu malzemenin özellikle nanobilim olmak üzere bir çok farklı sahada bir fenomene dönüşmesine yol açmıştır. Hem uygulamalı hem de kuramsal birçok çalışmada karbon nanotüpler, nanoteknoloji için bir model sistem olmuştur. Kaydedilen ilerlemeler o denli çarpıcıdır ki, mevcut alanda, malzemenin bir özelliğinin keşfi, bu özellikten yola çıkan bir uygulamanın geliştirilmesi ve son olarak da uygulamanın ticari ürüne dönüşmesi birkaç yıllık süreler zarfında mümkün olabilmektedir. Şu an, konu üzerinde çalışmalarını sürdüren dünya çapındaki sayısız araştırma grubunun yanında birçok

dev şirket karbon nanotüp esaslı ürünleri piyasaya sürmek için yarışmaktadır [Mutluay, 2007].

CNT' ler, tek duvarlı karbon nanotüpler (SWCNT) ve çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT) olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır (Şekil 2.15). SWCNT' ler tüp çapı 1-2 nm' den oluşan kusursuz bir şekilde sarılmış tek bir grafit tabakadan meydana gelmektedir [Moore et al., 2004]. Son zamanlarda, elektrokimyada elektrot materyali olarak SWCNT kullanımı büyük ilgi uyandırmıştır. SWCNT' ler olağanüstü mekaniksel, kimyasal ve elektronik özellikler göstermektedirler. SWCNT' nin kütle taşınım mekanizması yarıçapa, sarmal yapıya ve çözeltildeki elektroaktif türler ile elektron transfer reaksiyonuna aracılık etme yeteneğine bağlı olarak, yarı iletken türden metalik türe doğru değişmektedir [Valentini et al., 2004]. MWCNT' ler çapları 2' den 50 nm' ye değişen, tabakalar arası uzaklığı 0.34 nm olan eş merkezli ve kapalı borucuklardan oluşmaktadır [Moore et al., 2004].



Şekil 2.15. Karbon nanotüp çeşitleri.

CNT' ler, geometrilerine bağlı olarak yarı-iletken ve metalik özellik gösterirler. Hiçbir katkı maddesi olmaksızın, nanotüpün, geometrik parametrelerinin değiştirilmesiyle, elektronik özellikleri de değiştirilebilir. Tüplerin elektronik uygulamalarda, önemli bir yeri vardır. CNT' ler bilinen en sağlam ve esnek malzeme olma özelliğine sahiptirler. Dayanıklılık, esneklik gibi fiziksel ve kimyasal özellikleri yanında, dış veya iç cidarlarının, atom veya molekülleri soğuracak özellikler taşıması, CNT' leri daha kullanışlı hale getirmektedir [Çubukçu, 2008]. CNT' ler

oldukça önemli elektronik özelliklere sahiptir. CNT' lerle yapılan iletimde, polifenilen esaslı zincirlerden 10 ila 100 kat daha fazla akım iletimi sağlanmaktadır. CNT'lerin ısı iletkenlikleri, en iyi ısı iletken olan elmasın 2 katıdır ve bakır telden 1000 kat daha fazla elektrik taşıyabilir. CNT'lerin küçük çaplarından dolayı kuantum mekanik etkileri elektronik yapılarını belirler. Bunun anlamı kuantizasyon şartlarının nanotüp çevresi boyunca nanotüpün metal ya da yarı iletken olarak davranıp davranmadığını belirler. CNT'lerin en önemli uygulamalarından birini gösteren bu özelliklerinin gelecek nanoelektroniklerinin temeli olduğu düşünülmektedir [Merkoçi et al., 2005]. CNT'lerin benzersiz özellikleri, kimyasal sensör görevi için özellikle de elektrokimyasal tayinde CNT'leri son derece önemli kılmaktadır. Son çalışmalar göstermektedir ki CNT güçlü bir elektrokatalitik aktivite göstermekte ve elektrokimyasal cihaz üzerindeki yüzey bozulmasının azalmasına yardımcı olmaktadır [Wang and Musameh, 2003].

Önümüzdeki on yıllık dönemler içinde silisyum esaslı geleneksel transistör teknolojisinin sınırlarına ulaşılacağı tahmin edilmektedir. Bu bakımdan çalışmalar yeni sistem arayışlarına yönelmiştir. Alan etkili transistörler en etkin transistör türü olarak kendini kanıtlamıştır. CNT esaslı alan etkili transistörler geleneksel silisyumlu aygıtların en başarılıları ile aynı, hatta daha iyi işletme özellikleri göstermiştir. Gelecekte transistörlerin "moleküler elektronik" kavramını temel alarak yapılandırılacağı düşünülmektedir ki CNT'ler en çok umut vaat eden moleküler elektroniklerden biridir [Avouris, 2002].

Daha önce anlatıldığı üzere nanotüplerin elektriksel özellikleri, kompozit uygulamalarında da büyük önem arz eder. Polimerler gibi yalıtkan malzemelerin elektriksel özelliklerini geliştirmek için çeşitli katkı malzemeleri kullanılır. Bu amaçla kullanılan önemli bir malzeme olan karbon siyahında, %16'lık takviye oranı ile polimerin katkılanmasıyla polimerde iletkenlik sağlanır. MWCNT-epoksi kompozitlerde ise bu oran %0,01-0,004 aralığındadır [Robertson, 2004]. CNT'ler yüksek uzunluk/çap oranları sayesinde, çok küçük miktarlarda bile kullanıldıklarında birbirleri ile bağlantılı bir şebeke oluşturarak matriks malzemeyi iletken hale geçirmektedir [Ajayan and Tour, 2007]. CNT'lerin hava taşıtlarının kanat ve gövde parçalarının antistatik kalkanlanmasında kullanılabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte nanotüp esaslı iletken kompozitler için asıl önemli pazar, saydam iletken

kaplamalardır. Yaklaşık 40 yıldır bu maksatla indiyum kalay oksit kullanılsa da bu malzeme kırılıgandır ve özellikle büyük çaplı üretimlerde maliyetler inanılmaz derecede yükselebilmektedir [Glatkowski et al., 2005], ayrıca plastıklere yapışma yeteneği de düşüktür [Robertson, 2004]. Buna karşın nanotüplü saydam iletkenler, indiyum kalay oksit esaslılara benzer çalışma başarısına sahipken onlardan çok daha esnek ve dayanıklı olup, basit süreçler ve düşük maliyetlerle üretilebilirler [Glatkowski et al., 2005]. Üstelik CNT'lerin polimerle yapışma uyumluluğu çok iyidir [Robertson, 2004].

Elektron transfer reaksiyonunu arttırmak için CNT'lerin yeteneği elektronik yapılarına ve yüksek elektriksel iletkenliklerine dayandırılmaktadır [Musameh et al, 2002]. Karbon pastası ve kompozit elektrotlar birkaç yıldan beri elektrokimyasal sensörlerde kullanılmaktadır. CNT içeren benzer matriksler elektrokimyasal sensör alanında araştırmaların odak noktası olmuştur. Polimer matriks içindeki CNT'ler ya rastgele ya da dikey olarak dağılabilmektedirler. Literatürlerde CNT pastaları ya da kompozitleri üretmek için bağlayıcıların çeşitliliğinden (mineral yağ, teflon ya da epoksi reçine) bahsedilmiştir. Bunlardan katı epoksi bazlı CNT kompozitler en az kullanılandır. Yayımlanan makalelerin büyük çoğunluğu CNT'lerin düşük potansiyellerde elektron transfer reaksiyonlarını artırdığını göstermiştir. Bu avantaj, son yıllarda araştırmacıların CNT ile hazırlanmış enzim elektrotlarının geliştirilmesi üzerine yoğun çalışmalar yapmasına neden olmuştur. Belki de bugüne kadar bulunan CNT-enzim tabanlı biyosensörlerin en ilginç özelliği gelişmiş çalışma kararlılığıdır [Merkoçi et al, 2005]. CNT, biyosensörlerde farklı iletken polimerlerle beraber kullanılarak çalışma elektrodu üzerinde değişik kompozit polimer yapıları oluşturulmuştur. Örneğin; Poli(amidoamin)/MWCNT kompozit polimerinin bir camısı karbon yüzeyinde sentezlenerek hazırlandığı çalışma elektroduna *glucose oxidase* ve *horseradish peroxidase* enzimi bağlanarak hem glikoz hem de hidrokinon tayini [Zeng et al., 2007], kitosan/SWCNT polimerinin yine bir camısı karbon yüzeyinde sentezlenerek hazırlandığı çalışma elektrodu ile sürekli sistemde galaktoz tayini [Tkac et al., 2007], nafyon/MWCNT polimerinin camısı karbon yüzeyinde sentezlenerek hazırlandığı çalışma elektrodu ile kesikli sistemde fenol ve 4 türevinin tayini gerçekleştirilmiştir [Tsai and Cheng-Chiu, 2007]. Örnekler bununla sınırlı değildir ve yapılan çalışmaların çoğunda CNT'nin çalışma elektrodu üzerine olumlu

etkisi vurgulanmış, söz konusu analiz için hesaplanan analitik parametrelerde iyileşme sağladığı belirtilmiştir.

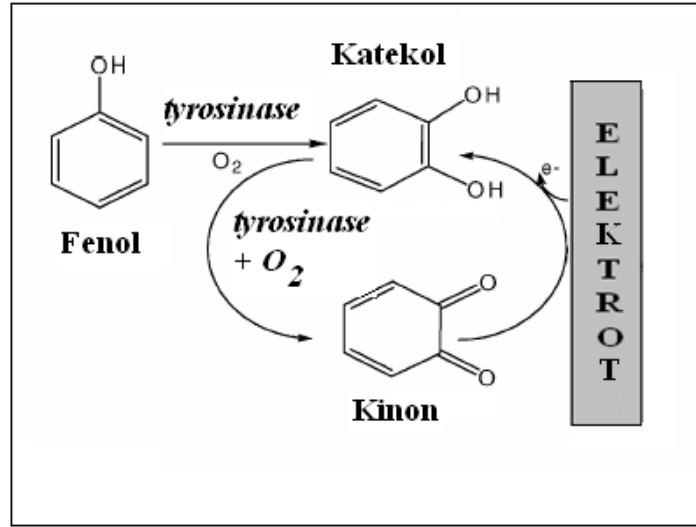
2.4. Amperometrik Fenol Biyosensörleri

Fenol ve türevleri için geliştirilmiş amperometrik biyosensör uygulamalarında en fazla kullanılan enzimler polifenoloksidaz sınıfı enzimlerdir. Ölçümler biyosensör yaklaşımı çerçevesinde sürekli akışlı kesikli yüklemeli sistemlerde enjeksiyonla yapılabildiği gibi klasik bir üçlü elektrot sisteminin (çalışma elektrodu, karşıt elektrot ve referans elektrodu) yer aldığı elektroliz kabı kullanılarak da gerçekleştirilebilmektedir. Enzimler elektrot üzerine çeşitli iletken matriksler kullanılarak tutuklanmakta veya fiziksel yöntemle hazırlanmış kompozitler içerisine yerleştirilmektedir. Enzimle hazırlanan bu elektrot çalışma elektrodudur ve biyosensörün katalitik kısmını oluşturmaktadır. Bu çalışma elektrodunu içeren üçlü elektrot sistemi kullanılarak sabit bir elektriksel potansiyel altında fenol bileşiklerinin artan konsantrasyonlarda ortama eklenmesi sonucu redoks tepkimesinde meydana gelen elektron transferi, bir elektriksel sinyale dönüştürülerek akım şeklinde okunmaktadır. Burada sisteme uygulanacak olan potansiyel değeri, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan ürünlerin elektrot üzerinde indirgenebilmesi için gerekli olan potansiyel değeridir. Enzimin tutturulduğu çalışma elektrodu yapımında çeşitli karbon allotropları, iletken polimerler, silika jel, çeşitli manyetik nanopartiküler maddeler vb. kullanılabilir. Sözü edilen her bir materyale ilişkin literatürde pek çok çalışma bulunmasına karşın, özellikle iletken polimerler ve karbon allotropları ile yapılan çalışmalarda fenol için en iyi sonuçlar elde edilmiştir. İletken polimerlerin kendi elektroaktiflik özelliklerine ve enzimle kurdukları ilişkiye bağlı olarak fenollerin ölçebilme kapasitesi önemli değişiklikler göstermiştir. Amperometrik fenol biyosensörlerinde yaygın olarak kullanılan 3 enzim *tyrosinase*, *laccase* ve *horseradish peroxidase* enzimleridir. Bunlardan *laccase* ve *tyrosinase*, fenol ve türevleri ile reaksiyona girmek için moleküler oksijeni, *horseradish peroxidase* enzimi ise hidrojen peroksiti kullanmaktadır. Her üç enzim de literatürde çeşitli tip ve özellikle elektrotlarla fenol ölçümünde biyosensör yapımı için kullanılmıştır. Gerek her bir enzimin, gerekse kullanılan çalışma elektrodu tiplerinin birbirlerine göre çeşitli üstünlükleri bulunmakta ve farklı fenol türevlerine karşı farklı tepkiler

vermektedir. Amperometrik ölçüm yöntemi, bileşiğin oksitlenmesiyle analitik olarak ölçülebilir bir sinyal üretmekte ve genellikle negatif potansiyelde gerçekleştirilmektedir. Numune içerisinde oksitlenebilen başka maddelerin varlığı yöntemin seçicilik özelliğini zayıflatabilmektedir. *Tyrosinase*, *laccase* ve *horseradish peroxidase* enzimleri kullanılarak hazırlanan biyosensörler, fenolü enzim vasıtasıyla kinona dönüştürmektedir. Söz konusu reaksiyonda negatif potansiyelde indirgenecek olan bu ürün için, reaksiyon sonunda ölçülebilir bir sinyal üretilmekte böylece numunelerde daha sonra oksidasyona uğrayarak girişim yapabilecek pek çok maddenin etkisini ortadan kaldıracaktır.

Tyrosinase enzimi, bitki ve hayvansal dokularda yaygın olarak bulunan oksidoreduktaz sınıfı (redoks reaksiyonlarını katalizleyen) bir enzimdir. Bulunduğu dokuda ana substratı olan tirocini okside ederek dokuya koyu renk veren kahverengi ve siyah melanin pigmentlerin üretimini sağlamaktadır. Aktif merkezi prostetik grup (demir ya da bakır ihtiva eden grup) içermektedir. *Tyrosinase* enziminin aktif merkezinde her biri üç histidin aminoasidi grubuna bağlanmış iki bakır atomu bulunmaktadır ve bu bakır atomları iki tane oksijen atomuyla etkileşim halindedir. Prostetik grubunda bulunan bakır sayesinde enzim, redoks tepkimelerine rahatlıkla girebilmektedir. Enzimin ana substratı tirocin, fenolik yapıda bir madde olduğundan fenol ve bazı türevleri de bu enzimin spesifik substratlarıdır. Enzim genel olarak, moleküler oksijeni farklı elektron vericilerle (fenoller) indirger. *Tyrosinase* nötr tampon ve oda sıcaklığında oldukça kararlı, 5'ten küçük, 8'den büyük pH değerlerinde ve yüksek sıcaklıkta kararsızdır. *Tyrosinase* enzimi fenol dönüşümünü, pH 7'de etkin bir şekilde katalizler [Ikehata, 2000]. Amperometrik fenol biyosensörlerinde biyomolekül olarak *Tyrosinase* enzimi kullanıldığında, elektrot üzerinde gerçekleşen reaksiyon mekanizması fenollerin ardışık iki tepkimeyle katalizlenmesi sonucu şu şekilde açıklanabilir: ilk basamakta monofenollerin moleküler oksijen varlığında enzimatik reaksiyon sonucu *o*-difenollere (katekol) dönüşümü sağlanır. İkinci basamakta ise, oluşan difenoller de aynı enzimatik reaksiyon üzerinden *o*-kinonlara dönüştürülür. Bu arada moleküler oksijen direkt olarak suya dönüşür. Ardışık tepkimelerin son ürünü olan kinonlar uygun potansiyel değerinde elektrot yüzeyinden elektron alarak indirgenir ve tekrar katekole dönüşür (Şekil 2.16). Bu sırada elektrottan geçen elektron miktarı ortamdaki fenol

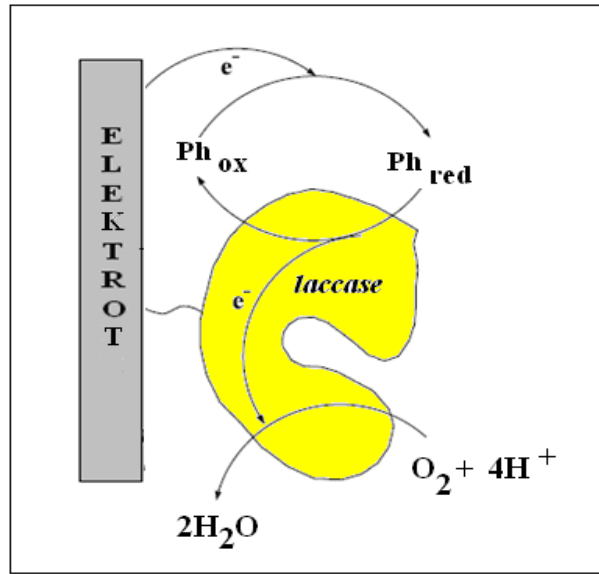
konsantrasyonuyla orantılı olarak değişim göstermekte ve bu elektron akışı cihaz tarafından akım sinyallerine çevirilmektedir.



Şekil 2.16. Çalışma elektrodu üzerinde *tyrosinase* enzimi ile fenol arasındaki etkileşim.

Laccase enzimleri bakteriler ve böceklerden de izole edilmesine rağmen, bitki ve fungal kaynaklı enzimler olmak üzere 2 ana kategoriye ayrılabilir. Bu enzimler daha çok, beyaz çürükçül funguslar tarafından yüksek miktarda sentezlenebilmektedir [Kuru, 2007]. *Laccase* enzimi, yapısında birden fazla bakır atomu bulunan oksidoreduktaz sınıfı bir enzim olup, birçok organik maddenin oksidasyon reaksiyonunu katalizler. *Laccase* enziminin bu organik maddelerden monofenol, difenol, polifenol, aminofenoller ve aromatik daiminler arasında seçicilik göstermediği bilinmektedir. Enzimin fenol türevlerine karşı gösterdiği yüksek derecede spesifik olmayan oksidasyon kapasitesi, toplam fenol ölçümlerinin yapıldığı biyosensörlerde sıkça kullanılmasını sağlamıştır. Substratlarının enzimdeki bağlanma bölgelerine hidrofobik etkileşimler sonucu bağlandığı bilinmektedir. Bu enzimle oksijenin 4 elektron transferi üzerinden direkt olarak suya indirgenmesi, enzimin biyoyakıt hücrelerin katot bölümünde kullanılmasını cazip hale getirmiştir [Quan et al., 2004]. *Laccase* enzimi, amperometrik fenol biyosensörlerinde ilk basamakta elektrot yüzeyinde oksijenle yükseltgenir, daha sonra elektron vericisi olan fenolik bileşiklerle indirgenir. Bu reaksiyonda fenolik bileşikler kinonlara ya da fenoksi radikallerine dönüşür. Oluşan bu fenolik ürünler elektrot üzerinden elektron olarak indirgenir (referans elektrot olarak doygun kalomel elektrot kullanıldığında

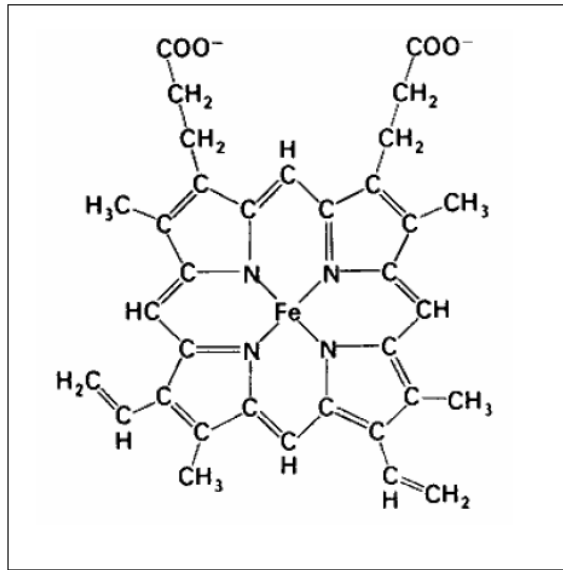
genellikle 0'dan küçük potansiyel değerlerinde) (Şekil 2.17). Ortaya çıkan bu indirgenme akımı fenol konsantrasyonuyla orantılı gelişim gösterir [Wilkolazka et al., 2005].



Şekil 2.17. Çalışma elektrodu üzerinde *laccase* enzimi ile fenol arasındaki etkileşim.

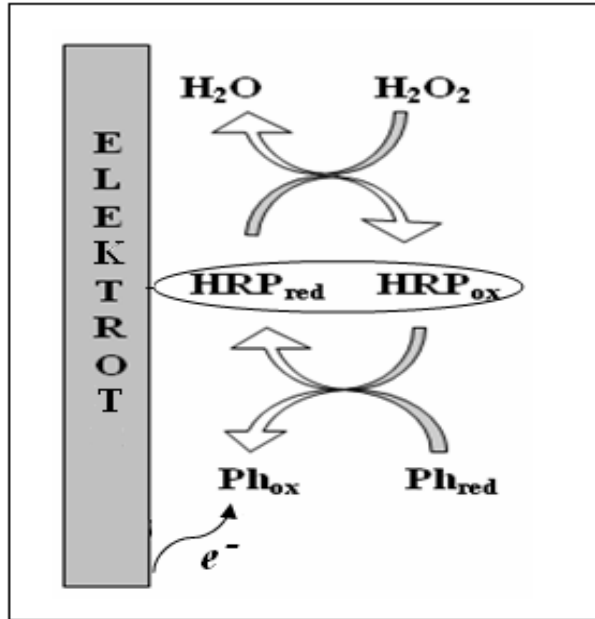
Peroxidase, bitkisel kaynaklardan ve mikroorganizmalardan üretilen, peroksit varlığında reaksiyonları katalizleyen hemoproteindir. Hemoprotein, aktif bölgesinde demir bulunduran enzimdir (Şekil 2.18). Fenoller (*p*-kresol, guaiakal, pirogallol, katekol, vb.) ve aromatik aminler (anilin, *p*-tolidin, *o*-fenildiamin, *o*-dianisidin) *peroxidase* enzimlerinin tipik substratlarıdır. Bu enzimler, H₂O₂ ya da hidroperoksitler tarafından radikaller oluşturmak için okside edilirler. Oluşan bu radikaller, enzimin aktif bölgesinden ortama difüze olduktan sonra dimerik, oligomerik ve polimerik ürünler oluştururlar. *Horseradish peroxidase* enziminin substratlarını okside ettiği pH aralığı 4-10 gibi geniş bir aralıktır. Gerek yapısı itibari ile gerekse reaksiyonlar sonucu oluşan ürünlerin inhibe edici özellikte olmasından dolayı deneysel çalışmalarda güçlükle kullanılabilen hassas bir enzimdir. Bu sebeple, bilim adamları enzimin kararlılığını ve en az zarara uğramasını sağlama amaçlı çalışmalara yönelmişlerdir. Bu amaçla, farklı immobilizasyon teknikleri, enzim modifikasyonları ve reaksiyon ortamlarına eklenebilecek katkı maddeleri üzerine çalışmalar hız kazanmıştır [Nozaki and Kawamoto, 2003]. Buna rağmen, enzimin aktif merkezi dış yüzeye oldukça yakındır ve bu durum enzim üzerinden gerçekleşen redoks reaksiyonlarını kolaylaştırdığından ve fenollerle oldukça hızlı reaksiyon

verebildiğinden *horseradish peroxidase* enziminin amperometrik fenol biyosensörlerinde kullanılmasını avantajlı hale getirmektedir.



Şekil 2.18. *Horseradish peroxidase* enziminin aktif merkezindeki prostetik grup (ferrik protoporfirin IX).

Horseradish peroxidase enziminin fenolle reaksiyon verebilmesi enzimin hidrojen peroksit ile yükseltgenmesi sonucu gerçekleşmektedir. Öncelikle enzim hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek oksitlenirken, hidrojen peroksit de suya indirgenir. Oksitlenmiş olan enzim fenol oksidasyonunu katalizleyerek fenoksi radikallerini oluşturur, bu esnada enzim indirgenerek ilk (native) haline dönüşür. Elektronunu kaybetmiş olan fenol, kaybettiği elektronu elektrottan sağlayarak tekrar indirgenir. Elektrot yüzeyinde gerçekleşen bu mekanizma Şekil 2.19'da gösterilmiştir. Yukarıda açıklanan reaksiyonlar hidrojen peroksit ortamda buldukça devam eder. Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan fenoksi radikallerinin elektrot yüzeyinde indirgenmesi, biyosensörde akım değişimleri olarak gözlenir. Bu akım değişimleri ortama ilave edilen fenolün konsantrasyonuyla orantılı olarak gelişim gösterir.



Şekil 2.19. Çalışma elektrodu üzerinde *horseradish peroxidase* enzimi ile fenol arasındaki etkileşim.

Enzim tabanlı amperometrik fenol biyosensörleri üzerine yapılmış çalışmalar aşağıda özetlenmiştir;

Stanca ve Popescu, pilatin bir elektrot yüzeyinde elektropolimerize edilmiş Poli(amfifilik pirol) matrisi üzerine *tyrosinase* enzimini gluteraldehit ile çapraz bağlayarak geliştirdikleri biyosensörde, fenol, dihidroksi benzenler, hidroksi toluenler ve klorofenoller gibi çeşitli fenol bileşiklerini amperometrik yöntemle ölçmüşlerdir. Ölçümler sulu (fosfat tamponu) ve susuz (kloroform) ortamlarda gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan elektrodun gerek sulu, gerekse susuz ortamda gösterdiği ölçüm hassasiyeti fenol için sırasıyla $690 \mu A/M$ ve $149 \mu A/M$ olarak hesaplanmıştır [Stanca and Popescu, 2004].

Liu ve arkadaşları, karbon pastası ile desteklenmiş modifiye manyetik nanopartiküller ($MgFe_2O_4-SiO_2$) kullanarak *tyrosinase* tabanlı bir fenol biyosensörü geliştirmişlerdir. *Tyrosinase* manyetik nanopartiküller üzerindeki amino grupların modifiye edilmesi ile sisteme kovalent olarak bağlanmıştır. Biyosensörün ilk 20 s içerisinde %95 kararlı hale geldiği gözlenmiştir. Fenol için belirledikleri doğrusal ölçüm aralığı 1×10^{-6} - $2,5 \times 10^{-4}$ M, hassasiyet değeri $54,2 \mu A/mM$ ve belirleme limiti (LOD) 6×10^{-7} M olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlarda çalışma elektroduna

yüksek miktarda *tyrosinase* enziminin immobilize edilmiş olması çalışmanın avantajlarından biri olarak belirtilmiştir. Çalışmanın sonunda, hazırlanan elektrodun silika sol-jel graft kopolimer elektrodlarına göre daha iyi özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir [Liu et al., 2005].

Wilkolazka ve arkadaşları, *laccase* enziminin bağlı olduğu grafit bir çalışma elektrodunu 30 farklı fenol türevinin ölçümü için kullanılmıştır. Söz konusu elektrot, 2,6- dimetoksifenol, koniferil alkol, kafeik asit, DOPAC ve hidrokinon gibi bazı fenolik bileşiklerin nanomolar konsantrasyonlarına, ferulik asit, syringic asit, dopamin, 3,4-dihidroksibenzoik asit ve DL-noradrenalin gibi bazı fenolik bileşiklerin mikromolar konsantrasyonlarına, fenol ve 4-hidroksibenzaldehitin milimolar konsantrasyonlarına tepki vermiştir. Orto ve para bağlı fenoller arasında para bağlı fenollerin K_m^{app} değerlerinin daha düşük olduğu belirtilmiştir [Wilkolazka et al., 2005].

Liu ve arkadaşları, koloidal altın ile modifiye edilmiş karbon pastası elektroda *tyrosinase* immobilize ederek, fenol tayininde kullanılmak üzere yenilenebilir bir biyosensör geliştirmişlerdir. Amperometrik ölçüm sonuçları üzerine pH'nın, işletme potansiyelinin ve koloidal altın çözeltisi hacminin etkisi araştırılmıştır. Optimum şartlarda biosensörün yanıt süresi 5 saniyeden az, hassasiyeti $12,3 \mu A/cm^2 \cdot \mu M$ olarak bulunmuştur. Çalışmada K_m^{app} değeri ise $58,3 \mu M$ olarak hesaplanmıştır [Liu et al., 2003].

Notsu ve Tatsuma yaptıkları ilginç bir çalışmada, *tyrosinase* elektrodu ve *tyrosinase/peroxidase* elektrodunu eş zamanlı kullanarak iki fenolik bileşiği aynı anda tayin edebilen amperometrik bir fenol biyosensörü geliştirebilmişlerdir. Hazırlanan biyosensör sistemi ile aynı çözelti içerisindeki *p*-kresol ve katekol bir ölçümde aynı anda tayin edilebilmiştir [Notsu and Tatsuma, 2004].

Kim ve Lee, fenolik bileşiklerin tayini için, silikat/nafyon kompozit filme *tyrosinase* bağlanarak hazırlanmış amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Kompozitteki nafyon polimeri sadece sol-jel silikat film eldesinin kırılma gücünü gidermek için değil aynı zamanda biyosensörün uzun süreli kararlılığını arttırmak için de kullanılmıştır. Enzim elektrodunun optimum analitik performansını

belirlemek için, elektrot üretimindeki işletme parametreleri ve çeşitli deneysel değerler (pH ve işletme potansiyeli) araştırılmıştır. Biyosensörün ölçülebilecek akımın %95'ine (yanıt süresi) 15 saniyede ulaştığı belirtilmiştir. Katekol ve fenol için biyosensörün hassasiyeti, sırasıyla, 200 ve 46 mA/M olarak hesaplanmıştır. Enzim elektrodunun başlangıç aktivitesinin %74'nü 2 hafta boyunca koruduğu belirlenmiştir [Kim and Lee, 2003].

Metzger ve arkadaşları, ısıya dayanıklı *Bacillus stearothermophilus* türünden elde edilmiş *phenol hydroxylase* enzimi ile hazırlanmış amperometrik bir fenol biyosensörü geliştirmişlerdir. Enzim, sol-jel bir matriks içerisine hapsedilmiştir. Enzim bağlı sol-jel, Clark tipi oksijen elektrodun uç kısmına monte edilmiş ve fenol biyosensörü uygulamaları için kullanılmıştır. Oksijen tüketim hızı ile fenol konsantrasyonu arasında doğrusal ilişkinin mevcut olduğu açıklanmıştır. pH 7,6'da ve 40 °C'da, fenol için doğrusal aralık 2,5- 400 µM olarak belirlenmiş, yanıt süresi 10 s olarak bulunmuştur. Ayrıca, biyosensörün 7 gün içinde %20 aktivite kaybettiği belirtilmiştir [Metzger et al., 1998].

Christophe ve arkadaşları, fenollerin ve herbisitlerin ölçümleri için, *tyrosinase* tabanlı amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Poli(3,4-etilendioksitiyofen)'in camsı karbon elektrot yüzeyinde elektropolimerizasyonu sırasında *tyrosinase* polimer içerisine hapsedilmiştir. Biyosensör performansını optimize etmek için çalışma şartları ve elektropolimerizasyon proses parametreleri değiştirilerek çalışılmıştır. Kesikli sistemde monofenol ve difenollerin ölçümü -0,2 V'da gerçekleştirilmiştir. Ölçümü yapılan fenollerin belirleme limitleri (LOD) 5-500 nm gibi oldukça düşük konsantrasyon aralığında hesaplanmıştır. Herbisitlerin tayini çalışma elektrodunun inhibisyon mekanizması üzerinden gerçekleştirilmiştir [Christophe et al., 2003].

Wang ve arkadaşları, fenolik bileşiklerin tayini için Fe₃O₄ nanopartikülleri ile modifiye edilmiş kitosan polimeri içerisinde tyrosinase enzimini hapsederek modifiye polimeri camsı karbon elektrot üzerine tutturmuştur. Amperometrik ölçümler -0,2 V' da doygun kalomel elektrot kullanılarak yapılmıştır. Katekol için doğrusal ölçüm aralığı $8,3 \times 10^{-8}$ – $7,0 \times 10^{-5}$ M, belirleme limiti $2,5 \times 10^{-8}$ M olarak hesaplanmıştır. Polimerde, Fe₃O₄ nanopartiküllerinin sağladığı geniş yüzey alanı ve

kitosanın gözenekli yapısı sayesinde yüksek miktarda enzimin tutuklandığı rapor edilmiştir [Wang et al., 2008].

Chen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, camı karbon elektrot yüzeyine ZnO nanoçubukları yerleştirilmiştir. Pozitif yüklü bu çubuklar üzerine elektrostatik çekimlerle *tyrosinase* enzimi adsorbe edilmiştir. Çalışma elektrodu fenol ve katekol ölçümleri için kullanılmıştır. Fenol için doğrusal ölçüm aralığı 20-100 μM , katekol için 10-400 μM , ölçüm hassasiyetleri ise fenol ve katekol için sırasıyla 0,83 $\mu\text{A}/\text{mM}$ ve 2,14 $\mu\text{A}/\text{mM}$ olarak hesaplanmıştır [Chen et al., 2008].

Zepli ve arkadaşları, aluminyum sol-jel tabakası içerisinde *tyrosinase* enzimini hapsetmişler ve bu tabakayı, sonojel-karbon çevirici üzerine yayma yöntemiyle tutturmuşlardır. Elde ettikleri jel tabakasının enzim için mükemmel bir mikroçevre oluşturduğunu, düşük kütle transfer bariyeri sağladığını ve enzim aktivitesini uzun bir süre sabit tuttuğunu belirtmişlerdir. Amperometrik fenol ölçümleri -0,3 V'da yapılmıştır. Fenol için doğrusal ölçüm aralığı 5×10^{-7} - 3×10^{-5} M, belirleme limiti ise 3×10^{-7} M olarak bulunmuştur [Zepli et al., 2008].

Freire ve arkadaşları, kağıt fabrikası atıksuyunda bulunan fenolik bileşiklerin belirlenmesinde amperometrik bir sensör sistemi geliştirmiştir. Kullanılan bu sistem, sürekli bir akış sistemi, dializ membran prosesi ve *laccase* tabanlı bir elektrottan oluşmuştur. Enzim immobilizasyonu için, camı karbon elektrot 30 dakika boyunca, glutraldehit, bovin serum albumin ve *laccase* karışımında bekletilmiştir. Sistemin performansı, pH'ya, iyonik şiddete, uygulanan potansiyele ve debiye göre araştırılmıştır. Guaiakol ve kloroguaiakol ölçümleri için 0,5-1,6 mL/dak debi aralığında çalışılmış, debi arttıkça sinyal artmış ve bu değerden sonra artan debilerde alınan sinyallerde düşüşler kaydedilmiştir. 0,001 ve 0,5 M konsantrasyon aralığındaki tamponlarla çalışılmış ve bu aralıkta sensör performansında değişiklik olmadığı gözlenmiştir. 1,6 mL/dak debide ve pH 5'de guaiakol ve kloroguaiakol için doğrusal ölçüm aralığı 1-10 μM olarak belirlenmiştir. Dializ membran ünitesinin, biyosensör yüzeyini kirlenmekten koruduğu ve dolayısıyla da biyosensör performansı üzerine olumlu etkide bulunduğu görülmüştür. Bu özellik sayesinde, karışık bir ortamda ön arıtım yapılmadan atıksu örneğinde direkt ölçüm yapılabilmiştir. Biyosensör, 3 ay gibi uzun bir süre kararlı olarak ölçüm yapabilmektedir [Freire et al., 2002]. Yine aynı

çalışma grubunun yaptığı bir çalışmada, *laccase* enzimi, fiziksel adsorpsiyon, gluteraldehit, karbodiimid, karbodimid/gluteraldehit teknikleriyle farklı şekillerde karbon-fiber elektroda immobilize edilmiştir. En iyi sensör yanıtının karbodiimid/gluteraldehit immobilizasyon tekniği kullanılarak hazırlanmış çalışma elektrodundan alındığı görülmüştür. Bu teknikle *laccase*, karbon-fiber elektroda karboksil gruplarından kovalent olarak bağlanmış, karbodiimid sayesinde enzim ve elektrot arasında güçlü bağlanma oluşurken gluteraldehit sayesinde de enzimler arasında ağlaşma gerçekleşmiştir. En kötü sensör yanıtının ise fiziksel adsorpsiyon immobilizasyon tekniğinin kullanıldığı çalışma elektrodundan alındığı gözlenmiştir. Substrat olarak 100 µM'lık katekol çözeltisi kullanılmış ve bu metotta farklı gluteraldehit miktarlarının sensör üzerine etkisi araştırılmıştır. En iyi gluteraldehit oranı %10 (m/v) olarak tespit edilmiştir. Biyosensör farklı pH ve potansiyellerde çalıştırılmış ve optimum sonuca pH 5'de ve -0,1 V potansiyelde ulaşılmıştır. İmmobilize *laccase* enziminin, 2 aydan fazla bir süre aktivitesinin tamamını koruduğu tespit edilmiştir [Freire et al., 2001].

Görüldüğü üzere, son yıllarda yoğunlaşmış olan fenol biyosensörü çalışmalarıyla özellikle elektroaktivitesi geliştirilmiş yeni çalışma elektrotlarının hazırlanmasına çalışılmaktadır. Bu çalışmalar aynı zamanda biyosensörün kararlılığı ve hassasiyeti üzerinde de doğrudan etkili olduğundan, fenol biyosensörlerinin ticari kullanımını kolaylaştıracaktır. Ayrıca yapılan çalışmalarda birbirinden farklı fenol bileşiklerinin spesifik olarak tayin edilmesi özelliği üzerinde durulmakta ve çevresel örneklerin uzun örnek hazırlama saflaştırma basamakları aşılmaya çalışılmaktadır. Sözü edilen konularda literatürde önemli eksiklikler bulunduğundan konu üzerindeki çalışmalar giderek daha da yoğunlaşmıştır. Ayrıca, literatüre bakıldığında amperometrik fenol biyosensör uygulamalarında en yaygın kullanılan enzimlerin *tyrosinase* ve *laccase* enzimleri olduğu aşikardır. *Horseradish peroxidase* enziminin fenollerle reaksiyona girebilmesi için *tyrosinase* ve *laccase* enzimlerinde olduğu gibi ortamda zaten var olan moleküler oksijeni kullanmak yerine hidrojen peroksit ihtiyacı duyması ve hidrojen peroksit miktarının da fenol katalizi için sınırlayıcı ya da inhibe edici özellikte olması *Horseradish peroxidase* enziminin biyosensörlerde kullanımını kısıtlamaktadır. *Tyrosinase* tabanlı fenol biyosensörleri düşük kararlılığa sahiptir ve reaksiyon ürünlerinin inhibisyonundan önemli ölçüde etkilenmektedir. *Horseradish peroxidase* tabanlı biyosensörlerde biyokatalitik reaksiyon döngüsünün

tamamlanabilmesi hidrojenperoksit varlığına bağlıdır. *Laccase* enzimi özellikle klorlu fenol ölçümlerinin yapıldığı biyosensörlerde daha sık tercih edilmektedir. Ayrıca, *laccase* tabanlı biyosensörlerin diğer enzimlerin kullanıldığı biyosensörlere göre daha kararlı olduğu ve reaksiyon ürünlerinin inhibisyonundan daha az etkilendiği literatürde belirtilmiştir. *Laccase* tabanlı biyosensörlerin *o*, *m*, *p*-benzendiollere, fenole ve *o*, *m*, *p*-kinonlara karşı yüksek hassasiyet gösterdikleri söylenmektedir [Freire et al., 2002]. Fakat, tüm bu kıyaslamalara rağmen, farklı iletken polimerlerin, farklı immobilizasyon tekniklerinin ve farklı çalışma ortamlarının hazırlanmasıyla bu 3 enzimin kullanıldığı fenol biyosensörlerinin birbirlerine göre dezavantajları ortadan kaldırılabilir. Üstelik, çalışma elektrotlarının bazı nanopartiküllerle modifiye edilmesi, yeni kompozit ve kopolimerlerin sentezlenmesi ve medyatörlerin iletken polimerlerin yapılarına dahil edilmesiyle her enzim için sözü edilen dezavantajlar yok edilebilir, analitik ölçüm parametreleri iyileştirilmiş fenol biyosensörleri geliştirilebilir. Özellikle son birkaç yılda yapılan fenol biyosensör çalışmaları bu amaca yönelik yürütülmektedir.

2.4.1. Horseradish peroxidase Tabanlı Fenol Biyosensörleri

Horseradish peroxidase enziminin elektron transfer mekanizması hem direkt hem de aracılı (mediated) yoldan gerçekleşmektedir. *Horseradish peroxidase* tabanlı bir hidrojen peroksit biyosensöründe elektrot yüzeyinden direkt elektron transfer mekanizması, fenol ve türevleri için geliştirilmiş *horseradish peroxidase* tabanlı biyosensörlerde ise aracılı elektron transfer mekanizması gerçekleşmektedir. *Horseradish peroxidase* tabanlı fenol biyosensörlerinde, enzim rejenerasyonu fenol üzerinden alınan elektronlar tarafından sağlanmaktadır. Dolayısıyla bu sistemlerde ölçülecek olan fenol bir medyatördür. *Horseradish peroxidase* enzimi fenolün birçok türevine karşı düşük spesifiklik gösterdiğinden, *horseradish peroxidase* tabanlı fenol biyosensörleri fenolün hemen hemen tüm çeşidine tepki verebilmektedir. *Horseradish peroxidase* enziminin yukarıda bahsedildiği gibi direkt elektron transfer mekanizmasına sahip olması, fenolik bileşiklerin ölçümünde sıkıntı yaratabilmektedir. Elektrot yüzeyinden gerçekleşen direkt elektron transfer mekanizması oldukça yüksek akımlara yol açtığından, fenoller için ölçüm hassasiyeti düşük olabilmektedir [Rosatto et al., 2001; Lindgren et al., 1997]. Fenol

biyosensörlerinde *horseradish peroxidase* enziminin direkt elektron transferi, enzimin direkt elektron transferini bloke edebilecek tipteki matrikslere immobilize edilmesiyle ortadan kaldırılabilir [Rosatto et al., 2002]. Örneğin; Rosatto ve arkadaşları, titanyum oksit ile modifiye edilmiş silikajeli enzim immobilizasyon matriksi olarak kullandıkları bir fenol biyosensöründe, *horseradish peroxidase* enziminin direkt elektron transferini bloke edebilmiş ve fenol ölçümü hassasiyetini arttırabilmişlerdir. Fakat aynı zamanda biyosensör kararlılığının düşük olduğunu da rapor etmişlerdir [Rosatto et al., 1999].

Horseradish peroxidase enzimi literatürde kovalent bağlama [Imabayashi et al., 2001], karbon pastası veya grafit-teflon kompozitleri içerisinde tutuklama [Serra et al., 2001; Lindgren et al., 1997], sol-jel matrikslere bağlama [Kane et al., 1998; Rosatto et al., 2002; Rosatto et al., 1999; Mello et al., 2003] şeklindeki immobilizasyon teknikleriyle birçok polimerik destek materyale immobilize edilmiş ve fenolik bileşiklerin ölçümünde kullanılan farklı tiplerde çalışma elektrotları geliştirilmiştir. Araştırmacılar tarafından, *horseradish peroxidase* enziminin kovalent bağlanma olmaksızın grafit-teflon peletler içerisinde tutuklanmasının elektrot fabrikasyonu bakımından kolay, hızlı, ucuz olduğu ve kovalent bağlanma olmadığından hassasiyet kaybının olmadığı belirtilmiştir. Elektrot yüzeyinde seçici membran kullanılmasının özellikle *horseradish peroxidase* enzimi için hızlı elektron transfer mekanizmasını bloke ettiği, ayrıca analiz ortamına eklenen bazı kofaktörlerin ve medyatörlerin membran tarafından engellenerek enzimatik reaksiyona katılamayacağı söylenmektedir. Karbon pastası elektrotlarının uzun ömürlü olmadığı, zayıf mekaniksel özellikte olduğu, organik ortamlarda kullanılmasının güç olduğu da literatürde rapor edilmiştir [Serra et al., 2001].

Horseradish peroxidase tabanlı fenol biyosensörlerinin modifikasyonları ve bazı katkı maddelerinin ilavesi, elektrot hassasiyeti ve kararlılığını geliştirebilmek için alternatif bir yoldur. Katkı maddelerinin ilavesiyle, ölçüm özellikleri geliştirilmiş *horseradish peroxidase* tabanlı fenol biyosensörlerinin çoğunda kararlılıktan ziyade hassasiyet iyileştirilebilmiştir. Bu duruma neden olarak da enzimatik reaksiyon sonunda oluşan fenoksi radikallerinin katkı maddesi yardımıyla fazla üretilmesi ya da ölçümler süresince katkı maddesinde meydana gelecek kayıplar gösterilmiştir [Lutz et al., 1995; Ortega et al., 1994; Rosatto et al., 2001]. Popescu ve arkadaşları

horseradish peroxidase tabanlı karbon pastası elektrodu kullanarak yaptıkları bir çalışmada, ortama katkı maddesi olarak ekledikleri laktitol sayesinde pasta içerisindeki enzimin katalitik özelliğinin iyileşme gösterdiğini belirtmişlerdir [Popescu et al., 1995]. Ruzgas ve arkadaşlarının aynı prosedürle geliştirdikleri ve karbon pastası yerine katı grafit kullandıkları biyosensörde, oluşan fenoksi radikallerinin elektrot üzerinde daha etkili indirgendiği, bu nedenle hassasiyet ve kararlılık değerlerinin arttığı belirtilmiştir [Ruzgas et al., 1995].

Karbon nanotüplerin kullanıldığı *horseradish peroxidase* tabanlı fenol biyosensörlerinde, karbon nanotüpün enzim için iyi bir immobilizasyon matriksi olduğu, elektron transferini kolaylaştırıcı etkisinin bulunduğu ve *horseradish peroxidase* için bağlandığı polimer ortamında iyi bir mikroçevre yarattığı birçok araştırmacı tarafından vurgulanmıştır [Huang et al., 2008; Wang et al., 2004; Joshi et al., 2005; Davis et al., 1998].

El Ichi ve arkadaşları klorlu fenol ölçümleri için geliştirdikleri bir biyosensörde, kitosan mikrokürecikler şeklinde sentezlemiş, sentez ortamına *horseradish peroxidase* enzimini eklemişlerdir. Elde ettikleri *horseradish peroxidase*/kitosan polimerine çapraz bağlama ajanı olan glioksal (%0,005) ilave ederek enzimi polimere kovalent bağlamışlar ve polimeri altın elektrot yüzeyine tutturmuşlardır. Kesikli sistemde 2,6-diklorofenol, 4-klorofenol ve 5-klorofenol için hassasiyet değerlerini sırasıyla; 1500, $1,9 \times 10^{-6}$ ve $0,9 \times 10^{-6}$ nA/ μ M, doğrusal ölçüm aralıklarını sırasıyla; 0,01-20 μ M, 10^{-6} - 20 μ M, 10^{-6} - 20 μ M, belirleme limitlerini sırasıyla; 0,01, 10^{-6} , 10^{-6} μ M olarak ölçmüşlerdir. Biyosensörün yanıt süresini 1 s olarak belirtmişlerdir. 3 aylık kullanım sonunda (elektrot kullanılmadığında buzdolabında korunarak) çalışma elektrodu aktivite kaybının sadece %10 olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca çalışmada, kitosan mikrokürelerinin yüksek porozitesinden dolayı elektron transferini hızlandırdığı ve fazla miktarda enzimin tutuklanabildiği vurgulanmıştır [El Ichi et al., 2009].

Liu ve çalışma grubu, altın elektrodu belli voltajlar uygulayarak ve çeşitli kimyasallarla modifiye ederek negatif yüklemişlerdir. Çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) çözeltisi içine Poli(alilamin hidroklorid) çözeltisi eklemek suretiyle pozitif yüklü, suda çözünür bir süspansiyon elde etmişlerdir. Negatif yüklenmiş altın

elektrodu bu süspansiyona daldırarak Poli(alilamin hidroklorid)/MWCNT yapısını elektrot yüzeyine adsorbe etmişlerdir. Enzim immobilizasyonu, hazırlanan elektrodun *horseradish peroxidase* çözeltisine bırakılıp, bekletilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Grup, buraya kadar olan elektrot hazırlama basamaklarını tekrarlayarak, tabaka tabaka bir çalışma elektrodu hazırlamıştır ve bu elektrotla, 18 çeşit fenolik bileşiğin ölçümünü yapmıştır. Bunların arasından elde ettikleri en yüksek ölçüm hassasiyeti değerleri *p*-aminofenol için 205 nA/ μ M, hidrokinon için 165 nA/ μ M, katekol için 123 nA/ μ M ve *o*-aminofenol için 104 nA/ μ M olarak hesaplanmıştır. En geniş doğrusal ölçüm aralığı, *o*-nitrofenol için 8-120 μ M, en düşük belirleme limiti (LOD) ise hidrokinon ve *p*-aminofenol için 0,05 μ M olarak belirtilmiştir. Çalışma elektrodu aktivitesi 40 günlük kullanımdan sonra %93,4 düşüş göstermiştir [Liu et al., 2008].

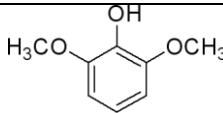
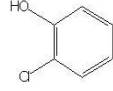
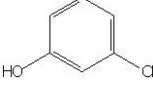
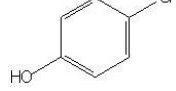
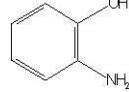
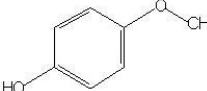
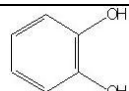
Santos ve arkadaşları, geliştirdikleri biyosensörde redoks medyatörü olarak metilen mavisi kullanmışlardır. Çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) çözeltisi içerisine metilen mavisini ekleyerek karbon nanotüp üzerine medyatörü adsorbe etmişlerdir. Filtre ettikleri katı haldeki MWCNT/metilen mavisini gluteraldehit içeren *horseradish peroxidase* çözeltisine ekleyip karıştırmışlar, aynı karışıma mineral yağ ile birlikte grafit tozunun da ilavesiyle homojen bir pasta elde etmişlerdir. Hazırladıkları pastayı 4 mm çapında cam bir tüp içerisine doldurup çalışma elektrodu olarak kullanmışlardır. Kesikli sistemde ölçümü yapılan katekol için hassasiyet değerini 50 nA/ μ M-cm², doğrusal ölçüm aralığını 1-150 μ M, belirleme limitini 0,5 μ M olarak hesaplamışlardır. Ard arda 300 kullanımdan sonra (yaklaşık 10 saat) çalışma elektrodunun aktivitesini %97 koruduğunu gözlemişlerdir. Biyosensörde redoks medyatörü olarak kullanılan metilen mavisinin, elektron transfer hızını arttırdığı rapor edilmiştir [Santos et al., 2007].

