



T.C.

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**



**ÜRE TAYİNİ İÇİN TEK KULLANIMLIK
AMPEROMETRİK BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ
ARZU EKER**

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÜRE TAYİNİ İÇİN TEK KULLANIMLIK
AMPEROMETRİK BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ
ARZU EKER

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih:**29/08/2019**

Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Zikriye ÖZBEK

ÇANAKKALE

Arzu EKER tarafından Doç.Dr. Zikriye ÖZBEK yönetiminde hazırlanan ve 29/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Üre Tayini İçin Tek Kullanımlık Amperometrik Biyosensör Geliştirilmesi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Doç. Dr. Zikriye ÖZBEK

Başkan

Doç. Dr. Yaser AÇIKBAŞ

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Emin

YAKAR

Üye

Prof.Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Arzu EKER

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleŐtirilmesinde, çalıŐmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Zikriye ÖZBEK'e, çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen sevgili eŐim Ramis EKER ve ocuklarım Boğaç Berke EKER ve Beren EKER'e, benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen annem Nurten AKDEMİR, babam Adem AKDEMİR ve kardeŐim Murat AKDEMİR'e sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Arzu EKER

anakkale, Ağustos 2019

SİMGELER VE KISALTMALAR

PB	Prusya Mavisi
SPE	Screen-printed elektrot
g	Gram
%	Yüzde oranı
mM	Mili Molar
μ M	Mikro Molar
M	Molar
μ A	Mikro Amper
A	Amper
V	Volt
s	Saniye
dk	Dakika
O ₂	Oksijen
pH	Power of Hydrogen
Pt	Platin çalışma elektrodu
(NH ₂) ₂ CO	Üre
Ag/AgCl	Gümüş/Gümüş Klorür Çalışma elektrodu
GA	Gluteraldehit
NH ₃	Amonyak
HCl	Hidrojen Klorür
KCl	Potasyum Klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
CO ₂	Karbondioksit
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu

ÖZET

ÜRE TAYİNİ İÇİN TEK KULLANIMLIK AMPEROMETRİK BIYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Arzu EKER

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Zikriye ÖZBEK

29/08/2019, 46

Biyosensörler biyolojik reaksiyonlarda hedef analitleri kontrol etmek için kullanılan ufak algılayıcı aygıtlardır. Biyosensörlerin hedefi, tayin edilecek materyal miktarına göre orantılı olarak elektriksel işaret üretmektir. Biyosensörler birçok alanda kullanılabilir. Bunların başlıcaları biyomedikal örneklerin analizi ve tıp alanıdır. Günümüzde yaklaşık 200 civarında biyosensör geliştirilmiş ancak, 25'i piyasaya sürülmüştür.

Üre Biyosensörleri ise; çözeltilerdeki üre konsantrasyonu tayininde kullanılan sensörlerdir. Potansiyometrik ölçüm esasına dayanır. Çözeltiye daldırılan iki elektrod arasındaki potansiyel farkının ölçülmesine dayalı konsantrasyon tayini yapılır.

Bu çalışmada da üre tayini yapabilmek için, Screen-printed elektrodları (SPE) kullanılan amperometrik üre biyosensörü geliştirildi. İletken polimer ince film üzerine immobilize edilen üreaz enzim elektrodunun uygun çalışma şartlarının oluşturulması için pH tesiri ve tampon çözeltisi derişimi için ölçülen akım değerleri incelenmiştir. Ardından, biyosensörün istikrarlılığı ve elektrot cevabına etki oluşturacak taneciklerin tesiri belirlenmiştir. Bu biyosensörler, üre yapımının yapıldığı vücuttaki üre seviyesinin çok düşük ve ilk yükseltisinde değerlendirilmesine odaklanır.

Anahtar sözcükler: Üreaz Enzim, Screen-printed Elektrot, Amperometrik, Biyosensör

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF DISPOSABLE AMPEROMETRIC BIOSENSORS FOR UREA DETERMINATION

Arzu EKER

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Bioengineering and Material Engineering

Advisor: Assoc.Prof. Dr. Zikriye ÖZBEK

29/08/2019, 46

Biosensors are small sensor devices used to control target analytes in biological reactions. The purpose of the biosensors is to generate an electrical signal in proportion to the amount of material to be analyzed. Biosensors can be used in many areas. Majority of these are biomedical samples analysis and medicine field. Nearly 200 biosensors have been developed, but around 25 have been commercially marketed.

Urea Biosensors; These are the sensors used to determine the concentration of urea in solutions. It is based on potentiometric measurement. The concentration is determined by measuring the potential difference between two electrodes immersed in the solution.

In this study, amperometric urea biosensor with screen-printed electrodes (SPE) was developed in order to determine urea. For the determination of the optimum working conditions of the urease enzyme electrode immobilized on conductive polymer thin film, the measured pH values, the temperature of the medium and the measured current values for the buffer solution concentration were investigated. Then, the stability of the biosensor and the effect of the particles that can interfere with the electrode response are determined.

Keywords: Urease Enzyme, Screen-printed Electrode, Amperometric, Biosensor

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEZ SINAVI SONUÇ FORMU	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1. Biyosensörlerin Tarihçesi.....	1
1.2. Biyosensör Nedir?	3
1.3. Biyosensörler - Çeşitleri, Nasıl Çalışır ve Uygulamaları.....	5
1.3.1. Biyosensörlerin Çalışması	5
1.3.2. Biyosensör Çeşitleri.....	6
1.3.2.1. Elektrokimyasal Biyosensör	6
1.3.2.2. Amperometrik Biyosensör	6
1.3.2.3. Potansiyometrik Biyosensör	8
1.3.2.4. Kondüktometrik Biyosensör	8
1.3.2.5. Termometrik Biyosensör	8
1.3.2.6. Optik Biyosensör	8
1.3.2.7. Fiber Optik Laktat Biyosensörü.....	9
1.3.2.8. Kan Şekeri için Optik Biyosensörler	9
1.3.2.9. Piezoelektrik Biyosensörler	9
1.3.2.10. İmmün Biyosensörler.....	10
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	11
BÖLÜM 3	
MATERYAL ve YÖNTEM	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Deneylerde Kullanılan Malzemeler.....	19
3.1.1.1. Üre	19
3.1.1.2. Prussian Blue (Prusya Mavisi).....	20
3.1.1.3. Jelatin	21
3.1.1.4. Gluteraldehit	21
3.2. Deneylerde Kullanılan Sistemler	21
3.2.1. Ekran Baskılı Elektrodlar (SPE).....	22
3.2.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)	23
3.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler.....	24
3.3.1. Fosfat Tamponu	24
3.3.2. TRIS Tamponu	24
3.3.3. Prusya Mavisi Çözeltisi	24
3.3.4. Ölçümde Kullanılan Çözelti	25

3.3.5. Üreaz Enzim Çözeltilisi	26
3.3.6. Üre Çözeltilisi	26
3.4. Üre Tayini İçin Enzim Elektrotların Hazırlanması	26
3.4.1. SPE/PB/Üreaz Elektrotların Üre Duyarlılıklarının Tespiti	27
3.4.2. Üre Biyosensörünün İmmobilizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu	27
3.4.2.1. Jelatin Etkisi.....	28
3.4.2.2. Gluteraldehit Miktarının Etkisi	28
3.4.2.3. Tampon Cinsinin Etkisi	28
3.4.2.4. Tampon Derişiminin Etkisi.....	28
3.5. Biyosensörün Karakterizasyonu.....	29
3.5.1. Cevap Zamanı.....	29
3.5.2. Biyosensörün Tekrarlanabilirliği, Üretilirliği.....	29
BÖLÜM 4	
ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	30
4.1. Üre Enzim Elektrodu.....	30
4.1.1. Enzim Elektrotlarının Üreye Karşın Duyarlılığı	30
4.1.2. Hazırlanan Biyosensörün Optimizasyonuna Ait Bulgular	31
4.1.2.1. Jelatin Miktarı Biyosensör Cevabına Tesiri.....	31
4.1.2.2. Gluteraldehit (GA) Oranının Biyosensör Cevabına Etkisi	32
4.1.2.3. Tampon Cinsinin Biyosensör Cevabına Etkisi	33
4.1.2.4. Tampon Derişiminin Biyosensör Cevabına Etkisi.....	34
4.1.2.5. Cevap Süresinin Biyosensöre Etkisi	35
4.1.2.6. Tekrar Edilebilirliğinin Biyosensör Cevabına Etkisi.....	36
4.1.2.7. Biyosensör AFM Sonuçları	37
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	39
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ	I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Bir biyosensörün ana bileşenlerini gösteren şematik diyagram: (a) biyokatalizör, (b) dönüştürücü, (c) işlemci, (d) yülseletici, (e) görüntüleme	4
Şekil 1.2. Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması	6
Şekil 1.3. Amperometrik temelli biyosensörün ana öğeleri.....	7
Şekil 1.4. Kuartz Kristal mikrobals biyosensördeki piezoelektrik kristal yapısı, (a) üst görünüm, (b) yan görünümü	9
Şekil 3.1. Dropsens-stat400 analiz sistemi	22
Şekil 3.2. Ekran Baskılı Elektrot (SPE) Gösterimi	23
Şekil 3.3. Atomik Kuvvet Mikroskobu çalışma prensibi.....	23
Şekil 3.4. Amperometrik SPE analiz sistemi	25
Şekil 3.5. Hazırladığımız enzim elektrotlar	27
Şekil 4.1. Enzim elektrodun üre duyarlılığı (0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu, +0,65 V, 25 °C)	31
Şekil 4.2. Enzim elektroduna jelatin miktarı tesiri (0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu, +0,65 V, 25 °C)	32
Şekil 4.3. Enzim elektrodunun cevabına GA oranının tesiri (0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu, +0,65 V, 25 °C)	33
Şekil 4.4. Enzim elektrot cevabına tampon cinsi etkisi (a) 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu, (b) 0,05 M pH 7,4 TRİS tamponu (+0,65 V, 25 °C).....	34
Şekil 4.5. Enzim elektrot cevabının tampon konsatrasyonunun etkisi (pH 7,4 fosfat tamponu, +0,65 V, 25 °C)	35
Şekil 4.6. Enzim elektrodunun cevap süresi (a) $1,0 \times 10^{-5}$ M üre ve (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M üre (0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu, +0,65 V, 25 °C)	36
Şekil 4.7. Enzim elektrodun tekrar edilebilirliğinin incelenmesi (0,05 M pH=7,4 fosfat tamponu, 25 °C)	37
Şekil 4.8. Elektrodun üç boyutlu AFM görüntüsü $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ (a) Sadece SPE (b) SPE/PB/Üreaz	38

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Bir biyosensör, biyolojik sinyali elektrik sinyaline dönüştüren analitik bir cihazdır. “Biyosensör” terimi genellikle, doğrudan biyolojik bir sistemden yararlanmadıkları durumlarda bile, maddelerin biyolojik konsantrasyonunu ve diğer parametrelerin konsantrasyonunu belirlemek için kullanılan sensör cihazlarını kapsamaktadır. Bu çok geniş tanım, bazı bilimsel dergiler tarafından (örn., *Biyosensörler*, Elsevier Uygulamalı Bilimler) kullanılmaktadır. Biyosensörler, enzimlere biyolojik olarak cevap veren materyal olarak ilişkindirilsede, diğer biyolojik sistemlerin örneğin tüm hücre metabolizması, ligand bağlanması ve antikör-antijen reaksiyonu tarafından da kullanılabilirliği kabul edilmelidir. Sağlık endüstrisinden gelen büyük ivme (örneğin, batı dünyasının% 6'sı diyabetiktir ve glikoz için hızlı, doğru ve basit bir biyosensörün kullanılabilirliğinden faydalanacaktır), ayrıca gıda kalitesi değerlendirmesi ve çevresel izleme gibi diğer alanlardan gelen bazı baskılarla, biyosensörler, şu anda, % 60'lık yıllık büyüme oranı ile, hızla genişleyen bir alanı temsil eder. Tahmini dünya analitik piyasası yılda 12.000.000.000 civarındadır ve bunun % 30'u sağlık alanındadır. Bu pazarın şu anda % 0.1'den az oranda biyosensörler tarafından kullanılıyor olmakla birlikte geniş bir pazar genişleme potansiyeli olduğu açıktır. Bu alanda araştırma ve geliştirmeler geniş ve çok disiplinlidir; biyokimya, biyoreaktör bilimi, fiziksel kimya, elektrokimya, elektronik ve yazılım mühendisliği gibi. Bu güncel çabanın çoğu, potansiyometrik ve amperometrik biyosensörler ve kolorimetrik kağıt enzim şeritleri ile ilgilidir. Ancak, tüm ana güç çevirici tiplerinin, biyosensörlerde kullanılmak üzere, önümüzdeki birkaç yıl boyunca, kapsamlı bir şekilde incelenmesi muhtemeldir.

1.1. Biyosensörlerin Tarihçesi

1956'da Clark, oksijen elektroduna ait makalesini yayınladı. Bu deneyime dayanarak ve vücutta ölçülebilen analitlerin yelpazesini genişletme isteğini ele alarak, 1962 yılında New York Akademisi'nin bir sempozyumunda membran kapalı sandviçler olarak enzim dönüştürücüleri ekleyerek elektrokimyasal sensörleri (pH, polarografik, potansiyometrik veya kondüktometrik) nasıl daha uygulanabilir hale dönüştüreceğini tanımlamış ve bu bir dönüm noktası olmuştur. Uygulama, diyaliz membranı kullanılarak bir oksijen elektrodunda glikoz oksidazın tutulduğu bir deneyle gösterilmiştir. Ölçülen oksijen konsantrasyonundaki düşüş, glikoz konsantrasyonuna orantılıdır.

Potansiyometrik bir enzim elektrotunu detaylandıran ilk kişi Guilbault ve Montalvo'dır. Amonyum-seçici bir sıvı membran elektrodunda hareketsizleştirilmiş üreaz bazında bir üre sensörü tanımlamışlardır. Clark'ın fikirleri, 1975'te Yellow Springs Instrument Company (Ohio)'da hidrojen peroksidin amperometrik tespitine dayanan, glikoz analizörü ile ticari gerçekliğe dönüşmüştür. Bu, dünyanın dört bir yanındaki şirketler tarafından inşa edilen birçok biyosensör bazlı laboratuvar analizcisinin de ilki olmuştur.

Biyosensörler için termal transdüserlerin kullanımı 1974 yılında önerilmiştir ve yeni cihazlar sırasıyla, ısı enzim problemleri ve enzim termistörleridir.

Biyosensör, 1975'te, Divis'in, alkol ölçümü için mikrobik elektrotlardaki biyolojik element olarak bakterilerin kullanılabilmesini öne sürmesiyle yeni bir evrimsel yol almıştır. Bu çalışma Japonya'da ve diğer yerlerde biyosensörlerin biyoteknolojik ve çevresel uygulamalarında büyük bir araştırma başlangıcı olmuştur. Lubbers ve Opitz, 1975 yılında optode terimini, karbon dioksit veya oksijeni ölçmek için immobilize göstergeli bir fiber optik sensörü tanımlamak için kullanmışlardır. Uygulamayı, fiber optik bir sensörün sonunda alkol oksidazı hareketsizleştirerek alkol için optik bir biyosensör yapmak üzere genişletmişlerdir. Ticari optoidler, pH, pCO₂ ve pO₂'nin in vivo ölçümü için mükemmel performans göstermektedirler, ancak enzim optoidleri henüz geniş çapta mevcut değildir. 1976'da Clemens ve arkadaşları yapay pankreasta elektrokimyasal glikoz biyosensörünü birleştirmiş ve bu daha sonra Biostator olarak Miles (Elkhart) tarafından pazarlanmıştır. Biostator artık piyasada bulunmamakla birlikte, San Diego'da yeni bir yarı sürekli kateter tabanlı kan şekeri analiz cihazı yakın zamanda VIA Medical tarafından tanıtılmıştır. Aynı yıl içerisinde La Roche (İsviçre), çözünür aracı olan Lactate Analyzer LA 640'ı tanıtmış ve hekzasiyanoferrat, elektronları laktat dehidrojenazdan bir elektrota yönlendirmek için kullanılmıştır. Bu zaman içinde ticari bir başarı olmamasına rağmen, yeni nesil arabulucu-biyosensörlerin ve spor ve klinik uygulamalar için laktat analizörlerinin geriye dönük olarak önemli bir öncüsü olmuştur.

1982 yılında deri altı implantasyon için ilk iğne tipi enzim elektrotunu tanımlayan Shichiri ve arkadaşları Glikoz biyosensörlerinin in vivo uygulamasında büyük bir ilerleme kaydetmiştir. Şirketler hala bu uygulamayı takip ediyorlar, ancak genel kullanım için henüz bir cihaz mevcut değildir. Piezoelektrik veya potansiyometrik transdüserlere karşı antikorları sabitleyerek doğrudan immünosensörler kurma fikri 70'lerin başından beri araştırılmıştır ama aslında bu Liedberg ve arkadaşlarının çalışmasıdır. Gerçek zamanlı

olarak afinite reaksiyonlarını izlemek için yüzey plazmon rezonansı kullanımını tarif etmişlerdir.

Biyosensörler olarak adlandırılan üç “nesil” vardır; Reaksiyonun normal ürününün transdüserine yayıldığı ve elektriksel tepkimeye neden olduğu birinci jenerasyon biyosensörler, İyileştirilmiş yanıt elde etmek için reaksiyon ve dönüştürücü arasında belirli 'aracıları' içeren ikinci nesil biyosensörler, ve reaksiyonun kendisinin tepkiye neden olduğu ve hiçbir ürün ya da mediyatör difüzyonunun doğrudan söz konusu olmadığı üçüncü jenerasyon biyosensörler.

