



**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**YÜKSEK LİSANS**

**CAMSI KARBON ELEKTROT YÜZEYİNE MODİFİYE  
EDİLMİŞ NAFYON / GRAFEN OKSİT NANOKOMPOZİT  
FİLM İLE BİLİRUBİNİN VOLTAMETRİK TAYİNİ**

**Asiye Aslıhan AVAN**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Analitik Kimya Programı**

**Danışman**

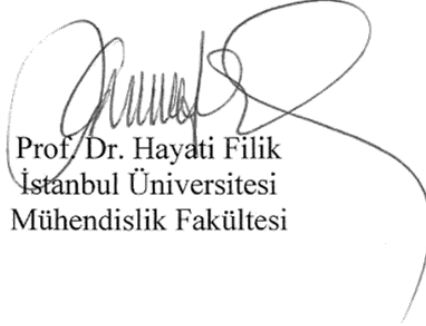
**Prof. Dr. Hayati FİLİK**

**Aralık, 2014**

**İSTANBUL**

Bu çalışma 10/12/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi:**



Prof. Dr. Hayati Filik  
İstanbul Üniversitesi  
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Reşat APAK  
İstanbul Üniversitesi  
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Esma TÜTEM  
İstanbul Üniversitesi  
Mühendislik Fakültesi



Doç. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN  
İstanbul Üniversitesi  
Mühendislik Fakültesi



Doç. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU  
Marmara Üniversitesi  
Fen Edebiyat Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin 37163 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Hoşgörüsü, samimiyeti, engin bilgisi ve tecrübesiyle yüksek lisans çalışmalarım süresince danışmanım olarak, her zaman beni yönlendiren, yol gösteren her konuda desteğini gördüğüm, değerli hocam *Prof. Dr. Hayati FİLİK' e*

Tez çalışmalarım boyunca desteğini ve güler yüzünü esirgemeyen bir dönem danışmanlığımı üstlenen sevgili hocam *Doç. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ'e*

Deneysel çalışmalarımda kullandığım maddeyi sentezleyen değerli hocalarım Prof. Dr. İsmail BOZ ve Doç. Dr.Serkan Naci KOÇ'a

Yaşamımın her anında yanımda olan, beni sabırla ve sevgiyle yetiştiren, sevgilerini ve başarıma olan inançlarını her zaman hissettiren, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen babam *Halil AVAN*, annem *Leman AVAN*, kardeşlerim *Şule AVAN ÖNSEL* ve *Aslı Neslihan AVAN' a*,

Yüksek lisans öğrenimim süresince yardımlarını esirgemeyen, sevgi ve destekleriyle her zaman yanımda olan çok değerli arkadaşlarım *Sevda AYDAR ve Gamze Çetintaş'a*

Çalışmamın uygulama kısmını destekleyen *İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'*ne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aralık,2014

Asiye Aslıhan Avan

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

|                                                              |      |
|--------------------------------------------------------------|------|
| ÖNSÖZ.....                                                   | i    |
| İÇİNDEKİLER.....                                             | ii   |
| ŞEKİL LİSTESİ.....                                           | iv   |
| TABLO LİSTESİ.....                                           | vi   |
| SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ .....                              | vii  |
| ÖZET.....                                                    | viii |
| SUMMARY.....                                                 | x    |
| 1. GİRİŞ.....                                                | 1    |
| 2. GENEL KISIMLAR .....                                      | 4    |
| 2.1 BİLİRUBİN.....                                           | 4    |
| 2.1.1. Diazobilirubin Yöntemi ile Bilirubin Tayini.....      | 5    |
| 2.2 GRAFEN.....                                              | 6    |
| 2.3. ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLER.....                          | 7    |
| 2.3.1. Voltametrik Metodlar.....                             | 8    |
| 2.3.1.1. Döngülü voltametri (CV) .....                       | 9    |
| 2.3.1.2. Kare dalga voltametrisi (SWV) .....                 | 10   |
| 2.3.1.3. Kronoamperometri (CA).....                          | 11   |
| 2.3.1.4. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) ..... | 12   |
| 2.4. ER-GO’NUN AVANTAJLARI .....                             | 12   |
| 3. MALZEME VE YÖNTEM.....                                    | 14   |
| 3.1. CİHAZLAR.....                                           | 14   |
| 3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE ÇÖZELTİLER .....        | 14   |
| 3.2.1. Bilirubin Çözeltisi.....                              | 14   |
| 3.2.2. Dopamin Çözeltisi .....                               | 14   |
| 3.2.3. Ürik Asit Çözeltisi .....                             | 14   |
| 3.2.4. Tokoferol Çözeltisi .....                             | 15   |
| 3.2.5. Askorbik Asit Çözeltisi.....                          | 15   |
| 3.2.6. Nafyon Çözeltisi .....                                | 15   |

|                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.7. Grafen Oksit Çözeltisi.....                                   | 15        |
| 3.2.8. Diazo Bilirubin Yönteminin Çözeltileri:.....                  | 15        |
| 3.3. SERUM ÖRNEĞİNİN HAZIRLANMASI .....                              | 15        |
| 3.4. ELEKTRODUN HAZIRLANMASI .....                                   | 16        |
| 3.5. PROSEDÜR.....                                                   | 16        |
| 3.6. DİAZO BİLİRUBİN YÖNTEMİNİN SERUM ÖRNEĞİNE UYGULANIŞI.....       | 17        |
| <b>4. BULGULAR.....</b>                                              | <b>18</b> |
| 4.1. SEM KARAKTERİZASYONU.....                                       | 18        |
| 4.2. ELEKTROKİMYASAL EMPEDANS KARAKTERİZASYONU .....                 | 18        |
| 4.3. NAFYON / GRAFEN OKSİT MİKTARI ETKİSİ .....                      | 19        |
| 4.4. ÇÖZÜCÜ ETKİSİ .....                                             | 21        |
| 4.5. BİLİRUBİNİN ELEKTROKİMYASAL DAVRANIŞI.....                      | 21        |
| 4.6. TARAMA HIZININ ETKİSİ.....                                      | 22        |
| 4.7. SÜLFÜRİK ASİT ETKİSİ.....                                       | 25        |
| 4.8. KARE DALGA PAREMETRELERİNİN ETKİSİ .....                        | 26        |
| 4.9. ANALİTİK PARAMETRELER .....                                     | 26        |
| 4.10. GİRİŞİM ETKİSİ .....                                           | 27        |
| 4.11. TEKRARLANABİLİRLİK, TEKRAR KULLANILABİLİRLİK VE STABİLİTE..... | 28        |
| 4.12. ANALİTİK UYGULAMALAR.....                                      | 28        |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>                                    | <b>29</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                                                | <b>31</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>                                                | <b>36</b> |

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

|                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1: Bilirubin. ....                                                                                                                                                                                                                                                               | 4  |
| Şekil 2.2: Bilirubinin asidik ortamda diazonyum tuzuyla vermiş olduğu azobilirubin reaksiyonu.....                                                                                                                                                                                       | 6  |
| Şekil 2.3: Elektroanalitik Yöntemlerin Sınıflandırılması.....                                                                                                                                                                                                                            | 8  |
| Şekil 2.4: Döngülü voltametrde potansiyelin uygulanması.....                                                                                                                                                                                                                             | 10 |
| Şekil 2.5: Kare dalga voltametrinde potansiyelin uygulanması.....                                                                                                                                                                                                                        | 11 |
| Şekil 2.6: Kronoamperometride çalışma elektrotuna uygulanan potansiyelin zamanla değişim grafiği. ....                                                                                                                                                                                   | 11 |
| Şekil 4.1: ER-GO film (A), Nafyon/ER-GO filmin (B) SEM görüntüsü.....                                                                                                                                                                                                                    | 18 |
| Şekil 4.2: Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) temiz yalın GCE (a), Nafyon/GCE (b) ve Nafyon/ER-GO/GCE (c) $5,0 \times 10^{-3}$ M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ (1:1) ve 0,1 M KCl içeren çözelti ortamında, genlik 5mV; frekans aralığı: $1 \times 10^5$ Hz – 0,01 Hz..... | 19 |
| Şekil 4.3: Nafyon/GO oranının 50µM BR'nin pik akımları üzerine etkisi. ....                                                                                                                                                                                                              | 20 |
| Şekil 4.4: GCE yüzeyine damlatılan 1:5 oranındaki Nafyon/GO miktarının 50µM BR'nin pik akımları üzerine etkisi. ....                                                                                                                                                                     | 20 |
| Şekil 4.5: 50µM BR nin 0,05 M $\text{H}_2\text{SO}_4$ içeren farklı çözücülerdeki döngülü voltamogramları DMSO (a), DMF (b), Etanol (c) ve Aseton (d). ....                                                                                                                              | 21 |
| Şekil 4.6: 0,05 M $\text{H}_2\text{SO}_4$ içeren aseton ortamında $50 \text{ mV s}^{-1}$ tarama hızında 50µM BR in yalın GCE (a), Nafyon/GCE (b) ve Nafyon/ ER-GO/GCE (c) nin döngülü voltamogramları. ....                                                                              | 22 |
| Şekil 4.7: Nafyon/ER-GO/GCE ile 0,05M $\text{H}_2\text{SO}_4$ li aseton ortamında 50 µM BR'nin farklı tarama hızlarındaki döngülü voltamogramları. Tarama hızları; 10, 25, 50, 100, 150, 200 ve $250 \text{ mV s}^{-1}$ . ....                                                           | 23 |
| Şekil 4.8: Pik akımının tarama hızına bağlı değişim grafiği(A). $E_p$ ve $\log v$ arasındaki ilişki(B) ....                                                                                                                                                                              | 24 |
| Şekil 4.9: BR'in oksidasyonunun reaksiyon mekanizması. ....                                                                                                                                                                                                                              | 24 |
| Şekil 4.10: $\text{H}_2\text{SO}_4$ konsantrasyonunun pik akımına etkisi sırasıyla; 0,01, 0,03, 0,05, 0,1 ve 0,15 M. ....                                                                                                                                                                | 25 |

**Şekil 4.11:** Nafyon/ER-GO/GCE ile 0,05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren aseton ortamında 2, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 µM BR in kare dalga voltamogramları. BR konsantrasyonuna karşı pik akım grafiği (a). .....27

## TABLO LİSTESİ

|                                                                              | Sayfa No |
|------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>Tablo 4.1:</b> Serum Örneklerinin Bilirubin İçeriği.....                  | 28       |
| <b>Tablo 5.1:</b> Bilirubin sensörlerinin performans karşılaştırmaları ..... | 29       |

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

| Simgeler              | Açıklama                 |
|-----------------------|--------------------------|
| <b>E</b>              | : Potansiyel             |
| <b>E<sub>pa</sub></b> | : Anodik Pik Potansiyeli |
| <b>I<sub>pa</sub></b> | : Anodik Pik Akımı       |
| <b>R<sub>ct</sub></b> | : Yük Transfer Direnci   |
| <b>v</b>              | : Tarama Hızı            |

| Kısaltmalar          | Açıklama                                          |
|----------------------|---------------------------------------------------|
| <b>AC</b>            | : Alternatif Akım                                 |
| <b>Ag/AgCl</b>       | : Gümüş / Gümüş Klorür                            |
| <b>AsOx</b>          | : Askorbat Oksidaz                                |
| <b>AuNp</b>          | : Altın Nanopartikül                              |
| <b>BOx</b>           | : Bilirubin Oksidaz                               |
| <b>BR</b>            | : Bilirubin                                       |
| <b>BSA</b>           | : Bovine Serum Albumin                            |
| <b>CA</b>            | : Kronoamperometri                                |
| <b>CV</b>            | : Döngülü Voltametri                              |
| <b>DMF</b>           | : Dimetilformamid                                 |
| <b>DMSO</b>          | : Dimetil sülfoksit                               |
| <b>EIS</b>           | : Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi         |
| <b>ER-GO</b>         | : Elektrokimyasal Olarak İndirgenmiş Grafen Oksit |
| <b>GCE</b>           | : Camsı Karbon Elektrot                           |
| <b>GO</b>            | : Grafen Oksit                                    |
| <b>MWCNT</b>         | : Çok Duvarlı Karbon Nanotüp                      |
| <b>O<sub>x</sub></b> | : Oksidan                                         |
| <b>R</b>             | : Redüktan                                        |
| <b>SEM</b>           | : Taramalı Elektron Mikroskobu                    |
| <b>SWV</b>           | : Karedalga Voltametrisi                          |

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### CAMSI KARBON ELEKTROT YÜZEYİNE MODİFİYE EDİLMİŞ NAFYON / GRAFEN OKSİT NANOKOMPOZİT FİLM ile BİLİRUBİNİN VOLTAMETRİK TAYİNİ

Asiye Aslıhan AVAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

**Danışman : Prof. Dr. Hayati FİLİK**

Nafyon / Elektrokimyasal olarak indirgenmiş grafen oksit (Nafyon / ER-GO) nanokompozit modifiye camsi karbon elektrot (GCE) ile bilirubin tayinine duyarlı bir elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir. Nafyon / ER-GO modifiye camsi karbon elektrotla destek elektrolit olarak 0,05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren aseton ortamında bilirubin (BR)'in elektrokimyasal davranışı incelendi. Yalın GCE ile karşılaştırıldığında geliştirilen entegre sensör ile bilirubinin katalitik oksidasyonunda analitik performansını arttırdığı görülmüştür. Bilirubinin elektrokimyasal davranışı Nafyon / ER-GO modifiye camsi karbon elektrot üzerinde döngülü voltametri (CV) ve kare dalga voltametrisi (SWV) ile incelenmiştir. Döngülü voltametride, Nafyon / ER-GO modifiye camsi karbon elektrotta BR nin yükseltgenme pik akımı yalın camsi karbon elektroda göre 2 kat daha fazla bulunmuştur. Optimum şartlarda, BR için kalibrasyon eğrisi, iki lineer aralık gösterdi: ilk lineer aralık 2,0 - 20 µM ve ikinci lineer aralık ise 70 µM kadar çıkmıştır. Dedeksiyon limiti SWV kullanılarak 0,84 µM (0,049 mg dL<sup>-1</sup>) olarak

bulunmuştur. Son olarak, önerilen yöntem serum örneklerinde bilirubin tayininde başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Aralık 2014, 47 Sayfa.

