



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KSANTİN TAYİNİ İÇİN AMPEROMETRİK
ENZİM ELEKTROTLARININ
GELİŞTİRİLMESİ

Salih Zeki BAŞ
DOKTORA TEZİ
Kimya Anabilim Dalı

Şubat – 2011
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Salih Zeki Baş tarafından hazırlanan “KSANTİN TAYİNİ İÇİN AMPEROMETRİK ENZİM ELEKTROTLARININ GELİşTİRİLMESİ” adlı tez çalışması 17/02/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliğı ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof. Dr. Kadir PEKMEZ

Danışman

Prof. Dr. Salih YILDIZ

Üye (2. Danışman)

Prof. Dr. Handan GÜLCE

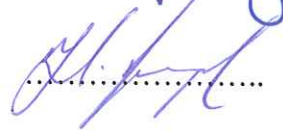
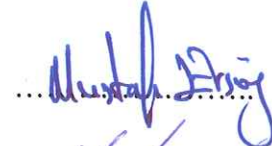
Üye

Prof. Dr. Mustafa ERSÖZ

Üye

Yrd. Doç. Dr. Haluk BİNGÖL

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Bayram SADE
FBE Müdürü

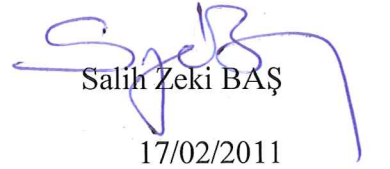
Bu tez alışması Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü tarafından 08101018 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.


Salih Zeki BAŞ
17/02/2011

ÖZET

DOKTORA TEZİ

KSANTİN TAYİNİ İÇİN AMPEROMETRİK ENZİM ELEKTROTLARININ GELİŞTİRİLMESİ

Salih Zeki BAŞ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Salih YILDIZ

2011, 148 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Salih YILDIZ

Prof. Dr. Handan GÜLCE

Prof. Dr. Kadir PEKMEZ

Prof. Dr. Mustafa ERSÖZ

Yrd. Doç. Dr. Haluk BİNGÖL

Bu çalışmada, polivinilferrosen(PVF) ile modifiye edilmiş Pt elektrot kullanılarak beş yeni ksantin biyosensörü tanımlandı. Pt elektrot yüzeyinin PVF kaplanması iki farklı metot ile yapıldı. Birinci metotta, PVF modifiye elektrodu Pt elektrodunun metilen klorür içerisindeki PVF çözeltisine belirli bir süre daldırılması ve sonra çözücünün buharlaştırılmasıyla hazırlandı. İkinci metotta ise, polivinilferrosenyum perklorat ($PVF^+ClO_4^-$) modifiye elektrodu 0,10 M tetrabutylamonyumperklorat içeren metilen klorürdeki PVF çözeltisinde 0,70 V (Ag/AgCl karşı) da elektrokimyasal yükseltgenmesiyle hazırlandı.

Çalışmanın ilk bölümünde, birinci metot kullanılarak, polivinilferrosen(PVF) kaplı Pt elektrot yüzeyine, PVF kaplı film üzerine altın biriktirilmesiyle hazırlanan Pt elektrot yüzeyine ve PVF kaplı film üzerine platin biriktirilmesiyle hazırlanan Pt elektrot yüzeyine ksantin oksidaz immobilize edilmiş ve bu elektrotlar sırasıyla PVF-XO, PVF-Au-XO ve PVF-Pt-XO olarak adlandırılmıştır.

Çalışmanın diğer bölümünde ise, ikinci metot kullanılarak, $PVF^+ClO_4^-$ kaplı Pt elektrot yüzeyine ve $PVF^+ClO_4^-$ kaplı film üzerine platinin elektrokimyasal biriktirmesiyle hazırlanan Pt elektrot yüzeyine ksantin oksidaz immobilize edilmiş ve bu elektrotlar PVF^+XO^- ve PVF^+XO^- -Pt olarak adlandırılmıştır.