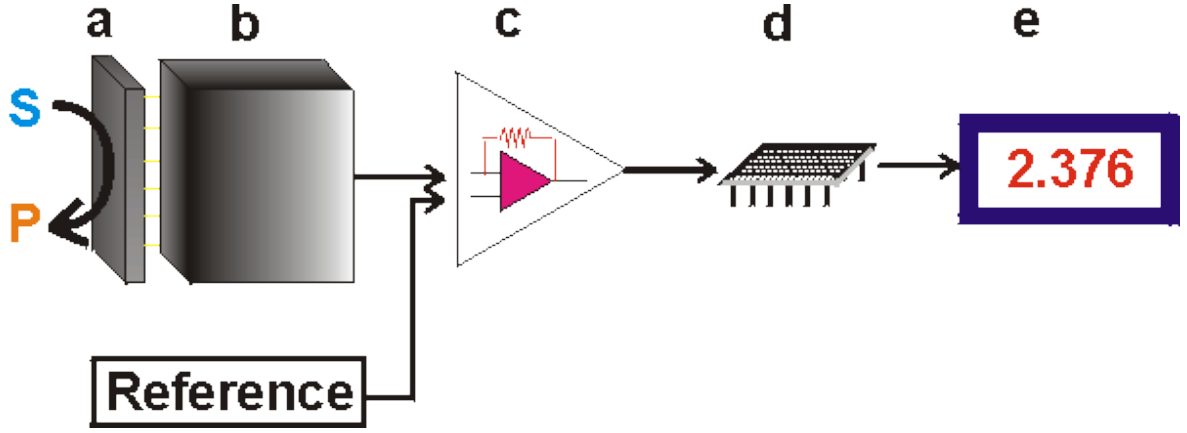
1.2. Biyosensör Nedir?

Biyosensör, analiti tespit etmek için kullanılır. Analitik bir cihazdır ve biyolojik bileşenleri bir fizikokimyasal dedektör ile toplar. Algılayıcı biyolojik unsurlar, biyometrik bileşenlerdir. Doku, mikroorganizmalar, antikolar, nükleik asitler gibi bileşenleri tanımak ve analiz etmek için etkileşirler. Biyolojik hassas unsurlar ayrıca biyolojik mühendislik tarafından da üretilebilir. Detektör elemanları, analit arayüzünden gelen sinyalleri biyokimyasal elementler ile transdüser gibi diğer sinyallere dönüştürür ve daha kolay ve kaliteli olarak ölçülebilir. Biyosensör cihazları, elektronik ve sinyal işlemcileri ile ilişkilidir ve genellikle sonuçların görüntülenmesinden sorumludur. Modern elektroniklerin geliştirilmesinde biyosensör araştırmasının önemli bir rolü vardır.

Biyosensör sistemi üç ana kısımdan meydana gelmektedir. “Biyomolekül, biyoseçici”; seçici tanıma mekanizmasına sahiptir.

“Çevirici”;biyoseçicinin incelenen materyal ile etkileşimi neticesinde meydana gelen fiziko kimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürür.

“Elektronik” kısımlardır. Bunların içinde önemli olan, analiz yapılacak materyali tanıyan ancak geri dönüşümlü olarak etkileşen, hassas biyoseçicidir.



Şekil 1.1. Bir biyosensörün ana bileşenlerini gösteren şematik diyagram: (a) biyokatalizör, (b) dönüştürücü, (c) işlemci, (d) yükseltici, (e) görüntüleme

Biyokatalizör (a), substratı ürüne dönüştürür. Bu reaksiyon, bir elektrik sinyaline dönüştüren dönüştürücü (b) tarafından belirlenir. Dönüştürücüdən gelen çıktı (c) yükseltilir, işlenir (d) ve görüntülenir (e). Bir biyosensörün anahtar kısmı, transdüserdir.

Dönüştürücüdən gelen elektrik sinyali genellikle düşüktür ve göreceli olarak yüksek ve gürültülü (yani elektriksel girişimden dolayı veya dönüştürücünün elektronik bileşenleri içinde üretilen yüksek oranda rastgele bir doğa bileşeni içeren yüksek frekanslı bir sinyal bileşeni içerir) taban çizgisine bindirilir. Sinyal işleme, normal olarak, herhangi bir biyokatalitik membran içermeyen benzer bir transdüserden türetilen, bir örnek sinyalden çıkan, sonuç sinyalini kuvvetlendiren ve istenmeyen sinyal gürültüsünü elektronik olarak filtreleyen (yumuşatma) bir "referans" başlangıç sinyalini çıkarmayı içerir. Biyosensör tepkisinin nispeten yavaş doğası, elektriksel gürültü filtreleme problemini önemli ölçüde kolaylaştırır. Bu aşamada üretilen analog sinyal doğrudan çıktı olabilir, ancak genellikle bir dijital sinyale dönüştürülür ve verilerin işlendiği, konsantrasyon birimlerine dönüştürüldüğü ve bir gösterim aygıtına veya veri deposuna dönüştürüldüğü bir mikroişlemci aşamasına geçirilir.

Başarılı bir biyosensör, aşağıdaki yararlı özelliklerin en azından bir kısmına sahip olmalıdır:

1. Biyokatalizör, analizler için yeterince özel, doğal saklama şartlarında durağan olmalı ve kolorimetrik enzim şeritleri ve dipsticks durumunda, çok sayıda test üzerinde iyi stabilite göstermelidir (örn. Çok daha büyük 100'den).

2. Tepkime, karıştırılabilen, pH ve sıcaklık olarak yönetilebilen fiziksel parametrelerden bağımsız olmalıdır. Bu, minimum ön işleme ile numunelerin analizine izin

verir. Reaksiyon kofaktörler veya koenzimler içerdiğinde, bunlar tercihen enzim ile birlikte ko-immobilize edilmelidir.

3.Tepki, seyreltme veya konsantrasyon olmadan, doğru, kesin, tekrarlanabilir ve kullanışlı analitik aralık üzerinde doğrusal olmalıdır. Elektriksel gürültüden de arınmış olmalıdır.

4.Biyosensör tıp alanlarında vücut içi takip için uygulanacaksa, algılayıcının hiçbir toksik veya antijenik etkisi olmayan, küçük ve biyo-uyumlu olması gerekir. Fermenterlerde kullanılacaksa sterilize edilebilir olmalıdır. Bu, tercihen otoklavlama ile gerçekleştirilir, Hiçbir biyosensör enzimi, hali hazırda bu tür ıslak ısı işlemlere dayanamaz. Her iki durumda da, biyosensör kirlenme veya proteoliz olmaya eğilimli olmamalıdır.

5.Bir biyosensör, düşük maliyetli, ufak, taşımaya uygun ve tüm kullanıcılar için kullanılmaya uygun olmalıdır.

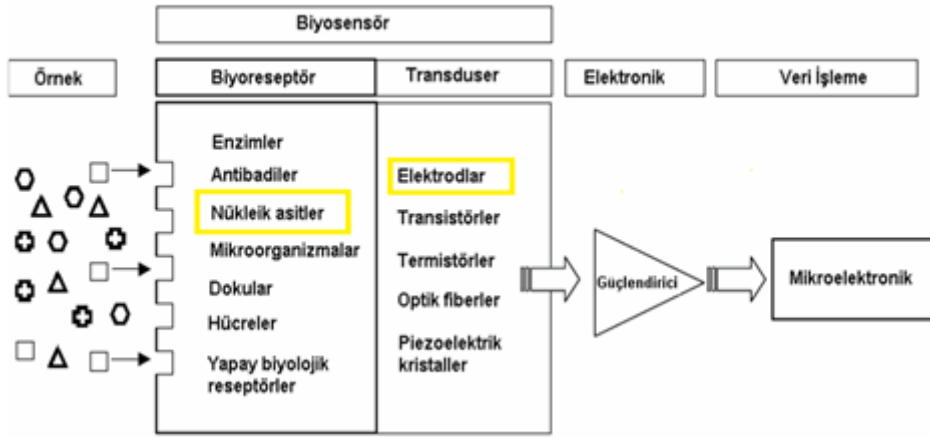
6.Biyosensör için bir pazar olmalıdır. (ör. Devlet sübvansiyonları, kalifiye analistlerin sürekli istihdamı veya kötü müşteri algısı)

1.3. Biyosensörler - Çeşitleri, Nasıl Çalışır ve Uygulamaları

Biyosensör, analiti tespit etmek için kullanılır. Biyosensör analitik bir cihazdır ve biyolojik bileşenleri bir fizikokimyasal dedektör ile toplar. Algılayıcı biyolojik unsurlar, biyometrik bileşenlerdir doku, mikroorganizmalar, antikolar, nükleik asitler gibi bileşenleri tanımak ve analiz etmek için etkileşirler. Detektör elemanları, analit arayüzünden gelen sinyalleri biyokimyasal elementler ile transdüser gibi diğer sinyallere dönüştürür ve daha kolay ve kaliteli olarak ölçülebilir. Biyosensör cihazları, elektronik ve sinyal işlemcileri ile ilişkilidir ve genellikle sonuçların görüntülenmesinden sorumludur ve kullanıcı dostudur. Modern elektroniklerin geliştirilmesinde biyosensör araştırmasının önemli bir rolü vardır.

1.3.1. Biyosensörlerin Çalışması

Enzim gibi tercih edilen biyolojik materyal, fiziksel veya membran tutulması ve kovalent olmayan veya kovalent bağlanma gibi geleneksel yöntemler için tercih edilir. Tercih edilen biyolojik materyal, dönüştürücü ile temas halindedir. Analit aracılığıyla bir bağlı analit üretmek için, ölçülecek elektriksel cevabı üreten biyolojik maddeye bağlanır. Bazı durumlarda, analit bir ürüne dönüşmüştür ve ısı, oksijen, elektron veya hidrojen iyonları gibi gazların salınımı ile ilişkilendirmek için bazı olasılıkları vardır.



Şekil 1.2. Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması

1.3.2. Biyosensör Çeşitleri

Sensör cihazlarına ve biyolojik materyallere dayanan farklı biyosensörler vardır ve bunların etki tepki mekanizmasına göre biyosensörler sınıflandırılmıştır;

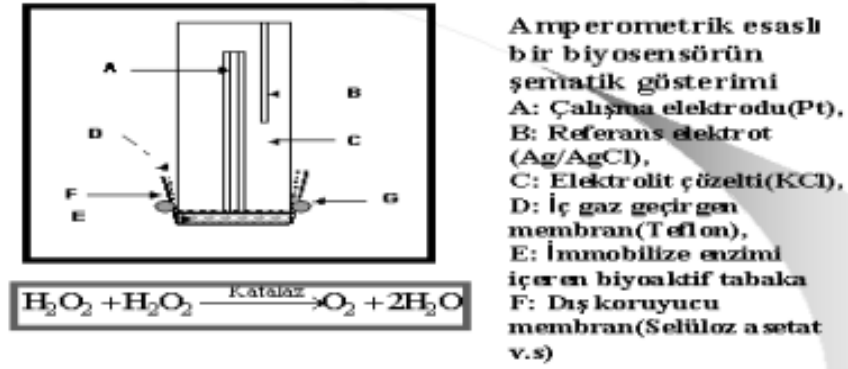
1. Reaksiyonla ısı çıkışı (veya absorbe) (kalorimetrik biyosensörler),
2. Elektrik potansiyelinin üretilmesine neden olan yüklerin dağılımındaki değişiklikler (potansiyometrik biyosensörler),
3. Redoks reaksiyonunda üretilen elektronların hareketi (amperometrik biyosensörler),
4. Reaksiyon sırasında ışık çıkışı veya reaktantlar ve ürünler (optik biyosensörler) arasındaki bir ışık absorbans farkı,
5. Reaktanların veya ürünlerin kütlesine bağlı etkiler (piezo-elektrik biyosensörler).

1.3.2.1. Elektrokimyasal Biyosensör

Elektrokimyasal Biyosensörler basit bir cihazdır. Elektronik akımın, iyonik ölçümlerin veya biyopatın elektrotlar tarafından taşınan iletkenlik değişikliklerini ölçer.

1.3.2.2. Amperometrik Biyosensör

Biyosensörler elektron hareketine, yani enzim katalizli redoks reaksiyonunun bir reaksiyonu olarak elektronik akım tayinine dayanır. Genel olarak normal bir temas voltajı analiz etmek için elektrotlardan geçer. Substrat veya ürünü üreten enzimatik reaksiyonda, elektronları indirilecek elektrot yüzeyi ile transfer edebilir.



Şekil 1.3. Amperometrik temelli biyosensörün ana öğeleri

Sonuç olarak alternatif bir akım akışı ölçülebilir. Substrat konsantrasyonu, akımın büyüklüğü ile doğru orantılıdır. Oksijenin indirgenmesi oksijen elektrotları yoluyla elde edilir ve Amperometrik bir biyosensörden basit bir yoldur. Örnek, glikozun glikoz ile belirlenmesidir.

Yukarıdaki açıklama, birinci nesil Amperometrik biyosensör ile ilgilidir ve elektrotlardan salınan elektronların bir miktar aktarımı bazı zorluklara sahiptir. İkinci kuşak Amperometrik biyosensörler, bir arabulucuda elektronları alır ve elektrotlara aktarırlar. Kan şekeri biyosensörleri diyabetik hastalar için dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır. Glikoz okside tek kullanımlık elektrotlar ve bir medyatör türevleri (Ferrocence) vardır ve kan şekeri biyosensörünün şekli bir göz kalemine benzemektedir. Kan şekeri Biyosensörü, Amperometrik Biyosensörün iyi bir örneğidir.

1.3.2.3. Potansiyometrik Biyosensör

Bu tür biyosensörlerde, pH elektrotlarında iyon seçici elektrotlar tarafından belirlenen iyonik konsantrasyon belirlenir. Dolayısıyla, hidrojen iyonlarının salınmasında çok miktarda enzimatik reaksiyon söz konusudur. Bunlar amonyağı seçen ve karbondioksit seçen problardır.

Potansiyometrik elektrot ve referans elektrot potansiyel farkın yardımıyla tayin edilebilir ve seçici derişimiyle doğru orantılıdır. Potansiyometrik Biyosensörler, enzimlerin H^+ ve NH_4^+ gibi iyonik konsantrasyonlara duyarlıdır.

İyon seçici alan etkili transistörler potansiyometrik biyosensörlerin minyatürleştirilmesinde kullanılabilirler.

1.3.2.4. Kondüktometrik Biyosensör

Biyolojik sistemde, iyonik türleri değiştiren çeşitli reaksiyonlar vardır. Elektronik iletkenlik, iyonik bir türün yardımıyla ölçülebilir. Hareket metriği Biosensor örneği immobilize alanları kullanan üre Biyosensörüdür. Gerçekleşen reaksiyonlarda iyon konsantrasyonundaki büyük değişiklik bunlar, üre konsantrasyonunun izlenmesi için kullanılır. Genellikle diyaliz ve böbrek cerrahisi sırasında üre Biyosensörü çok faydalıdır.

1.3.2.5. Termometrik Biyosensör

Isı üretimi ile bağlantılı birçok daha fazla biyolojik reaksiyon vardır ve bu, termometrik biyosensörlerin temelini oluşturur. Isı değişimi ile sabitlenmiş bir ısı yalıtımlı kutudan oluşmaktadır.

1.3.2.6. Optik Biyosensör

Optik Biyosensör floresan, absorbans vb. gibi optik ölçümlerin prensibini kullanan bir cihazdır. Fiber optik ve Optoelektronik dönüştürücülerde kullanılırlar. Optik Biyosensörler, malzemelerin elektriksiz uzaktan algılanması için güvenlidir. Dönüştürücü elemanlarda öncelikle optik biyosensörler enzimlerde ve antikordlarda bulunur. Genellikle biyosensörler herhangi bir referans sensörü gerektirmez ve örnekleme sensörü kullanılarak karşılaştırmalı sinyaller üretilir. Bunlardan en önemli olanları;

1.3.2.7. Fiber Optik Laktat Biyosensörü

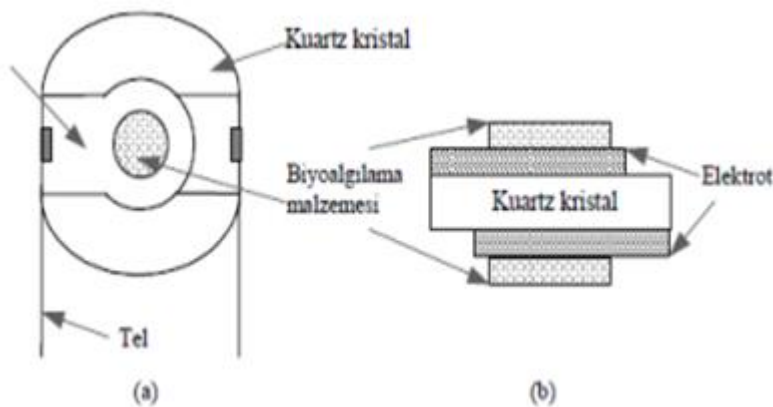
Fiber optik laktat Biyosensörün çalışması, oksijen konsantrasyonundaki değişimin, moleküler floresan boyadaki oksijenin etkilerini belirleyerek, moleküler ölçümüne dayanmaktadır.

