



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



GLUKOZ ANALİZİ İÇİN POLİMER ESASLI OPTİK
SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

PINAR PARLATICI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

DANIŞMAN

Doç.Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU

EŞ-DANIŞMAN

Dr. Soner ÇUBUK

İSTANBUL, 2014



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**GLUKOZ ANALİZİ İÇİN POLİMER ESASLI OPTİK
SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ**

PINAR PARLATICI
(520411002)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

DANIŞMAN
Doç.Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU

EŞ-DANIŞMAN
Dr. Soner ÇUBUK

İSTANBUL, 2014

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Pınar PARLATICI'nın "Glukoz Analizi için Polimer Esaslı Optik Sensör Geliştirilmesi" başlıklı tez çalışması, 25 Eylül 2014 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

(Danışman)
Marmara Üniversitesi Doç. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU (İMZA).....

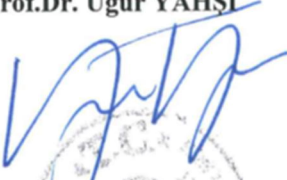
(Üye)
Marmara Üniversitesi Doç. Dr. Mehmet Vezir KAHRAMAN (İMZA).....

(Üye)
Marmara Üniversitesi Yard. Doç. Dr. Gülbin ERDOĞAN (İMZA).....

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 10.10.2014... tarih ve 2014/22-02... sayılı kararı ile Pınar PARLATICI'nın Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof.Dr. Uğur YAHSİ




ÖNSÖZ

Bu Yüksek Lisans tez çalışması, Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya programında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek Lisans çalışmam süresince, aktarmış olduğu teorik bilgiler ve deneysel katkılar ile bana yol gösteren, bu çalışmanın tamamlanmasında büyük emeği bulunan tez danışmanım Doç. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU'na,

Moleküler Floresans Spektroskopi analizlerim sırasında büyük bir sabırla bana yardımcı olan ve tecrübelerini benden esirgemeyen eş danışmanım Dr. Soner ÇUBUK'a,

Çalışmalarım sırasında hep yanımda olan arkadaşım Sibel Kenan'a, evde bana her zaman destek olan eşim Taner Parlaticı'ya

Sonsuz şükran ve teşekkürlerimi sunarım...

EYLÜL, 2014

Pınar PARLATICI

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SEMBOLLER	vi
KISALTMALAR	vii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	x
BÖLÜM 1 .GİRİŞ	1
1.1. Sensörler	1
1.1.1. Sensörler Hakkında Genel Bilgi	1
1.1.2. Kimyasal Sensörler	2
1.1.2.1.Kimyasal Sensörlerin Bazı Özellikleri	2
1.1.2.2.Kimyasal Sensörlerin Sınıflandırılması	3
1.1.3. Biyosensörler	4
1.1.3.1.İdeal Biyosensör Karakteristikleri	9
1.1.3.2.Nitelikli Biyosensörlerde Aranılan Özellikler	11
1.1.3.3. Biyosensör Dizaynında Dikkat Edilmesi Gerekenler	12
1.1.4. Biyosensör Uygulamaları	12
1.1.5. Optik Esaslı Biyosensörler	13
1.1.6. Biyosensörlerin Kısa Tarihçesi	13
1.2.Glukoz	15
1.2.1. Glukoz Hakkında Genel Bilgi	15
1.2.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	16
1.2.3. Glukoz Analizinin Önemi	17
1.2.4. Glukoz Analizinde Kullanılan Yöntemler	17
1.3.Glukoz Analiz Yöntemimizin Diğer Yöntemlerle Kıyaslanması	18
1.4.Kullanılan Cihazlar Hakkında Genel Bilgi	20
1.4.1. Spektrofluorometre	20
1.4.2. ATR-FTIR Spektrofotometre	21

1.4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	22
BÖLÜM 2. MATERYAL VE YÖNTEM	24
2.1. Materyal	24
2.1.1. Spektrofluorimetre	24
2.1.2. Ultra saf su cihazı	24
2.1.3. Hassas terazi	24
2.1.4. Mikropipet	24
2.1.5. Buzdolabı	24
2.1.6. pH metre	24
2.1.7. Magnetik karıştırıcı	24
2.1.8. Uv lamba	25
2.1.9. Vakum etüvü	25
2.1.10. ATR-FTIR spektrofotometre	25
2.1.11. Sem cihazı	25
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
2.3. Yöntem	28
2.3.1. Kullanılan çözeltiler	28
2.3.2. Sensörün hazırlanması	29
2.3.3. Sensörün karakterizasyonu	30
2.3.3.1. IR ölçümleri	30
2.3.3.2. Yüzey özellikleri	30
2.3.4. Sensörün glukoz analizi için kullanılabilirliğinin araştırılması	30
2.3.4.1. Spektral karakterizasyon çalışmaları	30
2.3.4.2. Sensör cevabına pH etkisinin araştırılması	32
2.3.4.3. Sensörün cevap verme süresi	32
2.3.4.4. Sensörün rejenarasyonu ve yeniden kullanılabilirliği	32
2.3.4.5. Kalibrasyon eğrisi, tayin ve tespit sınırı	32
2.3.4.6. Sensörün ömrü	32
2.3.4.7. Girişim yapan maddelerin etkileri	32
2.3.5. Sensörün analitik uygulamaları: gerçek örnekte glukoz analizi	33

BÖLÜM 3. BULGULAR VE TARTIŞMA	34
3.1.Sensörün Spektral Karakterizasyon Çalışmaları	34
3.1.1. IR ölçümleri	35
3.1.2. Yüzey özellikleri	35
3.2.Sensör Cevabına pH Etkisinin Araştırılması	37
3.3.Sensörün Cevap Verme Süresi	38
3.4.Sensörün Rejenarasyonu ve Yeniden Kullanılabilirliği	38
3.5.Kalibrasyon Aralığı, Tespit ve Tayin Sınırları	39
3.6.Sensörün Ömrü	40
3.7.Girişim Yapan Maddelerin Etkileri	40
3.8.Sensörün Analitik Uygulamaları: Gerçek Örnekte Glukoz Analizi	41
BÖLÜM 4. SONUÇLAR	42
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

GLUKOZ ANALİZİ İÇİN POLİMER ESASLI OPTİK SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Sensörlerin geliştirilmesinde polimerler önemli bir yer tutmaktadır. Polimer film esaslı sensörlerin yapısal analizi genellikle fonksiyonel grup içeren bir molekülden oluşmaktadır. Glukoz tayini için kullanılan fonksiyonel gruplar arasında borik asit türevleri yüzyıllardır bilinen önemli bir yere sahiptir. Floresans sensörler son 20 yılda çeşitli türlerin tespitinde, ticari olarak kullanılabilirliği ve uygulanabilirliği açısından oldukça başarılı olmuştur.

Çalışmamızda glukoz için floresans veren bir optik sensör sentezlenmiştir. Sensörün karakterizasyonu ve standardizasyonu yapılmış, ayrıca tayin için gerekli olan pH etkisi, konsantrasyon aralığı gibi çeşitli parametreler araştırılmıştır. Geliştirilen metodun tespit sınırı $0,89 \cdot 10^{-5}$ mM ve tayin sınırı ise $3,17 \cdot 10^{-3}$ mM'dır ($n=7$). Doğrusal çalışma aralığı ise $2,78 \cdot 10^{-4}$ mM - $5,56 \cdot 10^{-3}$ mM olarak bulunmuştur. Çalışmamızda geliştirdiğimiz sensörün rejenerasyonu kolayca saf su ile yıkanarak sağlanmaktadır. Ayrıca sensörün kolay hazırlanabilirliği, uygulamada kolaylık sunması, ölçümlerde zaman ve kimyasallardan kazanım sağlamasıyla da ekonomik bir alternatif olduğu görülmüştür. Geliştirdiğimiz sensör ile glukoz tayini gerçek kan örneklerine başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Sonuç olarak geliştirdiğimiz sensörün glukoz sensörü olarak klinik örneklerde kullanılabilir olduğu görülmüştür.

Elde edilen çalışma verileri "Development of photopolymerized fluorescence sensor for glucose analysis" adıyla Sensors & Actuators B adlı derginin 2013 yılı 181. cildinin 187 – 193 sayfalarında yayınlanmıştır.

EYLÜL , 2014

Pınar PARLATICI

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF PHOTOPOLYMERIZED FLUORESCENCE SENSOR FOR GLUCOSE ANALYSIS

The use of polymers is finding a significant place in development of sensors. Sensors based on polymer films which construct to analysis of a target molecule usually contain a specific functional group. Among the functional groups which used to detect glucose, boronic acid derivatives are known over a century and have an important place. The fluorescent sensors have had a large success in the past 20 years with their commercial availability and applicability to detect several species.

In this work we developed a novel boronic acid based fluorescence sensor for the determination of glucose. Characterization and standardization of the sensor has been performed and various parameters such as dynamic linear range and effect of pH have been investigated. The membran is capable of determining glucose between $2.78 \cdot 10^{-4}$ mM and $5.56 \cdot 10^{-3}$ mM with a limit of detection of $0.89 \cdot 10^{-5}$ mM, and limit of quantification $3.17 \cdot 10^{-3}$ mM ($n=7$). The sensor is easy to prepare, cost effective and rapid, also it is fully reversible, as it can be easily regenerated by treatment with water. The proposed sensor was then applied successfully for the determination of glucose in blood samples. The results showed that synthesized glucose sensor could be used in clinical samples to determine glucose concentration.

This work was supported by Marmara University, Commission of Scientific Research Project (M.Ü.BAPKO) under grant FEN-D-090113-0014 and published on May 2013, in Sensors and Actuators B: "Development of photopolymerized fluorescence sensor for glucose analysis " Chemical Volume 181, Pages 187–193.

SEPTEMBER, 2014

Pinar PARLATIÇI

SEMBOLLER

A	: Absorbans
I	: Işık Şiddeti
pH	: Bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesini tarif eden ölçü birimi
λ	: Lamda
C	: Konsantrasyon
F	: Floresans Şiddeti
°C	: Santigrat

KISALTMALAR

ATR-FTIR	:Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spektroskopi
DMPA	: 2,2-Dimetoksi-2-Fenilasetofenonon
em.	: Emisyon
HEMA	: 2-Hidroksietil Metakrilat
IR	: Kızılötesi (Infrared) Işınım
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry
L	: Litre
mmol	: Milimol
nm	: Nanometre
PMT	: Fotoçoğaltıcı Tüp
ppm	: Milyonda Bir Kısım
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
UV	: Ultraviyole
uy.	: Uyarma
λmaks.	: Maksimum Dalga Boyu
λmin	: Minimum Dalga Boyu
PEG-DA	: Poli (etilen glikol) diakrilat
VPBA	: 4 – Vinil fenil boronik asid

ŞEKİL LİSTESİ

	SAYFA
Şekil 1.1. Bir Sensörün Çalışma Mekanizması	2
Şekil 1.2 Bazı Sensör Çeşitleri	2
Şekil 1.3. Yükseltici, Mikroişlemci, Dijital Görüntüleyici İçeren Biyosensör Şeması.	5
Şekil 1.4 Biyosensör Bileşenleri	6
Şekil 1.5. Bir Biyosensörün Konfigrasyonu	8
Şekil 1.6. Clark'ın Enzim Elektrodu	14
Şekil 1.7. Glukozun Yapısı	15
Şekil 1.8. Glukozun Kimyasal Yapısı	16
Şekil 1.9. Bir Spektrofluorometrenin Kısımları	20
Şekil 1.10. FTIR Cihazı	21
Şekil 1.11. Taramalı Elektron Mikroskobu Bileşenleri (SEM)	22
Şekil 2.4. Sensörün Küvet İçine Yerleştirilmesi	31
Şekil 2.5. Fenilboronik Asid ve Glukozda Bulunan Alkollerin Bağlanma Tepkimesi	31
Şekil 3.1. Glukoz Analizi İçin Kullanılan Optik Sensörün Glukoz Çözeltisi Varlığında (2.78×10^{-3} mM) Uyarma (uy : 211 nm) ve Emisyon (em : 424 nm) Spektrumu	34
Şekil 3.2 Sensörün FTIR Spektrumu	35
Şekil 3.3 Glukoz Sensör Membranın SEM Görüntüsü (2500 kat büyütülmüş)	36
Şekil 3.4 Glukoz Sensör Membranın SEM Görüntüsü (3000 kat büyütülmüş)	36
Şekil 3.5 Floresans – pH Grafiği	37
Şekil 3.6 Sensörün Cevap Verme Süresi	38
Şekil 3.7 Glukoz Tayini İçin Oluşturulan Optik Sensör Membranın Kalibrasyon Eğrisi (λ uy/em =211 nm/ 424 nm)	39

TABLO LİSTESİ

	SAYFA
Tablo 1.1. Glukoz Analiz Yöntemimizin Diğer Yöntemlerle Kıyaslanması	19
Tablo 2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
Tablo 2.2. Sensörün Hazırlanması İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
Tablo 3.1. Girişim Yapabilecek Maddelerin Kabul Edilebilir Üst Limitleri ($2,78 \cdot 10^{-3}$ mM glukoz konsantrasyonu varlığında)	40
Tablo 3.2. Gerçek Kan Örneğinde Glukoz Analizi	41

1. GİRİŞ

1.1. SENSÖRLER VE SINIFLANDIRILMASI

1.1.1. Sensörler Hakkında Genel Bilgi

Sensörler, fiziksel büyüklükleri elektrik sinyallerine çeviren aktif ya da pasif cihazlardır.

Pasif sensörler, çevrelerinden aldıkları sinyalleri ölçen sensörlerdir. Bir sinyal gelmediği sürece durağıandırırlar. Anahtar tipi sensörler buna örnek verilebilir.

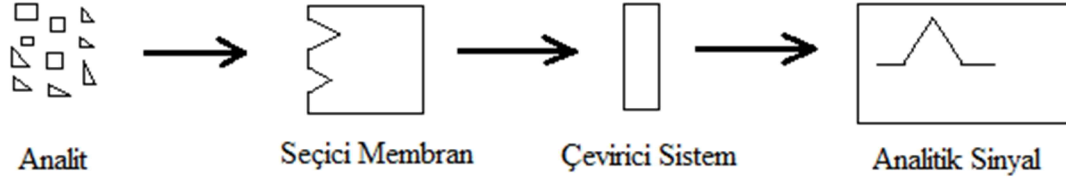
Aktif sensörler, sinyallerini kendileri üretip bu sinyallerin dış ortamlarla etkileşimlerini ölçen sensörlerdir. Mesafe sensörleri buna örnek verilebilir.

Aşağıda bazı alanlar ve bu alanlarda ilgili sensörlerle algılanabilecek örnek büyüklükler verilmiştir.

- ✓ Mekanik : Uzunluk, alan, miktar, kütleli akış, kuvvet, tork(moment), basınç, hız, ivme, pozisyon, ses dalgaboyu ve yoğunluğu
- ✓ Termal : Sıcaklık, ısı akışı
- ✓ Elektriksel : Voltaj, akım, direnç, endüktans, kapasitans, dielektrik katsayısı, polarizasyon, elektrik alanı ve frekans
- ✓ Manyetik : Alan yoğunluğu, akı yoğunluğu, manyetik moment, geçirgenlik
- ✓ Işıma : Yoğunluk, dalgaboyu, polarizasyon, faz, yansıtma, gönderme
- ✓ Kimyasal : Yoğunlaşma, içerik, oksidasyon/redüksiyon, reaksiyon hızı, pH miktarı [9].