Enzim elektrotlarının amperometrik cevapları enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan H_2O_2 'in sabit potansiyelde yükseltgenmesine dayanarak ölçülmüştür. Enzim elektrotlarının cevabı üzerine uygulama potansiyelinin, polimer film kalınlığının, immobilize olan enzim miktarının, enzim immobilizasyon süresinin, pH'ın, sıcaklığın, ksantin konsantrasyonunun etkisi ile altın ve platin taneciklerinin elektrokimyasal yükseltgenmede elektrokatalitik etkileri araştırılmıştır. Ayrıca, enzim elektrotlarının doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, kararlılık, görünür Michaelis-Menten sabiti ve aktivasyon enerjisi gibi performans parametreleri de araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ksantin, Ksantin Oksidaz, Polivinilferrosen, Amperometrik Biyosensör, Elektrokimyasal platin biriktirme, Kimyasal altın biriktirme, Kimyasal platin biriktirme.

ABSTRACT

Ph.D THESIS

DEVELOPMENT OF AMPEROMETRIC ENZYME ELECTRODES FOR XANTHINE DETERMINATION

Salih Zeki BAŞ

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
SELÇUK UNIVERSITY
DOCTOR OF PHILOSOPHY IN CHEMISTRY**

Advisor: Prof. Dr. Salih YILDIZ

2011, 148 Pages

Jury

Prof. Dr. Salih YILDIZ

Prof. Dr. Handan GÜLCE

Prof. Dr. Kadir PEKMEZ

Prof. Dr. Mustafa ERSÖZ

Yrd. Doç. Dr. Haluk BİNGÖL

In this study, five novel xanthine biosensors were described by using polyvinylferrocene (PVF) modified Pt electrodes. PVF coating of Pt electrode surfaces was performed in two different methods. In the first method, PVF modified electrode was prepared by immersing Pt electrode in a solution of PVF in methylene chloride for a certain time period and then, by vaporizing the solvent. In the second method, polyvinylferrocenium perchlorate ($PVF^+ClO_4^-$) modified electrode was prepared by electrooxidizing PVF at 0.70 V versus Ag/AgCl in a methylene chloride solution containing 0.10 M tetrabutylammonium perchlorate.

In the first part of the study, by using the first method, xanthine oxidase was immobilized on the surface of polyvinylferrocene coated Pt electrode, gold deposited PVF coated Pt electrode and platinum deposited PVF coated Pt electrode and these electrodes were called as PVF-XO, PVF-Au-XO and PVF-Pt-XO, respectively.

In the other part of the study, by using the second method, xanthine oxidase was immobilized on the surface of $PVF^+ClO_4^-$ coated Pt electrode and platinum electrodeposited $PVF^+ClO_4^-$ coated Pt electrode and these electrodes were called as PVF^+XO^- and PVF^+XO^- -Pt, respectively.

The amperometric responses of the enzyme electrodes were measured at constant potential versus Ag/AgCl, which was due to the electrooxidation of enzymatically produced H_2O_2 . The effects of applied potential, the thickness of polymeric film, the amount of the immobilized enzyme, the immobilization time of the enzyme, pH, temperature, xanthine concentrations on the responses of the enzyme electrodes and the electrocatalytic effects of gold and platinum particles on the enzymatic electrooxidation were investigated. Also, the performance parameters of the enzyme electrodes such as the linear working range, the detection limit, the apparent Michaelis-Menten constant, the activation energy were investigated.

Keywords: Xanthine, Xanthine Oxidase, Polyvinylferrocene, Amperometric Biosensor, Platinum electrodeposition, Gold deposition, Platinum deposition.

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Salih Yıldız ve Selçuk Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Handan Gülce danışmanlıklarında tamamlanarak, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Doktora Tezi olarak sunulmuştur.

Tez projemin planlanması ile başlayan ve çalışmalarım boyunca devam eden dönemde destek ve yardımlarını gördüğüm danışmanım Sayın Prof. Dr. Salih Yıldız'a, tez projemin konusu hakkındaki tecrübesi ve sağladığı laboratuvar imkanı ile çalışmalarım boyunca yanımda olan Sayın Prof. Dr. Handan Gülce'ye, çalışmalarımda kullandığım polimerin sentezi için Sayın Prof. Dr. Ahmet Gülce'ye, Tez İzleme Komitesinde yer alan Sayın Prof. Dr. Mustafa Ersöz'e ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Haluk Bingöl'e, çalışmalarım esnasında yardımlarını fazlasıyla gördüğüm Arş. Gör. Özlem Gökdoğan'a, teşekkürlerimi sunarım.