**Anahtar kelimeler:** Bilirubin, voltametri, grafen, biyomolekül, serum analizi.

## **SUMMARY**

**M. Sc. THESIS**

### **ELECTROCHEMICAL SENSOR for VOLTAMMETRIC DETERMINATION of BILIRUBIN BASED on NAFION/GRAPHENE OXIDE NANOCOMPOSITE FILM GLASSY CARBON ELECTRODE**

**Asiye Aslıhan AVAN**

**İstanbul University**

**Institute of Graduate Studies in Science and Engineering**

**Department of Chemistry**

**Supervisor : Prof. Dr. Hayati FİLİK**

A sensitive electrochemical sensor for the determination of bilirubin (BR) at the Nafion-electrochemically reduced graphene oxide (Nafion/ER-GO) nanocomposite modified glassy carbon electrode (GCE) was presented. The electrochemical oxidation behaviors of bilirubin at the Nafion/ER-GO modified glassy carbon electrode were studied in acetone 0.05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> containing as the supporting electrolyte. Compared with bare GCE, the proposed integrated sensor showed improved analytical performance characteristics in catalytic oxidation of bilirubin. The electrochemistry of BR on Nafion/ER-GO modified glassy carbon electrodes were studied by cyclic voltammetry (CV) and square-wave voltammetry (SWV). In cyclic voltammetric responses, the oxidation peak current of BR obtained at the Nafion/ER-GO modified glassy carbon electrode was 2 times greater than that of bare glassy carbon electrode. At optimized conditions, the calibration curve for BR showed two linear segments: the first linear segment increased from 2.0 to 20 and second linear segment increased up to 70  $\mu$ M. The detection limit was determined as 0.84  $\mu$ M (0.049 mg dL<sup>-1</sup>) using SWV. Finally, the proposed method was successfully used to determine bilirubin in serum samples.

December 2014, 47 Pages.

**Keywords:** Bilirubin, voltammetry, graphene, biomolecule, serum analysis.

## 1. GİRİŞ

Bilirubin hem metabolizmasının son ürünüdür. Serbest olan hem toksiktir, hem oksijenaz tarafından tetrapireol halkasının ayrılması yoluyla parçalanır. Bilirubin hem içeren proteinlerden, eritrositlerden ve diğer kaynaklardan her gün vücut ağırlığının kilogramı başına yaklaşık 4 mg kadar üretilmektedir. Bilirubin vücutta konjuge (direkt) bilirubin ve ankonjuge (indirekt) bilirubin olmak üzere iki şekilde bulunur. İndirekt bilirubin suda çözünmez, suda çözünabilir formu olan direkt bilirubine dönüşmesi için karaciğere taşınması gerekir. Yetişkinlerde kandaki normal bilirubin düzeyi  $10^{-5}$ - $10^{-6}$ M arasındadır. Vücutta bilirubin miktarı albüminin bağlama kapasitesini aştığında fazla serbest bilirubin çeşitli dokulara bağlanarak birikir ve özellikle beyinde zararlı etkilere neden olur. Klinik kimyada bilirubin analizi yetişkinlerde ve yeni doğan bebeklerde hemolitik hastalıkların teşhis ve tahmininde önemlidir. [1- 4]

Klinik örneklerde bilirubin tayini için birçok yöntem geliştirilmiştir. Klinik laboratuvarlarında çok sayıdaki örneklerin bilirubin tayininin hızlı bir şekilde yapılabilmesi için analiz cihazları kullanılmaktadır. Kan serumundaki bilirubinin tayini için en çok UV-vis spektrofotometri yöntemi kullanılır. Burada diazolama yöntemi ile bilirubinin porfirin halkaları ile diazo bileşiğinin oluşturduğu renkli azobilirubin bileşiği spektrofotometrik olarak ölçülür. Fakat bu analitik metodlarda hassasiyet düşüktür ve bazı maddelerle girişim olmaktadır. Son yıllarda BR tayininde duyarlılık ve seçiciliğin artırıldığı kromatografik ve enzimatik yöntemler geliştirilmiştir. Ancak bu yöntemler karmaşıktır ve uygulama alanları sınırlıdır. BR elektroaktif bir bileşiktir ve çoğu elektroanalitik teknik ile seçici, oldukça duyarlı, daha kısa sürede gerçekleşebilen, ucuz, geniş çalışma aralığına sahip olması ve hızlı cevap vermesi nedeniyle BR tayini için elektrokimyasal teknikler yukarıda belirtilen yöntemlere güçlü bir alternatif olarak kabul edilebilir. Bunlar yaygın olarak kan serum örneklerinde BR tayininde kullanılır [5-7] BR nin sulu çözeltideki elektrokimyasal davranışı da tanımlanmıştır [8-11]. Ancak araştırmalar sulu çözelti içinde BR'nin çözünürlüğünün ve kararlılığının sınırlı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle bilirubinin elektrokimyasal oksidasyonu

dimetilformamid/dimetilsülfoksit (DFA/DMSO) gibi susuz çözücüler içinde camsı karbon elektrot ile döngülü voltametrde çalışılmıştır [12-15] . Buna ek olarak, yalın GCE de BR'in elektrokimyasal oksidasyon davranışları destek elektrolit olarak % 1(v / v) 1-bütıl-3-metil- hekşafıorofosfat ([bmim] [PF<sub>6</sub>]) (yani iyonik sıvı) içeren DMF ile çalışılmıştır [16]. Son zamanlarda, elektrokimyasal olarak bilirubin oksidaza (BOx) dayalı amperometrik biyosensörler üretilmiş ve bilirubin analizine uygulanmıştır [17; 18]. Shoham ve ark. tarafından yeni bir yaklaşım geliştirilmiştir. Enzim elektrot, 3-merkaptopropiyanat esterinin altın yüzeyine bağlanarak oluşturduğu tek tabaka üzerine bilirubin oksidaz tabakalarının kovalent bağlanması ile hazırlanmıştır [19]. Kannana ve ark. tarafından bilirubin oksidaz (BOx) immobilasyonu için altın nanopartikül içeren sol-jel ağı üretilmiştir [20]. Ancak BOx enzimi çok kolay denaturasyona (37 °C'de 17 h' te %50 aktivitesini kaybetmiştir) uğradığından kararsız bir enzimdir, bu nedenle biyosensör cihazlarında bu biyokataliz sınırlı bir uygulamaya sahiptir. BOx pahalı bir enzimdir bu yüzden BOx'a alternatif maddeler gereklidir.

Klemm ve ark. tarafından; BOx enzimi BSA ile çapraz bağlanarak gluteraldehit ilavesiyle birlikte önceden aktive edilmiş membran yüzeyine tutturulmuş ve oksijen elektrot ile bilirubinin enzimatik tayini yapılmıştır [21].

Diğer bir bilirubin sensörü Rahman ve ark. tarafından PolyTTCA–Mn(II) kompleksi ve askorbat oksidaz (AsOx) içeren polyethylenimin (PEI) ince filmi kullanılarak geliştirilen amperometrik biosensörüdür [22]. Ortamdaki askorbat oksidaz (AsOx) biyolojik elektroaktif bileşiklerin (askorbik asit ve dopamin) eliminasyonu için kullanılmış ve AsOx kullanılmasıyla elektrokimyasal sensöre (PolyTTCA–Mn(II)) seçimlilik özelliği kazandırılmıştır.

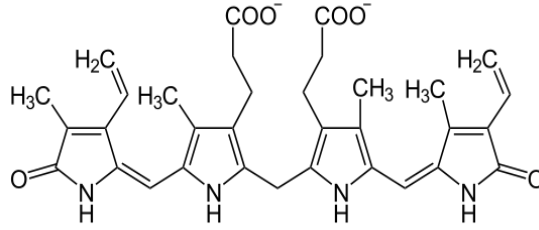
Grafenin kendine özgü özellikleri onu nanomateriyale dayalı biyosensörlerde kullanımı için uygun bir aday yapmıştır. Grafenin önemli özellikleri elektrokimyasal biosensörlerin hızlı gelişmesini sağlamıştır, optik biyosensörlerin yanı sıra grafen-metal nanopartiküller ile de performansı arttırılmıştır [23]. Yeni bir çalışmada, Feng ve ark., MWCNT-COOH / Grafen / AuNP kompozit ile bilirubin biyosensörü geliştirmişlerdir. Bu biyosensörün elektrokimyasal davranışı incelenmiş ve sonuçlar MWCNT-COOH / Grafen / AuNP kompozitin yüksek iletkenliğe sahip olduğunu göstermiştir [24].

Geliştirdiğimiz Nafyon / ER-GO nanokompozit film modifiye GCE, asetaminofen ve kafeik asidin tayininde kullanılmıştır [25, 26]. Bu çalışmada, Nafyon / ER-GO nanokompozit film modifiye edilmiş GCE kullanılarak 0,05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren aseton çözeltisi içinde BR'in elektrokimyasal tayini yapıldı. Kare dalga voltametri yöntemi bu çalışmada kan serum örneklerinde BR'in hassas tayininde kullanılmıştır. Modifiye edilmemiş camı karbon elektrot ile karşılaştırıldığında, Nafyon / ER-GO modifiye elektrot BR'in oksidasyon pik akımlarını artırmaktadır. Ancak pikler hemen hemen aynı potansiyellerde bulunmaktadır. Bildiğimiz kadarıyla ilk kez Nafyon / ER-GO / GCE kullanılarak bilirubine duyarlı bir voltametrik sensör geliştirilmiştir.

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1 BİLİRUBİN

Bilirubin, alyuvarlara rengini veren hemoglobin gibi hemoproteinlerin yıkımı sonucu meydana gelen bir üründür. Günlük toplam bilirubin üretimi 250-300 mg kadardır. Bilirubinin büyük bir kısmı 120 günlük bir süre sonunda dolaşım ömrü dolan yaşlı eritrositlerin çoğunlukla dalakta olmak üzere kanda parçalanmasıyla açığa çıkan hemoglobinin bilirubine dönüşmesiyle oluşur. Hemoglobinin vücutta yıkıldığında hem ve globin yapı elemanlarına ayrışır. Protein kısmı olan globin, amino asitlere dahil olurken tetrapireol halkasından oluşan hem molekülü ise taşıdığı demiri kaybederek, hem oksijenaz ve biliverdin redüktaz tarafından bilirubin oluşturmak amacıyla yıkılır [27].



Şekil 2.1: Bilirubin.

Hem'den bir molekül CO' in ayrılmasıyla önce yeşil renkli biliverdin oluşur, biliverdin redüktaz enzimi yardımıyla da bilirubine dönüşür. Oluşan bilirubin ankonjuge formdadır ve indirekt bilirubin olarak isimlendirilir. Bilirubinin konjuge olmamış ve bağlanmamış formu toksik olan kısımdır. Albuminle bağlanma toksisiteyi azaltır. Suda çözünemediği için albumine bağlanarak karaciğere taşınır. Karaciğerde glukuronik asid transferaz enziminin katalizlediği reaksiyonla, bilirubin glukuronik asidle konjuge olarak suda çözünebilir hale gelir ve safraya geçerek bağırsağa atılır. Karaciğerde konjuge olmuş olan bu bilirubine direkt (konjuge) bilirubin adı verilir. İndirekt bilirubinden daha az toksiktir. Buradan bağırsaklara ulaşan bilirubin bağırsak bakterileri tarafından indirgenerek ürobilinojene dönüştürülür. Bunun bir kısmı karaciğere ulaşır ve yeniden safraya geçerek bağırsaklara atılır. Bir kısmı dışkı ile atılır ve sterobilinojen

olarak adlandırılır, emilip sistemik dolaşıma geçen küçük bir kısmı ise idrarla atılır. Böylece kanda bilirubin düzeyi düşük tutulur [28-30].

Normalde, sadece konjuge bilirubin idrarla atılır ve yalnızca eser miktarda tespit edilebilir. Normal bilirubin düzeyi  $1.0 \text{ mg dL}^{-1}$  ( $18 \text{ } \mu\text{M}$ )’den daha azdır. İdrarda bilirubin varlığı karaciğer hasarı veya hastalığına işaret edebilir.

Bilirubinin güçlü bir antioksidan ve etkili bir peroksi radikal süpürücüdür [31]. Serum bilirubininin kardiyovasküler hastalıklar ile ters orantılı bir ilişki sergilediği ve serum bilirubinin yüksek konsantrasyonlarının özellikle akciğer kanseri riskini azaltabildiği görülmüştür [32 , 33]. Bununla birlikte, yüksek konsantrasyonlarda bilirubin toksik olabilir. Hiperbilirubinemi kanda bilirubin konsantrasyonunun yüksek olması nedeniyle meydana gelen bir hastalıktır. Yüksek konsantrasyonda bilirubin oluşması hemoglobinin anormal olarak çevresel bozunmasından ve hemolizden kaynaklanmaktadır [34].