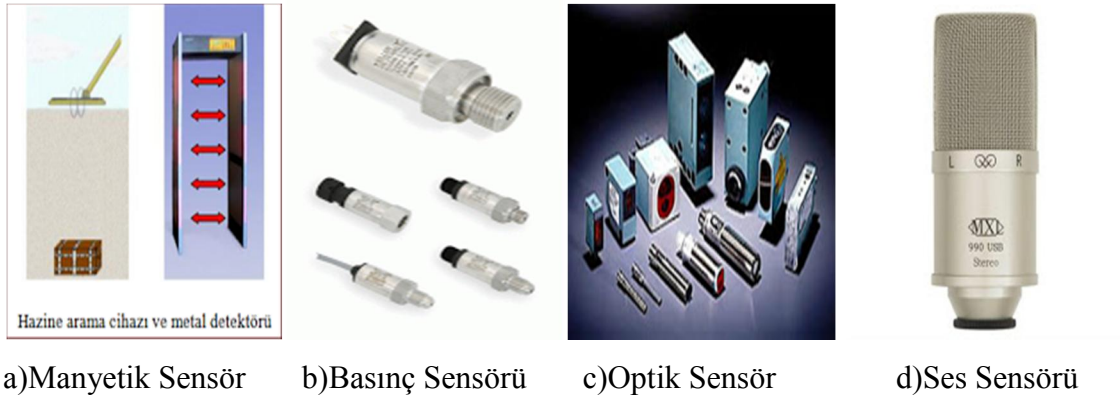
Sensörler fiziksel ortam ile endüstriyel amaçlı elektrik/elektronik cihazları birbirine bağlayan bir köprü görevi görürler. Bu cihazlar endüstriyel proses sürecinde koruma ve görüntüleme gibi çok geniş bir kullanım alanına sahiptirler. Günümüzde üretilmiş yüzlerce tip sensörden söz edilebilir. Mikro elektronik teknolojisindeki inanılmaz hızlı gelişmeler bu konuda her geçen yeni buluş ya da yeni bir uygulama tipi geliştirilmesine olanak sağlamaktadır.

Genel olarak bir sensörün çalışma mekanizması aşağıdaki gibi şematize edilebilir.



Şekil 1.1. Bir Sensörün Çalışma Mekanizması

Aşağıda bazı sensör çeşitleri verilmiştir.



Şekil 1.2. Bazı Sensör Çeşitleri

1.1.2. Kimyasal Sensörler

Kimyasal sensörler, analiz edilen bileşene karşı spesifik bir numunenin konsantrasyonundan yararlanarak elde edilen kimyasal bilgiyi analitiksel olarak yararlı bir sinyale dönüştüren sistemlerdir.

1.1.2.1. Kimyasal sensörlerin bazı özellikleri

- ✓ Kimyasal sensörlerde; duyarlı bir tabaka analit ile kimyasal etkileşim içindedir.
- ✓ Analize maruz bırakıldıktan sonra, duyarlı tabakanın kimyasında bir değişiklik olmaktadır.
- ✓ Minyatürize edilebilirler.
- ✓ Tek bir fiziksel ya da kimyasal özelliğin ölçülmesi gerekli değildir.
- ✓ Aynı kimyasal ölçümler için karşılık gelen eşdeğer aletlerden tipik olarak daha az masraflıdır [11].

1.1.2.2. Kimyasal Sensörlerin Sınıflandırılması

Kimyasal sensörleri birbirinden çok farklı şekilde sınıflandırmak mümkündür. En sık kullanılan sınıflandırma şekilleri arasında ölçülen büyüklüğe göre ve kullanım alanlarına göre sınıflandırma sıralanabilir [11].

Ölçülen Büyüklüğe Göre Sınıflandırılması

- ✓ Mekanik: Uzunluk, alan, miktar, kuvvet, moment, hız, ivme,
- ✓ Termal: Sıcaklık, ısı akışı
- ✓ Elektriksel: Voltaj, akım, direnç, kapasitans, frekans,
- ✓ Manyetik: Alan yoğunluğu, manyetik moment, geçirgenlik
- ✓ Isıma: Yoğunluk, dalga boyu, polarizasyon, faz, yansıtma
- ✓ Kimyasal: Yoğunlaşma, içerik, reaksiyon hızı, pH miktarı [12] .

Kullanım Alanlarına Göre Sınıflandırılması

Kullanım alanlarına göre kimyasal sensörler 4 ana grupta incelenebilir.

1. Optik Sensörler

- İyonik Sensörler
- Gaz Sensörler
- Biyosensörler
- Elektrooptik ve Optomekanik Sensörler

2.Kütle Sensörler

3.Elektrokimyasal Sensörler

- Potansiyometrik Sensörler
- Amperometrik Sensörler
- Kondüktometrik Sensörler
- Voltametrik Sensörler

4.Termal Sensörler

1.1.3. Biyosensörler

Genel anlamda biyosensörler, biyoloji, fizik, kimya, biyokimya, mühendislik gibi pek çok bilim alanının bilgi birikiminden multidisipliner bir anlayış çerçevesinde yararlanılarak ve biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçimlilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesiyle geliştirilen biyoanalitik cihazlar olarak tanımlanabilirler.

Son yıllarda bilim ve teknolojiadaki hızlı gelişmeler biyosensör kavram ve tanımlarında da önemli genişlemelere yol açmıştır. Canlı yaşamın önemli unsurlarından olan görme, işitme, koklama, tat alma, dokunma gibi algılama mekanizmaları doğal ve en mükemmel biyosensörük sistemler olarak düşünüldükleri için biyosensör çalışmalarına güzel örnekler oluşturmaktadırlar.

Günümüzde görme, işitme gibi yeteneklerini kaybetmiş kişilerin bu yeteneklerini tekrar yerine koyacak yapay sistemler üzerinde yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Tıp alanındaki bilim adamlarıyla da ortak çalışmayı gerektiren bu araştırmalar da biyosensör alanına dahil edilebilirler. Bununla birlikte, bugün biyosensörlerden bahsedilince ilk akla gelen daha genel ve yaygın kullanım imkanı bulmuş, analiz amacına yönelik biyoanalitik sistemler olmaktadır.

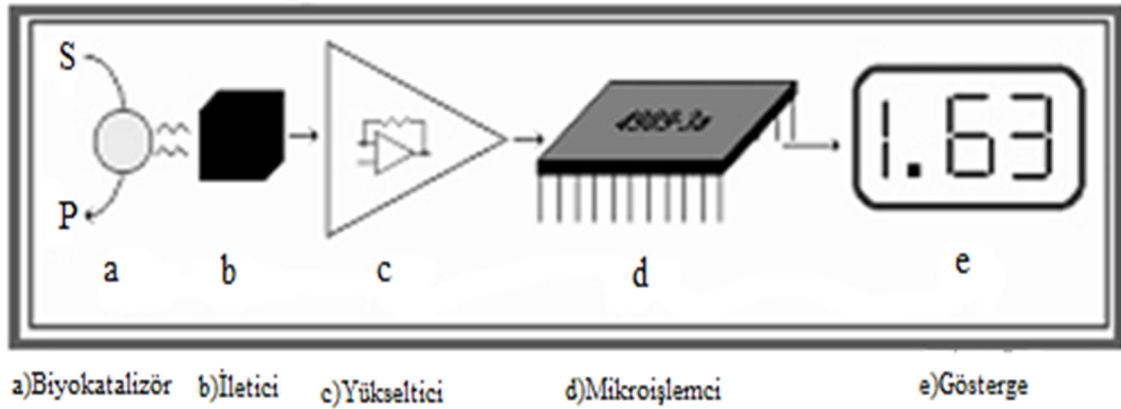
Genel kullanım alanları incelendiğinde biyosensörlerin tıbbi analizlerden çevresel analizlere, proses izlenmesinden ilaç analizlerine ve savunma faaliyetlerine kadar pek çok alanda uygulama bulduğu görülmektedir.

Biyosensörler sayesinde normalde uzun tahliller gerektiren analizler daha kısa sürede yapılabilir. Örneğin glukoz biyosensörleri kandaki glikoz değerini kısa sürede ölçebilmektedir. Aynı ölçüm normalde geleneksel yöntemlerle daha uzun sürede

yapılabilmektedir. Kısa sürede sonuca ulaştırması ve uygulama kolaylığı biyosensörlerin en önemli avantajlarından [13].

Biyosensörler, genel olarak analizlenecek madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bir bileşenin, bu etkileşim sonucu ortaya çıkan sinyali ileten bir iletici sistemle birleştirilmesi ve bunların bir ölçüm sistemiyle kombinasyonundan oluşturulurlar.

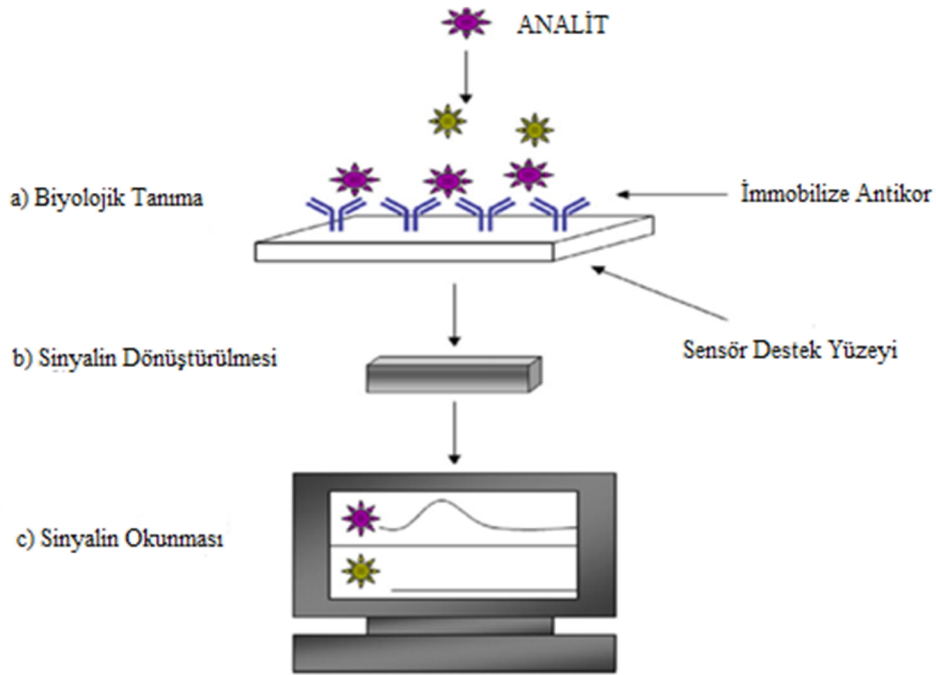
Sistemin özelliğine bağlı olarak Şekil 1.3.' te görüldüğü gibi yükseltici, mikroişlemci, dijital görüntüleyici gibi kısımlar sistem içinde yer alabilirler.



Şekil 1.3. Yükseltici, Mikroişlemci, Dijital Görüntüleyici İçeren Biyosensör Şeması

Biyosensör, fizyolojik ya da biyokimyasal değişimler ile ilgili bilgiyi belirleyen, ileten ve kaydeden bir araçtır. Teknik olarak biyosensör, bir elektronik dönüştürücü ile biyolojik aracı birleştiren bir probdur. Böylece biyokimyasal sinyalin ölçülebilir elektriksel cevaba dönüşümünü sağlamaktadır.

Biyosensör yapımında çeşitli dönüştürücüler örneğin elektrokimyasal, optik, akustik ve elektronik dönüştürücüler kullanılabilmektedir. Bir biyosensör Şekil1.4'de gösterilen üç ana bileşenden oluşmaktadır. Analit ile biyolojik tanıma elementi arasındaki etkileşim transdüksiyon sistemi tarafından ölçülebilir bir sinyale dönüştürülmektedir. Ardından sinyal okuma ya da gösterilme şekline dönüştürülmektedir [8].



Şekil 1.4. Biyosensör Bileşenleri.

Söz konusu sinyal proton konsantrasyonundaki değişim, amonyak ya da oksijen gibi gazların salınımı veya alımı, ışık yayılımı-absorbsiyonu ya da yansımaları, ısı yayılımı, kütle değişimi vb sonucunda üretilebilmektedir. Üretilen bu sinyal bir dönüştürücü tarafından elektrokimyasal, termal, optik ya da piezoelektrik anlamda akım, potansiyel enerji, sıcaklık değişimi, ışığın absorbsiyonu ya da kütle artışı gibi ölçülebilir bir cevaba dönüştürülmektedir.

Üretilen sinyal daha sonraki analizler için çoğaltılabilir, işlenebilir ya da depolanabilir. Prensipinde işlevsel bir biyosensör üretmek için her hangi bir reseptör herhangi bir uygun dönüştürücü ile kombine olarak kullanılabilir [1].

Günümüzde biyosensörler klinik, biyokimyasal ve çevresel analizlerde biyomoleküllerin etkileşiminin analizi için oldukça güçlü araçlardır. Biyomedikal alana bakıldığında kaza, acil bölümü ya da doktor ofisi açısından biyosensörler hızlı, gerçek zamanlı ve doğru sonuç sağlama potansiyeli olan cihazlardır. Bunun tipik bir örneği diyabet hastalarında kılcal damarlarda glikozun *in vitro* tayinidir [2].

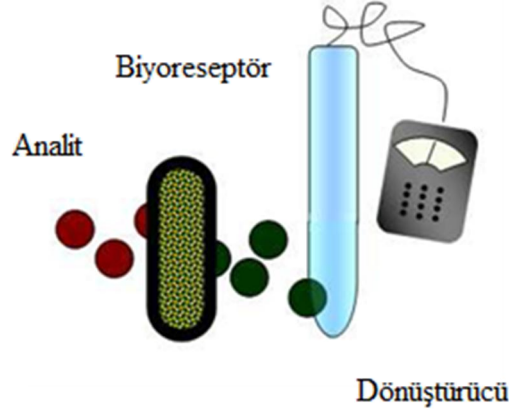
Biyosensörler, gerçek zamanlı, hızlı ve çoklu analizlerin yapımına olanak sağlayarak, umut vaat eden bir alternatif olmaktadır. Patojen mikroorganizmaların tayini için farklı tipte biyosensörler geliştirilmiştir.

Patojen bakteri biyosensörleri alanındaki yakın zaman gelişmeleri içerisinde elektrokimyasal biyosensörlerin kullanımı da yer almaktadır. Bakterilerin belirlenmesinde metabolik ürünlerin ölçümü; işlem basitliği, düşük maliyet, farklı canlı ve canlı olmayan hücrelerin belirlenebilmesi ve etiketlemeye ihtiyaç duymadan tayin edebilme gibi çeşitli avantajlar sağlayan oldukça ilginç bir yaklaşımdır [3]. DNA hibridizasyon sensörleri elektrot yüzeyine immobilize edilmiş nükleik asit tanıma tabakasını içermektedir. Bu tabaka seçici olarak spesifik bir DNA sekansının belirlenmesinde rol oynamaktadır. Dönüştürücü sistemi ile hibridizasyon olayı ölçülebilir bir sinyale dönüştürülmektedir. Sinyal okuma sistemine bağlı olarak DNA sensörleri iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Bunlardan birincisinde redoks aktif türler etiket olarak kullanılmaktadır, ikincisinde ise herhangi bir etiket kullanılmaksızın DNA ara yüzeyinde meydana gelen değişimler elektrokimyasal olarak gözlemlenmektedir [4].

Temel olarak bir biyosensörün seçiciliği veya spesifikliği, mevcut analitik algılama kapasitesine sahip olan biyolojik tanıma elementine bağlı olarak değişmektedir. Biyolojik olarak aktif materyalin seçimi ise; spesifiklik, depolanma, işlevsellik ve çevresel stabilite faktörlerine bağlıdır. Bu seçim aynı zamanda kimyasal bileşik, antijen, mikrop, hormon, nükleik asit gibi belirlenecek olan analite ve de koku, tat gibi sübjektif parametreler de bağlıdır. Enzimler, DNA, reseptörler, organeller ve mikroorganizmalar gibi bitki ve hayvan hücreleri ya da dokuları da biyolojik duyu elementi olarak kullanılmaktadır [5].