1.3.2.8. Kan Şekeri için Optik Biyosensörler

Diyabet hastaları için kan şekerinin izlenmesi daha önemlidir. Bu basit teknikte, yani glikoz oksit, Horseradish Peroksidaz ve Chromogen içeren reaktiflerle doymuş kağıt şeritler kullanılır. Taşınabilir yansıma ölçer kullanarak boya renginin yoğunluğu ölçülebilir. Dünya çapında glikoz şerit endüstrisi çok yüksektir. Uygun enzimler ve reaktiflerle kaplı kalorimetrik test şeritleri, daha fazla kan ve idrar parametrelerinin görünümü için kullanılmaktadır. Diğer Optik Fiber Biyosensörler optik biyosensör cihazlarında pCO₂'yi ve kritik bakım ve cerrahi izlemeyi ölçer.

1.3.2.9. Piezoelektrik Biyosensörler

Piezoelektrik Biyosensör prensibi ses titreşimlerinde kullanılır, dolayısıyla akustik Biyosensörler olarak adlandırılır. Biyosensörlerin temelleri piezoelektrik kristaller tarafından oluşturulur ve karakteristik frekanslar pozitif ve negatif yükün kristalleri ile titreşir. Elektronik cihazları kullanarak kristal yüzeyindeki bazı molekülleri ölçebilir ve inhibitörleri ekleyebildiğimiz bu kristalleri kullanarak yanıt frekanslarını değiştirebiliriz. Gaz fazındaki kokain için biyosensörler, kokain antikörlerini kristalin yüzeyine tutturmak suretiyle geliştirilmiştir.



Şekil 1.4. Kuartz Kristal mikrobals biyosensördeki piezoelektrik kristal yapısı, (a) üst görünüm, (b) yan görünümü

1.3.2.10. İmmün Biyosensörler

İmmün Biyosensörler, immünolojik özgüllük prensibi üzerinde çalışır ve çoğunlukla Potansiyometrik Biyosensörler üzerinde ölçümle birleştirilir. Bağışıklık Biyosensörleri için olasılıkların farklı konfigürasyonları vardır, bunların bazıları aşağıda verilmiştir ve şekil açıklamayı göstermektedir.

İmmün Biyosensörler;

- Hareketsizleştirilmiş antikor antijen boyunca doğrudan birleşebilir.
- Hareketsizleştirilmiş antijen, ikinci bir serbest antijene dönüşebilen antikor ile birleşebilir.
- Hareketsizleştirilmiş antikor, serbest antijenler ve enzim işaretli antijenle birlikte muhalif olarak birleştirilmiştir.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Üreaz enzimi hidrolaz sınıfındandır. Soya fasulyesinden 1926 senesinde Sumner aracılığıyla kristal halinde üretilmiş üre enzimoloji geçmişinin en bilinen olayıdır. Enzimoloji tarihinde ilk olarak bir enzim saf haliyle üretilmiş ve enzimlerin içeriğinde proteinin varlığı tam olarak gözlemlenmiştir. Enzim içeriği X ışınları Kristal Yapı Analizi ile 1930'larda bulunmuş ancak, enzim içeriğinin daha net anlaşılması bilgisayar teknolojisinin gelişmesiyle 1967 yılında gerçekleşmiştir (Kara, 2006).

Bir molekül üre hidrolizi ile amonyak ve bir karbondioksit molekülü olmak üzere iki molekül açığa çıkar.

Bakteri, mantar ve bitkilerde üreaz enzimi bulunmaktadır. Üreyi azot ve karbondioksit çevirerek azot döngüsünde önemli bir yer tutmaktadır. Bunun yanı sıra zirai gübrelemede ürenin hidrolizini hızlandırmada, canlılarda birçok hastalıkların meydana gelmesinde etkilidir.

Üreaz aktivitesine dayanan çeşitli analizler ve yöntemler geliştirilmiş olup bunlar: iyon seçici elektrotlar, fenol-hipoklorit ile reaksiyon (Berthelot Yöntemi), Nesler'in reaktifi, çift enzim yöntemi ile yapılan analizlerdir.

Üre ile ilgili yapılan çalışmalar incelenip kısaca belirtilmiştir;

Marchenko ve arkadaşları; kan serumunda ve hemodiyalizatta üre tespiti için rekombinant üreaz esaslı potansiyometrik biyosensör uygulaması çalışmasında üre tespiti için iki aynı pH'ye duyarlı alan etkili transistöre dayalı potansiyometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Diyalizat numunelerinin biyosensör ölçümleri, üre'nin geleneksel kolorimetrik tayini ile doğrulanmıştır.

Önerilen biyosensör, farklı üre konsantrasyonlarına sahip numunelerin analizi ve hemodiyaliz kontrolü için etkili bir şekilde kullanılabilir. Dahası, biyosensörün özellikleri hemodiyaliz sırasında diyaliz sıvısını çalışma hücrelerine pompalayarak olası üre konsantrasyonlarının gerçek zamanlı olarak ölçülmesini sağlar. Biyosensör, 5 aylık depolamada tepkilerin anlamlı bir şekilde azalmadığını göstermiştir (Marchenko ve ark., 2015).

Michalec ve arkadaşları; hemodiyaliz tedavileri sırasında suni böbrek tarafından üretilen atık sıvıdaki üre tayini için ayrılmış akışlı optoelektronik cihazlara ve mikrosiloidoid pompalara ve vanalara dayanan üç kompakt akış analiz sistemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen fotometrik cihazlar çift detektör diyodu prensibine göre

çalışır. İlk akış analiz sistemi için enzimatik olarak üreazla modifiye edilmiş pH duyarlı filmi temel alan bir optoelektronik üre biyosensörü uygulanmıştır. İkinci sistemde Berthelot reaksiyonu ile açık boru şeklindeki üreaz biyosensörü ve amonyak optik dedektörü kullanılmıştır. Üçüncü enzimatik olmayan analitik sistem, üre ile modifiye Ehrlich reaktifi reaksiyonunda oluşan ürünün optoelektronik dedektörüne dayanır (Michalec ve ark.,2016).

Nauman Ali ve arkadaşları Standart ekleme ve 2.derece türev yöntemleri ile gümüş nanopartikülleri kullanarak gerçek örneklerde üre tayini için spektrofotometrik yöntemler geliştirmişlerdir. Bu çalışmada, gümüş nanoparçacıklar (AgNPs) kullanarak idrar örneklerinde üre spektrofotometrik belirlenmesi için basit, hassas ve ucuz yöntemler geliştirmişlerdir (Nauman Ali ve ark.,2018).

Alizadeh ve arkadaşları yaptıkları çalışmada idrar, kan serum, toprak ve su gibi çeşitli gerçek örneklerde ürenin seçici ve kesin olarak belirlenmesi için yenilikçi bir yöntem getirmişlerdir. Yöntem üre ile diasetil monoksim reaksiyonu sırasında üretilen elektroaktif bir ürünün kare dalga voltametriyi tayini üzerine kurulmuştur (Alizadeh ve ark., 2017).

Suman ve arkadaşları insana ait serumdaki üre tayini için bir biyosensör geliştirmişlerdir. Bu biyosensör mürekkep püskürtmeli basılmış polianilin nanopartiküllerinin ve mürekkep püskürtmeli basılmış üreaz enziminin serigraf baskılı karbon pastası elektrotlarına ardışık olarak bir araya getirilmesinin bir kombinasyonu kullanılarak imal edilmiştir (Suman ve ark., 2011).

Jakhar ve arkadaşları geliştirilmiş bir potansiyometrik üre biyosensörünün inşası için üreaz nanopartiküllerinin hazırlanması, karakterizasyonu ve uygulanması ile ilgili çalışma yapmışlardır (Jakhar ve ark.,2018).

Kuralay ve arkadaşları poli (vinilferrosenyum) filmde immobilize üreaz kullanarak üre tespiti için amperometrik enzim elektrodu geliştirmişlerdir (Kuralay ve ark., 2006).

QunWang ve arkadaşları üre kremasındaki üre bileşeninin tayini için bir santrifüj bölüm kromatografisi (CPC) yöntemi geliştirmişlerdir. Önerilen CPC yöntemi, karmaşık örnek ön-muamele süreçleri olmadan hassasiyet ve rahatlık sunmaktadır (QunWang ve ark., 2016).

Gündüz ve arkadaşları üre'nin kantitatif tayini için bir potansiyometrik yöntem önermişlerdir. Bu yöntem yarı mikro Kjeldahl yönteminden daha hızlı ve daha az maliyetlidir. Buna ek olarak, doğruluğu Kjeldahl'ın yöntemiyle neredeyse aynıdır. Verilen

bir numunenin analizi yaklaşık 30 dakika içinde tamamlanmaktadır (Gündüz ve ark., 1994).

Dinh ve arkadaşları Oksazin 170 perklorat-etil selüloz zarı üzerinde hareketsizleştirilen üreaza dayalı bir rasyometrik fluoresan üre biyosensörünü geliştirmişlerdir (Dinh ve ark., 2015).

Courrol ve arkadaşları Eupropyum tetrasiklin probunu kullanarak tam kandaki üre hidrojen peroksit tayinini yapmışlardır (Courrol ve ark., 2006).

Eggensteinab ve arkadaşları Amonyuma duyarlı bir transdüktöre dayanılarak kanda üre tespiti için tek kullanımlık bir biyosensör geliştirmişlerdir. Dönüştürücü olarak çift matris membran (DMM) teknolojisinde bir NH_4^+ hassas atılabilir elektrot kullanan potansiyometrik üreye duyarlı biyosensör tarif edilmektedir (Eggensteinab ve ark., 1999).

Şehitoğulları ve arkadaşları potansiyometrik immobilize üreaz elektrodunun hazırlanması ve serumdaki üre tayini ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. Bu potansiyometrik membran elektrodu, $8.9 \cdot 10^{-5}$ ila 1.110^{-3} M konsantrasyon aralığında üreye doğrusallık sağlar, ancak değişen tampon konsantrasyonu 10^{-4} ila 10^{-2} M üre konsantrasyonu aralığında incelenebilir (Şehitoğulları ve ark., 2002).

Wałcerz ve arkadaşları İnsan serum örneklerinde üre tespiti için bir akış enjeksiyon sistemindeki potansiyometrik enzim elektrotu geliştirmişlerdir. Amonyum iyonu seçici elektrotun membranına doğrudan kovalent bağlı üreazı olan bir üre biyo-sensörü geliştirilmiştir (Wałcerz ve ark., 1998).

Yong ve arkadaşları bir ekran baskılı inter-digitated dizi (IDA) elektrot üzerinde sol-jel ile hareketsizleştirilmiş üre bazlı bir iletkenlik üre biyosensörü geliştirmişlerdir (Yong ve ark., 2000).

Boubriak ve arkadaşları İyon duyarlı alan etkili transistör temelli bir üreaz biyosensörü ile serumda üre tayini yapmışlardır. Solüsyonlardaki ve kan serumundaki üre tayini için bir üreaz biyosensörü, iyon duyarlı bir alan etkili transistörün (ISFET) yüzeyindeki sığır serum albümin membranında üreazı immobilize ederek analiz etmişlerdir (Boubriak ve ark., 1995).

Uchiyama ve arkadaşları; İyon kromatografisi ile immobilize bir üreaz reaktörü kullanarak üre ölçümü yapmışlardır. Bir hareketsizleştirilmiş üreaz reaktörü, üre ve sodyum, potasyum ve amonyum iyonlarının aynı anda tespiti için iyon kromatografisi ile kullanılabilirliğini sağlamışlardır (Uchiyama ve ark., 1985).

Liu ve arkadaşları; Yüzey akustik dalga cihazını yeşil soya fasulyesinden ekstrakte edilen üreazla birleştirmeyi ve insan idrarında üre belirlenmesini temel alan yeni bir üre

sensörü geliştirmişlerdir. Üre sensörü, 61 MHz'de çalışan bir SAW rezonatörünün ve bir çift paralel elektrodun seri olarak kullanıldığı bir yüzey akustik dalga (SAW) cihazının, yeşil soya fasülyesinden ekstrakte edilen üreazı birleştirerek hazırlanmıştır (Liu ve ark., 1996).

Suzuki ve arkadaşları; Amonyak, kreatinin ve üreyi aynı anda tespit etmek için entegre mikroakışkan sistem geliştirmişlerdir. Mikro akış kanalına dahil edilmiş amonyak, kreatinin ve üre için entegre bir algılama sistemi mikrofabrikasyona tabi tutulmuştur (Suzuki ve ark.,2005).

Schmitt ve arkadaşları Tatlı su numunelerinde amonyak olarak üre tespiti için entegre bir indirgeme metodu geliştirmişlerdir.Kolonometrik tespit ile amonyak olarak üre belirlenerek on-line mikrodalga doğal su örneklerinin hazırlanması için bir akış enjeksiyon sistemi anlatılmıştır (Schmitt ve ark., 1993).

Schubertve arkadaşları; serum örneklerinde üre tayini için fiber optik enzim sensörü geliştirmişlerdir.Serum örneklerinde üre tespiti için fiber optik enzim sensörüne odaklanan bir çalışmayı tartışmaktadır (Schubert ve ark., 1994).

Johansson ve arkadaşları Üre tesbiti için bir enzim reaktörü elektrodunu geliştirmişlerdir (Johansson ve ark., 1976).

Wałcerz ve arkadaşları; İyonofor içermeyen pH membran elektroduna dayalı üre tespiti için enzim biyosensörleri geliştirmişlerdir.İyonofor içermeyen bir pH membran elektroduna dayalı üre tespiti için yeni bir enzimatik sensör tipi oluşturulmuştur. Membran malzemesi, 1,4-diaminobutan ile modifiye edilmiş polivinil kloriddir (Wałcerz ve ark., 1995).

Bjarnasona ve arkadaşları; serumdaki üre tayini için yeni bir termal biyosensör geliştirmişlerdir.Yeni bir termal biyosensör, alümina plakaları üzerinde bir BiTe-termokupl ile ısı iletimi temel alınarak yapılmıştır (Bjarnasona ve ark., 1998).

Berman ve arkadaşları insan serumunda ürenin enzimatik potansiyometrik tayinini yapmışlardır (Berman ve ark., 1978).

Pijanowska ve arkadaşları; pH-ISFET tabanlı üre biyo-sensörü geliştirmişlerdir.Glutaraldehid kullanımı ile hidratlı bir silisyum nitrür yüzey üzerine üreazın doğrudan immobilizasyonu için yeni bir yöntem sunulmuştur (Pijanowska ve ark., 1997).

Guilbault ve arkadaşları; Üre duyarlı bir elektrot ile üre, kan ve idrar tayini yapmışlardır. Ürenin kan ve idrarda doğrudan tahlil edilmesi için özel bir elektrot tarif edilmiştir. Elektrot, bir Beckman katyon elektrotunun yüzeyinin üzerine poliakrilamid

içinde bir üreaz tabakasının hareketsizleştirilmesi ile hazırlanır ve referans olarak kaplanmamış katyon elektrotlu bir iyon değişim sisteminde kullanılır.Yaklaşık% 2-3 hassasiyet ve doğruluk elde edilir (Guilbault ve ark., 1970).

Tek kullanımlık ekran baskılı biyosensörler, hızlı "yerinde" analizler yapmak için artan ihtiyaca cevap veren analitik yöntemlerin geliştirilmesinde başarıyla kullanılmıştır.Bu nedenle, insan sağlığı problemleri, hayvanlar ve bitkiler salgınlarının önlenmesinde önemli rol oynayan mikroorganizmaların erken tespiti bu tür cihazları kullanarak gerçekleştirilmiştir. Dahası, mikroorganizmalar, ilgilenilen farklı analitlerin analizi için hassas mikrobiyal biyosensörlerin geliştirilmesinde biyolojik algılama elemanları olarak kullanılmaktadır (Alonso-Lomillo ve ark.,2010).

Aşağıda bazı çalışmalara örnekler verilmiştir.

Stefano ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; toplu enjeksiyon analizini (BIA) kullanarak omeprazolün ekran baskılı elektrotlarda (SPE) duyarlı amperometrik tayinini yapmışlardır. Yöntemle analiz edilen farmasötik numuneler için, algılama limiti, hassasiyet ve numune verimi gibi özelliklerinin amperometrik tespit ile akış-enjeksiyon analizine göre avantajlarını sunmuşlardır (Stefano ve ark.,2017).

Upan ve arkadaşları; hidrokinonun hassas ve selektif olarak belirlenmesi için akış enjeksiyonlu amperometrik (FI-Amp) sensör geliştirmiştir.Basit bir perde baskılı karbon elektrotu (SPCE) çeşitli nanomalzemelerle değiştirilerek kinon tayininde duyarlılığın geliştirilmesi sağlanmıştır. Sonuç olarak, CNT'nin elektronun kuinona transferine katkıda bulunduğunu gösteren karbon nanotüpü (CNT) ile modifiye edilmiş SPCE'den uygun hassasiyet elde edilmiştir (Upan ve ark.,2016).

Abad ve arkadaşları serigrafi ile basılan karbon elektrotları kullanarak şarapta malik ve glukonik asitlerin eşzamanlı amperometrik tayinini gerçekleştirmişlerdir. Yöntem, hem analitlerin şarapta belirlenmesinde, hem de başarılı sonuçların elde edilmesinde uygulanmıştır (Abad ve ark.,2015).

Dou ve arkadaşları su numunelerinde organofosforlu zirai mücadele ilaçlarının belirlenmesi için ekran baskılı elektrotlara (SPEs) dayanan bir amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir (Dou ve ark.,2012).

Thirumalraj ve arkadaşları modifiye edilmiş bir gümüş nanotel elektrodu kullanarak insan kan serum örneklerinde hidrojen peroksitin amperometrik olarak tespitini yapmışlardır(Thirumalraj ve ark., 2016).