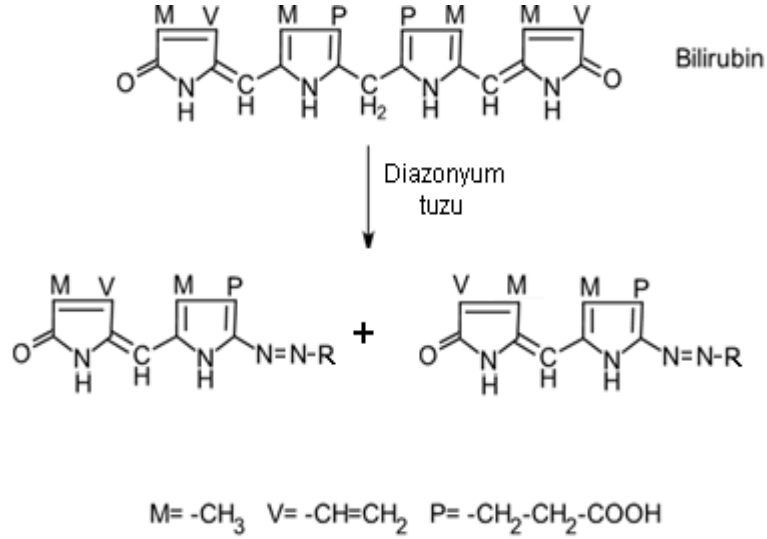
Yenidoğanlarda plazmadaki düşük albumin seviyesi, düşük bağlanma oranı, olgunlaşmamış safra salgısı ve bakteri florasının olmaması nedenleri ile daha çok hemoglobin birikmesi sonucu hiperbilirubinemi görülmektedir [35].

Kanda bilirubinin artması sonucu deri sarı renk alır ve buna sarılık adı verilir. Beynin belli bölgelerinde indirekt bilirubinin depolanması sonucu ortaya çıkan nörolojik bir sendrom olan kernikterus yeni doğanlarda oluşur. Bu hastalığın yeni doğanlarda oluşmasının nedeni kan beyin bariyerinin tam olarak gelişmemesi ve bilirubinin rahatlıkla bu bariyeri aşabilmesidir. Bunun sonucunda beyin ganglionlarındaki bilirubinin etkisiyle zeka geriliği, nöbetler ve anormal refleksler oluşur. Kansız kalındığında, safra yollarının tıkanması ve karaciğer yangılı hastalıklarda kandaki bilirubin düzeyi yükselmektedir. Bu nedenle bilirubin tayini oldukça önemlidir.

#### **2.1.1. Diazobilirubin Yöntemi ile Bilirubin Tayini**

Bilirubin diazo aromatik aminler ile reaksiyona girerek merkezdeki metilen köprüsünün parçalanması ile iki izomerik azopigment oluşturur. Bilirubin ve diazo sülfanilik asit arasındaki bu reaksiyon serumdaki konjuge ve ankonjuge bilirubin konsantrasyonlarını

belirlemekte kullanılmaktadır. Bilirubinün reaksiyon mekanizması ise Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.2:** Bilirubinün asidik ortamda diazonyum tuzuyla vermiş olduğu azobilirubin reaksiyonu.

Diazo sülfanilik asid (diazo reaktifi) serumdaki konjuge bilirubinle reaksiyona girerek kırmızı mor renkli diazobilirubin bileşiğini oluşturur. Serumdaki toplam bilirubin tayini ise ortama metil alkol ilave edilerek 30 dk sonunda oluşan bu renkli diazobilirubin bileşiğinin 540 nm de spektroskopik olarak ölçülmesiyle bulunur [36].

## 2.2 GRAFEN

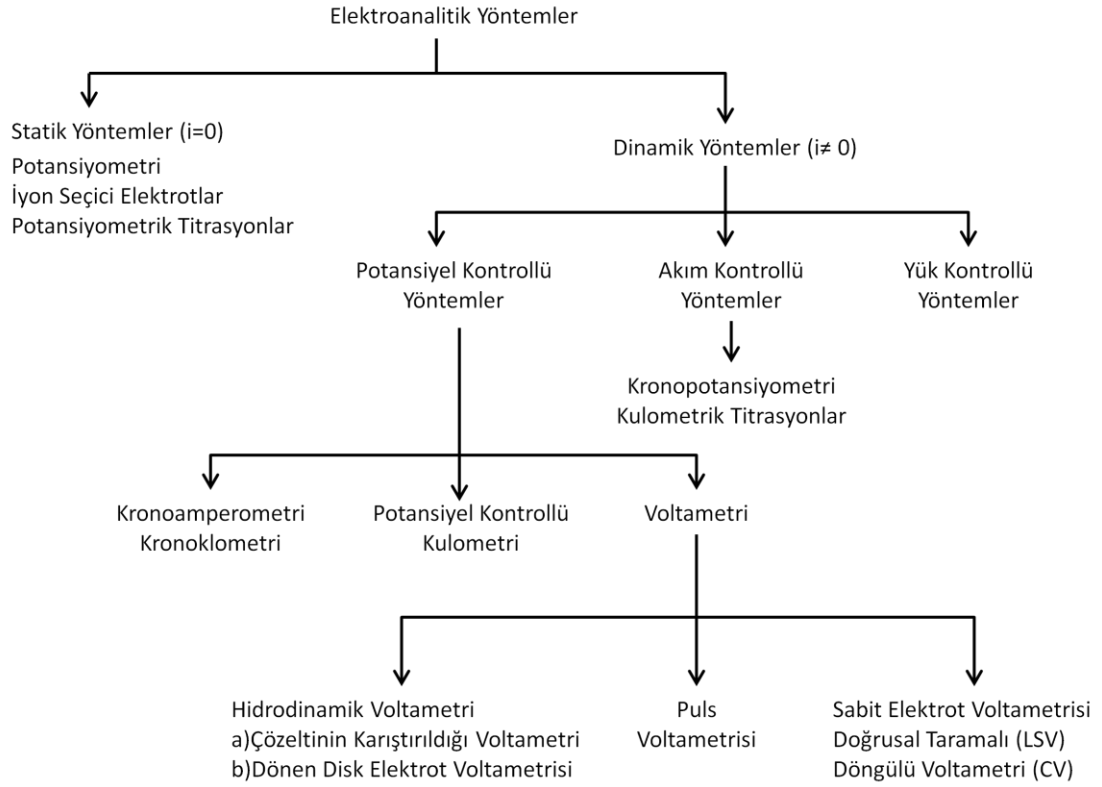
Grafen, bir karbon allotropudur ve kovalent bağ ile bağlı karbon atomlarının bal peteği kristal kafes yapısı içinde sıkıca paketlenildiği, tek atom kalınlığına sahip düzlemsel yapıdadır [37]. Önceleri tek tabaka grafit olarak adlandırılan bu malzeme daha sonraları grafen adını almıştır.

Grafen, keşfinden bu yana farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olması nedeniyle oldukça dikkat çekmiştir. Bunlar arasında grafenin yüksek termal iletkenliği, mükemmel elektriksel iletkenliği ve iki boyutlu yapısı nedeniyle geniş spesifik bir yüzey alanına sahip olması sayılabilir. Doğada iki boyutlu tek malzeme olma özelliğini taşıyan grafende elektronlar karbon tabakası içerisinde bilinen en iyi yarıiletken olan silisyumdan 100 kat daha hızlı hareket ederler. Elektronların içerisinde kolayca hareket edebiliyor olması grafeni

entegre devreler için ciddi bir alternatif malzeme haline getirmiştir. Pek çok uygulama için hafif ve maliyeti düşük yüksek performanslı kompozit malzemelerin üretilmesinde yeni bir boyut açmıştır. Elektriksel özelliklerinin yanında en küçük atomu bile geçirmeyen iki boyutlu sık kafes yapısı grafenin sensör çalışmalarında da kullanılabileceğini göstermiştir. Bu sık kafes yapısına rağmen oldukça esnek olan grafen değişik formdaki malzemeleri kaplayabilme özelliğine sahiptir. Grafen tek atom kalınlığında olmasına karşın mekanik sağlamlılığı en iyi olan malzemedir ve çelikten daha güçlüdür. Ayrıca vücuttaki iyonik sıvılarda bozunmadan kalabilmesi grafenin biyolojik alanlarda da kullanımına imkan sağlamaktadır. Tek-tabakalı yapısı ve mükemmel transfer hızıyla grafen, elektronik aygıtlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra elektroanalitik alanlarda, biyoaygıtlarda geniş ölçüde kullanılmaktadır [38, 39].

### **2.3. ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLER**

Elektrokimyasal yöntemler, maddenin analizini, indirgenme veya yükseltgenme özelliklerine göre temellendiren yöntemlerdir. Bu metotların hepsinde elektrot-çözelti sistemine elektriksel etki yapılarak sistemin verdiği cevap ölçülür. Bu cevap sistemin özellikleri hakkında bilgi verir. Genel olarak bütün elektrokimyasal tekniklerde akım, potansiyel ve zaman parametreleri bulunur ve bu parametreler tekniğin adını belirler. Mesela, voltametri, kromoamperometri ve kronokulometri gibi tekniklerde sırası ile potansiyel-akım, zaman-akım ve zaman-yük parametreleri arasındaki ilişki anlatılmaktadır [40]. Elektroanalitik metotların sınıflandırılması Şekil 2.3' te şema halinde verilmiştir [41].



**Şekil 2.3:** Elektroanalitik Yöntemlerin Sınıflandırılması.

### 2.3.1. Voltametrik Metodlar

Voltametri, bir indikatör elektrot ya da çalışma elektrotunun polarize olduğu şartlar altında akımın, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülmesine dayanan elektro analitik yöntemlere verilen isimdir. Uygulanan potansiyele karşı ölçülen akımın grafiğe geçirilmesi ile elde edilen akım-potansiyel eğrisine voltamogram denir. Genellikle polarizasyonu sağlamak için voltametrde kullanılan çalışma elektrotlarının yüzey alanı birkaç milimetrekaire ile birkaç mikrometrekaire arasında değişir [42].

Voltametrik metotlarda üçlü elektrot sistemi kullanılır.

- \* Çalışma elektrodu olarak; camsı karbon elektrot, damlayan civa elektrot, altın elektrot, platin elektrot gibi kolay polarize olan elektrotlar,
- \* Referans elektrot olarak; Ag/AgCl elektrot, standart hidrojen elektrot ve doymuş kalomel elektrot gibi belirli bir yarı hücre potansiyeline sahip olan elektrotlar,
- \* Karşıt elektrot olarak; platin elektrot ve altın elektrot gibi kolay polarize olan ve geniş yüzey alanına sahip elektrotlar kullanılır.

Üçlü elektrot sisteminde; potansiyel çalışma elektrotu ile referans elektrot arasına uygulanır, akım ise çalışma elektrotu ile karşıt elektrot arasında ölçülür. Böylece çalışma elektrodu ile referans elektrot arasından hemen hemen hiç akım geçmez. Çünkü referans elektrotun potansiyeli çok küçük akımlarda sabit olup akım arttığında potansiyeli sabit kalmaz. Başka bir ifadeyle referans elektrot polarize olmaz. Üçlü elektrot sisteminin kullanılması ile aynı sistemde hem gerilim uygulanabilir hem de oluşan akım ölçülebilir.

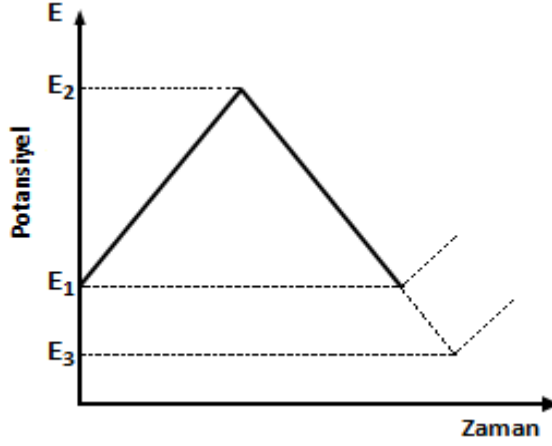
Voltametrde akım, çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucunda oluşur. Voltametrde çalışma elektrotuna uygulanan potansiyel negatif yönde arttırılırsa elektrottaki indirgenme tepkimesi hızlanır. Genelde çalışma elektrodu katot olarak kullanılır ve indirgenme ile katodik akım oluşur. Eğer çalışma elektrotunun potansiyeli, pozitif yönde arttırılırsa, bu kez elektrot anot olarak davranır ve anodik akım oluşur [40, 42].

#### **2.3.1.1. Döngülü voltametri (CV)**

Döngülü voltametri kimyada birçok alanda önemli ve yaygın olarak kullanılan elektroanalitik teknik haline gelmiştir. CV kantitatif tayinler için nadir olarak kullanılmasına rağmen bir sistemin elektrokimyasal davranışını araştırmak için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. CV elektrot yüzeyinde meydana gelen elektrokimyasal reaksiyonun kinetiğinin aydınlatılmasını mümkün kılarken elektrokimyasal tepkimeler hakkındaki nitel bilginin hızla elde edilebilmesi sebebiyle ilk başvuru teknik [43].