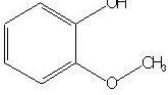
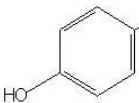
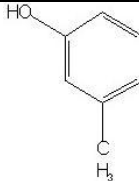
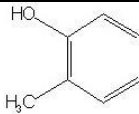
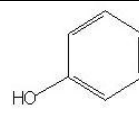

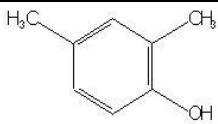
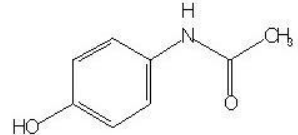
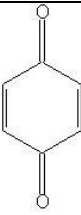
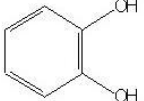
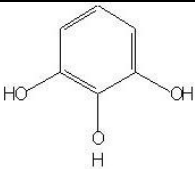
3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallardan, hidrojen peroksit (%30), glutraldehit (%25 w/v), lityum klorid, tetrahidrofuran (THF), diklorometan, potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4), sodyum hidroksit, sitrik asit, sülfürik asit, trisodyum sitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), asetik asit, sodyum asetat ve potasyum klorür Merck'den, fenol ve fenolik bileşiklerin tümü, pirol (%99), sodyum dodesil sülfat (SDS), 1-sikloheksil-3-(2-morfolinoetil) karbodiimid metho-*p*-tolueno-sulfonat ve asetonitril Sigma'dan, tetrabutylamonyum tetrafloroborat (TBAFB) Fluka'dan, çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) Nanocs. Inc. Firmasından temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan fenol bileşikleri molekül yapılarıyla beraber Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan 18 fenol bileşiği ve molekül yapıları.

| <i>Fenolik bileşik</i> | <i>Moleküler yapısı</i> |
|------------------------|--|
| 2,6-dimetoksifenol |  |
| 2-klorofenol |  |
| 3- klorofenol |  |
| 4- klorofenol |  |
| 2-aminofenol |  |
| 4-metoksifenol |  |
| Pirokatekol |  |

| | |
|---------------------------|--|
| Guaiakol (2-metoksifenol) |  |
| Hidrokinon |  |
| <i>m</i> -kresol |  |
| <i>o</i> -kresol |  |
| <i>p</i> -kresol |  |
| Fenol |  |
| 2,4-dimetilfenol |  |
| 4-asetamidofenol |  |
| <i>p</i> -benzokinon |  |
| Katekol |  |
| Pirogallol |  |

Çizelge 3.1. DEVAM

3.2. Enzim

Horseradish peroksidaz enzimi (E.C.1.11.1.7), 1 tüp içerisinde 52 mg katı protein şeklinde Merck'den temin edilmiştir. 1 tüpteki enzim aktivitesi üretici firma tarafından pH 7- 0,1 M fosfat tamponu içerisinde 25°C sıcaklıkta pirogallola karşı elde edilmiş enzim aktivitesidir ve bu değer 10 000 U/vial olarak tanımlanmıştır. Çalışmalarda kullanılmak üzere stok enzim çözeltisi, çalışmanın amacına göre değişim gösteren farklı miktarlardaki enzimin 0,1 M - pH 7 potasyum fosfat tamponu içerisinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Stok enzim çözeltisi +4°C sıcaklıkta buzdolabında korunmuştur.

3.3. Elektrokimyasal Sistem ve Elektrotlar

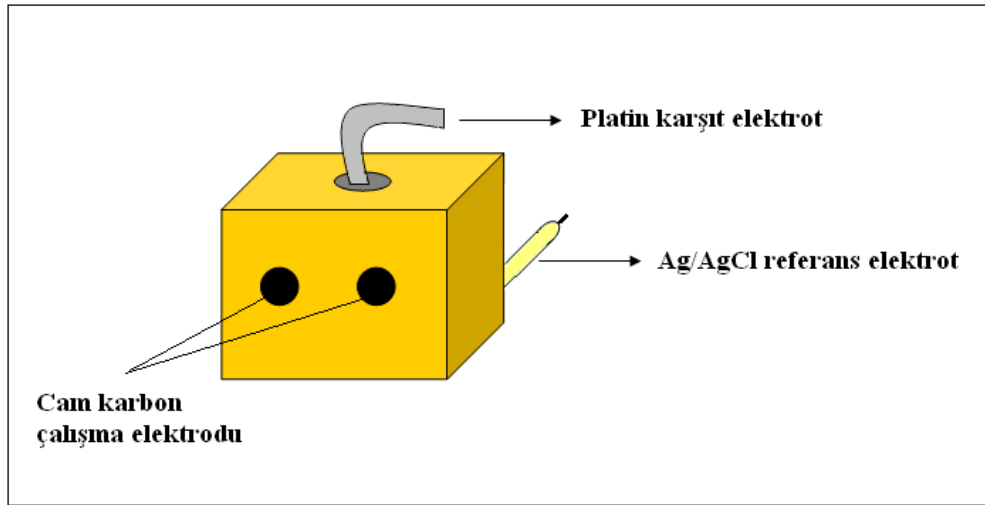
Kesikli sistemde kullanılan elektrokimyasal düzenek, üçlü elektrot sistemi, cam reaksiyon hücresi ve bir potansiyostattan, sürekli sistemde ise bir akış hücresi ve bir potansiyostattan oluşmaktadır. Kesikli sistemdeki üçlü elektrot sisteminde kullanılan çalışma elektrotları Camısı karbon ve Altın elektrotlardır. Altın elektrot olarak ya 2 mm çapında dairesel bir elektrot, ya da kenar uzunluğu 2 cm olan kare levha şeklinde kesilmiş bir elektrot kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan camısı karbon elektrot daireseldir ve 3 mm çapındadır. Referans elektrot olarak da, sulu ortamlarda kullanıma uygun olan Gümüş/Gümüş klorür (Ag/AgCl) referans elektrodu (CHI 840B marka potansiyostattaki ölçümlerde) veya doygun Calomel elektrot (Hg/Hg₂Cl₂) (AMEL marka potansiyostattaki ölçümlerde) kullanılmıştır. Sistemde kullanılan karşıt elektrot, platin bir çubuktur.

Sürekli sistemde kullanılan üçlü elektrot sistemi bir akış hücresine monte edilmiş dairesel 2 mm çapında camısı karbon çalışma elektrodundan, platinden yapılmış çubuk şeklinde bir karşıt elektrottan ve Ag/AgCl referans elektrodundan oluşmaktadır (Şekil 3.1).

Deneylerde kullanılan tüm çalışma elektrotları ve karşıt elektrotlarının yüzeyleri her kullanımdan önce elektrot temizleme kiti ile temizlenmiştir. Elektrot temizleme kiti, farklı büyüklükteki zımparalardan ve 1-0,3-0,05 mikron boyutundaki γ -alüminyum tozlarından oluşmaktadır. Uygun zımpara üzerine sırasıyla farklı

boyuttaki γ -alüminyum tozlarından bir miktar alınarak elektrot yüzeyi zımparalanmış böylelikle hem elektrot yüzey temizliği hem de yüzey pürüzsüzlüğü sağlanmıştır.

Üçlü elektrot sisteminde kullanılan tüm dairesel Altın ve Camsı karbon çalışma elektrotları, tüm referans elektrotlar, cam reaksiyon hücresi ve akış hücresi ve elektrot temizleme kiti CH Instruments firmasından temin edilmiştir. Elektrokimyasal ölçümler CHI 840B ve AMEL 7050 Marka 2 çeşit potansiyostat (elektrokimyasal analizatör) kullanılarak yapılmıştır.



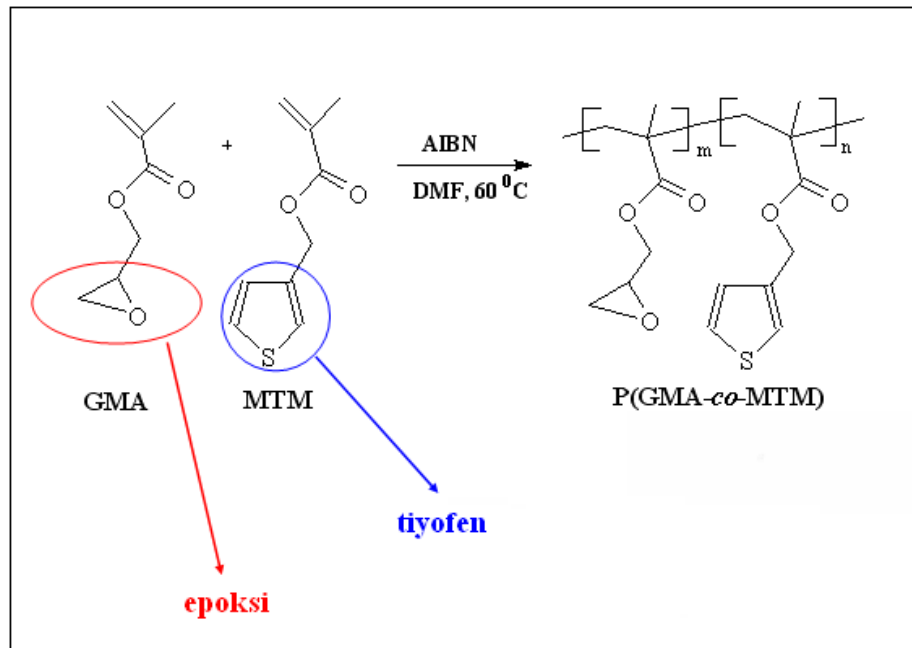
Şekil 3.1. Sürekli sistem akış hücresi ve üçlü elektrot sistemi.

3.4. Polimerler

Çalışmada kullanılan polimerlerden polipirol, ticari pirol monomerinin elektrot yüzeyinde elektropolimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Elektropolimerizasyon ortamı ve polimerizasyon şartları yapılan her çalışma elektrodunda değişim göstermiştir. Çalışmada polipirol film tek başına kullanıldığı gibi, çalışma elektrodu yüzeyinde değişik kompozit polimerlerin sentezlenmesinde de kullanılmıştır. Bu çalışma kapsamında geliştirilen çalışma elektrotlarının hemen hemen hepsi polipirol tabanlıdır.

Tez çalışmasında kullanılan diğer polimer ise Poli(glisidil metakrilat-co-3-tiyenilmetil metakrilat) {Poli(GMA-co-MTM)} polimeridir. Polimerin yapısındaki kopolimerlerden MTM, elektroaktif tiyofen grupları içerirken, GMA direkt enzim immobilizasyonunu sağlayan epoksi gruplarına sahiptir. Çalışmada Poli(GMA-co-

MTM) genellikle polipirol ile beraber kompozit filmler oluşturacak şekilde kullanılmıştır. Yan zincirlerinde tiyofen grupları içeren MTM monomeri enstitümüze bağlı Kimya Bölümü öğretim elemanı Doç Dr. Faruk Yılmaz ve grubu tarafından sentezlenmiştir [Yılmaz et al., 2004; Yılmaz et al., 2005]. Deneyleerde kullanmak üzere Poli(GMA-co-MTM) polimerinin, polimer içindeki kopolimer yüzdeleri %30 GMA, %70 MTM olan ve %10 GMA, %90 MTM olan 2 farklı kompozisyonu enstitümüze bağlı Kimya Bölümü'nde şu şekilde sentezlenmiştir; önceden belirlenmiş miktarlarda 3-tiyenilmetil metakrilat (MTM) (polimer içerisinde %70 veya %90 olacak şekilde), glisin metakrilat (GMA) (polimer içerisinde %30 veya %10 olacak şekilde), dimetilformamid (DMF) ve α,α' -Azobisisobütironitril (AIBN) Pyrex tüpüne yerleştirilerek karıştırılmış, karışımdan 10 dakika Argon gazı geçirilerek ortamın oksijeni alınmıştır. Tüpün ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra $60\pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıktaki termostatlı yağ banyosuna bırakılmıştır. Polimerizasyon reaksiyonundan sonra, oluşan kopolimer metanolde çöktürülmüş ve filtreden geçirilip 24 saatlik vakum altında kurutulmuştur. Poli(GMA-co-MTM)'nin sentezi ve kimyasal yapısı Şekil 3.2'de verilmiştir. %30 oranında GMA ve %70 oranında MTM içeren Poli(GMA-co-MTM)'nin 6 mg'ı, 10 mL tetrahidrofuran (THF) içerisinde çözülerek, %10 oranında GMA ve %90 oranında MTM içeren Poli(GMA-co-MTM)'nin 6 mg'ı, 10 mL diklorometan içerisinde çözülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.2. Poli(GMA-co-MTM)'nin sentezi.

3.5. Karbon nanotüp Çözeltisi

Karbon nanotüp (CNT), suda çözünmeyen bir yapıya sahiptir. Fakat, bu tez çalışmasında CNT'nin elektropolimerizasyon ortamlarında suda çözünebilir halde olması gerektiğinden Zhao ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş asit oksidasyon metodu ile CNT suda çözünebilir bir yapıya dönüştürülmüştür [Zhao et al., 2002]. Bu metoda göre; 14 mg MWCNT, hacimsel olarak 9:1 oranında hazırlanmış H_2SO_4/H_2O_2 karışımının 5 mL'sine eklenmiş ve 30 dakika karıştırılmıştır. Reaksiyondan sonra çözelti aynı H_2SO_4/H_2O_2 karışımı ile 20 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti ultrasonik banyoda (Elma 460-H) 5 dakika sonike edildikten sonra, saf su ile 1 L'ye tamamlanmış ve 0.45 μ M por çaplı selüloz membrandan süzümüştür. Membranda tutulan MWCNT, pH değeri 7 olana kadar 0,01 M'lık NaOH çözeltisiyle yıkanmış ve son olarak saf sudan geçirilmiştir. MWCNT tartılmış ve son konsantrasyonu 0,03 mg/L olacak şekilde saf suda çözülmüştür. Sulu MWCNT çözeltisi 2 dakika sonike edilerek homojenizasyonu sağlanmıştır.

3.6. Çalışma Elektrotlarının Hazırlanışı

3.6.1. PPy/PGA/HRP/Au Çalışma Elektrodunun Hazırlanışı

PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodunun hazırlanması ve amperometrik fenol ölçümleri AMEL marka potansiyostatta gerçekleştirilmiştir. Üçlü elektrot sisteminin çalışma elektrodu altın (Au) levha, karşıt elektrodu platin, referans elektrodu ise doygun Kalomel elektrottur. PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodunun yapımı için öncelikle Poligluteralehit (PGA) çözeltisi hazırlanmıştır. PGA, gluteralehitin bazik ortamda polimerize edilmiş halidir. Polimerizasyon prosesi şu şekilde gerçekleştirilmiştir; %25'lik gluteralehitin 2 mL'si 10 mL saf suya eklenmiştir. Bu çözeltiye karıştırma altında, çözeltinin pH değeri 9-10 aralığına gelene kadar 0,1 M NaOH çözeltisinden damla damla eklenmiştir. Uygun pH değeri sağlandıktan sonra çözelti, gluteralehitin polimerize olması için 600 rpm'lik hızda 30 dakika karıştırılmıştır. Pirolün elektropolimerizasyonu, hazırlanan PGA çözeltisinin 10 mL'sinde gerçekleştirilmiştir. PGA çözeltisi içerisine 6 mg SDS ve 7 μ L pirol monomeri (ortamda 0,01 M pirol olacak şekilde) eklenip karıştırılmıştır. Polimerizasyon ortamına üçlü elektrot sistemi daldırılıp, 0 ile +1,2 V arasındaki

potansiyel taraması ve 100 mV/s'lik tarama hızında dönüşümlü voltametri (CV) metodu ile altın elektrot yüzeyinde Polipirol/Poligluteralehit (PPy/PGA) film kaplanmıştır. Kaplama süresi 5 dakikadır. Bu şekilde hazırlanan elektrot %25'lik gluteralehit içerisinde 1,5 saat bekletildikten sonra 0,3 mg/mL'lik *horseradish peroxidase* (HRP) enzim çözeltisine (bkz. Bölüm 3.2) bırakılıp +4°C'de 20 saat bekletilmiştir.

3.6.2. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au Çalışma Elektrodunun Hazırlanışı

Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodunun hazırlanması ve amperometrik fenol ölçümleri CHI marka potansiyostatta gerçekleştirilmiştir. Üçlü elektrot sisteminin çalışma elektrodu 2 mm çapında altın, karşıt elektrodu platin, referans elektrodu ise Ag/AgCl elektrottur. Çalışma elektrodu hazırlanmasında öncelikle %10 oranında GMA ve %90 oranında MTM kopolimerlerini içeren Poli(GMA-co-MTM)'nin diklorometan içerisinde hazırlanmış çözeltisinden (bkz. Bölüm 3.4) 100 µL alınarak altın levha üzerine damlatılmış ve diklorometan oda sıcaklığında elektrot yüzeyinden uçurulmuştur. 10 mL PGA çözeltisi (bkz. Bölüm 3.6.1) içerisine 6 mg SDS ve 7 µL pirol monomeri (ortamda 0,01 M pirol olacak şekilde) eklenip karıştırılmıştır. Polimerizasyon ortamına üçlü elektrot sistemi daldırılıp, 0 ile +1,2 V arasındaki potansiyel taraması ve 100 mV/s'lik tarama hızında, önceden yüzeyi Poli(GMA-co-MTM) ile kaplanmış altın elektrot üzerinde, dönüşümlü voltametri (CV) metodu ile 15 dakikalık sürede Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA kompozit filmi sentezlenmiştir. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA kompozit film elektrot, %25'lik gluteralehit içerisinde 1 gece bekletildikten sonra 1 mg/mL'lik HRP enzim çözeltisinde (bkz. Bölüm 3.2) 3 gece, +4°C'de bekletilmiştir.

3.6.3. PPy/CNT/HRP/Au Çalışma Elektrodunun Hazırlanışı

PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunun hazırlanması ve amperometrik fenol ölçümleri CHI marka potansiyostatta gerçekleştirilmiştir. Üçlü elektrot sisteminin çalışma elektrodu 2 mm çapında altın, karşıt elektrodu platin, referans elektrodu ise Ag/AgCl elektrottur. Pirol polimerizasyonu için 5 mL CNT çözeltisine (bkz. Bölüm

3.5) 0,05 M- pH 6,5 sitrat tamponundan 5 mL eklenerek elektropolimerizasyon ortamı hazırlanmıştır. Bu ortama sırasıyla 7 µL pirol monomeri (çözeltildeki konsantrasyonu 0,01 M olacak şekilde), 6 mg SDS ve 3 mg HRP enzimi eklenerek karıştırılmıştır. Üçlü elektrot sistemi cam reaksiyon hücresine daldırılmış, 0 ile +1,2 V'luk potansiyel aralığında ve 100 mV/s'lik tarama hızında dönüşümlü voltametri metodu kullanılarak 4 dakikalık sürede elektrot yüzeyinde PPy/CNT/HRP biyofilmi sentezlenmiştir.

3.6.4. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au Çalışma Elektrodunun Hazırlanışı

Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunun hazırlanması ve amperometrik fenol ölçümleri CHI marka potansiyostatta gerçekleştirilmiştir. Üçlü elektrot sisteminin çalışma elektrodu 2 mm çapında altın, karşıt elektrodu platin, referans elektrodu ise Ag/AgCl elektrottur. Çalışma elektrodu hazırlanmasında öncelikle %30 oranında GMA ve %70 oranında MTM kopolimerlerini içeren Poli(GMA-co-MTM)'nin tetrahidrofuran içerisinde hazırlanmış çözeltisinden (bkz. Bölüm 3.4) 20 µL alınarak altın elektrot üzerine damlatılmış ve tetrahidrofuran oda sıcaklığında elektrot yüzeyinden uçurulmuştur. Okside edilmiş CNT çözeltisinden (bkz. Bölüm 3.5) ve 0,05 M - pH 6,5 sitrat tamponundan 5'er mL alınmış ve cam reaksiyon hücresine eklenmiştir. Bu karışım içerisine 7 µL pirol monomeri (çözeltildeki konsantrasyonu 0,01 M olacak şekilde) ve 6 mg SDS eklenip karıştırılmıştır. Üçlü elektrot sistemi cam reaksiyon hücresine daldırılmış, 0 ile +1,2 V'luk potansiyel aralığında ve 100 mV/s'lik tarama hızında dönüşümlü voltametri metodu kullanılarak 4 dakikalık sürede elektrot yüzeyinde Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT kompozit filmi sentezlenmiştir. Hazırlanan elektrot, 5 mg/mL'lik 1-sikloheksil-3-(2-morfolinoetil) karbodiimid metho-*p*-tolueno-sulfonat (0,05 M - pH 4,8 asetat tamponunda hazırlanmış) çözeltisine daldırılmış, 200 rpm'lik karıştırma altında 3,5 saat bekletilmiştir. Süre sonunda elektrot 0,3 mg/mL'lik HRP çözeltisine (bkz. Bölüm 3.2) bırakılmış ve 1 gece +4°C'de bekletilmiştir.

3.6.5. Poli(GMA-co-MTM) ile Farklı Çalışma Elektrotlarının Hazırlanışı

Çalışmada %30 oranında GMA ve %70 oranında MTM kopolimerlerini içeren Poli(GMA-co-MTM)'yi kullanarak, polipirol ile birlikte kompozit filmler şeklinde ve farklı enzim immobilizasyon mekanizmalarına sahip değişik çalışma elektrotları dizayn edilmiştir. Poli(GMA-co-MTM)(%30-%70) tabanlı çalışma elektrotlarının hazırlanması ve amperometrik fenol ölçümleri CHI marka potansiyostatta gerçekleştirilmiştir. Üçlü elektrot sisteminde kullanılan çalışma elektrotları çalışmanın amacına göre 2 mm çapında altın ya da 3 mm çapında camsı karbon elektrottur. Karşıt elektrot olarak platin, referans elektrot olarak da Ag/AgCl elektrotlar kullanılmıştır.

3.6.5.1. Poli(GMA-co-MTM)/PPy~HRP/Au Çalışma Elektrodunun Hazırlanışı

Poli(GMA-co-MTM) çözeltisinden (bkz. Bölüm 3.4) 20 µL alınarak altın elektrot yüzeyine damlatılmış ve solventi uçurulmuştur. 0,05 M sitrat tamponunun (pH 6,5) 10 mL'sine sırasıyla 6 mg SDS ve 7 µL pirol monomeri eklenerek (çözeltideki konsantrasyonu 0,01 M olacak şekilde) çözelti karıştırılmıştır. Üçlü elektrot sistemi cam reaksiyon hücresine daldırılmış, -1,2 ile +1,2 V'luk potansiyel aralığında ve 100 mV/s'lik tarama hızında dönüşümlü voltametri metodu kullanılarak 4 dakikalık sürede elektrot yüzeyinde Poli(GMA-co-MTM)/PPy kompozit filmi sentezlenmiştir. Hazırlanan elektrot 0,6 mg/mL'lik HRP çözeltisine (bkz. Bölüm 3.2) bırakılmış ve 1 gece +4°C'de bekletilmiştir.

3.6.5.2. Poli(GMA-co-MTM)~HRP/PPy/Au Çalışma Elektrodunun Hazırlanışı

Poli(GMA-co-MTM) çözeltisinden (bkz. Bölüm 3.4) 20 µL alınarak altın elektrot yüzeyine damlatılmış ve solventi uçurulmuştur. Poli(GMA-co-MTM) film ile kaplanan elektrot 6 mg/mL'lik HRP çözeltisinde 1 gece +4°C'de bekletilmiştir. İmmobilizasyon süresi sonunda oluşan Poli(GMA-co-MTM)~HRP biyofilm elektrodu saf suyla yıkanmıştır. 0,05 M sitrat tamponunun (pH 6,5) 10 mL'sine sırasıyla 6 mg SDS ve 7 µL pirol monomeri eklenerek (çözeltideki konsantrasyonu

0,01 M olacak şekilde) çözelti karıştırılmıştır. Üçlü elektrot sistemi cam reaksiyon hücresine daldırılmış, -1,2 ile +1,2 V'luk potansiyel aralığında ve 100 mV/s'lik tarama hızında dönüşümlü voltametri metodu kullanılarak 4 dakikalık sürede elektrot yüzeyinde Poli(GMA-co-MTM)~HRP/PPy biyokompozit filmi sentezlenmiştir.

3.6.5.3. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au Çalışma Elektrodunun Hazırlanışı

Poli(GMA-co-MTM) çözeltisinden (bkz. Bölüm 3.4) 20 µL alınarak altın elektrot yüzeyine damlatılmış ve solventi uçurulmuştur. 0,05 M sitrat tamponunun (pH 6,5) 10 mL'sine sırasıyla 6 mg SDS, 7 µL pirol monomeri (çözeltideki konsantrasyonu 0,01 M olacak şekilde) ve 6 mg HRP enzimi eklenerek çözelti karıştırılmıştır. Üçlü elektrot sistemi cam reaksiyon hücresine daldırılmış, -1,2 ile +1,2 V'luk potansiyel aralığında ve 100 mV/s'lik tarama hızında dönüşümlü voltametri metodu kullanılarak 4 dakikalık sürede elektrot yüzeyinde Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP biyokompozit filmi sentezlenmiştir.

3.6.5.4. Poli(GMA-co-MTM)/HRP/Au Çalışma Elektrodunun Hazırlanışı

Poli(GMA-co-MTM) çözeltisinden (bkz. Bölüm 3.4) 20 µL alınarak altın elektrot yüzeyine damlatılmış ve solventi uçurulmuştur. Poli(GMA-co-MTM) film ile kaplanan elektrot 6 mg/mL'lik HRP çözeltisinde 1 gece +4°C'de bekletilmiştir.

3.6.5.5. PPy/HRP/Au Çalışma Elektrodunun Hazırlanışı

Altın elektrot yüzeyinde pirolün elektropolimerizasyonu için, 0,05 M sitrat tamponunun (pH 6,5) 10 mL'sine sırasıyla 6 mg SDS, 7 µL pirol monomeri (çözeltideki konsantrasyonu 0,01 M olacak şekilde) ve 6 mg HRP enziminin eklendiği polimerizasyon ortamı hazırlanmıştır. Üçlü elektrot sistemi cam reaksiyon hücresine daldırılmış, -1,2 ile +1,2 V'luk potansiyel aralığında ve 100 mV/s'lik tarama hızında dönüşümlü voltametri metodu kullanılarak 4 dakikalık sürede elektrot yüzeyinde PPy/HRP biyofilmi sentezlenmiştir.

3.6.5.6. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC Çalışma Elektrodunun Hazırlanışı

Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP biyokompozit film, camı karbon elektrot yüzeyinde Bölüm 3.6.5.3'deki gibi sentezlenmiştir.

3.6.6. PPy/PGA/HRP/GC Çalışma Elektrodunun Hazırlanışı

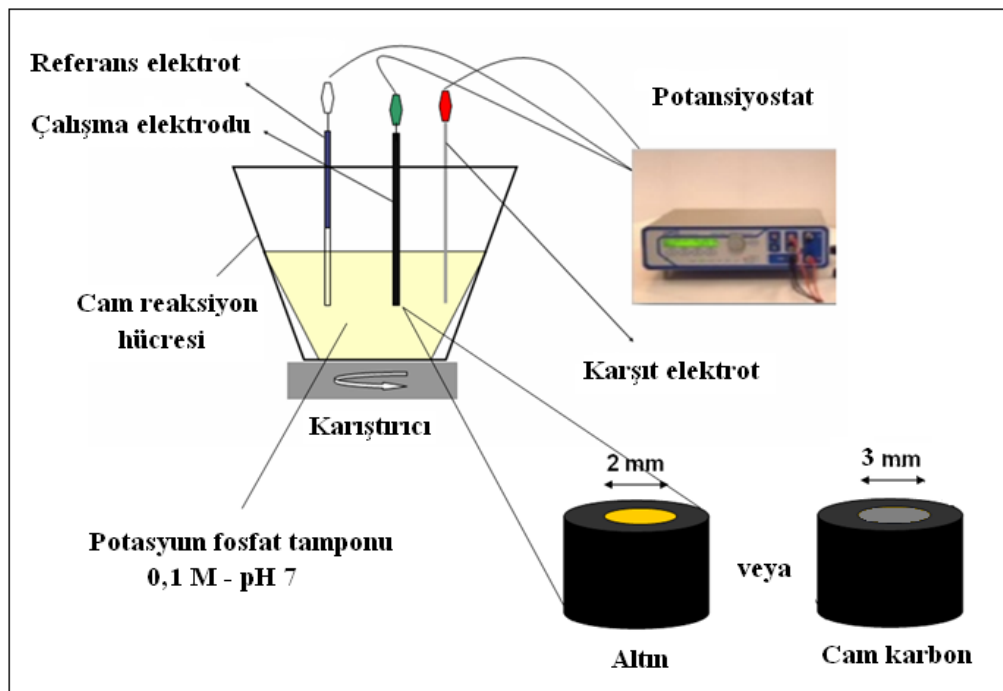
PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodunun hazırlanması ve amperometrik fenol ölçümleri sürekli sistemde CHI marka potansiyostat kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sürekli sistemde kullanılan üçlü elektrot sistemi akış hücresinde bulunan 2 mm çapında camı karbon çalışma elektrodundan, platin karşıt elektrottan ve Ag/AgCl referans elektrodundan oluşmaktadır. Çalışma elektrodunun yapımı için öncelikle PGA çözeltisi hazırlanmıştır (bkz. Bölüm 3.6.1). Hazırlanan PGA çözeltisinin 10 mL'sine 6 mg SDS ve 7 µL pirol monomeri (ortamda 0,01 M pirol olacak şekilde) eklenip karıştırılmış ve çözelti 1 mL/dak debide üçlü elektrot sisteminin bağlı olduğu akış hücresinden HPLC pompası vasıtasıyla sirküle edilmiştir. Sirkülasyon sırasında camı karbon elektrot yüzeyinde 0 ve +1,2 V'luk potansiyel aralığında, dönüşümlü voltametri (CV) tekniği kullanılarak 5 dakikalık bir sürede pirol elektropolimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra, üzerinde PPy/PGA filmin kaplı olduğu camı karbon elektrodu içeren akış hücresi sürekli sistemden çıkarılarak %25'lik glutraldehit ortamına bırakılmış ve +4°C'de 1 gece bekletilmiştir. Süre sonunda akış hücresi 0,3 mg/mL'lik HRP enzim çözeltisine (bkz. Bölüm 3.2) bırakılıp +4°C'de 1 gece bekletilmiştir.

3.7. Amperometrik Ölçümlerin Yapılışı

3.7.1. Kesikli Ölçümler

Kesikli sistem, cam reaksiyon hücresi içerisine daldırılmış üçlü elektrot sisteminden oluşmaktadır. Enzim tutuklu çalışma elektrodu ile birlikte, referans elektrot ve karşıt elektrot, 10 mL hacimde 0,1 M - pH 7 fosfat tamponu ve destek elektrolit (tampon içerisindeki konsantrasyonu 0,7 mg/mL olan lityum klorid) içeren kesikli reaksiyon hücresine daldırılarak sisteme sabit bir elektrik potansiyeli uygulanmıştır. Sistemde kararlı hal akım değerine ulaşıldıktan sonra, reaksiyon

ortamina konsantrasyonu sabit hidrojen peroksit çözeltisi ile birlikte artan konsantrasyonlarda fenolik çözeltiler eklenerek, 600 rpm'lik karıştırma hızında enzimatik reaksiyon gerçekleştirilmiş ve enzimatik reaksiyon ürünleri olan fenoksi radikalleri uygulanan potansiyel değerinde elektrot üzerinde indirgenmiştir. İndirgenme süresince gerçekleşen elektron transferi, potansiyostat tarafından akım sinyallerine dönüştürülmüştür. Kesikli sistem deney düzeneğine ait genel görünüm Şekil 3.3'de verilmiştir.

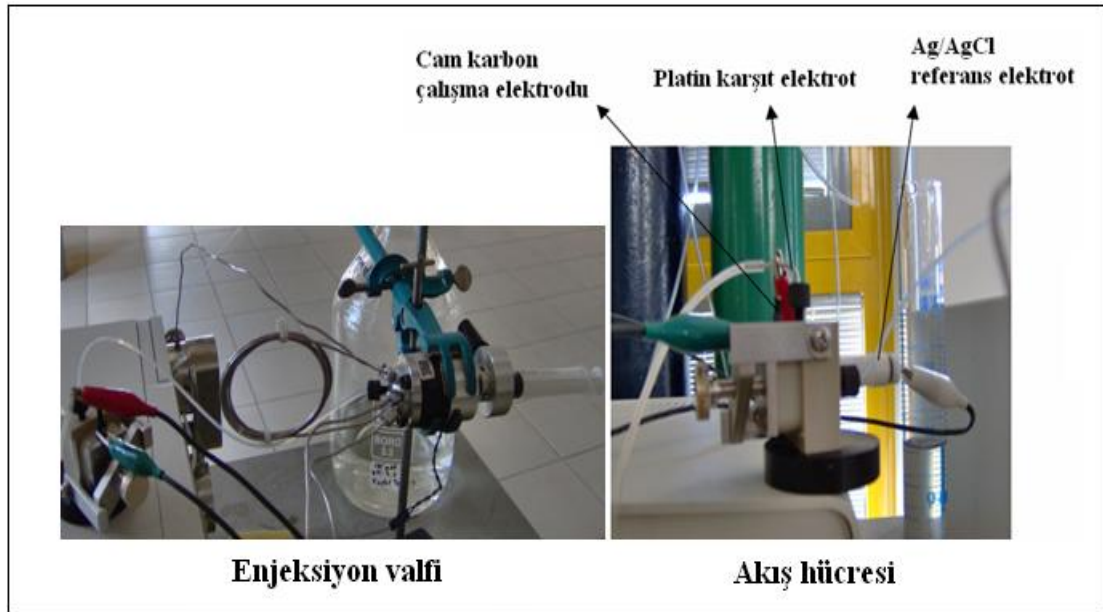


Şekil 3.3. Kesikli sistem deney düzeneği.

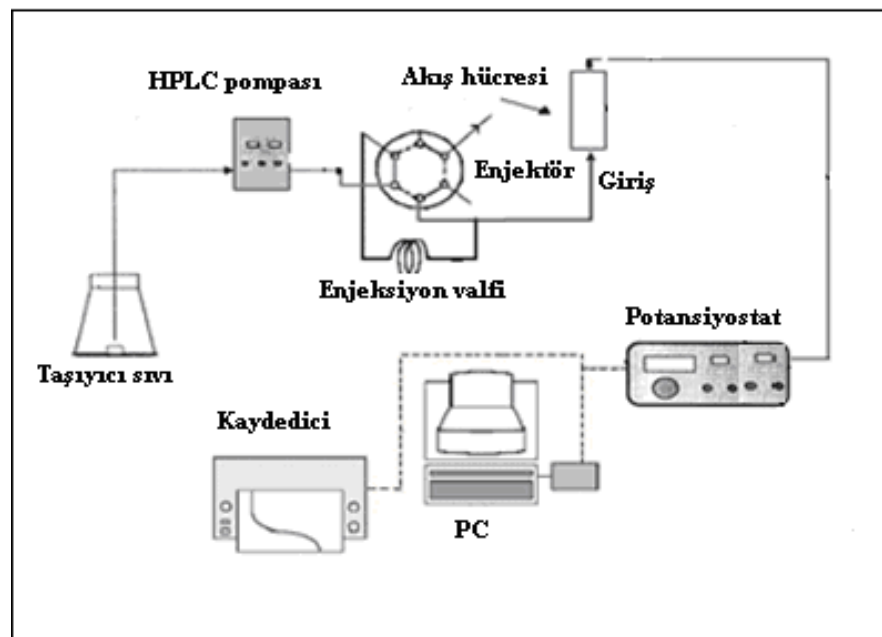
3.7.2. Sürekli Ölçümler

Sürekli sistem deney düzeneği bir potansiyostattan, 1 mL hacimli enjeksiyon valfinden (Shimadzu) (Şekil 3.4), HPLC pompasından (GBC LC 1150) ve çapraz akışlı akış hücresinden (CHI 130) (Şekil 3.4) oluşmaktadır. Sürekli sistem fenol ölçümlerinde, akış hücresi içerisinden 0,7 mg/mL lityum klorid içeren 0,1 M - pH 7 fosfat tamponu (taşıyıcı sıvı) HPLC pompası vasıtasıyla farklı akış hızlarında, uygun işletme potansiyeli altında geçirilmiştir. Taşıyıcı sıvı akış hücresinden akarken kararlı hal akım değerine ulaşıldıktan sonra, sabit konsantrasyonda hidrojen peroksit çözeltisi içeren artan konsantrasyonlardaki fenolik çözeltiler, enjeksiyon valfi yardımıyla sisteme enjekte edilmiştir. Enjeksiyon valfinden toplanan 1 mL'lik fenolik

çözelti, taşıyıcı sıvıya karışarak, akış hücresine ulaşmış ve akış hücresinde çalışma elektrodunda bağlı olan enzimle reaksiyona girmiştir. Enzimatik reaksiyon ürünleri olan fenoksi radikalleri, uygulanan potansiyel değerinde elektrot üzerinde indirgenmiş ve indirgenme süresince gerçekleşen elektron transferi, potansiyostat tarafından pik şeklindeki akım sinyallerine dönüştürülmüştür. Sürekli sistem deney düzeneğine ait genel görünüm Şekil 3.5’de verilmiştir.



Şekil 3.4. Sürekli sistem enjeksiyon valfi ve akış hücresi.



Şekil 3.5. Sürekli sistem deney düzeneği.

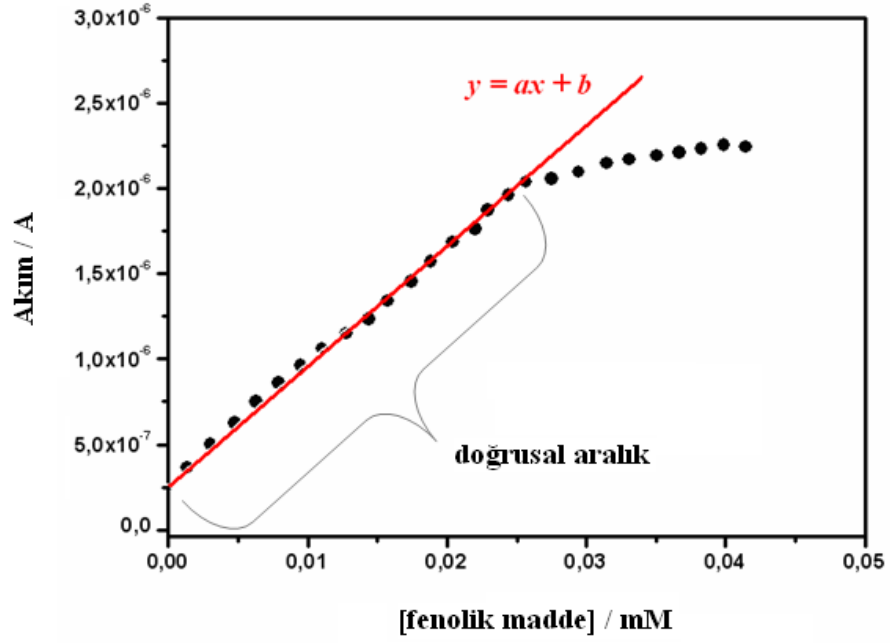
3.7.3. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

Kesikli ve sürekli sistemde fenolik bileşiklerin ortama eklenmesi sonucu oluşan akım değerleri kullanılarak söz konusu fenolik maddeler için kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır. Kesikli sistemde, belli bir konsantrasyondaki fenolik bileşiğin ortama eklenmesi sonucu elde edilen kararlı hal akım değeri, bir önceki eklemede elde edilen kararlı hal akım değerinden çıkarılarak akım değişimi hesaplanmış ve bu değişim değeri eklenen fenolik maddenin konsantrasyonuna karşı grafikte işaretlenmiştir. Konsantrasyonu artırılarak yapılan her ekleme için bu işlem tekrarlanmıştır. Böylelikle eklenen fenolik madde konsantrasyonlarına karşı hesaplanan akım değişimleri grafiğe geçirilerek söz konusu fenolik madde için analitik eğri çizilmiştir. Sürekli sistemde ise, belli bir konsantrasyondaki fenolik bileşiğin taşıyıcı sıvıya enjeksiyonu sonucu oluşan pikin uç noktasındaki akım değeri, kararlı hal akım değerinden (taşıyıcı sıvı geçerken okunan akım değeri) çıkarılarak enjekte edilen fenolik maddenin konsantrasyonuna karşı grafikte işaretlenmiştir. Sürekli sistemde kararlı hal akımı, çalışma elektrodu her enjeksiyon sonunda taşıyıcı sıvı ile yıkandığından dolayı her zaman başlangıçtaki akım değerine dönmüştür. Konsantrasyonu artırılarak yapılan her enjeksiyon için işlem tekrarlanmış ve enjekte edilen fenolik madde konsantrasyonlarına karşı oluşan pik akımları, kararlı hal akım değerinden çıkarılarak grafiğe geçirilmiş ve söz konusu fenolik madde için analitik eğri çizilmiştir. Gerek kesikli, gerekse sürekli sistemde elde edilen analitik eğri üzerindeki doğrusal bölge, fenolik maddenin ölçümü için gerekli olan analitik parametrelerin hesaplandığı kalibrasyon eğrisidir.

3.7.4. Analitik Ölçüm Parametrelerinin Hesaplanması

3.7.4.1. Doğrusal Aralık

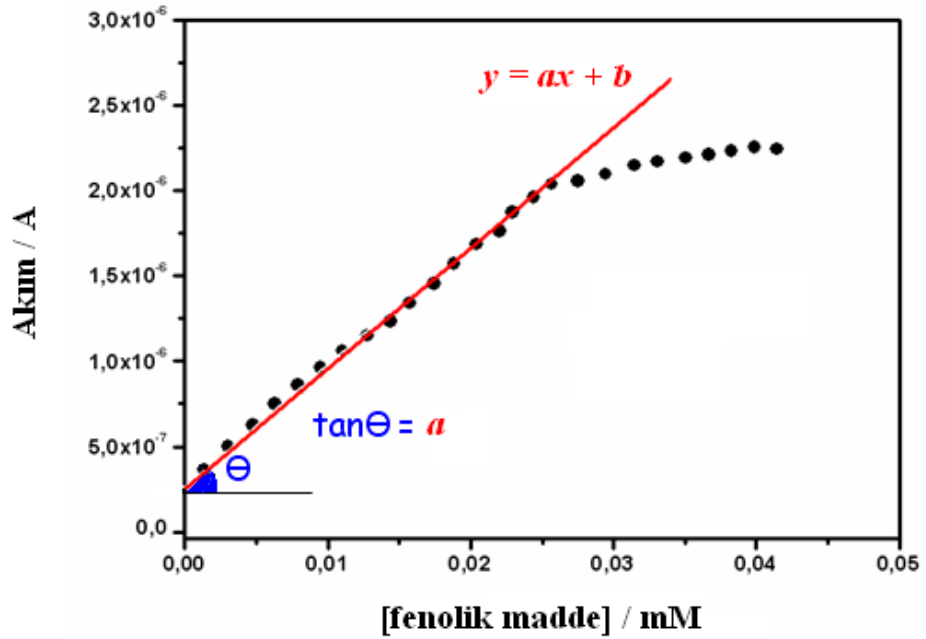
Doğrusal aralık, bir fenolik madde için hazırlanmış olan analitik eğrinin doğrusal bölgesidir, başka bir deyişle kalibrasyon eğrisinin sınırlarıdır. Biyosensör için konsantrasyon ölçüm aralığı tanımlanan bu doğrusal aralıktır. Diğer analitik ölçüm parametreleri, analitik eğrilerin doğrusal aralık bölgeleri kullanılarak hesaplanmıştır. Şekil 3.6'da analitik eğri ve üzerindeki doğrusal aralık bölgesi gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Analitik eğriye ait doğrusal aralık (kalibrasyon eğrisi).

3.7.4.2. Ölçüm Hassasiyeti

Biyosensörün hassasiyeti, oluşturulan kalibrasyon eğrisinin eğimidir. Hassasiyet ($\tan \Theta$) ölçümünün şematik gösterimi Şekil 3.7'dedir.



Şekil 3.7. Biyosensör hassasiyet değerinin ölçümü.

3.7.4.3. Belirleme Limiti (LOD)

Biyosensörün cevap verebildiği en küçük konsantrasyon değeri belirleme limiti olarak adlandırılır. Belirleme limiti $3 s_b / m$ formülü ile hesaplanmıştır [Hasebe and Osteryoung, 1975]. Burada m analit için hazırlanmış kalibrasyon eğrisinin doğrusal alarıktaki eğimini (hassasiyet değeri), s_b aynı konsantrasyondaki analitin reaksiyon ortamına ard arda eklenmesiyle oluşan akım değişimleri arasındaki standart sapma değerini göstermektedir.

3.7.4.4. İşletme Kararlılığı

Ölçüm metodunun güvenilirliği işletme kararlılığı (stabilite) ile tanımlanır. Biyosensörde ölçümün standart sapma değerinin düşük çıkması, ölçümü doğruluğa yaklaştırmaktadır. Çalışmada, aynı konsantrasyondaki fenolik maddenin reaksiyon ortamına ard arda eklenmesi sonucu oluşan akım değişimleri arasındaki standart sapma değeri, direkt olarak işletme kararlılığını vermiştir. Ayrıca çalışmada işletme kararlılığı ya \pm standart sapma değeri ya da %RSD (relative standard deviation) cinsinden verilmiştir. %RSD değeri, işletme kararlılığının tespiti için hesaplanan standart sapma değerlerinin, yine aynı ölçümde elde edilen akım değişimlerinin ortalamasına oranının 100 katı şeklinde hesaplanmıştır.

3.7.4.5. Depo Kararlılığı

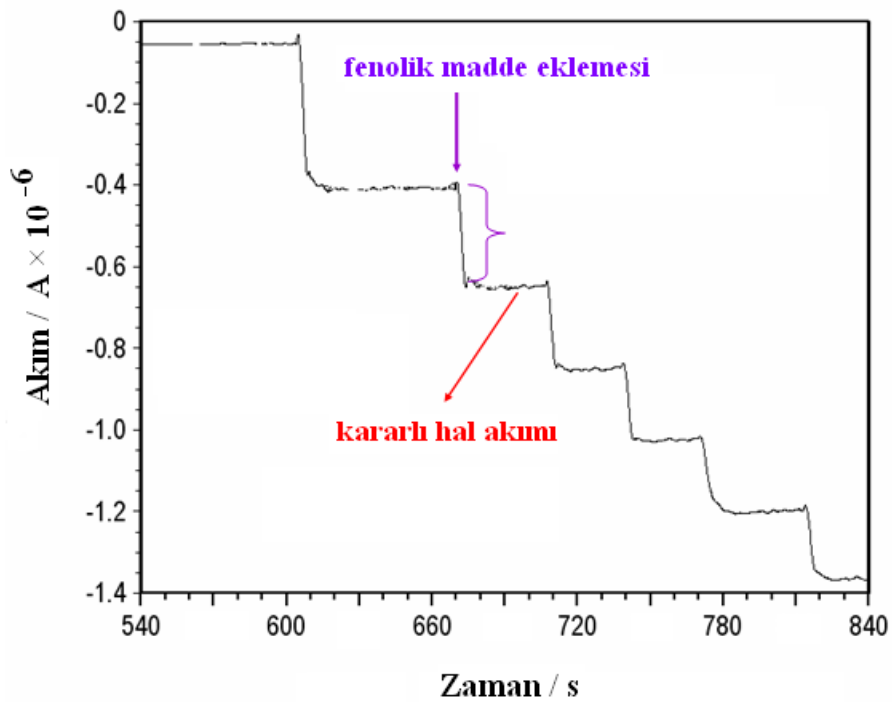
Depo kararlılığının tespiti, biyosensörün kullanım ömrünün belirlenebilmesi açısından önemlidir. Çalışmada hazırlanan tüm çalışma elektrotları, kullanılmadıkları zamanlarda 0,1 M - pH 7 fosfat tamponu içerisine bırakılmış ve +4°C sıcaklıkta buzdolabında bekletilmiştir. Depo kararlılığının tespiti, belli günlerde aynı konsantrasyondaki fenolik maddenin ölçümü ile belirlenmiştir. Günler arası ölçümlerde elde edilen akım değerlerindeki düşüşler, çalışma elektrodunun kullanıldığı ilk günkü akım değeri ile kıyaslanarak biyosensör için % elektrot aktivitesi kaybı olarak ifade edilmiştir.

3.7.4.6. Verimlilik

Biyosensörün verimliliği, yani ölçüm performansı ya da ne kadar doğrulukta konsantrasyon okuması yapabildiğinin tespiti için reaksiyon ortamına bilinen konsantrasyondaki fenolik madde eklenmiş, elde edilen akım değeri o maddeye ait kalibrasyon eğrisinde yerine konarak ne kadar konsantrasyon değerine tekabül ettiği bulunmuştur. Biyosensörün kalibrasyona göre ölçtüğü konsantrasyon değerinin gerçek konsantrasyon değerine oranı verimlilik (recovery) değerini vermiştir. Çalışmada bu oran 100 ile çarpılarak %verimlilik (%recovery) cinsinden belirtilmiştir. Böylelikle biyosensörün ölçüm sonucunun söz konusu fenolik maddenin gerçek konsantrasyon değerine ne kadar yaklaştığı belirlenmiştir.

3.7.4.7. Yanıt Süresi

Çalışmada yanıt süresi, reaksiyon ortamına fenolik madde eklemesi yapıldığı andan, akım değişimi gerçekleştikten sonra kararlı hal akımının %95'ine ulaşıldığı ana kadar geçen süre olarak belirtilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Biyosensörün yanıt süresi.

3.8. Biyosensör İşletme Parametrelerinin Belirlenmesi

Biyosensörde en iyi ölçüm performansına, uygun çalışma elektrotlarının hazırlanmasının yanı sıra, işletme parametrelerinin optimize edilmesiyle ulaşılmaktadır. Biyosensör işletme parametreleri, kullanılan enzimin tipine, immobilizasyon mekanizmasına, sentezlenen iletken polimerlerin yapısına ve bunların enzimle olan ilişkilerine, ölçümü yapılacak analitin çeşidine göre farklılık gösterdiğinden çalışmada kullanılan farklı çalışma elektrotları için en uygun işletim parametreleri belirlenmiştir.

3.8.1. Çalışma Potansiyeli Optimizasyonu

Hazırlanan çalışma elektrotları için, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan fenoksi radikallerinin elektrot üzerinde en etkili indirgendiği potansiyel değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla, 10 mL hacimde 0,7 mg/mL lityum klorid içeren 0,1 M - pH 7 fosfat tamponundan oluşan reaksiyon ortamına çalışma potansiyeli değiştirilerek aynı konsantrasyondaki fenolik madde eklenmiş ve yapılan her ekleme için akım değişimleri kaydedilmiştir (her eklemeden önce temiz bir reaksiyon ortamı hazırlanmıştır). Elde edilen akım değişimleri uygulanan potansiyel değerlerine karşı grafiğe geçirilmiştir.

3.8.2. pH Optimizasyonu

pH değeri enzimatik reaksiyonun performansını önemli ölçüde etkilediğinden, bu etki de direkt olarak akım değerlerine yansıdığından dolayı hazırlanan çalışma elektrotları için fenol ölçümlerinden önce en uygun pH değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla, 0,7 mg/mL lityum klorid içeren 0,1 M'lık tampon çözeltiler farklı pH değerlerinde hazırlanmıştır. Bu tampon çözeltilerden oluşmuş 10 mL'lik reaksiyon ortamlarına uygun çalışma potansiyeli uygulanarak aynı konsantrasyondaki fenolik madde eklenmesi yapılmış ve her ortamda elde edilen akım değişimleri kullanılan tampon çözeltinin pH değerlerine karşı grafiğe geçirilmiştir.

3.8.3. Hidrojen peroksit Optimizasyonu

Hidrojen peroksit konsantrasyonu, *horseradish peroxidase* enziminin fenol kataliz reaksiyonları için en önemli parametredir; azlığı enzimin fenol oksidasyonunu kısıtlarken, aşırı miktarları enzim inhibisyonuna neden olmaktadır. Bu nedenle çalışmada elektrotlar için en uygun hidrojen peroksit konsantrasyonları tespit edilmiştir. Bu amaçla 10 mL hacimde 0,7 mg/mL lityum klorid içeren 0,1 M - pH 7 fosfat tamponundan oluşan reaksiyon ortamlarına uygun çalışma potansiyeli altında, hidrojen peroksit konsantrasyonunu değiştirerek aynı konsantrasyonda fenolik madde eklemeleri yapılmış ve yapılan her ekleme için akım değişimleri kaydedilmiştir (her eklemeden önce temiz bir reaksiyon ortamı hazırlanmıştır). Elde edilen akım değişimleri hidrojen peroksit konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilmiştir. Çalışmada ayrıca, farklı hidrojen peroksit konsantrasyonlarında belli bir fenolik madde için kalibrasyonlar yapılmış ve bu kalibrasyonlar birbirleriyle kıyaslanarak uygun hidrojen peroksit konsantrasyonları tespit edilmiştir.