Bir biyosensörün performansını etkileyen ana faktörler 7 ana başlık altında toplanabilir. Bunlar; seçicilik, hassasiyet aralığı, doğruluk, kullanılan solüsyonun doğası, cevap elde etme süresi, tekrar kullanım zamanı (sensörün bir analizden sonraki analize hazır olması için geçen süre) ve kullanım ömrüdür [6].

Biyosensörler bir çok sensör gibi reseptör ve dönüştürücü olmak üzere iki ana yapıdan ibarettir. Eğer reseptör biyomoleküler bir yapıda ise buna biyoreseptör adı verilir (Şekil 1.5.). Biyoreseptörler analiti fark edebilen biyomoleküllerdir. Dönüştürücüler ise biyoreseptörün analiti fark ettiği esnada ürettiği kimyasal veya fiziksel sinyali elektrik sinyallerine dönüştüren yapılardır.

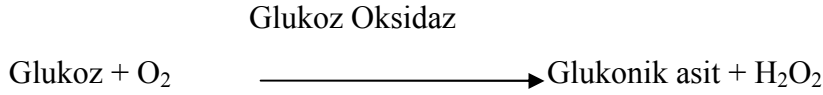


Şekil 1.5. Bir Biyosensörün Konfigrasyonu

Biyoreseptörler: Biyoreseptör olarak değişik biyomoleküller kullanılabilir. Bu biyomoleküllerden en çok kullanılanı enzimlerdir. Enzimler hedef moleküllere karşı oldukça özgüdür. Binlerce farklı analit içinden hedef analiti seçip reaksiyon oluşturabilen bu biyokatalizatörlerin dönüştürücülere bir şekilde immobilize edilmesi yani yapıştırılması gerekmektedir.

Matrikse fiziksel hapsleme veya kimyasal bağlama yöntemleri analiti tanıyan biyomoleküllerin dönüştürücülere immobilizasyonunda kullanılan stratejilerdir. Kimyasal bağlama yönteminde biyomolekül dönüştürücü yüzeyine uygun bir reaktif tarafından kovalent olarak bağlanır. Çok az sayıda biyomolekülün bağlanması bile biyosensörün etkili çalışması için yeterli olabilir.

Dönüştürücüler: Biyoreseptörün analiti tanıdıktan sonra ortamda oluşan fiziksel veya kimyasal değişimi algılayıp bunu ölçülebilir dijital sinyallere dönüştüren cihazlardır. Tüm bunları bir örnekle biraz daha açalım: Glikoz biyosensörleri kandaki glikoz konsantrasyonunun tesbitinde kullanılırlar. Burada analit glukoz iken glukoz oksidaz enzimi biyoreseptör olarak kullanılır. Aşağıdaki reaksiyon şemasında görüldüğü gibi iki yeni ürün reaksiyon sonucunda oluşur.



Burada kullanılacak dönüştürücü, 3 farklı kimyasala odaklanabilen 3 farklı dönüştürücüden biri olabilir.

1. Oksijen sensörü: Ortamda kullanılan oksijen miktarını ölçer ve bunu anlaşılabilir sinyal olan elektrik akımına dönüştürür.
2. pH sensörü: Glukonik asit ortamın pH'ını düşürür. Bir pH sensörü olan dönüştürücü ortamın pH'ına bakarak yıkılan glukoz miktarını tesbit edebilir. Dönüştürücü ile pH değişimi voltaj değişimine sebep olur.
3. H₂O₂ sensörü: Dönüştürücü ortamdaki H₂O₂ konsantrasyonunu ölçer ve elektrik akımına dönüştürür[14].

1.1.3.1. İdeal Biyosensör Karakteristikleri

Hangi tipte tasarlanacak olursa olsun bir biyosensörün işlevsel olabilmesi için, ölçüm sisteminin çeşitli fiziksel özellikleri taşıyor olması gerekmektedir. İdeal bir biyosensörün en önemli özellikleri ve karakteristikleri; hassasiyet, kalibrasyon, doğrusallık, tayin sınırı, kesinti (gecikme), uzun süreli stabilite, seçicilik, dinamik cevap oluşturma, düzlemsel membran, küresel membran, akış hassasiyeti, sıcaklığa olan bağımlılık, gürültü sinyali ve kullanım ömrünün olabildiğince uzun olmasıdır.

Biyosensör sistemlerinde analitler genel olarak direkt ölçülmemektedir. Daha çok reaksiyona giren ya da reaksiyon sonucu oluşan bir ürünün konsantrasyonundaki değişime bağlı olarak ölçüm yapılmaktadır. İdeal bir biyosensör hedef analitin bilinen konsantrasyonlarını içeren standart solüsyonlara ya da gazlara maruz bırakıldığı zaman kolay bir biçimde kalibre edilebilmelidir. Hassasiyeti belirlemek için kalibrasyon grafiği hazırlanışı sırasında çok fazla veri noktasına ihtiyaç duymamalıdır. Bir biyosensörün mükemmel düzeyde doğrusallığa sahip olabilmesi için, ölçüm ortamında fiziksel olarak çözünabilen substratın sıfır konsantrasyonundan maksimum konsantrasyonuna kadar uzanan geniş bir aralıkta hassasiyetinin sabit olması gerekmektedir. İdeal olarak, bir substratın en düşük konsantrasyonu bile biyosensör tarafından tayin edilebilmeli, tayin sınırı yalnızca tayinde kullanılan cihazın elektronik çözünürlüğü ile kısıtlanmalıdır.

Genel olarak, bir biyosensör sinyali elde edilen sonuçtan çıkarılması gereken arka plan sinyallerine sahiptir. Arka plan sinyalleri, bir biyosensör ile düşük tayin limitlerinde doğru ölçüm yapılmasını zorlaştırmaktadır. Akım kaçakları, elektronik cihazdaki veya biyosensörde farklı metallerin temasından kaynaklanan küçük gerilim farklılıkları veya pek çok elektrokimyasal etken bu sinyalleri oluşturabilmektedir. İdeal bir biyosensör daha önce yapılmış olan ölçümlerden etkilenmemelidir ve düz bir çizgi gibi temsil edilmeli herhangi bir kesintiye uğramamalıdır. Bununla birlikte, sistemde bir sonraki ölçümü etkileyecek şekilde enerji emilebilmekte ya da mevcut kimyasal ortam ölçüm sırasında değişebilmektedir. İdeal bir biyosensörün tüm kullanım ömrü boyunca ya da en azından ölçüm yapılana kadar hassasiyeti sabit kalabilmelidir. Elektrotun okside olması ve proteinler ya da ortamdaki, diğer kimyasal substratların direk emilmesi yoluyla kirlenme gibi hassasiyeti azaltan birden fazla faktör bulunmaktadır. İdeal bir biyosensör sadece hedef analit konsantrasyonundaki değişime cevap verir ve diğer kimyasal türlerin varlığından etkilenmez.

Bir biyosensör probunun fiziksel özellikleri ve nispeten büyüklüğü, ölçümü yapılan hedef analitin konsantrasyonundaki değişime nasıl hızlı cevap oluşturabileceğini belirlemektedir. Örnek içerisindeki kimyasal türler genel olarak basit difüzyon yoluyla aktif yüzeye geçmektedirler.

Farklı geometrileri ve basit sınır koşulları ile biyosensörler için, teorik modellerden analitik çözümler üretilebilir. Örneğin büyük elektrotlar genellikle, basit, tek tip ve ölçülebilir kalınlıktaki membranlar ile düzlemsel element olarak kaplanmaktadır. Benzer şekilde analitik çözüm küresel koordinatlardaki tek tip bir membran içinde bulunabilir. Bu yaklaşım genellikle, ölçüm ortamı ile kıyaslandığı zaman oldukça küçük kalan mikroeletrotlar için kullanılmaktadır.

Bazı durumlarda substratın membrandan sensöre taşınması önemli hale gelebilmektedir. Bazı proseslerde akış sınırlaması olabilmektedir. Difüzyon katsayısı, kimyasal çözünürlük ve biyosensör yapımında kullanılan katı materyaller gibi bütün fiziksel özellikler sıcaklıkla değişmektedir.

Enzimlerin katalizlediği reaksiyon oranı sıcaklığa oldukça bağımlıdır. Çeşitli kimyasal reaksiyonlar sonucunda, biyosensörün ısısını değiştirebilecek ölçüde ısı üretimi gerçekleştirebilmektedir. Pratikte genel olarak su banyoları ya da metal bloklar kullanılarak ölçümler izotermal koşullarla sınırlandırılmaktadır. Biyolojik elementler

genellikle bir biyosensör sistemindeki en az kararlı olan bileşiklerdir. Bir biyosensörün önemli bir özelliği normal işlem koşulları altında hassasiyetini koruyabildiği kadar uzun bir kullanım ömrüne sahip olmasıdır. Kullanım ömrü yapılan toplam ölçüm sayısına veya ölçülen analitin konsantrasyonuna bağlı olabilir [7].

1.1.3.2. Nitelikli Biyosensörlerde Aranılan Özellikler

Biyosensörler sekiz parametreye göre nitelendirilirler:

- ✓ **Duyarlılık :** Cihazın analitteki değişime (konsantrasyon) birebir cevap vermesi demektir. Duyarlılık yüksekse analitteki birim değişim sensörün ekranında aynen gözükür.
- ✓ **Seçicilik :** Cihazın sadece analite özgünlüğünü gösterir. Cihaz başka reaktiflere ilgi göstermez ve hatalı sonuç vermez.
- ✓ **Ölçüm aralığı:** Cihazın ölçebildiği analit konsantrasyonun aralığıdır. Analit belli bir konsantrasyondan az veya çoksa cihaz iyi bir duyarlılıkta sonuç vermeyebilir.
- ✓ **Ölçüm süresi:** Analit konsantrasyonundaki bir basamak değişime karşı cihazın vereceği nihayi yanıtın sadece %63'lük kısmını ölçmek için gösterdiği ölçüm süresidir. Bir tür cihazın ölçme hızını gösterir.
- ✓ **Tutarlılık:** Cihazın sonuçlarındaki tutarlılığı ifade eder.
- ✓ **Tesbit sınırı:** Cihazın tesbit edebileceği en düşük analit konsantrasyonunu ifade eder.
- ✓ **Ömrü:** Cihazın, performansında gözle görülür bir azalma olmadan verdiği hizmet ömrünü ifade eder.
- ✓ **Kararlılık:** Belirli bir süre içinde cihazın duyarlılığındaki veya baz çizgisinde değişimleri dikkate alan bir kalite ölçüm değeridir[13-14].

1.1.3.3. Biyosensör Dizaynında Dikkat Edilmesi Gerekenler

Biyosensör tasarımlarında önce biyosensörün hangi analiti tanıyacağı tesbit edilmelidir. Sonrasında ise aşağıdaki maddeler dikkate alınarak biyosensörler dizayn edilmelidir. Bunlar sırasıyla;

- ✓ Analite uygun biyoreseptörün (tanıyıcı molekülün) seçimi,

- ✓ Biyoreseptörü dönüştürücüye sabitlemede kullanılacak uygun ve verimli immobilizasyon metodunun seçimi,
 - ✓ Biyoreseptörün analiti tanınmasıyla oluşan kimyasal veya fiziksel sinyali anlaşılabilir sinyal formuna dönüştürecek olan dönüştürücünün seçimi ve dizaynı,
 - ✓ Ölçüm aralığının, duyarlılığın ve ölçümlerdeki parazitlerin dikkate alınması,
 - ✓ Cihazın kompakt bir hale dönüştürülmesi,
- olarak sıralanabilir.

Tüm bunları yapmak için ise bir çok alanda geniş bir bilgi birikimine ihtiyaç vardır. Mesela, birinci şık için biyokimya ve biyoloji, ikinci ve üçüncü için kimya, elektrokimya ve fizik ve dördüncü için kinetik ve kütle transferi alanları bunlardan bazılarıdır. Biyosensör dizayn edilir edilmez sıra onun elverişli imalat ve kullanma için uygun bir şekilde paketlenmesine gelir. Modern imalat teknolojileri ve stratejileri sayesinde çok daha az maliyetle biyosensör üretimi mümkün olmaktadır. Tasarıdan imalata tüm bu basamaklarda çoklu-disiplinlerin bir arada kafa kafaya çalışması son derece önemlidir [13].

1.1.4. Biyosensör Uygulamaları

Biyosensörler birçok alanda kullanılmaktadır.

Tıp: Metabolitlerin ölçülmesi, insulin eksikliği belirtilerinin ölçülmesi, hastane koşullarının gözlenmesi, yapay pankreasın çalışma koşullarının kontrolü, vb.

Endüstri: Endüstriyel proses kontrollerinde gereklidir. Biyoreaktörlerin kontrolü, giren ham madde ve çıkan ürünlerin ölçülmesi, vb.

Çevresel Denetim: Çevre Koruma Ajansı (Environmental Protection Agency) EPA tarafından hava ve su düzenli olarak izlenmektedir. Ayrıca yerel idari mercilerin de bölgesel izleme birimleri bulunmaktadır. Bu birimler düzenli olarak hava ve suyu tahlil etmektedirler.

Savunma (askeri ve sivil): Askeri ve sivil savunma alanında kullanılmak üzere bir çok sensör ve biyosensör dizaynı ve imalatına, son körfez krizi ve 11 Eylül sonrasında hız

verilmiştir. Herhangi bir biyoterör ve biyosaldırı sonrası erken tesbit ve analiz için çok güçlü ve taşınabilir biyosensörler en elzem cihazlardandır [13].

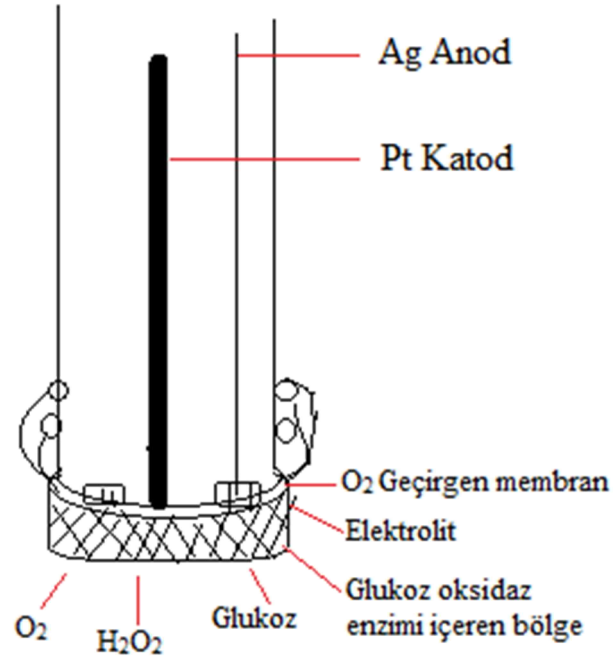
1.1.5. Optik Esaslı Biyosensörler

Optik biyosensörler iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle uygun bir biyomolekülün sabitlenerek hazırlanan ölçüm aygıtlarıdır.