Bergamini ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemde; prokainin herhangi bir ön- muamele olmaksızın farmasötik formülasyonda belirlenmesi için başarılı bir şekilde

uygulanmıştır ve bunlar üreticinin bildirdiği değerlere uygun olarak uygulanmıştır. Prokain tayini için hızlı ve basit bir yöntem, akışlı enjeksiyon analizi (FIA) ile amperometrik dedektör olarak bir ekran baskılı karbon elektrotu (SPCE) kullanılarak geliştirilmiştir (Bergamini ve ark., 2007).

Kanyong ve arkadaşları serumda bulunan dolaşımdaki galaktozun ölçümü için tek kullanımlık bir amperometrik biyosensörü geliştirmişlerdir. Biyosensörün optimal cevabını, enzim yükleme, sıcaklık, pH ve tampon mukavemetinin etkilerini sistematik olarak inceleyerek sonuçları elde etmişlerdir (Kanyong ve ark., 2013).

Zhang ve arkadaşları, Su bazlı bir karbon mürekkebi kullanılarak üretilen, serumdaki glukoz için yeni, tek kullanımlık, ekran baskılı bir amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Biyosensör performansının optimizasyonu, pH, tampon kuvveti ve uygulanan potansiyelin analitik tepki üzerindeki etkilerini incelenerek elde etmişlerdir. Tek kullanımlık amperometrik biyosensör sıgır serumu örneği üzerinde tekrarlanan tayinlerin uygulanmasıyla değerlendirilmiştir (Zhang ve ark., 2012).

Hart ve arkadaşları Progesteron için tek kullanımlık, ekran baskılı amperometrik biyosensörlere yönelik çalışma yapmışlardır. Tek kullanımlık bir amperometrik progesteron biyosensörünün temel dönüştürücü olarak kullanılmasına yönelik bir ekran baskılı karbon elektrodu (SPCE) araştırmışlardır (Hart ve ark., 1997).

Liu ve arkadaşları yüksek konsantrasyonda dopamin, askorbik asit ve ürik asit etkisiyle serotonin analizi için, Nafion zar kaplı kolloidal altın elektrot baskı elektroduna (Nafion / CGSPE) dayanan yeni, hızlı, kullanışlı ve hassas bir elektrokimyasal yöntem geliştirmişlerdir (Liu ve ark., 2010).

Kanyong ve arkadaşları idrar analizi için amperometrik ekran baskılı ürik asit biyosensörü sandviç formatını geliştirmişlerdir. Bir su bazlı mürekkep formülasyonu kullanılarak imal edilen elektrokatalizör kobalt ftalosiyanini (CoPC) içeren bir ekran baskılı karbon elektrotu (SPCE) bir ürik asit biyosensörünün temel dönüştürücü olarak araştırmışlardır. Bir sandviç biyosensör, ilk olarak bu dönüştürücü üzerine (CoPC-SPCE) selüloz asetat (CA), ardından urikaz (UOX) ve nihayetinde bir polikarbonat (PC) membranı biriktirilerek imal edilmiştir; Bu cihaz PC-UOX-CA-CoPC-SPCE olarak adlandırılmıştır (Kanyong ve ark., 2012).

Wang ve arkadaşları rutenyum-dispersiyonlu karbon mürekkeplerine dayanan glikoz ve alkoller için ekran baskılı amperometrik biyosensörler geliştirmişlerdir (Wang ve ark., 1995).

Crouch ve arkadaşları glikoz oksidaz içeren biokompozit su bazlı karbon mürekkebi kullanılarak insan plazma numunelerinin analizi için amperometrik, ekran baskılı, glukoz biyosensörü geliştirmişlerdir (Crouch ve ark., 2005).

Pemberton ve arkadaşları inek sütüne ait progesteron için hassas, seçici bir elektrokimyasal immünoassayın geliştirmiş ve tek kullanımlık ekran baskılı amperometrik biyosensör esas alınarak hazırlamışlardır (Pemberton ve ark.,1998).

Shitanda ve arkadaşları çevresel toksik bileşiklerin tespiti için akış enjeksiyon analiz sistemli amperometrik ekran baskılı algal biyosensör geliştirmişlerdir. Ekran baskılı algal biyosensör kimyasalların toksisitesinin değerlendirilmesi için imal edilmiştir. Tek hücreli mikroalga *Chlorella vulgaris* hücreleri, karbon nanotüpleri ve sodyum alginat çözeltisi karıştırılarak bir algal mürekkep hazırlanmıştır. Algal mürekkep doğrudan ekran baskılı bir karbon elektrot yüzeyinde ekran baskı tekniği kullanılarak hareketsizleştirilmiştir. Hareketsizleştirilmiş yosunların fotosentezle üretilen oksijen değerleri amperometik olarak izlenmiştir (Shitanda ve ark., 2009).

Escutia ve arkadaşları çay infüzyonlarındaki fenolik bileşiklerin içeriğini izlemek için *Trametes versicolor* (LTV) lakkazına dayanan bir amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Fungal enzim, tek kullanımlık grafit ekran baskılı elektrotlar (SPE) polivinil alkol fotopolimer PVA-AWP (azid birim kolu suda çözünür fotopolimer) içinde tutulma ile hareketsiz hale getirilmiştir. PH, sıcaklık ve uygulanan potansiyel açısından duyarlılık optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Doğrusal aralık, saptama limiti, operasyonel ve depolama kararlılıkları da bu yöntemle belirlenmiştir (Escutia ve ark.,2010).

Rejeb ve arkadaşları Triasilgliserollere karşı lipaz etkinliği, gliserol dehidrojenaz / NADH oksidaz esaslı bir amperometrik enzim biyosensörü kullanılarak ölçmüşlerdir. Önceki çalışmalarda bildirilen daha yüksek ameliyat stabilitesi nedeniyle, iki immobilize enzim sistemi için bir Prussian Blue modifiye elek baskılı elektrot substrat olarak seçilmiştir (Rejeb ve ark., 2007).

Huilin ve arkadaşları *Escherichia coli* O157: H7'nin çabuk ve etkili analizi için tek kullanımlık bir amperometrik immünosensiyon şeridi imal etmişlerdir. Yöntemde, çift antikorlarla dolaylı bir sandviç enzime bağlı immünoassay kullanılmıştır. Ekran baskılı karbon elektrotları (SPCE'ler) ticari gümüş ve karbon mürekkepleri ile çerçevelemişdir. AuNPs ve FeDC ile modifiye edilmiş SPCE, ileri uygulamalar için yüksek potansiyelle sahiptir ve hızlı patojen bulgusu için yöntemi entegre bir sisteme dahil etmenin temelini oluşturmaktadır (Huilin ve ark., 2008).

Carsol ve arkadaşları Karbon esaslı elek baskılı elektrot ile ürik asit ve hipoksantin'in amperometrik olarak tespitini yapmışlardır.Bu uygulama balık tazeliği tayini için kullanılmaktadır (Carsol ve ark., 1997).



BÖLÜM 3

MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

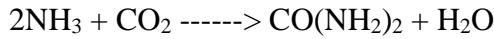
3.1.1. Deneyleerde Kullanılan Malzemeler

3.1.1.1. Üre

Ürenin kimyasal formülü $(\text{NH}_2)_2 \text{CO}$ 'dır. Vücut proteinleri metabolize ettiğinde oluşan atık yan ürünlerden biridir. Vücut, üreyi atık olarak elimine etse de, bileşik için birkaç endüstriyel kullanımı vardır.

Gıdaların insanlarda ve diğer memelilerde sindirilmesi sürecinde, proteinler sırayla vücut proteinlerinin sentezinde kullanılan amino asitleri verir. Ancak fazla amino asitler karbohidratlardan ve depolanamadıkları yağlardan farklıdır. Amonyak (NH_3) veren katabolizmaya (bozulma) uğrarlar. Hücrelerde amonyak birikmesi toksisiteye neden olur. Aşırı amonyağı vücuttan uzaklaştırmak için, Krebs-Henseleit üre döngüsü yoluyla karaciğerdeki CO_2 ile birleştirilerek üre haline dönüştürülür. Üre daha sonra kan akımı vasıtasıyla filtreleyen böbreğe taşınır ve en sonunda idrarla atılır.

Aşırı üre konsantrasyonu dokular için toksiktir. Güvenli bir konsantrasyona kadar yeterli su ile seyreltilmesi, çıkarılması ve atılması gerekir. Bununla birlikte, toksik amonyak ve ürenin hayvan vücudundan çıkarılması işlemi su gerektirir (Maynard ve ark., 1979). İnsanlarda kanda üre varlığı böbrek hastalığına işaret eder (Wardlaw ve ark., 2004).



1773 yılında, Fransız bilim adamı Hillaire M. Rouelle, insan idrarından üre elde etmiştir. Bir Alman kimyager olan Friedrich Wohler, herhangi bir kimsenin organik bir bileşiğı ilk kez kimyasal olarak sentezlediğı, amonyum siyanattan üre sentezlemiştir. 1864'te Alman kimyager Adolph Bayer, üreyi malonik asitle reaksiyona sokarak barbitüratlar, merkezi sinir sistemi çöktürücüleri nasıl yaratacağıını keşfetmiştir.

Gübre olarak yaygın şekilde kullanılmasının yanı sıra, başka kullanım alanlarında bulunmaktadır, özellikle sanayide; Üre üretimi ve nakliyesi ucuz ve çeşitli endüstriyel kullanım alanları bulmuştur. Üre-formaldehit reçineleri, ahşap ve kağıt ürünleri için yapıştırıcı olarak üretilir. Üre ayrıca antifrizlerde de kullanılır ve nitrik oksitleri dizel tanklarından uzaklaştırmak için seçici bir katalitik indirgeyici olarak kullanılır. Üre, dizel tanklarına püskürtülür ve sonra zararlı nitrik oksitleri azot ve suya dönüştürür. Bunların yanısıra;

1. Hayvancılık için yem katkı maddesi olarak kullanılan endüstriyel bir üründür. Üre, ruminant hayvanlar için yem maddesi olarak kullanılan en yaygın protein olmayan azot (NPN) bileşimidir. Bakterilerin ve diğer mikroorganizmaların aracılık ettiği protein biyosentezi için azot kaynağı olarak görev yapar. Bununla birlikte, onun kullanımı, diğerlerinin yanı sıra, enerji eksikliğini ve kükürt içeren minerallerdeki eksikliğini de göz önünde bulundurmalıdır. Kolayca işkembe içinde amonyağa dönüştürülür. Aşırı dozlarda beslendiğinde, rumendeki amonyak birikiminden kaynaklanan ölümcül toksisiteye neden olabilir ve bu da kan amonyak seviyesinin yükselmesine neden olur (Maynard ve ark., 1979).

2. Plastik, yapıştırıcı, kalıp, laminat, kontrplak, sunta, tekstil ve kaplama gibi çeşitli uygulamalarda sentetik reçinelerin imalatında kullanılan endüstriyel bir üründür (Myers ve ark., 2012). Formaldehit ile sert, elektriksel olarak iletken olmayan bir plastik üretir (Linstromberg ve ark., 1987).

3. Farmasötik ürünlerin üretiminde kullanılan endüstriyel bir üründür. 1864 yılında Alman kimyager Adolph von Baeyer ilk önce dietil malonat ve üre'den barbiturik asidi sentezledi. Pentotal, pentobarbital ve secobarbital gibi belirli barbitürik asit türevleri (barbitüratlar) sakinleştirici (sakinleştirici) veya uyku indükleyici olarak kullanılır (Bettelheim ve ark.,1998).

4. Diğer küçük kullanımlar rehidre edici losyon, idrar söktürücü ilaçlar, buz çözücüler ve soğuk kompres gibidir (Myers ve ark., 2012).

5. Yukarıda da belirtildiği gibi, kanda üre varlığı böbrek hastalığını saptamak için tanı aracı olarak kullanılır..(Maynard ve ark., 1979). Kan üre azotu (BUN) ve idrar üre azotu (UUN), böbrek yetmezliği veya son dönem böbrek hastalığı riski taşıyanlar için üre seviyelerini test eder.

3.1.1.2. Prussian Blue (Prusya Mavisi)

Prusya mavisi, ferros ferrosiyanyür tuzlarının oksidasyonu ile üretilen koyu mavi bir pigmenttir. İçeriğinde Fe^{III} bulunur. Rengin bir diğer adı Berlin mavisi veya Paris mavisidir.

Prusya mavisi ilk sentetik pigmentlerden biridir. Bileşik suda çözünür olmadığı için çok ince bir koloidal dispersiyon olarak kullanılır. Değişken miktarlarda diğer iyonların varlığı ile ortaya çıkması durumunda oluşan koloidal partiküllerin boyutuna hassas bir şekilde bağlı olması nedeniyle ünlüdür. Pigment boyalarda kullanılır. Tıpta Prusya mavisi,

belirli türdeki ağır metal zehirlenmelerinde, (örneğin sezyum ve talyum gibi) bir panzehir olarak kullanılır.

3.1.1.3. Jelatin

Jelatin, cildi, tendonları, bağları ve / veya kemikleri suyla kaynatmak suretiyle elde edilen bir proteindir. Genellikle ineklerden veya domuzlardan elde edilir. Jelatin şampuanlarda, yüz maskelerinde ve diğer kozmetik ürünlerinde kullanılır; meyve jelatinleri ve pudıngler için koyulaştırıcı olarak (Jell-O gibi); şekerlerde, şekerlemelerde, keklerde, dondurmalarda ve yoğurtlarda; fotoğraf filmi üzerinde kaplama olarak ve vitaminlerde kapsül olarak bazende şarapların temizlenmesi için kullanılır.

3.1.1.4. Glutaraldehit

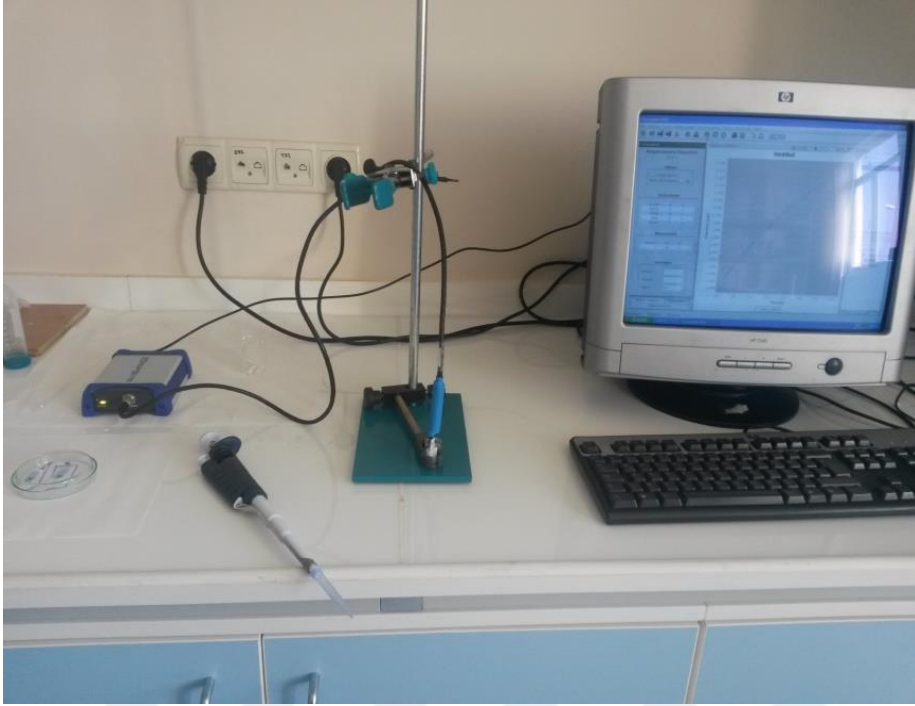
Glutaral, bir dezenfektan olarak ve biyolojik dokular için bir sabitleyici olarak kullanılan, iki aldehit grubu içeren, suda çözünen yağlı bir sıvıdır. Formülü $C_5H_8O_2$ 'dir.

Glutaraldehit, C-1 ve C-5'te aldehit fonksiyonlu pentandan oluşan bir dialdehittir. Çapraz bağlama reaktifi, dezenfektan ve fiksatif olarak rol oynar. Kauçuk ve plastik gibi aletlerin sterilizasyonu için kullanılır.

Glutaraldehit ayrıca biyosensörlerde yer alan biyoaktif materyallerin biyolojik moleküller ile birlikte çapraz bağ meydana getirmesi esasına dayalı bağlama metodunda fazlaca kullanılmaktadır.

3.2. Deneylede Kullanılan Sistemler

Amperometrik ölçümler, Şekil 3.1'de gösterilen Dropsens-stat400 cihazıyla birlikte ölçüm çözeltilerinin içerisinde konulduğu kendimizin yaptığı hücresiyle beraber alındı.



Şekil 3.1. Dropsens-stat400 analiz sistemi

ORION marka 912600 numaralı kombine cam pH elektrodu vasıtasıyla, çözeltilerin pH'ları ORION 720A cihazı aracılığıyla yapıldı.

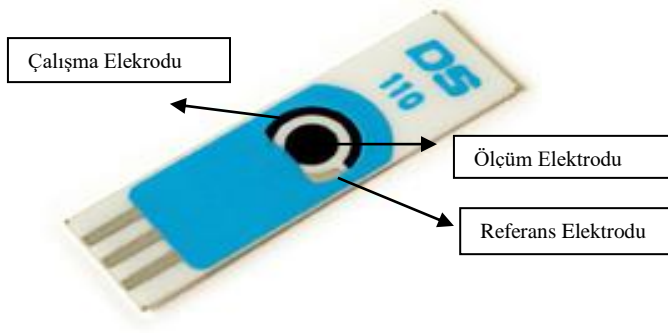
Temizlik aşamalarının gerçekleşmesinde ve çözeltilerin (18,2 MΩ·cm) hazırlık aşamasında kullanılacak olan su, Merk-Millipore markasına ait ultra saf su cihazı tarafından karşılandı.