Bu teknikte çalışma elektrodu, şekilde de gösterildiği gibi üçgen dalga biçiminde olan doğrusal potansiyelli bir taramaya tabi tutulur [44]. Potansiyelin zaman ile değişmesi tarama hızı olarak adlandırılır. Uygulanan potansiyelin zamanla değişim grafiği Şekil 2.4'te verilmiştir. Başlangıç potansiyeli olarak genellikle indirgenme yükseltgenme tepkimesinin olmadığı bir potansiyel seçilir ve potansiyel redoks tepkimesinin gerçekleştiği yönde  $E_1$  ve  $E_2$  sınırları arasında belirli bir hızda taranır. Potansiyel taraması bu şekilde bir  $E_1$  başlangıç potansiyeli ve  $E_2$  potansiyeli arasında yapılırsa metot doğrusal taramalı voltametri adını alır. Eğer  $E_2$  potansiyeline ulaşıldıktan sonra aynı tarama hızıyla ilk tarama yönüne göre ters yönde tarama yapılırsa metodun adı döngülü

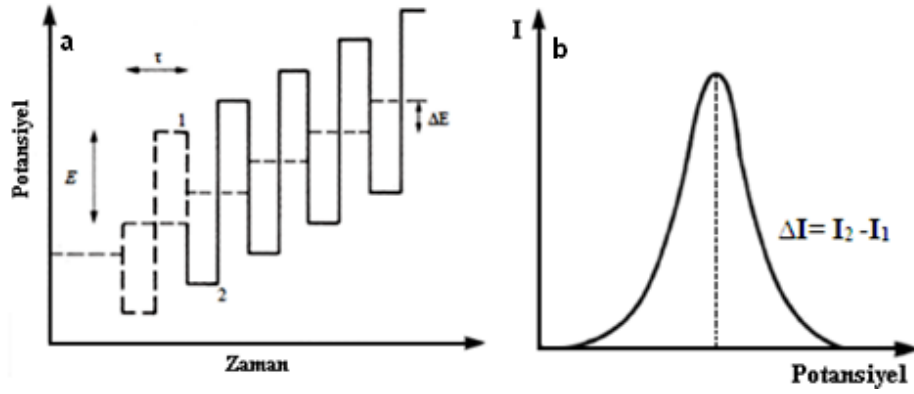
voltametri olur. İleri taramada indirgenme olmuşsa ters taramada yükseltgenme meydana gelir [40, 45].



**Şekil 2.4:** Döngülü voltametrinde potansiyelin uygulanması.

#### 2.3.1.2. Kare dalga voltametrisi (SWV)

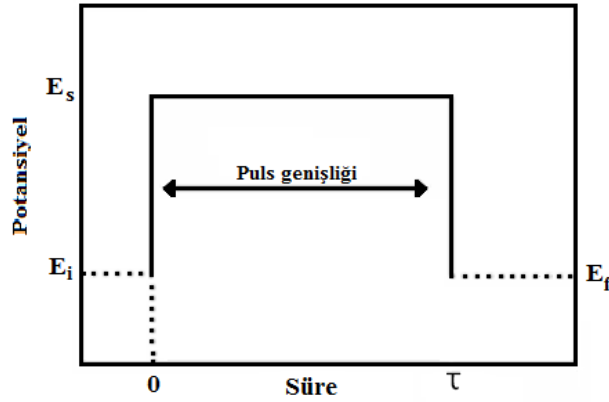
Kare dalga voltametrisi son derece hızlı ve duyarlı olması nedeniyle üstünlüğü olan bir voltametri tekniğidir. Voltamogramın tamamı 10 ms'den daha az bir sürede elde edilir. Tekniğe adını veren kare dalgası şeklindeki basamaklı sinyalde her basamağın boyu ve puls periyodu ( $\tau$ ) eşittir. Tersinir bir indirgenme reaksiyonunda bir pulsun boyutu, ileri tarama sırasında oluşan ürünün, geri tarama sırasında yükseltgenmesini sağlamaya yetecek kadar büyüktür. Şekil 2.5'te gösterildiği gibi ileri puls bir katodik akımını ( $i_1$ ) geri puls da bir anodik akımını ( $i_2$ ) oluşturur. Genellikle voltamogramları elde etmek için bu akımların farkı ( $\Delta I$ ), grafiğe geçirilir (Şekil 2.5.b). Bu fark derişimle orantılıdır; pik potansiyeli de voltametrik yarı-dalga potansiyeline karşılık gelir. Ölçüm son derece hızlı yapıldığından, birkaç voltametrik taramanın sinyal ortalaması alınarak analizin kesinliğini arttırmak mümkündür. Kare dalga voltametrisinin tayin sınırları  $10^{-7}$  ile  $10^{-8}$  M arasındadır [46].



Şekil 2.5: Kare dalga voltametrisinde potansiyelin uygulanması.

### 2.3.1.3. Kronoamperometri (CA)

Elektrokimyada en basit dalga formu, potansiyel basamak tekniğidir. Bu tekniğe göre, çalışma elektrotunun potansiyeli, faradayik akımın henüz meydana gelmediği bir değerden, elektrokimyasal olayın tamamlandığı bir potansiyel değerine ani olarak değiştirilir ve sistem, bu potansiyelde belirli bir süre ( $\tau$ ) bekletilir.



Şekil 2.6: Kronoamperometride çalışma elektrotuna uygulanan potansiyelin zamanla değişim grafiği.

Şekil 2.6’da  $E_i$  başlangıç uygulama potansiyeli  $E_s$  basamak potansiyeli ve  $E_f$  bitiş potansiyelidir. Elektrot yüzeyinde;  $O_x$  (oksidan) +  $e^- \rightarrow R$  (Redüktan) şeklinde bir elektrokimyasal olay gerçekleştiği düşünülürse, elektroda uygulanan potansiyel, bu olayın toplam hızını etkiler. Redoks potansiyelinden ( $E_0$ ) daha pozitif potansiyellerde, “ $O_x$ ” türünün “ $R$ ” türüne dönüşmesi söz konusu değilken, bu potansiyelden daha negatif potansiyellerde elektrokimyasal olay, difüzyon kontrollüdür (yani, “ $O_x$ ” molekülleri, elektrot yüzeyine ulaşır ulaşmaz elektroliz olur).

Başlangıçta çözeltide sadece “O<sub>x</sub>” türü bulunmaktadır. Potansiyel basamağı uygulandıktan sonra, elektrot yüzeyindeki “O<sub>x</sub>” türü derişimi sıfıra kadar azalır ve bu esnada elektrot ile çözelti ara yüzeyinde bir derişim farklılaşması meydana gelir. Çözeltideki “O<sub>x</sub>” türleri elektrot yüzeyine difüze olup, “R” türüne dönüşürken, difüzyon tabakası çözelti tarafına doğru genişler. Bu esnada oluşan akımın, zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilmesi tekniği “kronoamperometri” olarak adlandırılır [42].

#### **2.3.1.4. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS)**

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi, yaygın bir şekilde, korozyon hızını belirlemede kullanılırken son zamanlarda elektrokimyasal sistemleri ve yöntemleri araştırmada, elektrot direncini belirlemede kullanılan etkili bir tekniktir [41, 47].

Empedans bir devrede elektrik akımının akmasına karşı direnebilme yeteneğinin bir ölçüsüdür. Alternatif akım (AC) empedans yöntemi olarak bilinen elektrokimyasal empedans spektroskopisi genellikle elektrokimyasal hücreye bir AC potansiyeli uygulayarak ve hücreden geçen akımın ölçülmesiyle hesaplanır [48]. Bu alternatif akım elektrot yüzeyine değişik frekans aralığında küçük genlikli, düşük frekanslı olarak belli sürelerde uygulanmaktadır. Yöntem, metal/çözelti ara yüzeyinde oluşan çift tabakanın uygulanan alternatif akım empedansının ölçülmesine dayanmaktadır. Elde edilen sonuçlar Nyquist diyagramı ile analiz edilir [49].

## **2.4. ER-GO’NUN AVANTAJLARI**

Çalışmada grafen oksitten elektrokimyasal indirgemeyle grafen üretildi. GO’in elektrokimyasal indirgenmesi uygun sıcaklıklarda gerçekleştirilebilen, basit, ekonomik ve çevre dostu bir yöntemdir. Bu yöntemde elektrokimyasal indirgenme ile oksijen giderilir ve aynı zamanda grafen tabakalarının hidrofobikliği artırılır. GO in elektrokimyasal indirgenmesi ile ER-GO filmi GO’dan daha geniş ve pürüzlü bir yüzey elde edilir. Bu tür yüzeyler elektrolit iyonlarının difüzyonunu ve nüfuz etmesini kolaylaştırır. GO’in elektrokimyasal indirgenmesi ile daha verimli elektrokimyasal olarak aktif bölgeler açığa çıkarılır. Kısaca ER-GO GO’dan, kimyasal olarak indirgenmiş grafenden ve

karbon nanotüpten daha yüksek elektrokimyasal kapasite sergiler ve dayanıklılığını arttırır [25].

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. CİHAZLAR

Voltametik deneylerde hücre sisteminde çalışma elektrodu olarak camsı karbon elektrot (3 mm çapında), karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak da Ag/AgCl (3M KCl) elektrot kullanıldı. Voltametik deneylerde Gamry Referans 600 Potansiyostat (Gamry, USA) cihazı kullanıldı.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri FEI - QUANTA FEG 450 SEM cihazı kullanılarak elde edildi.

Kimyasal madde ve örnekleri tartmak için Radwag AS 220/C/2 hassas terazi, pH ölçümleri için HANNA HI 221 pH metre, kimyasal maddelerin çözünmesine yardımcı olmak için Elmasonic marka ultrasonik banyo, destile su üretimi için GFL 2008 su sistemi kullanıldı.

#### 3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER ve ÇÖZELTİLER

Kullanılan bütün kimyasallar analitik saflıktadır.

**3.2.1. Bilirubin Çözeltisi:**  $1,0 \times 10^{-2}$  M stok çözeltisi uygun miktarda tartılan bilirubin minimum miktarda 0,1 M NaOH ile çözülüp 25mL'ye destile suyla tamamlanarak hazırlandı.

**3.2.2. Dopamin Çözeltisi:**  $1,0 \times 10^{-2}$  M stok çözeltisi uygun miktarda tartılan dopamin bir miktar etanol ile çözülüp 50 mL'ye destile suyla tamamlanarak hazırlandı.

**3.2.3. Ürik Asit Çözeltisi:**  $1,0 \times 10^{-2}$  M stok çözeltisi uygun miktarda tartılan ürik asidin minimum miktarda  $1,0 \times 10^{-3}$  M NaOH ile çözülüp 50 mL'ye destile suyla tamamlanarak hazırlandı.

**3.2.4. Tokoferol Çözeltisi:** Tokoferol etanol ile çözülüp  $1,0 \times 10^{-2}$  M stok çözeltisi hazırlandı.

**3.2.5. Askorbik Asit Çözeltisi:** Askorbik asidin destile su ile  $1,0 \times 10^{-2}$  M stok çözeltisi hazırlandı.

Bozulmasını önlemek için çözeltiler gün ışığından korundu ve  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Kullanımdan önce, stok çözeltiler istenilen konsantrasyonlara destile su ile seyreltilerek hazırlandı.

**3.2.6. Nafyon Çözeltisi:** Ticari olarak ağırlıkça %5 Nafyon içeren (eşdeğer ağırlığı 1100 g/mol sülfonik asit grupları) çözelti kullanıldı. Ağırlıkça %1 nafyon çözeltisi %5 (w/w) olan nafyon çözeltisinden izopropil alkolle seyreltilerek hazırlandı.

**3.2.7. Grafen Oksit Çözeltisi:** Grafen oksit (GO), oksidasyon aracı olarak derişik sülfürik asit ve potasyum permanganatın kullanıldığı kuvvetli bir oksidasyon yöntemi olan modifiye edilmiş Hummers yöntemi ile sentezlendi [50, 51].

### **3.2.8. Diazo Bilirubin Yönteminin Çözeltileri:**

Diazo A: 0,1 g sülfanilik asit ile 1,5 ml derişik HCl ile karıştırılarak 100 mL'ye destile suyla tamamlanır.

Diazo B: 0,25 g  $\text{NaNO}_3$  destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.

Diazo Reaktifi: 10 mL Diazo A, 0,3 mL Diazo B ile karıştırılır.

Diazo Blank: 1,5 mL HCl destile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

## **3.3. SERUM ÖRNEĞİNİN HAZIRLANMASI**

Kan örnekleri, gönüllü, yetişkinlerden sağlandı. Bu örnekler vakumlu kuru kan alma tüplerine alındı. Kan kendiliğinden pıhtılaştıktan sonra 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Ayrılan serum analiz edilene kadar buzdolabında saklandı. Belli miktarda serum örneği aseton -  $\text{H}_2\text{SO}_4$  karışımına ilave edildi ve protein kısmı çöktürüldükten sonra 5000 rpm'de 5dk santrifüj edilerek deneylerde kullanıldı.

### 3.4. ELEKTRODUN HAZIRLANMASI

Her deneyde elektrot öncelikle 0,3  $\mu\text{m}$  daha sonra da 0,05  $\mu\text{m}$  büyüklüğünde alüminyum oksit partikülleri içeren malzeme ile 5 dakika boyunca temizlendi. Temizleme esnasında elektrot yüzeyinde kalan alüminyum oksit partiküllerini uzaklaştırmak için elektrot yıkandı ve etanol: propanol (1:1) karışımı içerisinde ultrasonik banyoda 5 dakika bekletildi.