Etkileşim sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü esas alırlar. Sinyal, ışık yansıması, saçılımı yada yayımı sonucu meydana gelir. Örneğin optik lifin üzerine enzim sabitlenmesiyle hazırlanan optik esaslı enzim sensörleri temelde absorpsiyon, fluoresans, biyoluminesans gibi temel ilkeler çerçevesinde işlev görürler

1.1.6. Biyosensörlerin Kısa Tarihçesi

Clark ve Lyons (1962) ilk defa biyosensör terimini ifade etmişlerdir. Enzim-elektrot kompleksini imal eden ikili, bu kompleksi glukoz sensörü olarak kullanmışlardır. Sensör, oksido-reduktaz enzim olan glukoz oksidazın platin elektroduna immobilize olmasından ibarettir. Platin elektrod enzim tarafından üretilen H_2O_2 tarafından $+0.6V$ 'da polarize olur. İşte basitçe bu prensibe göre çalışan tarihin ilk biyosensörü 1974 yılında piyasada Yellow Springs Instrument (YSI) olarak görülmüştür. YSI sensörünün geliştirilmesinde ana özellik yeni nesil membranlardır. Clark burada sandviç membran kullanmıştır. Enzim nükleopor polikarbonat membran ve selluloz asetat membran arasına hapsolmuştur. Bu membranlar normalde ortamın potansiyel yapısını etkileyecek olan diğer faktörleri elimine etmekte ve cihazın duyarlılığını ve özgünlüğünü artırmaktadır. Mesela, Clark'ın kullandığı membran H_2O_2 'i diffüze ederken askorbat ve diğer parazit kimyasalların geçişini engellemektedir [13].

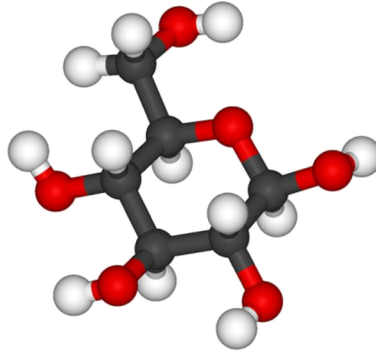


Şekil 1.6. Clark'ın Enzim Elektrodu

1.2. Glukoz

1.2.1. Glukoz Hakkında Genel Bilgi

Glukoz kapalı formülü $C_6H_{12}O_6$, yoğunluğu 1,538 g/mL, erime noktası 80-86 °C olan altı karbondan oluşmuş bir monosakkarittir. Glukoz beyin için tercih edilen enerji kaynağıyken, çok az veya hiç mitokondrisi olmayan hücrelerin örneğin olgun eritrositlerin muhtaç oldukları enerji kaynağıdır [15].



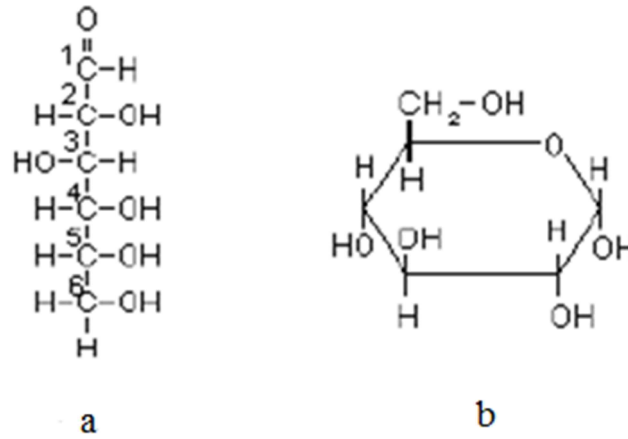
Şekil 1.7. Glukozun yapısı

Doğada yaygın olarak bulunan önemli bir karbonhidrattır. Serbest halde olgun meyvelerde (üzüm, incir) balda, bitki öz sularında, çoğunlukla fruktozla birlikte bulunur.

En çok üzümde bulunduğu için “üzüm şekeri” adı da verilir. Kanda serbest halde bulunur. İnsanda normalde 100 mL kanda 70-90 mg kadardır. Bu nedenle “kan şekeri” de denir.

Beynin en önemli yakıtıdır. Kanda en düşük düzeyde iken bile önce beyin tarafından kullanılır. Glukoz bileşik karbohidratların çoğunun (sakkaroz, laktoz, maltoz ve polisakkaritlerden nişasta, glikojen ve sellüloz) yapıtaşını teşkil eder [25].

Fischer ve Haworth düzenlemesine göre formülü aşağıda gösterildiği gibidir;



Şekil 1.8. Glukozun kimyasal yapısı (a) Fischer Formülü (b) Haworth Formülü

1.2.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Molekül yapısında aldehit grubu bulunduğu için bir aldoheksozdur. Aldoheksoz 6C'lu, aldehit grubu içeren şeker demektir. Glukoz suda çok, alkolde az çözünür. Orta derecede tatlıdır.

Heksozların en önemli üyesidir. Çünkü karbonhidratlar glukoz halinde kana geçer ve karaciğer ile kaslarda glikojen şeklinde depo edilir. Glukoz sindirim sırasında parçalara ayrılmaz [25].

Kandaki glukoz düzeyine glisemi adı verilir. Normal sınırlardaki glisemiye normoglisemi, normal sınırın altındaki glisemiye hipoglisemi ve normal sınırın üstündeki glisemiye ise hiperglisemi adı verilir. Kandaki glukoz seviyesi, glukoz metabolizması ile ilgili bütün metabolik yolların (glikoliz, glikojenoliz, glikojenez, glukoneogenez vb.) koordineli çalışması ve kontrolü ile ayarlanır. Kan glukoz seviyesinin düzenlenmesinde, karaciğer ve hormonların etkisi önemlidir. Kısa süreli açlıklarda, karaciğerdeki glikojenden glikojenoliz sonucu kana glukoz verilirken uzun süreli açlıklarda ise karaciğer tarafından glukoneogenezle kana glukoz verilir [16].

Deri altı dokularında glukoz derişimini sürekli bir değerlendirmeye tabi tutabilmek ve kandaki glukoz seviyesini belirleyebilmek amacıyla duyarlı, seçici, güvenilir ve düşük maliyetli glukoz sensörü üretimi giderek artmaktadır [17].

Kimya, biyoloji, klinik analizler, tarım ve gıda endüstrisi alanlarında glukoz seviyelerinin belirlenmesi için yakın infrared spektroskopisi (NIR), optik çevirme, kolorimetrik ve fluorimetrik tespiti içeren çeşitli metodlar önerilmiştir. Bunlar dışında farklı çalışma prensipleri içeren, temelde absorpsiyon, fluoresans, biyoluminesans gibi temel ilkeler çerçevesinde çalışan optik sensörler kullanılmaya başlanmıştır. Bu sensörler enzim temelli elektrokimyasal veya optik, enzim temelli olmayan elektrokimyasal ve boronikasit türevi içermekte olup bu çalışmalar hala devam etmektedir.

İdeal bir glukoz tayin sistemi sürekli olmalı, invazif olmamalı, kolay kullanılabilir ve ekonomik olmalıdır. Son on yılda invaziv olmayan ve kesintisiz glukoz izleme cihazları geliştirmek için kullanılabilecek yeni boronikasit temelli fluoresans sensörlerin sentezi yapılmıştır. Çalışmaların sayısı fazla olmayıp ilgili sensörün sentezi için karbohidrat gibi diol içeren maddelere yüksek ilgisi olan maddelerin kullanıldığı bildirilmiştir [18-23].

1.2.3. Glukoz Analizinin Önemi

Glukoz tayini gıda işlemleri ve fermantasyonda olduğu kadar klinik, biyolojik ve kimyasal örneklerde de çok önemlidir. Şeker hastalığının izlenmesi ve tıbbi teşhis amacıyla glukoz tayinleri yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.2.4. Glukoz Analizinde Kullanılan Yöntemler

Glukozun nicel tayini biyokimya, klinik kimya, gıda ürünleri ve fermantasyonda çok önemli yere sahiptir. Refraktif indeks, UV ve kolorimetri gibi geleneksel karbonhidrat tayin yöntemlerinin seçimliliği yoktur ve duyarlılık düşüktür [24]. Kromatografik metotlar ya da kapiler elektroforezde kullanılan dedektöre bağlı olarak kompleks matrislerde tayinler zor olabilmektedir, çünkü çok fazla sinyal algılanır ya da bazı analitler için tayin limitleri uygun değildir ve analitlerin türevlendirilmesine ihtiyaç duyulur. Ancak, uygun doku, mikroorganizma ya da enzimlerin biyobileşen olarak kullanıldığı biyosensör sistemleri ile bu tip sınırlamalar ortadan kaldırılabilir.

Diğer glukoz tayin metotları kolorimetrik ve enzimatik metotlar olmak üzere ikiye ayrılmıştır.

Kolorimetrik metotlar;

a)Oksidasyon-redüksiyon metotları

- ✓ Folin-Wu Metodu
- ✓ Somogy-Nelson Metodu

b)Dinitrofenol metodu

Enzimatik metotlar;

- ✓ Glukoz oksidaz metodu (enzimatik kolorimetrik metot)
- ✓ Hekzokinaz metodu (enzimatik ultraviyole metot) [24].

Son yıllarda yapılan çalışmalar incelendiğinde dünyada biyosensör teknolojisine olan ilgi açıktır ki ülkemizde de bu konuda çalışmalar hızla artmaktadır.

1.3. Glukoz Analiz Yöntemimizin Diğer Yöntemlerle Kıyaslanması

Dünyada çeşitli çalışmalar yapılmış olmasına karşın ülkemizde glukoz izlenmesi ile ilgili çok sayıda çalışma mevcut değildir. Çalışmamızda geliştirdiğimiz yöntem ile glukoz izlenmesi hızlı, ekonomik ve kolay bir şekilde gerçekleştirilebilmiştir. Yöntemimiz glukoz analizi çalışmalarına katkı sağlayacak ve bu alandaki eksikliği tamamlayacaktır. Yöntemde kullanılan UV sertleştirme tekniği de farklı yüzeylere polimerik materyalin kaplanmasını sağlaması açısından sağlayacağı kolaylık ve pratiklik ile de orijinal olduğu kadar ekonomik bir alternatif olmasıyla bu alandaki çalışmalara kuvvetli bir alternatif olma adayıdır.

Tablo 1.1. Glukoz Analiz Yöntemimizin Diğer Yöntemlerle Kıyaslanması

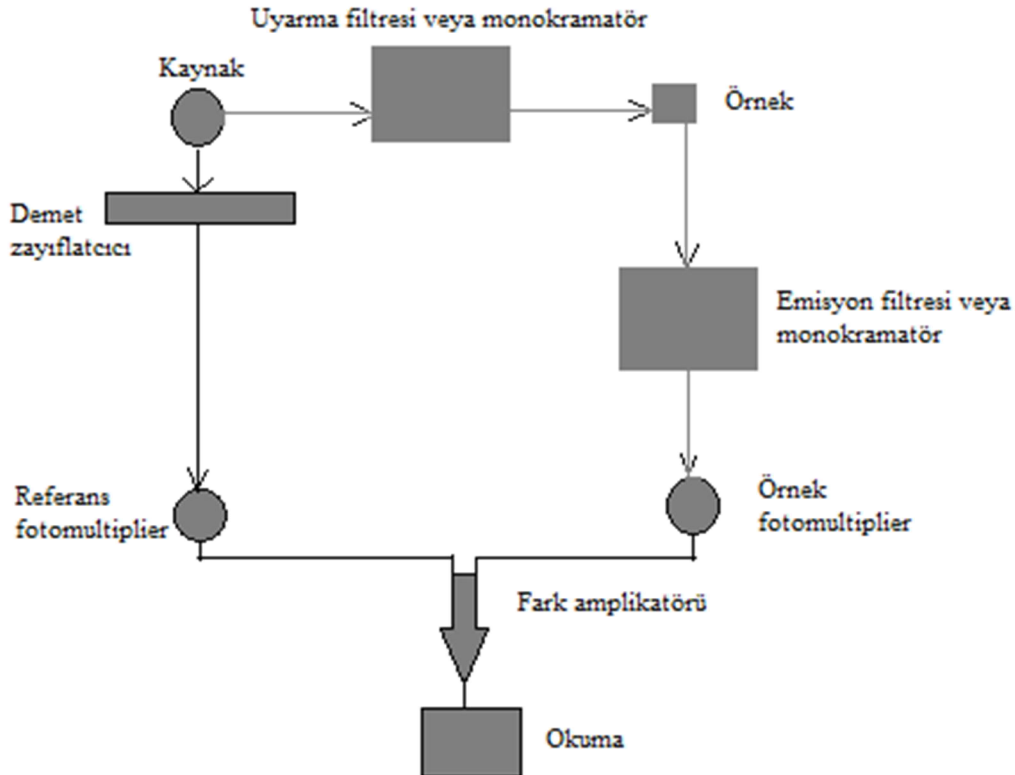
Sistem	Cevap Süresi	pH	Tayin Aralığı	LOD	Yeniden Kullanılabilirlik	Sensörün Ömrü	Kaynak
3-akrilamit fenilboronik asit ve akrilamit kopolimer (NAAPBA-co-AA)	0,02–0,10 (mL.dk ⁻¹)	7,75	0,5–16,0 mM	0,5 mM	250	-	26
Poli (3-oktiltiyofen) Au yüzey filmi (POT-Au-SAM elektrot)	-	9,0	5–30.0 mM	0.2 µM	-	-	27
Glikoz oksidaz ile kimyasal olarak modifiye edilmiş floresan türevi(GOx-FS)	0,7 (mL.dk ⁻¹)	6,5	400-2000 mg.L ⁻¹	-	>350	>3 ay	28
PVC film ile modifiye edilen oksazolon türevleri	4 dakika	7,0	1,67-26,59.10 ⁻⁵ M	0,12.10 ⁻⁵ 2,01.10 ⁻⁵ M	5	1 ay	29
Pirolitik grafit (PG) ile modifiye edilen tetraamin platin (II) klorür ve 5,10,15,20-tetrakis (4-metoksi-fenil) -21H, 23H-porfirin kobalt(II)	6 s	7.0	>2 mM	0.5 µM	4	>40 gün	30
Pullulan asetat / polietilen glikol / heparin membran	<30 s	7.4	>30 mM	-	-	-	31
Vinil fenil boronik asit-hidroksi etil metakrilat - Poli (etilen glikol) diakrilat kopolimeri P(VBPA/ PEG-DA/HEMA)	3 dakika	7.0	2.78.10 ⁻⁴ mM - 5.56.10 ⁻³ mM	0.89.10 ⁻⁵ µM	20	5 ay	Bu Çalışma

1.4. Kullanılan Cihazlar Hakkında Genel Bilgi

1.4.1. Spektrofluorometre

Bazı maddelerin çözeltileri ultraviyole veya görünür bölge ışınlarıyla uyarılınca bu ışınları absorbe ederek uyarılmış hale geçerler. Uyarılma kesildiğinde maddenin uyarılmış halden temel hale dönerken yayımladığı ışın absorbladığı ışıdan daha düşük enerjili olduğundan daha uzun dalga boyuna sahiptir. Bu şekilde uyarılma kesildikten sonra maddenin absorbladığı ışını daha uzun dalga boyunda yayımlaması floresans olarak adlandırılır [38].

Basit ve tipik bir cihaz Şekil 1.9.'da gösterilmiştir. Basit bir cihazda iki tane gratingli monokromatör vardır. Ksenon lambasından gelen ışın birinci monokromatörde dağıtılır ve örneği uyarır. Oluşan floresans ışın, ikinci monokromatörden dağıtıldıktan sonra, bir fotoselde algılanır. Okuma bir metre veya kaydedici ile yapılır. Cihaz, sadece birinci monokromatör ile, absorbans ölçmelerinde kullanılabilir [37].