Çözeltilerin ekleme işlemlerinde ise Gilson marka mikropipetler kullanıldı.

Çözeltilerin karıştırılmasını sağlamak amacıyla, birden fazla karıştırıcıya sahip Jeitech marka manyetik karıştırıcı ve IKA marka vortex yardımıyla çözeltiler hazırlandı. Kimyasal malzemelerin tartım aşamasında Denver marka hassas terazide ölçüm alındı.

3.2.1. Ekran Baskılı Elektrotlar (SPE)

Ekran baskılı elektrotlar (SPE), basit, hızlı ve ucuz biyosensör üretimine yönelik en umut verici yaklaşımlardan biridir. Mikroelektrotları ve modifiye elektrotları içeren ekran baskılı elektrotlara dayalı tek kullanımlık biyosensörler, biyomoleküllerin, pestisitlerin, antijenlerin, DNA'nın, mikroorganizmaların ve enzimlerin saptanmasında ve ölçülmesine olanak sağlamaktadır. SPE tabanlı sensörler, hızlı ve doğru yerinde analizler yapmak ve taşınabilir cihazların geliştirilmesi için artan ihtiyaçla uyumludur (Taleat ve ark., 2014).

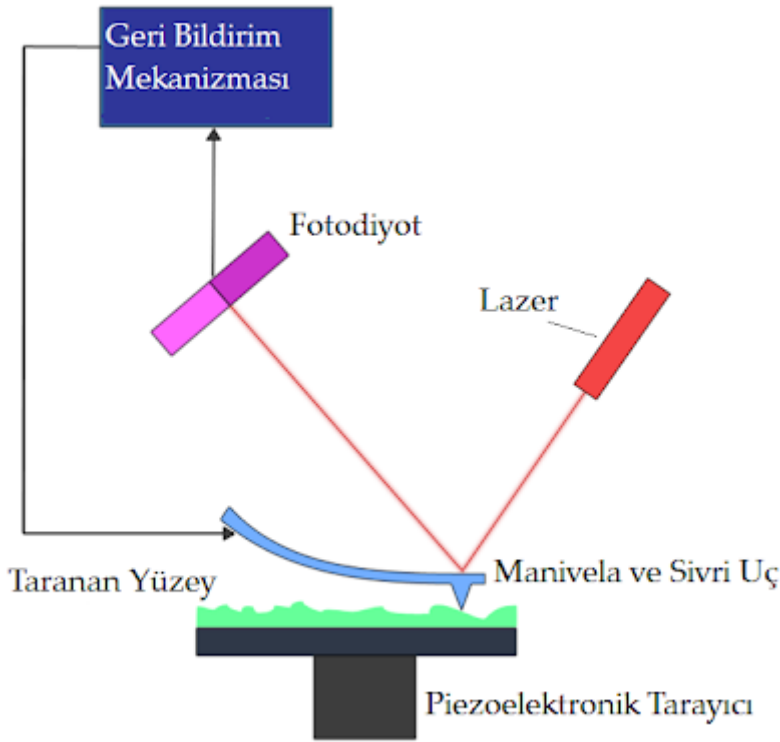


Şekil 3.2. Ekran Baskılı Elektrot (SPE) Gösterimi

Amperometrik ölçümlerde, üzerinde yer alan çalışma elektrodu, referans elektrot ve karşıt elektrot sisteminden oluşan çapı 4 mm ve de $0,12 \text{ cm}^2$ alana sahip Şekil 3.2'deki screen printed elektrot (SPE) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) veya tarama kuvvet mikroskobu (SFM), çok yüksek çözünürlüğe sahip bir tarama mikroskobu (SPM) türüdür. Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM), morfoloji, boyut, yüzey pürüzlülüğü ve doku gibi farklı özelliklere dayanan nicel ve nitel veriler için kullanılır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Atomik Kuvvet Mikroskobu çalışma prensibi

AFM'de, keskin prob ucu (< 10 nm) ile 0.2-10 nm'lik bir prob-örnek ayrımı ile numune yüzeyi arasındaki kuvvet ölçülür. Prob, etkileşim üzerine sapan bir konsol ile tutturulmuştur; bu sapma, bir lazer ışınının yansıması ile ölçülür. "ışın sıçrama" yöntemi ile. Bu nedenle, yüzeyin topografyası doğrudan konsolun sapması ile ölçülür. Topoğrafya haritası, farklı renk gradyanları (kırmızı, turuncu, sarı vb.) veya gri tonlamalı olarak temsil edilen farklı zirveler biçimini alır. Bu şekilde, araştırılmakta olan parametrelerin tanımlanmasında ve ölçülmesinde çok yardımcı olabilecek çok renkli bir örnek yüzey topolojisi görüntüsü üretilir (Nasrollahzadeh ve ark., 2019).

3.3. Deneyleerde Kullanılan Çözeltiler

3.3.1. Fosfat Tamponu

Toplamda fosfat konsantrasyonu 0,05 M değerinde olması için sodyum dihidrojenfosfat dihidrat ve disodyum monohidrojenfosfat heptahidrat'tan çeşitli miktarlarda tartım işlemi ve saf su içerisinde çözülme işlemi gerçekleştirildi. Bu çözeltilere ait pH'ları 0,10 M NaOH ve 0,10 M HCl çözeltileriyle beraber pH'ları belirlendi. Bunun yanı sıra, optimum tampon konsantrasyonunu bulmak için, toplamda fosfat konsantrasyonu 0,10 M; 0,15 M ve 0,20 M olacak biçimde fosfat tamponları benzer şekilde hazırlandı. Hazırlanan tamponlar $+4$ °C'de soğutucuda korundu.

3.3.2. TRIS Tamponu

Konsantrasyonu 0,05 M olan TRIS tampon çözeltisinin hazırlanması için, yeterli oranlarda tris(hidroksimetil)aminometan mikroterazi kullanılarak tartım işlemi gerçekleştirildi ve pH değeri 1,0 M HCl solüsyonu yardımıyla istenen belirlendi. Diğer yandan, konsantrasyonu 0,10 M olacak biçimde TRIS tampon solüsyonu da benzer prosedür kullanılarak hazırlandı.

3.3.3. Prusya Mavisi Çözeltisi

SPE alttaşları üzerine Prusyamavisi (PB) damlatılarak kimyasal bir şekilde kaplanmıştır. PB elde etmek için 0,1 M $Fe_2(SO_4)_3$ çözeltisi, ve 0,1 M $K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisi kullanılmıştır. Bu iki çözeltinin hazırlanması aşağıda verilmiştir.

0,1 M $(Fe_2SO_4)_3$ çözeltisi: İlk olarak 3,998 g $Fe_2(SO_4)_3$ malzemesi 100 ml saf suda çözünmesi sağlanarak 0,1 M $Fe_2(SO_4)_3$ çözeltisi elde edilmiştir. Sonra, aşağıdaki kimyasal malzemelerin hepsi karıştırıcı yardımıyla çözünme işlemi gerçekleştirilerek ince film için çözelti oluşumu sağlanmıştır.

15 ml 0,1 M $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ çözeltisi

90 ml safsu

0,5 g EDTA

10 ml HCl (3 M)

0,1M $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ çözeltisi; 4,1234g $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ maddesi 100 ml saf suda çözündürülerek 0,1 M $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ çözeltisinin hazırlanması gerçekleştirilmiştir. Daha sonra altta verilen kimyasal malzemelerin karıştırıcıyla çözünme işlemi gerçekleştirilip ince film solüsyonu oluşturulmuştur.

15 ml 0,1 M $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ çözeltisi

90 ml saf su

10 ml HCl (3 M)

3.3.4. Ölçümde Kullanılan Çözelti

Amperometrik ölçümlerde kullanacak olduğumuz çalışma hücresine (toplam çalışma hücresi hacim 1 mL) 0,05 M pH:7,4 fosfat tamponu 885 μL , 0,1 M potasyum klorür (KCl) çözeltisi 100 μL , 5 mM potasyum ferrosiyanit ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) çözeltisi 10 μL ve 5 mM potasyum ferrisiyonit ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) çözeltisi içinden 5 μL , mikropipetler yardımıyla konulmuştur.

Amperometrik ölçümlerde kullanılacak olan SPE analiz sistemi Şekil 3.4'de görülmektedir.



Şekil 3.4. Amperometrik SPE analiz sistemi

3.3.5. Üreaz Enzim Çözeltisi

Üreaz enziminin (Sigma Aldrich), konsantrasyonu 1 mg/mL şeklinde 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponunda çözünmesi gerçekleştirildi. Hazırladığımız üreaz çözeltisinin kullanılmadığı durumlarda -20°C soğutucuda korundu.

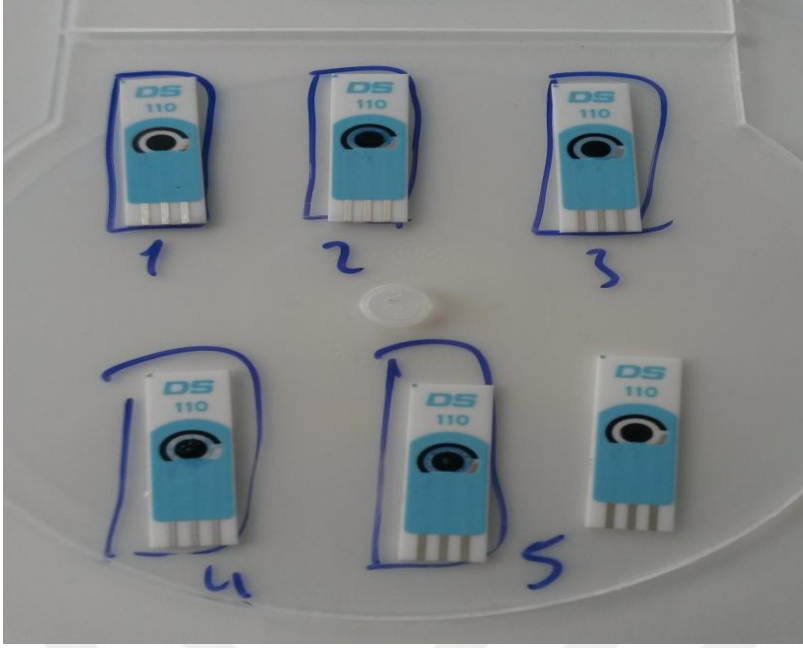
3.3.6. Üre Çözeltisi

Konsantrasyonu $2,0 \times 10^{-5}$ M depo üre çözeltisinin hazırlanması amacıyla, metil β -siklodekstrin olan su içinde çözenen üreden belirli miktarlarda tartılarak saf su içerisinde çözünme işlevi gerçekleştirildi. Benzer olarak stok üre çözeltisi kullanılmadığında $+4^{\circ}\text{C}$ 'de soğutucuda saklandı.

3.4. Üre Tayini İçin Enzim Elektrotların Hazırlanması

Firmadan hazır elde edilen SPE elektrot üzerine üreaz enziminin immobilizasyonu için aşağıdaki prosedür aşama aşama takip edildi;

- ❖ : İlk olarak, belirli oranlarda jelatin tartılıp ependorf tüplere konularak işleme başlandı.
- ❖ : Ependorf tüpün içerisine 50 μL 0,05 M pH:7,4 fosfat tamponu eklenerek 13-17 dk arasında bekletildi.
- ❖ : Jelatin ısıtılan suda 1-2 s bekletilmesi ile şişirilme işlemi yapılarak ardından vorteksleme işlevi yapıldı.
- ❖ : Şişen jelatin çözeltisi içerisinden mikropipet yardımıyla hızlı bir şekilde 11,5 μL alınıp başka bir ependorf tüpe aktarıldı.
- ❖ : Belirli ünite de enzim olan enzim çözeltisinden mikropipet ile 4 μL alınıp jelatin olan ependorf tüpte birleştirildi.
- ❖ : Daha sonra çözeltinin içerisine 2,5 μL PB solüsyonu ilave edildi.
- ❖ : Bu 3 çözeltinin bulunduğu ependorf tüpe 2 μL % 25'lik glutaraldehit (GA) eklenerek güzel bir şekilde karışımı gerçekleştirildi.
- ❖ : En son olarak, hazırladığımız bu çözeltiden mikropipetle 10 μL çekilerek SPE yüzeyine enzim immobilizasyonu için 30 dakika 25°C de, daha sonra 4-5 saatlik bir süreç soğutucuda $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmesi sağlandı.
- ❖ Hazırladığımız enzim elektrot SPE/PB/Üreaz olacak şekilde isimlendirildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Hazırladığımız enzim elektrotlar

3.4.1. SPE/PB/Üreaz Elektrotların Üre Duyarlılıklarının Tespiti

Hazırlanan SPE/PB/Üreaz enzim elektrotların üre duyarlılıklarını tespiti amacıyla enzim elektrotlar farklı farklı hazırlanan hücre ölçüm çözeltisine değişik potansiyelde kararlı durum akımları bulununcaya dek bekletildi. Çalışmanın yapılabilmesi için potansiyel değeri belirlenildi. Diğer yandan, hücre ölçüm çözeltisine belirli konsantrasyonlarda stok üre çözeltisinden eklemeler yapılarak, ilaveler ardısıra amperometrik yanıtlar belirlenildi. Üre konsantrasyonuna karşılık hesapladığımız akım fark değerleri grafiğe aktarılarak enzim elektrotlarımızın çalıştığımız konsantrasyonlarda üre duyarlılıkları ve lineer çalışma periyotları bulunmuş oldu.

3.4.2. Üre Biyosensörünün İmmobilizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu

Tezin bu kısmında enzim esaslı biyosensör için, uygun biyosensör yanıtının bulunacağı ideal immobilizasyon şartlarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda jelatin miktarının, gluteraldehit oranının, üreaz enziminin konsantrasyonunun, tampon cinsinin, tampon derişiminin, biyosensörün yanıtına etkisi olup olmayacağı incelenmiştir. İmmobilizasyon aşamasının uygun miktarlarının tayini amacıyla, öbürleri tek bir değerde tutulması ile optimizasyonu yapılması planlanan parametrenin değiştirilmesiyle biyosensörler hazırlandı ve deneysel veriler elde edildi.

3.4.2.1. Jelatin Etkisi

Enzim esaslı biyosensör için, SPE/PB/Üreaz enzim elektrodun cevabına jelatin miktarının etkisinin belirlenmesi için değişik oranlarda jelatin kullanılmasıyla biyosensör hazırlandı.

Hazırladığımız biyosensörler ile alınan ölçüm sonuçlarından olağan grafik verileri bulundu. Ardından, grafikler aracılığıyla ideal jelatin miktarı elde edildi.

3.4.2.2. Gluteraldehit Miktarının Etkisi

SPE/PB/Üreaz elektrodunun, hazırladığımız biyosensöre cevabının belirlenmesi için değişik oranlarda Gluteraldehit (GA) kullanılmasıyla ideal ölçüm şartları belirlenildi.

3.4.2.3. Tampon Cinsinin Etkisi

Tampon türünün yapacağı etkiyi araştırmak için hazırlanan enzim elektrodun yanıtına, değişik pH ve konsantrasyonda fosfat ve TRIS tamponları hazırlandı. Enzim elektrodu, +0,65 V'da 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponunda kararlı hal akımı oluşuna dek beklenildi. Çözelti içerisine, hazır alınan stok üre çözelti içinden belli miktarlarda ilave edildi ve +0,65 V'da bulunan akım farkları üre konsantrasyonuna karşılık olarak grafik elde edildi. Aynı aşamalar 0,05 M pH 4. TRIS tamponu ile de yinelendi ardından bulunan kalibrasyon grafik eğimlerinden faydalanarak belirlenen duyarlılıklar ve ölçümler 2 farklı tampon çeşidi için karşılaştırıldı.

3.4.2.4. Tampon Değişiminin Etkisi

Tampon konsantrasyonunun SPE/PB/Üreaz enzim elektrodu yanıtına tesirini incelemek amacıyla; pH'sı 7,4 olan 0,05; 0,10; 0,15 ve 0,20 M'lık, 4 farklı fosfat tampon hazırlandı. Bu enzim elektrodu +0,65 V'da ölçüm tamponları içerisinde kararlı durum akımı oluşana dek beklendi. Çözeltiye, stok üre çözeltisinden değişik miktarlarda ilave edildi ve +0,65 V değerinde bulunan akım değişimleri üre konsantrasyonuna karşılık grafiğe geçirildi. Benzer işlev, diğer konsantrasyondaki tamponlar için ayrıca yinelendi ve grafiğe aktarılan kalibrasyon eğimleri kullanılarak enzim elektrodun duyarlılıkları belirlenmesi sağlandı.

3.5. Biyosensörün Karakterizasyonu

Enzim esaslı biyosensörlerde kullanılan biyoajanların immobilizasyon parametrelerinin ve ölçüm şartlarının uygun koşullarının belirlendikten sonraki aşamada biyosensörün karakterize edilmesi işlemi gerçekleştirildi.

3.5.1. Cevap Zamanı

SPE/PB/Üreaz enzim elektroduna ait cevap zamanını incelemek maksadıyla, enzim elektrodunun çalışma çözeltisi içerisinde +0,65 V'da kararlı durum akımları bulununcaya değin beklendi. Hücre ölçüm çalışma ortamındaki üre konsantrasyonu $2,0 \times 10^{-5}$ M üre çözeltisi ilave edildi ardından değişik sürelerde sistemden geçmekte olan akım değerleri kaydedildi. Aynı üre konsantrasyonunda zamana karşın akım fark değeri grafiğe aktarılarak akım farkının neredeyse aynı kaldığı zaman hazırladığımız biyosensörü cevap zamanı şekilde belirlenildi. Benzer işlevler, çalışma hücresindeki üre konsantrasyonu $2,0 \times 10^{-6}$ M olan başka çözeltilerde tekrarlandı.