Salih Zeki Baş
Konya - 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ.....	1
2. BİYOSENSÖRLER.....	4
2.1. Biyobileşenler	4
2.2. Fiziksel Bileşenler.....	5
2.3. Enzim İmmobilizasyonu	8
2.3.1. İmmobilizasyon yöntemleri	8
2.3.1.1. Taşıyıcıya bağlanma yöntemi	9
2.3.1.2. Çapraz bağlanma yöntemi	10
2.3.1.3. Tutuklama yöntemi	10
2.4. Enzim Biyosensörlerinde Substrat Taşınımı ve Elektron Transferi	10
2.4.1. Substrat Taşınımı	10
2.4.2. Elektron Transfer Mekanizması.....	12
2.5. Biyosensörlerin Performans Kriterleri.....	14
2.5.1. Seçicilik	14
2.5.2. Duyarlık	14
2.5.3. Doğrusallık.....	14
2.5.4. Cevap süresi.....	15
2.5.5. Gözlenebilme sınırı.....	16
2.5.6. Kararlılık.....	16
2.5.7. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)	16
2.5.8. Kullanım ömrü	17
3. ENZİMLER.....	18
3.1. Enzimlerin Yapısı	18
3.2. Enzimlerde Aktif Merkez ve Substrata Karşı Özgüllük	19
3.3. Enzimlerin Sınıflandırılması	20
3.4. Enzim Kinetiği	21
4. KSANTİN OKSİDAZ ENZİMİ.....	27
5. REDOKS POLİMERLERİ.....	34
6. KAYNAK ARAŞTIRMASI	38
6.1. Ksantin Okisadaz Biyosensörleri ile İlgili Kaynak Araştırması	38
6.2. Polivinilferrosen Modifiye Elektrotlar ile İlgili Kaynak Araştırması.....	40
6.3. Metal Taneciklerinin Kullanıldığı Elektrotlar ile İlgili Kaynak Araştırması	45

7. MATERYAL VE METOT.....	48
7.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	48
7.1.1. Vinilferrosen'in kimyasal polimerizasyonu.....	49
7.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Hücre ve Elektrotlar	50
7.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	50
7.4. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler	51
7.4.1. Gerilim kontrollü kulometri.....	51
7.4.2. Kronoamperometri.....	51
7.4.3. Dönüşümlü voltametri	53
7.4.4. Taramalı elektron mikroskobu.....	54
7.5. Ksantin Oksidaz Biyosensörlerinin Hazırlanması ve İşleyişi.....	56
8. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	63
8.1. PVF-XO Biyosensörüne Ait Araştırma Sonuçları.....	63
8.1.1. Uygulama potansiyelinin etkisi	63
8.1.2. PVF konsantrasyonunun etkisi	64
8.1.3. PVF çözeltisinde bekletme süresinin etkisi	65
8.1.4. XO çözeltisinde bekletme süresinin etkisi.....	65
8.1.5. XO konsantrasyonunun etkisi.....	66
8.1.6. pH etkisi.....	67
8.1.7. Sıcaklık etkisi.....	68
8.1.8. Girişim etkisi.....	70
8.1.9. Substrat konsantrasyonunun etkisi.....	71
8.1.10. PVF-XO biyosensörünün kararlılığı ve tekrarlanabilirliği	72
8.1.11. PVF-XO biyosensörünün voltametrik yöntem ile incelenmesi	74
8.1.12. PVF-XO biyosensörü ile gerçek numune çalışması	76
8.1.13. PVF-XO biyosensörüne ait SEM görüntüleri.....	77
8.2. PVF-Au-XO Biyosensörüne Ait Araştırma Sonuçları.....	78
8.2.1. Uygulama potansiyelinin etkisi	78
8.2.2. KAuCl ₄ konsantrasyonunun etkisi.....	79
8.2.3. KAuCl ₄ çözeltisinde bekletme süresinin etkisi.....	80
8.2.4. Sıcaklık etkisi.....	81
8.2.5. Girişim etkisi.....	82
8.2.6. Substrat konsantrasyonunun etkisi.....	83
8.2.7. PVF-Au-XO biyosensörünün kararlılığı ve tekrarlanabilirliği	85
8.2.8. PVF-Au-XO biyosensörünün voltametrik yöntem ile incelenmesi.....	86
8.2.9. PVF-Au-XO biyosensörü ile gerçek numune çalışması	88
8.2.10. PVF-Au-XO biyosensörüne ait SEM görüntüleri.....	89
8.3. PVF-Pt-XO Biyosensörüne Ait Araştırma Sonuçları	90
8.3.1. Uygulama potansiyelinin etkisi	90
8.3.2. PtBr ₂ konsantrasyonunun etkisi	90
8.3.3. PtBr ₂ çözeltisinde bekletme süresinin etkisi	91
8.3.4. Sıcaklık etkisi.....	92
8.3.5. Girişim etkisi.....	94
8.3.6. Substrat konsantrasyonunun etkisi.....	95
8.3.7. PVF-Pt-XO biyosensörünün kararlılığı ve tekrarlanabilirliği	97
8.3.8. PVF-Pt-XO biyosensörünün voltametrik yöntem ile incelenmesi	98
8.3.9. PVF-Pt-XO biyosensörü ile gerçek numune çalışması.....	100
8.3.10. PVF-Pt-XO biyosensörüne ait SEM görüntüleri	101