3.9. Gaz Kromatografi Metodu (GC-MS) ile Fenolik Bileşiklerin Ölçümü

Tez kapsamında 18 çeşit fenolik madde, farklı tipte hazırlanmış çalışma elektrotlarından oluşan biyosensörlerde test edilmiştir. Söz konusu fenolikler, ölçüm metotlarının karşılaştırılması amacıyla bir de gaz kromatografi cihazında (Agilent marka) GC-MS metoduyla ölçülmüştür. Ölçüm metodu aşağıdaki şekilde kurulmuştur:

| | |
|-----------------------|--|
| Kolon adı: | DB-5 MS kolonu |
| Kolon model numarası: | Agilent 19091S-433 HP-5MS (Capillary 30 m × 250 µm × 0,25 µm nominal) |
| Taşıyıcı gaz: | Helyum |
| İnlet sıcaklığı: | 280°C |
| İnlet modu: | Pulsed splitless |
| Kolon akışı: | 1,2 mL/dak |

| | |
|------------------|--|
| Fırın sıcaklığı: | 40°C'da 2 dakika bekleme, 10°C/dak. ile 100°C'ye çıkma, 2°C/dak ile 105°C'ye çıkma, 10°C/dak ile 250°C'ye çıkma şeklinde programlanmıştır. |
| Aux sıcaklığı: | 280 °C |
| MS Quad: | 150 °C |
| MS Source: | 230 °C |
| Ölçüm süresi: | 29,7 dakika |

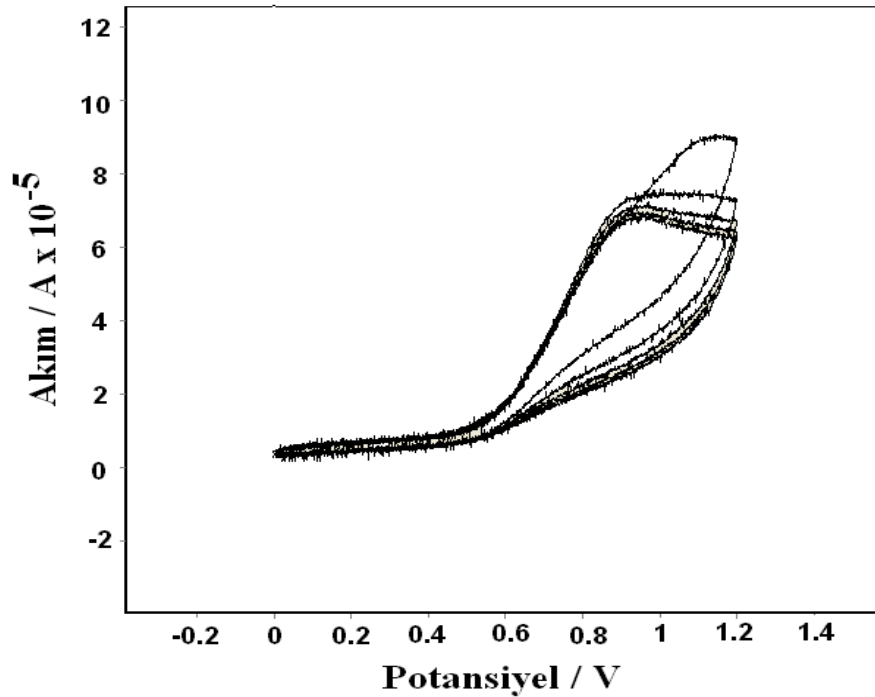
GC-MS ölçümleri için, 18 çeşit fenolik maddeyi bir arada içeren bir stok, her bir fenoliğin konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde saf metanolde hazırlanmıştır. Bu stok fenolik çözeltilerden konsantrasyonu sırasıyla 1,5-3-6,25-13-25-50-100 ve 200 µM olacak şekilde 8 adet standart ara çözeltiler hazırlanmıştır. GC-MS cihazının programı yukarıdaki gibi ayarlanmış ve bu 8 standart fenolik çözeltiler ölçüm için cihaza verilmiştir. Her fenolik madde, cihazda yanma sıcaklığına göre farklı zamanlarda sırasıyla pik şeklinde gözlenmiş ve cihaz, her bir fenoliğin konsantrasyonuna karşı oluşan pik alanlarını otomatik olarak hesaplamıştır. Fenolik konsantrasyonuna karşı hesaplanan bu alanlar grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve fenolik maddelerin analitik ölçüm parametreleri bu kalibrasyonlardan hesaplanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. PPy/PGA/HRP/Au Çalışma Elektrodu Bulguları

4.1.1. PPy/PGA/HRP/Au Çalışma Elektroduna Ait Film Karakterizasyonu

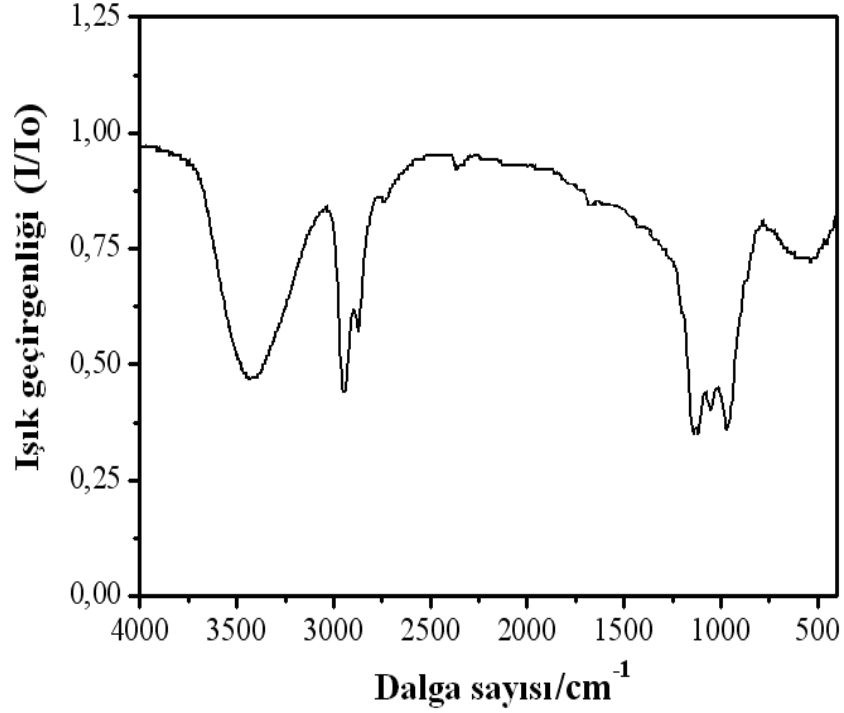
Bölüm 3.6.1’de açıklandığı gibi hazırlanan PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodunun elektropolimerizasyon sırasında elde edilmiş dönüşümlü voltametri grafiği Şekil 4.1’de verilmiştir. Şekil 4.1’de polipirole ait tipik dönüşümlü voltamogram grafiği elde edildiğinden altın elektrot üzerinde PGA varlığında pirolün polimerize olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4.1. PPy/PGA filmine ait dönüşümlü voltametri grafiği.

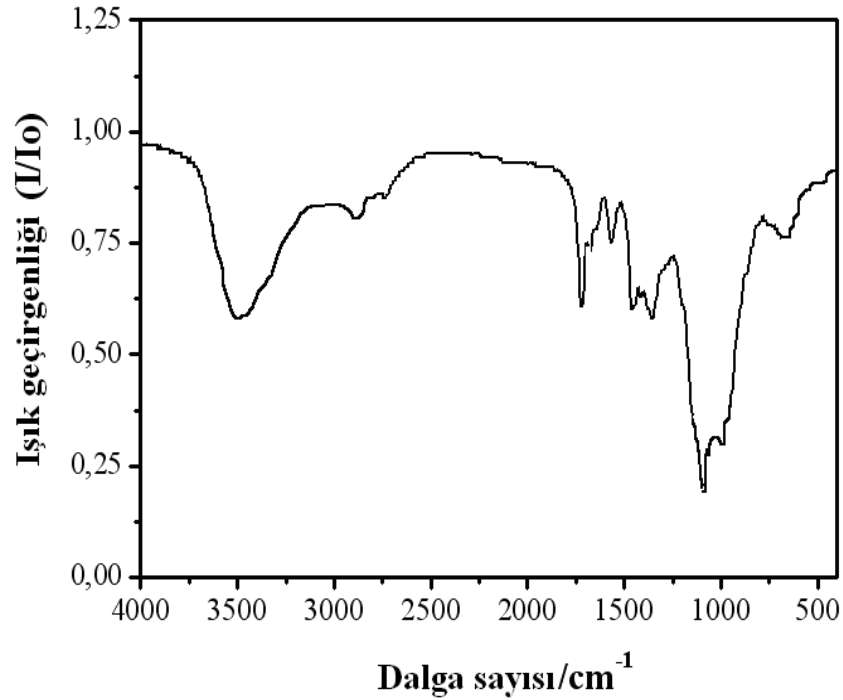
Altın elektrot yüzeyinde sentezlenen saf polipirole ait ayar spektrumu (fourier dönüşüm spektroskopisi (FTIR) Şekil 4.2’de verilmiştir. FTIR spektrumunda 3430 cm^{-1} dalga boyunda oluşan pik suya ait $-\text{OH}$ gruplarını, 1450 cm^{-1} tipik polipirol halkası

gruplarını, 800-1040 cm^{-1} civarındaki pikler ise pirol polimerizasyonunda oluşan =C-H gruplarını göstermektedir [Vishnuvardhan et al., 2006; Chen et al., 2003].



Şekil 4.2. Saf polipirol filmin FTIR spektrumu.

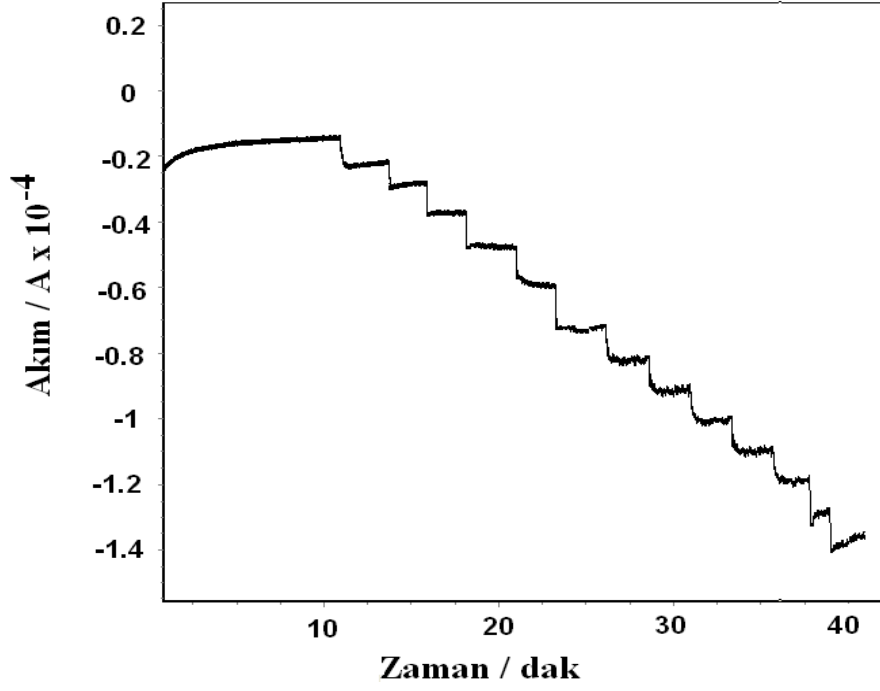
Altın elektrot yüzeyinde PGA ortamında pirolün elektropolimerizasyonu ile oluşan PPy/PGA kompozit filmine ait FTIR spektrumu ise Şekil 4.3'de gösterilmiştir. FTIR spektrumunda 3430 cm^{-1} dalga boyunda oluşan pik suya, karboksil gruplarına ait -OH gruplarını ya da alkolik hidroksil grupları, 2945 cm^{-1} ve 2740 cm^{-1} dalga boyunda oluşan pikler sırasıyla glutraldehite ait -CH ve -CH₂ gruplarını belirtmektedir [Margel, 1982]. 800-1040 cm^{-1} dalga sayısı civarında Polipirolün =C-H gruplarını belirten pikler, PPy/PGA kompozit filmine ait FTIR spektrumundan da açıkça belli olmaktadır. PPy, PGA ortamında elektropolimerize olabilmiş ve polimerizasyon sırasında PGA ile PPy/PGA kompozit filmini oluşturmuştur.



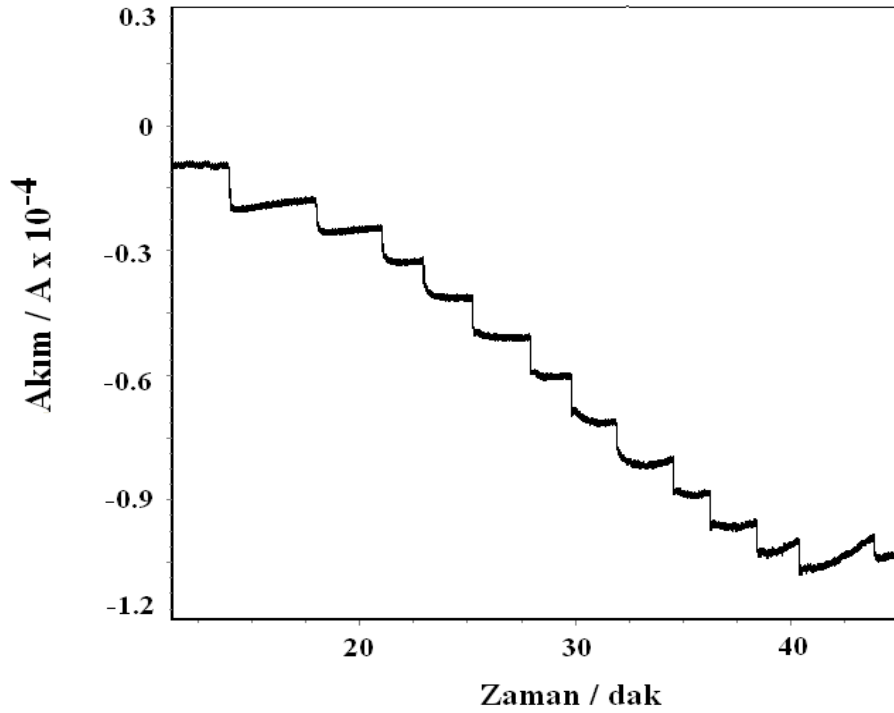
Şekil 4.3. PGA/PPy kompozit filmine ait FTIR spektrumu.

4.1.2. PPy/PGA/HRP/Au Çalışma Elektrodu ile Fenol ve Türevlerinin Ölçümü

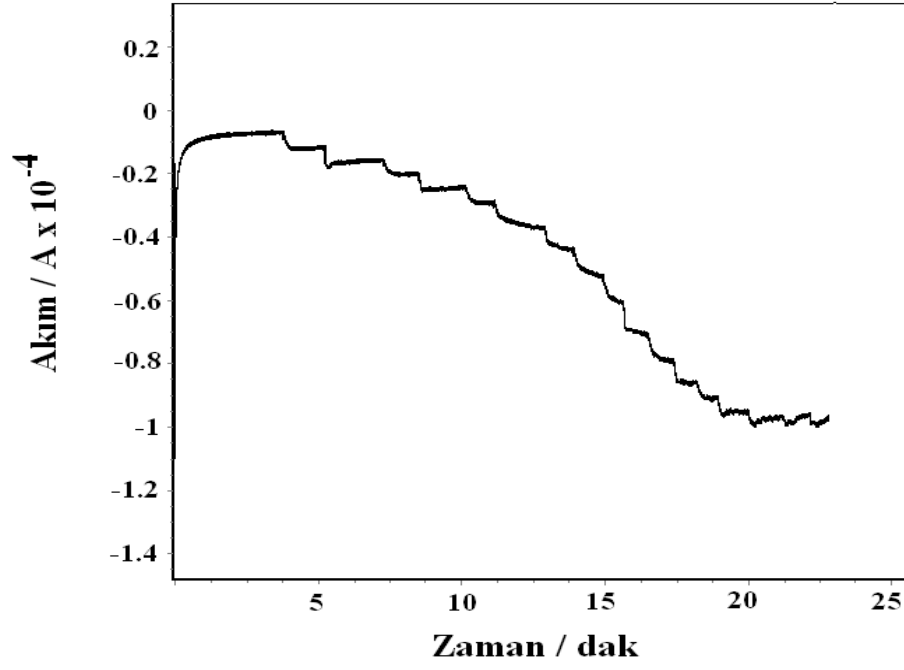
PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodu çalışma kapsamında kullanılan ilk çalışma elektrodudur ve bu elektrot ile 4 fenolik bileşiğin ölçümü kesikli ortamda 600 rpm'lik karıştırma hızında -50 mV çalışma potansiyeli uygulanarak ölçülmüştür. Bunun için 0,7 mg/mL lityum klorid içeren 0,1 M - pH 7 fosfat tamponunun 10 mL'sine her bir fenolik bileşik için artan konsantrasyonlarda eklemeler yapılmış ve her ekleme ile birlikte hücre içindeki konsantrasyonu 240 μM olacak şekilde hidrojen peroksit çözeltisi de reaksiyon hücresine ilave edilmiştir. Fenol ve *p*-benzokinon için reaksiyon ortamına 16 μM 'dan 272 μM 'a kadar, *p*-kresol için 1 μM 'dan 208 μM 'a kadar ve 2-klorofenol için 1 μM 'dan 144 μM 'a kadar eklemeler yapılmış ve her ekleme sonunda elde edilen akım değerleri zamana bağlı olarak görüntülenmiştir (akım-zaman grafiği). Fenol, *p*-benzokinon, *p*-kresol ve 2-klorofenol eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafikleri sırasıyla Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



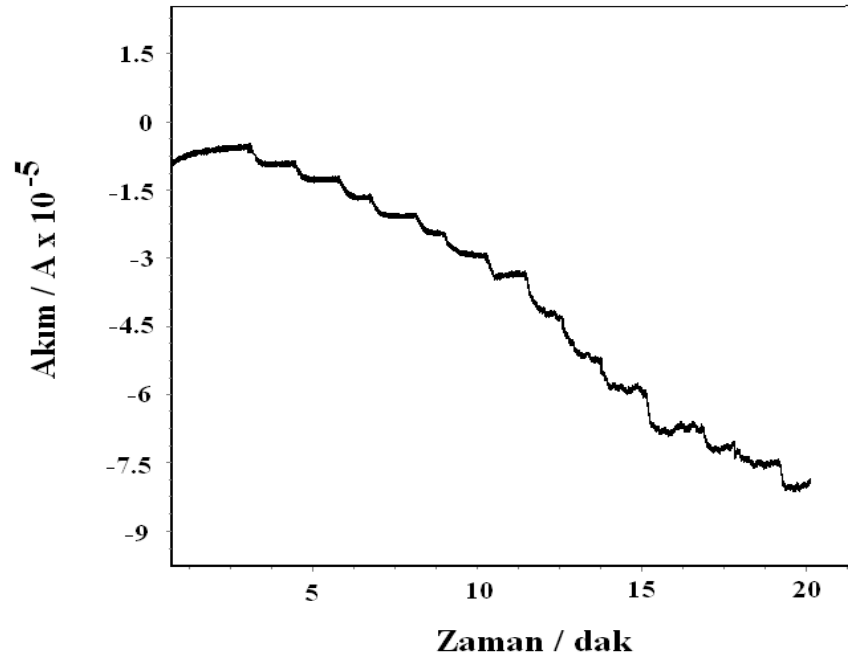
Şekil 4.4. PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodundan fenol eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği.



Şekil 4.5. PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodundan *p*-benzokinon eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği.

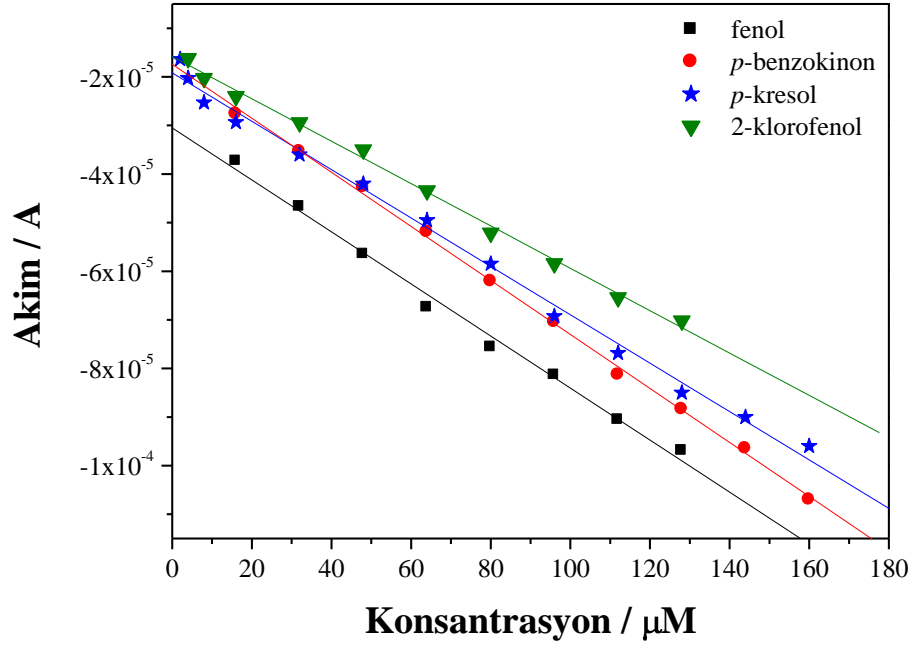


Şekil 4.6. PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodundan *p*-kresol eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği.



Şekil 4.7. PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodundan 2-klorofenol eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği.

Yukarıda anlatıldığı şekilde test edilen her fenolik bileşik için akım-zaman grafiklerinden elde edilen akım değişimleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiş ve söz konusu fenolikler için kalibrasyon eğrileri çıkarılmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodunda test edilen fenolik bileşiklerin kalibrasyon grafikleri.

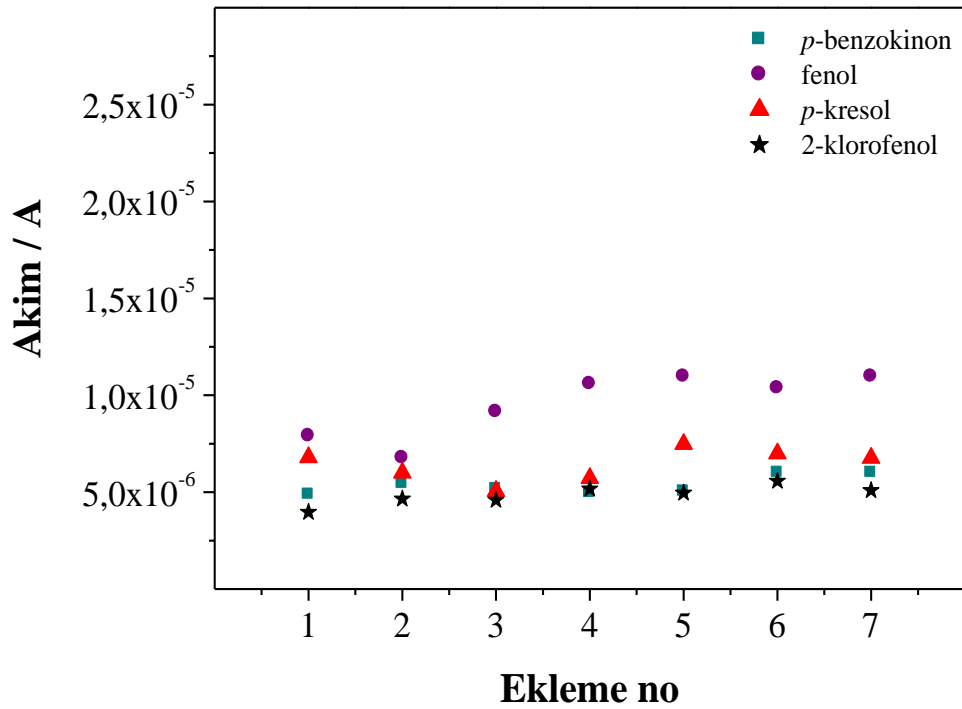
Çizelge 4.1'de test edilen fenolik türlerin kalibrasyonlarından elde edilen analitik hesaplamalar verilmiştir.

Çizelge 4.1. PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodu için fenol ve türevlerinin ölçümünde hesaplanan analitik parametreler.

| <i>Fenolik tür</i> | r^2 | <i>Hassasiyet</i> ($nA/\mu M$) | <i>Doğrusalalık</i> (μM) | <i>LOD</i> (μM) | <i>Yanıt süresi</i> (s) | <i>%RSD</i> |
|----------------------|-------|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|-------------|
| Fenol | 0,99 | 500 | 16-128 | 8,46 | 24 | 15 |
| <i>p</i> -benzokinon | 0,99 | 600 | 16-160 | 2,39 | 10 | 8,9 |
| <i>p</i> -kresol | 0,99 | 500 | 2-160 | 1,82 | 18 | 6 |
| 2-klorofenol | 0,99 | 400 | 4-128 | 3,84 | 16 | 10 |

Çizelge 4.1'den görüldüğü gibi test edilen fenoller arasında en düşük belirleme limiti (LOD) *p*-kresol için 1,82 μM , en yüksek LOD ise fenol için 8,46 μM olarak hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin doğrusal ölçüm aralığı fenol için 16-128 μM , *p*-benzokinon için 16-160 μM , *p*-kresol için 2-160 μM , 2-klorofenol için ise 4-128 μM olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi regresyon katsayısı her fenolik için 0,99 olarak bulunmuştur. En yüksek hassasiyet değeri *p*-benzokinon ölçümü için 600 nA/ μM olarak hesaplanmıştır. PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodundan elde edilen hassasiyet değerleri hem tez çalışması kapsamında diğer çalışma elektrotlarından elde edilen, hem de literatürde rapor edilmiş hassasiyet değerlerinden yüksektir. Bu sonuç, altın levha elektrodun geniş yüzey alanına sahip olmasına dayandırılabilir. Ayrıca, HRP enzimi bu çalışma elektroduna PGA aracılığıyla kovalent bağlanmıştır. PGA, glutraldehite göre daha fazla aldehit grup içerdiğinden enzim bağlama kapasitesi glutraldehite göre oldukça fazladır [Margel, 1982; Margel and Rembaum, 1980]. Buna ek olarak PGA'nın yapısında bulunan konjuge aldehit grupları elektroaktif olduğundan, PGA etkin elektron transfer özelliği göstermektedir. Gerek PGA'nın fazla enzim bağlama kapasitesi, gerekse de elektroaktif özellik göstermesi akım değerlerinin dolayısıyla da hassasiyetin yüksek olmasını sağlamıştır.

İşletme kararlılığının tespiti için, reaksiyon hücresine 16 μM 'lık eklemeler herbir fenolik için ard arda yapılmıştır (Şekil 4.9). Bu eklemeler sonucu elde edilen akım değişimlerinin standart sapma değerleri (%RSD) oldukça yüksek çıkmıştır (Çizelge 4.1). Standart sapma değerlerinin yüksek oluşu, ölçüm hassasiyetleri her ne kadar yüksek çıkmış da olsa LOD değerlerinin büyük çıkmasına neden olmuştur.



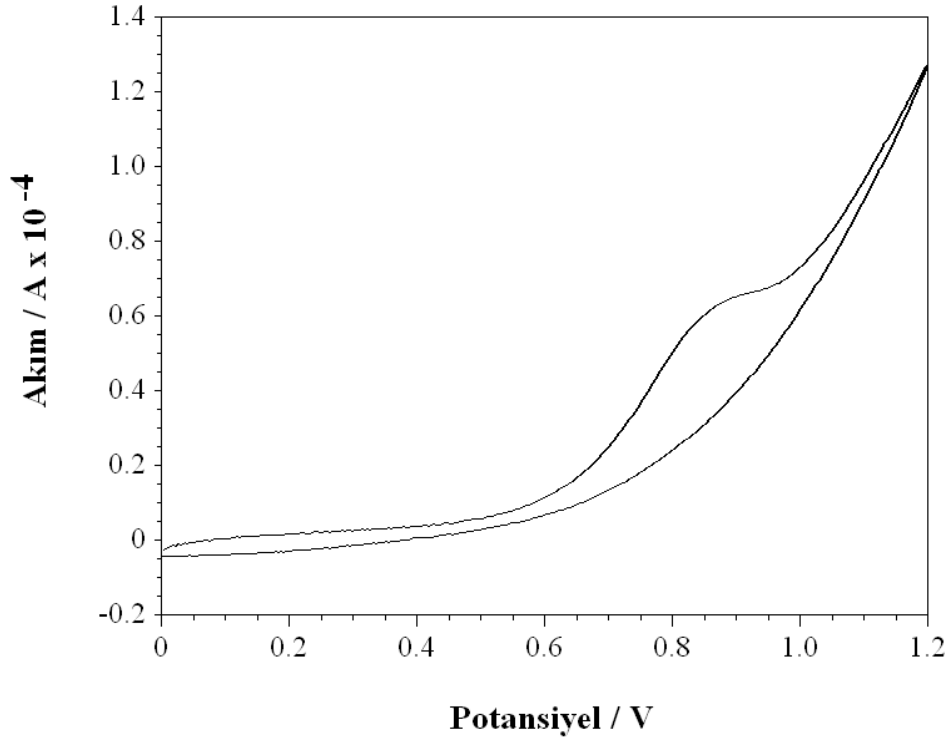
Şekil 4.9. PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodunun test edilen fenolikler için işletme kararlılığı grafikleri.

4.2. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au Çalışma Elektrodu Bulguları

4.2.1. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au Çalışma Elektroduna Ait Film Karakterizasyonu

Bölüm 3.6.2’de anlatıldığı gibi, altın elektrot yüzeyinde Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA kompozit filmi sentezlenirken elde edilen dönüşümlü voltametri grafiğinin son döngüsü Şekil 4.10’da gösterilmiştir. Pirol monomerinin Poli(GMA-co-MTM) ile kaplanmış altın elektrot üzerinde polimerleştiği, Şekil 4.10’da polipirolün oluşumunu gösteren tipik voltamogram grafiğinden anlaşılmaktadır. Poli(GMA-co-MTM)’nin yapısında bulunan MTM kopolimeri iletken tiyofen gruplar içerdiğinden, Poli(GMA-co-MTM) bu gruplar üzerinden pirolle elektropolimerize olabilmektedir. Poli(GMA-co-MTM) kendisi yalıtkan bir polimer olmasına rağmen,

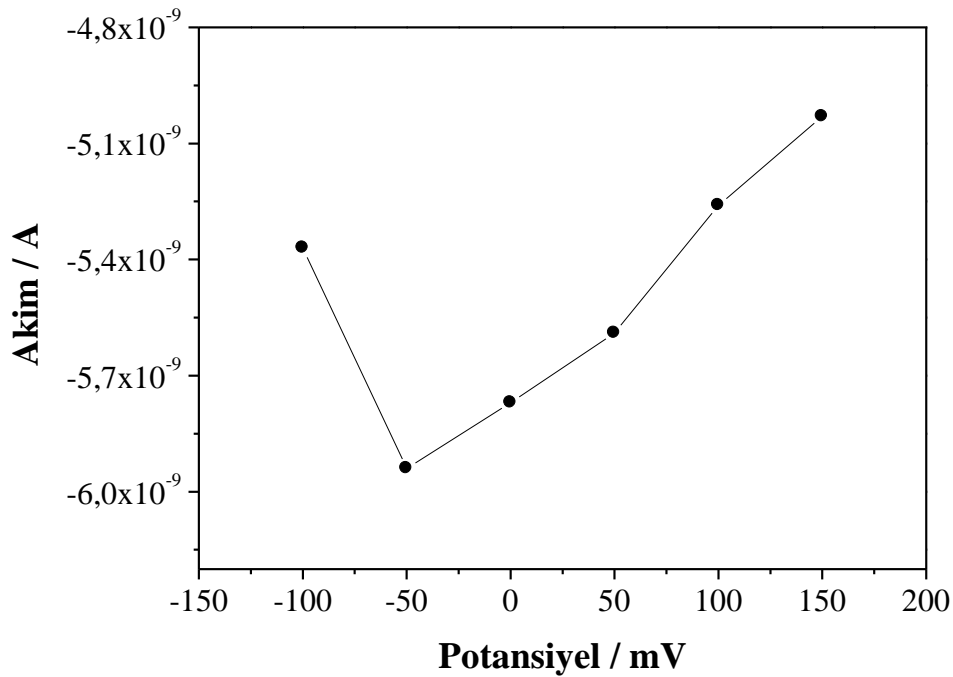
pirolle elektropolimerizasyonu sonucu oluşan kompozit Poli(GMA-co-MTM)/PPy filmi iletken özellik taşımaktadır. Şekil 4.10'dan ayrıca Poli(GMA-co-MTM)/PPy kompozit filminin iletken olduğu anlaşılmaktadır. Elektrot yüzeyinden elektron transferi, elektrodun kaplı olduğu film tabakasının iletken olması durumunda gerçekleşebileceğinden, Poli(GMA-co-MTM)'nin pirolle tiyofen grupları üzerinden polimerleşerek yeni ve iletken bir kompozit film oluşturması Poli(GMA-co-MTM)'nin çalışma elektrodunda rahatlıkla kullanılabilmesini sağlamıştır. Tez kapsamında hazırlanan çalışma elektrotlarında pirolün elektrot yüzeyindeki elektropolimerizasyonu normalde 1-2 dakikada tamamlanmışken, Poli(GMA-co-MTM)(%10-%90) ile kaplı elektrot yüzeyinde polipirol oluşumu 15 dakikada tamamlanabilmiştir.



Şekil 4.10. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA kompozit filmine ait dönüşümlü voltametri grafiği.

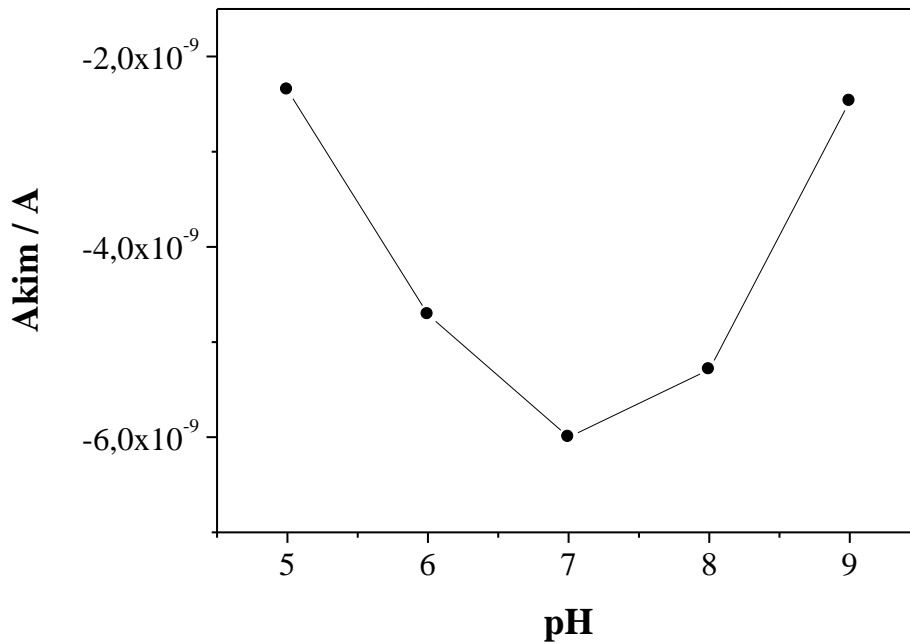
4.2.2. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au Çalışma Elektrodu İçin İşletme Parametrelerinin Optimizasyonu

Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodunun fenol ölçümlerine geçmeden önce, pH ve çalışma potansiyeli gibi bazı işletme parametreleri optimize edilmiştir. -100 ve +150 mV çalışma potansiyeli aralığında, her potansiyel değerinde reaksiyon hücresine 240 μ M hidrojen peroksit ve 32 μ M fenol eklemesi yapılarak çalışma elektrodundan elde edilen akım değişimleri Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan fenoksi radikallerinin elektrot yüzeyindeki indirgenme akımı +150 mV'dan itibaren -50 mV'a kadar hızlı bir şekilde artmış ve bu voltaj değerinden sonra indirgenme akımında düşüş görülmüştür. En yüksek indirgenme akımına -50 mV'luk potansiyel değerinde ulaşıldığından, fenolik bileşiklerin ölçümü için uygulanacak potansiyel değeri -50 mV seçilmiştir. Fenol dışındaki diğer fenolik türler için de aynı deneyler yapılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4.11. Çalışma potansiyelinin Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodu performansına etkisi.

Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodu performansı üzerine pH'nın etkisi 5-9 aralığında değişen farklı pH değerlerinde hazırlanmış 0,1 M'lık 10 mL tampon ortamlarına -50mV'luk çalışma potansiyeli altında, 32 μ M fenol ve 240 μ M hidrojen peroksit eklemeleri yapılarak araştırılmıştır. Farklı pH değerindeki her tampon ortamından alınan tepki grafiğe geçirilmiş ve Şekil 4.12'de gösterilmiştir. En yüksek indirgenme akımı pH 7'de görülmüştür. pH 7'den sonra enzim aktivitesinde meydana gelen azalmaya bağlı olarak indirgenme akımları da düşmeye başlamıştır.

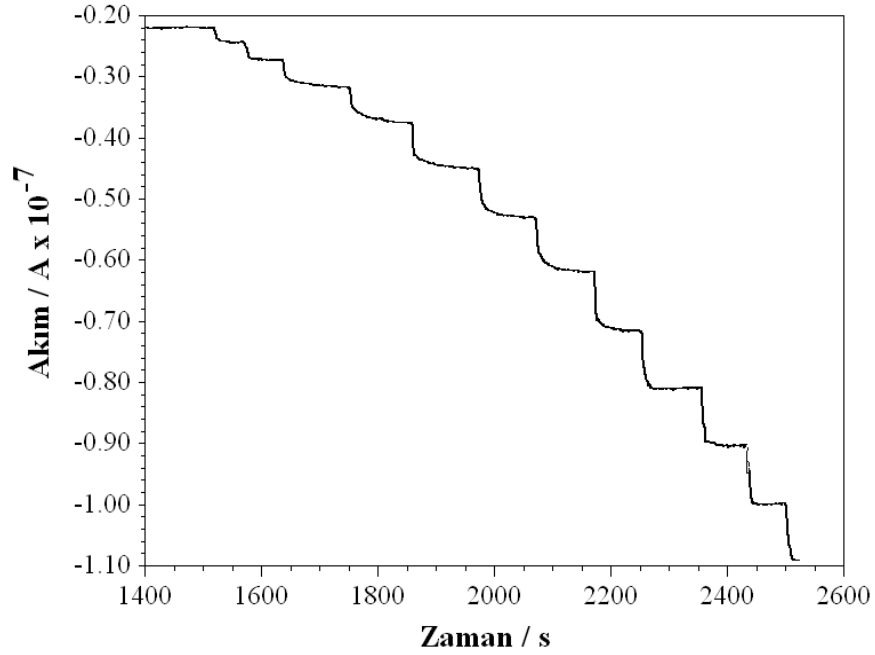


Şekil 4.12. Ortam pH'sının Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodu performansına etkisi.

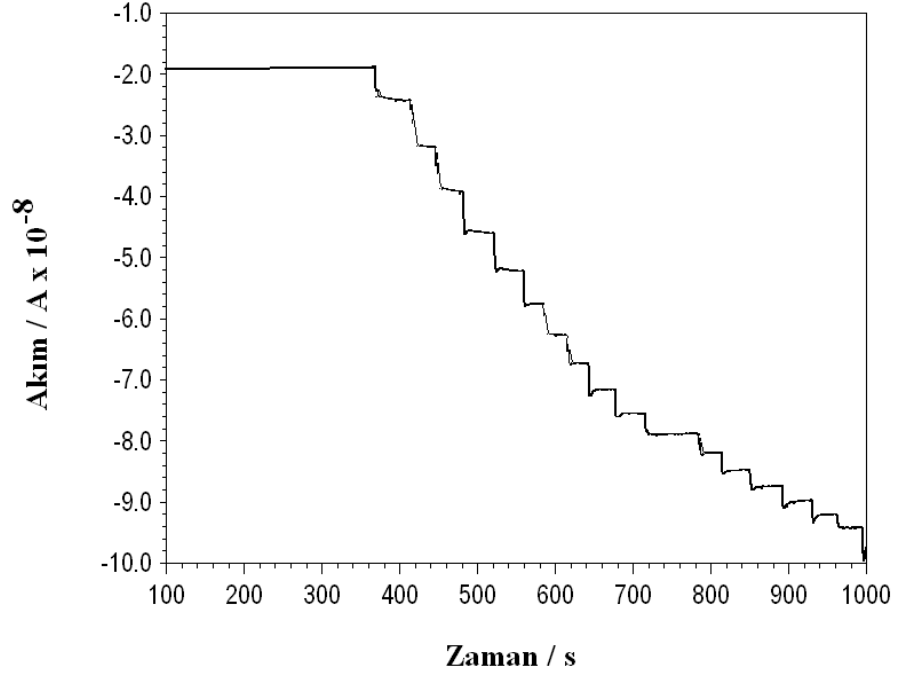
4.2.3. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au Çalışma Elektrodu ile Fenol ve Türevlerinin Ölçümü

Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodu kullanılarak çalışma parametreleri optimize edildikten sonra, kesikli ortamda 600 rpm'lik karıştırma hızında, -50 mV çalışma potansiyeli altında, fenol, katekol, *p*-benzokinon, *p*-kresol, 2-klorofenol ve 2,4-dimetilfenolden oluşan 6 fenolik bileşiğin ölçümü

yapılmıştır. Bunun için 0,7 mg/mL lityum klorid içeren 0,1 M - pH 7 fosfat tamponununun 10 mL'sine her bir fenolik bileşik için 16 μ M konsantrasyondan başlayarak artan konsantrasyonlarda eklemeler yapılmıştır. Reaksiyon ortamına her ekleme ile birlikte 240 μ M'lık hidrojen peroksit çözeltisi de eklenmiştir. Her ekleme sonunda elde edilen akım değerleri zamana bağlı olarak görüntülenmiştir (akım-zaman grafiği). *p*-kresol ve 2,4-dimetilfenol eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafikleri sırasıyla Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de gösterilmiştir.

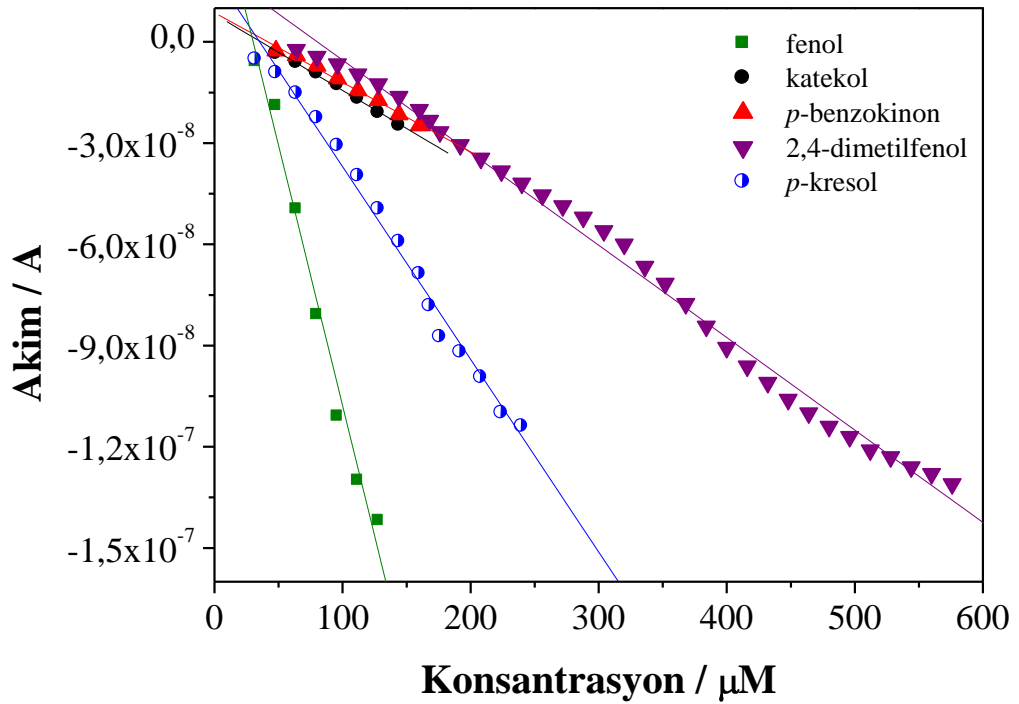


Şekil 4.13. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodundan *p*-kresol eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği.



Şekil 4.14. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodundan 2,4-dimetilfenol eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği.

Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodunda test edilen fenoller için akım-zaman grafiklerinden elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 4.15’de gösterilmiştir.



Şekil 4.15. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodunda test edilen fenolik bileşiklerin kalibrasyon grafikleri.

Çizelge 4.2, test edilen fenolik türlerin kalibrasyonlarından elde edilen analitik hesaplamaları göstermektedir.

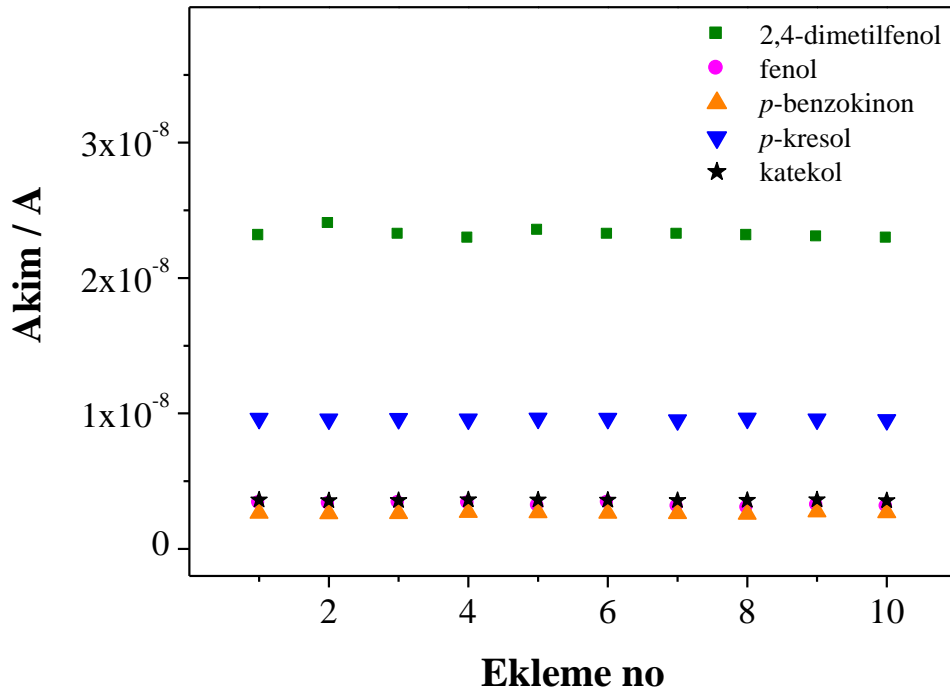
Çizelge 4.2. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodu için fenol ve türevlerinin ölçümünde hesaplanan analitik parametreler.

| Fenolik tür | r^2 | Hassasiyet (nA/ μ M) | Doğrusalalık (μ M) | LOD (μ M) | Yanıt süresi (s) | %RSD |
|----------------------|-----------|-----------------------------|----------------------------|-------------------|---------------------|------|
| Fenol | 0,98 | 2 | 32-128 | 5 | 27 | 1,41 |
| Katekol | 0,99 | 0,2 | 48-144 | 2,14 | 10 | 4,42 |
| <i>p</i> -benzokinin | 0,99 | 0,2 | 48-160 | 0,8 | 3 | 2 |
| 2,4-dimetilfenol | 0,99 | 0,3 | 64-576 | 0,43 | 2 | 0,5 |
| <i>p</i> -kresol | 0,98 | 0,6 | 32-240 | 0,12 | 10 | 0,7 |
| 2-klorofenol | Tepki yok | | | | | |

Çizelge 4.2'den görüldüğü gibi test edilen fenoller arasında en düşük belirleme limiti (LOD) *p*-kresol için 0,12 μ M, en yüksek LOD ise fenol için 5 μ M olarak

belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisinin doğrusal ölçüm aralığı fenol için 32-128 μM , *p*-benzokinon için 48-160 μM , *p*-kresol için 32-240 μM , katekol için 48-144 μM ve 2,4-dimetilfenol için ise 64-576 μM olarak belirlenmiştir. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodu 2-klorofenole yanıt vermemiştir. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodundan test edilen her fenolik için elde edilen hassasiyet değerleri oldukça düşüktür. En yüksek hassasiyet değeri fenol için 2 nA/ μM olarak hesaplanmıştır. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodu hassasiyet değerleri, PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodu hassasiyet değerlerinin (bkz. Bölüm 4.1.2) yaklaşık %1'i kadardır. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodunda kullanılan altın elektrodun yüzey alanı, PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodunda kullanılan elektrodun yüzey alanına kıyasla oldukça küçüktür. Yüzey alanının küçük olması immobilize edilen enzim miktarının az olmasına neden olmaktadır. Ayrıca, Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodunda film polimerizasyon süresinin oldukça uzun olması, kalın bir polimer film tabakasının oluşmasına neden olmuştur. Elektrot yüzeyindeki film kalınlığının fazla oluşu, elektrot ile enzim arasındaki elektron transferini engelleyebilecek bir bariyer oluşmasına neden olmaktadır.

İşletme kararlılığının tespiti için, reaksiyon hücreğine 2,4-dimetilfenol için 144 μM 'lık, diğer fenolikler için 48 μM 'lık eklemeler ard arda yapılmıştır (Şekil 4.16). Şekil 4.16'dan açıkça görüldüğü gibi ölçüm kararlılığı test edilen her fenolik için oldukça iyidir ve bu ölçümlerin standart sapma değerleri (%RSD) düşük çıkmıştır (Çizelge 4.2). Bu nedenle hesaplanan LOD değerleri, hassasiyet değerleri her ne kadar düşük çıkmış olsa da, bulunan doğrusal aralıkların çok altında çıkmıştır. HRP enzimi bu çalışma elektroduna PGA aracılığıyla kovalent bağlanmıştır.



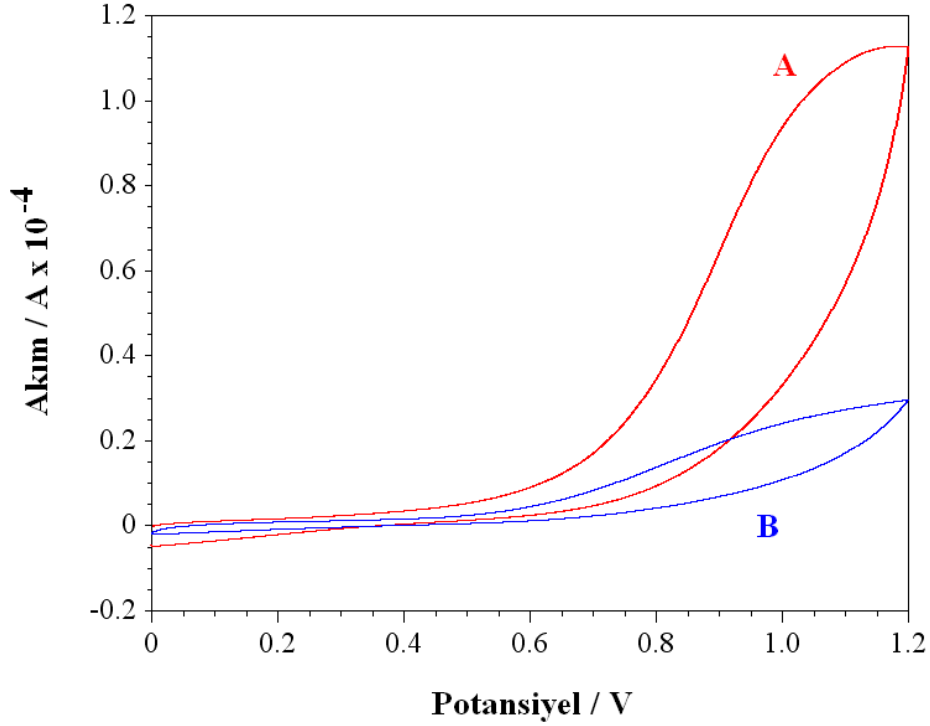
Şekil 4.16. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodunun test edilen fenolikler için işletme kararlılığı grafikleri.