3.5.2. Biyosensörün Tekrarlanabilirliği, Üretilirliği

SPE/PB/Üreaz enzim elektrodunun tekrarlanabilirliğini incelemek için, enzim elektrodu hücre ölçümü çözeltisinde +0,65 V potansiyelde kararlı durum akımları oluşuncaya değin beklendi. Belirli konsantrasyonda daha önce hazırlanan üre çözeltisinden eklendi ve +0,65 V'da amperometrik yanıtlar bulundu. Üre derişimine karşın bulunan akım farkları grafiğe geçirilerek kalibre grafiği çizdirildi. Hazırladığımız biyosensörle peş peşe benzer olarak kalibrasyon grafikleri çizdirildi. Bunun yanısıra, enzim elektrotların tekrarlanabilirliği farklı enzim elektrotlarının kalibrasyon eğrisinin çizdirildi.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Tez çalışmasında, üre tayininde PB filmin eklenmesiyle amperometrik enzim elektrotların (satın aldığımız SPE'lar) üzerine, üreaz enzimleri çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edilmesi sağlanmıştır. Enzim elektrotların ideal olarak çalışılması için koşulları ve biyosensör performansını etkileyen etkenleri yaptığımız araştırmalarla belirlenerek, araştırma verileri aşama aşama sunulmuştur.

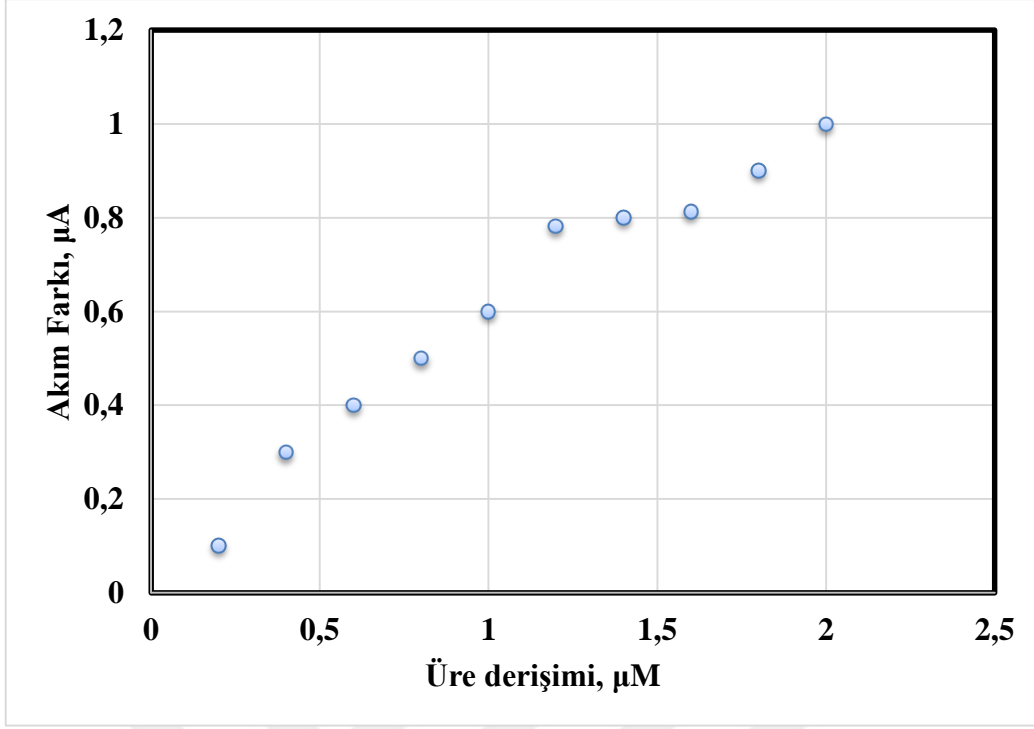
4.1. Üre Enzim Elektrodu

Tez çalışmasında, üre tayini için enzim elektrot hazırlanılması amacı ile PB ince film kaplı SPE elektrotlar yüzeyine, üreaz enzimi immobilizasyonu gerçekleştirildi.

Tez çalışmasında hazırladığımız enzim elektrodun yanıtına jelatin miktarının, GA oranının, tampon cinsinin, tampon derişiminin gibi farklı etkenlerin biyosensöre tesiri, enzim elektrodun üreye duyarlılığı, cevap zamanı, tekrarlanabilirliği-üretilebilirliği, biyosensör ömrü gibi performans etkileri incelenildi. Bunun yanısıra, enzim elektrodun serumda olabilecek ve girişim yapabilen çeşitlere karşın cevapları belirlenildi.

4.1.1. Enzim Elektrotlarının Üreye Karşın Duyarlılığı

Elde ettiğimiz SPE/PB/üreazenzim elektrodu, çalışma çözeltilinde +0,65 V'da kararlı durum akımları oluşuncaya dek beklendi ve belirlediğimiz konsantrasyondaki üre çözeltilisi de ilave edilerek amperometrik yanıtlar belirlenildi. Bulduğumuz cevap akım değerleri üre derişimine karşılık grafiğe aktarıldı (Şekil 4.1). Sonuçlar literatürle uyumlu olduğu gözlenmiştir (Şehitoğulları ve ark. 2002).

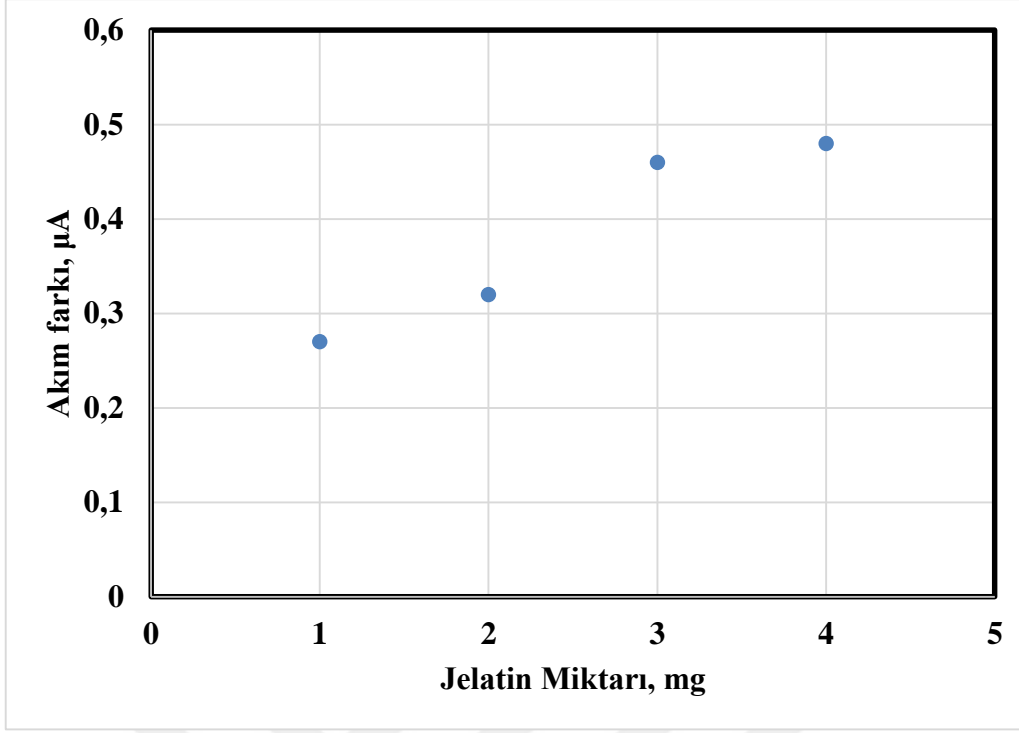


Şekil 4.1.Enzim elektrodun üre duyarlılığı (0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu, +0,65 V, 25 °C)

4.1.2. Hazırlanan Biyosensörün Optimizasyonuna Ait Bulgular

4.1.2.1. Jelatin Miktarı Biyosensör Cevabına Tesiri

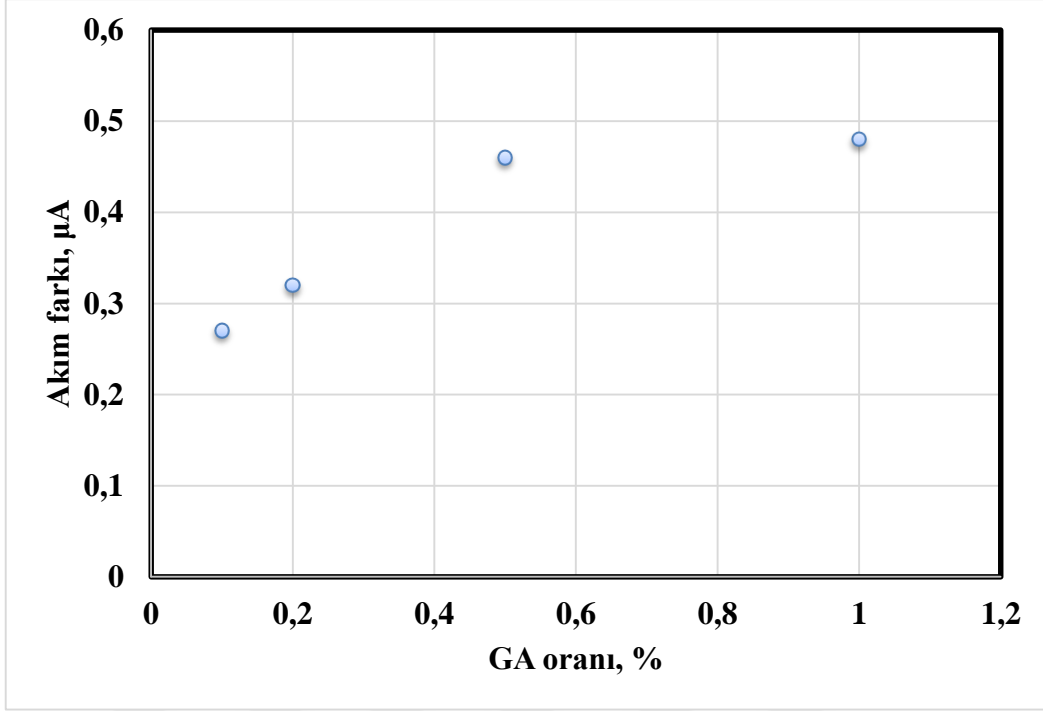
Hazırladığımız enzim temelli biyosensörün amperometrik cevap akımları üzerine jelatin miktarı etkisinin incelenmesi için, jelatin 0,001; 0,002; 0,003; 0,004 g olarak değişik miktarlarda tartıldı. Bu 4 değişik jelatin miktarlarıyla enzim elektrodlarının hazırlanması gerçekleştirildi. Çalışma hücresi içerisine hazırlanan çözeltiliye 1 mL olarak ilave yapıldı. Biyosensör bu çözelti içerisinde +0,65 V'da dengeye gelmesi için beklendi. Sonraki aşamada pH'sı 7,4 olan fosfat tampon çözeltisi ile hazırladığımız üre çözeltisinden, çalışma ortamında üre konsantrasyonu 2×10^{-5} M biçiminde çalışılan ölçüm hücresine ilave edildi. +0,65 V sabit potansiyel değerinde amperometrik akım yanıtları alındı. Aynı işlemler değişik jelatin oranları ve 2×10^{-5} M üre çözeltisi için de tekrarlandı. Değişik jelatin oranlarındaki çalışılacak elektrotların +0,65 V potansiyel değerinde belirlediğimiz amperometrik cevap akımları jelatin oranına karşılık grafik içerisine (Şekil 4.2) aktarıldı ve grafik sonuçlarından biyosensörün optimum çalışılacak jelatin miktarının, 2 mg olduğu belirlenildi. Bulunan sonuçlar literatür incelendiğinde uyum göstermektedir (Alonso-Lamillo ve ark. 2010, Stefano ve ark. 2017).



Şekil 4.2. Enzim elektroduna jelatin miktarı tesiri (0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu, +0,65 V, 25 °C)

4.1.2.2. Gluteraldehit (GA) Oranının Biyosensör Cevabına Etkisi

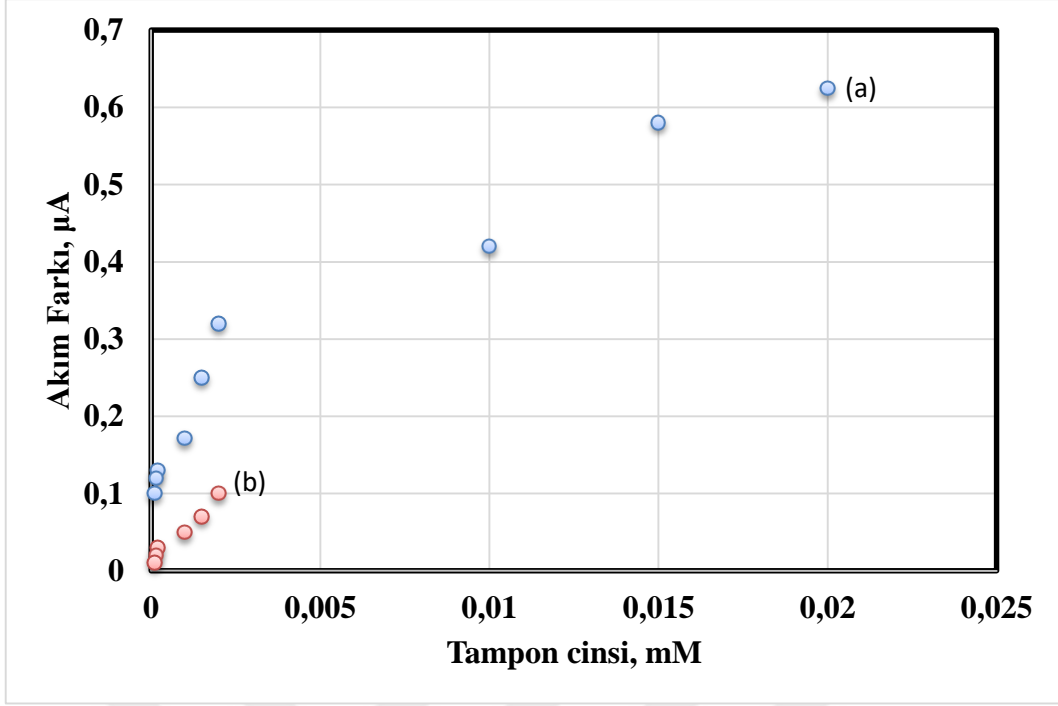
Hazırladığımız enzim temelli biyosensörümüzün amperometrik cevap-akımına GA oranlarının etkilerini araştırmak amacıyla, GA % 1; % 0,5; % 0,2; % 0,1 olarak değişik miktarlarda hazırlanıldı. Dört farklı GA miktarlarıyla SPE/PB/Üreaz elektrodalarının hazırlanması sağlandı. Çalışma hücresi içerisine hazırlanan çözelti 1 mL olarak eklenildi. Biyosensör çalışma çözeltisinde +0,65 V'da dengeye ulaştı. Çalışma ölçümü hücresine üre konsantrasyonu 2×10^{-5} M olarak eklendi. Diğer aşamada +0,65 V potansiyel değerinde amperometrik cevap akımı belirlenildi. Aynı işlevler değişik GA oranları ve 2×10^{-5} M üre çözeltileri için de yinelendi. Değişik jelatin miktarlarındaki çalışma elektrotlarının +0,65 V potansiyelinde ölçüm alınan amperometrik cevap akımları GA miktarlarına karşılık grafik içerisine (Şekil 4.3) aktarıldı ve grafik sonuçlarından biyosensörün ideal olarak çalışması için GA miktarı % 0,5 şeklinde belirlenildi. Bulunan bu veriler yapılan diğer çalışmalar ile uygunluk göstermektedir (Eggenteinato ve ark. 1999, Taleat ve ark. 2014).