Nafyon/ER-GO modifiye GCE literatürde belirtildiği gibi [25, 26, 52] grafen oksit (GO) 1,0  $\text{mg mL}^{-1}$  olacak şekilde destile su ile 30 dk ya da tamamı disperse oluncaya kadar ultrasonikte bekletildi. 1  $\text{mg mL}^{-1}$  GO çözeltisinden 50  $\mu\text{L}$  ve ağırlıkça %1,0 Nafyon-izopropil alkol çözeltisinden 10  $\mu\text{L}$  alınarak 30dk ultrasonik banyoda bekletildi. Hazırlanan Nafyon/GO çözeltisinin 10  $\mu\text{L}$  si camsı karbon elektrod yüzeyine damlatarak modifiye edildi. Çözücü 2 saat oda sıcaklığında buharlaştırılarak uzaklaştırıldı ve Nafyon/GO/GCE elde edildi. Çözücü buharlaştıktan sonra elektrot yüzeyindeki hareketli modifiyeyi uzaklaştırmak için destile su ile yıkandı. Daha sonra Nafyon/GO/GCE hücredeki 0,02M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  çözeltisi içine daldırıldı ve kronoamperometri yöntemiyle 10 dk -0,7 V sabit potansiyel uygulanarak GO'in elektrokimyasal indirgenmesi sonucunda Nafyon / ER-GO / GCE hazırlandı. Elde edilen elektrot bilirubin elektrokimyasal tayininde kullanıldı.

### 3.5. PROSEDÜR

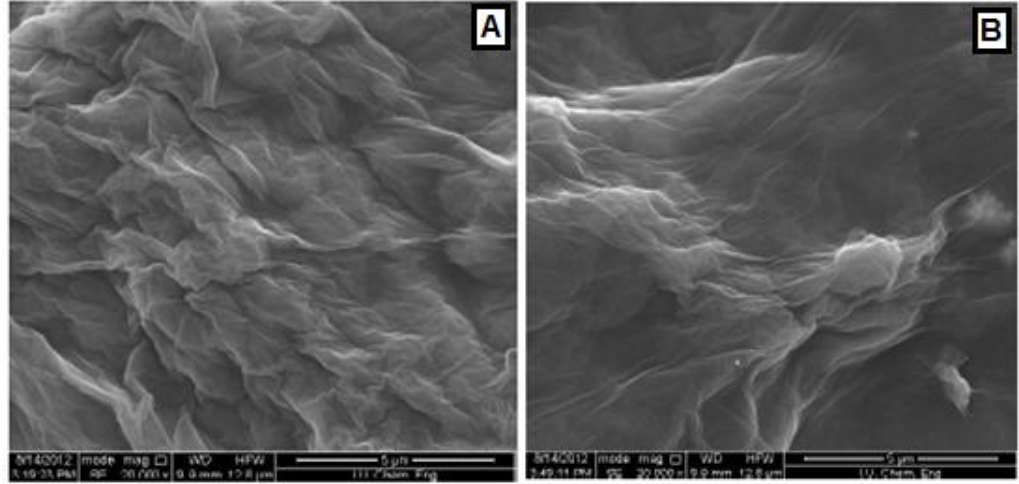
Tüm denemeler oda sıcaklığında (25°C'de) gerçekleştirildi. Belli miktarda BR çalışma çözeltisi ve 0,05 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ortamdaki su miktarı 1mL olacak şekilde 9 mL aseton ile elektrokimyasal hücreye koyuldu (son hacim 10 mL) ve üçlü elektrot sistemi ile çalışıldı. Döngülü voltametri çalışmaları 50  $\text{mVs}^{-1}$  tarama hızında yapıldı. Kare dalga voltametrisi ile BR tayininde step size, frekans, genlik gibi çeşitli cihaz parametreleri için optimum koşullar incelenmiştir ve step size 8 mV, frekans 10 Hz, kare dalga genliği 100 mV olarak belirlenmiştir. BR'in tayininde düşük oksidasyon potansiyeline sahip olması ve daha hassas olması dolayısıyla birinci oksidasyon piki seçilmiştir.

### **3.6. DİAZO BİLİRUBİN YÖNTEMİNİN SERUM ÖRNEĞİNE UYGULANIŞI**

Farklı konsantrasyonlarda bilirubin ile diazoblan ve diazo reaktifi kullanılarak bir seri çözeltiler hazırlandı ve 3'er mL metanol eklenerek 30 dk sonunda 540 nm'deki absorbans değerleri okundu. Bu şekilde elde edilen kalibrasyon doğrusundan serum örneklerindeki bilirubin miktarı hesaplandı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. SEM KARAKTERİZASYONU



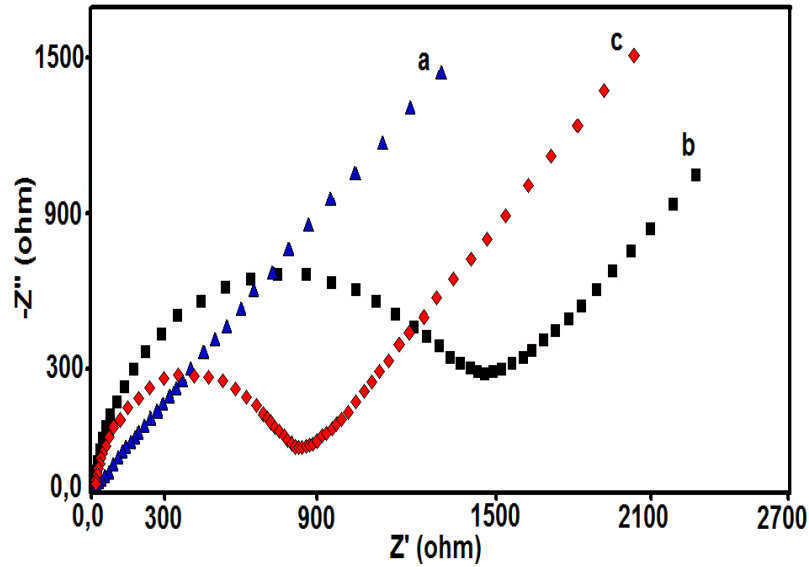
Şekil 4.1: ER-GO film (A), Nafyon/ER-GO filmin (B) SEM görüntüsü.

Hazırlanan ER-GO ve Nafyon/ER-GO nanokompozitinin biçimsel özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile elde edilmiştir. Şekil 4.1 A’da ER-GO filmin pürüzlü yüzeyinde grafenin tipik buruşuk ve tabakalı yapısı görülmektedir. Şekil 4.1 B’ de ise Nafyon/ER-GO filmin daha pürüzsüz ve homojen bir yüzey oluşturduğu görülmektedir.

### 4.2. ELEKTROKİMYASAL EMPEDANS KARAKTERİZASYONU

Elektrotların elektron transfer kapasitesi elektrokimyasal empedans deneyleri ile incelenmiştir. Şekil 4.2’de yalın GCE (Şekil 4.2a), Nafyon/GCE (Şekil 4.2b) ve Nafyon/ER-GO/GCE (Şekil 4.2c) 0,1 M KCl içeren  $5,0 \times 10^{-3}$  M  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  (1:1) ortamındaki elektrokimyasal empedans spektroskopisinin (EIS) Nyquist grafikleri görülmektedir.

EIS iki bölümden oluşur, düşük frekanslardaki doğrusal bölüm difüzyon kontrollü süreci gösterirken yüksek frekanstaki yarım daire bölümü ise elektron transfer sınırlı süreci ya da yük transfer direncine ( $R_{ct}$ ) karşılık gelmektedir. Yalın GCE de görülen yüksek frekanstaki iyi tanımlanmış küçük yarı daire küçük ara yüzli elektron direncini göstermektedir [53, 54]. Elektrot yüzeyine nafyon modifiye edildiği zaman GCE üzerindeki immobilize haldeki nafyon  $R_{ct}$  'i önemli ölçüde arttırmıştır. Bu olay nafyon filme bağlıdır, nafyon iyi bir katyon değiştirici olup elektrotla çözelti ara yüzünde  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$  in elektron alışverişinde engelleyici bir tabaka olarak rol oynar. Şekil 4.2'de de görüldüğü gibi ER-GO den sonra  $R_{ct}$  oldukça azalmıştır.  $R_{ct}$ , yaklaşık olarak GCE, Nafyon/GCE ve Nafyon/ER-GO/ GCE için sırasıyla 15,7  $\Omega$ , 1278,0  $\Omega$  ve 758,3  $\Omega$  olarak elde edilmiştir. Literatürde Grafen/ Nafyon modifiye camısı karbon elektrotla da benzer elektrokimyasal davranışların sergilendiği belirtilmiştir [54]. Sonuçlardan Nafyon/ER-GO nanokompozit filmin GCE yüzeyinde başarılı bir şekilde tutturulduğu görülmektedir.

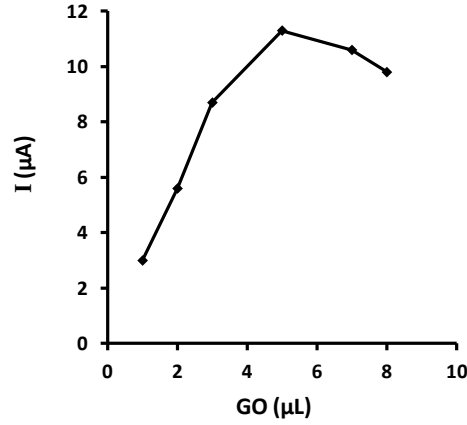


**Şekil 4.2:** Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) temiz yalın GCE (a), Nafyon/GCE (b) ve Nafyon/ER-GO/GCE (c)  $5,0 \times 10^{-3}$  M  $Fe(CN)_6^{4-/3-}$  (1:1) ve 0,1 M KCl içeren çözelti ortamında, genlik 5mV; frekans aralığı:  $1 \times 10^5$  Hz – 0,01 Hz.

#### 4.3. NAFYON / GRAFEN OKSİT MİKTARI ETKİSİ

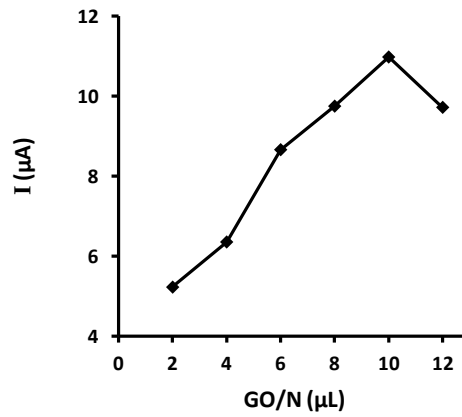
Nafyon: Grafen oksit miktarı 1:1 ve 1:8 oranları arasında CV yöntemiyle araştırıldı. Bu çalışmada Nafyon:Grafen oksit oranının 1:5 olduğu durumda en iyi sonucu verdiği

tespit edildi. 1:5 Nafyon / Grafen oksit oranından daha yüksek oranlar için bilirubin'in verdiği pikin giderek düştüğü saptandı. İletken filmler Nafyon-grafen oksit dispersiyonu (Nafyon/GO 1:5) kullanılarak hazırlandı.



**Şekil 4.3:** Nafyon/GO oranının 50µM BR'nin pik akımları üzerine etkisi.

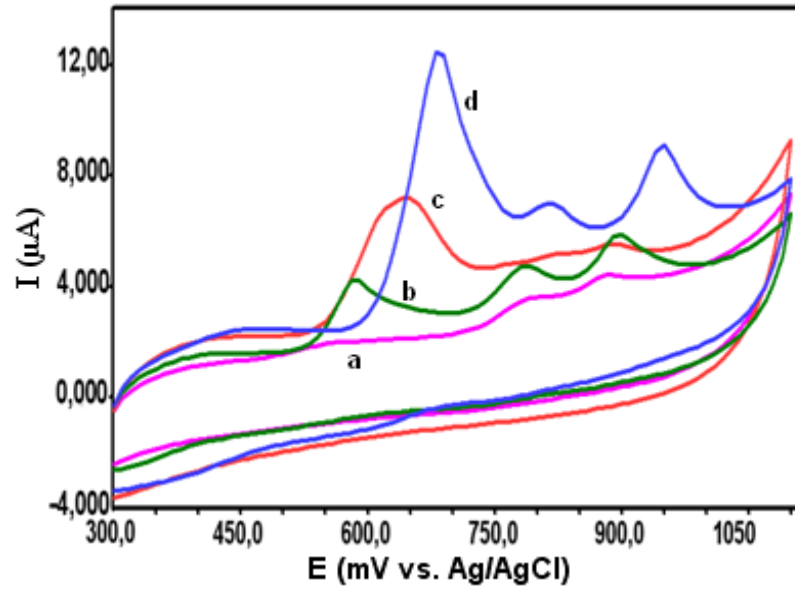
Yalın GCE yüzeyine 1:5 oranındaki Nafyon/GO çözeltisinden 2-12 µL arasında farklı hacimlerde damlatılarak Nafyon/GO modifiye GCE elektrotlar hazırlandı. Pik akımı artan Nafyon/GO miktarıyla birlikte (5-10µL) belirgin bir şekilde artmıştır. Artan Nafyon/GO hacminde ise Nafyon/ER-GO/GCE'de elde edilen pik akımları azalmıştır. Deneylerde homojen Nafyon/GO süspansiyonundan 10µL yalın GCE yüzeyine damlatılarak kullanıldı.



**Şekil 4.4:** GCE yüzeyine damlatılan 1:5 oranındaki Nafyon/GO miktarının 50µM BR'nin pik akımları üzerine etkisi.

#### 4.4. ÇÖZÜCÜ ETKİSİ

Nafyon / ER-GO modifiye camı karbon elektrot yüzeyinde susuz çözücü ortamlarında BR'nin elektrokimyasal tayini döngülü voltametri ile incelendi. Optimum sonuçların elde edilebilmesi için aseton, DFA, DMSO ve etanol gibi farklı çözücülerin asidik çözeltileri ile çalışıldı. Şekil 4.5'de görüldüğü gibi en iyi sonuç asetonun asidik çözeltisinde elde edilmiştir. Deneylerde 0,05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren aseton çözeltisi kullanıldı. Organik çözücü olmayan ortamlarda ise Nafyon / ER-GO sensörü BR ile yanıt vermedi.