4.3. PPy/CNT/HRP/Au Çalışma Elektrodu Bulguları

4.3.1. PPy/CNT/HRP/Au Çalışma Elektroduna Ait Film Karakterizasyonu

PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu Bölüm 3.6.3'de açıklandığı gibi hazırlanmıştır. CNT'nin, pirol polimerizasyonu üzerine etkisini anlayabilmek için PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektroduna paralel olarak bir de PPy/HRP/Au çalışma elektrodu şu şekilde hazırlanmıştır: CNT'siz polimerizasyon ortamında, 0,05 M- pH 6,5 sitrat tamponunun 10 mL'sine 7 µL pirol monomeri (çözeltideki konsantrasyonu 0,01 M olacak şekilde), 6 mg SDS ve 3 mg HRP enzimi eklenerek karıştırılmıştır. Üçlü elektrot sistemi cam reaksiyon hücresine daldırılmış, 0 ile +1,2 V'luk potansiyel aralığında ve 100 mV/s'lik tarama hızında dönüşümlü voltametri metodu kullanılarak 4 dakikalık sürede elektrot yüzeyinde PPy/HRP biyofilmi

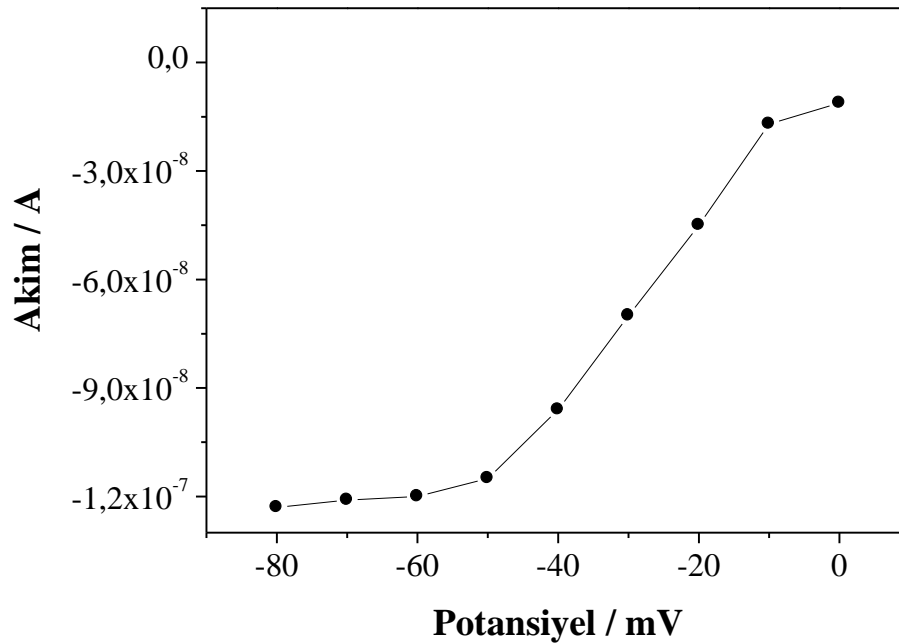
sentezlenmiştir. PPy/CNT/HRP/Au ve PPy/HRP/Au çalışma elektrotlarına ait dönüşümlü voltametri grafikleri Şekil 4.17’de gösterilmiştir. Elde edilen dönüşümlü voltametri grafiklerinden, her iki çalışma elektroduna ait voltamogramın tipik pirol elektropolimerizasyon voltamogramı olduğu açıkça görülmektedir. Voltamogram şekillerinin aynı olması, CNT’nin pirolün elektrot yüzeyinde elektropolimerizasyonuna engel olmadığını, tam aksine CNT’nin bilinen elektron transfer mekanizmasını hızlandırma etkisinin pirol oksidasyonuna katkıda bulunduğu anlaşılmaktadır. Çünkü, PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektroduna ait voltamogramda, pirolün elektropolimerizasyonunun gerçekleştiği +0,8 V’tan büyük potansiyel değerlerinde pirol oksidasyonuna ait akım değerleri, PPy/HRP/Au çalışma elektroduna göre oldukça yüksektir.



Şekil 4.17. PPy/CNT/HRP/Au (A) ve PPy/HRP/Au (B) çalışma elektrotlarına ait dönüşümlü voltametri grafikleri.

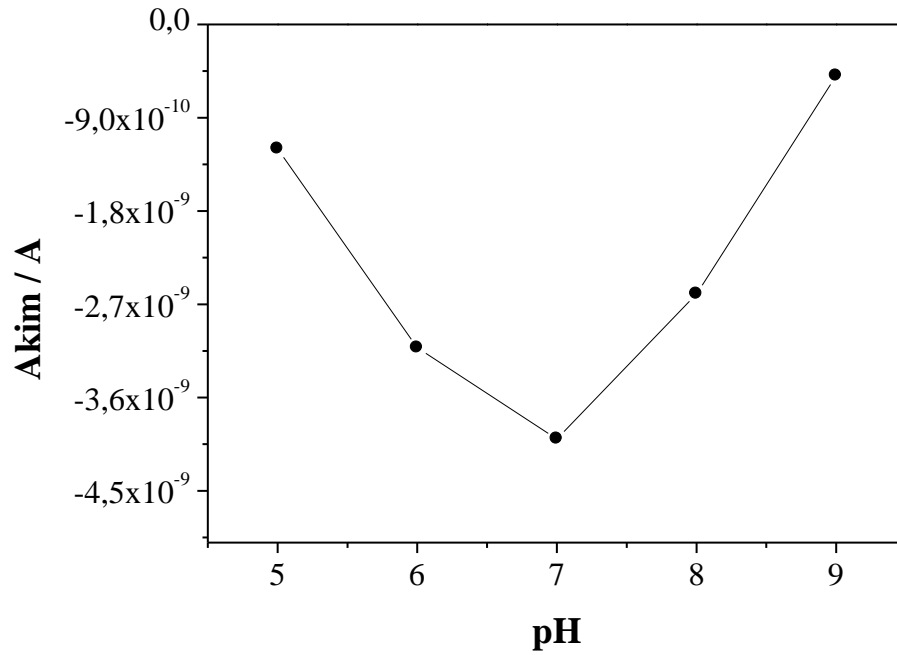
4.3.2. PPy/CNT/HRP/Au Çalışma Elektrodu İçin İşletme Parametrelerinin Optimizasyonu

PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunun -80 ve 0 mV aralığındaki farklı çalışma potansiyellerinde, 16 μ M hidrojen peroksit ve 16 μ M hidrokinon eklemelerine olan tepkisi Şekil 4.18’de gösterilmiştir. Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan fenoksi radikallerinin elektrot yüzeyindeki indirgenme akımı 0 mV’den itibaren -50 mV’a kadar hızlı bir şekilde artmış ve daha negatif potansiyellerde indirgenme akımındaki bu artışın yavaşladığı görülmüştür. Bu yavaşlamanın nedeni enzimatik reaksiyon ürünleri olan *o*-kinonların yüksek potansiyel değerlerinde polimerize olmasına bağlanabilir [Pena et al., 2001; Serra et al., 1999]. Üstelik, daha yüksek negatif potansiyel değerlerinde HRP’nin bir üst basamağa oksidasyonu gerçekleşmektedir ki HRP enzimi bu formda fenolle reaksiyona giremediğinden zamana bağlı olarak aktivitesini kaybeder [Rosatto et al., 2002]. Bu nedenle çalışma potansiyeli -50 mV olarak seçilmiştir. Hidrokinon dışındaki diğer fenolik türler için de aynı deneyler yapılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4.18. Çalışma potansiyelinin PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu performansına etkisi.

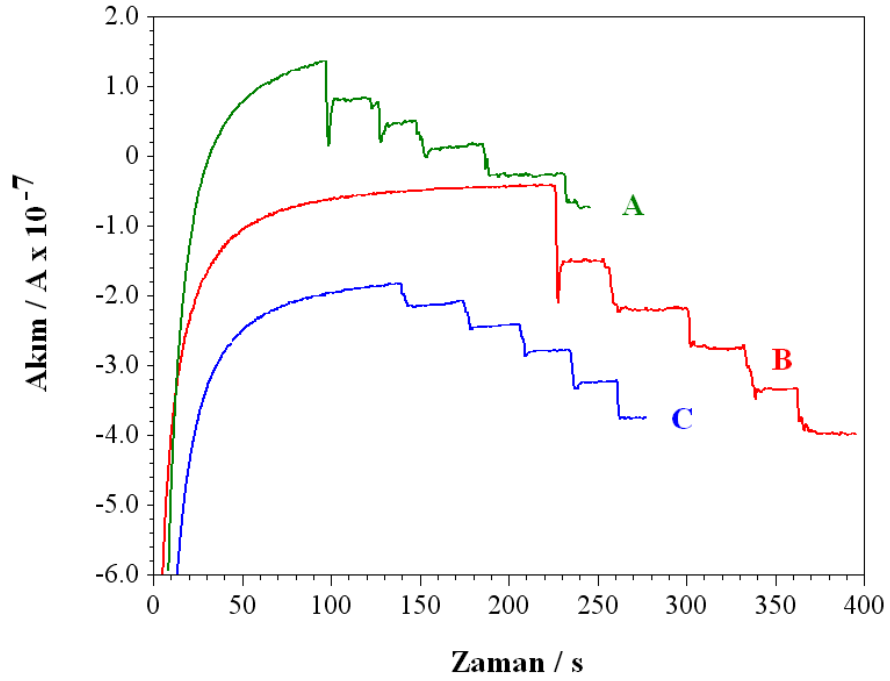
PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu performansı üzerine pH'nın etkisi, 5-9 aralığında değişen farklı pH değerlerinde hazırlanmış 10 mL'lik tampon ortamlarına -50mV'luk çalışma potansiyeli uygulayıp, 16 μ M hidrojen peroksit ve 0,1 μ M *p*-benzokinin eklemeleri yapılarak araştırılmıştır. Farklı pH değerindeki her tampon ortamından alınan tepki grafiğe geçirilmiş ve Şekil 4.19'da gösterilmiştir. En yüksek indirgenme akımına pH 7'de ulaşılmıştır. Bu pH değerinden sonra enzimatik reaksiyondaki aktivite düşüşüne bağlı olarak akım değişimlerinde düşüşler kaydedilmiştir. pH 7 değerinin, HRP'nin fenol ve türevlerini gerek serbest, gerekse de immobilize halde en etkili şekilde katalizlediği pH değeri olduğu literatürde rapor edilmiştir [Maehly et al., 1995].



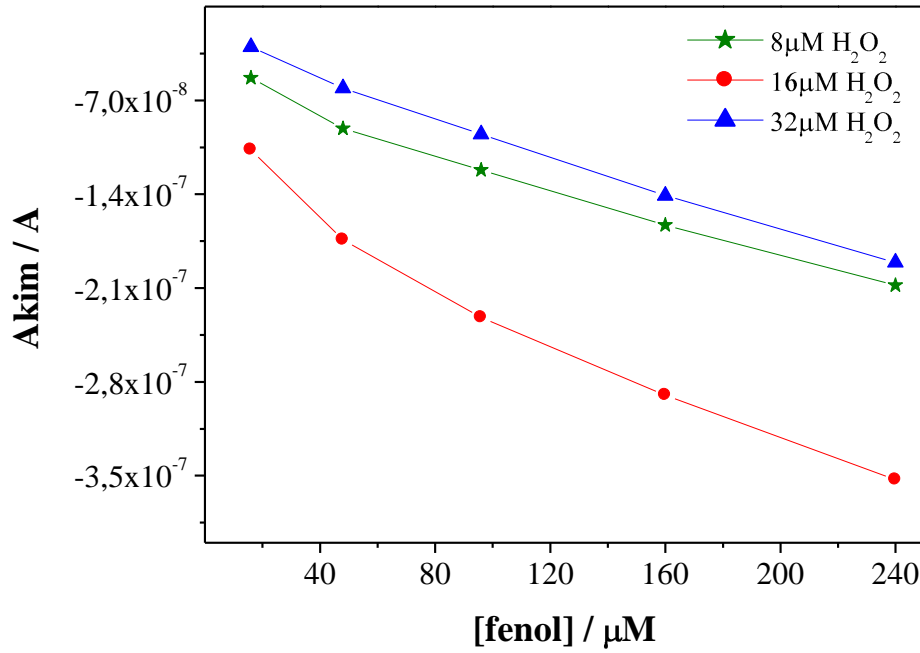
Şekil 4.19. Ortam pH'sının PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu performansına etkisi.

PPy/CNT/HRP/Au çalışmada optimum hidrojen peroksit konsantrasyonunu belirleyebilmek için, sırasıyla 8-16-32 μ M konsantrasyonlarında hidrojen peroksit içeren 10 mL'lik pH 7 - 0,01 M tampon ortamına -50 mV'luk potansiyel uygulanarak, konsantrasyon aralığı 16-48-96-160 ve 240 μ M şeklinde artan fenol eklemeleri yapılmış ve bu eklemelerden elde edilen akım değerleriyle

(Şekil 4.20) farklı hidrojen peroksit konsantrasyonlarındaki fenol kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır (Şekil 4.21). Fenol ölçümü için hassasiyet değerleri, 8-16-32 μM konsantrasyonlarında hidrojen peroksit içeren reaksiyon ortamlarında sırasıyla 0,7 $\text{nA}/\mu\text{M}$, 1 $\text{nA}/\mu\text{M}$ ve 0,65 $\text{nA}/\mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. Görüldüğü gibi en yüksek akım değerleri ve ölçüm hassasiyeti 16 μM 'lık hidrojen peroksit konsantrasyonunda yapılan fenol kalibrasyonundan elde edilmiştir. Bu değerden sonra kalibrasyon eğrilerinin hassasiyeti enzim inhibisyonuna bağlı olarak düşme eğilimi göstermiştir.



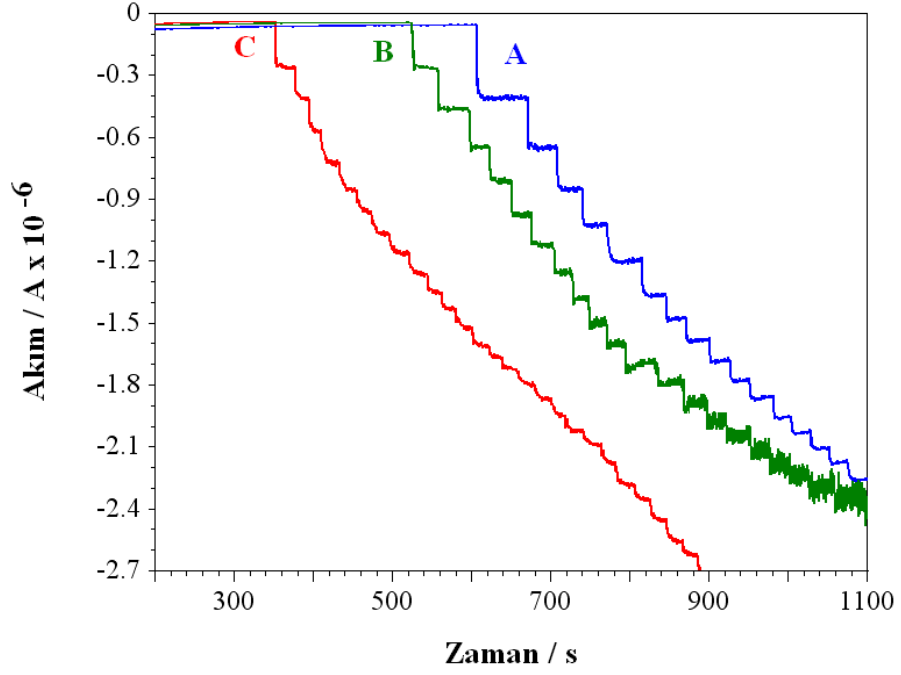
Şekil 4.20. PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu için 8 μM (A), 16 μM (B) ve 32 μM (C) hidrojen peroksit konsantrasyonlarında fenol eklemelerinden elde edilen akım-zaman grafikleri.



Şekil 4.21. PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu için farklı hidrojen peroksit konsantrasyonlarında akım-zaman grafiklerinden elde edilen fenol kalibrasyonları.

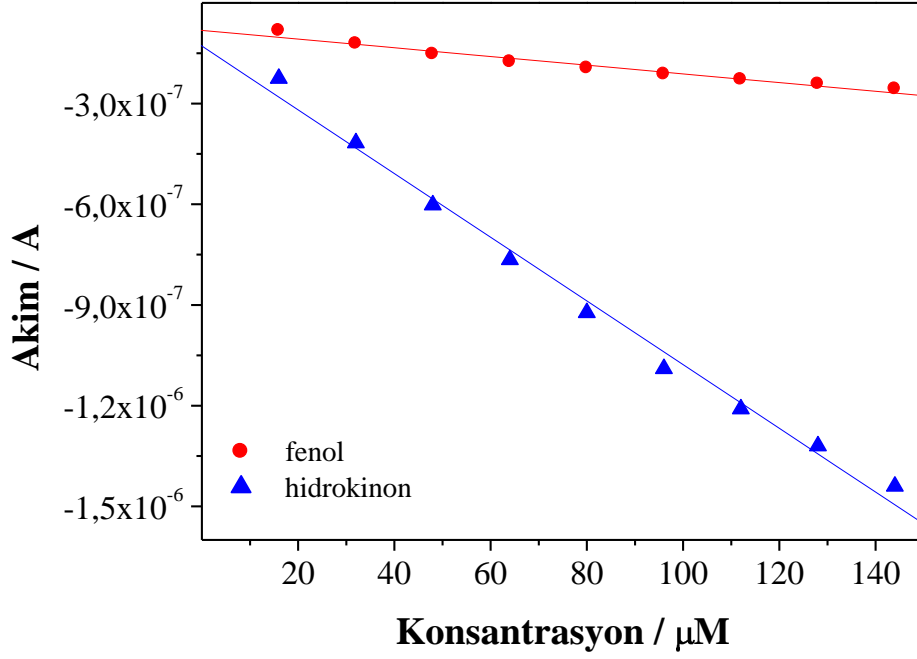
4.3.3. PPY/CNT/HRP/Au Çalışma Elektrodu ile Fenol ve Türevlerinin Ölçümü

İşletme parametreleri optimize edilen PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu ile 18 fenol bileşiğinin ölçümü kesikli ortamda 600 rpm'lik karıştırma hızında -50 mV çalışma potansiyeli uygulanarak yapılmıştır. Bunun için 0,7 mg/mL lityum klorid içeren 0,1 M - pH 7 fosfat tamponunun 10 mL'sine her bir fenolik bileşik için 1,6 µM konsantrasyondan başlayarak artan konsantrasyonlarda eklemeler yapılmıştır. Reaksiyon ortamına her ekleme ile birlikte 16 µM'lık hidrojen peroksit çözeltisi eklenmiştir. Her ekleme sonunda elde edilen akım değerleri zamana bağlı olarak görüntülenmiştir (akım-zaman grafiği). 2-aminofenol, 4-metoksifenol ve hidrokinon eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafikleri Şekil 4.22'de gösterilmiştir.

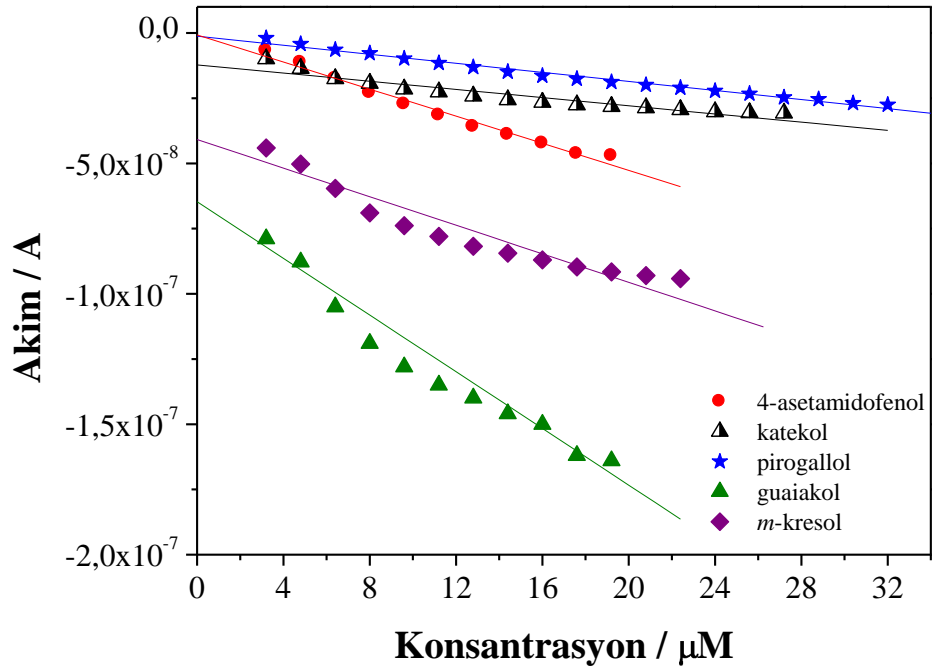


Şekil 4.22. PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodundan 2-aminofenol (A), hidrokinon (B) ve 4-metoksifenol (C) eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafikleri.

Amperometrik akım-zaman grafikleri kullanılarak her bir ekleme sonunda elde edilen akım değişimleri ekleme konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilmiş ve söz konusu fenolik türler için kalibrasyon eğrileri çıkartılmıştır. Fenol ve hidrokinon için hazırlanan kalibrasyon eğrileri Şekil 4.23’de, katekol, pirogallol, guaiakol, *m*-kresol ve 4-asetamidofenol için hazırlanan kalibrasyon eğrileri Şekil 4.24’de verilmiştir.



Şekil 4.23. PPY/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunda fenol ve hidrokinon için elde edilen kalibrasyon eğrileri.



Şekil 4.24. PPY/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunda katekol, pirogallol, guaiakol, m-kresol ve 4-asetamidofenol için elde edilen kalibrasyon eğrileri.

Farklı fenol türlerinin kalibrasyonundan elde edilen analitik hesaplamalar Çizelge 4.3’de verilmiştir. r değeri kalibrasyon eğrisi korelasyon katsayısıdır. Çizelge 4.3’den görüldüğü gibi test edilen fenoller arasında en düşük belirleme limiti (LOD) *p*-benzokinon için 0,027 μM , en yüksek LOD ise 2,4-dimetilfenol için 27,9 μM olarak hesaplanmıştır. Literatürde farklı fenol biyosensörleri için hesaplanmış LOD değerleri 0,00003-346 μM aralığında değişim göstermektedir [Fan et al., 2007; Carretero et al., 2006].

Ölçüm hassasiyeti genel olarak enzimin analite ilgisine, kullanılan iletken polimerin çeşidine, enzim immobilizasyon metoduna, iletkenliğe ve enzimatik reaksiyonla oluşan fenoksi radikallerinin stabilitesine ve önemli ölçüde fenol üzerindeki elektron verici grupların konjugasyon yapılarına bağlıdır [Marko-Varga et al., 1995]. Çalışmada en yüksek ölçüm hassasiyeti 4-metoksifenol ve 2-aminofenol için sırasıyla 50 ve 40 $\text{nA}/\mu\text{M}$, en düşük ölçüm hassasiyeti ise fenol, pyrogallol ve 2,4-dimetilfenol ve fenol için 1 $\text{nA}/\mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. 2,4-dimetilfenol için düşük ölçüm hassasiyeti orto pozisyonundaki bir metil grubunun varlığından kaynaklanmış olabilir. Wilkolazka ve arkadaşları, orto-fenollerin enzimatik oksidasyon ürünlerinin daha hızlı üretildiğini savunmuştur. [Wilkolazka et al., 2005]. Çalışmamızda orto-fenol olan 2-aminofenol için test edilen fenoller arasında oldukça yüksek ölçüm hassasiyeti gözlenmiştir. Literatürde farklı fenol biyosensörleri için hesaplanmış hassasiyet değerleri 0,011-746 $\text{nA}/\mu\text{M}$ aralığında değişim göstermektedir [Li et al., 2006; Chang et al., 2002]. PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu *o*-kresol bileşiğine tepki vermemiştir. PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunda tüm fenolikler için yanıt süresi 2 s’dir ve bu değer literatürde verilen yanıt sürelerine göre (5-35 s) oldukça düşüktür [Tsai and Cheng-Chiu, 2007; Rajesh et al., 2004; Yu et al., 2003].

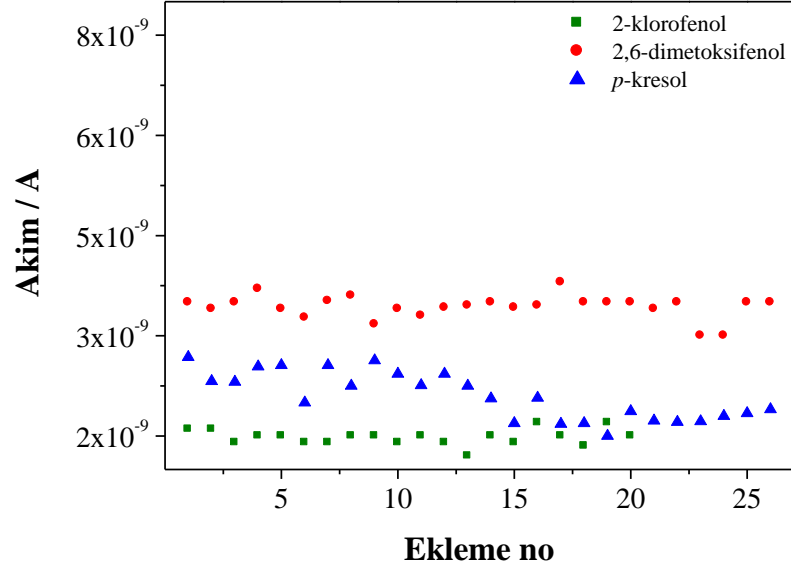
Koile ve arkadaşları, yüksek konsantrasyonlardaki fenol eklemelerinde akım değişimindeki doğrusallığın bozulmasını reaksiyon ürünlerinin yüzeyi yavaşça kaplamasına bağlamıştır [Koile and Johnson, 1979]. Literatürde, CNT tabanlı çalışma elektrotlarının elektrokatalitik aktiviteyi arttırdığı ve CNT sayesinde yüzeyin reaksiyon ürünleriyle kaplanmasının minimize edildiği rapor edilmiştir [Tsai and Cheng-Chiu, 2007]. Çalışmamızda, test edilen her fenolik tür için yüksek r değerlerine sahip (0,99) geniş doğrusal aralıklar elde edilmiştir.

Çizelge 4.3. PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu için fenol ve türevlerinin ölçümünde hesaplanan analitik parametreler.

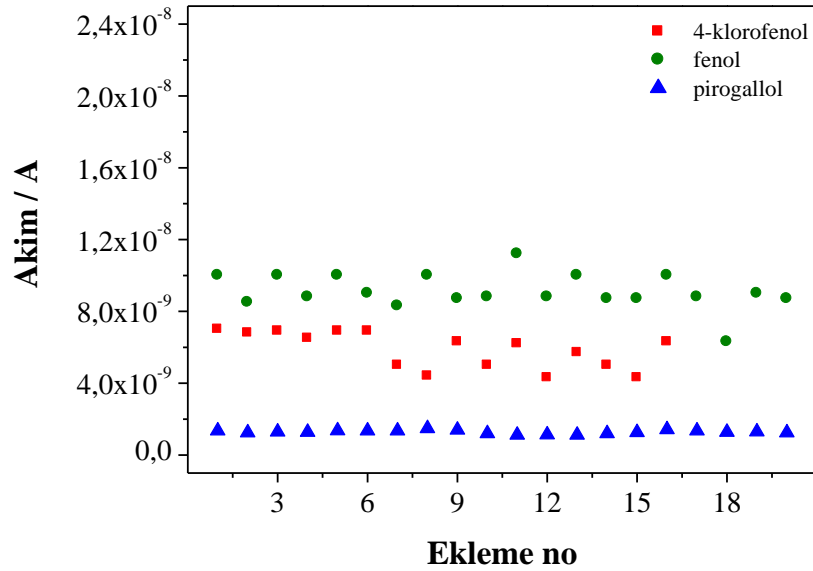
| <i>Fenolik tür</i> | <i>r</i> | <i>Hassasiyet</i> (<i>nA/μM</i>) | <i>Doğrusal</i> <i>aralık</i> (<i>μM</i>) | <i>LOD</i> (<i>μM</i>) | <i>Yanıt süresi</i> (<i>s</i>) | <i>%RSD</i> |
|----------------------|----------|---------------------------------------|---|-----------------------------|-------------------------------------|-------------|
| Fenol | 0,99 | 1 | 16-144 | 3,52 | 2 | 2,89 |
| <i>p</i> -benzokinon | 0,99 | 3 | 0,02-0,16 | 0,027 | 2 | 4,43 |
| Hidrokinon | 0,99 | 8 | 16-240 | 6,42 | 2 | 6,5 |
| 2,6-dimetoksifenol | 0,99 | 7 | 1,6-19,2 | 0,29 | 2 | 1,8 |
| 2-klorofenol | 0,99 | 8 | 1,6-8 | 0,26 | 2 | 1,7 |
| 3- klorofenol | 0,99 | 6 | 1,6-12,8 | 0,2 | 2 | 1,1 |
| 4- klorofenol | 0,99 | 8 | 1,6-14,4 | 0,3 | 2 | 1,87 |
| 2-aminofenol | 0,99 | 40 | 8-60,8 | 1,53 | 2 | 5,4 |
| 4- metoksifenol | 0,99 | 50 | 1,6-81,6 | 1,06 | 2 | 2,8 |
| Pirokatekol | 0,99 | 8 | 1,6-446,4 | 6,27 | 2 | 6,7 |
| Guaiakol | 0,98 | 9 | 1,6-9,6 | 0,3 | 2 | 1,92 |
| <i>m</i> -kresol | 0,99 | 9 | 8-20,8 | 1,5 | 2 | 2,84 |
| <i>o</i> -kresol | | | <i>Tepki yok</i> | | | |
| <i>p</i> -kresol | 0,98 | 5 | 128-832 | 24 | 2 | 2,5 |
| Katekol | 0,98 | 2 | 1,6-8 | 0,93 | 2 | 3,8 |
| 4-asetamidofenol | 0,99 | 3 | 1,6-16 | 1,11 | 2 | 2,57 |
| Pirogallol | 0,98 | 1 | 1,6-22,4 | 1,24 | 2 | 1,2 |
| 2,4-dimetilfenol | 0,98 | 1 | 64-240 | 27,9 | 2 | 2,2 |

PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunun işletme kararlılığının tespiti için, 0,7 mg/mL lityum klorid içeren 0,1 M - pH 7 fosfat tamponunun 10 mL'sine -50 mV'luk çalışma potansiyeli altında, ard arda yaklaşık 20-30 defa 1,6 μ M'lık fenolik eklemeleri yapılmış ve elde edilen akım değişimleri kaydedilmiştir. Akım değişimlerinin standart sapma değerlerinden hesaplanan %RSD değerleri (bkz. Bölüm 3.7.4.4) Çizelge 4.3'de verilmiştir. %RSD değerleri test edilen fenolikler için 1,1 ve 6,7 arasında değişmiştir. Bu değerler biyosensör için oldukça iyidir, biyosensörün ölçümler arası kararlılığını göstermektedir. Kararlılık değerlerinin düşük olması, immobilizasyon basamağının enzim için yıpratıcı olmamasına, CNT'nin enzimin biyoaktivitesini sürdürebilmesi için çok uygun bir mikro çevre oluşturmasına bağlanabilir. Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'da bazı fenoliklerin kararlılık grafikleri gösterilmiştir. PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu, 1 ay içinde 700 defa kullanılmış ve kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin %70'ini korumuştur. HRP

enzimi, pirolün elektropolimerizasyonu sırasında oluşan çapraz bağ ağları arasında tutuklanmıştır. Enzimin ılıman şartlarda tek basamakta immobilizasyonu enzim aktivitesini uzun süre korumuştur.

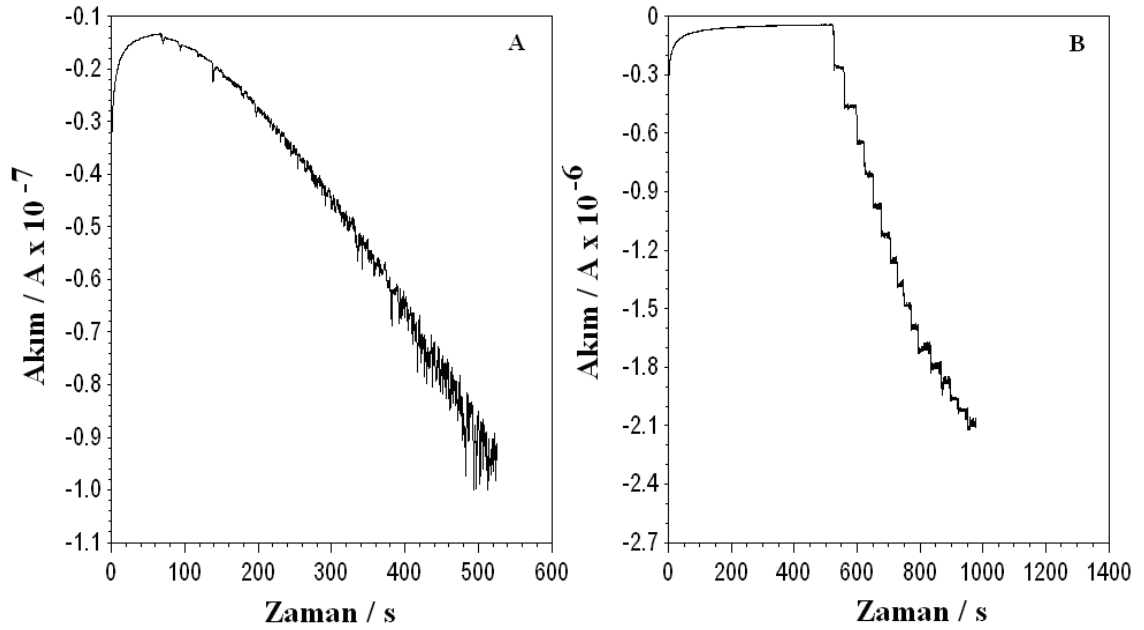


Şekil 4.25. PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunun 2-klorofenol, 2,6-dimetoksifenol ve p-kresol için işletme kararlılığı grafikleri.



Şekil 4.26. PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunun 4-klorofenol, fenol ve pirogallol için işletme kararlılığı grafikleri.

CNT'nin biyosensör performansı üzerine etkisini daha iyi anlayabilmek için CNT'siz PPy/HRP/Au çalışma elektrodu Bölüm 4.3.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. PPy/HRP/Au çalışma elektrodu ile hidrokinon ölçümü kesikli ortamda 600 rpm'lik karıştırma hızında -50 mV çalışma potansiyeli uygulanarak yapılmıştır. Bunun için 0,7 mg/mL lityum klorid içeren 0,1 M - pH 7 fosfat tamponununun 10 mL'sine 16 µM'dan başlayarak artan konsantrasyonlarda hidrokinon eklemeleri yapılmıştır. Reaksiyon ortamına her ekleme ile birlikte 16 µM'lık hidrojen peroksit çözeltisi eklenmiştir. Her ekleme sonunda elde edilen akım değerleri zamana bağlı olarak görüntülenmiştir (akım-zaman grafiği). Aynı deney PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu kullanılarak yapılmış ve sonuçlar birbiriyle kıyaslanmıştır (Şekil 4.27). PPy/HRP çalışma elektrodundan, artan konsantrasyonlarda yapılan hidrokinon eklemeleri sonucu elde edilen akım değişimleri PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektroduna nazaran oldukça küçük çıkmıştır. Ayrıca, PPy/HRP çalışma elektrodundan alınan sinyallerin oldukça kararsız ve gürültülü olduğu gözlenmiştir. Çalışmada, CNT'nin polipirol film yapısına katılmasının elektrokatalitik aktiviteyi arttırdığı sonucuna varılmıştır. Üstelik her iki elektrotta immobilize edilmiş HRP miktarı, Vojinovic ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş enzim aktivite tayini ile belirlenmiş [Vojinovic et al., 2004], PPy/CNT/HRP/Au ve PPy/HRP çalışma elektrotlarındaki HRP miktarları sırasıyla 6,1 ve 2,7 µg bulunmuştur. CNT'li elektroda, CNT'nin taşıdığı fonksiyonel amino ve karboksil grupları ve yine CNT tarafından oluşturulmuş geniş yüzey alanı sayesinde, CNT'siz çalışma elektroduna göre yaklaşık 2 kat fazla enzim bağlanabilmiştir.



Şekil 4.27. PPy/HRP/Au (A) ve PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodundan (B) hidrokinoon eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafikleri.

4.4. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au Çalışma Elektrodu Bulguları

4.4.1. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au Çalışma Elektroduna Ait Film Karakterizasyonu

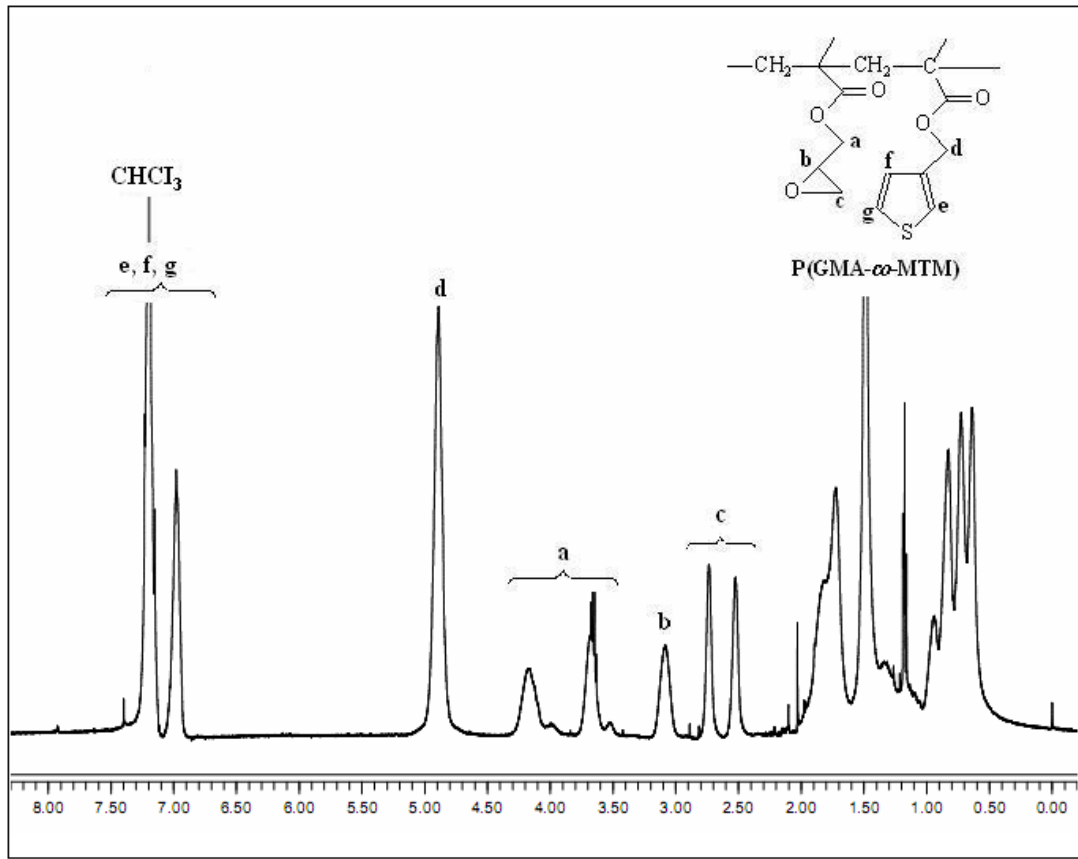
Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu Bölüm 3.6.4'de açıklandığı gibi hazırlanmıştır. Enstitümüze bağlı Kimya Bölümü'nde Bölüm 3.4'deki gibi sentezlenmiş, %30 oranında GMA ve %70 oranında MTM kopolimerlerini içeren Poli(GMA-co-MTM)'nin bileşimi Çizelge 4.4'de, polimerin ¹H-NMR spektrumu ise Şekil 4.28'de gösterilmiştir. Poli(GMA-co-MTM)'nin molekül ağırlığı ve molekül ağırlık dağılımı Kimya Bölümünde, Agilent Instrument (Model 1100) marka kromatografi cihazında belirlenmiştir (Water Styragel Kolonları: HR 5E, HR 4E, HR 3 ve HR 2, solvent: THF, solvent akış hızı: 0.3 mL/dak, sıcaklık: 30 °C).

Çizelge 4.4. GMA ve MTM serbest-radikal kopolimerizasyonuna ait kompozisyon verileri.

| Kopolimer | M_{GMA}^a | m_{GMA}^b | Süre (dak) | Dönüşüm (%) | M_w | M_n | M_w / M_n |
|------------------|-------------|-------------|---------------|----------------|--------|--------|-------------|
| Poly(GMA-co-MTM) | 0,28 | 0,30 | 150 | 81 | 0,0673 | 0,0184 | 3,66 |

^a M_{GMA} ve m_{GMA} GMA'nın sırasıyla besleme ve kopolimer içerisindeki mol fraksiyonunu ifade etmektedir.

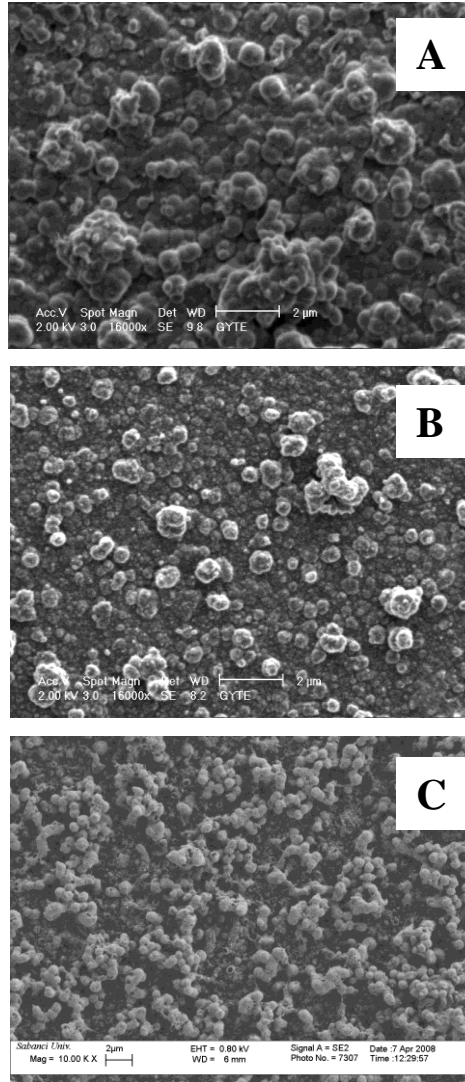
^b Kopolimerin kompozisyonu 5 ppm civarında rezonans sinyali veren metilen protonlarına (-COOCH₂-) (d) ait pik alanlarının, 3,1 ppm civarında rezonans sinyali veren epoksi halkasına (b) ait metilen protonunun pik alanıyla kıyaslanmasıyla hesaplanmıştır (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Poly(GMA-co-MTM)'ye ait ¹H-NMR spektrumu (çözücü: döterkloroform).

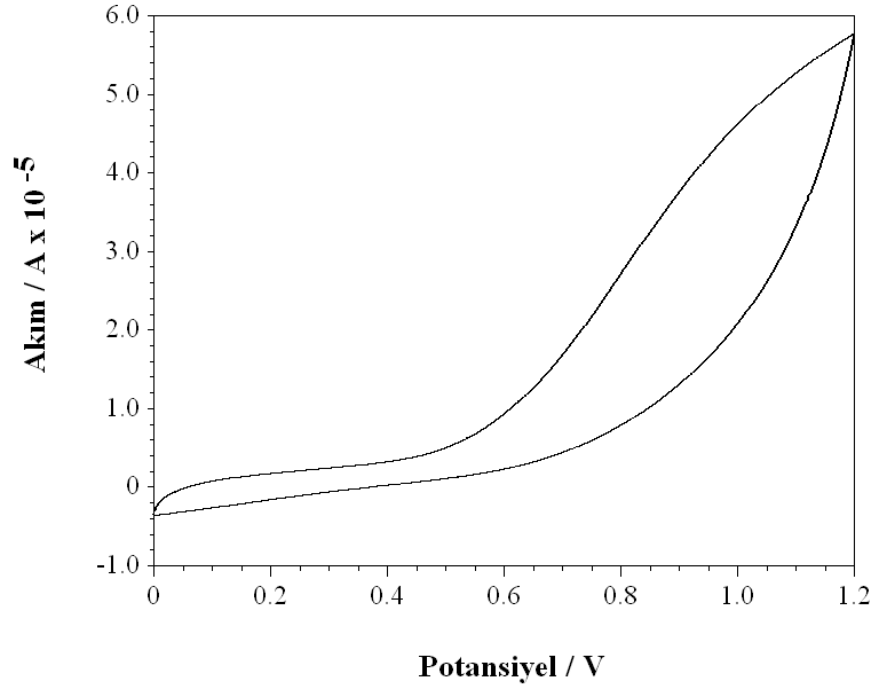
SEM görüntüleri için 3 adet altın elektrodun yüzeyi PPy, Poli(GMA-co-MTM)/PPy ve Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT film ile kaplanmıştır. PPy film,

elektrot yüzeyinde 10 mL'lik 0,05 M- pH 6,5 sitrat tamponu ortamına 7 μ L pirol monomeri (çözeltideki konsantrasyonu 0,01 M olacak şekilde) ve 6 mg SDS eklenerek, 0 ile +1,2 V'luk potansiyel aralığında ve 100 mV/s'lik tarama hızında dönüşümlü voltametri metoduyla 4 dakikalık sürede kaplanmıştır. Poli(GMA-co-MTM)/PPy filmin kaplanması, elektrot yüzeyine Poli(GMA-co-MTM) çözeltisinden 20 μ L damlatılıp solventi uçurulduktan sonra yukarıda anlatıldığı şekilde pirol elektropolimerizasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Elektrot yüzeyinde Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT film ise, elektrot Poli(GMA-co-MTM) ile kaplandıktan sonra CNT'li ortamda pirolün elektropolimerize edilmesiyle sentezlenmiştir. Bu 3 elektroda ait SEM görüntüleri Şekil 4.29'da verilmiştir.

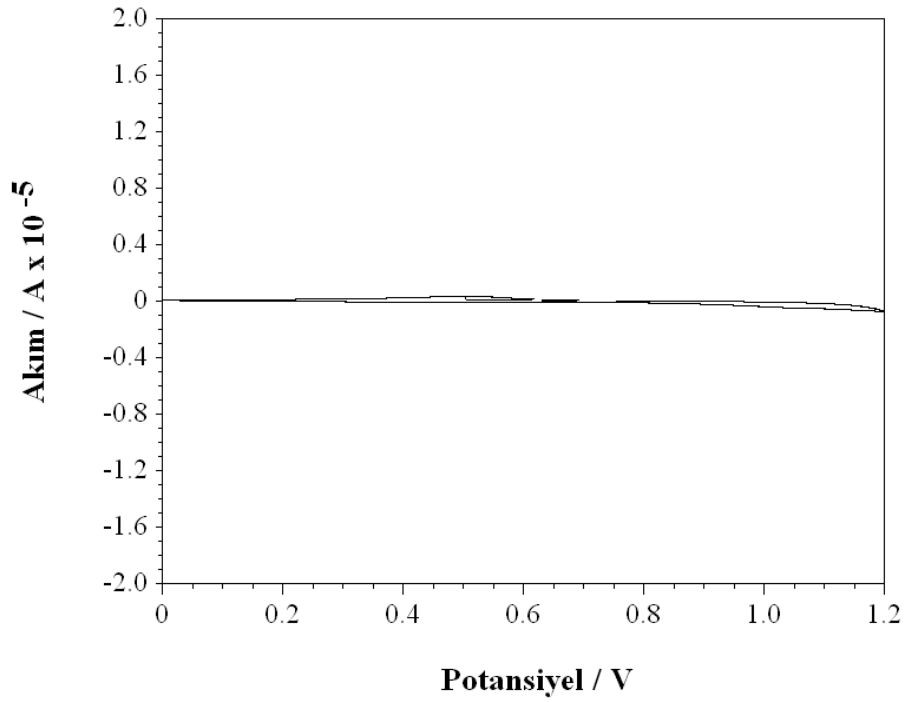


Şekil 4.29. PPy (A), Poli(GMA-co-MTM)/PPy (B) ve Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT (C) filmlerine ait SEM görüntüleri.

Bölüm 3.6.4’de açıklandığı gibi hazırlanan Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği Şekil 4.30’da, sadece Poli(GMA-co-MTM) film ile kaplı elektroda ait dönüşümlü voltametri grafiği ise Şekil 4.31’de verilmiştir. Dönüşümlü voltametrlere 0,1 M - pH 7 fosfat tamponu ve destek elektrolit (tampon içerisindeki konsantrasyonu 0,7 mg/mL olan lityum klorid) içeren ortamda, 0 ile +1,2 V’luk potansiyel aralığında ve 100 mV/s’lik tarama hızında elde edilmiştir. Şekil 4.31’den açıkça görüldüğü gibi, Poli(GMA-co-MTM) film elektrodu voltametrik pik vermemiştir. Poli(GMA-co-MTM), her ne kadar yan zincirlerinde elektroaktif tiyofen grupları içeriyor olsa da ana zinciri tamamen yalıtkan özellikte olduğundan voltametrik pik vermemesi beklenen bir durumdur. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiğinde ise pirole ait tipik voltamogram görüntüsü elde edilmiştir. Poli(GMA-co-MTM)’nin yalıtkan olması Poli(GMA-co-MTM) ile kaplı elektrot üzerinde PPy’nin sentezlenmesine engel olmamıştır. Çünkü, Poli(GMA-co-MTM)’nin yan zincirindeki tiyofen grupları ile pirolden oluşan elektrokimyasal olarak polimerleşebildiği potansiyel değerlerinde bir etkileşim söz konusudur. Bu etkileşim sayesinde Poli(GMA-co-MTM) ve PPy’den oluşan iletken özellikte kompozit bir polimer elde edilmiştir. Şekil 4.30’da verilen dönüşümlü voltametri grafiği pirolden tiyofen grupları arasındaki etkileşimin göstergesidir.