Şekil 4.3.Enzim elektrodunun cevabına GA oranının tesiri
(0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu, +0,65 V, 25 °C)

4.1.2.3. Tampon Cinsinin Biyosensör Cevabına Etkisi

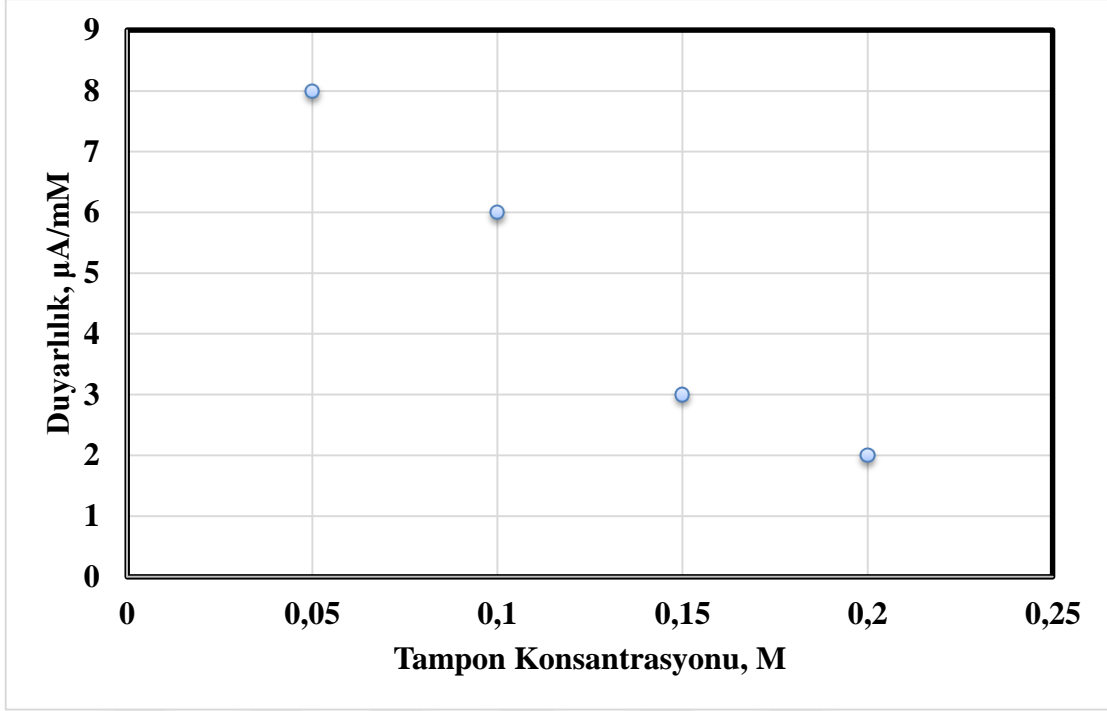
Enzim elektrotlarında çalışma ortamında bulunabilecek tampon çeşitlerin biyosensör yanıtlarına katkısının olabileceği bilinir. Bundan dolayı, bu tez çalışmasında tampon çeşidinin incelenmesinin faydalı olabileceği düşünüldü. En ideal tampon türünün bulunulması maksadıyla, 0,05 M pH 7,4 fosfat ve TRIS tamponları içerisinde SPE/PB/Üreaz enzim elektrodunun belirli konsantrasyonda üre ilaveleriyle gözlemlenen amperometrik cevapları için Şekil 4.4 a ve b'deki grafikler elde edildi. Bu grafiklerden bulunan duyarlılık değerleri ve çalışma aralıkları kıyaslandığında, fosfat tamponu kullandığımızda enzim elektrodunun üre duyarlılığının TRIS tamponuyla kıyasla hemen hemen 2 kat daha fazla olduğu ve çalışma aralığının da daha geniş bir aralıkta bulunduğu gözlemlenmiştir. Bundan dolayı, diğer deneylerde, çalışma tamponu için fosfat tamponu seçilmiştir. Üre tayini için yapılan farklı çalışmalarda çalışma tamponu olarak fosfat tamponunun seçildiği gözlemlenmiştir (Marchenko ve ark. 2015, Nauma Aline ve ark. 2018, Kuralay ve ark. 2006). TRIS tamponunun kullanılmasıyla bulduğumuz duyarlılığın düşük olmasının sebebi, kesin bir şekilde açıklayamamakla beraber, pH'yı ayarlama kullandığımız HCl'den gelecek Cl⁻ iyonlarının tesiriyle PB film iletken değerinin düşmesinden kaynaklı olabilir (Rejeb ve ark. 2007).



Şekil 4.4. Enzim elektrot cevabına tampon cinsi etkisi (a) 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu, (b) 0,05 M pH 7,4 TRİS tamponu (+0,65 V, 25 °C)

4.1.2.4. Tampon Derişiminin Biyosensör Cevabına Etkisi

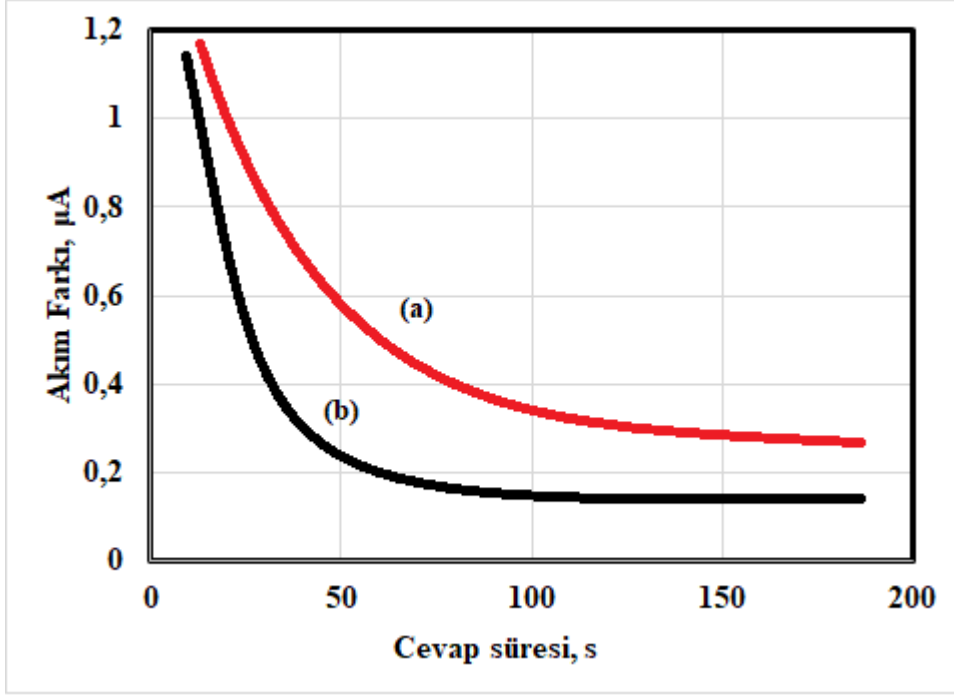
Enzim (SPE/PB/Üreaz) elektrodunun cevabına tampon konsantrasyonunun etkisinin gözlemlenmesi ve ideal tampon konsantrasyonunu belirlemek için, 0,05 M; 0,10 M; 0,15 M ve 0,20 M derişimlerde hazırladığımız tampon içerisine, SPE/PB/Üreaz elektrodunun üre ilavelerine karşılık amperometrik cevaplar belirlenildi ve çizilen kalibrasyon sonuçlarından yararlanılarak bulunan duyarlılık değerleri tampon konsantrasyonuna karşılık grafiğe aktarıldı. Şekil 4.5'ten anlaşılacağı gibi, en yüksek duyarlılık 0,05 M tampon konsantrasyonunda ölçüldü. Bu derişimin üzerindeki fosfat konsantrasyonlarında duyarlılığın azalmış olduğu gözlemlenmektedir. Bundan dolayı, bir sonra yapılacak deneylerin 0,05 M tampon konsantrasyonunda yapılması kararlaştırıldı. Diğer yandan, birçok çalışmada, ideal tampon derişimi için 0,05 M değerinin kullanılmış olduğu gözlemlenmiştir (Zhang ve ark. 2012, Hart ve ark. 1997). Bu bakımdan çalışmada bulunan sonuç literatür ile uyumludur. Tampon kapasitesi düşük değeri sebebiyle daha düşük tampon konsantrasyonlarında çalışma yapılmamıştır.



Şekil 4.5. Enzim elektrot cevabının tampon konsantrasyonunun etkisi (pH 7,4 fosfat tamponu, +0,65 V, 25 °C)

4.1.2.5. Cevap Süresinin Biyosensöre Etkisi

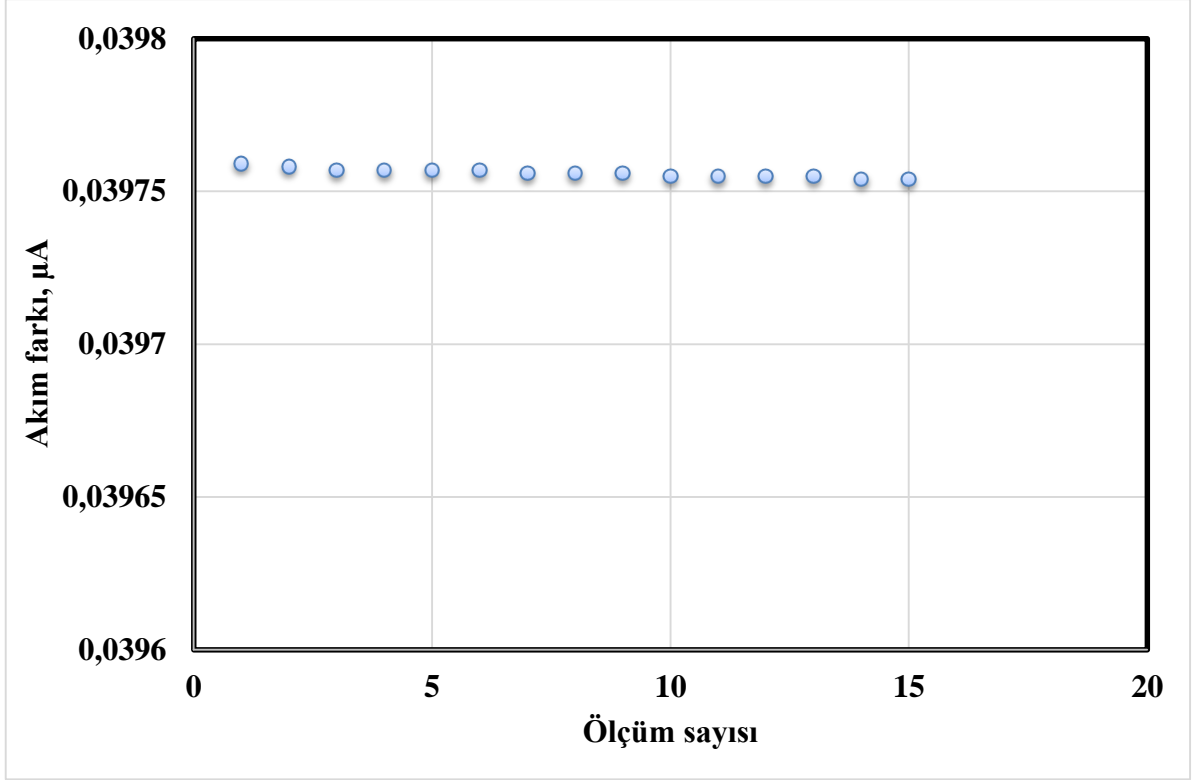
SPE/PB/Üreaz elektrodun üreye cevabını, derişim değerleri sırasıyla $1,0 \times 10^{-6}$ M ve $1,0 \times 10^{-5}$ M olan 2 farklı üre için belirledik. Zamana karşılık cevap akımları grafiğe aktarıldığında 2 farklı derişimde eğrilerin birbirleriyle benzer oranlarda olduğu gözlemmiştir (Şekil 4.6).Enzim elektrodunun cevapları bulunması amacıyla akımların hemen hemen stabil olduğu 150 s'lik zamanların alınabileceği anlaşıldı.Fakat, tüm ölçümler 40 s sonunda tekrarlandığında da ideal kalibrasyon eğrilerinin bulunacağından çalışmalar 40 s sonraki akımlar belirlenerek gerçekleştirildi.Bunun sebebi, analizin doğru olarak ve kısa bir zamanda ölçülmesi (tıp alanında) nihai olarak önemli bir etkindir.Literatürde cevap süresi 30 s, 40 s ve 150 s gibi veriler yer almaktadır (Gündüz ve ark. 1994).Bu çalışmada belirlenmiş cevap zamanı, ideal bir zaman sürecinde analizinin gerçekleştirilmesi için uygundur.



Şekil 4.6. Enzim elektrodunun cevap süresi (a) $1,0 \times 10^{-5}$ M üre ve (b) $1,0 \times 10^{-6}$ M üre (0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu, +0,65 V, 25 °C)

4.1.2.6. Tekrar Edilebilirliğinin Biyosensör Cevabına Etkisi

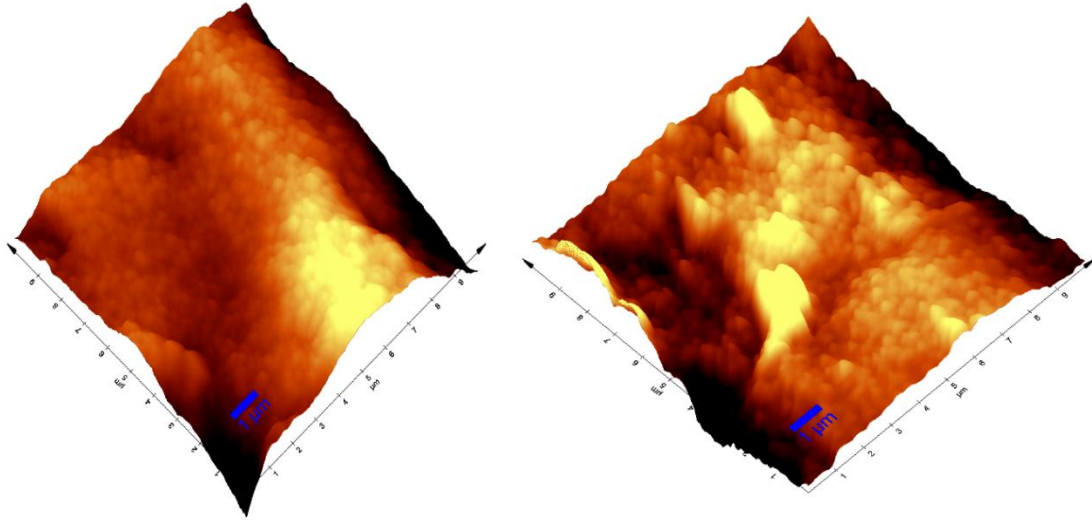
Gerçekleştirilen deneysel veriler ışığında bulunan amperometrik cevap akımları ölçme sayısına karşılık grafiğe aktarıldı (Şekil 4.7). Enzim elektrodun 15 ölçüm tekrarımda ilk ölçüm biyosensör değerlerinin %88'inin korunduğu gözlemlenmiştir. Biyosensörün belirli aralıklarda performansının çok fazla değişikliğe uğramaması kullandığımız immobilizasyon yönteminin kullanılabilir ve ideal olabileceğini göstermiştir. Tekrar edilebilirlik tüm biyosensör tipleri için önemli olmakla birlikte hazırladığımız biyosensör ile birçok kez deneme yapılabiliniceğini göstermiştir. Sürekli olarak yapılan analizler için tek ölçümede kullanılmakta olan kitler maliyet açısından yüksek olduklarından, bu şekilde hazırladığımız biyosensör daha ucuz ve kullanım açısından basittir. Elde edilen ölçümlerin literatürle karşılaştırıldığında hazırladığımız biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin sonucuna ulaşılabilir (Shul'ga ve ark. 1994, Escutio ve ark. 2010, Dervisevic ve ark. 2017).



Şekil 4.7. Enzim elektrodun tekrar edilebilirliğinin incelenmesi (0,05 M pH=7,4 fosfat tamponu, 25 °C)

4.1.2.7. Biyosensör AFM Sonuçları

SPE üzerine bir biyosensör oluşturmadan yüzeyin topografik görüntüsü alındı. Daha sonra da SPE üzerine PB ve enzim immobilize edildikten sonra SPE/PB/Üreaz enzim elektrodunun AFM sonuçları Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



(a) Sadece SPE

(b) SPE/PB/Üreaz

Şekil 4.8. Elektrodun üç boyutlu AFM görüntüsü 10µm x 10µm

(a) Sadece SPE (b) SPE/PB/Üreaz

AFM görüntülerinden elde edilen sonuç SPE elektrot üzerine PB ve üreaz enziminin immobilizasyonu başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir. SPE yüzey pürüzlülük değeri (rms) 390 nm iken SPE/PB/Üreaz enzim ile kaplı elektrodun rms değeri 728,5 nm olarak gözlenmiştir.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Biyosensörler, analiz yapılacak malzemenin biyobileşenle etkileşmesi sonucunda dönüştürücü yüzeyinde analit oranıyla orantılı olarak sinyal meydana gelmesiyle sinyalin çalışma sistemine aktarılması prensibine dayanmaktadır. Hazırlanan biyosensörde biyobileşen olarak enzimler, kullanılmıştır.

Analizi yapılacak malzemeye uygun olarak bir biyobileşen ve analitin dönüşümünün sonucu oluşan elektrokimyasal sinyali elektriksel sinyale çevirebilen uygun bir transduser seçilmiştir. Biyosensörlerde önemli sıkıntı biyolojik maddenin ideal olarak başarılı immobilize etmektir. İmmobilizasyon aşaması biyolojik malzemenin ömrünü, tekrar kullanılabilirliğini belirlemektedir. Uygun immobilizasyon işlevinin seçimi ile hazırlanacak biyosensörlerin son senelerde ticareti de büyük oranda faydalanılmaktadır.

Bu yüksek lisans tezi için hazırladığımız SPE/PB/Üreaz üre biyosensörünün; üre konsantrasyonunun lineer çalışma aralığı $2 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5}$ mM olarak bulundu. Çalışma değerleri lineerliğin uygun olduğunu ve bu çalışma aralığının kantitatif analizlerde kullanılabileceğini göstermiştir.

Ayrıca üre biyosensörünün ideal çalışma oda sıcaklığında, jelatin miktarı 2 mg, ve de GA oranı % 0,5 bulundu. Üre biyosensörünün cevap verme süresi 40 s olarak gözlemlendi. En ideal çalışma tamponunun, fosfat tamponu 0,05 M pH:7,4 olarak elde edildi. Tekrar kullanılabilirliğinin iyi olduğu gözlenmiştir (15 ölçme sonucunda biyosensör performansının % 88 oranında korunduğu belirlenmiştir).

Tez çalışmasından beklenen sonuçların elde edilmesiyle tezin başarılı olduğunu göstermektedir. Tezin amaçları arasında incelenen SPE/PB/Üreaz üre biyosensörünün AFM görüntülerinden de faydalanarak, optimizasyonunun başarılı olarak elde edildiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca üre ile üreaz enzimi arasındaki kataliz etkisi ile üreazın üreyi çok iyi parçalayıp, glüteraldehit ile çapraz bağ oluşturduğu bu görüntüler ile desteklenmektedir.