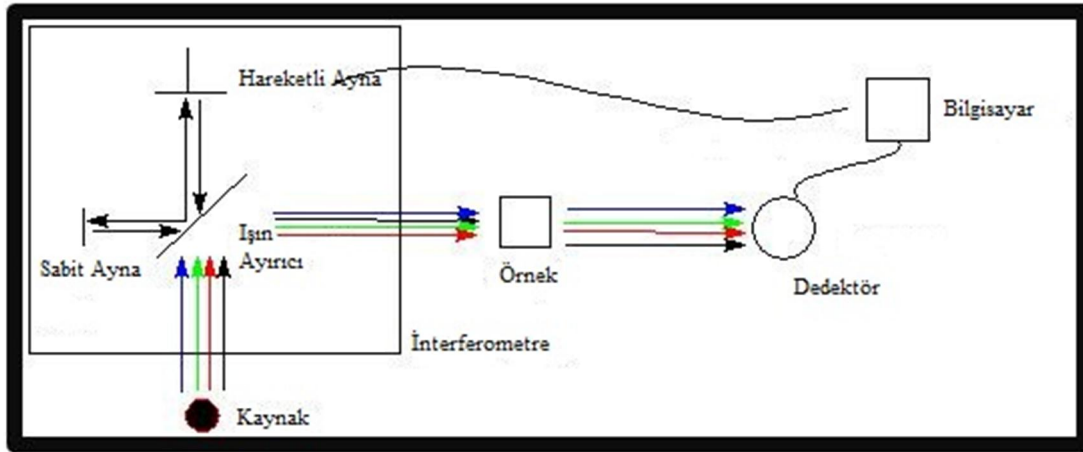


Şekil 1.9. Bir Spektrofluorometrenin Kısımları

1.4.2. ATR-FTIR spektrofotometre

Kızılötesi (IR) absorpsiyon spektroskopisi bir tür titreşim spektroskopisidir. IR ışınları molekülün titreşim hareketleri tarafından soğurulmaktadır. Matematiksel Fourier dönüşümü spektroskopisinde ışın şiddeti, zamanın bir fonksiyonu olarak alınır. Her dalga boyunu ayrı ayrı tarama gerekmeksizin hızlı ve yüksek çözünürlükte spektrumlar elde edilebilir.

ATR-FTIR Absorpsiyon bantlarının dalga boyunda azalma meydana getirilerek daha az emekle ve örnek kalınlığından bağımsız olarak soğurganlığı çok fazla olabilen farklı maddelerin spektrum analizlerine olanak sağlar [39].



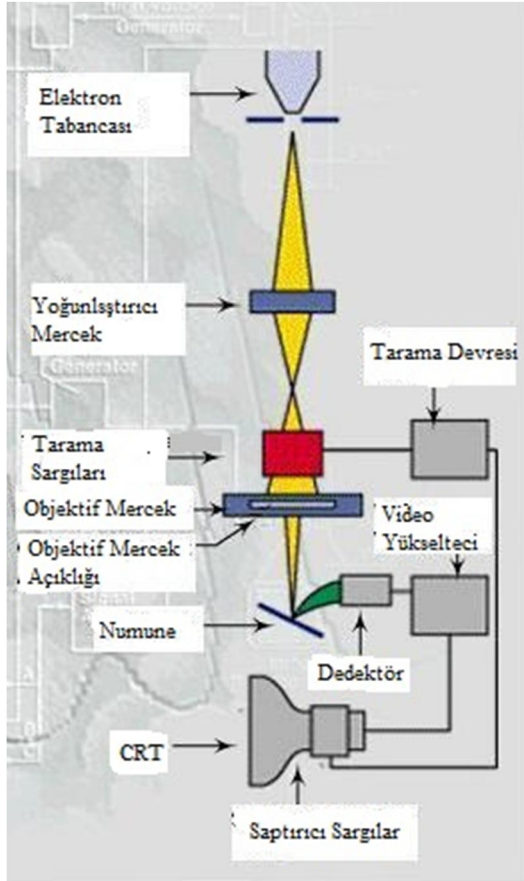
Şekil 1.10. FTIR Cihazı

Şekil 1.10.'da görüldüğü üzere ışık, ışık kaynağından ayrıldıktan sonra bir ışın ayırıcıya gelir. Burada ışın sabit ayna ve hareketli aynaya birlikte gönderilir. Daha sonra ışınlar aynadan yansıyarak yeniden ışın ayırıcıya döner. Sonra örneğin bulunduğu yere gider. Örnek ile etkileşen ışın heterokromatik yapıdadır. IR spektroskopisinde monokromatörden geçirilen bu ışın tek dalga boyuna indirilir ve monokromatik yapıya indirilir. Işın örnek ile etkileştikten sonra algılayıcılar tarafından algılanır ve bilgisayar ile ölçülebilecek anlamlı sinyallere dönüştürülür [40].

1.4.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu, örnekleri üç boyutlu inceleme imkanı sağlayan bir elektron mikroskobudur. Ayırım gücü, odak derinliği, görüntü ve analizi birleştirme özelliği taramalı elektron mikroskobunu araştırma ve incelemelerde geniş ölçüde kullanılan bir aygıt haline getirmiştir. Bunun yanında mikro işlemci ve bilgisayarların mikroskopta birlikte kullanılmaları cihaza kullanım kolaylığı sağlamıştır.

Diğer yöntemlerle çok uzun sürebilecek ayrıntılı veri toplama ve toplanan veri üzerinde yapılan istatistiksel değerlendirmelerin otomatik olarak, çok kısa zamanda tamamlanabilmesini sağlamaktadır. Böylece incelenen numunelerin yüzey özellikleri daha kesin ve daha ayrıntılı olarak görüntülenebilmektedir [32-36].



Şekil 1.11. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Bileşenleri

Taramalı Elektron Mikroskobu Optik Kolon, Numune Hücresi ve Görüntüleme Sistemi olmak üzere üç temel kısımdan oluşmaktadır (Şekil 1.11.). Optik

kolon kısmında; elektron demetinin kaynağı olan elektron tabancası, elektronları numuneye doğru hızlandırmak için yüksek gerilimin uygulandığı anot plakası, ince elektron demeti elde etmek için yoğunlaştırıcı mercekler, demeti numune üzerinde odaklamak için objektif merceğı, bu merceğı bağı çeşitli çapta apatürler ve elektron demetinin numune yüzeyini taraması için tarama bobinleri yer almaktadır. Mercek sistemleri elektromanyetik alan ile elektron demetini inceltmekte veya numune üzerine odaklamaktadır. Tüm optik kolon ve numune 10^{-4} Pa gibi bir vakumda tutulmaktadır. Görüntü sisteminde, elektron demeti ile numune girişimi sonucunda oluşan çeşitli elektron ve ışınları toplayan dedektörler, bunların sinyal çoğaltıcıları ve numune yüzeyinde elektron demetini görüntü ekranıyla senkronize tarayan manyetik bobinler bulunmaktadır [41].

BÖLÜM 2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1.Kullanılan Cihazlar

2.1.1. Spektrofluorometre

Bu tezde yapılan spektrofluorometrik analizler Varian Eclipse marka Xenon ark lamba içeren Spektrofluorometre ile yapılmıştır.

2.1.2. Ultra saf su cihazı

Yapılan deneylerde kullanılan saf su Millipore Direct-Q®- 3 Ultra Saf Su Cihazı'ndan temin edilmiştir.

2.1.3. Hassas terazi

Yapılan çalışmalardaki alınan tartımlar için (en fazla 410 gram, hassasiyet 0,0001 gram) Presica marka terazi kullanılmıştır.

2.1.4. Mikropipet

Yapılan çalışmalardaki ekstarksiyon işlemlerinde pendorph marka 1000 µL ve 100 µL hassasiyetli mikropipetler kullanılmıştır.

2.1.5. Buzdolabı

Yapılan çalışmalardaki hazırlanmış olan stok çözeltilerin ve gerçek kan örneklerin saklanması için Ariston marka buzdolabı kullanılmıştır.

2.1.6. pH-metre

Hazırlanan çözeltilerin ve örneklerin pH ölçümleri WTW marka pH 7110 set 2 model masa üstü pH metre kullanılarak yapılmıştır.

2.1.7. Magnetik karıştırıcı

Deneylerde kullanılacak çözeltilerin hazırlanmasında karıştırma işlemi IKA marka RH Basic 2 model magnetik karıştırıcı kullanılmıştır.

2.1.8. UV lamba

Çalışmalarda kullanılacak polimer karışımın sertleştirilerek jel haline getirilmesinin sağlanması için OSRAM (300 W, $\lambda_{\text{max}}=365$ nm) UV lamba kullanılmıştır.

2.1.9. Vakum etüvü

Sentezlenmiş olan polimerik membranın kurutma işleminin gerçekleştirilmesi için vakum etüvü kullanılmıştır.

2.1.10. ATR-FTIR spektrofotometre

Hazırlanmış olan jellerin fonksiyonel gruplarının karakterizasyonu için Perkin-Elmer marka ATR-FTIR Spektrofotometre kullanılmıştır.

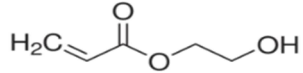
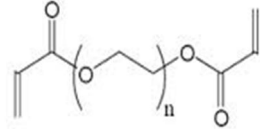
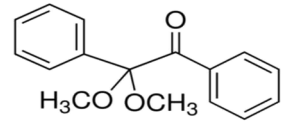
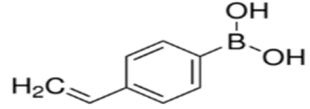
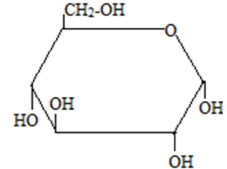
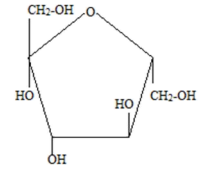
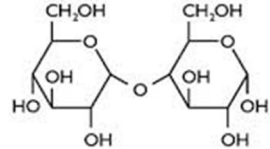
2.1.11. SEM (Taramalı elektron mikroskobu)

Hazırlanmış olduğumuz jellerin morfolojik özellikleri Philips XL30 ESEM-FEG/EDAX cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

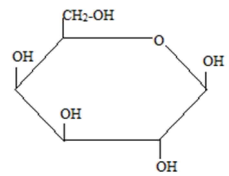
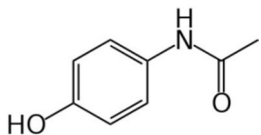
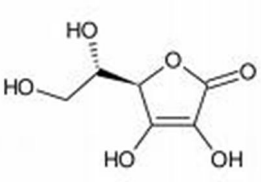
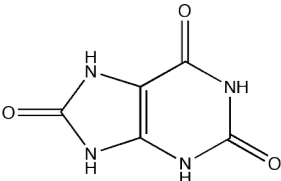
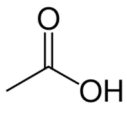
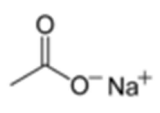
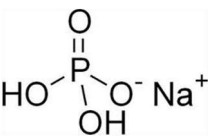
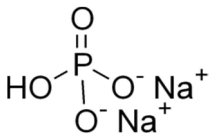
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan kimyasal maddeler Tablo 2.1’ de verilmiştir.

Tablo. 2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Madde	Katalog Numarası	Formül
Hidroksietilmetakrilat (HEMA)	Sigma 17348	
Poli(etilenglikol) diakrilat (PEG-DA)	Sigma 455008	
2,2-Dimetoksi-2-Fenilasetofenon(DMPA)	Sigma 196118	
4- Vinilfenilboronik asit (VPBA)	Sigma 417580	
Glukoz	Merck 108337.1000	
Fruktoz	Merck 105323.0250	
Maltoz		

Tablo. 2.1. “devam”

Galaktoz	Merck 104062.0050	
Parasetamol		
Askorbik asid	Merck 110023.0001	
Ürik asid		
Asetik asid	Merck M818755.2500	
Sodyumasetat		
Sodyumdihidrojenfosfat		
Disodyumhidrojenfosfat		

2.3. Yöntem

2.3.1. Kullanılan Çözeltiler

Deneylerin yapıldığı pH ortamlarının sağlanması için gerekli olan tampon çözeltiler Merck firmasından temin edilen Asetik asid (CH_3COOH), Sodyum Asetat Trihidrat ($\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Disodyum hidrojen fosfat heptahidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) kullanılarak Britton Robinson tampon sistemine göre hazırlanmıştır.

Tampon çözeltilerin hazırlanması

pH 3,0-9,0 aralığında yapılan deneylerde kullanılacak tampon çözeltiler arasında pH 3,0- 5,5 için asetat tampon çözelti sistemi, pH 5,5' in üzerindeki değerler için ise fosfat tampon sistemleri kullanılmış olup ilgili tampon çözeltilerin hazırlanması için pH'larının istenilen değere ulaşmasını sağlamak üzere kendi bileşenlerinden uygun hacimler kullanılmıştır.

Glukoz stok çözeltisi

0,05 gram glukoz 500 mL saf su içinde çözünerek $5,56 \cdot 10^{-1}$ mM'lık glukoz stok çözeltisi elde edilmiştir.

Uygun pH değerini bulmak üzere hazırlanan glukoz ara çözeltileri

Glukoz stok çözeltisinden alınan her bir 0,1 mL glukoz çözeltisi;
100 mL pH 3,0 tamponu ile seyreltilerek $5,56 \cdot 10^{-4}$ mM'lık glukoz ara çözeltisi elde edilmiştir.
100 mL pH 4,0 tamponu ile seyreltilerek $5,56 \cdot 10^{-4}$ mM'lık glukoz ara çözeltisi elde edilmiştir.
100 mL pH 5,0 tamponu ile seyreltilerek $5,56 \cdot 10^{-4}$ mM'lık glukoz ara çözeltisi elde edilmiştir.
100 mL pH 6,0 tamponu ile seyreltilerek $5,56 \cdot 10^{-4}$ mM'lık glukoz ara çözeltisi elde edilmiştir.
100 mL pH 7,0 tamponu ile seyreltilerek $5,56 \cdot 10^{-4}$ mM'lık glukoz ara çözeltisi elde edilmiştir.

100 mL pH 8,0 tamponu ile seyreltilerek $5,56.10^{-4}$ mM'lık glukoz ara çözeltisi elde edilmiştir.

100 mL pH 9,0 tamponu ile seyreltilerek $5,56.10^{-4}$ mM'lık glukoz ara çözeltisi elde edilmiştir.

Yabancı iyon etkisinin araştırılması için kullanılan çözeltiler

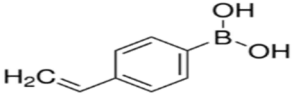
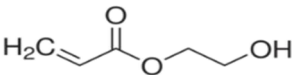
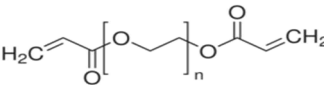
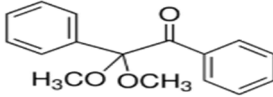
Ürik asidin kandaki sınır değeri olan 3.10^{-4} M için 0,0504 g ürik asid alınarak 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Parasetamolün kandaki sınır değeri 1.10^{-4} M için 0,0176 g parasetamol alınarak 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Askorbik asidin kandaki sınır değeri 1.10^{-4} M için 0,0151 g askorbik asid alınarak 100 ml'ye tamamlanmıştır.