8.4. PVF ⁺ XO ⁻ Biyosensörüne Ait Araştırma Sonuçları	102
8.4.1. Uygulama potansiyelinin etkisi	102
8.4.2. PVF ⁺ ClO ₄ ⁻ film kalınlığının etkisi	102
8.4.3. XO çözeltisinde bekletme süresinin etkisi	103
8.4.4. XO konsantrasyonunun etkisi	104
8.4.5. pH etkisi	105
8.4.6. Sıcaklık etkisi	106
8.4.7. Girişim etkisi	108
8.4.8. Substrat konsantrasyonunun etkisi	108
8.4.9. PVF ⁺ XO ⁻ biyosensörünün kararlılığı ve tekrarlanabilirliği	110
8.4.10. PVF ⁺ XO ⁻ biyosensörünün voltametrik yöntem ile incelenmesi	112
8.4.11. PVF ⁺ XO ⁻ biyosensörü ile gerçek numune çalışması	114
8.4.12. PVF ⁺ XO ⁻ biyosensörüne ait SEM görüntüleri	114
8.5. PVF ⁺ XO ⁻ -Pt Biyosensörüne Ait Araştırma Sonuçları	116
8.5.1. Uygulama potansiyelinin etkisi	116
8.5.2. Platin biriktirme potansiyelinin etkisi	117
8.5.3. Platin film kalınlığının etkisi	118
8.5.4. H ₂ PtCl ₆ konsantrasyonunun etkisi	118
8.5.5. Sıcaklık etkisi	119
8.5.6. Girişim etkisi	121
8.5.7. Substrat konsantrasyonunun etkisi	122
8.5.8. PVF ⁺ XO ⁻ -Pt biyosensörünün kararlılığı ve tekrarlanabilirliği	123
8.5.9. PVF ⁺ XO ⁻ -Pt biyosensörünün voltametrik yöntem ile incelenmesi	125
8.5.10. PVF ⁺ XO ⁻ -Pt biyosensörü ile gerçek numune çalışması	127
8.5.11. PVF ⁺ XO ⁻ -Pt biyosensörüne ait SEM görüntüleri	127
9. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	129
KAYNAKLAR	139
ÖZGEÇMİŞ	149

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

A	: elektrot alanı
C	: substrat konsantrasyonu
$C_{yük}$	: yükseltgenmiş türlerin konsantrasyonu
C_{ind}	: indirgenmiş türlerin konsantrasyonu
D	: difüzyon katsayısı
C_B	: analitin başlangıç konsantrasyonu
c_m	: gözlenebilme sınırı
E_{pc}	: katodik pik potansiyeli
E_{pa}	: anodik pik potansiyeli
$E_{1/2}$	: voltametrik yarı dalga potansiyeli
F	: Faraday sabiti, 96485 C
ΔG	: Gibbs serbest enerjisi
i	: akım
I_{max}	: maksimum akım değeri
i_{pc}	: katodik pik akımı
i_{pa}	: anodik pik akımı
J	: substratın difüzyon akısı
k	: elektron transfer hızı
k_1	: enzim ile substrat arasındaki reaksiyonun ileri yöndeki hız sabiti
k_{-1}	: enzim ile substrat arasındaki reaksiyonun geri yöndeki hız sabiti
k_2	: enzim-substrat kompleksinde ürün oluşumuna ait ileri yöndeki hız sabiti
k_{-2}	: enzim-substrat kompleksinde ürün oluşumuna ait geri yöndeki hız sabiti
k_{ET}	: elektron transferine ait hız sabiti
K	: balık tazeliğinde kullanılan kalite standart değeri
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
K_{mapp}	: görünür Michaelis-Menten sabiti
n	: elektron sayısı
N	: elektroliz olan maddenin mol sayısı
t	: zaman
R_{SE}	: kendiliğinden değişme hızı