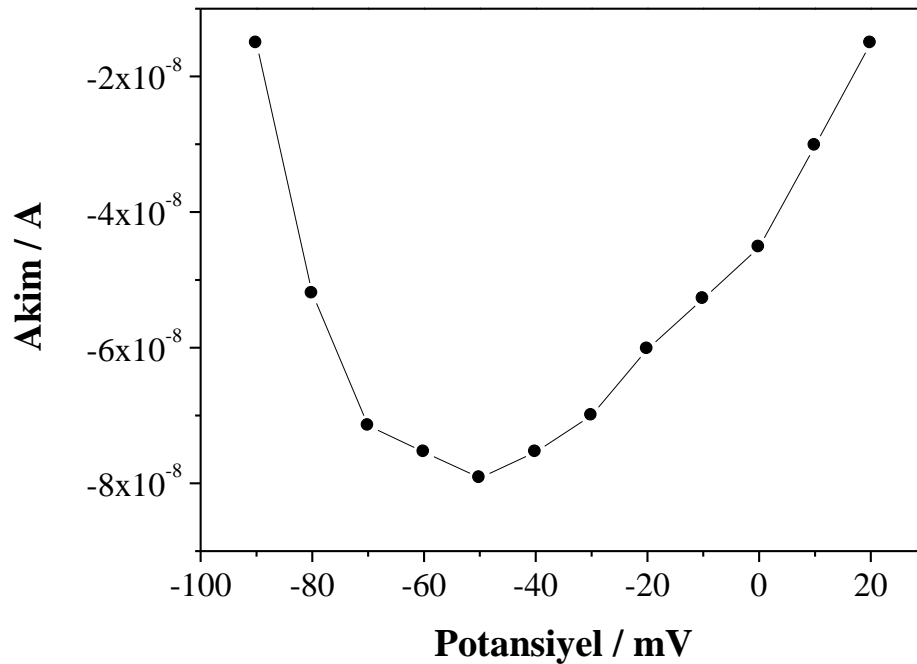
Şekil 4.30. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği.



Şekil 4.31. Poli(GMA-co-MTM) film elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği.

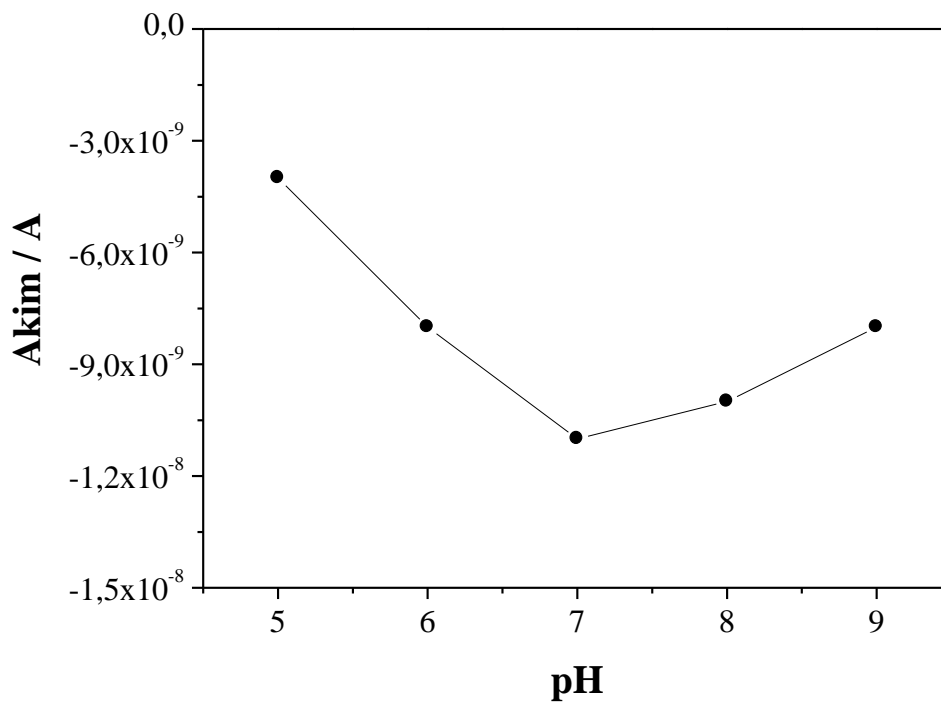
4.4.2. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au Çalışma Elektrodu İçin İşletme Parametrelerinin Optimizasyonu

Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunun -90 ve +20 mV aralığındaki farklı çalışma potansiyellerinde, 16 μ M hidrojen peroksit ve 20 μ M fenol eklemelerine olan tepkisi Şekil 4.32’de gösterilmiştir. Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan fenoksi radikallerinin elektrot yüzeyindeki indirgenme akımı +20 mV’den -50 mV’a kadar hızla artmış ve -50 mV’dan daha negatif potansiyellerde akım değerleri hızla azalmıştır. Akım değerlerindeki bu düşüşler büyük negatif potansiyel değerlerinde gerek HRP’nin fenollerle reaksiyona giremeyecek derecede okside olmasına, gerekse *o*-kinon yapıdaki reaksiyon ürünlerinin polimerize olmasına bağlanabilir [Pena et al., 2001; Serra et al., 1999]. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunun optimum çalışma potansiyeli maksimum akımın elde edildiği -50 mV olarak seçilmiştir. Fenol dışındaki diğer fenolik türler için de aynı optimizasyon yapılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir.



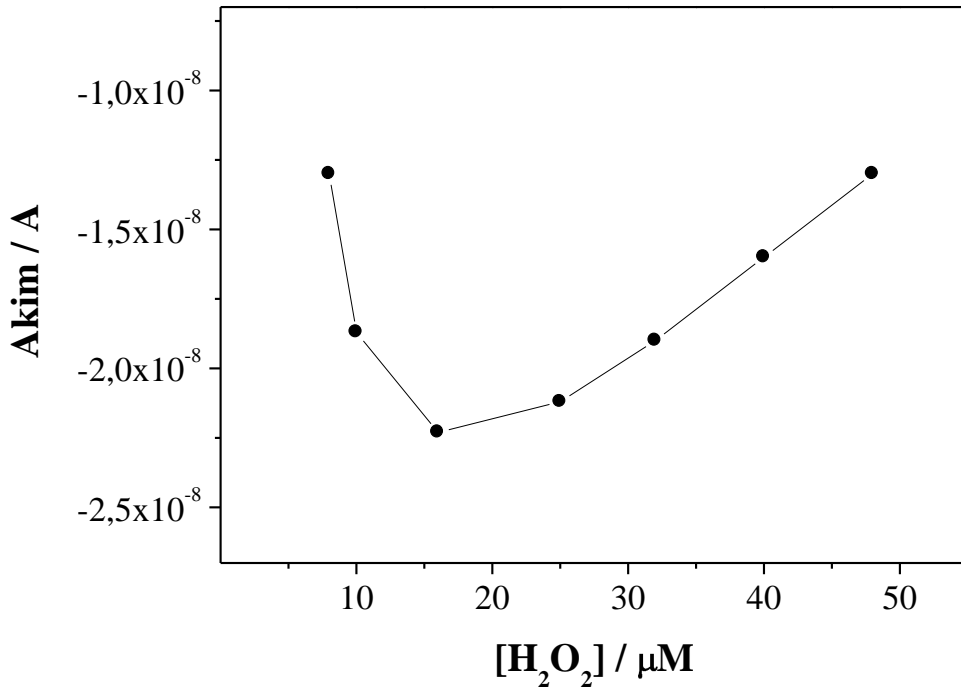
Şekil 4.32. Çalışma potansiyelinin Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu performansına etkisi.

Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu performansı üzerine pH'nın etkisi 5-9 aralığında değişen farklı pH değerlerinde hazırlanmış 0,1 M'lık 10 mL tampon ortamlarına -50mV'luk çalışma potansiyeli altında, 3,2 μ M fenol ve 16 μ M hidrojen peroksit eklemeleri yapılarak araştırılmıştır. Farklı pH değerindeki her tampon ortamından alınan tepki grafiğe geçirilmiş ve Şekil 4.33'de gösterilmiştir. En yüksek indirgenme akımı pH 7'de görülmüş, bu değerden sonra akım değerleri azalmaya başlamıştır. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu için optimum pH değeri 7 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.33. Ortam pH'sının Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu performansına etkisi.

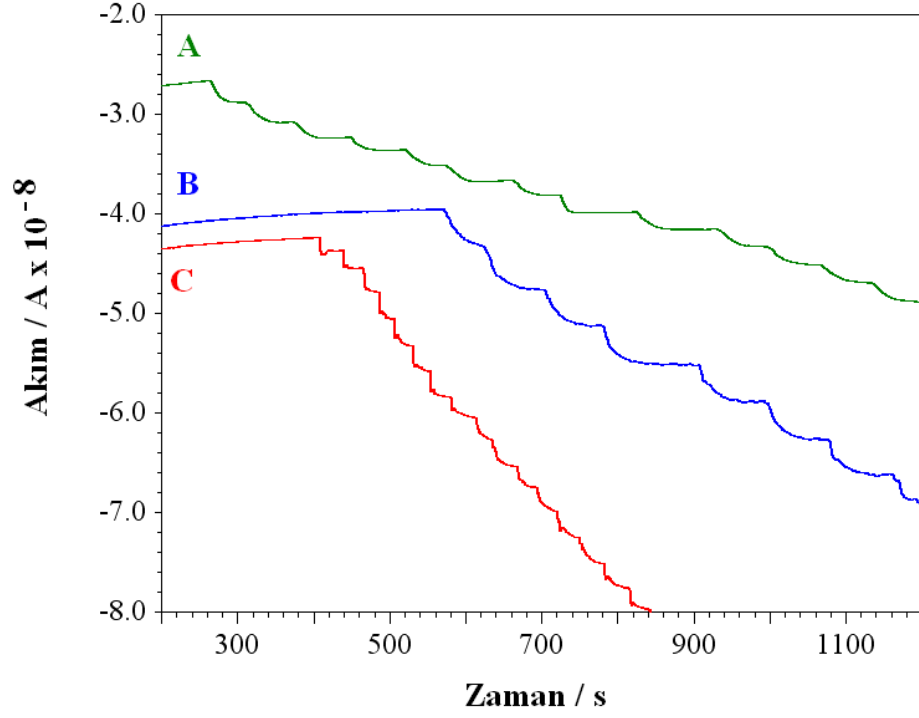
Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışmada optimum hidrojen peroksit konsantrasyonunu belirleyebilmek için sırasıyla 8-48 μ M konsantrasyon aralığında hidrojen peroksit içeren 10 mL'lik pH 7 - 0,01 M tampon ortamına 16 μ M fenol eklemesi yapılmıştır. -50 mV'luk potansiyel altında, her hidrojen peroksit konsantrasyonunda elde edilen indirgenme akımları Şekil 4.34'de verilmiştir. En yüksek indirgenme akımına 16 μ M hidrojen peroksit içeren tampon ortamında ulaşılmıştır.



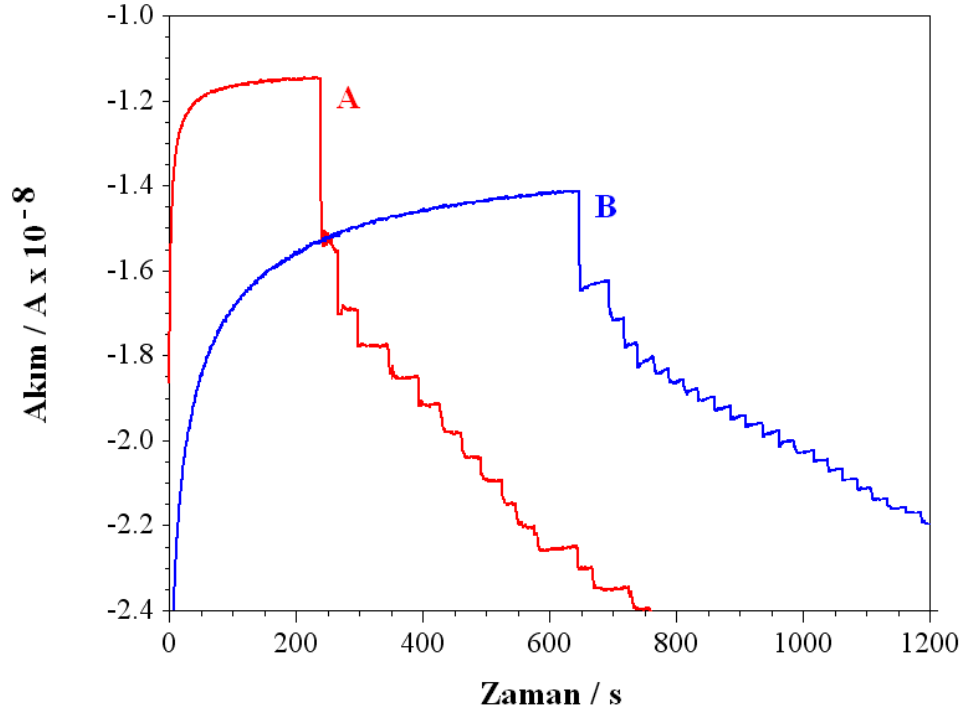
Şekil 4.34. Hidrojen peroksit konsantrasyonunun Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu performansına etkisi.

4.4.3. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au Çalışma Elektrodu ile Fenol ve Türevlerinin Ölçümü

Optimize edilmiş deney koşullarında Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunun 18 fenol bileşiğine verdiği tepki incelenmiştir. Kesikli ortamda, 600 rpm'lik karıştırma altında, -50 mV'luk çalışma potansiyelinde her bir fenol bileşiği için 1,6 μM konsantrasyondan başlamak üzere düzenli olarak artan konsantrasyonlarda reaksiyon ortamına eklemeler yapılmıştır. Reaksiyon ortamına her ekleme ile birlikte 16 μM'lık hidrojen peroksit çözeltisi de eklenmiştir. Her ekleme sonunda elde edilen akım değerleri zamana bağlı olarak görüntülenmiştir. Pirokatekol, 4-metoksifenol ve 2-aminofenol eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafikleri Şekil 4.35'de, guaiakol ve pirogallol eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafikleri ise Şekil 4.36'da gösterilmiştir.

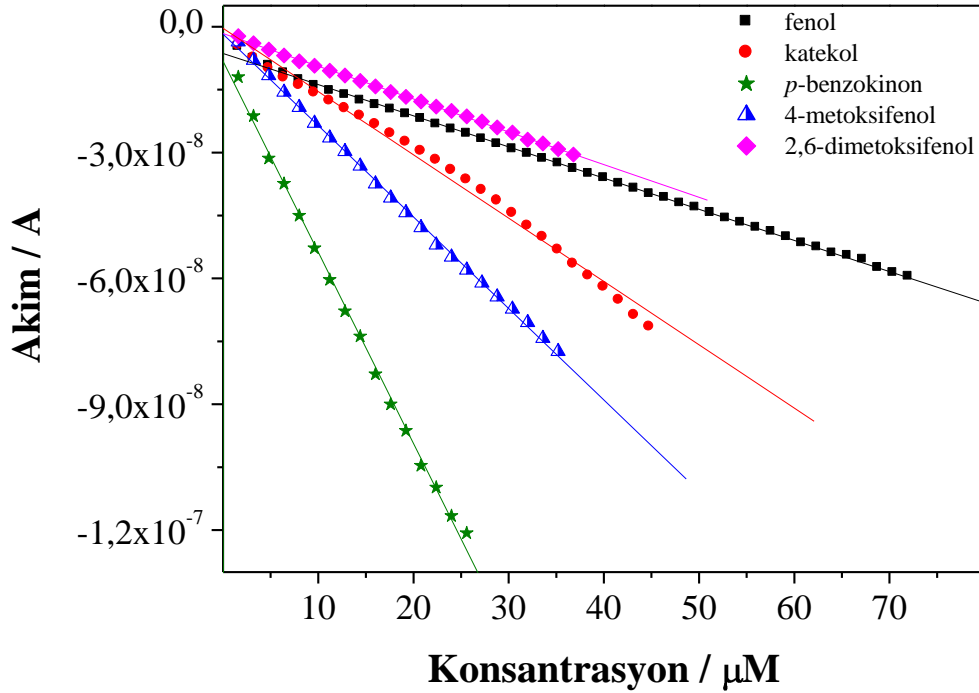


Şekil 4.35. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodundan pirokatekol (A), 4-metoksifenol (B) ve 2-aminofenol (C) eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafikleri.



Şekil 4.36. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodundan guaiakol (A) ve pirogallol (B) eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafikleri.

Amperometrik akım-zaman grafikleri kullanılarak her bir ekleme sonunda elde edilen akım değişimleri ekleme konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilmiş ve söz konusu fenolik türler için kalibrasyon eğrileri çıkartılmıştır. Fenol, katekol, *p*-benzokinin, 4-metoksifenol ve 2,6-dimetoksifenol için hazırlanan kalibrasyon eğrileri Şekil 4.37’de verilmiştir.



Şekil 4.37. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunda fenol, katekol, *p*-benzokinin, 4-metoksifenol ve 2,6-dimetoksifenol için elde edilen kalibrasyon eğrileri.

Farklı fenol türlerinin kalibrasyonundan elde edilen analitik hesaplamalar Çizelge 4.5’de verilmiştir. Ölçüm hassasiyeti, hidrokinnon > *p*-benzokinin > 4-asetamidofenol > katekol = 2-aminofenol = 4-metoksifenol > 2-klorofenol = 3-klorofenol = 4-klorofenol = pirokatekol > 2,6-dimetoksifenol > fenol > 2,4-dimetilfenol > guaiakol > pirogallol şeklindedir. Çalışmada en düşük hassasiyet değeri pirogallol için elde edilmiştir, *o-m-p*-kresollerden ise yanıt alınamamıştır. Pirogallol ve *o-m-p*-kresoller enzimle okside edildiklerinde yapılarında bulunan *m*-hidroksi ve metil grupları elektron aktarımı için iyi bir konjugasyon yapısına sahip değildir [Maehly et al., 1995]. Bu nedenle elektron transferi ya oldukça güç ya da hiç

gerçekleşmemektedir. Benzer sonuçlar Kane ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir. Kane ve arkadaşları, *o*-pozisyondaki elektron verici ve *m*-pozisyondaki elektron alıcı grupların ölçüm hassasiyetini düşüreceğini veya bu grupları taşıyan bileşiklerden hiç yanıt alınamayacağını belirtmişlerdir [Kane et al., 1998]. Çalışmada test edilen fenoller arasında en yüksek ölçüm hassasiyeti hidrokinon eklemelerinden elde edilmiştir. Bu durum, hidrokinonda bulunan elektron verici grupların konjugasyon yapılarının güçlü elektron transfer yeteneğine bağlanabilir. 2,4-dimetilfenol için elde edilen hassasiyet değeri de oldukça düşüktür. Benzer şekilde *o*-pozisyonunda bulunan bir metil grubunun hassasiyeti düşürdüğü tahmin edilmektedir [Maehly et al., 1995]. Klorofenollerin tümü aynı ölçüm hassasiyetine sahiptir. Çalışmamızda hassasiyet değerleri, 0,1-9 nA/μM aralığında değişim göstermiştir. Literatürde bu aralık 0,011-746 nA/μM aralığında rapor edilmiştir [Yang et al., 2006; Wilkolazka et al., 2005; Tsai and Cheng-Chiu, 2007; Kim and Lee, 2003; Vianello et al., 2006].

Çizelge 4.5. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu için fenol ve türevlerinin ölçümünde hesaplanan analitik parametreler.

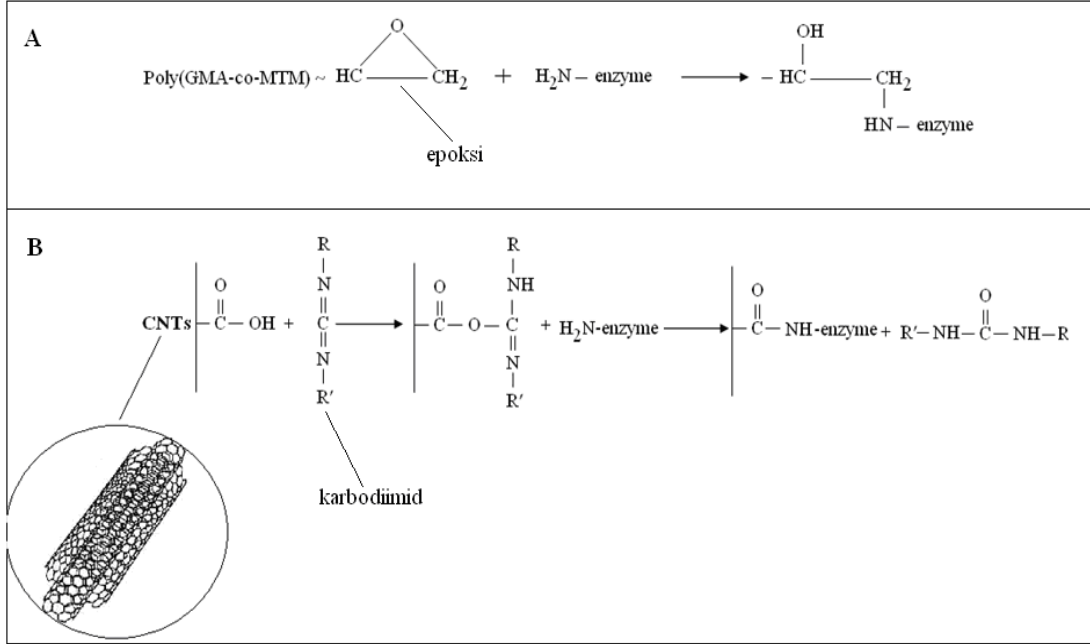
| <i>Fenolik tür</i> | <i>r</i> | <i>Hassasiyet</i> (nA/μM) | <i>Doğrusal</i> <i>aralık</i> (μM) | <i>LOD</i> (μM) | <i>Yanıt</i> <i>süresi</i> (s) | <i>%RSD</i> | <i>%Verimlilik</i> |
|----------------------|----------|------------------------------|--|--------------------|--------------------------------------|-------------|--------------------|
| Fenol | 0,999 | 0,7 | 1,6-72 | 0,732 | 3,8 | 7,5 | 101 |
| <i>p</i> -benzokinon | 0,998 | 5 | 1,6-25,6 | 0,409 | 12 | 13 | 97 |
| Hidrokinon | 0,995 | 9 | 1,6-25,6 | 0,336 | 14 | 8,8 | 95 |
| 2,6-dimetoksifenol | 0,996 | 0,8 | 1,6-36,8 | 0,382 | 10 | 8,38 | 95 |
| 2-klorofenol | 0,999 | 1 | 1,6-68,8 | 0,249 | 1,7 | 4,7 | 107 |
| 3-klorofenol | 0,999 | 1 | 1,6-81,6 | 0,441 | 1,6 | 9,9 | 97 |
| 4-klorofenol | 0,999 | 1 | 1,6-86,4 | 0,336 | 2,6 | 6,9 | 102 |
| 2-aminofenol | 0,999 | 2 | 1,6-44,8 | 0,247 | 2,5 | 6,6 | 99 |
| 4-metoksifenol | 0,999 | 2 | 1,6-35,2 | 0,312 | 35 | 6,35 | 102 |
| Pirokatekol | 0,998 | 1 | 1,6-49,6 | 0,516 | 32 | 11 | 98 |
| Guaiakol | 0,994 | 0,3 | 3,2-52,8 | 0,490 | 5 | 10 | 100 |
| <i>m</i> -kresol | | | <i>Tepki yok</i> | | | | |
| <i>o</i> -kresol | | | <i>Tepki yok</i> | | | | |
| <i>p</i> -kresol | | | <i>Tepki yok</i> | | | | |
| Katekol | 0,995 | 2 | 1,6-44,8 | 0,304 | 3 | 7,5 | 98 |
| 4-asetamidofenol | 0,995 | 3 | 1,6-22,4 | 0,624 | 59 | 12 | 103 |
| Pirogallol | 0,999 | 0,1 | 4,8-48 | 0,660 | 2 | 11 | 106 |
| 2,4-dimetilfenol | 0,998 | 0,4 | 1,6-40 | 0,382 | 4,52 | 7,8 | 102 |

Çizelge 4.5’de test edilen her fenolik için Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunun yanıt süresi verilmiştir. En hızlı yanıt süreleri 3-klorofenol, 2-klorofenol, pyrogallol, 2-aminofenol, 4-klorofenol, katekol ve fenol için sırasıyla 1,6- 1,7-2- 2,5-2,6 ve 3 s olarak bulunmuştur. Hızlı yanıt süresi HRP ve substratları arasındaki hızlı elektron değişiminin göstergesidir. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP filmin, enzimin katalitik özelliği üzerine olumsuz etki yapmadığı anlaşılmaktadır. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunun test edilen fenoliklerin çoğuna verdiği yanıt süresi, literatürde fenol ve klorofenoller için rapor edilen 10 s [Rajesh and Kaneto, 2005] ve 30 s’lik [Zhang et al., 2003] süreden azdır.

Geniş doğrusal aralık 2-klorofenol için 1,6-68,8 μM , 3-klorofenol için 1,6-81,6 μM ve 4-klorofenol için 1,6-86,4 μM aralığında elde edilmiştir ($r=0,999$). En düşük belirleme limiti 2-aminofenol için 0,247 μM , en yüksek belirleme limiti ise fenol için 0,732 μM olarak hesaplanmıştır. Biyosensörde ayrıca ölçüm verimliliği hesaplanmış (bkz. Bölüm 3.7.4.6) ve ölçümü yapılan fenolikler arasında bu değer % 95-107 aralığında değişim göstermiştir (Çizelge 4.5).

Elektrokimyasal film kaplaması sırasında ortamda bulunan CNT, oluşmakta olan Poli(GMA-co-MTM)/PPy kopolimerinin ağ yapıları arasında hapsolmuştur. Elektrot yüzeyinde bu şekilde bağlı bulunan CNT, reaksiyon sırasında medyatör olarak davranmış, elektron transferini kolaylaştırmış ve nano yapısı sayesinde kompozit film içerisinde HRP immobilizasyonu için geniş yüzey alanı oluşturmuştur. Çalışmada HRP’nin film üzerine immobilizasyonu muhtemelen polimerin fonksiyonel grupları ile HRP arasındaki C ~ N bağları üzerinden gerçekleşmiştir. HRP gerek kompozit film içerisinde bulunan CNT’nin karboksil grupları üzerinden (asit oksidasyon metodu ile CNT üzerinde karboksil grupları oluşmuştur [Zhao et al., 2002]) karbodiimid aracılığıyla, gerekse Poli(GMA-co-MTM)’nin epoksi grupları üzerinden elektrot yüzeyine kimyasal olarak bağlanmıştır. HRP’nin film yüzeyine muhtemel bağlanma mekanizmaları Şekil 4.38’de gösterilmiştir. HRP’nin film yüzeyine yukarıda açıklandığı gibi 2 mekanizma ile immobilizasyonunun teorik olarak enzim molekülü üzerinde sterik engellemeye neden olması beklenir. Fakat burada HRP’nin, elektron transfer köprüsü olan CNT ile direkt teması HRP’nin

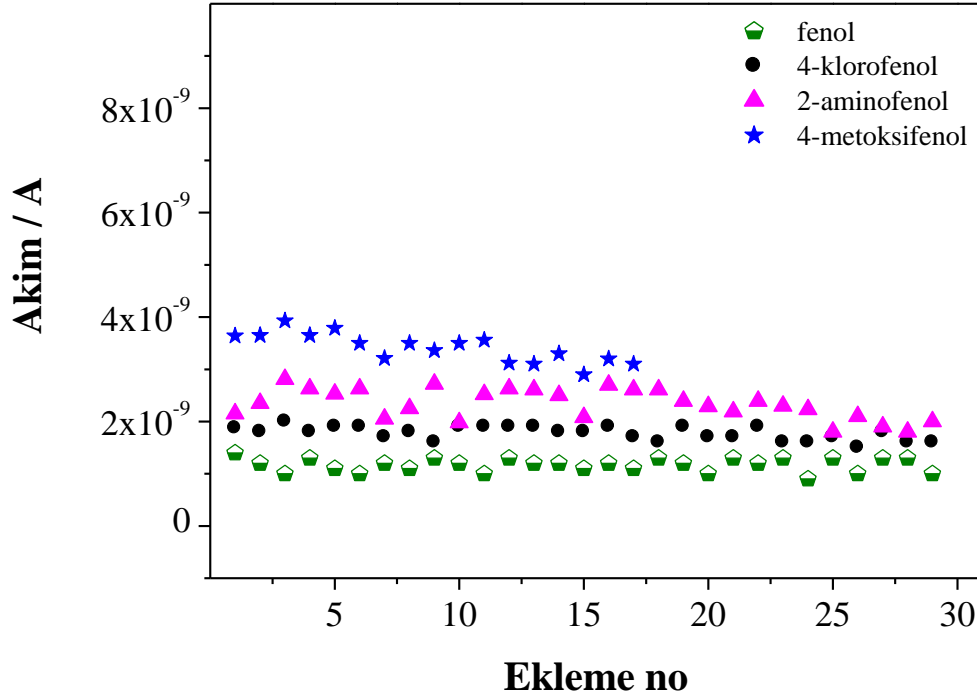
elektron alışını kolaylaştırmış ve bu durum elektrokimyasal reaksiyon için enzime kararlı bir mikroçevre yaratmıştır.



Şekil 4.38. HRP'nin Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT kompozit film yüzeyine Poli(GMA-co-MTM)'nin epoksi grupları üzerinden (A), CNT'nin taşıdığı karboksil grupları üzerinden (B) muhtemel bağlanma mekanizmaları.

Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunun işletme kararlılığının tespiti için, 0,7 mg/mL lityum klorid içeren 0,1 M - pH 7 fosfat tamponununun 10 mL'sine -50 mV'luk çalışma potansiyeli altında, ard arda 1,6 µM'lık fenolik eklemeleri yapılmış ve elde edilen akım değişimleri kaydedilmiştir (Şekil 4.39). Akım değişimlerinin standart sapma değerlerinden hesaplanan %RSD değerleri (bkz. Bölüm 3.7.4.4) Çizelge 4.5'de verilmiştir. %RSD değerleri test edilen fenolikler için 4,7-13 aralığında değişim göstermiştir. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu, 1 ay içinde 700 defa kullanılmış ve kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin %80'ini korumuştur. Uzun süre depo kararlılığı, literatürde farklı şekillerde hazırlanan fenol biyosensörleri için rapor edilen kararlılık değerlerinden yüksek çıkmıştır [Shan et al., 2007; Carretero et al., 2006; Vianello et al., 2004]. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP kompozit film, enzimin biyoaktivitesini uzun süre koruyabilmesi için enzime uygun bir çevre

oluşturmuş ve bu sayede çalışma elektrodunun uzun süre kararlı olması sağlanabilmektedir.

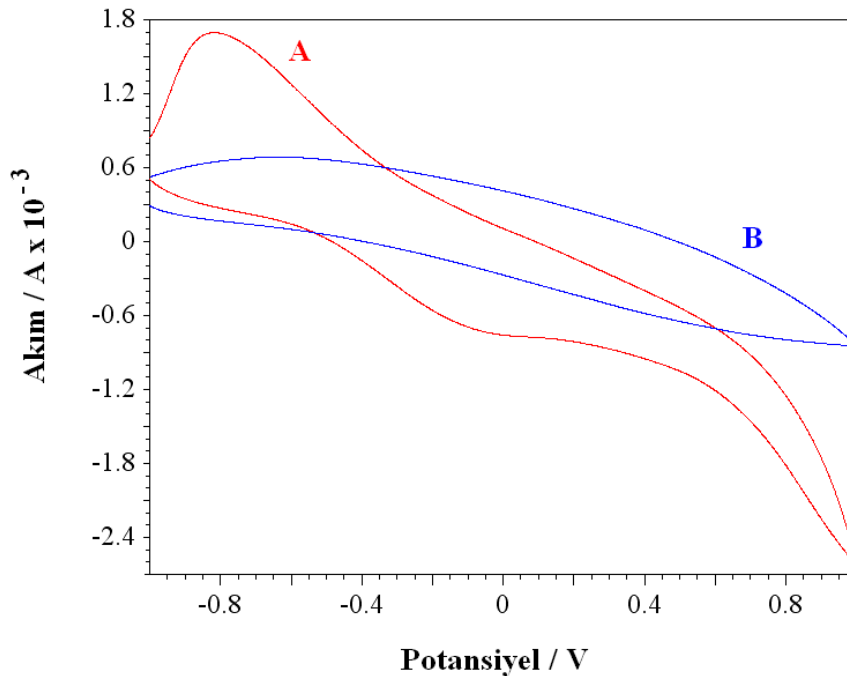


Şekil 4.39. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodunun fenol, 4-klorofenol, 2-aminofenol ve 4-metoksifenol için işletme kararlılığı grafikleri.

4.5. Poli(GMA-co-MTM) ile Hazırlanmış Farklı Çalışma Elektrotlarının Film Karakterizasyonu

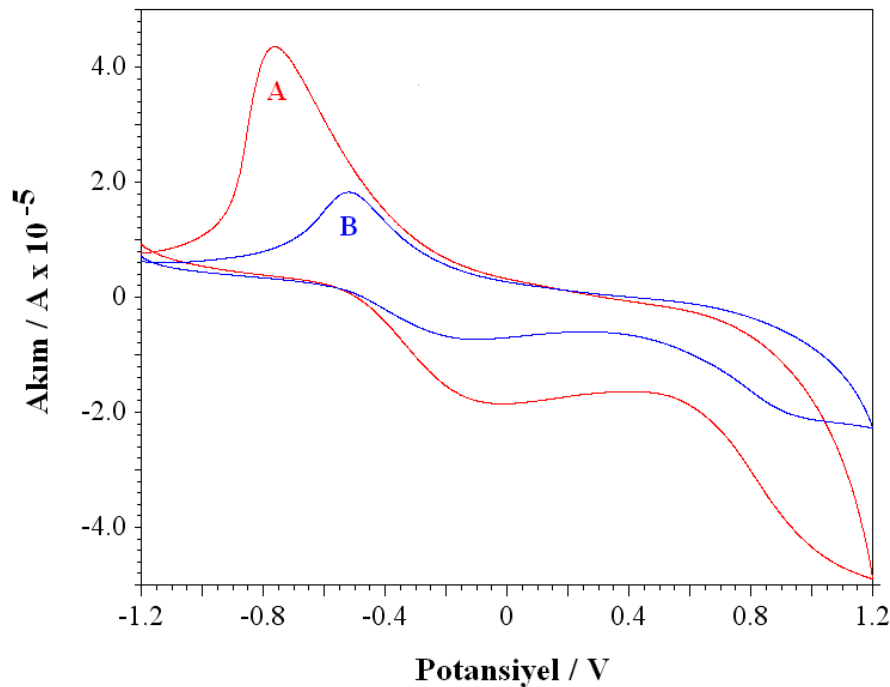
Bu bölümde, Bölüm 3.6.5’de açıklandığı gibi farklı film kaplama ve enzim immobilizasyon metotlarıyla hazırlanmış Poli(GMA-co-MTM) tabanlı çalışma elektrotlarının genel bir elektrokimyasal film karakterizasyonu yapılmıştır. Poli(GMA-co-MTM) tabanlı çalışma elektrotları, Poli(GMA-co-MTM)/PPy kompozitleri şeklinde hazırlandığından, bu iki polimeri içerecek şekilde uygun elektropolimerizasyon ortamlarının seçimi için aşağıdaki gibi dönüşümlü voltametri deneyleri yapılmıştır. Pirol monomeri şimdiye kadar hep sulu ortamlarda elektrot yüzeylerinde elektropolimerize edilmiştir. Poli(GMA-co-MTM)/PPy kompozitleri oluşturulurken en iyi kompozit filmlerin olduğu ortamı belirleyebilmek için, altın

elektrot yüzeyi hem sulu hem de organik ortamda polipirol ile kaplanmıştır. Bunun için, temizleme prosedüründen geçirilmiş altın elektrot yüzeyinde, 0,05 M sitrat tamponunun (pH 6,5) 10 mL'sine sırasıyla 6 mg SDS, 7 μ L pirol monomeri (çözeltideki konsantrasyonu 0,01 M olacak şekilde) eklenerek, -1 ile +1 V'luk potansiyel aralığında, 100 mV/s'lik tarama hızında dönüşümlü voltametri metodu kullanılarak 4 dakikalık sürede polipirol film kaplanmıştır (Şekil 4.40A). Pirolün organik ortamda elektropolimerizasyonu ise asetonitril ortamında gerçekleştirilmiştir. Bunun için, 10 mL asetonitril ortamına destek elektrolit olarak 0,165 g TBAFB (konsantrasyonu 0,05 M olacak şekilde) ve 7 μ L pirol monomeri (konsantrasyonu 0,01 M olacak şekilde) eklenerek, -1 ile +1 V'luk potansiyel aralığında, 100 mV/s'lik tarama hızında dönüşümlü voltametri metodu kullanılarak 4 dakikalık sürede polipirol film kaplanmıştır (Şekil 4.40B). Şekil 4.40'dan görüldüğü gibi pirolün sulu ortamda elektropolimerizasyonunda elektrot yüzeyinden geçen akım değerleri, organik ortamdaki elektropolimerizasyonda elde edilen akım değerlerinden yüksek çıkmıştır. Bu sonuç, pirolün sulu ortamda elektrot yüzeyinde daha iyi okside olduğunun göstergesidir. Bu nedenle Poli(GMA-co-MTM)/PPy kompozitleri elektrot yüzeyinde sulu ortamda hazırlanmıştır.



Şekil 4.40. Pirolün sulu ortamda (A) ve organik ortamda (B) altın elektrot yüzeyinde elektropolimerizasyonuna ait dönüşümlü voltametri grafikleri.

Daha önce Poli(GMA-co-MTM) ile hazırlanmış çalışma elektrotlarında Poli(GMA-co-MTM)/PPy kompozitleri sentezlenirken, Poli(GMA-co-MTM)'nin tek başına elektrot yüzeyinde bir elektroaktiflik göstermediğinden, ancak pirol ile elektropolimerize edilmesinden sonra oluşan Poli(GMA-co-MTM)/PPy kompozitinin elektriksel iletkenliğe sahip olmasından dolayı bir elektroaktiflik gösterdiğinden bahsetmiştik. Yukarıda anlatıldığı şekilde sulu ortamda sentezlenmiş saf polipirol filme ve Poli(GMA-co-MTM) elektrot yüzeyine damlatıldıktan sonra bu elektrodun yüzeyinde sulu ortamda pirol elektropolimerizasyonu sonucu oluşmakta olan Poli(GMA-co-MTM)/PPy kompozit filmine ait dönüşümlü voltametri grafikleri Şekil 4.41'de gösterilmiştir. Şekil 4.41A'da görüldüğü gibi pik akım değerlerinin artması, pirol ile Poli(GMA-co-MTM)'ye ait tiyofen gruplarının elektropolimerizasyon sırasında etkileşime girdiğinin göstergesidir [Yılmaz et al., 2004; Camurlu et al., 2007; Çırpan et al., 2002]. Polipirol filme ve Poli(GMA-co-MTM)/PPy kompozit filmine ait dönüşümlü voltametrimlerin şekillerinin aynı olması, Poli(GMA-co-MTM)/PPy kompozit film oluşurken elektrot ile film arasındaki elektron transfer prosesinde olumsuz bir etkinin gerçekleşmediğini belirtmektedir ayrıca iyi tanımlanmış pikler her iki filmin de homojen olduğunu göstermektedir.

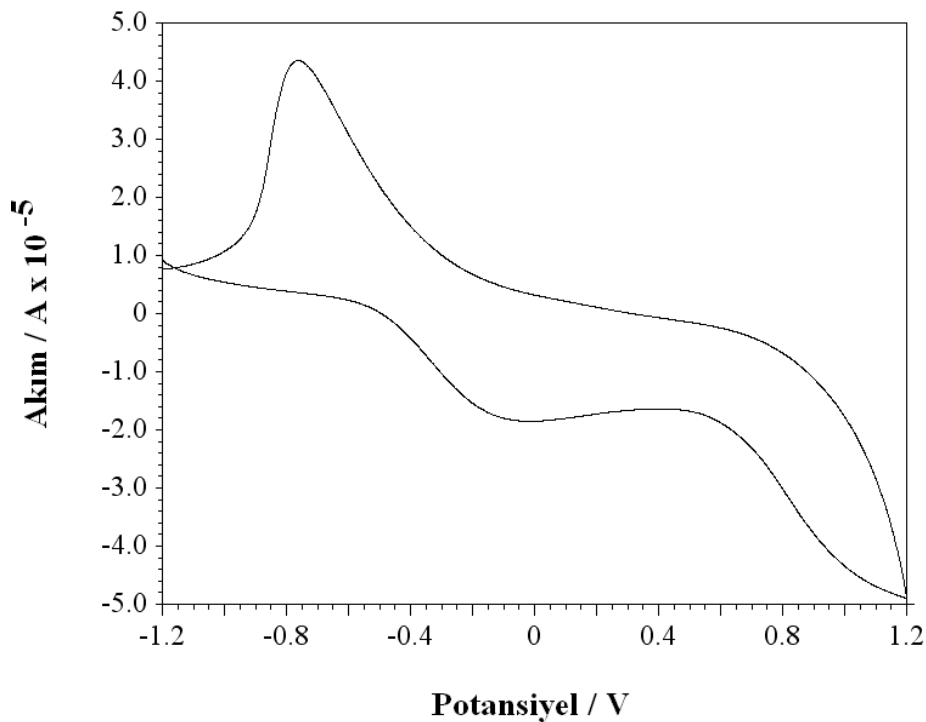


Şekil 4.41. Sulu ortamda altın elektrot yüzeyinde Poli(GMA-co-MTM)/PPy kompozit filmin (A) ve saf polipirol filmin (B) elektropolimerizasyonuna ait dönüşümlü voltametri grafikleri.

4.5.1. Poli(GMA-co-MTM)/PPy~HRP/Au Çalışma Elektrodu Bulguları

Bölüm 3.6.5.1, Bölüm 3.6.5.2, Bölüm 3.6.5.3, Bölüm 3.6.5.4 ve Bölüm 3.6.5.5’de açıklandığı gibi hazırlanmış Poli(GMA-co-MTM) tabanlı çalışma elektrotlarının model fenolik olarak hidrokina tepkisi incelenmiş ve her bir elektrodun ölçüm sonuçları birbiriyle kıyaslanmıştır. Bu 5 çalışma elektroduna ait analitik hesaplamalar Çizelge 4.6’da verilmiştir.

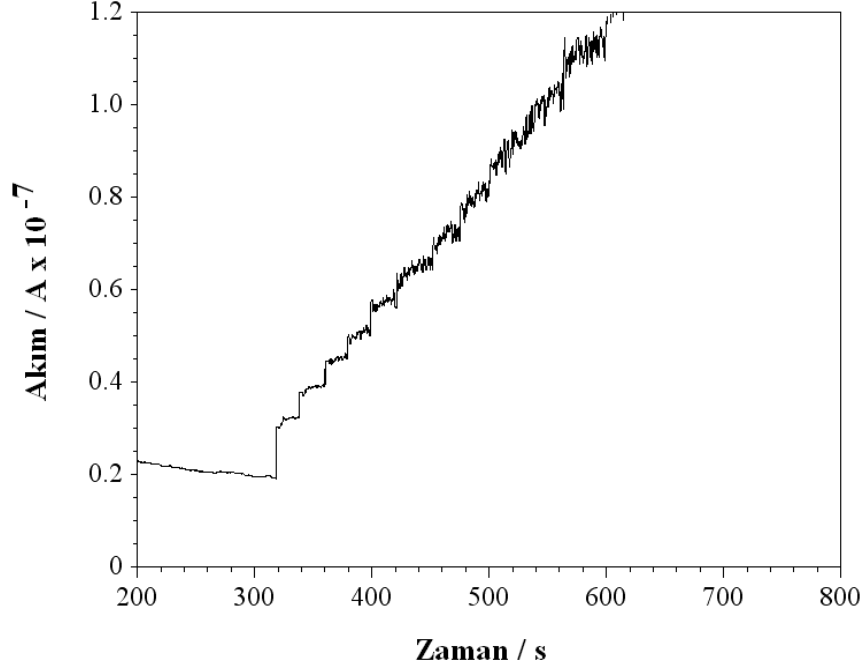
Poli(GMA-co-MTM)/PPy~HRP/Au çalışma elektrodu Bölüm 3.6.5.1’de açıklandığı gibi hazırlanmıştır. Poli(GMA-co-MTM)/PPy~HRP/Au çalışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği Şekil 4.42’de verilmiştir.



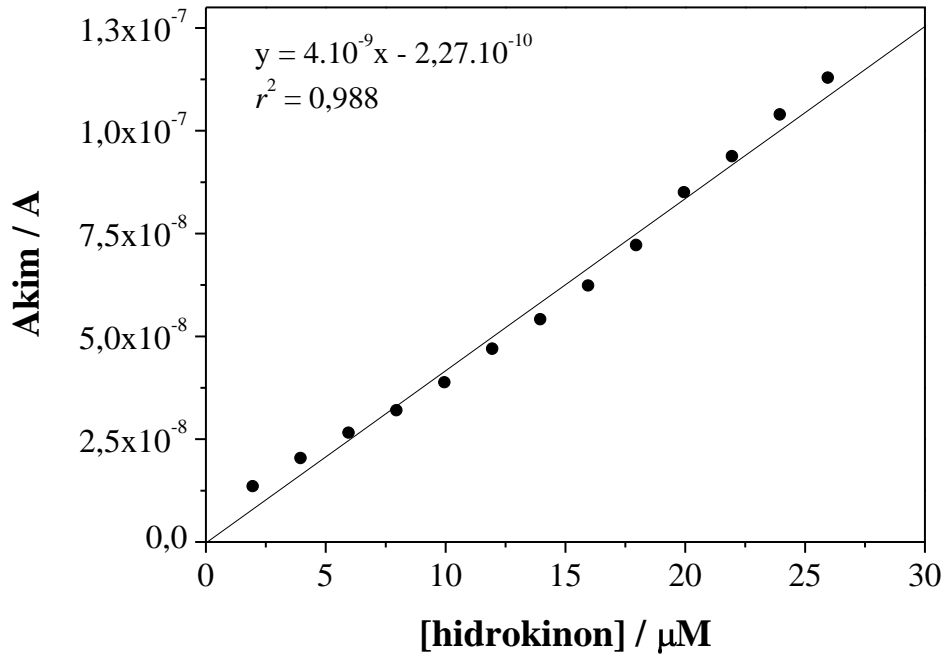
Şekil 4.42. Poli(GMA-co-MTM)/PPy~HRP/Au çalışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği.

Poli(GMA-co-MTM)/PPy~HRP/Au çalışma elektrodunun model fenolik olarak hidrokina verdiği tepki incelenmiştir. Kesikli ortamda, 600 rpm’lik karıştırma altında, -50 mV’luk çalışma potansiyelinde hidrokina, 2 μ M konsantrasyondan

başlamak üzere düzenli olarak artan konsantrasyonlarda reaksiyon ortamına eklenmiştir . Reaksiyon ortamına her ekleme ile birlikte $20 \mu\text{M}$ 'lık hidrojen peroksit çözeltisi de eklenmiştir. Her ekleme sonunda elde edilen akım değerleri zamana bağlı olarak görüntülenmiştir (Şekil 4.43). Amperometrik akım-zaman grafiğinden yararlanılarak elde edilen hidrokinon kalibrasyon grafiği de Şekil 4.44'de verilmiştir.



Şekil 4.43. Poli(GMA-co-MTM)/PPy~HRP/Au çalışma elektrodundan hidrokinon eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği.

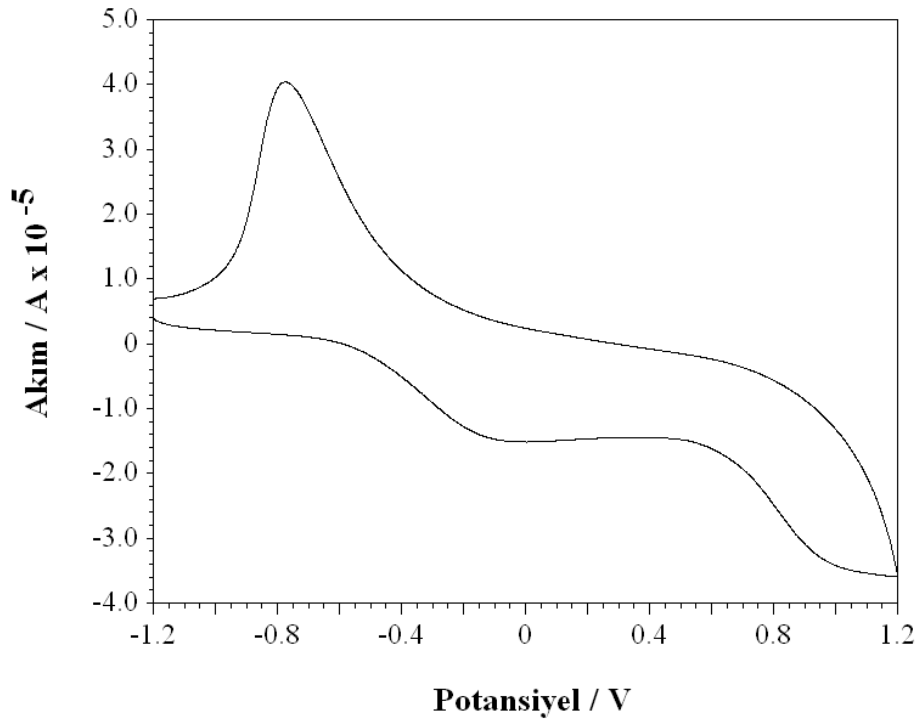


Şekil 4.44. Poli(GMA-co-MTM)/PPy~HRP/Au çalışma elektrodunda hidrokinon için elde edilen kalibrasyon eğrisi.

Poli(GMA-co-MTM)/PPy~HRP/Au çalışma elektrodunda hidrokinon ölçümü için elde edilen analitik parametrelerden hassasiyet değeri $4 \text{ nA}/\mu\text{M}$, belirleme limiti $1,2 \mu\text{M}$ ve doğrusal ölçüm aralığı $2\text{-}26 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.6). Poli(GMA-co-MTM)/PPy~HRP/Au çalışma elektrodunda hidrokinon eklemeleri sonucu oluşan akım değerleri ve buna bağlı olarak da ölçüm hassasiyeti oldukça düşük çıkmıştır. Poli(GMA-co-MTM)/PPy~HRP/Au çalışma elektrodunda, enzimin Poli(GMA-co-MTM)/PPy kompozit filmine, Poli(GMA-co-MTM)'ye ait epoksi grupları üzerinden kimyasal bağlanması beklenmiştir. Fakat burada, Poli(GMA-co-MTM) ile kaplanmış elektrot yüzeyinde pirol elektropolimerizasyonu sonucu Poli(GMA-co-MTM)/PPy kompozit filmi sentezlenmiş ve elektrot daha sonra enzim çözeltisine bırakılmıştır. Poli(GMA-co-MTM)/PPy kompozit filminin, enzimin Poli(GMA-co-MTM)'ye ait epoksi gruplarına erişimini zorlaştırdığı tahmin edilmektedir. Ayrıca ölçümler sırasında oldukça fazla kararsızlık gözlenmiştir (Şekil 4.43).

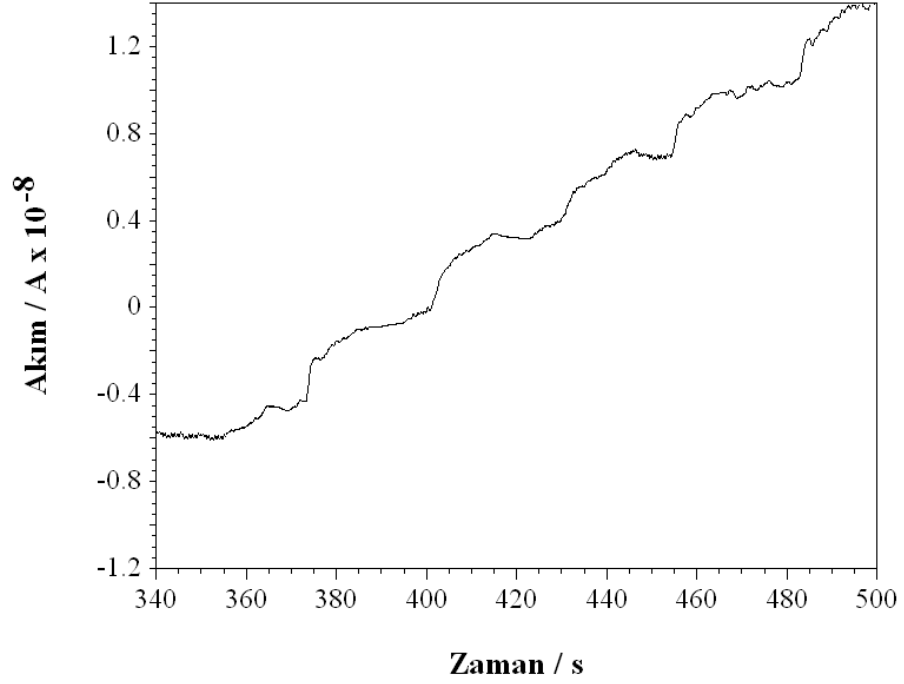
4.5.2. Poli(GMA-co-MTM)~HRP/PPy/Au Çalışma Elektrodu Bulguları

Poli(GMA-co-MTM)~HRP/PPy/Au çalışma elektrodu Bölüm 3.6.5.2'de açıklandığı gibi hazırlanmıştır. Poli(GMA-co-MTM)~HRP/PPy/Au çalışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği Şekil 4.45'de verilmiştir.