2.3.2. Sensörün hazırlanması

Tablo 2.2. Sensörün Hazırlanması İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal	Formül	mmol
VPBA		0,68
HEMA		6,03
PEG-DA		0,29
DMPA		0,12

- 0,1 g vinilfenil boronik asit
- 0,7 g HEMA
- 0,2 g PEG-DA
- 0,03 g fotobaşlatıcı olan 2-2 dimetoksi 2 fenilasetofenon (DMPA)

Tüm maddeler, dışı alüminyum folyo kaplı bir beherde tabloda yazılı olan miktarlar kadar tartıldıktan sonra karışımın ağırlığının % 20' si kadar saf su ile çözünene kadar cam bagetle karıştırıldı. İçerik homojen hale geldikten sonra 40 mm× 12 mm× 2 mm (BxGxD) boyutlarındaki yuvalar içeren teflon kalıp içine bir pastör pipeti kullanılarak yerleştirilmiştir. Formülasyon kalıba aktarıldıktan sonra üzerine kalıbın kendi boyutu kadar bir polyester film yerleştirilmiş ve onun üzerine de aynı boyutta ince bir cam konulmak suretiyle 5 dakika süreyle UV lamba (300 W $\lambda_{maks.}=365$ nm) altında sertleştirme işlemi yapılmıştır. Süre sonunda kalıptan çıkarılan ürün polimerleşmeden kalan monomerlerin uzaklaştırılması için 24 saat destile su içinde bekletilmiştir. Süre sonunda su içinden alınan polimerik membranlar vakum etüvünde 30 °C' de 3 gün süreyle kurutulmuştur. Elde edilen membranların şeffaf ve herhangi bir kabarcık içermeyen homojen şekilde elde edildiği gözlemlenmiştir.

2.3.3. Sensörün karakterizasyonu

2.3.3.1. IR ölçümleri

Elde edilen polimerik membrana ait FTIR spektrumu, ATR-FTIR spektrofotometresi kullanılarak $4000\text{ cm}^{-1} - 400\text{ cm}^{-1}$ aralığında tarama yapılarak elde edilmiştir. İlgili FTIR spektrumu Şekil 3.2'de verilmiştir.

2.3.3.2. Yüzey özellikleri

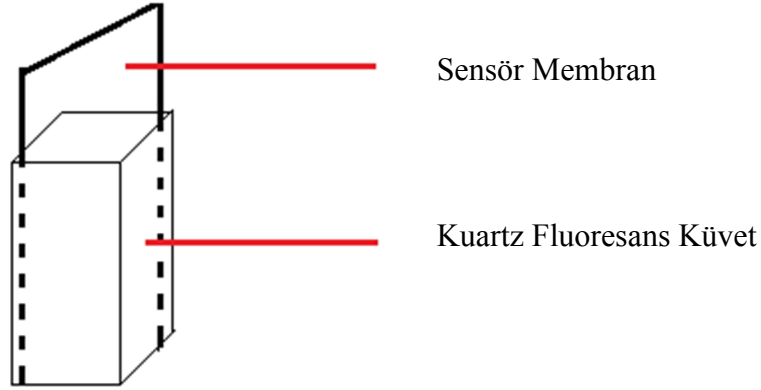
Glukoz analizinde kullanılacak olan sensörün yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak belirlenmiştir. Farklı büyütme faktörleriyle ele alınmış SEM görüntüleri şekil 3.3. ve şekil 3.4.' de verilmiştir.

2.3.4. Sensörün glukoz analizi için kullanılabilirliğinin araştırılması

2.3.4.1. Spektral karakterizasyon çalışmaları

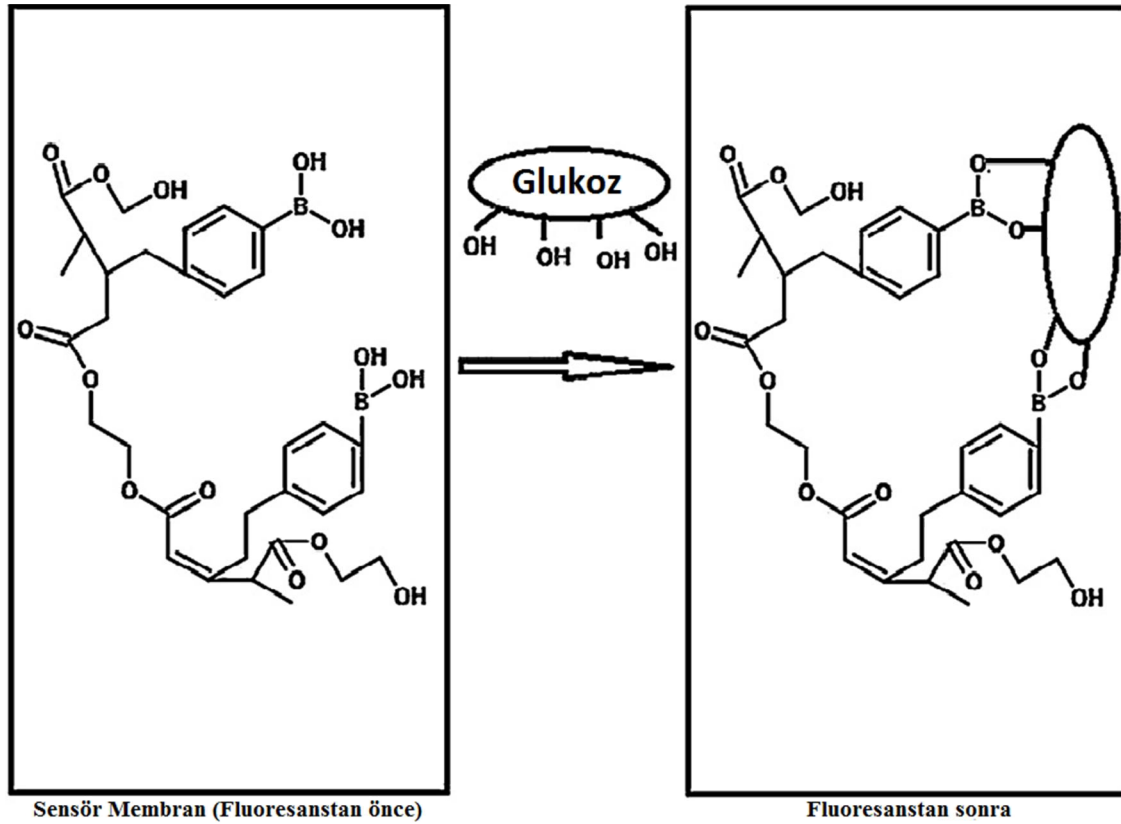
Tüm floresans ölçümleri Varian Eclips spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır. Işık kaynağı olarak Xenon kısa ark lambası kullanılmıştır. Bölüm 2.3.2.' de hazırlanmış olan jeller ölçüm küvetine şekil 2.4.'te görüldüğü üzere diagonal pozisyonda yerleştirilmiştir. Hazırlanmış olan sensörün glukozla vereceği cevabın ölçülmesi bir uyarma dalga boyuna karşılık gelen emisyon dalga boyunda floresans

şiddetinde meydana gelen artış yada azalışın belirlenmesi için farklı slit aralıkları ve farklı fotoçoğaltıcı tüp (PMT) voltajlarında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.4. Sensörün küvet içine yerleştirilmesi

Glukoz ile fenilboronik asid arasında meydana gelen bağlanma reaksiyonu Şekil 2.5.'te gösterilmiştir. Glukoz analizi için kullanılan optik sensörün ($2,78 \times 10^{-3}$ mM) glukoz çözeltisi varlığında uyarma ve emisyon dalga boyları belirlenmiş olup ilgili grafik Şekil 3.1' de gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Fenilboronik asid ve glukozda bulunan alkollerin bağlanma tepkimesi

2.3.4.2. Sensör cevabına pH etkisinin araştırılması

İlgili çalışmalar Britton Robinson (BR) tampon çözeltileri kullanılarak oda sıcaklığında pH 3,0 – 9,0 aralığında hazırlanmış olan $2,78.10^{-3}$ mM konsantrasyonundaki glukoz çözeltisi kullanılarak en uygun pH değerine karar verilmiştir.

2.3.4.3. Sensörün cevap verme süresi

Polimerik sensörün $2,78.10^{-3}$ mM konsantrasyonundaki Glukoza karşı vermiş olduğu floresans şiddetindeki değişim 10 saniye aralıklarla 30 dakika boyunca ölçülmüştür. İlgili sonuçlar Şekil 3.6 'da verilmiştir.

2.3.4.4. Sensörün rejenarasyonu ve yeniden kullanılabilirliği

Saf suyla yıkanan sensörün $2,78.10^{-3}$ mM konsantrasyondaki glukoz çözeltisine karşı vermiş olduğu floresans şiddeti ölçülerek sensörün rejenarasyonu ve yeniden kullanılabilirliği incelenmiştir.

2.3.4.5. Kalibrasyon aralığı, tespit ve tayin sınırı

Kalibrasyon grafiğini oluşturmak için bölüm 2.3.1'de hazırladığımız $5,56.10^{-1}$ mM konsantrasyonundaki glukoz çözeltisinden pH:7 tamponu ile $2,78.10^{-4}$ mM, $1,12.10^{-4}$ mM , $3,34.10^{-4}$ mM , $5,56.10^{-4}$ mM , $7,78.10^{-4}$ mM , $5,56.10^{-3}$ mM'lık çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin ayrı ayrı floresans şiddeti ölçülerek kalibrasyon grafiği çizilmiş olup ilgili grafik Şekil 3.7'de gösterilmiştir.

2.3.4.6. Sensörün ömrü

5 Ay boyunca karanlıkta, desikatör içinde saklanan sensörün $2,78.10^{-3}$ mM konsantrasyonundaki glukoz çözeltisine karşı floresans şiddeti farklı zaman aralıklarında ölçülerek sensörün kullanım ömrü belirlenmiştir.

2.3.4.7. Girişim yapan maddelerin etkileri

Hazırlanan sensörün karar verilen şartlarda elde edilen floresans spektrumu üzerine biyolojik sıvılarda girişim etkisi yapabilecek olan ürik asid, parasetamol,

askorbik asid, maltoz, galaktoz ve fruktozun etkileri araştırılmış olup ilgili sonuçlar Talo 3.1.'de verilmiştir.

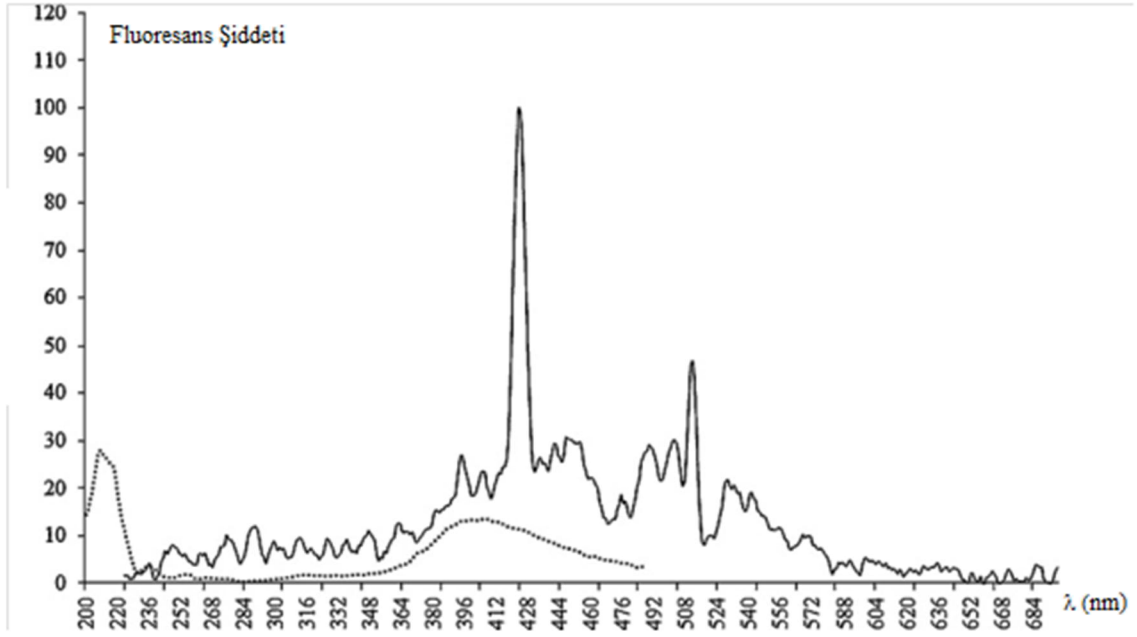
2.3.5. Sensörün analitik uygulamaları: gerçek örnekte glukoz analizi

Biyolojik sıvı olarak kullanacağımız, kandaki glukoz tayini için 6 sağlıklı bireye ait, glukoz değerleri özel hastane koşullarında belirlenmiş kanlar alınmıştır. Kan serumundaki glukoz konsantrasyonunun sensörün doğrusal çalışma aralığına getirilmesi için seyreltildikten sonra karar verilen en uygun şartlarda önerilen yöntemle analizi yapılmıştır.

BÖLÜM 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Sensörün Spektral Karakterizasyon Çalışmaları

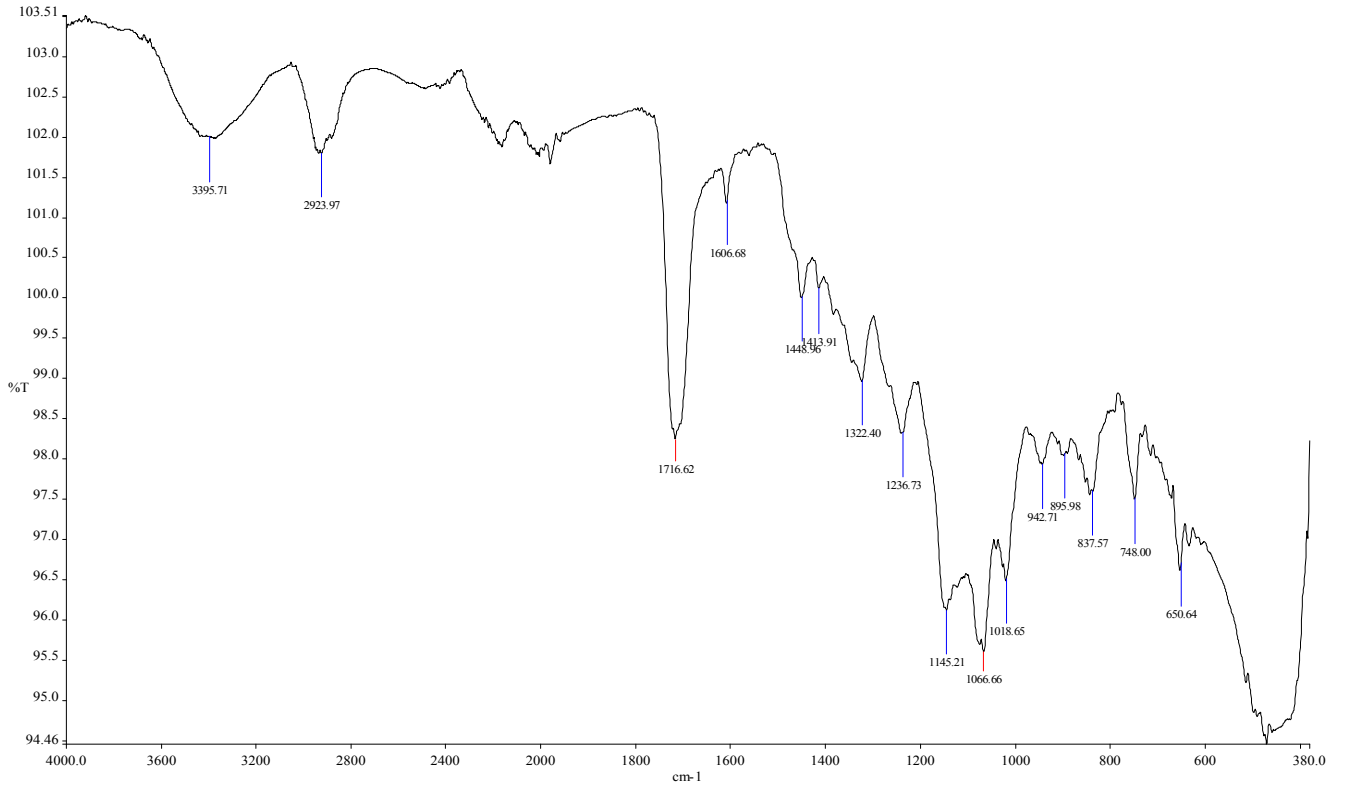
Sensörün $2,78.10^{-3}$ mM glukoz çözeltisi varlığında floresans şiddeti dalga boyuna karşı ölçülmüş ve elde edilen spektrum taramasını gösterir grafik şekil 3.1’de verilmiştir. Grafikte de görüldüğü gibi λ_{uy} : 211 nm λ_{em} : 424 nm olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Uyarma ve emisyon dalga boyu taraması ($2,78.10^{-3}$ mM glukoz varlığında)