Sonuçta, tezde belirlediğimiz işlemçizelgesi baz alınarak üre biyosensörü ile alakalı bütün ölçümler gerçekleştirilmiş vetezde öngörülen amaçlara ulaşılmıştır. En son aşama olarak, elde edilen SPE/PB/Üreaz enzim temelli biyosensörün kan analizlerinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Alizadeh T., Ganjali M.R., Rafiei F., 2017. Trace Level And Highly Selective Determination Of Urea In Various Real Samples Based Upon Voltammetric Analysis Of Diacetylmonoxime-Urea Reaction Product On The Carbon Nanotube/Carbon Paste Electrode. *Analytica Chimica Acta* (Volume 974), Pages 54-62.
- Alonso-Lomillo M.A., Domínguez-Renedo O., Arcos-Martínez M.J., 2010. Screen-Printed Biosensors In Microbiology; A Review. (Volume 82), Issue 5, Pages 1629-1636.
- Bergamini M.F., Santos A.L., Stradiotto N.R., Zanoni M.V.B., 2007. Flow Injection Amperometric Determination Of Procaine In Pharmaceutical Formulation Using A Screen Printed Carbon Electrode. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, (Volume 43), Issue 1, Pages 315-319.
- Berman E.M., Yao S.J., Wolfson S.K., Joyce J., Tokarsky M., 1978. Enzymatic-Potentiometric Determination Of Urea In Human Serum. *Bioelectrochemistry And Bioenergetics* (Volume 5), Issue 1, Pages 63-66.
- Bettelheim F.A., March J., 1998. *Introduction To General, Organic & Biochemistry*. 5th Ed. Orlando, FL: Saunders College Publishing. 809 P.
- Bjarnasona B., Johanssonb P., Johanssona G., 1998. A Novel Thermal Biosensor: Evaluation For Determination Of Urea In Serum. *Analytica Chimica Acta* (Volume 372), Issue 3, Pages 341-348.
- Boubriak O.A., Soldatkin A.P., Starodub N.F., Sandrovsky A.K., El'skaya A.K., 1995. Determination Of Urea In Blood Serum By A Urease Biosensor Based On An Ion-Sensitive Field-Effect Transistor. *Sensors And Actuators B: Chemical* (Volume 27), Issues 1-3, Pages 429-431.
- Carsol M.A., Volpe G., Mascini N.M., 1997. Amperometric Detection Of Uric Acid And Hypoxanthine With Xanthine Oxidase Immobilized And Carbon Based Screen-Printed Electrode. Application For Fish Freshness Determination. *Talanta* (Volume 44), Issue 11, Pages 2151-2159.
- Courrol L.C., Bellini M.H., Tarelho L.V.G., Silva F.R.O., Mansano R.D., Gomes L., Vieira Jr N.D., Shor N., 2006. Urea Hydrogen Peroxide Determination In Whole Blood

- Using Europium Tetracycline Probe. *Analytical Biochemistry*. (Volume 355), Issue 1, Pages 140-144.
- Crouch E.,Cowell D.C., Hoskins S., Pittson R.W., Hart J.P., 2005. Amperometric, Screen-Printed, Glucose Biosensor For Analysis Of Human Plasma Samples Using A Biocomposite Water-Based Carbon Ink Incorporating Glucose Oxidase. *Analytical Biochemistry*, (Volume 347), Issue 1, Pages 17-23.
- Dervisevic M.,Dervisevic E., Senel M., Cevik E., Yildiz H.B., Camurlu P., 2017. Construction Of Ferrocene Modified Conducting Polymer Based Amperometric Ureabiosensor. *Enzym Microb Technol* 102:53–59.
- Dinh H.,Rhee D.J , 2015. Development Of A Ratiometric Fluorescent Urea Biosensor Based On The Urease Immobilized Onto The Oxazine 170 Perchlorate-Ethyl Cellulose Membrane. *Talanta* (Volume 134), Pages 333-339.
- Dou J.,Ding A., Cheng L., Sekar R., Li S., 2012. A Screen-Printed, Amperometric Biosensor For The Determination Of Organophosphorus Pesticides In Water Samples. *Journal Of Environmental Sciences*, (Volume 24), Issue 5, Pages 956-962.
- Eggensteinab C.,Borchardta M., Diekmanna C., Gründiga B., Dumschata C., Cammanna K., Knolla M., Spenerab F. , 1999. A Disposable Biosensor For Urea Determination In Blood Based On An Ammonium-Sensitive Transducer. *Biosensors And Bioelectronics*. (Volume 14), Issue 1, Pages 33-41.
- Escutia P.,Gómez J.J., Numbers Carolecalas-Blanchard..Jean Louismarty. María Teresaramírez-Silva., 2010. Amperometric Biosensor Based On A High Resolution Photopolymer Deposited Onto A Screen-Printed Electrode For Phenolic Compounds Monitoring In Tea Infusions. *Talanta* (Volume 81), Issues 4–5, Pages 1636-1642.
- Guilbault G.G.,Hrabánková E., 1970. Determination Of Urea In Blood And Urine With A Ureasensitive Electrode. *Analytica Chimica Acta* (Volume 52), Issue 2, Pages 287-294.
- Gündüz T.,Yılmaz S., 1994. Potentiometric Determination Of Urea With Perchloric Acid In Acetic Anhydride. *Talanta* (Volume 41), Issue 9, Pages 1471-1474.

- Hart J.P., Pemberton R.M., Luxton R., Wedge R., 1997. Studies Towards A Disposable Screen-Printed Amperometric Biosensor For Progesterone. *Biosensors And Bioelectronics*, (Volume 12), Issue 11, Pages 1113-1121.
- Jakhar S., Pundir C.S., 2018. Preparation, Characterization And Application Of Urease Nanoparticles For Construction Of An Improved Potentiometric Urea Biosensor. *Biosensors And Bioelectronics* (Volume 100), Pages 242-250.
- Johansson G., Ögrenl., 1976. An Enzyme Reactor Electrode For Urea Determinations. *Analytica Chimica Acta* (Volume 84), Issue 1, Pages 23-29.
- Kanyong P., Pemberton R.M., Jackson S.K., Hart J.P., 2012. Development Of A Sandwich Format, Amperometric Screen-Printed Uric Acid Biosensor For Urine Analysis. *Analytical Biochemistry*, (Volume 428), Issue 1, Pages 39-43.
- Kanyong P., Pemberton R.M., Jackson S.K., Hart J.P., 2013. Development Of An Amperometric Screen-Printed Galactose Biosensor For Serum Analysis. *Analytical Biochemistry*, (Volume 435), Issue 2, Pages 114-119.
- Kara F., 2006. Üreazın Aljinat-Kitosan Polielektrolit Ve Poli(Akrilamit-Ko-Akrilik Asit)/K-Karragenan İnterpolimer Komplekslerine İmmobilizasyonu. Gazi Üniversitesi, Doktora Tezi, 59s.
- Kuralay F., Özyörük H., Yıldız A., 2006. Amperometric Enzyme Electrode For Urea Determination Using Immobilized Urease İn Poly(Vinylferrocenium) Film. *Sensors And Actuators B: Chemical* (Volume 114), Issue 1, Pages 500-506.
- Linstromberg WW., Baumgarten HE., 1987. *Organic Chemistry: A Brief Course*. Lexington, Massachusetts: D.C. Heath And Company. 517 P.
- Liu D., Chen K., Ge K., Nie L., Yao S., 1996. A New Urea Sensor Based On Combining The Surface Acoustic Wave Device With Urease Extracted From Green Soya Bean And Its Application— Determination Of Urea İn Human Urine. *Biosensors And Bioelectronics* (Volume 11), Issue 4, Pages 435-442.
- Liu M., Xiang J., Zhou J., Ding H., 2010. A Disposable Amperometric Sensor For Rapid Detection Of Serotonin İn The Blood And Brain Of The Depressed Mice Based On

- Nafion Membrane-Coated Colloidal Gold Screen-Printed Electrode. *Journal Of Electroanalytical Chemistry*, (Volume 640), Issues 1–2, Pages 1-7.
- Marchenko S.V.,Kucherenko S., Hereshkoi A.N., Panasiuk V., Soldatkina O.O. , El'skaya A.V., Soldatkina A.P., 2015. Application Of Potentiometric Biosensor Based On Recombinant Urease For Urea Determination In Blood Serum And Hemodialyzate. *Volume 207, Part B*, Pages 981-98.
- Maynard LA.,Loosli JK., Hintz HF., Warner RG., 1979. *Animal Nutrition*. 7th Ed. New York, NY: Mcgraw-Hill Book Company. 602 P.
- Michalec M.,Granica M., Bzura J., Koncki R., Matuszkiewicz J., Łukasz R., Tymecki., 2016. Optoelectronic Detectors And Flow Analysis Systems For Determination Of Dialysate Urea Nitrogen(*Volume 226*). Pages 563-569.
- Molinero-Abad B.,Alonso-Lomillo M.A., Domínguez-Renedo O., Arcos-Martínez M.J., 2015. Simultaneous Amperometric Determination Of Malic And Gluconic Acids In Wine Using Screen-Printed Carbon Electrodes. *Sensors And Actuators B: Chemical*, (Volume 211), Pages 250-254.
- Myers RL., 2007. *The 100 Most Important Chemical Compounds : A Reference Guide*. Westport, CT: Greenwood Press. P. 288-290. Retrieved Jan. 6, 2012 From [Http://Www.Scribd.Com/Doc/23712570/29/Chlorophyll](http://www.Scribd.Com/Doc/23712570/29/Chlorophyll).
- Nasrollahzadeh M.,Atarod M., Sajjadi M., Sajadi S.M., Issaabadi Z., 2019. Chapter 6 - Plant-Mediated Green Synthesis Of Nanostructures: Mechanisms, Characterization, And Applications. (*Volume 28*), 2019, Pages 199-322.
- Nauman A.,Muhammad I., Khan A., Khan H., Haider S., Tahseen K., 2018. Spectrophotometric Methods For The Determination Of Urea In Real Samples Using Silver Nanoparticles By Standard Addition And 2nd Order Derivative Methods (*Volume 189*). Pages 110-115.
- Pemberton R.M.,Harta J.P., Foulkes J.A., 1998. Development Of A Sensitive, Selective Electrochemical Immunoassay For Progesterone In Cow's Milk Based On A Disposable Screen-Printed Amperometric Biosensor. *Electrochimica Acta* (*Volume 43*), Issue 23, Pages 3567-3574.

- Pijanowska D.G., Torbicz W., 1997. Ph-ISFET Based Urea Biosensor. *Sensors And Actuators B: Chemical* (Volume 44), Issues 1–3, Pages 370-376.
- Rejeb I.B., Arduini F., Mohamed A.A., Pallesch G.G., 2007. Amperometric Biosensor Based On Prussian Blue-Modified Screen-Printed Electrode For Lipase Activity And Triacylglycerol Determination. *analytica Chimica Acta* (Volume 594), Issue 1, Pages 1-8.
- Schmitt A., Buttle L., Uglow R., Williams K., Haswell S., 1993. An Integrated Reduction Method For The Determination Of Urea As Ammonia In Fresh Water Samples. *Analytica Chimica Acta* (Volume 284), Issue 2, Pages 249-255.
- Schubert F., Müller C., Scheper T., 1994. A Fiber Optic Enzyme Sensor For The Determination Of Urea In Serum Samples. *Biosensors '94* Pages 233, New Orleans, USA.
- Shitanda I., Takamatsu S., Masayuki Tagaki K.W., 2009. Amperometric Screen-Printed Algal Biosensor With Flow Injection Analysis System For Detection Of Environmental Toxic Compounds. *Electrochimica Acta* (Volume 54), Issue 21, Pages 4933-4936.
- Stefano J.S., Tormin T.F., Silva J.P., Richter E.M., Munoz R.A.A., 2017. Amperometric Determination Of Omeprazole On Screen-Printed Electrodes Using Batch Injection Analysis. *Microchemical Journal*, (Volume 133), Pages 398-403.
- Shul'ga A.A., Soldatkin A.P., El'skaya A.V., Dzyadevich S.V., Patskovsky S.V., Strikha V.I., 1994. Thin-Film Conductometric Biosensors For Glucose And Urea Determination. *Biosensioelectron* 9(3):217–223.
- Suman, O'Reilly E., Kelly M., Morrin A., Smyth M.R., Killard A.J., 2011. Chronocoulometric Determination Of Urea In Human Serum Using An Inkjet Printed Biosensor. *Analytica Chimica Acta* (Volume 697), Issues 1–2, Pages 98-102.
- Suzuki H., Matsugi Y., 2005. Integrated Microfluidic System For The Simultaneous Determination Of Ammonia, Creatinine, And Urea. *Sensors And Actuators B: Chemical* (Volume 108), Issues 1–2, Pages 700-707.

- Şehitoğulları A., Uslan A.H., 2002. Preparation Of A Potentiometric Immobilized Urease Electrode And Urea Determination In Serum. *Talanta* (Volume 57), Issue 6, Pages 1039-1044.
- Taleat Z., Khoshroo A., Mazloun-Ardakani M., 2014. Screen-Printed Electrodes For Biosensing: A Review. (Volume 181), Issue 9–10, Pp 865–891.
- Thirumalraj B., Zhao D.H., Chen S.M., Palanisamy S., 2016. Non-Enzymatic Amperometric Detection Of Hydrogen Peroxide In Human Blood Serum Samples Using A Modified Silver Nanowire Electrode. *Journal Of Colloid And Interface Science*, (Volume 470), Pages 117-122.
- Uchiyama S., Tohfuku Y., Suzuki S., Muto G., 1985. Determination Of Urea By Ion Chromatography With An Immobilized Urease Reactor. *Analytica Chimica Acta* (Volume 174), Pages 313-316.
- Upan J., Reanpang P., Chailapakul O., Jakmunee J., 2016. Flow Injection Amperometric Sensor With A Carbon Nanotube Modified Screen Printed Electrode For Determination Of Hydroquinone. *Talanta*, (Volume 146), Pages 766-771.
- Wałcerz I., Głab S., Koncki R., 1998. Potentiometric Enzyme Electrode In A Flow Injection System For The Determination Of Urea In Human Serum Samples. *Analytica Chimica Acta*. (Volume 369), Issues 1–2, Pages 129-137.
- Wałcerz I., Koncki R., Leszczyńska E., Głab S., 1995. Enzyme Biosensors For Urea Determination Based On An Ionophore Free Ph Membrane Electrode. *Analytica Chimica Acta* (Volume 315), Issue 3, Pages 289-296.
- Wang J., Chen Q., Pedrero M., Pingarrón J.M., 1995. Screen-Printed Amperometric Biosensors For Glucose And Alcohols Based On Ruthenium-Dispersed Carbon Inks. *Analytica Chimica Acta*, (Volume 300), Issues 1–3, Pages 111-116.
- Wang Y.Q., Wang S.S., Jizhu, Leiwang, Bo-Haijiang, Wei-Jiezhao., 2016. Determination Of Urea Content In Urea Cream By Centrifugal Partition Chromatography. *Journal Of Food And Drug Analysis* (Volume 24), Issue 2, Pages 399-405.
- Wardlaw GM., Hampl JS., Disilvestro RA., 2004. *Perspectives In Nutrition*. 6th Ed. New York, NY: McGraw-Hill Companies, Inc. 752 P.

- Yong W.,Seung L., Tae R.K., Kang H.K., Min S.L., Je C.S., Park K., 2000. Sol–Gel-Derived Thick-Film Conductometric Biosensor For Urea Determination In Serum. *Analytica Chimica Acta*. (Volume 404), Issue 2, Pages 195-203.
- Yueh-Huilin, Sz-Hauchen, Yao-Chenchuanga.,Yi-Chenlu, Thomas Y.Shen, C. Allenchang,Chih-Shenglin., 2008. Disposable Amperometric Immunosensing Strips Fabricated By Au Nanoparticles-Modified Screen-Printed Carbon Electrodes For The Detection Of Foodborne Pathogen. *Biosensors And Bioelectronics* (Volume 23), Issue 12, Pages 1832-1837.
- Zhang H.,Liu G., Chai C., 2012. A Novel, Disposable, Screen-Printed Amperometric Biosensor For Glucose In Serum Fabricated Using A Water-Based Carbon Ink. *Sensors And Actuators B: Chemical*, (Volume 168), Pages 103-110.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Arzu EKER

Doğum Yeri: ÇANAKKALE

Doğum Tarihi: 27.02.1981

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi:Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi-Tezsiz:Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi,
Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Öğretmenliği

Yüksek Lisans Öğrenimi:Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen
Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

Bildiriler -Uluslararası -Ulusal:

A. EKER, Z. ÖZBEK, 'Development of Disposable Amperometric Biosensor for Urea Determination', 4th International Congress on Biosensors, Temmuz 2019,Çanakkale,(Poster)

A. EKER, The Recycling Of Ceramic Sludge Waste to Produce Alternative Eco-Products In Ceramic Tile Factory, Eurasia Waste ManagementSymposium, İstanbul, Nisan 2014

A. EKER, Investigation Of Using The Sanitaryware Plaster Moulds Waste Addition Into Save Roller Engobe Composition", Sunum, pp.7, 2014SERES Kongre, Eskişehir, Ekim 2014

A. EKER, Recycling Of Green Process Waste In Porcelain Tile, Sunum, pp.4, QUALICER, Castelló, Şubat 2014

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: Ar-Ge Mühendisi, Kaleseramik Çanakkale Kalebodur Seramik San. A.Ş., 2006-2015

Öğr.Gör., Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Çan Meslek Yüksekokulu Elektronik ve Otomasyon Bölümü 2015-

İLETİŞİM

E-posta Adresi: arzueker@comu.edu.tr