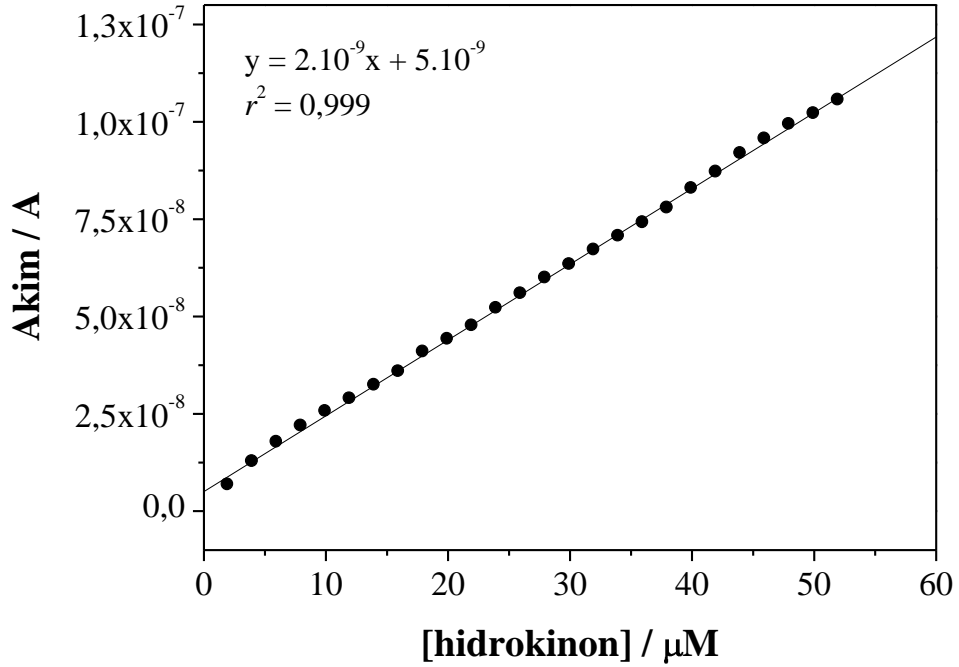


Şekil 4.45. Poli(GMA-co-MTM)~HRP/PPy/Au çalışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği.

Poli(GMA-co-MTM)~HRP/PPy/Au çalışma elektrodunun hidrokinona verdiği tepki kesikli ortamda, 600 rpm'lik karıştırma altında, -50 mV'luk çalışma potansiyelinde 2 μ M konsantrasyondan başlamak üzere düzenli olarak artan konsantrasyonlarda hidrokinonun reaksiyon ortamına eklenmesiyle incelenmiştir. Her ekleme sonunda elde edilen akım değerleri zamana bağlı olarak Şekil 4.46'da verilmiştir. Amperometrik akım-zaman grafiğinden yararlanılarak elde edilen hidrokinon kalibrasyon grafiği Şekil 4.47'de verilmiştir.



Şekil 4.46. Poli(GMA-co-MTM)~HRP/PPy/Au çalışma elektrodundan hidrokinon eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği.

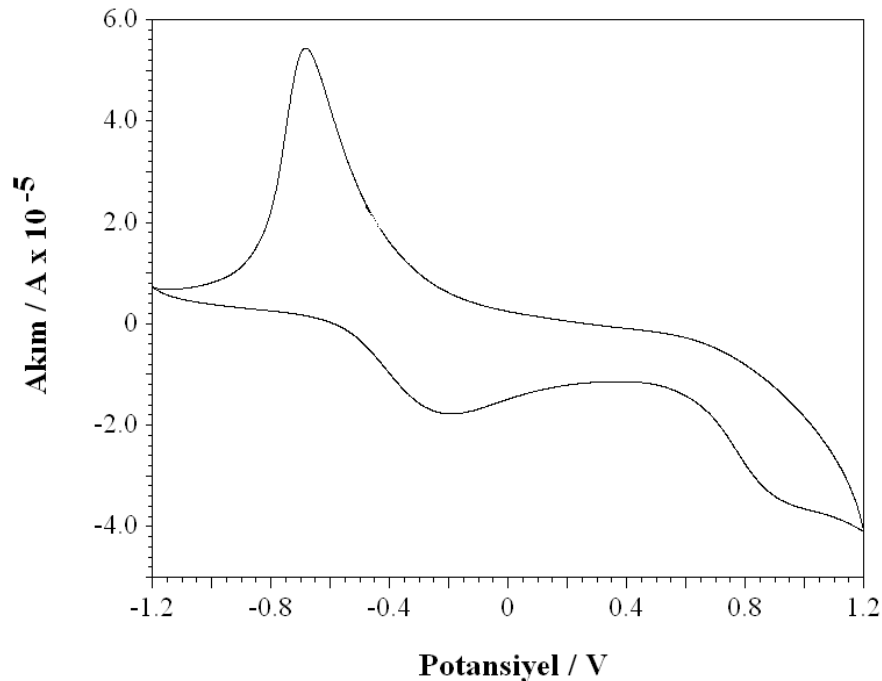


Şekil 4.47. Poli(GMA-co-MTM)~HRP/PPy/Au çalışmada hidrokinon için elde edilen kalibrasyon eğrisi.

Poli(GMA-co-MTM)~HRP/PPy/Au çalışma elektrodunda hidrokinon ölçümü için hassasiyet değeri $2 \text{ nA}/\mu\text{M}$, belirleme limiti $1,5 \mu\text{M}$ ve doğrusal ölçüm aralığı $2-52 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.6). Poli(GMA-co-MTM)~HRP/PPy/Au çalışma elektrodunda da hidrokinon eklemeleri sonucu oluşan akım değerleri ve buna bağlı olarak da ölçüm hassasiyeti düşük çıkmıştır. Poli(GMA-co-MTM)~HRP/PPy/Au çalışma elektrodunda, enzim Poli(GMA-co-MTM) üzerine direkt olarak epoksi gruplarından bağlanmış ve immobilize enzim tabakası üzerine polipirol film kaplanmıştır. Bu durum Poli(GMA-co-MTM)'ye bağlı enzim moleküllerinin enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği bulk ortam ile temasını engellediğinden hidrokinonun enzimatik oksidasyonu kısıtlanmıştır.

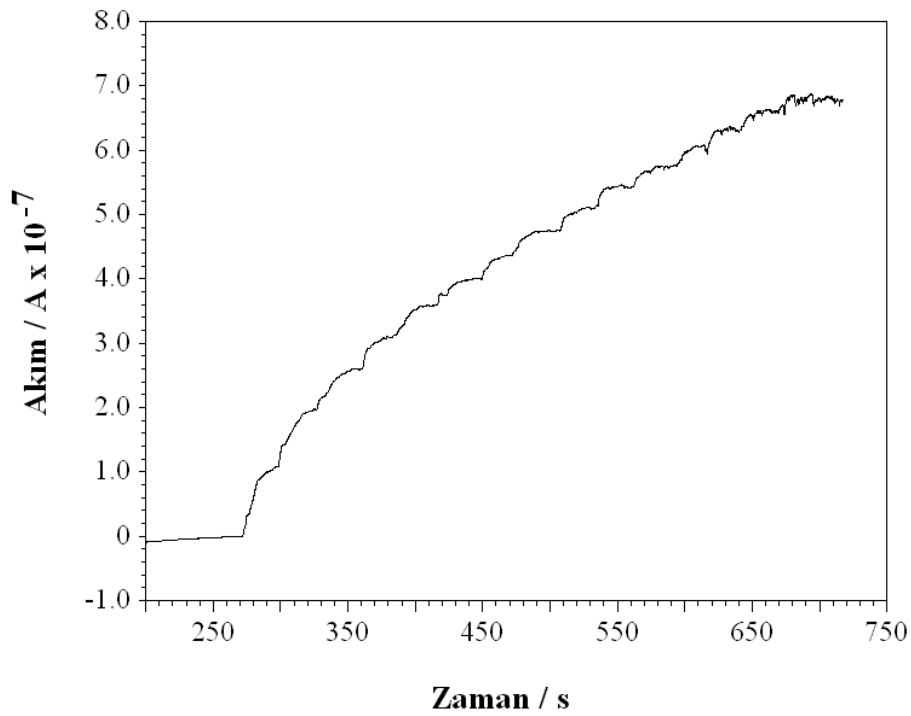
4.5.3. PPy/HRP/Au Çalışma Elektrodu Bulguları

PPy/HRP/Au çalışma elektrodu Bölüm 3.6.5.5'de açıklandığı gibi hazırlanmıştır. Çalışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği Şekil 4.48'de verilmiştir.



Şekil 4.48. PPy/HRP/Au çalışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği.

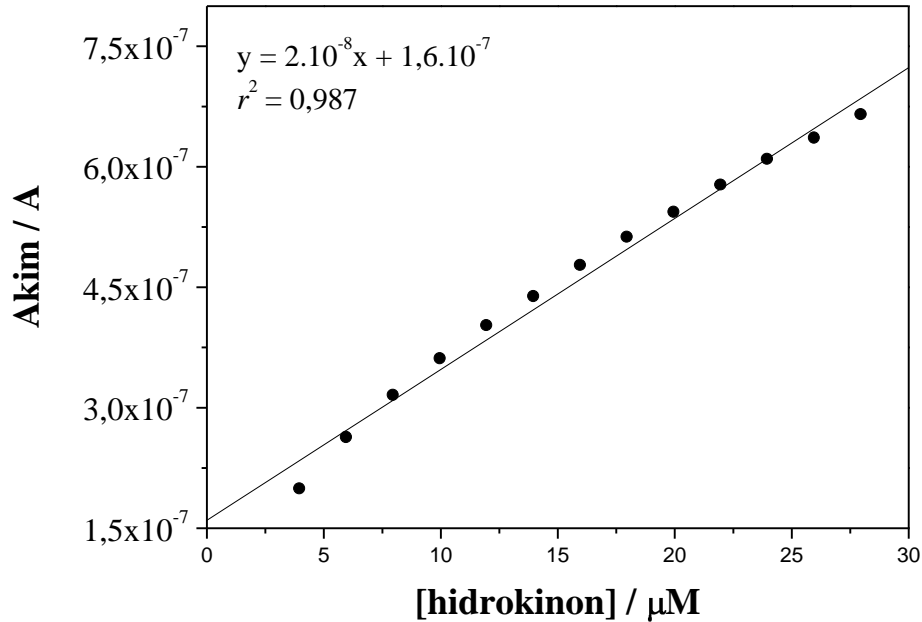
PPy/HRP/Au çalışma elektrodunun hidrokinona verdiği tepki yukarıdaki bölümlerde açıklanan reaksiyon şartlarında incelenmiştir. Her ekleme sonunda elde edilen akım değerleri zamana bağlı olarak Şekil 4.49'da verilmiştir. Amperometrik akım-zaman grafiğinden yararlanılarak elde edilen hidrokinon kalibrasyon grafiği Şekil 4.50'de verilmiştir.



Şekil 4.49. PPy/HRP/Au çalışma elektrodundan hidrokinon eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği.

PPy/HRP/Au çalışma elektrodunda hidrokinon ölçümü için hassasiyet değeri 20 nA/ μ M, belirleme limiti 2,55 μ M ve doğrusal ölçüm aralığı 4-28 μ M olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.6). PPy/HRP/Au çalışma elektrodunda hidrokinon eklemeleri sonucu oluşan akım değerleri ve buna bağlı olarak da ölçüm hassasiyeti, Poli(GMA-co-MTM)/PPy~HRP/Au (bkz. Bölüm 4.5.1) ve Poli(GMA-co-MTM)~HRP/PPy/Au (bkz. Bölüm 4.5.2) çalışma elektrotlarından elde edilen hassasiyet değerlerine göre yüksek çıkmıştır. Burada enzim pirolün elektropolimerizasyonu sırasında ortamda bulunduğundan, pirol monomeri polimerleşirken polimerde oluşan çapraz bağ ağları arasında hapsedilerek fiziksel olarak tutuklanmıştır. Enzim immobilizasyon işlemi enzimi yıpratmayacak şekilde

tek basamakta gerçekleştirilmiştir. Tutuklanan enzimin üzeri başka bir film ile kaplanmadığından bulk çözelti ile teması da sınırlanmamıştır.

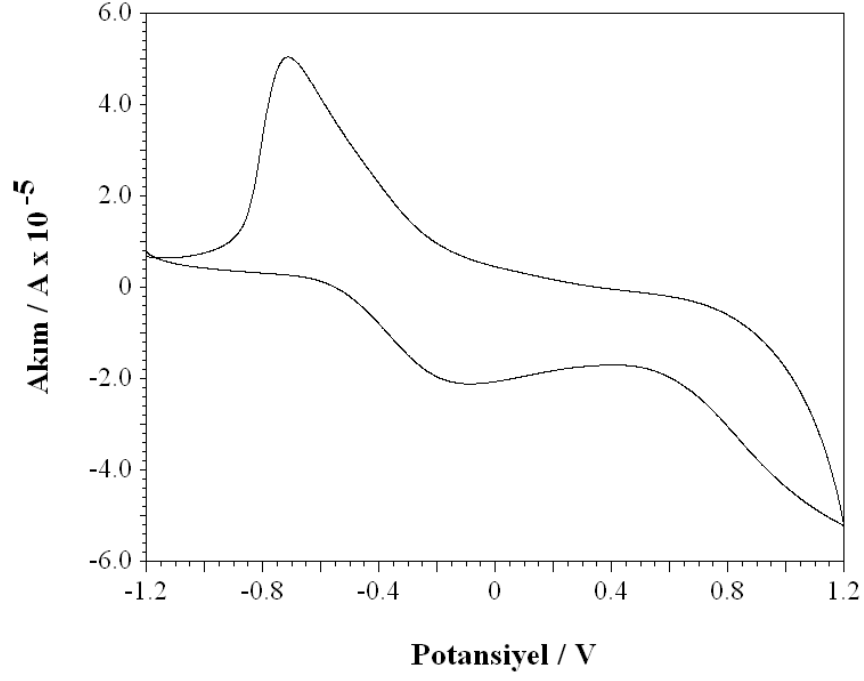


Şekil 4.50. PPy/HRP/Au çalışma elektrodunda hidrokinon için elde edilen kalibrasyon eğrisi.

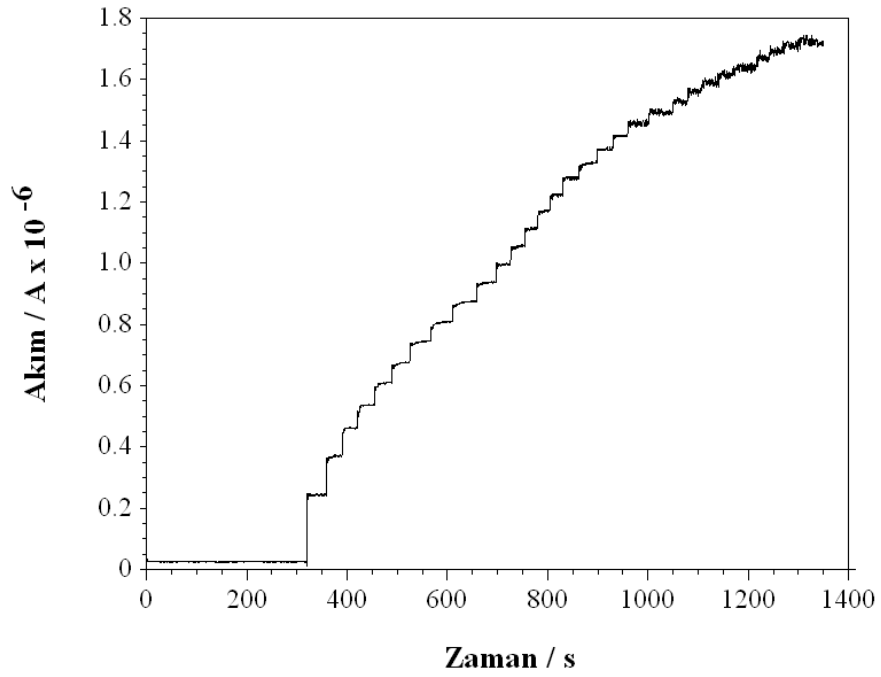
4.5.4. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au Çalışma Elektrodu Bulguları

Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektrodu Bölüm 3.6.5.3'de açıklandığı gibi hazırlanmıştır. Çalışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği Şekil 4.51'de verilmiştir.

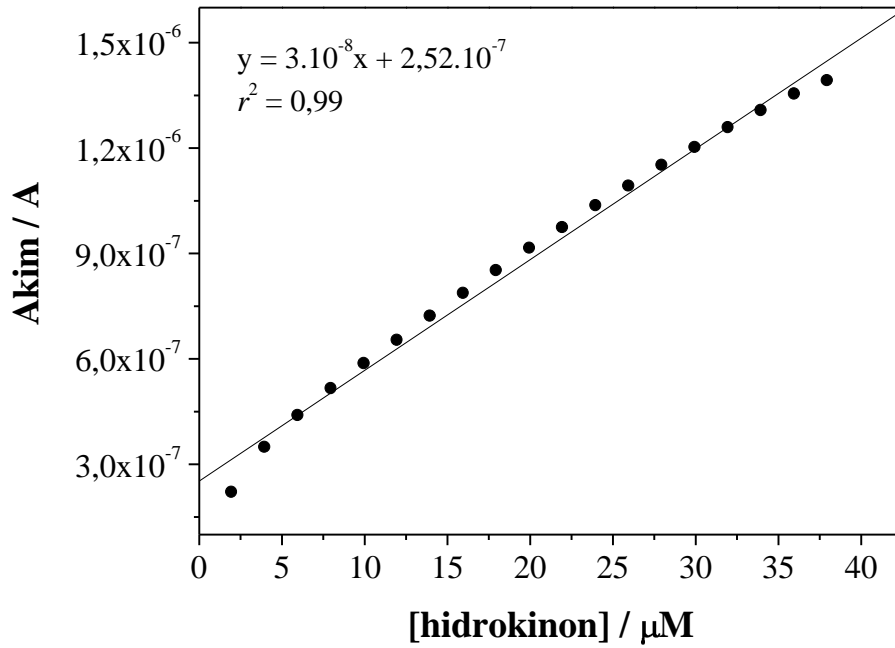
Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektrodunun hidrokinona verdiği tepki yukarıdaki bölümlerde açıklanan reaksiyon şartlarında incelenmiştir. Her ekleme sonunda elde edilen akım değerleri zamana bağlı olarak Şekil 4.52'de verilmiştir. Amperometrik akım-zaman grafiğinden yararlanılarak elde edilen hidrokinon kalibrasyon grafiği Şekil 4.53'de verilmiştir.



Şekil 4.51. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği.



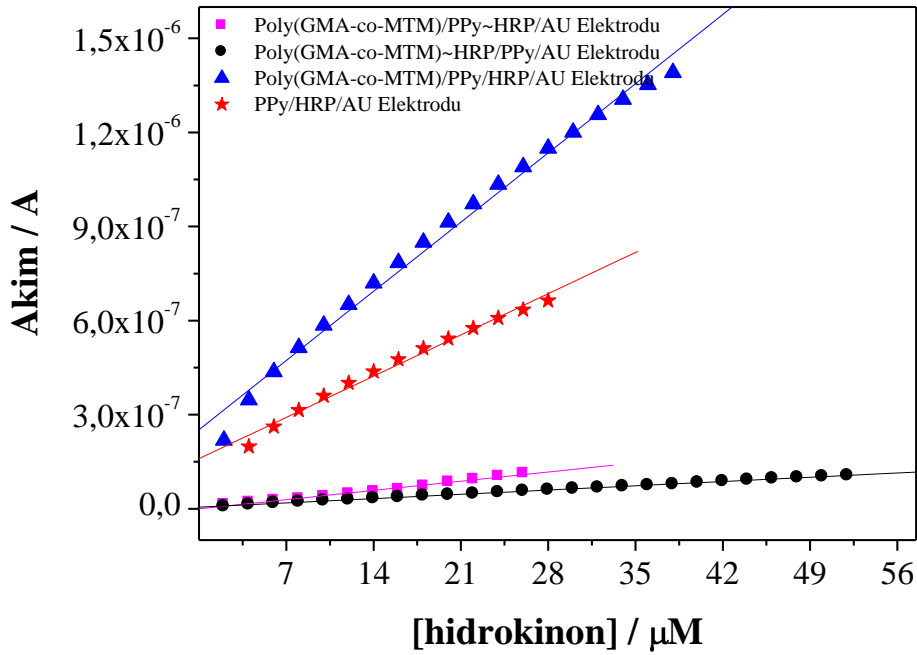
Şekil 4.52. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektrodundan hidrokinon eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği.



Şekil 4.53. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektrodunda hidrokinon için elde edilen kalibrasyon eğrisi.

Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektrodunda hidrokinon ölçümü için hassasiyet değeri $30 \text{ nA}/\mu\text{M}$, belirleme limiti $1,03 \mu\text{M}$ ve doğrusal ölçüm aralığı $2\text{-}38 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.6). Poli(GMA-co-MTM)~HRP/PPy/Au çalışma elektrodunda hidrokinon eklemeleri sonucu oluşan akım değerleri ve buna bağlı olarak da ölçüm hassasiyeti, Poli(GMA-co-MTM)/PPy~HRP/Au (bkz. Bölüm 4.5.1), Poli(GMA-co-MTM)~HRP/PPy/Au (bkz. Bölüm 4.5.2) ve PPy/HRP/Au (bkz. Bölüm 4.5.3) çalışma elektrotlarından elde edilen hassasiyet değerlerine göre yüksek çıkmıştır. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektrodunda enzim hem fiziksel hem de kimyasal bağlanma mekanizmalarıyla elektroda immobilize edilmiştir. HRP, pirolün elektropolimerizasyonu sırasında ortamda bulunduğu için, pirol monomeri polimerleşirken polimerde oluşan çapraz bağ ağları arasında hapsedilerek fiziksel olarak tutuklanmış, diğer yandan elektropolimerizasyon esnasında elektrodun yüzeyi önceden Poli(GMA-co-MTM) ile kaplanmış olduğundan Poli(GMA-co-MTM)'nin epoksi gruplarıyla kimyasal bağ yapmıştır.

Poli(GMA-co-MTM)/PPy~HRP/Au (bkz. Bölüm 4.5.1), Poli(GMA-co-MTM)~HRP/PPy/Au (bkz. Bölüm 4.5.2), PPy/HRP/Au (bkz. Bölüm 4.5.3) ve Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektrotlarından hidrokinon eklemeleri için elde edilen kalibrasyonlar bir grafik üzerinde Şekil 4.54’de gösterilmiştir.

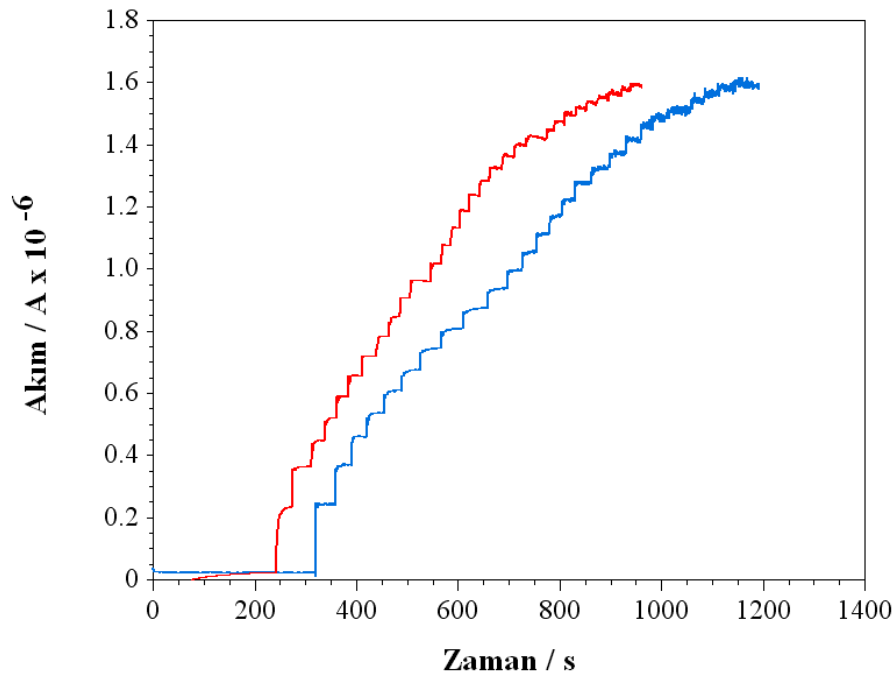


Şekil 4.54. Aynı polimer filmlerle farklı immobilizasyon teknikleri kullanılarak hazırlanmış çalışma elektrotlarında hidrokinon için elde edilen kalibrasyon eğrileri.

Şekil 4.54’den açıkça görüldüğü gibi en yüksek ölçüm hassasiyeti, enzimin hem fiziksel tutuklama ile hem de kimyasal bağlanma ile immobilize edildiği Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektrodundan elde edilmiştir. Elektrot yüzeyinde kompozit filmin oluşum şeklinin ve enzim immobilizasyon prosesinin en uygun olduğu çalışma elektrodu Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP kompozitiyle oluşturulmuş çalışma elektrodudur.

Çalışma elektrodunun fabrikasyonunda tekrar üretilebilirliğin olup olmadığının anlaşılabilmesi için, iki adet elektrot aynı fabrikasyon metodu kullanılarak farklı günlerde hazırlanmış ve hazırlanan elektrotların aynı reaksiyon şartlarında hidrokinona verdiği tepki incelenmiştir. Farklı zamanlarda yapılmış iki adet

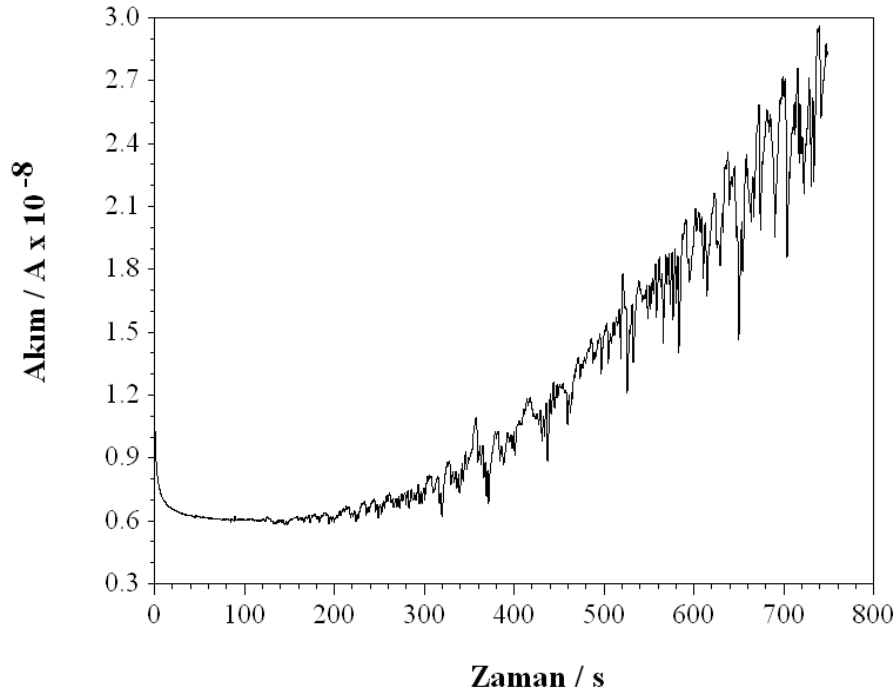
Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektrodundan hidrokinon eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafikleri Şekil 4.55’de gösterilmiştir. Şekilden anlaşıldığı gibi, farklı zamanlarda yapılmış aynı çalışma elektrotlarına ait amperometrik yanıtlar birbiriyle uyumlu ve neredeyse aynı sinyalleri verdiği için, çalışma elektrodu tekrar üretilebilir.



Şekil 4.55. Farklı günlerde yapılmış Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektrotlarının aynı hidrokinon eklemelerinden elde edilen akım-zaman grafikleri.

4.5.5. Poli(GMA-co-MTM)/HRP/Au Çalışma Elektrodu Bulguları

Bölüm 3.6.5.4’de açıklandığı gibi hazırlanan Poli(GMA-co-MTM)/HRP/Au çalışma elektrodundan Poli(GMA-co-MTM)’nin ana zincirinin yalıtkan yapıda olmasına bağlı olarak herhangi bir dönüşümlü voltametri grafiği elde edilememiştir. Poli(GMA-co-MTM)/HRP/Au çalışma elektrodunun hidrokinona verdiği tepki yukarıdaki bölümlerde açıklanan reaksiyon şartlarında incelenmiştir. Eklemeler sonunda elde edilen akım değerleri zamana bağlı olarak Şekil 4.56’da verilmiştir.



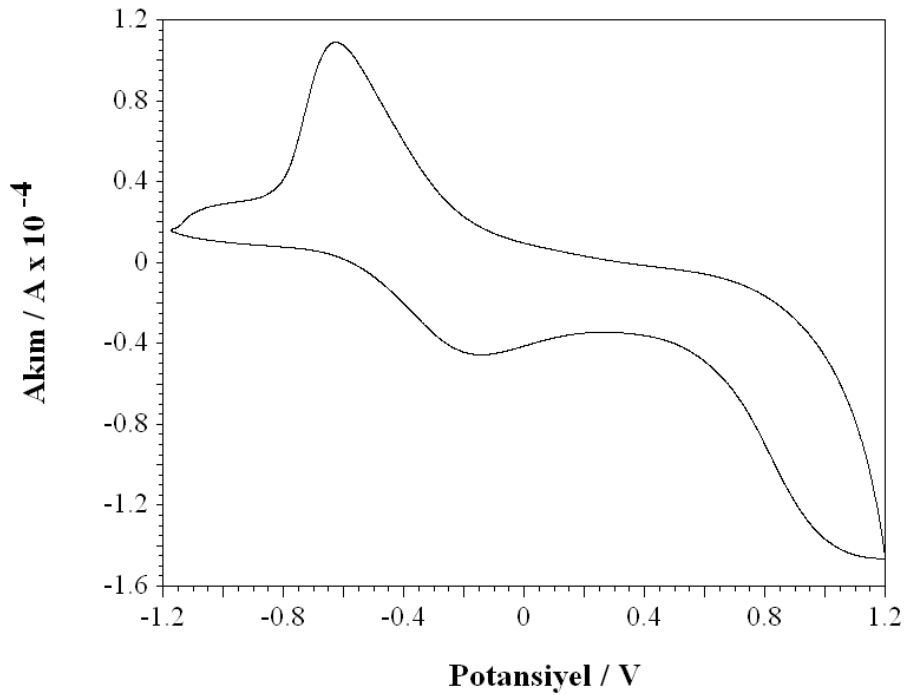
Şekil 4.56. Poli(GMA-co-MTM)/HRP/Au çalışma elektrodundan hidrokinon eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği.

Şekil 4.56'dan anlaşıldığı gibi Poli(GMA-co-MTM)/HRP/Au çalışma elektrodundan hidrokinon eklemelerine karşı herhangi bir tepki alınamamıştır. Poli(GMA-co-MTM)/HRP/Au çalışma elektrodu hidrokinon eklemelerine tamamen tepkisiz kalmamış olsa bile sağlıklı bir ölçümün yapılabileceği uygun amperometrik sinyaller üretememiştir. Enzim burada çalışma elektrodu üzerine Poli(GMA-co-MTM)'ye ait epoksi grupları üzerinden kimyasal bağlanmış fakat tamamen karasız bir aktivite göstermiştir. Elektrot yüzeyinin sadece Poli(GMA-co-MTM) film ile kaplanması, Poli(GMA-co-MTM)'nin yalıtkanlık özelliğine bağlı olarak elektroaktiviteyi kısıtlamıştır.

4.5.6. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC Çalışma Elektrodu Bulguları

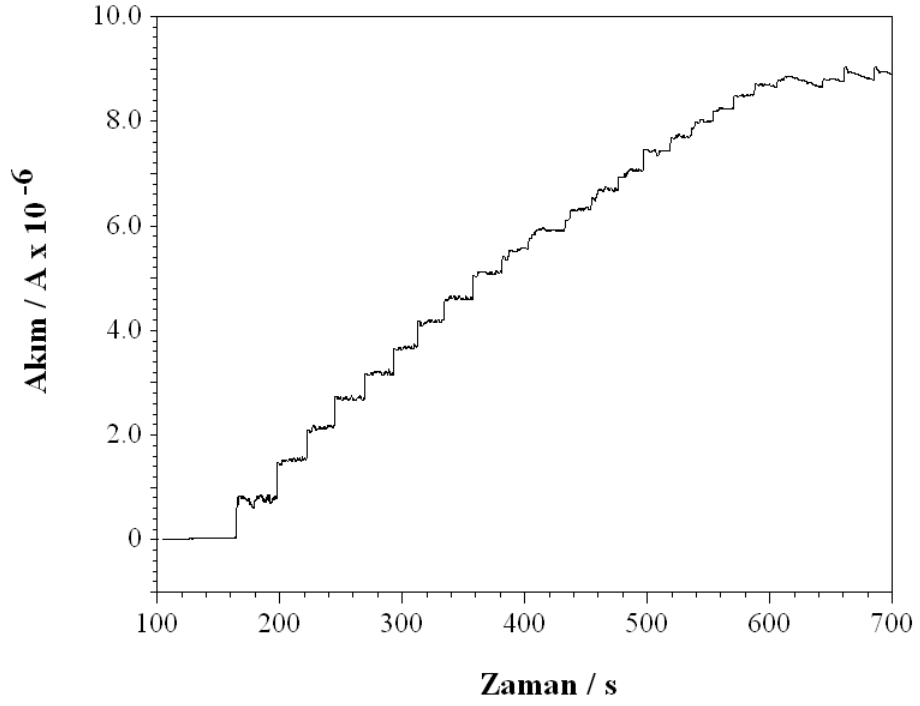
Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodu Bölüm 3.6.5.6'da açıklandığı gibi hazırlanmıştır. Camsı karbon elektrot yüzeyinde kaplanan Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP film, Bölüm 3.6.5.3'de altın elektrot yüzeyinde

sentezlenen film ile aynıdır. Bu iki elektrot arasındaki tek fark; birinde altın diğeri ise camı karbon elektrot kullanılmasıdır. Aynı Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP filmin farklı elektrot yüzeyinde sentezlenmesindeki amaç, Poli(GMA-co-MTM)/PPy~HRP (bkz. Bölüm 4.5.1), Poli(GMA-co-MTM)~HRP/PPy (bkz. Bölüm 4.5.2), PPy/HRP (bkz. Bölüm 4.5.3) ve Poli(GMA-co-MTM)/HRP (bkz. Bölüm 4.5.5) filmlerle yapılmış çalışma elektrotları arasında en iyi ölçüm performansına Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP film ile hazırlanan çalışma elektroduyla (bkz. Bölüm 4.5.4) ulaşıldığından bu filmin farklı tip bir elektrot yüzeyinde sentezlendiğinde ölçüm parametreleri açısından ne gibi bir değişikliğin olduğunun incelenmesidir. Çalışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği Şekil 4.57’de verilmiştir.

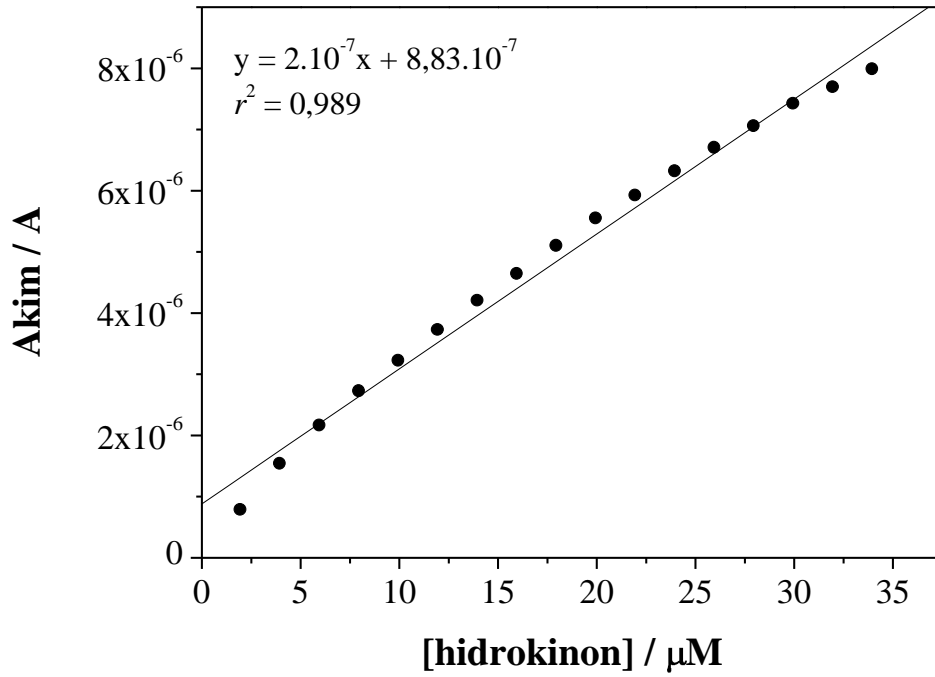


Şekil 4.57. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC alışma elektroduna ait dönüşümlü voltametri grafiği.

Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC alışma elektrodunun hidrokinona verdiği tepki yukarıdaki bölümlerde açıklanan reaksiyon şartlarında incelenmiştir. Her ekleme sonunda elde edilen akım değerleri zamana bağlı olarak Şekil 4.58’de, amperometrik akım-zaman grafiğinden yararlanılarak elde edilen hidrokinon kalibrasyon grafiği ise Şekil 4.59’da gösterilmiştir.



Şekil 4.58. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodundan hidrokinon eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafiği.

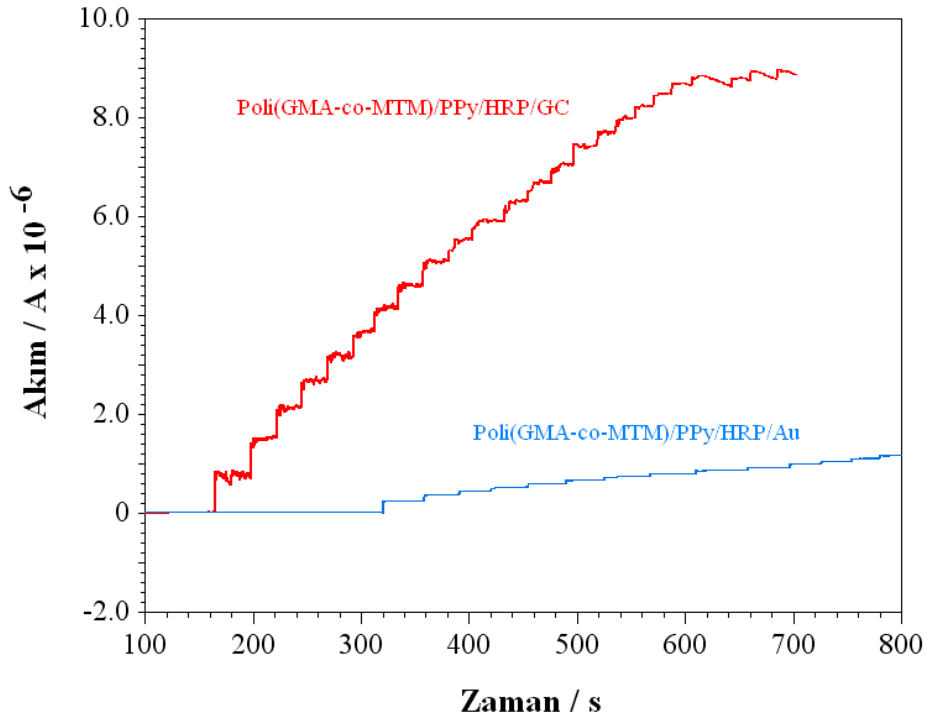


Şekil 4.59. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışmada hidrokinon için elde edilen kalibrasyon eğrisi.

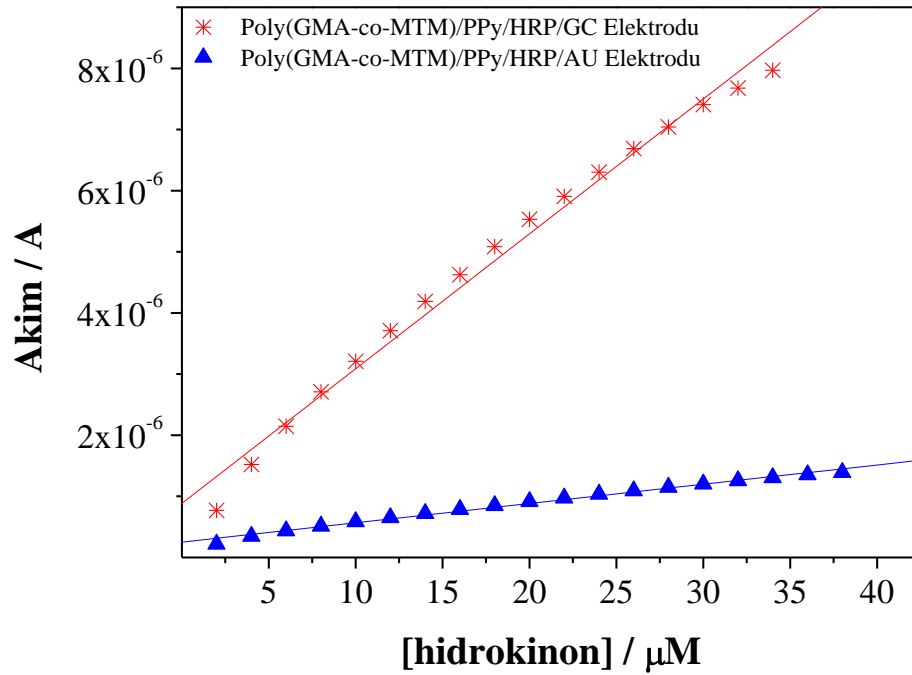
Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodunun hidrokinon için ölçüm hassasiyeti 200 nA/ μ M'dır (Çizelge 4.6) ve bu değer, Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektrodunun hassasiyet değeri olan 30 nA/ μ M'ın yaklaşık 7 katıdır. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC ve Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektrotlarının yukarıda anlatıldığı gibi aynı hidrokinon eklemelerine verdiği tepkiler arasındaki fark Şekil 4.60'dan ve Şekil 4.61'den açıkça görülmektedir. Görüldüğü gibi her ne kadar Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC ve Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektrotlarında hazırlanan kompozit filmler ve enzimin elektroda bağlanma mekanizmaları aynı olsa da, sadece elektrot tipinin değiştirilmesi çalışma elektrodu ölçüm performansı kriterlerini etkilemiştir. Camsı karbon elektrotlar, dokularla biyouyumluluğu, geniş potansiyel aralığında düşük atık akım üretme ve elektrot yüzeyi metabolitlerle dolduğunda akım değerlerinde meydana gelebilecek bozulmaları en aza indirebilme özelliklerinden dolayı diğer metal elektrotlara kıyasla daha yaygın kullanılmaktadır [Jin et al., 2008; Lane and Blaha, 1990; Ewing et al., 1981; Mattson and Jones, 1976]. Son zamanlarda yayınlanmış çalışmalarda, *horseradish peroxidase* enziminin karbon elektrot materyaline daha fazla uyum sağladığı rapor edilmiştir [Santos et al., 2007; Carvalho et al., 2007; Huang et al., 2008; Kafi et al., 2008; Serra et al., 2001; Lindgren et al., 1997; Chang et al., 2002]. Rabinovich ve Lev, fenol biyosensörünün tepkisinin, kinonların elektrokimyasal olarak geri indirgenmesiyle difenoliklere dönüşümüne bağlı olduğunu ve bu indirgenmenin karbon elektrot materyallerinde daha etkili gerçekleştiğini, buna bağlı olarak da ölçüm hassasiyetinin arttığını belirtmiştir [Rabinovich and Lev, 2001].

Çizelge 4.6. Poli(GMA-co-MTM) tabanlı çalışma elektrotlarının hidrokinon ölçümü için hesaplanan analitik parametreleri.

| <i>Çalışma elektrodu</i> | <i>Doğrusal aralık (μM)</i> | <i>LOD (μM)</i> | <i>Hassasiyet ($nA/\mu M$)</i> | <i>r^2</i> |
|-----------------------------|---|---------------------------------|---|-------------------------|
| Poli(GMA-co-MTM)/PPy~HRP/Au | 2-26 | 1,2 | 4 | 0,98 |
| Poli(GMA-co-MTM)~HRP/PPy/Au | 2-52 | 1,5 | 2 | 0,99 |
| Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au | 2-38 | 1,03 | 30 | 0,99 |
| Poli(GMA-co-MTM)/HRP/Au | <i>Tepki yok</i> | | | |
| PPy/HRP/Au | 4-28 | 2,55 | 20 | 0,98 |
| Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC | 2-34 | 0,13 | 200 | 0,98 |



Şekil 4.60. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC ve Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektrotlarının hidrokinon eklemelerinden elde edilen akım-zaman grafikleri.



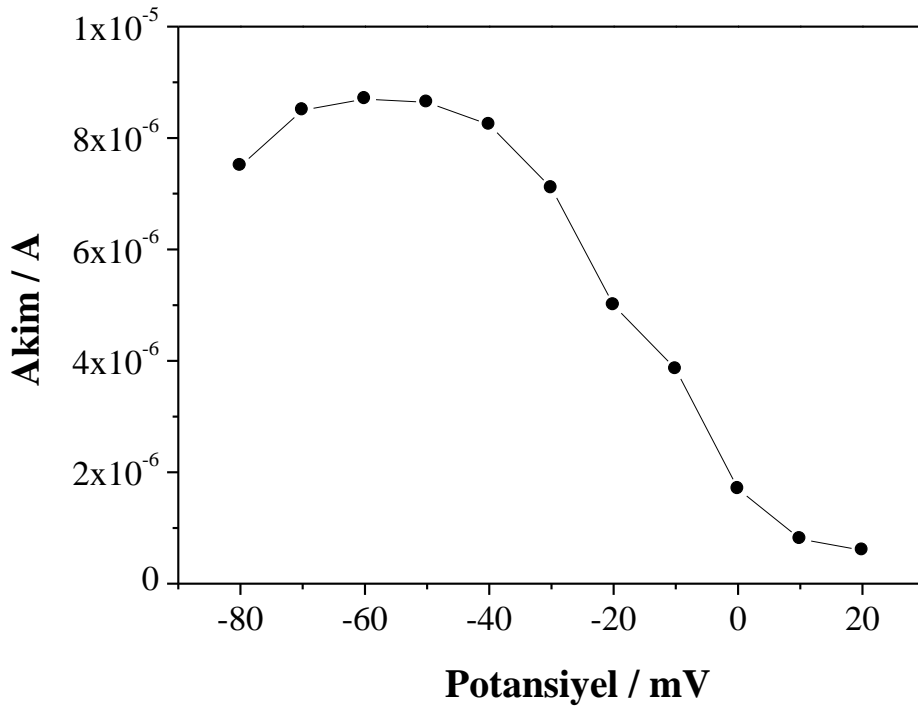
Şekil 4.61. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC ve Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektrotlarının hidrokinon kalibrasyon grafikleri.

Çizelge 4.6'dan anlaşıldığı gibi, aynı reaksiyon şartlarında, aynı konsantrasyonlardaki hidrokinon eklemelerine karşı elde edilen akım değerleri Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodunda en yüksek çıkmıştır. Birbirleriyle kıyaslanan bu 6 çalışma elektrodundan elde edilen sonuçlara göre, Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodunun, maksimum ölçüm hassasiyeti ve minimum LOD değerine sahip olmasından, bu 6 elektrot arasında en iyi sonuç veren çalışma elektrodu olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle diğer fenolik bileşiklerin ölçümü Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodu kullanılarak yapılmıştır.

4.5.6.1. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC Çalışma Elektrodu İçin İşletme Parametrelerinin Optimizasyonu

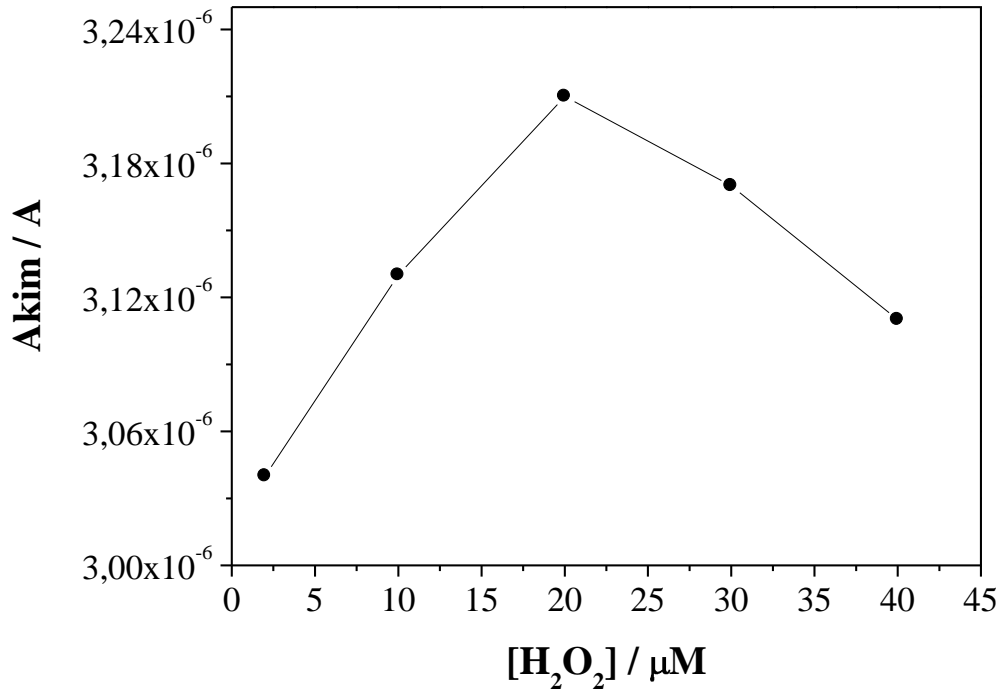
Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodunun -80 ve +20 mV aralığındaki farklı çalışma potansiyellerinde, 20 µM hidrojen peroksit ve 20 µM

hidrokinon eklemelerine olan tepkisi Şekil 4.62'de gösterilmiştir. Enzimatik reaksiyon ürünleri olan kinon türlerinin elektrot yüzeyindeki indirgenme akımı +20 mV'dan -50 mV'a kadar hızla artmış ve -50 mV'dan -70 mV'a kadar sabit kalmıştır. -70mV'dan daha yüksek negatif potansiyellerde indirgenme akımında azalma gözlenmiştir. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodunun optimum çalışma potansiyeli maksimum akımın elde edildiği -50 mV olarak seçilmiştir. Fenol dışındaki diğer fenolik türler için de aynı optimizasyon yapılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4.62. Çalışma potansiyelinin Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodu performansına etkisi.