3.1.1. IR ölçümleri

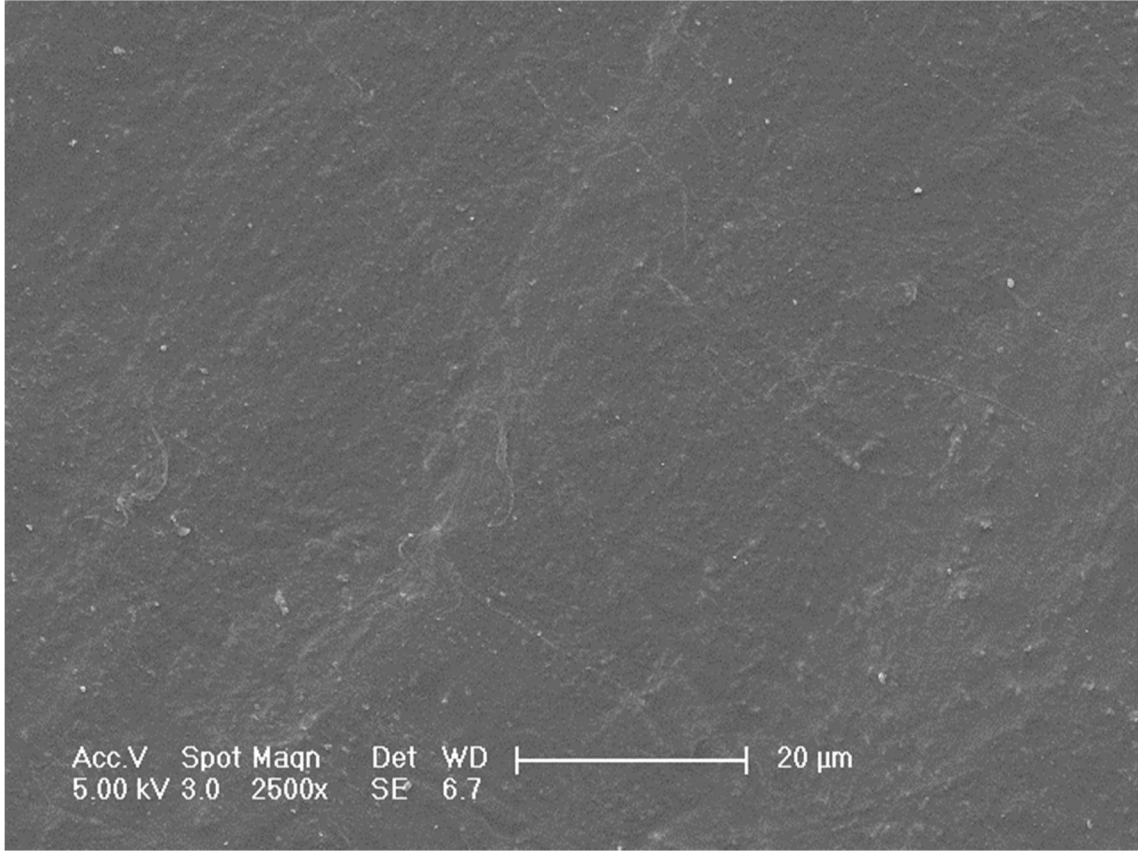
FTIR spektrumunda 4000 cm^{-1} - 400 cm^{-1} dalga boyları aralıklarında yapılan tarama sonucunda kaydedilen polimerik membranın fonksiyonel grupları Şekil 3.2' de verilmiştir. Sonuçlara göre 3395 cm^{-1} da bulunan pik HEMA' nın hidroksil grubunu, 2923 cm^{-1} deki pik C-H bandını ve güçlü olan 1716 cm^{-1} daki keskin pik ise karbonil grubunun varlığını göstermektedir.



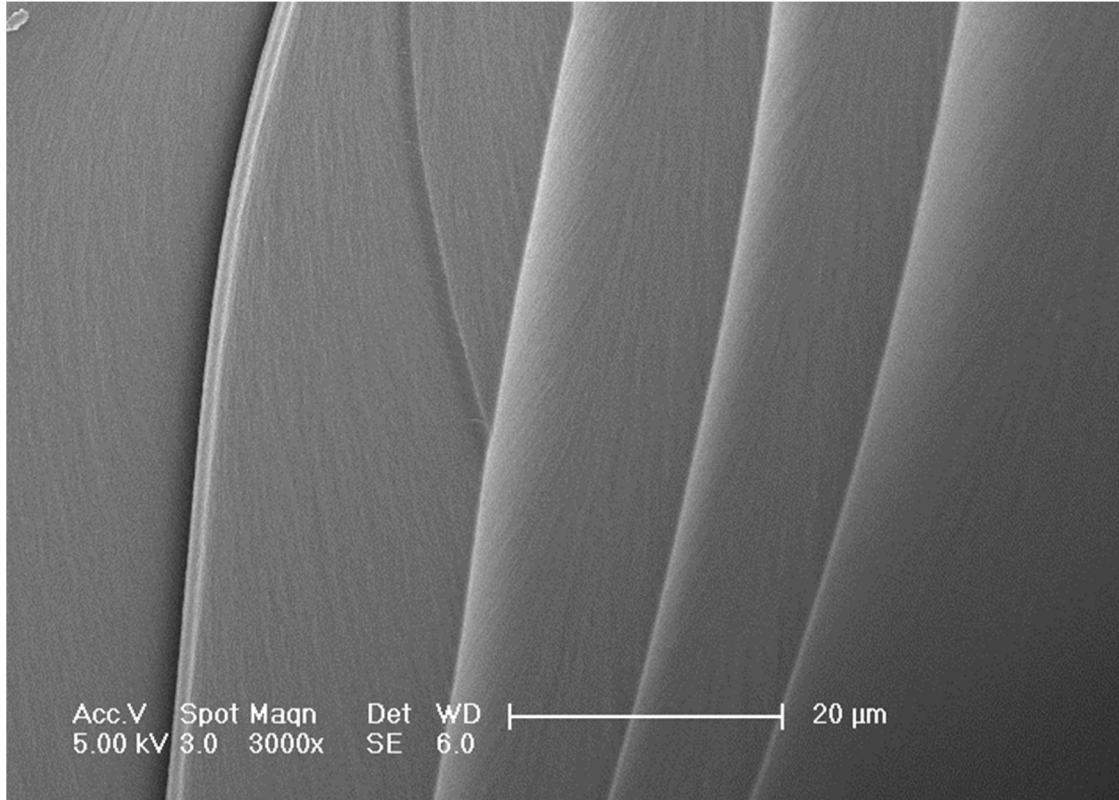
Şekil 3.2. Sensörün FTIR analizi

3.1.2. Yüzey özellikleri

Polimerik membranın yüzey morfolojisi $2500\times$ - $3000\times$ kat büyütme faktörleriyle gözlemlenmesi sonucunda homojen ve çatlaksız olduğunu gösteren SEM görüntüleri Şekil 3.3, ve Şekil 3.4'te verilmiştir.



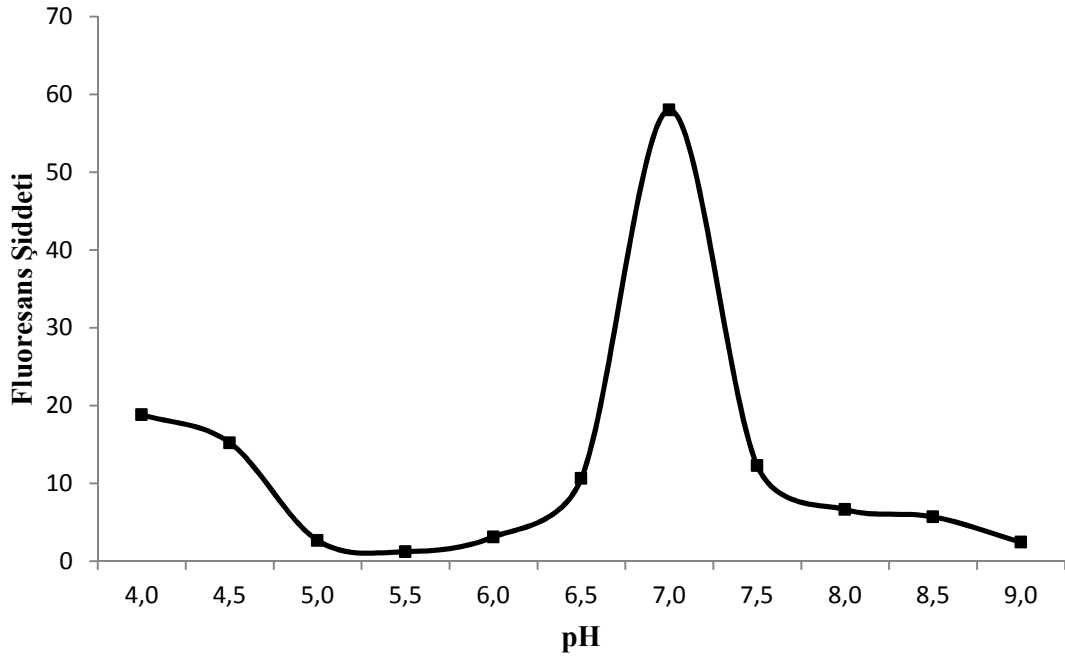
Şekil 3.3. Glukoz sensör membranının SEM görüntüsü (2500 kat büyütülmüş)



Şekil 3.4. Glukoz sensör membranının SEM görüntüsü (3000 kat büyütülmüş)

3.2. Sensör Cevabına pH Etkisinin Araştırılması

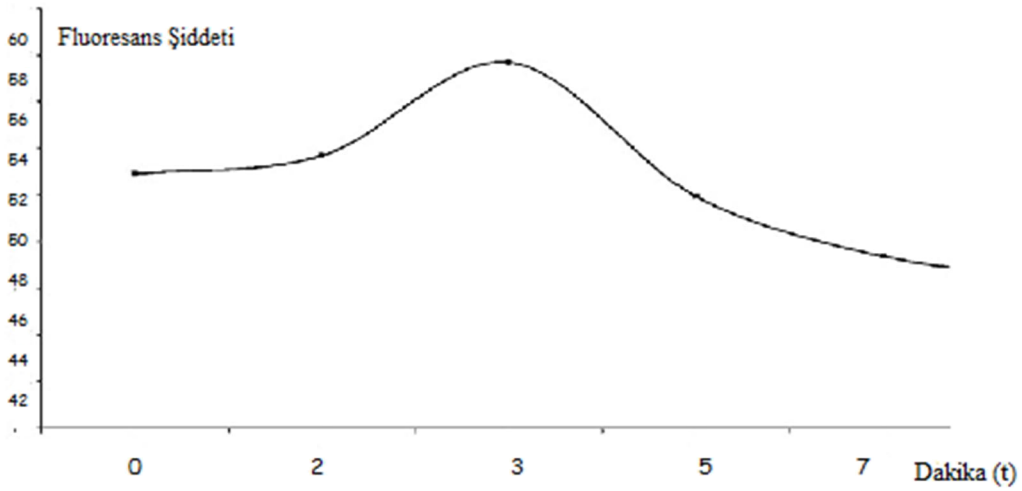
Britton Robinson tampon çözeltileri kullanılarak oda sıcaklığında pH değerleri 3,0 - 9,0 aralığında ve $2,78.10^{-3}$ mM glukoz konsantrasyonunda ayrı ayrı hazırlanmış çözeltilerle yapılan çalışmalar sonucunda 6,5 – 7,5 aralıklarındaki pH değerlerinde floresans şiddetinin artış gösterdiğini, pH değeri 7'den fazla olduğunda ise floresans şiddetinde Şekil 3.4 'te görüldüğü gibi azalma meydana geldiği belirlenmiş, maksimum floresans şiddetine pH: 7 de ulaşıldığından çalışmanın ilerleyen bölümlerinde pH: 7 tampon sistemi kullanılmıştır.



Şekil 3.5. Floresans – pH grafiği

3.3. Sensörün Cevap Verme Süresi

$2,78.10^{-3}$ mM konsantrasyonundaki glukoz çözeltisine karşı sensörün floresans şiddetinin zamana karşı ölçülmesiyle elde edilen grafik şekil 3.6 da verilmiştir. Grafikten görüldüğü gibi maksimum floresans şiddetinin elde edildiği değer olan 3. dakika çalışmanın devam eden aşamalarında floresans şiddeti ölçümlerinin yapılacağı süre olarak belirlenmiştir.



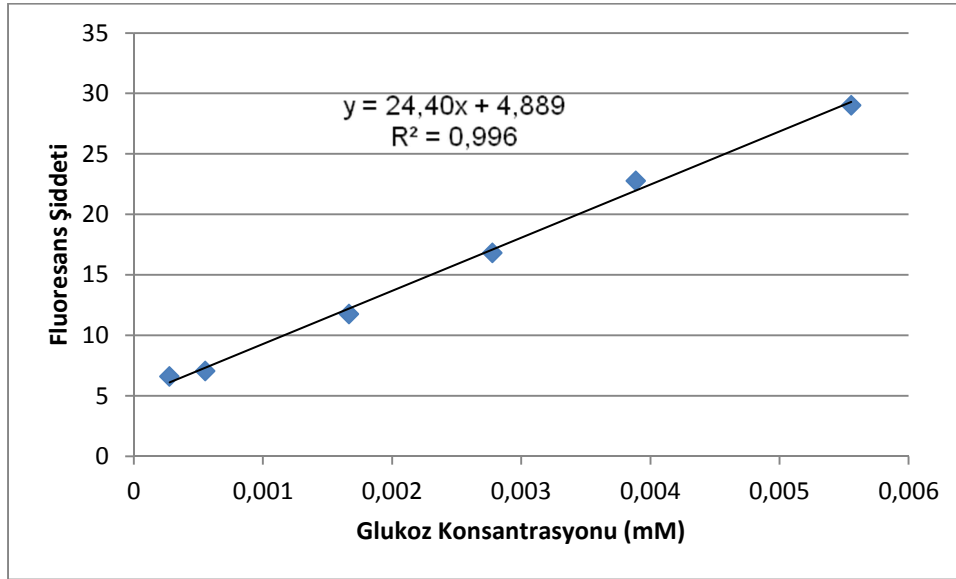
Şekil 3.6. Sensörün Cevap Verme Süresi

3.4.Sensörün Rejenarasyonu ve Yeniden Kullanılabilirliği

Sensörün rejenerasyonu için sadece saf su kullanılarak 3 dakikalık bir yıkama ile başlangıçtaki floresans şiddetinin elde edilebilir olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda bu şekilde tek bir membran sensörün 20 defa kullanılabildiği tespit edilmiştir (%95 güven aralığı, n=7)

3.5.Kalibrasyon Aralığı, Tespit ve Tayin Sınırları

Kalibrasyon grafiğinin oluşturulabilmesi amacıyla hazırlanmış olan glukoz içeren çözeltilerin konsantrasyonlarına karşılık değişen floresans şiddetlerinin grafiğe aktarılmasıyla en uygun çalışma aralığı olarak $2,78.10^{-4}$ mM ve $5,56.10^{-3}$ mM konsantrasyon aralığı belirlenmiş olup ilgili grafik şekil 3.7.' de gösterilmiştir. $5,56.10^{-3}$ mM glukoz çözeltisi konsantrasyonundan daha büyük konsantrasyonlarda grafiğin doğrusallığı bozulmakta olup bu değerler grafikte gösterilmemiştir. Yönteme ait tespit ve tayin sınırlarının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada $5,56.10^{-3}$ mM konsantrasyonlarında hazırlanmış glukoz içeren pH: 7 tampon çözeltisindeki 6 farklı çözeltiyle yapılan çalışmada tespit ve tayin sınırları sırasıyla $0,89.10^{-5}$ mM ve $3,17.10^{-3}$ mM olarak hesap edilmiştir.