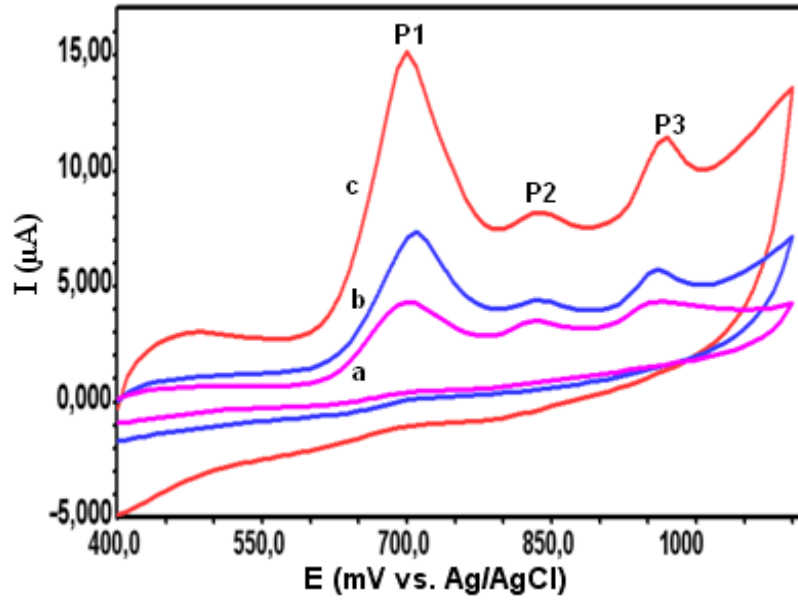


Şekil 4.5: 50μM BR nin 0,05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren farklı çözücülerdeki döngülü voltamogramları DMSO (a), DMF (b), Etanol (c) ve Aseton (d).

#### 4.5. BİLİRUBİNİN ELEKTROKİMYASAL DAVRANIŞI

Nafyon/ER-GO modifiye GCE yüzeyinde BR'in elektrokimyasal davranışı döngülü voltametri ile incelendi. Şekil.4.6'de 0,05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren aseton ortamında 50μM BR'in yalın GCE ve Nafyon / ER-GO / GCE 'deki döngülü voltamogramları görülmektedir. Yalın GCE üzerinde (Şekil 4.6 a), döngülü voltametri sonucunda BR'in 711 mV (P1), 841 mV (P2) ve 966 mV (P3) potansiyellerinde olmak üzere üç oksidasyon piki gözlemlendi. Nafyon / ER-GO / GCE (Şekil 4.6 c) üzerinde ise 701 mV (P1), 841 mV (P2) ve 966 mV (P3) potansiyellerinde bulunan pik akımlarının önemli ölçüde arttığı görüldü. Her üç oksidasyon piki de birbirinden ayrılmaktadır. Çalışılan

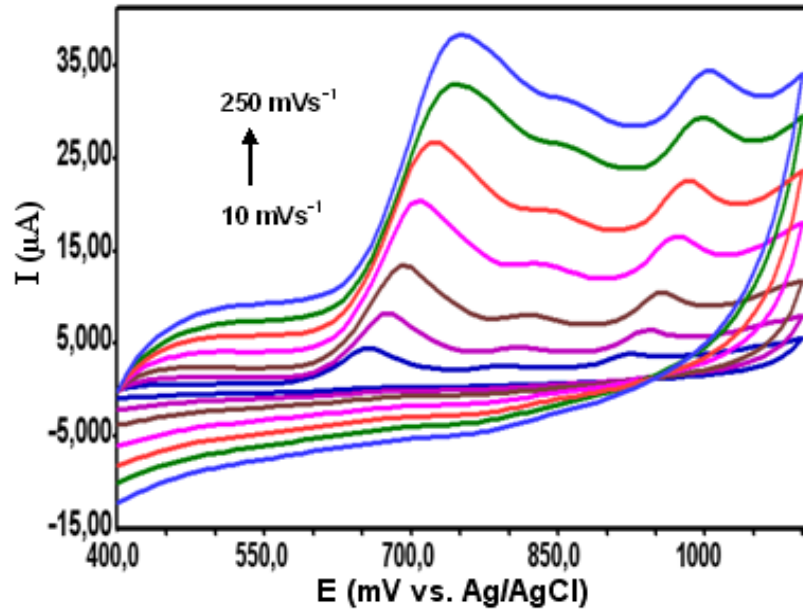
potansiyel aralığında katodik pik akımı görülmedi. Ayrıca oksidasyon pik akımı Nafyon/GCE' ye göre üç kat daha artarak  $11\mu\text{A}$  çıktığı görülmektedir. Bununla birlikte GCE üzerindeki nanokompozit film daha geniş yüzey alanına sahip olduğu için Nafyon/ER-GO modifiye GCE ve Nafyon/GCE yalın GCE'ye göre daha geniş backgrounda sahip olduğu görülmektedir. Sonuçlar, Nafyon / ER-GO ile modifiye edilmiş elektrodun BR oksidasyonu için güçlü bir elektrokatalitik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.



**Şekil 4.6:** 0,05 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  içeren aseton ortamında  $50\text{ mV s}^{-1}$  tarama hızında  $50\mu\text{M}$  BR in yalın GCE (a), Nafyon/GCE (b) ve Nafyon/ER-GO/GCE (c) nin döngülü voltamogramları.

#### 4.6. TARAMA HIZININ ETKİSİ

Nafyon / ER-GO / GCE'de BR'in oksidasyon pik akımları üzerinde tarama hızının etkisi döngülü voltametri ile incelendi. Şekil 4.7'de Nafyon / ER-GO /GCE ile 0,05 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  içeren aseton ortamında  $50\mu\text{M}$  BR'in  $10\text{-}250\text{ mV s}^{-1}$  tarama hızı aralığındaki döngülü voltamogramları görülmektedir. Şekil 4.7'de görüldüğü gibi, BR'in oksidasyon pik potansiyelleri pozitif yöne doğru kaymış ve oksidasyon pik akımları artmıştır.



Şekil 4.7: Nafyon/ER-GO/GCE ile 0,05M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>' li aseton ortamında 50 µM BR'nin farklı tarama hızlarındaki döngülü voltamogramları. Tarama hızları; 10, 25, 50, 100, 150, 200 ve 250 mV s<sup>-1</sup>.

Nafyon/ ER-GO/ GCE üzerine bilirubinün oksidasyonunun difüzyon veya adsorpsiyon kontrollü mü olduğunu belirlemek için pik akımı ve tarama hızının karekökü arasındaki ilişki incelenmiştir. Bunun sonucunda elde edilen (Şekil 4.8A) lineer regresyon denklemleri ise:

$$I_{pa1} = 1,1051 v^{1/2} (\mu A mV^{1/2} s^{-1/2}) + 0,0884 (R^2 = 0,9969)$$

$$I_{pa2} = 0,0928 v^{1/2} (\mu A mV^{1/2} s^{-1/2}) + 0,2026 (R^2 = 0,9910) \text{ ve}$$

$$I_{pa3} = 0,3588 v^{1/2} (\mu A mV^{1/2} s^{-1/2}) - 0,044 (R^2 = 0,9913).$$

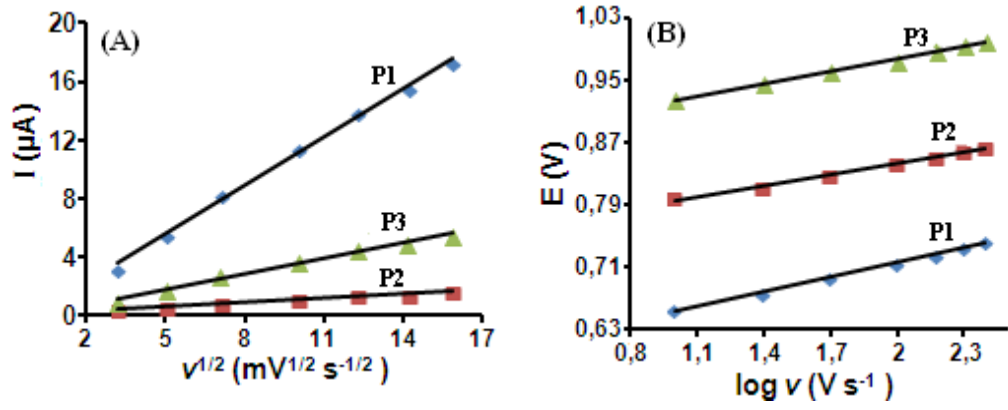
E<sub>pa</sub> 'ya karşı tarama hızının logaritması (Şekil 4.8B) arasındaki regresyon denklemleri:

$$E_{pa1} = 0,0626 \log v + 0,5918 (R^2 = 0,9958),$$

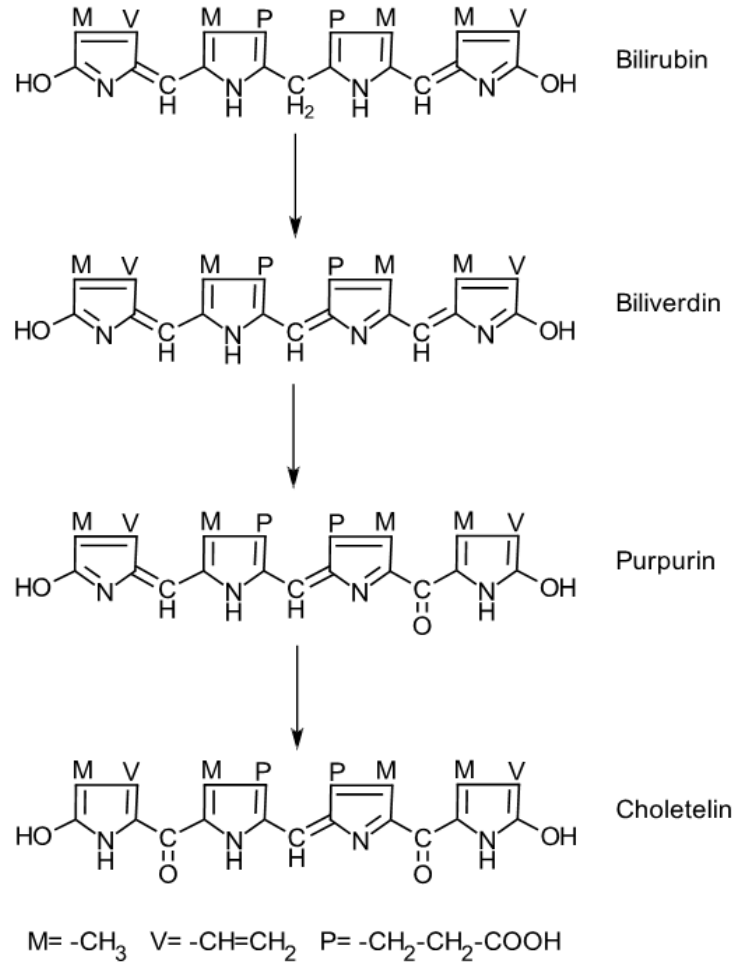
$$E_{pa2} = 0,0472 \log v + 0,7488 (R^2 = 0,9919) \text{ ve}$$

$$E_{pa3} = 0,0527 \log v + 0,8713 (R^2 = 0,9962).$$

Bu sonuçlar Nafyon / ER-GO modifiye edilmiş GCE ile BR'in reaksiyonunun ağırlıklı olarak difüzyon kontrollü bir işlem olduğunu gösterir. Şekil 4.9 'de BR'in oksidasyonunun reaksiyon mekanizması gösterilmiştir [16].



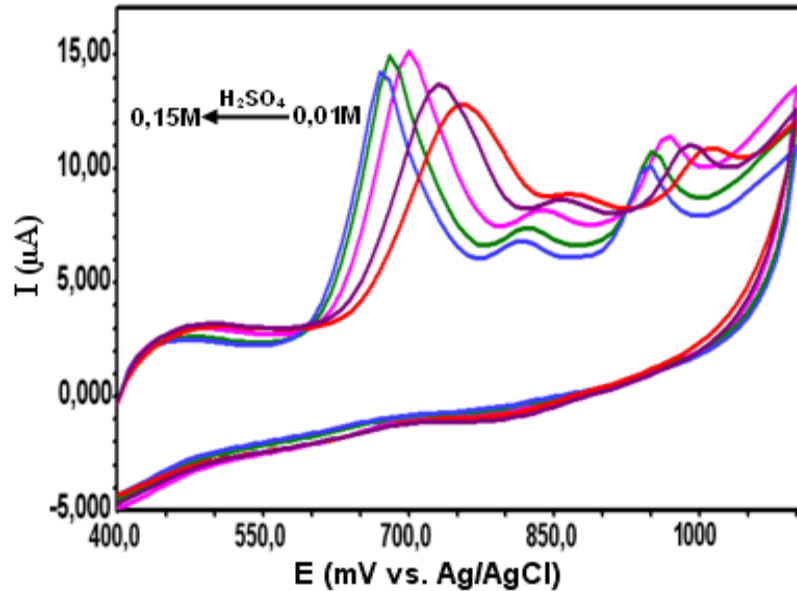
**Şekil 4.8:** Pik akımının tarama hızına bağlı değişim grafiği(A).  $E_p$  ve  $\log v$  arasındaki ilişki(B).