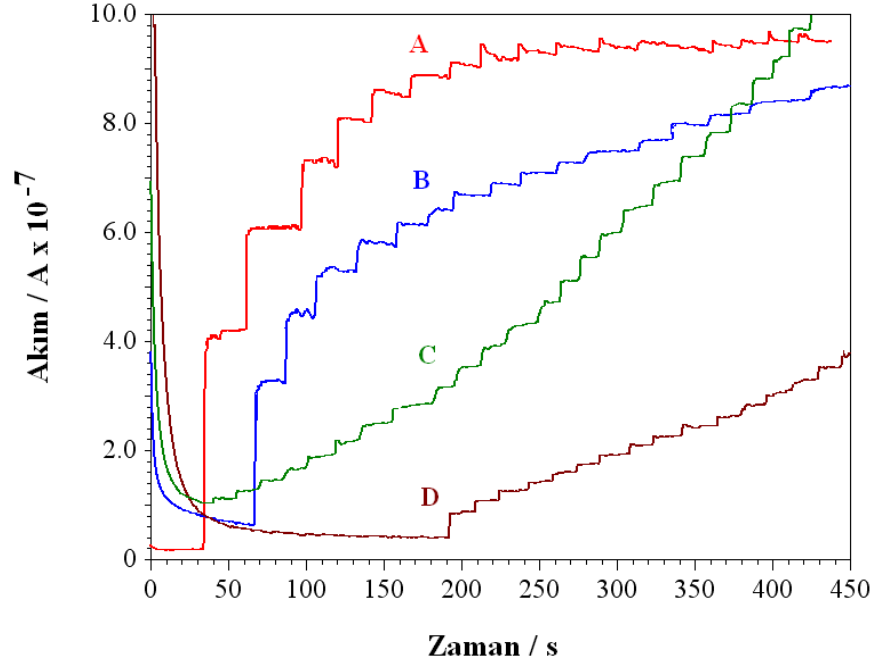
Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodunda optimum hidrojen peroksit konsantrasyonunu belirleyebilmek için sırasıyla 2-10-20-30-40 μM konsantrasyon aralığında hidrojen peroksit içeren 10 mL'lik pH 7 - 0,01 M tampon ortamına 10 μM hidrokinon eklemesi yapılmıştır. -50 mV'luk potansiyel altında, her hidrojen peroksit konsantrasyonunda elde edilen indirgenme akımları Şekil 4.63'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek indirgenme akımına 20 μM hidrojen peroksit içeren tampon ortamında ulaşılmıştır.



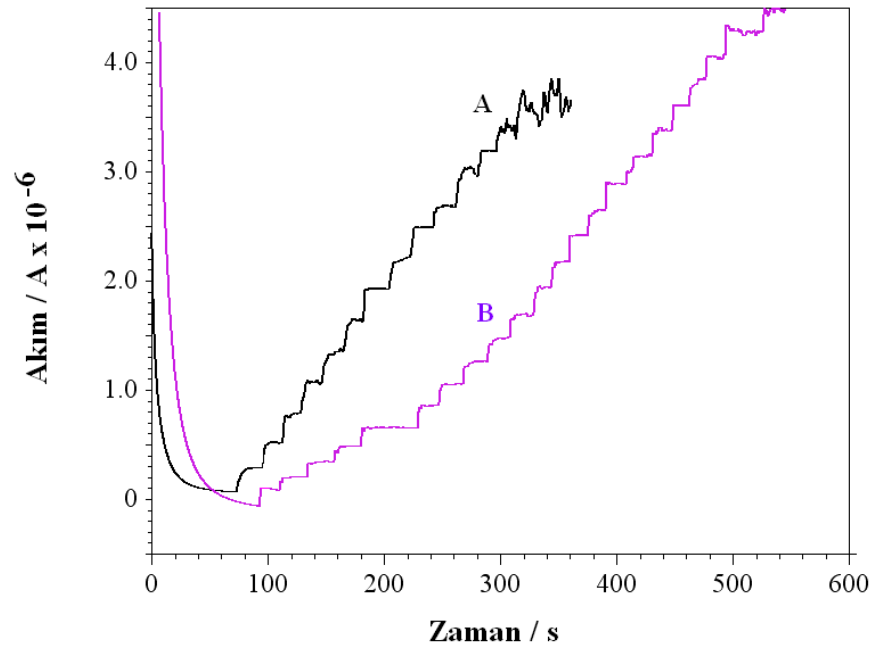
Şekil 4.63. Hidrojen peroksit konsantrasyonunun Poli(GMA-coMTM)/PPy/HRP/ GC çalışma elektrodu performansına etkisi.

4.5.6.2. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC Çalışma Elektrodu ile Fenol ve Türevlerinin Ölçümü

Optimize edilmiş deney koşullarında Poli(GMA-coMTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodunun 18 fenol bileşiğine verdiği tepki incelenmiştir. Kesikli ortamda, 600 rpm'lik karıştırma altında, -50 mV'luk (vs. Ag/AgCl) çalışma potansiyelinde her bir fenol bileşiği için 2 μM konsantrasyondan başlamak üzere düzenli olarak artan konsantrasyonlarda reaksiyon ortamına eklemeler yapılmıştır. Reaksiyon ortamına her ekleme ile birlikte 20 μM'lık hidrojen peroksit çözeltisi de eklenmiştir. Her ekleme sonunda elde edilen akım değerleri zamana bağlı olarak görüntülenmiştir. Katekol, *p*-benzokinon, *p*-kresol ve *m*-kresol eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafikleri Şekil 4.64'de, 4-asetamidofenol ve 4-metoksifenol eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafikleri ise Şekil 4.65'de gösterilmiştir.

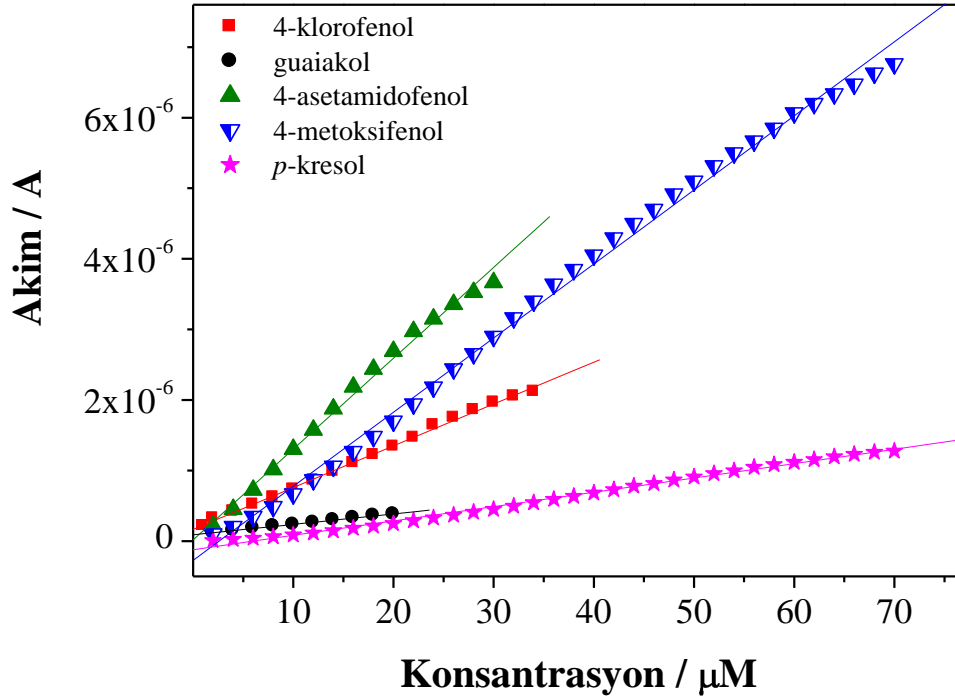


Şekil 4.64. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodundan katekol (A), *p*-benzokinon (B), *p*-kresol (C) ve *m*-kresol (D) eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafikleri.



Şekil 4.65. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodundan 4-asetamidofenol (A) ve 4-metoksifenol (B) eklemeleri sonucu elde edilen akım-zaman grafikleri.

Amperometrik akım-zaman grafikleri kullanılarak her bir ekleme sonunda elde edilen akım değişimleri ekleme konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilmiş ve söz konusu fenolik türler için kalibrasyon eğrileri çıkartılmıştır. Şekil 4.66, 4-metoksifenol, *p*-kresol, 4-asetamidofenol, guaiakol ve 4-klorofenol için hazırlanan kalibrasyon eğrilerini göstermektedir.



Şekil 4.66. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodunda 4-metoksifenol, *p*-kresol, 4-asetamidofenol, guaiakol ve 4-klorofenol için elde edilen kalibrasyon eğrileri.

Çizelge 4.7’de Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodu için farklı fenol türlerinin kalibrasyonundan elde edilen analitik hesaplamalar verilmiştir. Test edilen fenoller arasında, en düşük belirleme limiti hidrokinnon için 0,13 µM, en yüksek belirleme limiti ise pirokatekol için 1,87 µM olarak hesaplanmıştır.

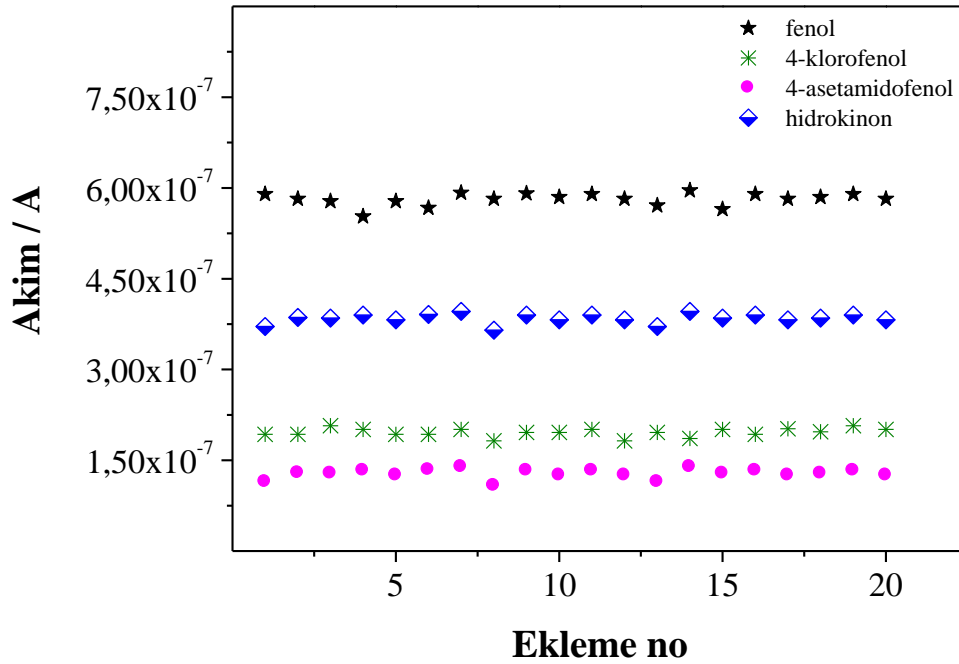
Çizelge 4.7. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodu için fenol ve türevlerinin ölçümünde hesaplanan analitik parametreler.

| <i>Fenolik tür</i> | r^2 | <i>Hassasiyet</i> (<i>nA/μM</i>) | <i>Doğrusal aralık</i> (<i>μM</i>) | <i>LOD</i> (<i>μM</i>) | <i>%RSD</i> | <i>%Verimlilik</i> |
|----------------------|-------|---------------------------------------|---|-----------------------------|-------------|--------------------|
| Hidrokinon | 0,989 | 200 | 2-34 | 0,13 | 2,3 | 95 |
| Katekol | 0,915 | 30 | 2-12 | 0,87 | 4,5 | 81 |
| <i>p</i> -benzokinon | 0,922 | 30 | 2-10 | 0,85 | 5 | 87 |
| 2-klorofenol | 0,972 | 10 | 4-10 | 1,62 | 4,1 | 91 |
| 3- klorofenol | 0,978 | 20 | 2-12 | 1,31 | 5 | 70 |
| 4- klorofenol | 0,998 | 60 | 1-34 | 0,55 | 2 | 93 |
| 2-aminofenol | | | <i>Tepki yok</i> | | | |
| Fenol | 0,987 | 90 | 2-12 | 0,3 | 2,1 | 91 |
| Guaiakol | 0,998 | 10 | 2-20 | 1,2 | 3,8 | 109 |
| 2,6-dimetoksifenol | | | <i>Tepki yok</i> | | | |
| 4-asetamidofenol | 0,993 | 100 | 2-30 | 0,21 | 2,3 | 102 |
| 4-metoksifenol | 0,997 | 100 | 2-70 | 0,25 | 3,2 | 105 |
| 2,4-dimetilfenol | | | <i>Tepki yok</i> | | | |
| Pirogallol | | | <i>Tepki yok</i> | | | |
| Pirokatekol | 0,981 | 3 | 2-22 | 1,87 | 2,8 | 94 |
| <i>m</i> -kresol | 0,996 | 10 | 2-88 | 1,43 | 3,8 | 100 |
| <i>o</i> -kresol | | | <i>Tepki yok</i> | | | |
| <i>p</i> -kresol | 0,995 | 20 | 2-70 | 1,28 | 5,1 | 99 |

Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodu, test edilen fenoller arasında orto-pozisyonda elektron verici gruplar içeren *o*-kresol ve 2-aminofenole tepki vermemiştir. Enzimatik reaksiyon sırasında oluşan *o*-kinonların formasyonuna bağlı olarak hassasiyet değerleri, test edilen fenoller için 3-200 nA/μM arasında değişim göstermiş ve en yüksek hassasiyet değeri hidrokinon için belirlenmiştir. Hidrokinondan sonra, 4-metoksifenol ve 4-asetamidofenol için de yüksek hassasiyet elde edilmiştir (100 nA/μM). 4-metoksifenolde, fenolik bileşiğin *horseradish peroxidase* ile oksidasyon kapasitesini arttıran -OCH₃ grubunun olması, 4-metoksifenol hassasiyetinin yüksek olmasını sağlamış olabilir. Buna ek olarak, hidrokinon ve 4-asetamidofenolün yüksek hassasiyet değerleri, etkili elektron verici konjugasyon yapısına sahip olmalarına dayandırılabilir. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodunun 2,4-dimetilfenole tepki vermemesi beklenen bir durumdur. Çünkü, orto-pozisyonda bulunan bir metil grubu, fenolik

bileşimin elektron verme özelliğini sınırlamaktadır [Maehly et al., 1995]. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodu ayrıca pirogallol ve 2,6-dimetoksifenole tepki vermemiştir. Elde edilen hassasiyet değerleri, yapılmış birçok fenol biyosensör çalışmasına göre yüksek çıkmıştır [Serra et al., 2001; Cosnier et al., 1999; Freire et al., 2002; de Oliveira and Vieira, 2006; Tembe et al., 2007; Zeng et al., 2007; Liu et al., 2006; Rajesh et al., 2004; Sulak et al., 2009; Abu-Rabeah et al., 2005; Campuzano et al., 2003; Dempsey et al., 2004; Freire et al., 2002; Liu et al., 2005; Zhang et al., 2003; Kaoutit et al., 2007]. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodunda, en geniş doğrusal ölçüm aralığı *m*-kresol için 2-88 μ M olarak belirlenmiştir. Zhou ve arkadaşları, doğrusallığın yüksek konsantrasyonlarda bozulmasının nedeni olarak, elektrot yüzeyinin enzimatik reaksiyon ürünleriyle dolmasını göstermişlerdir [Zhou et al., 2007]. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodunda, biyokompozit filmin yapısının, yüzeyin reaksiyon ürünleriyle dolmasını minimize ettiği söylenebilir. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodunun test edilen fenolikler için yanıt süresi yaklaşık 3 s'dir.

Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodunun işletme kararlılığının tespiti için, 0,7 mg/mL lityum klorid içeren 0,1 M - pH 7 fosfat tamponunun 10 mL'sine -50 mV'luk çalışma potansiyeli altında, ard arda 2 μ M'lık fenolik eklemeleri yapılmış ve elde edilen akım değişimleri kaydedilmiştir (Şekil 4.67). Akım değişimlerinin standart sapma değerlerinden hesaplanan %RSD değerleri (bkz. Bölüm 3.7.4.4) Çizelge 4.7'de verilmiştir. %RSD değerleri test edilen fenolikler için 2-5,1 aralığında değişim göstermiştir. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodu, hergün kullanıldığında, 40. günün sonunda başlangıç aktivitesinin %80'ini korumuştur. *Horseradish peroxidase*, Poli(GMA-co-MTM)/PPy kompozit film üzerine hem Poli(GMA-co-MTM)'nin epoksi grupları üzerinden kimyasal bağlanmış, hem de pirol elektropolimerizasyonu sırasında oluşan kompozit film içine hapsedilmiştir. Enzimin oluşan film boyunca kompozit içine hapsedilmesi, enzimatik reaksiyon ve elektron transfer mekanizması açısından enzime kararlı bir mikroçevre yaratmıştır. Poli(GMA-co-MTM)/PPy kompozit film yapısı, pirol ile tiyofen grupları arasındaki elektrokimyasal etkileşmeden dolayı iyi bir elektroaktiviteye sahiptir. Biyosensörde ayrıca ölçüm verimliliği hesaplanmış (bkz. Bölüm 3.7.4.6) ve ölçümü yapılan fenolikler arasında bu değer % 70-109 aralığında değişim göstermiştir (Çizelge 4.7).



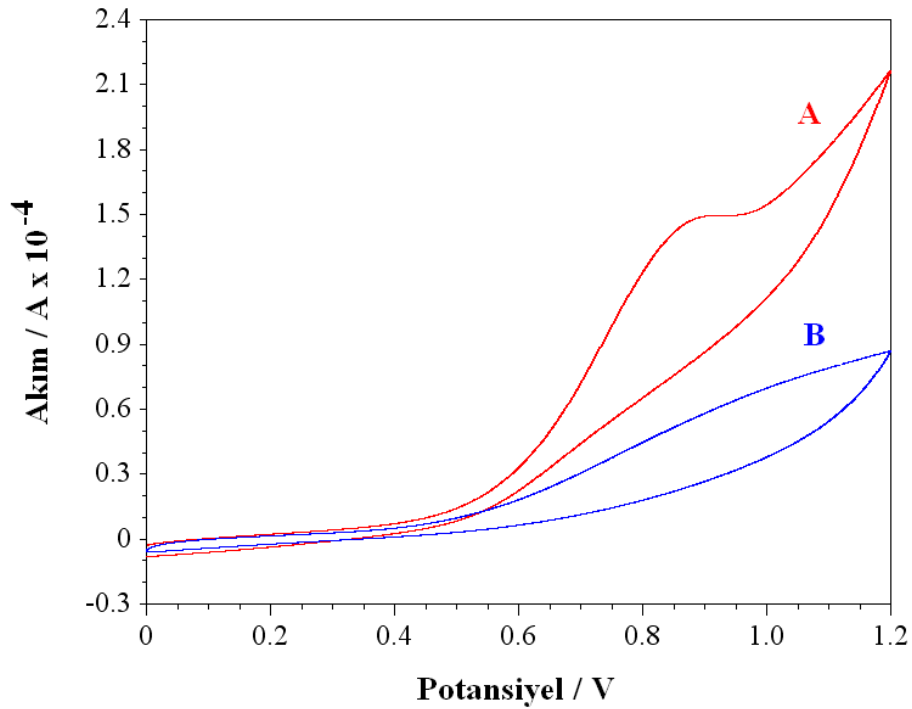
Şekil 4.67. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodunun fenol, hidrokinon, 4-klorofenol ve 4-asetamidofenol için işletme kararlılığı grafikleri.

4.6. PPy/PGA/HRP/GC Çalışma Elektrodu Bulguları

4.6.1. PPy/PGA/HRP/GC Çalışma Elektroduna Ait Film Karakterizasyonu

Bölüm 3.6.6'da açıklandığı gibi hazırlanan PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodunun ve aşağıda açıklandığı gibi hazırlanan PPy/HRP/GC elektrodunun 0,7 mg/mL lityum klorid içeren 0,1 M - pH 7 fosfat tamponu ortamında 100mV/s'lik tarama hızında elde edilen dönüşümlü voltametri grafikleri Şekil 4.68'de gösterilmiştir. PPy/HRP/GC elektrodunun hazırlanması için; 0,05 M- pH 6,5 sitrat tamponunun 10 mL'sine, 6 mg SDS ve 7 µL pirol monomeri (ortamda 0,01 M pirol olacak şekilde) ve 3 mg HRP eklenip karıştırılmış ve çözelti 1 mL/dak debide üçlü elektrot sisteminin bağlı olduğu akış hücresinden HPLC pompası vasıtasıyla sirküle edilmiştir. Sirkülasyon sırasında camsi karbon elektrot yüzeyinde 0 ve +1,2 V'luk

potansiyel aralığında, dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak 5 dakikalık bir sürede pirol elektropolimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.68'den açıkça görüldüğü gibi, iki dönüşümlü voltametri arasındaki fark, PGA'nın PPy yapısına katılmasıyla yeni PPy/PGA kompozitinin oluşumunu göstermektedir. PPy/PGA/HRP filme ait dönüşümlü voltametri grafiğinde PPy/HRP film voltametrisine göre ciddi akım farkları gözlenmektedir. Çünkü, PGA'nın yapısında bulunan konjuge aldehitler elektroaktif özellikte olduklarından, kompozit film üzerinde daha etkili elektron transfer özelliği sağlamıştır.

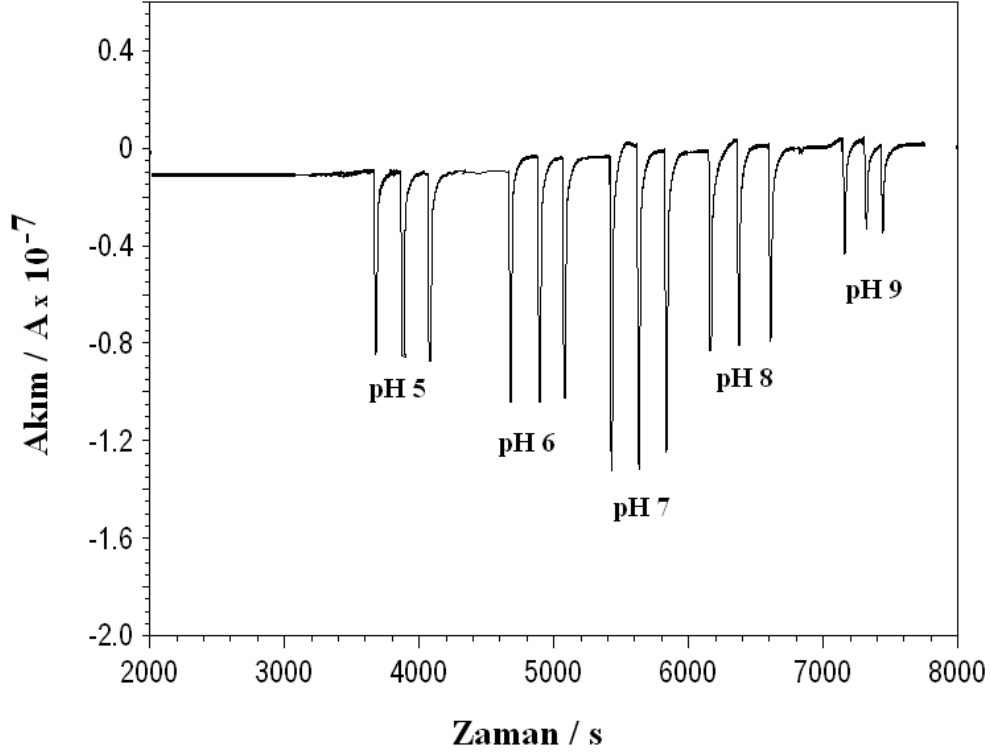


Şekil 4.68. PPy/PGA/HRP/GC (A) ve PPy/HRP/GC (B) çalışma elektrotlarına ait dönüşümlü voltametri grafikleri.

4.6.2. PPy/PGA/HRP/GC Çalışma Elektrodu İçin İşletme Parametrelerinin Optimizasyonu

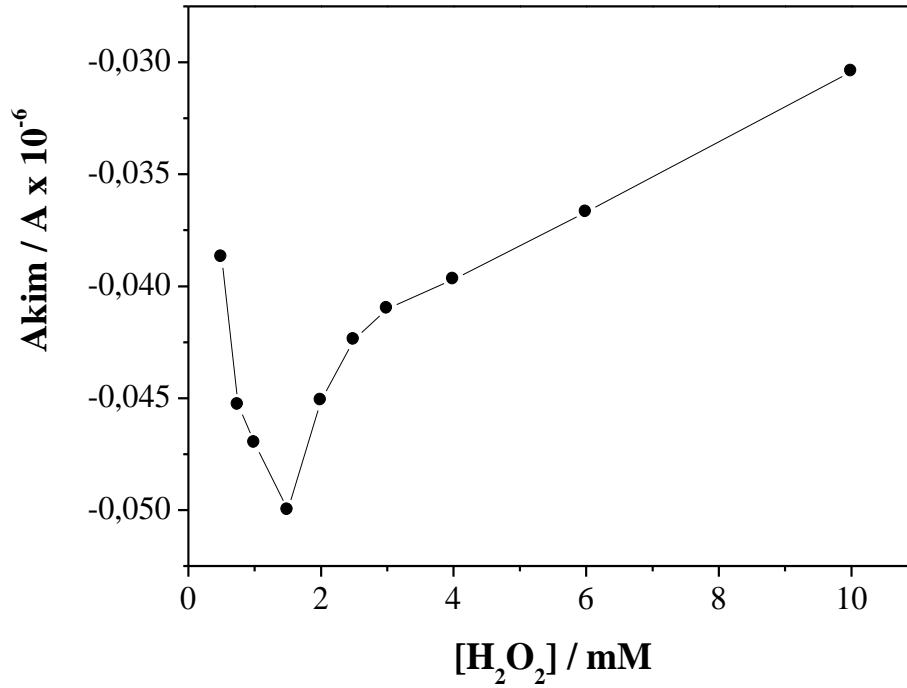
PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodu performansı üzerine pH'nın etkisi 5-9 aralığında değişen farklı pH değerlerinde hazırlanmış tampon ortamlarına -50mV'luk çalışma potansiyeli altında, 1 mL/dak akış hızında, 2 mM *p*-benzokinon ile birlikte

1,5 mM hidrojen peroksit enjeksiyonları yapılarak araştırılmıştır (her pH değerinde 3 enjeksiyon yapılmıştır) (Şekil 4.69). En yüksek indirgenme akımına pH 7'de ulaşılmıştır. Bu pH değerinden sonra enzimatik reaksiyondaki aktivite düşüşüne bağlı olarak akım değişimlerinde düşüşler kaydedilmiştir.



Şekil 4.69. Ortam pH'sının PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodu performansına etkisi.

PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodunda optimum hidrojen peroksit konsantrasyonunu belirleyebilmek için, 0,3 mM *p*-benzokinon içeren 0,5-10 mM konsantrasyon aralığındaki hidrojen peroksit çözeltileri sırasıyla 1 mL/dak akış hızında sürekli sisteme enjekte edilmiştir. -50 mV'luk potansiyel altında, her hidrojen peroksit konsantrasyonunda elde edilen indirgenme akımları Şekil 4.70'de verilmiştir. En yüksek indirgenme akımına 1,5 mM hidrojen peroksit konsantrasyonunda ulaşılmıştır. Hidrojen peroksit konsantrasyonu 1,5 mM'ın üstüne çıkıldığında, enzim inhibisyonuna bağlı olarak akım değerleri hızla düşmeye başlamıştır.

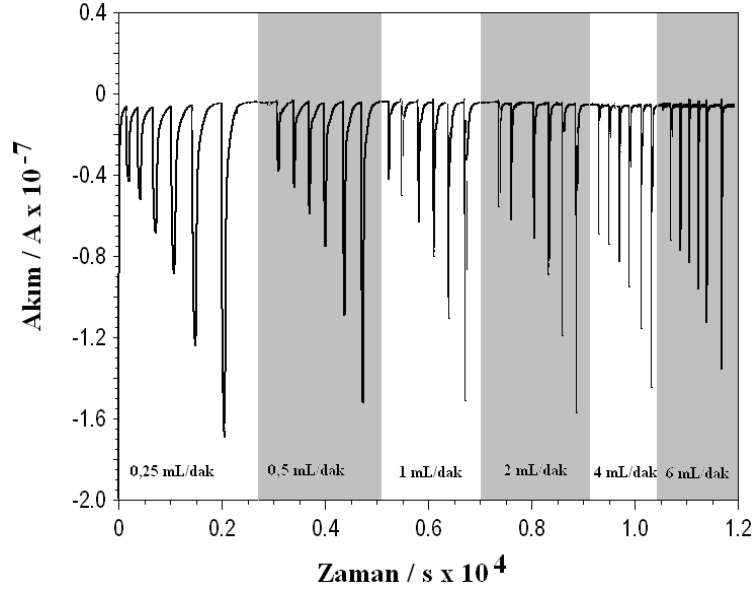


Şekil 4.70. Hidrojen peroksit konsantrasyonunun PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodu performansına etkisi.

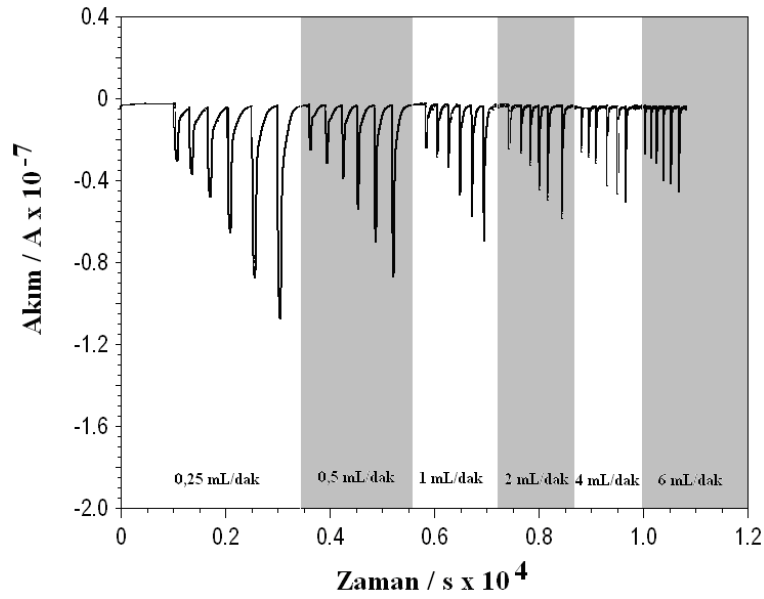
4.6.3. PPy/PGA/HRP/GC Çalışma Elektrodu ile Fenol ve Türevlerinin Ölçümü

Sürekli modda işletilen biyosensörlerde örnekleme sayısı, belirleme limiti, hassasiyet ve analiz sonucunun doğruluğu direkt olarak akış hızından etkilenmektedir. Düşük akış hızlarında örnekleme sayısı az, pik şekilleri aşırı yayvan iken, yüksek akış hızlarında örnekleme sayısı fazla, pikler keskin ve dar fakat belirleme limiti yüksektir. Akış hızının sayılan etkilerinden dolayı, sürekli sistem ile işletilen biyosensörlerde uygun ölçüm parametrelerinin elde edilmesi için akış hızı optimize edilmelidir. PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodunda, akış hızı değiştirilerek katekol ve *p*-benzokinon enjeksiyonları yapılmıştır. Bunun için öncelikle, 0,25-6 mL/dak arasında değişen akış hızlarında, her akış hızında sırasıyla 0,075-0,125-0,2-0,3-0,5-0,75 mM konsantrasyonundaki katekol çözeltisi -50 mV' luk çalışma potansiyelinde sisteme enjekte edilmiştir. Enjekte edilen fenolik çözeltilerin her biri 1,5 mM hidrojen peroksit çözeltisi ile karıştırılmıştır. Aynı işlem *p*-

benzokinin için de yapılmış ve elde edilen pikler katekol için Şekil 4.71’de, *p*-benzokinin için ise Şekil 4.72’de gösterilmiştir. Akış hızı arttıkça, bekleme süresi azaldığından enzimatik reaksiyon kısıtlanmış bu sayede sinyallerin büyüklüğünde düşüşler meydana gelmiştir. Bu arada yüksek akış hızlarında sinyallerin kararlılığı bozulmuştur, piklerdeki küçülmelere bağlı olarak da belirleme limiti düşmüştür.



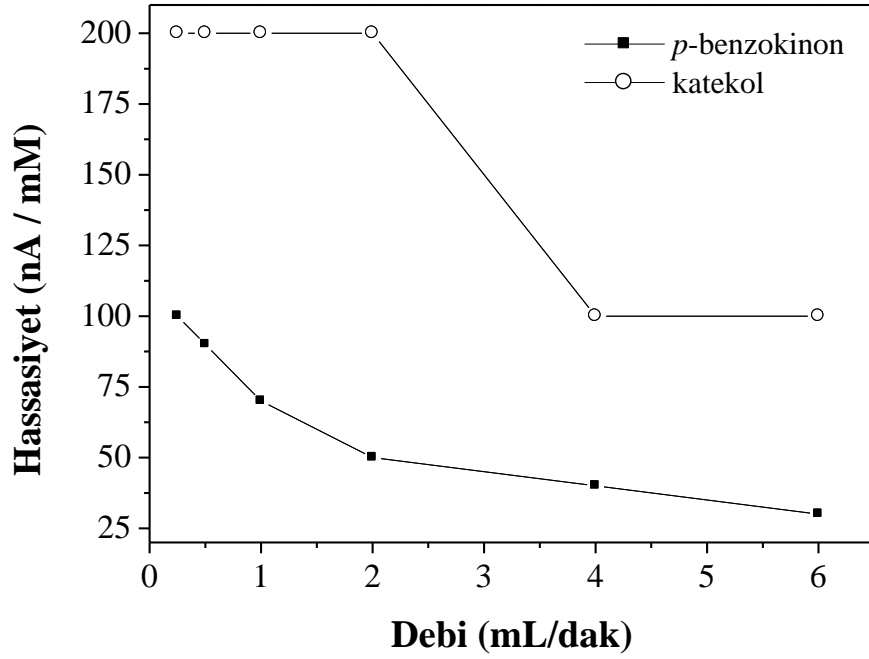
Şekil 4.71. PPY/PGA/HRP/GC çalışma elektrodundan 0,25-6 mL/dak aralığındaki akış hızlarında elde edilen katekol sinyalleri.



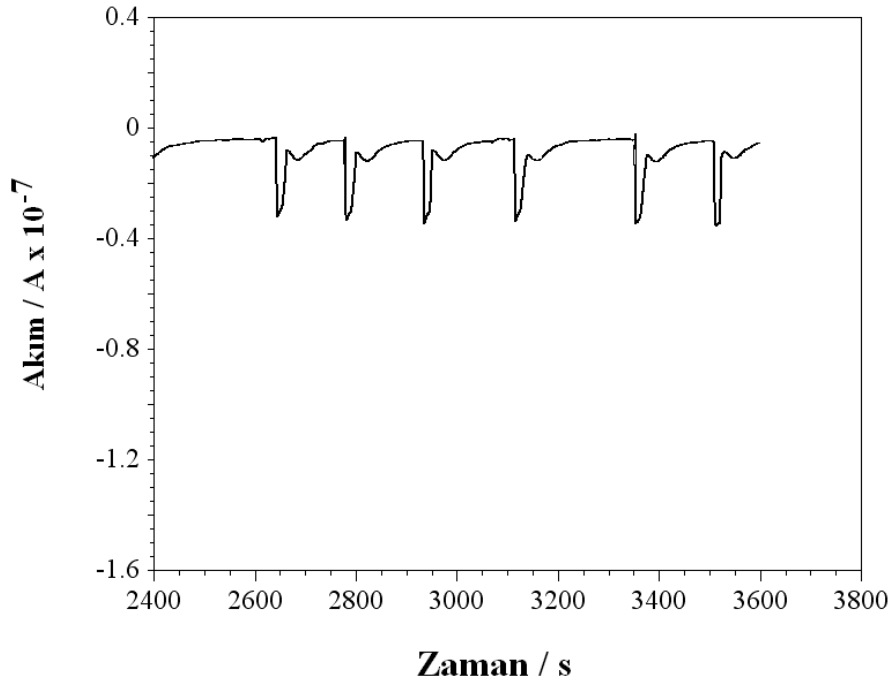
Şekil 4.72. PPY/PGA/HRP/GC çalışma elektrodundan 0,25-6 mL/dak aralığındaki akış hızlarında elde edilen *p*-benzokinin sinyalleri.

Şekil 4.71 ve Şekil 4.72’de elde edilen piklerin uç noktalarının konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin hassasiyet değerleri akış hızına karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.73). Farklı akış hızlarında katekol için elde edilen hassasiyet değerleri 100-200 nA/mM, *p*-benzokinon için ise 30-100 nA/mM aralığında değişim göstermiştir. Şekilden açıkça görüldüğü gibi katekol ve *p*-benzokinon için en yüksek hassasiyet değerleri düşük debilerde elde edilmiştir. Katekolün hassasiyeti, 2 mL/dak akış hızına kadar sabit kalmış, 2 mL/dak akış hızından büyük değerlerde hızla düşüş göstermiştir. *p*-benzokinon için ise 0,25 mL/dak akış hızından itibaren hassasiyet değerleri düşmeye başlamıştır. Genel olarak her debi değerinde katekol için elde edilen hassasiyet değerleri *p*-benzokinonun hassasiyet değerlerine göre yüksek çıkmıştır. 1 mL/dak akış hızından düşük hızlarda *p*-benzokinon için hassasiyet değeri büyük olmasına rağmen, elde edilen pikler yayvan, yanıt süresi ve ölçümler arası süre uzundur. Ölçümler için pik şekillerinin, sinyal kararlılığının ve hassasiyet değerlerinin en uygun olduğu akış hızı 1 mL/dak olarak belirlenmiştir. Çalışılan her akış hızında gerek katekol, gerekse *p*-benzokinon için elde edilen hassasiyet değerleri oldukça yüksektir. Bu durum, elektrot yüzeyinin sürekli akışla temizlenmesinden ötürü hem elektrot yüzeyinin enzimatik ürünlerle dolmasının önlenmesine, hem de enzimin fenolle kısa süreli temasına bağlı olarak aktivitesini koruyabilmiş olmasına dayandırılabilir.

PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodunun 1 mL/dak akış hızında, 0,075-0,75 mM konsantrasyon aralığındaki fenol enjeksiyonlarına verdiği tepki Şekil 4.74’de gösterilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodu, fenolün artan konsantrasyonlarına karşı ölçülebilir sinyaller üretmemiştir.

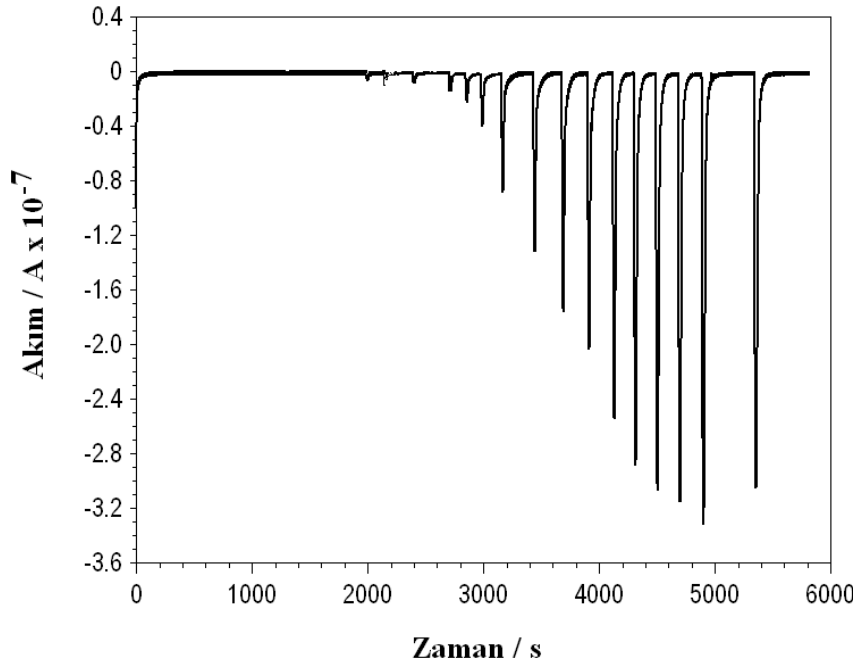


Şekil 4.73. PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodundan, farklı akış hızlarında katekol ve *p*-benzokinon için elde edilen hassasiyet değerleri.

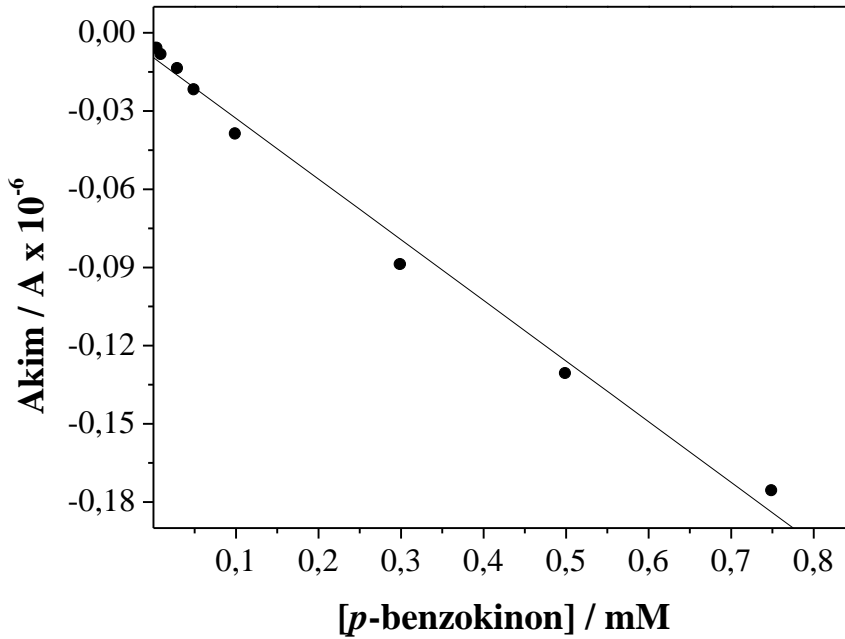


Şekil 4.74. PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodundan 1 mL/dak akış hızında artan konsantrasyonda fenol enjeksiyonlarına verdiği tepki.

PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektroduna, 1 mL/dak akış hızında ve -50 mV uygulama potansiyelinde sırasıyla 2,5-5-10-30-50-100-300-500-750-1000-1500-2000-2500-3000-5000 ve 7000 μM konsantrasyonunda *p*-benzokinon enjeksiyonları yapılmış ve elde edilen pikler Şekil 4.75'de gösterilmiştir. Bu sinyaller kullanılarak elde edilen *p*-benzokinon kalibrasyon eğrisi ise Şekil 4.76'da gösterilmiştir. *p*-benzokinon için doğrusal ölçüm aralığı, 2,5-750 μM ($r = 0,99$), belirleme limiti 2 μM , yanıt süresi ise 3 s olarak bulunmuştur.



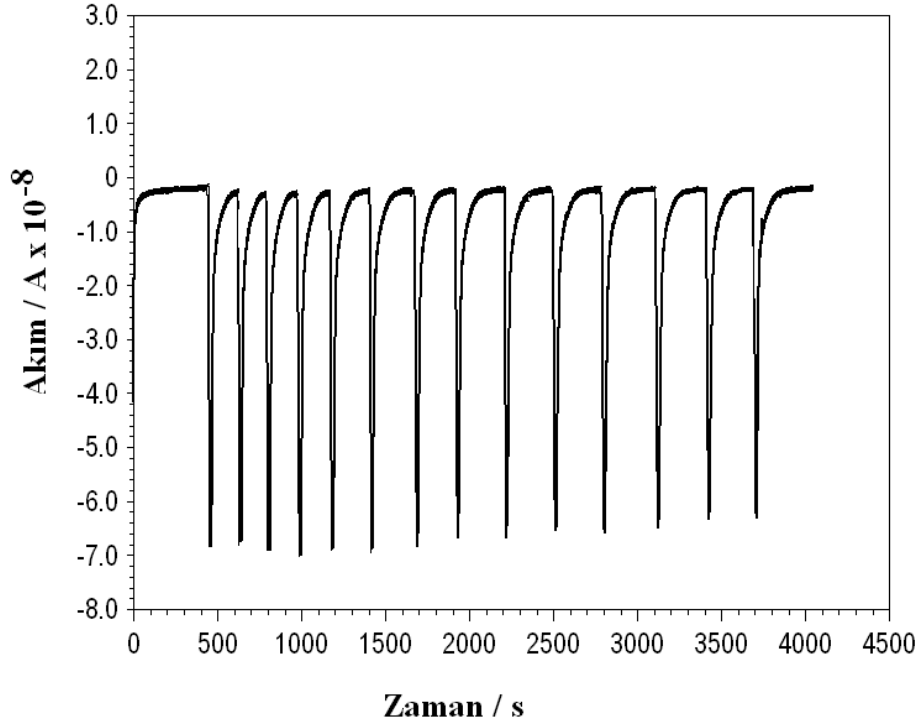
Şekil 4.75. PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodunun 1 mL/dak akış hızında artan konsantrasyondaki *p*-benzokinon enjeksiyonlarına verdiği sinyaller.



Şekil 4.76. PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodunda *p*-benzokinon için elde edilen kalibrasyon eğrisi.

PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodunun işletme kararlılığının tespiti için, sürekli akışa -50 mV'luk çalışma potansiyeli altında ard arda 2,5 μ M'lık *p*-benzokinon enjeksiyonları yapılmıştır. Enjeksiyonlar sonucu elde edilen pikler Şekil 4.77'de verilmiştir. Pik akımlarının standart sapma değeri $\pm 0,23$ nA olarak hesaplanmıştır. PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodu, 1 ay boyunca hergün kullanıldığında başlangıç aktivitesini aynen korumuş, 40. günün sonunda ise başlangıç aktivitesinin %40'ını kaybetmiştir. *Horseradish peroxidase*, PPy/PGA kompozit filmine aynı zamanda çapraz bağlama ajanı olan PGA üzerinden kimyasal olarak bağlanmıştır. Literatürde, enzim için çapraz bağlama ajanı olarak gluteraldehitin kullanıldığı biyosensörlerde elektrot kullanım ömrünün genel olarak 15 günden az olduğu rapor edilmiştir [Rajesh and Kaneto, 2005; Verdine et al., 2003]. Bu çalışmada, PGA, PPy ile kopolimerize edilmiş, bu sayede PGA'ya ait elektroaktif aldehit grupları kompozit içine yerleşmiştir. Aktif aldehit grupları sayesinde etkili enzim immobilizasyonu sağlanmış, hem de kompozitin elektrokimyasal özelliği geliştirilmiştir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda

gluteraldehit ve PGA biyokimyada çapraz bağlama ajanı olarak kullanılmış fakat çalışma elektrodunda kopolimer olarak kullanılmamıştır.



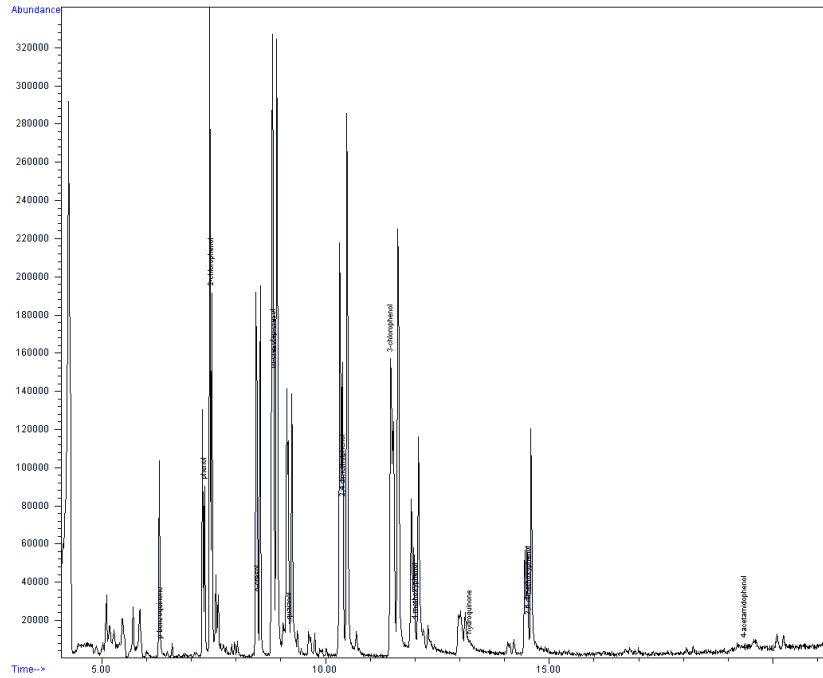
Şekil 4.77. PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodunun *p*-benzokinin için işletme kararlılığı grafiği.

4.7. Gaz Kromatografi Metodu (GC-MS) ile Fenolik Bileşiklerin Ölçümü

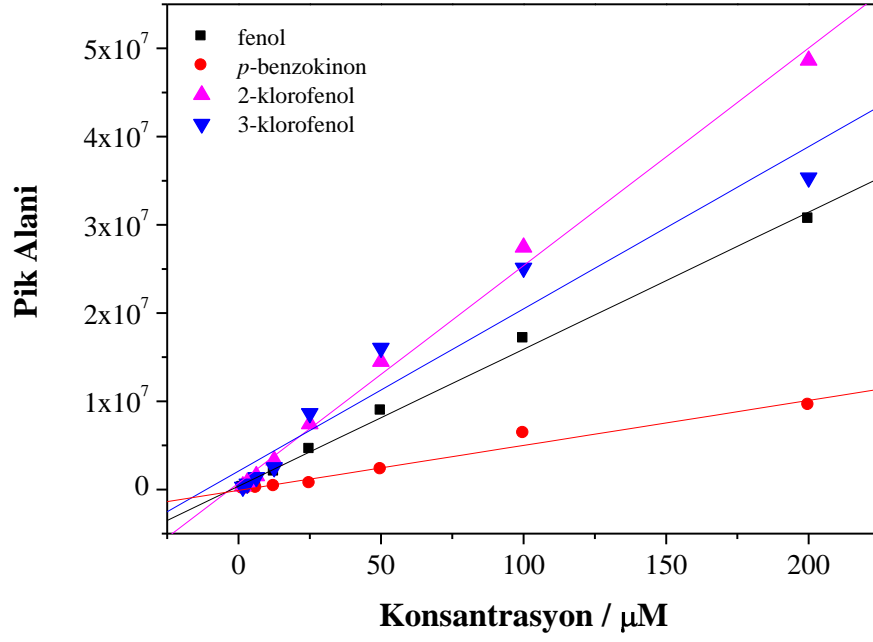
Tez çalışması kapsamında hazırlanan çalışma elektrotlarında test edilen fenolik bileşikler bir de GC-MS metodu ile ölçülmüş (bkz. Bölüm 3.9), ölçüm sonuçlarından hesaplanan analitik parametreler Çizelge 4.8’de, GC-MS metodu ile fenolik bileşiklerin ölçümüne ait kromatogram görüntüsü ise Şekil 4.78’de verilmiştir.

Çizelge 4.8. GC-MS metodu ölçümleri sonuç tablosu.