Şekil 3.7. : Glukoz tayini için oluşturulan optik sensör membranın kalibrasyon eğrisi
(λ uy/em =211 nm/ 424 nm)

3.6.Sensörün Ömrü

Sensörün kararlılığının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda desikatörde karanlık bir ortamda bekletilen ve belirli zamanlarda sensörün karar verilen en uygun şartlarda gerçekleştirilen floresans şiddeti ölçüm sonuçlarında başlangıç değerinden $\pm\%5$ değişim göstermediği süre 5 ay olarak belirlenmiştir.

3.7.Girişim Yapan Maddelerin Etkileri

$2,78.10^{-3}$ mM konsantrasyonuna sahip glukoz çözeltisine belirli oranlarda yabancı iyonların ilavesiyle hazırlanan çözeltilerin floresans şiddetleri ölçülmüştür. Floresans şiddetlerinde yabancı iyon içermeyen çözeltinin floresans şiddetinde $\pm\%5$ değişikliğe sebep olan yabancı iyonların kabul edilebilir üst limitleri Tablo 3.1' de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Girişim yapabilecek maddelerin kabul edilebilir üst limitleri ($2,78.10^{-3}$ mM glukoz konsantrasyonu varlığında)

Yabancı Madde	Kabul Edilebilir Üst Limit (mM)
Ürik Asid	0,01
Askorbik Asid	0,01
Parasetamol	0,01
Maltoz	$4,38.10^{-3}$
Fruktoz	$5,56.10^{-3}$
Galaktoz	$5,56.10^{-3}$

3.8. Sensörün Analitik Uygulamaları: Gerçek Örnekte Glukoz Analizi

Gerçek değerleri önceden ölçülmüş olan 5 ayrı kan serumu alınarak kabul edilen ölçüm şartlarında hazırlanmış olan kalibrasyon grafiği aralığına girebileceği bir konsantrasyona seyreltildikten sonra şahit olarak $2,78.10^{-3}$ mM konsantrasyonunda glukoz çözeltisi kullanılarak gerçek kan örneklerinin analizi yapılmıştır. Tüm sonuçlar incelendiğinde sensör membran ile yapılan çalışmada bağıl hata tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Gerçek Kan Örneğinde Glukoz Analizi

Örnek No	Gerçek değer (mg/mL)	Analiz Değeri (mg/mL)	Bağıl Hata (%)
1	79,00	77,28	2,18
2	82,00	81,72	0,34
3	88,00	83,89	4,67
4	116,00	112,07	3,39
5	105,00	100,18	4,59
6	112,00	108,98	2,70

Tablodaki veriler incelendiğinde sensör membran ile yapılan çalışmada bağıl hata oldukça düşük olarak elde edilmiş olup bu sensörün gerçek numunelerdeki glukoz miktarının belirlenmesinde tercih edilebilir olduğunu göstermiştir.

BÖLÜM 4. SONUÇLAR

Yaptığımız çalışmada glukoz iyonunun analizi için floresans veren yeni bir optik sensör geliştirilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarla kıyaslandığında geliştirdiğimiz yöntemin seçiciliği yüksek, daha hızlı, daha hassas, ekonomik ve yüksek performansa sahip ve aynı zamanda kullanılan materyalin kolay hazırlanabildiği bir yöntem olduğu gözlemlenmiştir.

Elde edilen sonuçları maddeler halinde sıralayacak olursak;

- ✓ Sensör olarak kullanılacak polimerik membran kimyasallardan, PEG-DA, HEMA, VPBA, DMPA kullanılarak UV ışık altında sertleştirilerek elde edilmiş olup 5 dakika gibi kısa bir sürede hazırlanmıştır.
- ✓ Polimerik membranın yüzey morfolojisi incelendiğinde homojen, pürüzsüz, gözeneksiz ve çatlaksız bir yapıya sahip olduğu görülmüştür.
- ✓ Spektral karakteristikler incelendiğinde sensörün 211 nm uyarma dalga boyunda ve 424 nm emisyon dalga boyunda floresans şiddeti verdiği ve glukoz varlığında floresans şiddetinin arttığı gözlemlenmiştir.
- ✓ Sensörün glukoz varlığında maksimum floresans şiddetine ulaştığı pH değerinin 7 olduğu ve cevap verme süresinin de 3 dakika olduğu bulunmuştur.
- ✓ Sensörün rejenerasyonu amacıyla sadece saf su ile yapılan 3 dakikalık bir yıkama işleminin yeterli olduğu görülmüştür. Aynı zamanda tek bir membranın 20 kez kullanılabildiği gözlenmiştir.
- ✓ Sensörün çalışma aralığı olarak $2,78.10^{-4}$ mM - $5,56.10^{-3}$ mM glukoz konsantrasyonu bulunmuş olup tespit ve tayin sınırları sırasıyla $0,89.10^{-5}$ mM ve $3,17.10^{-3}$ mM olarak hesaplanmıştır. (n=7, %95 güven aralığında).
- ✓ Sensörün 5 ay boyunca kararlı bir şekilde saklanabildiği ve bu süre zarfında başlangıçtaki floresans şiddetinde anlamlı bir değişme olmadığı görülmüştür.
- ✓ Sensörün seçiciliğinin belirlenmesi amacıyla girişim yapabilecek iyonların kabul edilebilir üst limitleri Askorbik Asid, parasetamol ve ürik asid için 0,1 mM, maltoz için $4,38.10^{-3}$ mM, galaktoz ve fruktoz için $5,56.10^{-3}$ mM olarak bulunmuştur.
- ✓ Geliştirilmiş olan sensörün gerçek örneklerle uygulanabilirliği gerçek kan örnekleri üzerinde denenmiş olup klinik sonuçlarıyla kıyaslandığında % 0,34 -

% 4,67 hata aralığında sensörün gerçek örneklere uygulanabilir olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak geliştirdiğimiz yöntem seçiciliği yüksek, kolay hazırlanabilir analiz materyali, hızlı, hassas, güvenilir ve ekonomik bir yöntem olup bu alanda gerçekleştirilen sınırlı sayıdaki çalışmalara katkı sağlamakla birlikte alternatif olarak da bu konuda yapılacak diğer çalışmalara yol gösterici mahiyettedir.

Çalışmamızdan elde edilen çalışma verileri “Development of photopolymerized fluorescence sensor for glucose analysis” adıyla Sensors & Actuators B adlı derginin 2013 yılı 181. Cildinin 187. – 193. Sayfalarında yayınlanmıştır.

KAYNAKLAR

- 1- Zhai, J., Cui, H., Yang, R. (1997), DNA based biosensors *Biotechnology Advances*, 15, 43-58.
- 2-Conroy, P.J., Hearty, S., Leonard, P., O’Kennedy, R.J. (2009), Antibody production, design and use for biosensor-based applications, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20: 10-26.
- 3-Serra, B., Zhang, J., Morales, M.D., Guzman-Vanquez de Prada, A., Reviejo, A.J., Pingarron, J.M. (2008), A rapid method for detection of catalase-positive and catalase-negative bacteria based on monitoring of hydrogen peroxide evolution at a composite peroxidase biosensor, *Talanta*, 75: 1134-1139.
- 4-Gooding, J.J. (2002), Electrochemical DNA hybridization biosensors, *Electroanalysis*, 14(17), 1149-1156.
- 5-D’Souza, S.F. (2001), Microbial biosensors *Biosensors & Bioelectronics*, 16: 337–353.
- 6- Eggins, B.R. (2002), *Chemical sensors and Biosensors*, John Wiley&Sons Ltd, West Sussex, England.
- 7-Buerk, D.G. (1993), *Biosensors: Theory and Applications*, CRC Press, USA
- 8-DİNÇER, E. *Listeria Monocytogenes’in Elektrokimyasal Sensör Sistemleri İle Belirlenmesi*. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye, 27-30.
- 9- ÖZCAN, Ö (2011) Kablosuz sensör ağları için PIC tabanlı sensör düğümü tasarımı. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, Türkiye, 1-2.

- 10-BEKTAŞOĞLU, E. (2011) Ligand Değişimine Dayanan Dimetoat Baskılı Polimerlerin Katı Faz Ekstraksiyonu ve Potansiyometrik Sensör Uygulamaları. Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir,Türkiye, 45-49.
- 11-J. Stetter and W. Penrose., (2002), Understanding Chemical Sensors and Chemical Sensors Arrays; Past, Present and Future, *Sensors Update*, Vol 10, 189-229.
- 12-<http://www.obitet.gazi.edu.tr/obitet/sensorler/algilayici.htm>
- 13-Gooding JJ, *Analytica Chimica Acta*, 559 (2006); sayfa:137
- 14-Shah J ve Wilkins E, *Electroanalysis*; 15, 3 (2003); sayfa: 157-167
15. New York, A. (1991) Glucose and glucose containingsyrup, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, **VCH Publishers**, 12: 457-475.
- 16.Alegret, S.,Dominguez, C., Munoz, J., (1997) Glucose biosensors based on a reagentless graphite-epoxy screen-printable biocomposit, ***Sensors and Actuators B***, 45: 55-62.
- 17.Sljukia, B.,Banks, C.E., Salter, C., Crossiey, A., (1995) Electrochemicall polymerized composites of multiwalled carbon nanotubes and poly (vinylferrocene) and their use as modified electrodie, ***Application to glucose sensing***, *Analyst*, 131: 670-677.
- 18.T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake, and S. Shinkai, (1994) A glucose –selective molecular fluorescence senso, *Angew, Chem. Int. Ed.*, 33, 2207-2209.
- 19.T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake, R. Iguchi, and S. Shinkai, (1995) Novel Saccharide-Photoinduced Electron Transfer Sensors Based on the Interaction of Boronic Acid and Amin, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 8982-8987.

20. M. Bielecki, H. Eggert, J. C. Norrild, (1999). A fluorescent glucose sensor binding covalently to all five hydroxy groups of alpha-D-glucofuranose. A reinvestigation, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2, 449-455

21. N. Dicesare and J. R. Lakowicz, (2001) Evaluation of two synthetic glucose probes for fluorescence-lifetime based sensing, *Anal. Biochem.*, 294, 154-160

22. N. Dicesare and J. R. Lakowicz, (2002) Chalcone-analogue fluorescent probes for saccharides signaling using the boronic acid group, *Tetrahedron Letters*, 43, 2615-2618

23. W. Yang, H. He, D. G. Drueckhammer, (2001) Computer-guided design in molecular recognition: Design and synthesis of a glucopyranose receptor, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40, 1714-1718

24. Spichiger-Keller, U.E. (1998) , Chemical sensors and biosensors for medical and biological applications, *Verlog Chemie*, Weinheim, 455

25. [http://www.hbogn.meb.gov.tr/Karbonhidratların özellikleri 2 Haziran 2006](http://www.hbogn.meb.gov.tr/Karbonhidratların_özellikleri_2_Haziran_2006)

26. C. Thammakhet, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, (2011) Development of an oncolumn affinity smart polymer gel glucose sensor, *Analytica Chimica Acta* 695 105–112.

27. H. C, iftc, i, U. Tamer, (2012) Functional gold nanorod particles on conducting polymer poly(3-octylthiophene) as non-enzymatic glucose sensor, *Reactive and Functional Polymers* 72 127–132.

28. V. Sanz, J. Galban, S. Marcos, J.R. Castillo, (2003) Fluorometric sensors based on chemically modified enzymes. Glucose determination in drinks, *Talanta* 60 415–423.

29. G. Ozturk, S. Timur, S. Alp, (2008) SENSORS, Optical determination of glucose with glucose oxidase immobilized in PVC together with fluorescent oxazol-5-one derivatives, *Analytical Letters* 41 608–618.

30. L.X. Su, F. Xu, T. Okada, (1998) Studies on optimization of a platinum catalyst and porphine modified, pyrolytic graphite, amperometric, glucose sensor by sequential level elimination experimental design, *Talanta* 47 1165–1174.

31. W.J. Sung, K. Na, Y.H. Bae, (2004) Biocompatibility and interference eliminating property of pullulan acetate/polyethylene glycol/heparin membrane for the outer layer of an amperometric glucose sensor, *Sensors and Actuators B* 99 393–398.

32. Agematsu H, Sawada T, Watanabe H, Yanagisawa T, Ide Y. (1997) Immuno-scanning electron microscope characterization of large tubules in human deciduous dentin. *Anat Rec*, 248(3): 339-345,.

33. Al-Nazhan S. (2004) SEM observations of the attachment of human periodontal ligament fibroblasts to non-demineralized dentin surface in-vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 97(3): 393-397,.

34. Babay N. (2001) SEM study on the effect of two different demineralization methods with saturated tetracycline hydrochloride on diseased root surfaces. *J Contemp Dent Pract*, 15: 25-35,.

35. Breschi L, Gobbi P, Chersoni S, Mazzotti G, Prati C. (2003) Effects of different acid and sodium hypochlorite treatments on dentin collagen: a FEISEM analysis. *Am J Dent*, 16: 77-81

36. Breschi L, Gobbi P, Falconi M, Ruggeri A Jr, Mazzotti G, Di Lenarda R, Prati C. (2003) Effect of dentinal pretreatments on coronal dentin primary carious lesions: a field emission SEM study. *Clin Oral Investig*, 7(3): 140-147,.

37- http://www.bayar.edu.tr/besergil/10_BOLUM_7.pdf

38- <http://www.mhilmieren.com/ensII4.pdf>

39-<http://www.derilkim.com/urunler/analitik-cihazlar/ftir-spektrometresi/ftir-spektroskopi-nedir/>

40- <http://biyokure.org/fourier-transform-infrared-kizilotesi-spektroskopisi-ftir/5696/>

41-<http://www.selcukiltek.com/equipment-105-sem-taramali-elektron-mikroskobu.aspx>

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Pınar PARLATICI
Doğum Yeri ve Tarihi : Üsküdar/1986
Yabancı Dili : İngilizce
E-Posta : destina_pinar@hotmail.com

Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite/Lise	Mezuniyet Yılı
Lise	Sayısal	Üsküdar Çamlıca Kız Lisesi	2003
Üniversite	Kimya	Balıkesir Üniversitesi	2010
Y. Lisans	Analitik Kimya	Marmara Üniversitesi	2014

MAKALE/DERLEME

ÇUBUK, S., KAHRAMAN, M. V., YETİMOĞLU, E. K., DEMİRBİLEK, P. & FIRLAK, M. (2013). Development of photopolymerized fluorescence sensor for glucose analysis. *Sensors & Actuators: B. Chemical*. Sayı -. Cilt 181 sf 187-193

KONGRE/SEMPOZYUM

YETİMOĞLU, E. K. & Fırlak, S. Ç. M. V. K. S. K. M. (2013). *UV Cured Boronic Acid Based Fluorescence Sensor For The Determination Of Glucose* 11th International Conference on Chemical & Process Engineering. Milano, Italya