**Şekil 4.9:** BR'in oksidasyonunun reaksiyon mekanizması.

#### 4.7. SÜLFÜRİK ASİT ETKİSİ

Fosfat Tamponu,  $H_2SO_4$ , NaOH, Britton Robinson Tamponu ve Asetat Tamponu gibi çeşitli destek elektrolitler denenmiştir. Bunlar arasından en iyi sonuçlar  $H_2SO_4$  ile elde edilmiştir. Bu ortamda kare dalga ile daha duyarlı sonuçlar elde edilmiştir. pH 3-12 arasında oksidasyon pik akımları gözlenmemiştir. BR ( $50\mu M$ ) üzerine asit konsantrasyonunun etkisi 0,01M - 0,15M aralığında  $H_2SO_4$  içeren aseton ortamında  $50 mVs^{-1}$  tarama hızında döngülü voltametri ile çalışılmıştır (Şekil 4.10). Voltamogramlarda 0,01M dan 0,05M'a kadar asit konsantrasyonu arttıkça anodik pik akımının arttığı görülmektedir. Artan asit konsantrasyonlarında ise BR'nin pik akımlarının (P1, P2, P3) azaldığı ve pik potansiyellerinin negatife kaydığı görülmüştür. Sonuçlar düşük pH ortamlarında gerçekleştirilen ölçümlerin daha stabil olduğunu ve daha yüksek pik akımının elde edildiğini göstermiştir. Çünkü BR yüksek pH'larda negatif yüklenir ve Nafyon/ERGO/ GCE negatif yüklü nafyon içerir bu da BR'nin çözeltiden elektrot yüzeyine difüzyonunu engeller. Ayrıca en yüksek pik akımı ve en iyi pik şekli de 0,05 M  $H_2SO_4$  çözeltisi ile elde edilmiştir. Bu nedenle 0,05 M  $H_2SO_4$  içeren aseton çözeltisi ile çalışılmıştır.



Şekil 4.10:  $H_2SO_4$  konsantrasyonunun pik akımına etkisi sırasıyla; 0,01, 0,03, 0,05, 0,1 ve 0,15 M.

#### 4.8. KARE DALGA PAREMETRELERİNİN ETKİSİ

SWV’de elde edilen pik akımları karedalga genliği, karedalga frekansı ve step size gibi çeşitli enstrümantal parametrelere bağlıdır. Bu enstrümantal parametrelerin pik akımı üzerine çok az etkisinin olduğu bulunmuştur.

Pik akımları üzerine genliğin etkisi 10 mV’tan 200 mV a kadar incelenmiştir. Kare dalga genliği 10 mV ve 100 mV arasında artan genlikle birlikte pik akımının arttığı ve sonrasında ise hemen hemen sabit kaldığı görülmüştür. Bu yüzden kare dalga genliği 100 mV olarak seçilmiştir.

BR’nin pik akımı kare dalga frekansının artmasıyla 10 Hz’e kadar artış gösterirken üzerindeki değerlerde pik akım değerleri kararsızlaşır ve geniş artık akımla örtülür. Frekans 10 Hz seçilerek step size parametresi araştırıldı. Pik akımı step size’ın 8 mV’a kadar artmasıyla lineer bir artış göstermiş ve sonrasında hemen hemen sabit kalmıştır. Bu nedenle, 8 mV optimum step size olarak seçilmiştir. Genel olarak optimize edilmiş parametreler kare dalga frekansı, 10 Hz; kare dalga genliği, 100 mV; step size 8 mV olarak belirlenmiştir.

#### 4.9. ANALİTİK PARAMETRELER

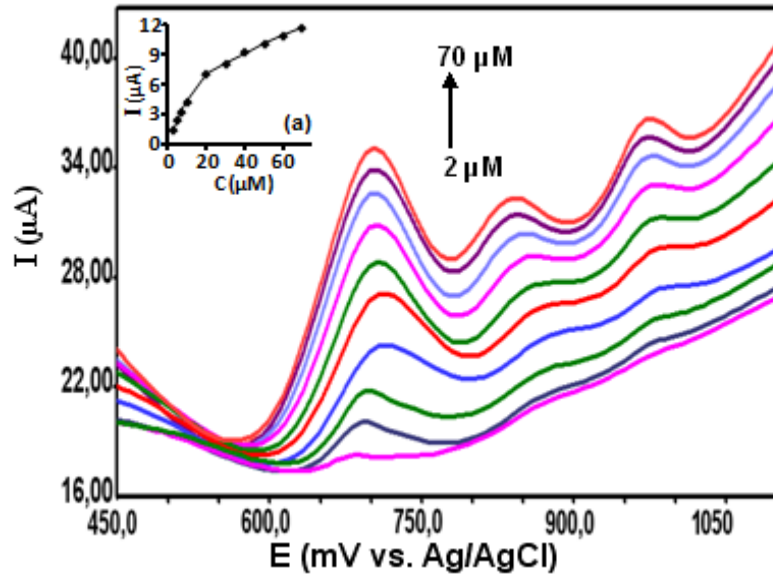
BR voltametrik tayini Nafyon / ER-GO / GCE ile kare dalga voltametrisi kullanılarak 0,05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>’li aseton ortamında gerçekleştirilmiştir. Şekil. 4.11’de BR’in çeşitli konsantrasyonlardaki kare dalga voltamogramları görülmektedir. SWV yönteminin uygulanmasıyla iki lineer aralık görülmüştür.

İlk lineer aralık 2,0 µM ile 20 µM arasında ve kalibrasyon denklemi;

$$I_p (\mu A) = 0,3096 C (\mu M) + 0,8675 (R^2 = 0,9935)$$

ikinci lineer aralık 20-70 µM arasında ve kalibrasyon denklemi;

$$I_p (\mu A) = 0,0931 C (\mu M) + 5,2341 (R^2 = 0,9949) \text{ dir.}$$



**Şekil 4.11:** Nafyon/ER-GO/GCE ile 0,05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren aseton ortamında 2, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 μM BR in kare dalga voltamogramları. BR konsantrasyonuna karşı pik akım grafiği (a).

$C_L = 3 S/|b|$  olarak tanımlanan dedeksiyon limiti (S: blankın standart sapması ve b: kalibrasyon doğrusunun eğimi)  $0,84 \mu\text{M}$  ( $8,4 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) ( $0,049 \text{ mg dL}^{-1}$ ) olarak bulunmuştur.  $5 \mu\text{M}$  ve  $25 \mu\text{M}$  konsantrasyonlarda BR kullanılarak beşer kez tekrarlanan ölçüm sonucunda bağıl standart sapmaları (RSD) sırasıyla % 2,8 ve % 2,2 olarak bulunmuştur, bu da Nafyon / ER-GO / GCE için mükemmel bir tekrarlanabilirlik göstermektedir.

#### 4.10. GİRİŞİM ETKİSİ

Geliştirilen sensörün seçiciliğini göstermek için, çeşitli biyo-organik bileşiklerle bilirubin tayini incelendi. Gerçek örneklerde bulunan diğer bileşiklerin girişim etkisi  $50 \mu\text{M}$  bilirubin varlığında uygulanan yöntemdeki karışım çözeltisi ile incelenmiştir.  $500 \mu\text{M}$  askorbik asit,  $500 \mu\text{M}$  dopamin,  $5 \text{ mM}$  glikoz,  $1 \text{ mM}$  tokoferol ve  $300 \mu\text{M}$  ürik asit varlığında hiçbir girişim etkisi gözlenmemiştir. BR yukarıda belirtilen bileşikler ile sırasıyla % 95, % 99, % 98, 100 ve 102% geri kazanımla elde edilmiştir. Protein aseton ile çöktürülmüştür. Böylece, protein  $50 \mu\text{M}$  BR'in SWV ile verdiği sinyale herhangi bir girişimde bulunmamıştır.

#### 4.11. TEKRARLANABİLİRLİK, TEKRAR KULLANILABİLİRLİK VE STABİLİTE

Nafyon/ER-GO modifiye elektrodun tekrarlanabilirliğini hesaplamak için birbirinden bağımsız bir şekilde beş elektrot hazırlanarak 5,0  $\mu\text{M}$  BR için pik akım değerleri belirlendi ve bağıl standart sapması (RSD) % 3,8 olarak bulunarak iyi bir tekrarlanabilirliğe sahip olduğu bulundu. Nafyon / ER-GO modifiye elektrodun tekrar kullanılabilirliğinin ölçülmesinde 5,0  $\mu\text{M}$  ve 25  $\mu\text{M}$  BR konsantrasyonu kullanıldı. Önerilen yöntemin tekrar kullanılabilirliği için bağıl standart sapması (RSD, n=5) 5,0  $\mu\text{M}$  ve 25  $\mu\text{M}$  BR için sırasıyla % 3,3 ve % 3,0 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç, modifiye edilmiş elektrodun iyi bir tekrar kullanılabilirliğe sahip olduğunu göstermektedir. Elektrodun stabilitesi pratik biyosensör uygulamaları için çok önemlidir. Nafyon/ ER-GO / GCE'nin buzdolabında 4°C'de 10 gün saklanmasıyla 5,0  $\mu\text{M}$  BR'ye verdiği cevap yalnızca % 4.2 azalmıştır.

#### 4.12. ANALİTİK UYGULAMALAR

Yöntemin gerçek örnekte bilirubin analizinin performansını ve uygulanabilirliğini doğrulamak için bu modifiye elektrot kan serum örneğinde bilirubin tayinine uygulandı. Serumda bilirubin tayini aynı şartlar altında beş kez tekrarlandı. Serum örneğinde bilirubin tayini için standart katkı yöntemi kullanıldı. BR'nin % geri kazanımı % 95-105 aralığında bulunmuştur. Geri kazanım değerleri önerilen yöntemle gerçek örneklerde BR tayini için verimli bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir. SWV analizleri ve bölüm 3.6'da anlatılan spektroskopik yöntem ile karşılaştırıldığında elde edilen bilirubin değerlerinin uyumlu olduğu bulundu [36].

**Tablo 4.1:** Serum Örneklerinin Bilirubin İçeriği.

| Örnek | Katkı<br>(mg dL <sup>-1</sup> ) | Bulunan<br>(mg dL <sup>-1</sup> ) | Geri Kazanım<br>(%) | Referans Metod<br>(mg dL <sup>-1</sup> ) |
|-------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------|------------------------------------------|
| A     | -                               | 0,86                              | -                   | 0,78                                     |
|       | 0,2                             | 1,07                              | 95                  |                                          |
|       | 0,4                             | 1,27                              | 97,5                |                                          |
| B     | -                               | 1,22                              | -                   | 1,32                                     |
|       | 0,2                             | 1,43                              | 105                 |                                          |
|       | 0,4                             | 1,63                              | 103                 |                                          |

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde bilirubinin tayininde en çok diazolama yöntemi ile bilirubinin porfirin halkalarının diazo bileşiği ile oluşturduğu renkli azobilirubin bileşiğinin spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanan UV-vis spektrofotometri yöntemleri kullanılır. Fakat bu analitik metodlarda hassasiyet düşüktür ve bazı maddelerle girişim olmaktadır. Son yıllarda BR'nin elektroaktif bir bileşik olmasından yararlanılarak BR tayininde elektrokimyasal tekniklerin kullanıldığı çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Geliştirdiğimiz yöntemi tablo 5.1'de görülen literatürdeki bu yöntemlerle kıyasladığımızda Ye ve ark. nın yalın GCE'de, Shoham ve ark.'nın çok tabakalı enzim elektrotla [19] ve Klemm ve ark. BOx enziminin BSA ile çapraz bağlanmasıyla önceden aktive edilmiş membran yüzeyinde tutturulmuş oksijen elektrot [21] ile yapmış oldukları çalışmalara göre yöntemimizin BR'in elektrokimyasal oksidasyonunun daha düşük dedeksiyon limitine sahip olduğu görülmektedir. Fortune ve ark. tarafından BO<sub>x</sub> immobilize edilmiş Pt elektrotla [18] ve Kannana ve ark. tarafından geliştirilen BOx/AuNPs/MPTS elektrotla [20] bulunan LOD değerlerinin geliştirdiğimiz yöntemle göre daha üstün olduğu görülmektedir ancak bu yöntemlerde kullanılan BOx enzimi pahalı bir enzimdir ve çok kolay denaturasyona (37 °C'de 17 h'te %50 aktivitesini kaybetmiştir) uğradığından kararsızdır, bu nedenle biyosensör cihazlarında biyokataliz sınırlı bir uygulamaya sahiptir.

**Tablo 5.1:** Bilirubin sensörlerinin performans karşılaştırmaları.

| Elektrot                                             | LOD<br>(mol L <sup>-1</sup> ) | Lineer aralık<br>(μM) | Kaynak     |
|------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------|------------|
| GCE ([bmim][PF <sub>6</sub> ])                       | -                             | 26 -250-540           | [16]       |
| Pt/BOx                                               | 7x10 <sup>-7</sup>            | 1-300                 | [18]       |
| Çok tabakalı enzim elektrot                          | 1,7x10 <sup>-5</sup>          | 10-110                | [19]       |
| BOx/AuNPs/MPTS elektrot                              | 2,3x10 <sup>-9</sup>          | 1-5000                | [20]       |
| BSA -BO <sub>x</sub> /önceden aktive edilmiş membran | 8,0x10 <sup>-6</sup>          | 10-250                | [21]       |
| Nafyon/ER-GO /GCE                                    | 8,4x10 <sup>-7</sup>          | 2-20-70               | Bu çalışma |

Bu çalışmada Nafyon / ER-GO modifiye camı karbon elektrotla enzimatik olmayan bir bilirubin sensörü geliştirildi. Enzimatik olmayan elektrotla bilirubinin doğrudan elektrokatalitik oksidasyonu enzim elektrotların dezavantajlarını önleyerek avantajlar sağlayacaktır.