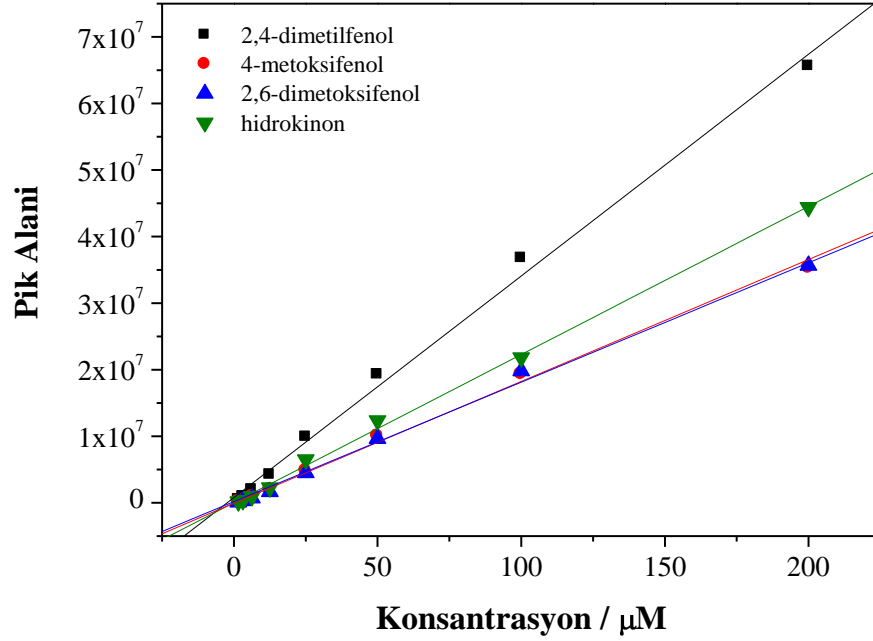
| Fenolik tür | <i>r</i> | Doğrusal aralık (μM) | LOD (μM) | %Verimlilik | %RSD |
|-------------------------------------|----------|--------------------------------------|--------------------------|-------------|-------|
| Fenol | 0,997 | 1,56-200 | 1,37 | 94 | 4,85 |
| <i>p</i> -benzokinon | 0,999 | 1,56-25 | 1,49 | 113,5 | 4,39 |
| Hidrokinon | 0,999 | 1,56-200 | 1,40 | 96,6 | 4,84 |
| 2,6-dimetoksifenol | 0,997 | 6,25-200 | 2,45 | 79,2 | 10,33 |
| 2-klorofenol | 0,997 | 1,56-200 | 1,51 | 96,6 | 5,23 |
| 3-klorofenol | 0,987 | 1,56-100 | 1,48 | 75,3 | 6,57 |
| 4-klorofenol | 0,994 | 1,56-50 | 1,10 | 89,8 | 4,08 |
| 2-aminofenol | | | Tepki yok | | |
| 4-metoksifenol | 0,998 | 1,56-200 | 1,5 | 87,9 | 5,7 |
| Pirokatekol | | | Tepki yok | | |
| Guaiakol | 0,998 | 1,56-200 | 1,53 | 100,5 | 5,09 |
| <i>m</i> -kresol + <i>p</i> -kresol | 0,995 | 1,56-200 | 1,39 | 107,6 | 4,33 |
| <i>o</i> -kresol | 0,997 | 1,56-200 | 1,54 | 96,9 | 5,3 |
| Katekol | | | Tepki yok | | |
| 4-asetamidofenol | 0,966 | 1,56-12,5 | 1,5 | 66,3 | 7,54 |
| Pirogallol | | | Tepki yok | | |
| 2,4-dimetilfenol | 0,997 | 1,56-200 | 1,25 | 100,8 | 4,14 |

**Şekil 4.78.** Fenolik türlere ait GC-MS kromatogram görüntüsü.

GC-MS ölçüm metodunda her bir fenoliğin konsantrasyonuna karşı oluşan pik alanlarının grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Şekil 4.79 ve Şekil 4.80 test edilen bazı fenol bileşiklerinin kalibrasyon eğrilerini göstermektedir. GC-MS ölçüm metodu ile tez çalışmasında hazırlanan çalışma elektrotlarının ölçüm sonuçları kıyaslandığında, GC-MS ölçüm metodunda hesaplanan LOD değerleri oldukça yüksek çıkmıştır. Söz konusu biyosensörlerde ise LOD değerleri oldukça düşüktür, biyosensörde söz konusu fenolik türler için GC-MS metoduna göre daha düşük konsantrasyonlar belirlenebilmiştir. GC-MS ölçüm metodunda hesaplanan verimlilik değerleri sağlıklı çıkmamıştır, hazırlanan fenol konsantrasyonu ile GC-MS ölçüm metodunda belirlenen konsantrasyon arasındaki fark, biyosensörde belirlenen konsantrasyona göre fazladır. GC-MS ölçüm metodunda aynı konsantrasyonda fenoliğin ard arda cihaza verilmesi sonucu oluşan pik alanlarının standart sapma değerleri tez kapsamında hazırlanmış çalışma elektrotlarına göre oldukça yüksek çıkmıştır. Bu da ölçüm stabilitesinin iyi olmadığı sonucunu vermektedir. GC-MS ölçüm metodunda, doğrusal ölçüm aralığı *p*-benzokinon, 4-klorofenol ve 4-asetamidofenol için oldukça küçüktür. GC-MS ölçüm metodunda *m*-kresol ve *p*-kresol aynı yerde pik oluşturduklarından beraber ölçülmüştür. Ayrıca GC-MS ölçüm metodu ile test edilen her fenolik tür için yüksek konsantrasyonlarda ölçüm yapabilmek mümkün değildir. Çünkü aşırı yüklemeler kolona ve kolon içi dolgu malzemesine zarar vermektedir. GC-MS ölçüm metodunda kullanılan fenol stokları metanolde (organik faz içerisinde) hazırlanmıştır. Sulu fazda ölçüm yapabilmek ancak cihaza numune vermeden önce numuneyi ekstrakte etmekle mümkün olabilmekte, bu da ölçümden önce konsantrasyon kayıplarına yol açabilmektedir. GC-MS ölçüm metodu ile ölçüm süresi yaklaşık 30 dakika iken, farklı tipte hazırlanmış olduğumuz biyosensörlerde bu süre 2 saniye civarındadır.



Şekil 4.79. GC-MS ölçüm metodunda fenol, *p*-benzokinon, 2-klorofenol ve 3-klorofenol için elde edilen kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4.80. GC-MS ölçüm metodunda 2,4-dimetilfenol, 4-metoksifenol, 2,6-dimetoksifenol ve hidrokinon için elde edilen kalibrasyon eğrisi.

4.8. Literatürde Horseradish peroxidase Tabanlı Fenol Biyosensörleri İçin Rapor Edilmiş Analitik Parametreler

Literatürde, *horseradish peroxidase* enzimi kullanılarak farklı tiplerde hazırlanmış çalışma elektrotlarının fenol ve türevlerinin ölçümünden elde edilmiş analitik parametreleri Çizelge 4.9'da gösterilmiştir. Çizelge 4.9'a bakıldığında, literatür sonuçlarına kıyasla, tez kapsamında hazırlanmış çalışma elektrotlarından fenol ve türevleri için elde edilmiş doğrusal ölçüm aralıklarının genel olarak daha geniş olduğu ve test edilen fenolik tür sayısının daha fazla olduğu söylenebilir. Çizelge 4.9'dan anlaşıldığı gibi, rapor edilen çalışma elektrotlarında kullanılan enzim aynı olsa da, çalışma elektrotları yüzeyinde sentezlenen/kullanılan film morfolojilerinin, iletkenliklerinin, yüzey özelliklerinin, taşıdıkları fonksiyonel gruplarının ve enzim bağlama özelliklerinin farklı olması ölçüm sonuçlarını da farklılaştırmıştır.

Çizelge 4.9. *Horseradish peroxidase* tabanlı fenol biyosensörleri literatür bulguları.

| Elektrot | Fenoller | Hassasiyet (nA/ μ M) | Doğrusal aralık (μ M) | LOD (μ M) | %RSD | Kullanım ömrü | Referans |
|---|------------------|--------------------------|----------------------------|----------------|------|---|-------------------------|
| HRP/Metilen mavisi/MWCNT grafit elektrot | Katekol | 6,3 | 1-150 | 0,5 | 2,3 | 300 kullanımdan sonra %97 aktivite | [Santos et al., 2007] |
| Grafit-Teflon-HRP kompozit elektrot | 4-klorofenol | 18,8 | 0,5-20 | 0,5 | 7,2 | 12 güne kadar aktivite kaybı yok | [Serra et al., 2001] |
| | 2-klorofenol | 72 | 0,2-20 | 0,16 | | | |
| | 3-klorofenol | 5,4 | 1-30 | 0,99 | | | |
| | Fenol | - | - | - | | | |
| | 2,4-dimetilfenol | 2,95 | 4,5-10 | 0,45 | | | |
| HRP/MWCNT camı karbon elektrot | 2,4-diklorofenol | 0,05 | 1-100 | 0,38 | 0,73 | 2 haftadan sonra %85 aktivite | [Huang et al., 2007] |
| GOD/HRP grafit elektrot | <i>p</i> -kresol | 11 | 2-20 | 0,4 | 5,6 | 25 günde %50 aktivite | [Lindgren et al., 1997] |
| Lektin konkonavalin A/HRP altın elektrot | Katekol | 160 | 6-48 | 0,6 | 5,4 | 4. hafta sonunda %66 aktivite | [Yang et al., 2006] |
| | Fenol | 52 | 7,6-68,4 | 0,2 | | | |
| | Hidrokinon | 390 | 6-72 | 2 | | | |
| | 2-aminofenol | 380 | 3,7-25,9 | 0,5 | | | |
| | 2-klorofenol | 75 | 6,9-48,3 | 2 | | | |
| | <i>o</i> -kresol | 20 | 12-84 | 0,4 | | | |
| | | | | | | | |
| SiO ₂ /Nb ₂ O ₅ sol-jel/HRP karbon pastası elektrodu | Fenol | 3,2 | 5-20 | 0,5 | 3 | 200 kullanımdan sonra aktivite kaybı yok | [Rosatto et al., 2002] |
| Titanyum oksit-silikajel/HRP karbon pastası elektrodu | Fenol | 2 | 10-50 | - | - | - | [Rosatto et al., 1999] |
| Poli(sodyum <i>p</i> -stiren sülfonat)/Poli(alilamin hidroklorid)/Konkonavalin A/HRP/GOD altın elektrot | Katekol | 76,82 | 6-60 | 0,9 | 2,3 | 4 haftadan sonra %22 aktivite | [Chen et al., 2008] |
| | <i>o</i> -kresol | 11,4 | - | - | | | |
| | Hidrokinon | 32,1 | - | - | | | |
| | Fenol | 14,9 | - | - | | | |
| Poli(alilamin hidroklorid)/MWCNT/HRP altın elektrot | 2-aminofenol | 104 | 0,4-8 | 0,07 | | 40 günden sonra %93, 90 günden sonra %84 aktivite | [Liu et al., 2008] |
| | Hidrokinon | 165 | 0,4-14 | 0,05 | | | |
| | Katekol | 123 | 0,4-20,4 | 0,06 | 3 | | |
| | <i>p</i> -kresol | 79,2 | 0,8-9,6 | 0,09 | | | |
| | <i>o</i> -kresol | 9,7 | 8-96 | 1 | | | |
| | <i>m</i> -kresol | 18,5 | 0,8-11,2 | 0,3 | | | |
| | 2-klorofenol | 19 | 4-36 | 0,8 | | | |
| | | | | | | | |

5. SONUÇLAR

Yeni teknolojik yöntemler tüm diğer konularda olduğu gibi öncelikle tıp, biyokimya ve üretim endüstrisinin ihtiyaçlarına göre şekillenmekte, en son çevresel izleme ve çevre teknolojileri açısından uygulanabilir olmaktadır. Biyosensörler biyoteknolojinin daha etkili bir şekilde kullanıldığı diğer alanlarda yerini aldığı gibi, son yıllarda çevresel izleme teknikleri alanında gereken yerini almaya başlamıştır. Sensör teknolojileri gelişen malzeme bilimiyle inanılmaz bir sürat kazanmış biyolojik oksijen ihtiyacının belirlenmesine yönelik mikrobiyal/enzimatik biyosensörler ve DNA tabanlı “screen-printed” elektrotlar çevresel izlemede daha şimdiden ticari rekabet alanında seslerini duyurmaya başlamışlardır. Biyosensörlerin klasik tayin yöntemlerine nazaran çoğu zaman çok özel ve duyarlı sonuçların pratik ve kısa sürede alınmasını sağlamaları, tekrar kullanılabilir ya da düşük maliyetle tek kullanımlık şekilde tekrar üretilebilmeleri onları gelecek vaat eden biyoanalitik sistemler olarak ön planda tutmaktadır. Biyosensörlerde kullanılmak üzere hazırlanan çalışma elektrotlarının yüzeyine enzimlerin immobilize edilebilmesi için birçok alternatif teknik bulunmaktadır. Ancak bunların ticari üretime uygulanabilmesi için, basit mümkünse tek adımda ve yumuşak reaksiyon koşullarında gerçekleştirilebilen, biyomolekülün yapı ve fonksiyonunu etkilemeyen bir yöntem olması arzu edilir. Benzer şekilde güvenilir ve hızlı ölçüm sonuçları veren bir çalışma elektrodunu elde edebilmek için, uygun iletken polimerler/kompozitler kullanılmalıdır. Biyosensör teknolojisinin gelişimi son yıllarda daha çok yeni iletken polimerlerin sentezlenmesine ve bu malzemelerin çalışma elektrotlarında kullanılmasına yöneliktir. Biyosensör teknolojisine yönelik her türlü gelişme daha nitelikli fenol biyosensörlerinin geliştirilmesine de vesile olacaktır.

Tez kapsamında camsı karbon ve altın elektrotlar kullanılarak farklı polimerler/kompozitler üzerine *Horseradish peroxidase* enzimi kimyasal bağlama ve hapsedme teknikleriyle bağlanmıştır. Hazırlanan çalışma elektrotları kesikli ve sürekli sistemde fenol ve fenol türevlerinin ölçümünde kullanılmıştır. Çalışma elektrotlarının ölçüm sonuçları, iletken polimerlerin/kompozitlerin yapılarına, fonksiyonelliklerine ve kullanılan immobilizasyon tekniklerine bağlı olarak farklılıklar göstermiştir. Genel olarak, hazırlanan çalışma elektrotları *o*-kresol bileşiğine tepki vermemiş, 2,4-

dimetilfenol bileşiğine ise oldukça düşük tepkiler vermiştir. Bu sonuçlar literatürle uyum sağlamaktadır. Tez çalışmasında geliştirilen fenol biyosensörleri bu alandaki diğer çalışmalarla kıyaslanabilir sonuçlar üretmiş ve literatüre katkı sağlamıştır. Tez çalışması kapsamında hazırlanarak fenol ve türevlerinin ölçümünde kullanılan çalışma elektrotlarının ölçüm sonuçları aşağıdaki gibi özetlenmiştir:

1. PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodu kesikli sistemde, fenol, *p*-benzokinon, *p*-kresol ve 2-klorofenol ölçümleri için kullanılmıştır. Test edilen fenoller arasında en düşük LOD *p*-kresol için 1,82 μM , en yüksek LOD ise fenol için 8,46 μM olarak hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin doğrusal ölçüm aralığı fenol için 16-128 μM , *p*-benzokinon için 16-160 μM , *p*-kresol için 2-160 μM , 2-klorofenol için ise 4-128 μM olarak belirlenmiştir. En yüksek hassasiyet değeri *p*-benzokinon ölçümü için 600 nA/ μM olarak hesaplanmıştır. PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodundan elde edilen hassasiyet değerleri hem tez çalışması kapsamında diğer çalışma elektrotlarından elde edilen, hem de literatürdeki hassasiyet değerlerinden yüksektir. Standart sapma değerleri (%RSD), test edilen fenoller için 6-15 aralığında değişim göstermiştir. Standart sapma değerlerinin yüksek oluşu, ölçüm hassasiyetleri her ne kadar yüksek çıkmış da olsa LOD değerlerinin büyük çıkmasına neden olmuştur.

2. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodu kullanılarak kesikli sistemde fenol, katekol, *p*-benzokinon, *p*-kresol, 2-klorofenol ve 2,4-dimetilfenol ölçümleri yapılmıştır. Test edilen fenoller arasında en düşük LOD *p*-kresol için 0,12 μM , en yüksek LOD ise fenol için 5 μM olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisinin doğrusal ölçüm aralığı fenol için 32-128 μM , *p*-benzokinon için 48-160 μM , *p*-kresol için 32-240 μM , katekol için 48-144 μM ve 2,4-dimetilfenol için 64-576 μM olarak belirlenmiştir. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodu 2-klorofenole yanıt vermemiştir. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodundan test edilen her fenolik için elde edilen hassasiyet değerleri oldukça düşüktür. En yüksek hassasiyet değeri fenol için 2 nA/ μM olarak hesaplanmıştır. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodu hassasiyet değerleri, PPy/PGA/HRP/Au çalışma elektrodu hassasiyet değerlerinin yaklaşık %1'i kadardır. Standart sapma değerleri (%RSD), test edilen fenoller için 0,5-4,42 aralığında değişim göstermiştir.

3. PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu kullanılarak kesikli sistemde 18 fenol bileşiminin ölçümü yapılmıştır. Test edilen fenoller arasında en düşük LOD *p*-benzokinon için 0,027 μM , en yüksek LOD ise 2,4-dimetilfenol için 27,9 μM olarak hesaplanmıştır. Çalışmada en yüksek ölçüm hassasiyeti 4-metoksifenol ve 2-aminofenol için sırasıyla 50 ve 40 $\text{nA}/\mu\text{M}$, en düşük ölçüm hassasiyeti ise fenol, pyrogallol ve 2,4-dimetilfenol ve fenol için 1 $\text{nA}/\mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda, test edilen her fenolik tür için yüksek *r* değerlerine sahip (0,99) geniş doğrusal aralıklar elde edilmiştir. %RSD değerleri test edilen fenolikler için 1,1 ve 6,7 arasında değişmiştir. PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu, 1 ay içinde 700 defa kullanılmış ve kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin %70'ini korumuştur. Çalışmada, CNT'nin polipirol film yapısına katılmasının elektrokatalitik aktiviteyi arttırdığı sonucuna varılmıştır.

4. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu kullanılarak kesikli sistemde 18 fenol bileşiminin ölçümü yapılmıştır. Çalışmada en düşük hassasiyet değeri pirogallol için 0,1 $\text{nA}/\mu\text{M}$, en yüksek ölçüm hassasiyeti ise hidrokinon için 9 $\text{nA}/\mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. *o-m-p*-kresollerden yanıt alınamamış, 2,4-dimetilfenol için ise oldukça düşük hassasiyet değeri (0,4 $\text{nA}/\mu\text{M}$) elde edilmiştir. Test edilen klorofenollerin tümünde aynı ölçüm hassasiyeti hesaplanmıştır. Çalışmamızda hassasiyet değerleri, 0,1-9 $\text{nA}/\mu\text{M}$ aralığında değişim göstermiştir. Geniş doğrusal aralık 2-klorofenol için 1,6-68,8 μM , 3-klorofenol için 1,6-81,6 μM ve 4-klorofenol için 1,6-86,4 μM aralığında elde edilmiştir. En düşük LOD 2-aminofenol için 0,247 μM , en yüksek LOD ise fenol için 0,732 μM olarak hesaplanmıştır. Biyosensörde ayrıca ölçüm verimliliği hesaplanmış ve ölçümü yapılan fenolikler arasında bu değer % 95-107 aralığında değişim göstermiştir. Elektrokimyasal film kaplaması sırasında ortamda bulunan CNT, oluşmakta olan Poli(GMA-co-MTM)/PPy kopolimerinin ağ yapıları arasında hapsolmuştur. Elektrot yüzeyinde bu şekilde bağlı bulunan CNT, reaksiyon sırasında medyatör olarak davranmış, elektron transferini kolaylaştırmış ve nano yapısı sayesinde kompozit film içerisinde HRP immobilizasyonu için geniş yüzey alanı oluşturmuştur. %RSD değerleri test edilen fenolikler için 4,7-13 aralığında değişim göstermiştir. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/CNT/HRP/Au çalışma elektrodu, 1 ay içinde 700 defa kullanılmış ve kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin %80'ini korumuştur.

5. %30 oranında GMA ve %70 oranında MTM kopolimerlerini içeren Poli(GMA-co-MTM)'yi kullanarak, polipirol ile birlikte kompozit filmler şeklinde ve farklı enzim immobilizasyon mekanizmalarına sahip 6 çeşit çalışma elektrodu dizayn edilmiştir. Model fenolik olarak hidrokinon kullanılmış ve hazırlanan elektrotların hidrokinona verdiği tepkiler incelenerek ölçüm sonuçları kıyaslanmıştır. Ölçüm sonuçlarına göre, seçilen çalışma elektrodunda 18 fenol bileşiğinin kesikli sistemde ölçümü yapılmıştır. Poli(GMA-co-MTM) tabanlı çalışma elektrotlarından Poli(GMA-co-MTM)/PPy~HRP/Au çalışma elektrodunda hidrokinon ölçümü için elde edilen hassasiyet değeri 4 nA/ μ M, LOD 1,2 μ M ve doğrusal ölçüm aralığı 2-26 μ M, Poli(GMA-co-MTM) ~HRP/PPy/Au çalışma elektrodunda hassasiyet değeri 2 nA/ μ M, LOD 1,5 μ M ve doğrusal ölçüm aralığı 2-52 μ M, Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/Au çalışma elektrodunda hassasiyet değeri 30 nA/ μ M, LOD 1,03 μ M ve doğrusal ölçüm aralığı 2-38 μ M, Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodunda hassasiyet değeri 200 nA/ μ M, LOD 0,13 μ M ve doğrusal ölçüm aralığı 2-34 μ M olarak hesaplanmıştır. Poli(GMA-co-MTM)/HRP/Au çalışma elektrodu hidrokinona tepki vermemiştir. Sadece polipirol ile hazırlanmış PPy/HRP/Au çalışma elektrodunda ise hidrokinon için hassasiyet değeri 20 nA/ μ M, LOD 2,55 μ M ve doğrusal ölçüm aralığı 4-28 μ M olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre, aynı reaksiyon şartlarında, aynı konsantrasyonlardaki hidrokinon eklemelerine karşı elde edilen akım değerleri Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodunda en yüksek çıkmıştır. Ayrıca, birbirleriyle kıyaslanan bu 6 çalışma elektrodundan Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodunun maksimum ölçüm hassasiyeti ve minimum LOD değerine sahip olması 6 elektrot arasında en iyi sonuç veren çalışma elektrodu olduğunu göstermiştir. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodunda test edilen fenoller arasında en düşük LOD hidrokinon için 0,13 μ M, en yüksek LOD ise pirokatekol için 1,87 μ M olarak hesaplanmıştır. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodu, *o*-kresol, 2-aminofenol, 2,6-dimetoksifenol, 2,4-dimetilfenol, pirogallol tepki vermemiştir. Hassasiyet değerleri, test edilen fenoller için 3-200 nA/ μ M arasında değişim göstermiş, en yüksek hassasiyet değeri hidrokinon için belirlenmiş ve hidrokinondan sonra, 4-metoksifenol ve 4-asetamidofenol için de yüksek hassasiyet elde edilmiştir (100 nA/ μ M). En geniş doğrusal ölçüm aralığı *m*-kresol için 2-88 μ M olarak belirlenmiştir. %RSD değerleri test edilen fenolikler için 2-5,1 aralığında değişim göstermiştir. Poli(GMA-co-MTM)/PPy/HRP/GC çalışma elektrodu, hergün kullanıldığında, 40. günün sonunda

başlangıç aktivitesinin %80'ini korumuştur. Biyosensörde ayrıca ölçüm verimliliği hesaplanmış ve ölçümü yapılan fenolikler arasında bu değer % 70-109 aralığında değişim göstermiştir

6. PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodu ile sürekli sistemde fenol, katekol ve *p*-benzokinon ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler belli bir hızda sistemden geçen taşıyıcı sıvıya fenolik bileşik enjeksiyonları yapılarak gerçekleştirilmiştir. PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodu, fenolün artan konsantrasyonlarına karşı ölçülebilir sinyaller üretmemiştir. PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodunda, akış hızı 0,25-6 mL/dak arasında değiştirilerek katekol ve *p*-benzokinon enjeksiyonları yapılmıştır. Farklı akış hızlarında katekol için elde edilen hassasiyet değerleri 100-200 nA/mM, *p*-benzokinon için ise 30-100 nA/mM aralığında değişim göstermiştir. Ölçümler için pik şekillerinin, sinyal kararlılığının ve hassasiyet değerlerinin en uygun olduğu akış hızı 1 mL/dak olarak belirlenmiştir. *p*-benzokinon için doğrusal ölçüm aralığı, 2,5-750 μ M, belirleme limiti 2 μ M, yanıt süresi ise 3 s olarak bulunmuştur. Aynı ölçümlerden elde edilen pik akımlarının standart sapma değeri $\pm 0,23$ nA olarak hesaplanmıştır. PPy/PGA/HRP/GC çalışma elektrodu, 1 ay boyunca hergün kullanıldığında başlangıç aktivitesini aynen korumuş, 40. günün sonunda ise başlangıç aktivitesinin %40'ını kaybetmiştir.

Tez kapsamında hazırlanan çalışma elektrotlarında test edilen fenolikler, ölçüm metotlarını karşılaştırma amacıyla bir de gaz kromatografi cihazında ölçülmüştür. GC-MS ölçüm metodu ile biyosensör ölçüm metodu kıyaslandığında, GC-MS ölçüm metodunda hesaplanan LOD ve standart sapma değerleri oldukça yüksek çıkmış, verimlilik değerleri ise sağlıklı çıkmamıştır. Doğrusal ölçüm aralığı *p*-benzokinon, 4-klorofenol ve 4-asetamidofenol için oldukça küçük çıkmıştır. *m*-kresol ve *p*-kresol aynı yerde pik oluşturduklarından beraber ölçülmüştür. GC-MS ölçüm metodu ile ölçüm süresi yaklaşık 30 dakika iken, farklı tipte hazırlanmış olduğumuz çalışma elektrotlarında bu süre 2 saniye civarındadır.

KAYNAKLAR

Abu-Rabeah K., Polyak B., Ionescu R.E., Cosnier S., Marks R.S., Synthesis and characterization of pyrrole-alginate conjugate and its applications in a biosensor. *Biomacromolecules* 6, (2005) 3313-3318.

Ajayan P.M., Tour J.M., Nanotube composites. *Science* 447(2007) 1066- 1068.

Alberty W.J., Cranston D.H., *Amperometric enzyme electrodes in biosensors: Fundamentals and applications*, University Press, UK, (1987), pp. 180-210.

Angeli A., Sopra il nero del pirrolo. *Gazz. Chim. Ital.* 46 (1916) 279.

Avouris P., Molecular Electronics with Carbon Nanotubes, *Acc. Chem. Res.* 35 (2002) 1026-1034.

Bartlett P.N., *The use of electrochemical methods in the study of modified electrodes in biosensors: Fundamentals and applications*, University Press, UK, (1987), pp. 211-246.

Campuzano S., Serra B., Pedrero M., Manuel de Villena F.J., Pingarron J.S., Amperometric flow-injection determination of phenolic compounds at self-assembled monolayer-based tyrosinase biosensors. *Anal. Chim. Acta* 494 (2003) 187-197.

Camurlu P., Toppare L., Yılmaz F., Yağcı Y., Gali G., Conducting copolymers of random and block copolymers of electroactive and liquid crystalline monomers with pyrrole and thiophene. *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem. A* 44 (2007) 265-270.

Carretero V., Mena M.L., Gonzales-Cortes A.P., Pingarron J.M., Development of a high analytical performance-tyrosinase biosensor based on a composite graphite-Teflon electrode modified with gold nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* 22 (2006) 730-736.

Carvalho R.H., Lemos F., Lemos M.A.N.D.A., Cabral J.M.S., Ribeiro F.R., Electro-oxidation of phenol on a new type of zeolite/graphite biocomposite electrode with horseradish peroxidase. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 278 (2007) 47-52.

Chang S.C., Rawson K., McNeil C.J., Disposable tyrosinase-peroxidase bi-enzyme sensor for amperometric detection of phenols. *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 1015-1023.

Chen L., Gu B., Zhu G., Wu Y., Liu S., Xu C., Electron transfer properties and electrocatalytic behavior of tyrosinase on ZnO nanorod. *J. Electroanal. Chem.* 617 (2008) 7-13.

Chen W., Xingwei L., Gi X., Zhaoquang W., Wenqing Z., Magnetic and conducting particles: preparation of polypyrrole layer on Fe₃O₄ nanospheres. *Applied Surface Science* 218 (2003) 215-221.

Chiti G., Marazza G., Mascini M., Electrochemical DNA biosensor for environmental monitoring, *Anal. Chim. Acta* 427 (2001) 155- 164.

Christophe V., Silvia F., Canh T.M., Amperometric tyrosinase based biosensor using an electrogenerated polythiophene film as an entrapment support. *Talanta* 59 (2003) 535-544.

Clark L.C., Lyons C., Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. NY Acad. Sci.* 102 (1962) 29-45.

Cosnier S., Fombon J.J., Labbe' P., Limosin D., Development of a PPO-poly(amphiphilic pyrrole) electrode for on site monitoring of phenol in aqueous effluents. *Sensors and Actuators B* 59 (1999) 134-139.

Çırpan A., Alkan S., Toppare L., Hepuzer Y., Yağcı Y., Conducting graft copolymers of (3-methyl thienyl methacrylate) with pyrrole and thiophene, *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* 40 (2002) 4131-4140.

Çubukçu M., Nanokompozitler ve Elektrokimyasal Sensör Uygulamaları, Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi (2008).

Dall'Ollio A., Dascola Y., Varacca V., Bocchi V., Resonance paramagnetique electronique et conductivité d'un noir d'oxypyrrrol electrolytique. Comptes Rendus C 267(1968) 433.

Davis J.J., Green M.L.H., Hill H.A.O., Leung Y.C., Sadler P.J., Sloan J., Xavier A.V., Tsang S.C., The immobilisation of proteins in carbon nanotubes. Inorganica Chimica Acta 272 (1998) 261-266.

de Oliveira I.R.W.Z., Vieira I.C., Immobilization procedures for the development of a biosensor for determination of hydroquinone using chitosan and gilo (*Solanum gilo*). Enzyme and Microbial Technology 38 (2006) 449-456.

Dempsey E., Diamond D., Collier A., Development of a biosensor for endocrine disrupting compounds based on tyrosinase entrapped within a poly(thionine) film. Biosens. Bioelectron. 20 (2004) 367-377.

Diamond D., Principles of Chemical and Biological Sensors, first edition, John Wiley & Sons Ltd., England (1998), pp. 20-21.

Diaz A.F., Kanazawa K.K., Gadrini G.P., Electrochemical polymerization of pyrrole. J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1979) 635-636.

Dinçkaya E., Enzim Sensörleri, Biyosensörler, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu (1999), sayfa 81, Editör A. Telefoncu.

Eggins B.R., Chemical Sensors and Biosensors, first edition, John Wiley & Sons Ltd., England (2002), pp. 5.

El Ichi S., Marzouki M.N., Korri-Youssoufi H., Direct monitoring of pollutants based on an electrochemical biosensor with novel peroxidase (POX1B). *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 3084-3090.

Ewing A.G., Dayton M.A., Wightman R.M., Pulse voltammetry with microvoltammetric electrodes. *Anal. Chem.* 53 (1981) 1842-1847.

Eyrik M., Poli(Ooksimetilen)/Politiyofen Kompozitlerinin Elektroeolojik Özelliklerinin Araştırılması, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Yüksek Lisans Tezi (2007).

Fan Q., Shan D., Xue H., He Y., Cosnier S., Amperometric phenol biosensor based on laponite clay-chitosan nanocomposite matrix. *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 816-821.

Freire R.S., Duran N., Kubota L.T., Development of a laccase-based flow injection electrochemical biosensor for the determination of phenolic compounds and its application for monitoring remediation of kraft E1 paper mill effluent. *Anal. Chim. Acta* 463 (2002) 229-238.

Freire R.S., Duran N., Kubota L.T., Effects of fungal laccase immobilisation procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. *Talanta* 54 (2001) 681-686.

Freire R.S., Duran N., Kubota L.T., Electrochemical biosensor-based devices for continuous phenols monitoring in environmental matrices. *Journal of Brazillian Chemical Society* 13 (2002) 456-462.

Freire R.S., Thongnogamadee S., Duran N., Wang J., Kubota L.T., Mixed enzyme (laccase/tyrosinase)-based remote electrochemical biosensor for monitoring phenolic compounds. *Analyst* 127 (2002) 258-261.

Glatkowski P., Wallis P., Trottier M., The twist of Carbon Nanotubes. *SPIE's oemagazine*, (2005), pp. 22-24.

Guilbault G.G., Montalvo J.G., A specific urea electrode, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 2164-2165.

Gurunathan K., Murugan V.A., Marimuthu R., Mulik U.P., Amelnekar D.P., Electrochemically synthesized conducting polymeric materials for applications towards technology in electronics, optoelectronics and energy storage devices. *Mater. Chem. Phys.* 61(1999) 173-191

Hasebe K., Osteryoung J., Differential pulse polarographic detector for high performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* 47 (1975) 2412-2418.

<http://www.affymetrix.com>

<http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bdergi/yeniufuk/icerik/ekDokuMuhNano.pdf>

<http://www.itab.anadolu.edu.tr/itab/pdf/nylp.pdf>

<http://www.nanoteknoloji.net.tc/>

<http://www.phys.uni.torun.pl/~jkob/physnews97/node2.html>

<http://physicsworld.com/cws/article/print/1761>

Huang S., Qu Y., Li R., Shen J., Zhu L., Biosensor based on horseradish peroxidase modified carbon nanotubes for determination of 2,4-dichlorophenol. *Microchim Acta* 162 (2008) 261-268.

Ikehata K., Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols. *Canada Bioresource Technology* 74(2000) 191-199.

Imabayashi S.I., Kong Y.T., Watanabe M., Amperometric biosensor for polyphenol based on horseradish peroxidase immobilized on gold electrodes. *Electroanalysis* 13 (2001) 408-412.

Ito T., Shirakawa H., Ikeda S., Simultaneous polymerization and formation of polyacetylene film on the surface of concentrated soluble Ziegler-type catalyst solution. *Journal of polymer science: Polymer chemistry edition* 12 (1974) 11-20.

Janata J., *Principles of Chemical Sensors*, Plenum Press, New York (1989).

Jin G., Huang F., Li W., Yu S., Zhang S., Kong J., Sensitive detection of trifluoperazine using a poly-ABSA/SWNTs film-modified glassy carbon electrode. *Talanta* 74 (2008) 815-820.

Joshi P.P., Merchant S.A., Wang Y., Schmidtke D.W., Amperometric biosensors based on redox polymer-carbon nanotube-enzyme composites. *Anal. Chem.* 77 (2005) 3183-3188.

Kafi A.K.M., Lee D.Y., Park S.H., Kwon Y.S., Potential application of hemoglobin as an alternative to peroxidase in a phenol biosensor. *Thin Solid Films* 516 (2008) 2816-2821.

Kane S.A., Iwuoha E.I., Smyth M.R., Development of a sol-gel based amperometric biosensor for the determination of phenolics. *Analyst* 123 (1998) 2001-2006.

Kaoutit M., Rodriguez I., Tamsamani K.R., Hidalgo J., The Sonogel-Carbon materials as basis for development of enzyme biosensors for phenols and polyphenols monitoring: A detailed comparative study of three immobilization matrixes. *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 2958-2966.

Kılıç E., Köseoğlu F., *Analitik Kimyanın Temelleri*, Bilim Yayıncılık, 7. Baskı, (1996), 303-495.

Kim M., Lee W.Y., Amperometric phenol biosensor based on sol-gel silicate/ nafion composite film. *Anal. Chim. Acta* 479 (2003) 143-150.

Koile R., Johnson D., Electrochemical removal of phenolic films from a platinum anode. *Anal. Chem.* 51 (1979) 741-744.

Kuan S.S., Guilbault G.G., Ion selective electrodes and biosensors based on ISEs, *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Oxford University Press, UK (1987), pp. 135-152.

Kuru F., Katı Substrat Fermentasyonu ile Lakkaz Üretimi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi (2007).

Lane R.F., Blaha C.D., Detection of catecholamines in brain tissue: surface-modified electrodes enabling in vivo investigations of dopamine function. *Langmuir* 6 (1990) 56-65.

Li Y.F., Liu Z.M., Liu Y.L., Yang Y.H., Shen G.L., Yu R.Q., A mediator-free phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to ZnO nanoparticles. *Analytical Biochemistry* 349 (2006) 33-40.

Lindgren A., Emneus J., Ruzgas T., Gorton L., Marko-Varga G., Amperometric detection of phenols using peroxidase-modified graphite electrodes. *Anal. Chim. Acta* 347 (1997) 51-62.

Liu L., Zhang F., Xi F., Lin X., Highly sensitive biosensor based on bionanomultilayer with water-soluble multiwall carbon nanotubes for determination of phenolics. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2008) 306-312.

Liu S., Yu J., Ju H., Renewable phenol biosensor based on a tyrosinase-colloidal gold modified carbon paste electrode. *J. Electroanal. Chem.* 540 (2003) 61-67.

Liu Y., Qu X., Guo H., Chen H., Liu B., Dong S., Facile preparation of amperometric laccase biosensor with multifunction based on the matrix of carbon nanotubes-chitosan composite. *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 2195-2201.

Liu Z., Liu Y., Yang H., Yang Y., Shen G., Yu R., A phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to modified core-shell magnetic nanoparticles supported at a carbon paste electrode. *Anal. Chim. Acta* 533 (2005) 3-9.

Liu Z., Liu Y., Yang H., Yang Y., Shen G., Yu R., Phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to modified core-shell magnetic nanoparticles supported at a carbon paste electrode. *Anal. Chim. Acta* 533 (2005) 3-9.

Lutz M., Burestedt E., Emneus J., Liden H., Gobhadi S., Gorton L., Marko-Varga G., Effects of different additives on a tyrosinase based carbon paste electrode. *Anal. Chim. Acta* 305 (1995) 8-17.

Maehly A.C., Colowick S.P., Kaplan N.O., *Plant Peroxidase Methods in Enzymology*, Vol. 2, Academic Press, Newyork (1995), p. 807.

Marko-Varga G., Emneus M.J., Gorton L., Ruzgas T., Development of enzyme-based amperometric sensors for the determination of phenolic compounds. *Trends in Anal. Chem.* 14 (1995) 319-328.

Margel S., Polyaldehyde microspheres as probes for cell membranes. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 21 (1982) 343-348.

Margel S., Rembaum A., Synthesis and characterization of poly(glutaraldehyde). A potential reagent for protein immobilization and cell separation. *Macromolecules* 13 (1980) 19-24.

Mattson J.S., Jones T.T., Infrared spectrophotometric observations of the adsorption of fibrinogen from solution at optically transparent carbon film electrode surfaces. *Anal. Chem.* 48 (1976) 2164-2167.

Mello L.D., Sotomayor M.D.P.T., Kubota L.T., HRP-based amperometric biosensor for the polyphenols determination in vegetables extract. *Sensors and Actuators B: Chemical* 96 (2003) 636-645.

Meriç B., İnfluenza A Virüsünün Tanısına Yönelik Elektrokimyasal DNA Biyosensör Tasarımı, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya (Eczacılık) Programı, Yüksek Lisans Tezi (2008).

Merkoçi A., Pumera M., Llopis X., Perez B., del Vale M., Alegret S., New Materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes, *Trends in Anal. Chem.* 24 (2005) 826-838.

Metzger J., Reis M., Hartmeier W., Amperometric phenol biosensor based on a thermostable phenol hydroxylase. *Biosens. Bioelectron.* 13 (1998) 1077-1082.

Minh T., *Biosensors*, Chapman&Hall, London (1993), pp. 217.

Moore R.R., Banks C.E., Compton R.G., Basal Plane Pyrolytic Graphite Modified Electrodes: Comparison of Carbon Nanotubes and Graphite Powder as Electrocatalysts. *Anal. Chem.* 76 (2004) 2677-2682.

Musameh M., Wang J., Merkoçi A., Lin Y., Low potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes. *Electrochemistry Communications* 4 (2002) 743-746.

Mutluay İ., Sürekli Karbon nanotüp Üretimi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi (2007).

Notsu H., Tatsuma T., Simultaneous determination of phenolic compounds by using a dual enzyme electrodes system. *J. Electroanal. Chem.* 566 (2004) 379-384.

Nozaki O., Kawamoto H., Reactivation of horseradish peroxidase with imidazole for continuous determination of hydrogen peroxide using a microflow injection-chemiluminescence detection system. *Luminescence* 18 (2003) 203-206.

Ortega F., Dominguez E., Burestedt E., Emneus J., Gorton L., Marko-Varga G., Phenol oxidase-based biosensors as selective detection units in column liquid chromatography for the determination of phenolic compounds. *J. Chromatography A* 675 (1994) 65-78.

Pena N., Reviejo A.J., Pingarron J.M., Detection of phenolic compounds in flow systems based on tyrosinase-modified reticulated vitreous carbon electrodes. *Talanta* 55 (2001) 179-187.

Popescu I.C., Zetterberg G., Gorton L., Influence of graphite powder, additives and enzyme immobilization procedures on a mediatorless HRP-modified carbon paste electrode for amperometric flow-injection detection of H₂O₂. *Biosens. Bioelectron.* 10 (1995) 443-461.

Quan D., Kim Y., Shin W., Characterization of an amperometric laccase electrode covalently immobilized on platinum surface. *Journal of ElectroAnal. Chem.* 561 (2004) 181–189.

Rabinovich L., Lev O., Sol-gel derived composite ceramic carbon electrodes. *Electroanalysis* 13 (2001) 265-275.

Rajesh R., Kaneto K., A new tyrosinase biosensor based on covalent immobilization of enzyme on *N*-(3-aminopropyl) pyrrole polymer film. *Curr. Appl. Phy.* 5 (2005) 178-183.

Rajesh R., Takashima W., Kaneto K., Amperometric phenol biosensor based on covalent immobilization of tyrosinase onto an electrochemically prepared novel copolymer poly (*N*-3-aminopropyl pyrrole-co-pyrrole) film. *Sensors and Actuators B: Chemical* 102 (2004) 271-277.

Reynolds J.R., Hsu S.G., Arnott H.J., The effect of electrolyte-controlled growth morphology on the charge transport properties of poly(3-methylthiophene). *J. Polym. Sci. Part B Polym Phys* 27 (1989) 2081-2103.

Robertson J., Realistic applications of CNTs, *Materials Today* (2004), pp.46-52.

Rosatto S.S., de Oliveira Neto G., Kubota L.T., Effect of DNA on the peroxidase based biosensor for phenol determination in waste waters. *Electroanalysis* 13 (2001) 445-450.

Rosatto S.S., Kubota L.T., de Oliveira Neto G., Biosensor for phenol based on the direct electron transfer blocking of peroxidase immobilising on silica–titanium. *Anal. Chim. Acta* 390 (1999) 65-72.

Rosatto S.S., Sotomayor P.T., Kubota L.T., Gushikem Y., SiO₂/Nb₂O₅ sol-gel as a support for HRP immobilization in biosensor preparation for phenol detection. *Electrochimica Acta* 47 (2002) 4451-4458.

Ruzgas T., Emneus J., Gorton L., Marko-Varga G., The development of a peroxidase biosensor for monitoring phenol and related aromatic compounds. *Anal. Chim. Acta* 311 (1995) 245-253.

Saçak M., *Polimer Kimyası, Gazi Kitabevi Yayınları, 2. Baskı, Ankara, (2004).*

Santos A.S., Pereira A.C., Sotomayor M.D.P.T., Tarley C.R.T., Duran N., Kubota L.T., Determination of phenolic compounds based on co-immobilization of methylene blue and HRP on multi-wall carbon nanotubes. *Electroanalysis* 19 (2007) 549-554.

Schmid S., *Ion sensitive Field Effect Transistors (ISFETs) Basics and Applications, Münih Teknik Üniversitesi, Fizik Bölümü Ders Notları (2006).*

Schöning M.J., Poghossian A., Recent advances in biologically sensitive field-effect transistors (BioFETs), *The Analyst* 127 (2002) 1137-1151.

Serra B., Benito B., Agui L., Reviejo A.J., Pingarron J.M., Graphite-Teflon-Peroxidase composite electrochemical biosensors, A tool for the wide detection of phenolic compounds. *Electroanalysis* 13 (2001) 693-700.

Serra B., Mateo E., Pedrero M., Reviejo A.J., Pingarron J.M., Graphite-teflon-tyrosinase composite electrodes for the monitoring of phenolic compounds in predominantly non aqueous media. *Analysis* 27 (1999) 592-599.

Service R.F., New focus: Microchip arrays put DNA on the spot, *Science*, 282 (1998) 396-399.

Sezgintürk M., β -galaktozidaz Aktivitesinin Belirlenmesinde Biyosensör Temelli Ölçüm Sistemlerinin Geliştirilmesi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi (2007).

Shan D., Zhu M., Han E., Xue H., Cosnier S., Calcium carbonate nanoparticles: A host matrix for the construction of highly sensitive amperometric phenol biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 23 (2007) 648-654.

Shirakawa H., Louis E.J., MacDiarmid A.G., Chiang C.K., Heeger A.J., Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene. *Chem. Soc., Chem. Commun.* (1977) 578 -580.

Stanca S.E., Popescu I.C., Phenols monitoring and jhill coefficient evaluation using tyrosinase- based amperometric biosensors. *Bioelectrochemistry* 64 (2004) 47-52.

Sulak M. T., Erhan E., Keskinler B., Amperometric phenol biosensor based on horseradish peroxidase entrapped PVF and PPy composite film coated GC electrode. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2009) DOI 10.1007/s12010-009-8534-y.

Telefoncu A., Enzimoloji (Lisansüstü Yaz Okulu), Ege Üniv., Fen Fakültesi, Kuşadası, Aydın, (1997).

Tembe S., Inamdar S., Haram S., Karve M., D'Souza S.F., Electrochemical biosensor for catechol using agarose–guar gum entrapped tyrosinase. *J. Biotechnol.* 128 (2007) 80-85.

Timur S., Pestisit Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Bölümü, Doktora Tezi (2001).

Tkac J., Whittaker J.W., Ruzgas T., The use of single walled carbon nanotubes dispersed in a chitosan matrix for preparation of a galactose biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 1820-1824.

Tomschik M., Jelen F., Havran L., Trnkova L., Nielsen P.E., Palecek E., Reduction and oxidation of peptide nucleic acid and DNA at mercury and carbon electrodes. *J. Electroanal. Chem.* 476 (1999) 71-80.

Tourillon G., Garnier F., New electrochemically generated organic conducting polymers. *J. Electroanal. Chem.* 135 (1982) 173-178.

Tsai Y.C., Cheng-Chiu C., Amperometric biosensors based on multiwalled carbon nanotube-nafion-tyrosinase nanobiocomposites for the determination of phenolic compounds. *Sensors and Actuators B* 125 (2007) 10-16.

Urdike S.J., Hicks G. P., Reagentless substrate analysis with immobilized enzymes. *Science* 158 (1967) 270-272.

Valentini F., Orlanducci S., Terranova M. L., Amine A., Palleschi G., Carbon nanotubes as electrode materials for the assembling of new electrochemical biosensors. *Sensors and Actuators B* 100 (2004) 117-125.

Verdine C., Fabiano S., Minch C.T., Amperometric tyrosinase based biosensor using an electrogenerated polythiophene film as an entrapment support. *Talanta* 59 (2003) 535-544.

Vianello F., Cambria A., Ragusa S., Cambria M. T., Zennaro L., Rigo A., A high sensitivity amperometric biosensor using a monomolecular layer of laccase as biorecognition element. *Biosens. Bioelectron.* 20 (2004) 315-321.

Vianello F., Ragusa S., Cambria M.T., Rigo A., A high sensitivity amperometric biosensor using laccase as biorecognition element. *Biosens. Bioelectron.* 21(2006) 2155-2160.

Vishnuvardhan T.K., Kulkarni V.R., Basavaraja C., Raghavendra S.C., Synthesis, characterization and a.c. conductivity of polypyrrole/Y₂O₃ composites. *Bull. Mater. Sci.* 29 (2006) 77-83.

Vojinovic V., Azevedo A.M., Martins V.C.B., Cabral J.M.S., Gibson T.D., Fonseca L.P., Assay of H₂O₂ by HRP catalysed co-oxidation of phenol-4-sulphonic acid and 4-aminoantipyrine: characterisation and optimization. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 28 (2004) 129-135.

Wang J., Kawde A.N., Jan M.R., Carbon-nanotube modified electrodes for amplified enzyme-based electrical detection of DNA hybridization. *Biosens. Bioelectron.* 20 (2004) 995-1000.

Wang J., Musameh M., Carbon Nanotube/Teflon Composite Electrochemical Sensors and Biosensors. *Anal. Chem.* 75 (2003) 2075-2079.

Wang S., Tan Y., Zhao D., Liu G., Amperometric tyrosinase biosensor based on Fe₃O₄ nanoparticles–chitosan nanocomposite. *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 1781-1787.

Wilkołazka A.J., Ruzgas T., Gorton L., Amperometric detection of mono- and diphenols at *Cerrena unicolor* laccase-modified graphite electrode: correlation between sensitivity and substrate structure. *Talanta* 66 (2005) 1219–1224.

Yang S., Li Y., Jiang X., Chen Z., Lin X., Horseradish peroxidase biosensor based on layer-by-layer technique for the determination of phenolic compounds. *Sensors and Actuators B: Chemical* 114 (2006) 774-780.

Yıldız A., Elektrokimyasal Biyosensörler, Biyosensörler, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu (1999), *Editör A. Telefoncu.*

Yıldız A., Genç Ö., Enstrümental Analiz., Hacettepe Yayınları, A-64, (1993), s. 289-384.

Yılmaz F., Kasapoğlu F., Hepuzer Y., Yagci Y., Toppare L., Fernandes E.G., Gali G., Synthesis and mesophase properties of block and random co-polymers of electroactive and liquid crystalline. *Designed Monomers and Polymers* 8 (2005) 223-236.

Yılmaz F., Sel O., Cirpan A., Toppare L., Hepuzer Y., Yagci Y., Controlled synthesis of block copolymers containing side chain thiophene units and their use in electropolymerization with thiophene and pyrrole. *Journal of Macromolecular Science, Part A Pure and Applied Chemistry A* 41(2004) 401-418.

Yu J., Liu S., Ju H., Mediator-free phenol sensor based on titania sol-gel encapsulation matrix for immobilization of tyrosinase by a vapor deposition method. *Biosens. Bioelectron.* 19 (2003) 509-514.

Zepli H., Hidalgo-Hidalgo de Cisneros J.L., Naranjo-Rodriguez I., Liu B., Tamsamani K.R., Marty J.L., Phenol biosensor based on Sonogel-Carbon transducer with tyrosinase alumina sol-gel immobilization. *Anal. Chim. Acta* 612 (2008) 198-203.

Zeng Y.L., Huang Y.F., Jiang J.H., Zhang X.B., Tang C.R., Shen G.L., Yu R.Q., Functionalization of multi-walled carbon nanotubes with poly(amidoamine) dendrimer for mediator-free glucose biosensor. *Electrochemistry Communications* 9 (2007) 185-190.

Zhang T., Tian B., Kong J., Yang P., Liu B., A sensitive mediator-free tyrosinase biosensor based on an inorganic-organic hybrid titania sol-gel matrix. *Anal. Chim. Acta* 489 (2003) 199-206.

Zhao W., Song C., Pehrsson P., Water-soluble and optically pH-sensitive single-walled carbon nanotubes from surface modification. *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 12418-12419.

Zhou Y.L., Tian R.H., Zhi J.F., Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized on a boron-doped diamond electrode. *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 822-828.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Aydın'da doğan Şeyda ÖZÖNER, ilk, orta ve lise eğitimini Aydın'da tamamladı. 1997-2001 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü'nde lisans eğitimi, 2002-2005 yılları arasında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Çevre Mühendisliği Bölümü'nde yüksek lisans eğitimi aldı. 2005 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Çevre Mühendisliği Bölümü'nde doktora eğitimine başladı. 2002 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Çevre Mühendisliği Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaya başlayan Şeyda ÖZÖNER halen bu görevini sürdürmektedir.