Modifiye elektrot üzerinde bilirubinin oksidasyonu döngüsel voltametri ve kare dalga voltametri yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. BR için optimum şartlarda, düşük oksidasyon potansiyeline sahip olan ve daha hassas olan birinci oksidasyon piki seçilerek SWV’de elde edilen kalibrasyon eğrisi 2,0 - 20  $\mu\text{M}$  ve 20 -70  $\mu\text{M}$  arasında olmak üzere, iki lineer aralık göstermiştir ve dedeksiyon limiti 0,84  $\mu\text{M}$  (0,049  $\text{mg dL}^{-1}$ ) olarak bulunmuştur. Modifiye elektrot iyi bir stabilite, tekrarlanabilirlik, duyarlılık ve düşük tayin sınırı olmak üzere istenilen özellikleri sergilemektedir. Ayrıca, rutin tayinlerde kullanılmasının mümkün olması, kolay hazırlanması, düşük maliyet gerektirmesi modifiye elektrodun diğer avantajlarındanıdır.

Sonuç olarak, modifiye edilmiş elektrotla, asidik çözelti içinde bilirubinin oksitlenmesinin, yüksek elektrokatalitik yeteneğe sahip olduğu bulundu. Bu çalışma elektrokimyasal yöntemle bilirubin tayininde yeni bir sistem geliştirildi.

## KAYNAKLAR

- [1]. With, T. K., 1968, *Bile Pigments Chemical, Biological and Clinical Aspects*, Academic Press, New York.
- [2]. Ostrow, J. D., 1986, *Bile Pigments and Jaundice: Molecular, Metabolic and Medical, M.D. Aspects*, Marcel Dekker Inc, New York.
- [3]. Avramescu, M. E., Sager, W. F.C., Borneman, Z., Wessling, M., 2004,.Adsorptive membranes for bilirubin removal, *Journal of Chromatography B*, 803 (2), 215-223.
- [4]. Wang, X., Chowdhury, J. R. ,Chowdhury, N. R., 2006, Bilirubin metabolism, *Current Paediatrics*, 16 (1), 70-74.
- [5]. Koch, T. R., Akingbe, O. O., 1981, Feasibility of measuring free and total bilirubin electrochemically in serum, *Clinical Chemistry*, 27 (7), 1295-1299.
- [6]. Yarnitzky, Ch. N., Saar, J., 1983, Determination of bilirubin in serum by fast scan square wave voltammetry, *Israel Journal of Chemistry*, 23 (2), 249-254.
- [7]. Zeng, B., Liu, Z., Zhou, X., 1994, Polarographic Investigation and Determination of Bilirubin, *Analytical Sciences*, 10 (1), 95-99.
- [8]. Wang, J., Luo, D. B. ve Farias, P.A.M., 1985, Determination of bilirubin by adsorptive stripping voltammetry, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 185 (1), 61-71.
- [9]. Jin, W., Zhao, X., Ding, C., Wang, F., Gao, Z., 1992, Investigations in bioanalytical chemistry: Part II. Differential-pulse adsorption voltammetry of bilirubin, *Analytical Chimica Acta*, 268 (1), 185-188.
- [10]. Van Norman, D. J. ve Humans, M. M, 1974, Bilirubin-metal ion complexes, *Analytical Chemistry*, 46 (7), 926-929.
- [11]. Longhi, P., Mussini, T., Rondinini, S., Dada, G., Manitto, P., Monti, D., 1987, A study of the electrochemical reduction of bilirubin and its derivatives, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 17 (1), 101-104.
- [12]. Van Norman, J. D., 1973, Electroanalytical and Spectral Study of Bilirubin in Dimethyl Formamid, 45 (1), 173-175.
- [13]. Slifstein, C., Ariel, M., 1973, The electrochemistry of bilirubin in dimethylsulfoxide, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 48 (3), 447-463.

- [14]. Longhi, P., Manitto, P., Monti, D., Mussini, T., Rondinini, S., 1981, Electrochemistry of the biliverdin—bilirubin system in N,N-dimethylformamide, *Electrochimica Acta*, 26 (4), 541-543.
- [15]. Cheng, G., Yang, Y., Dong, S., 1991, Spectroelectrochemical study of biliverdin produced by the electrooxidation of bilirubin, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 26 (2), 345-350.
- [16]. Ye, J., Xiong, H., Wang, Q., Zhang, X., Wang, S., 2011, Voltammetric Behavior of Bilirubin Based on [Bmim][PF<sub>6</sub>] As the Supporting Electrolyte in Organic Solvent and Its Analytical Application, *American Journal of Biomedical Sciences*, 3 (3), 191-198.
- [17]. Wang, J., Ozsoz, M., 1990, A polishable amperometric biosensor for bilirubin, *Electroanalysis*, 2 (8), 647-650.
- [18]. Fortune, A., Guilbault, G. G., 1996, Enzyme Electrode for the Determination of Bilirubin, *Electroanalysis*, 8(3), 229-232.
- [19]. Shoham, B., Migron, Y., Riklin, A., Willner, I., Tartakovsky, B., 1995, A bilirubin biosensor based on a multilayer network enzyme electrode, *Biosensors and Bioelectronics*, 10 (3), 341-352.
- [20]. Kannana, P., Chena, H., Leeb, V.T. W., Kim, D. H., 2011, Highly sensitive amperometric detection of bilirubin using enzyme and gold nanoparticles on sol-gel film modified electrode, *Talanta*, 86, 400-407.
- [21]. Klemm J., Mamas I. P., Miliades I. K., 2000, An Enzymic Method for the Determination of Bilirubin Using an Oxygen Electrode, *Electroanalysis*, 12 (4), 292-295.
- [22]. Rahman, M. A., Leea, K. S., Parka, D. S., Wonb, M. S., Shim, Y.B, 2008, An amperometric bilirubin biosensor based on a conductive poly-terthiophene–Mn(II) complex, *Biosensors and Bioelectronics*, 23 (6), 857-864.
- [23]. Artiles, M. S., Rout, C. S., Fisher, T. S., 2011, Graphene-based hybrid materials and devices for biosensing, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63 (14), 13352-1360.
- [24]. Feng, Q., Du, Y., Zhang, C., Zheng, Z., Hu, F., Wang, Z., Wang, C., 2013, Synthesis of the multi-walled carbon nanotubes-COOH/graphene/gold nanoparticles nanocomposite for simple determination of Bilirubin in human blood serum, *Sensors and Actuators B*, 185, 337-344.
- [25]. Filik, H., Çetintaş, G., Avan, A. A., Koç, S. N., Boz, İ., 2013, Electrochemical Sensing of Acetaminophen on Electrochemically Reduced Graphene Oxide-Nafion Composite Film Modified Electrode, *International Journal of Electrochemical Science*, 8, 5724 - 5737.

- [26]. Filik, H., Çetintaş, G., Avan, A. A., Aydar, S., Koç, S. N., Boz, İ., 2013, Square-wave stripping voltammetric determination of caffeic acid on electrochemically reduced graphene oxide–Nafion composite film, *Talanta*, 116, 245-250.
- [27]. Karakükçü, Ç., 2008, *Sarılıklı Yeni doğanlarda Bilirubin ve Fototerapiden Kaynaklanabilecek Genotoksik Etkilerin Alkali Comet Tekniği ile Değerlendirilmesi*, Tıpta Uzmanlık , Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi .
- [28]. Koçdoğan Kaya, A., 2009, *Moleküler Damgalanmış Biyomateryaller ile İnsan Plazmasından Bilirubin ve Kolesterol Uzaklaştırılması*, Yüksek Lisans, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [29]. Ocak, M., 2011, *Term ve Terme Yakın (35 Gestasyon Hastası ve Üzeri) Yenidoğan Bebeklerde Taburculuk Öncesi Sarılık Risklerini Belirlemek ve Bilirubin Nomogramına Göre İzlem Sıklığına Karar Vermek*, Uzmanlık Tezi, Uludağ Üniversitesi.
- [30]. Filik, H., Uras, F., Uras, A.R., Çetintaş, G., Giray, D., Kılcan, D., 2012, *Kolorimetrik Katı Faz Ekstraksiyonu-Fiber Optik Reflektans Spektroskopisiyle Biyolojik Sıvılarda Yeni Bir Bilirubin Ölçüm Yönteminin Geliştirilmesi*, Proje No: 109T856.
- [31]. Mayer, M., 2000, Association of Serum Bilirubin Concentration with Risk of Coronary Artery Disease., *Clinical Chemistry*, 46 (1), 1723-1727.
- [32]. Lin, J. P., Vitek, L., Schwertner, H. A., 2010, Serum Bilirubin and Genes Controlling Bilirubin Concentrations as Biomarkers for Cardiovascular Disease, *Clinical Chemistry*, 56 (10), 1535-1543.
- [33]. Rigato, L., Ostrow, J. D., Tiribelli, C., 2005, Bilirubin and non-hepatic disease – a jaundiced view, *Trends in Molecular Medicals*, 11 (6), 277-283.
- [34]. Wickramasinghe, S. N., Wood, W. G., 2005, Advances in the understanding of the congenital dyserythropoietic anaemias, *British Journal of Haematology*, 131(4), 431-446.
- [35]. Fevery, J., 2008, Bilirubin in clinical practice: a review, *Liver International*, 28 (5), 592-605.
- [36]. Hutchinson, D. W., Johnson, B., Knell, A. J., 1972, The reaction between bilirubin and aromatic diazo compounds, *Biochemical Journal*, 127 (5), 907-908.
- [37]. Stankovich, S., Dikin, D.A., Dommett, G.H.B., Kohlhaas, K.M., Zimney, E.J., Stach, E.A., Piner, R.D., Nguyen, S.T., Ruoff, R.S., 2006, Graphene-based composite materials. *Nature*, 442, 282-286.
- [38]. Soldano, C., Mahmood, A., Dujardin, E., 2010, Production, properties and potential of graphen, *Carbon*, 48, 2127-2150.

- [39]. Umaç, B., 2014, *Grafen Modifiye Bakır ve Ag, Cd, Cu Tek Tabakalı Au Elektrotlar Üzerinde Nitratın Elektrokimyasal İndirgenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [40]. Çekirdek, P. 2005, *Voltametik Metotlarla Ditiyofosfonat Anyonlarının Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [41]. Tekin, S., 2008, *Platin Elektrot Yüzeylerine Tutturulmuş Organik Moleküllerin Elektrokimyasal Tekniklerle  $pK_a$  Değerlerinin Tayini*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [42]. Oruç, H., 2012, *Bazı Sb(III) Komplekslerinin Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi ve Glutasyon Redüktaz Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin Kare Dalga Voltametriyle Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [43]. Kounaves, S.P. 1997, *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. National Science Foundation , Virginia, ISBN: 0-13-177338-0.
- [44]. Kissinger, P. T., Heineman, W. R., 1983, Cyclic Voltammetry, *Journal of Chemical Education*, 60 (9), 702.
- [45]. Çetintaş, G., 2013, *p-Aminofenol Tayini İçin Duyarlı Grafen Bazlı Elektrokimyasal Sensö*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [46]. Osteryoung, J., O' Dea J.J., Bard, A.J. 1986, *Electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker, New York, 209-308.
- [47]. Sürme, Y., 2011, *Bakır Üzerine Nikel-Tungsten Alaşımlarının Elektrokimyasal Olarak Kaplanması ve Elektrokatalitik Davranışlarının Belirlenmesi*, Doktora Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [48]. Güneşdoğdu, İ.M., 2007, *Magnezyum Alaşımı AZ63' ün pH 7' deki Korozyon Davranışının Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi Yöntemiyle Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [49]. Akgül, F.S., 2011, *Alternatif Akım İmpedans Tekniğinde Uygulanan Farklı Genliklerin İmpedans Parametreleri Üzerine Etkisi*, Yüksek Lisans, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [50]. Hummers, W. S., Offema, R. E., 1958, Preparation of Graphitic Oxide, *Journal of the American Chemical Society* ,80 (6), 1339.
- [51]. Park, S., Ruoff, R. S., 2004, Chemical methods for the production of graphenes, *Nature Nanotechnology*, 4, 217-224.

- [52]. Li, S. J., Deng, D. H., Pang, H., Liu, L., Xing, Y., Liu, S. R., 2012, Preparation of electrochemically reduced graphene oxide-modified electrode and its application for determination of p-aminopheno, *Journal of Solid State Electrochemistry*, 16 (9), 2883-2889.
- [53]. Qiao, J. X., Luo, H. Q., Li, N. B., 2008, Electrochemical behavior of uric acid and epinephrine at an electrochemically activated glassy carbon electrode, *Colloids and Surfaces B*, 62 (1), 31-35.
- [54]. Wang, F., Yu, X., Li, H., Li, M., Feng, Q., 2013, Graphene-Nafion Composite Film Modified Electrode for Voltammetric Sensor for Determination of Dihydromyricetin, *Journal of the Chinese Chemical Society*, 60 (8), 1019-1026.

## ÖZGEÇMİŞ



### Kişisel Bilgiler

|                    |                          |
|--------------------|--------------------------|
| Adı Soyadı         | Asiye Aslıhan AVAN       |
| Uyruğu             | T.C.                     |
| Doğum tarihi, Yeri | 1985, Fatih              |
| Telefon            | 0538 252 39 92           |
| E-mail             | asiyeaslihan@hotmail.com |

### Eğitim

| Derece        | Kurum/Anabilim Dalı/Programı                                    | Yılı |
|---------------|-----------------------------------------------------------------|------|
| Yüksek Lisans | İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/Kimya Anabilim Dalı/Analitik Kimya | 2014 |
| Yüksek Lisans | İ.Ü. İşletme İktisadi Enstitüsü/ MBA                            | 2009 |
| Lisans        | İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü        | 2007 |
| Lise          | Büyüçekmece Y.D.A. Lisesi                                       | 2002 |