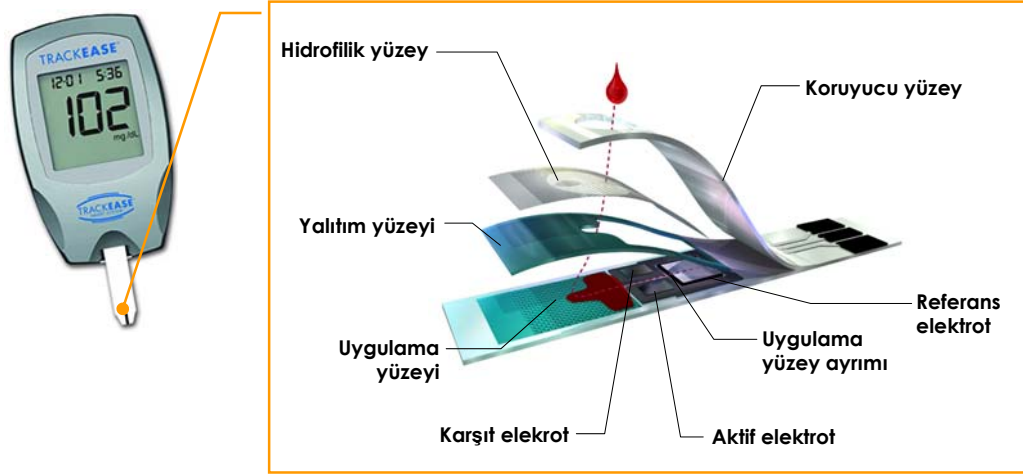
S_m	: analitik sinyal
$\bar{S}_{bl}$	: ortalama tanık sinyali
s_{bl}	: tanığın standart sapması
v	: reaksiyon hızı
V_m	: maksimum hız
λ	: taneciğin geometrisindeki değişim enerjisi
Q	: elektrik yükü
$[E]$	: enzim konsantrasyonu
$[S]$	: substrat konsantrasyonu
$[ES]$	: enzim-substrat kompleks konsantrasyonu
$[E]_0$	: enzim başlangıç konsantrasyonu
$[INO]$	: inosin konsantrasyonu
$[HX]$	: hipoksantin konsantrasyonu
$[IMP]$	: inosin monofosfat konsantrasyonu

1. GİRİŞ

Günümüzde biyoteknoloji, biyokimya, tıp ve eczacılık alanlarındaki gelişmeler enzimler, proteinler, hormonlar, nükleik asitler gibi biyomoleküllerin bu alanlardaki teknolojilerde kullanımını attırmaktadır. Biyomoleküllerin bu alanlardaki kullanımında en önemli husus ürünün biyolojik aktivitesini uygulanan işlemlerle kaybetmemesidir. Son yıllarda oldukça fazla çalışmanın yapıldığı biyomolekül kullanım alanlı teoknojilerden bir tanesi de, analizdeki hedef molekülün tanınmasına imkan sağlayan, diğer teknolojilere göre daha kuvvetli ve maliyeti düşük bir teknoloji olan biyosensör teknolojisidir. Biyosensörler temel olarak, enzim, antikor, nükleik asit, mikroorganizma ve doku kültürü gibi biyomoleküller ve bu moleküllerin hedef analit ile arasındaki etkileşimin sonucunu sinyal olarak veren bir dönüştürücüden oluşan cihazlardır. Biyosensörlere seçicilik, spesifiklik ve hızlı analiz özellikleri kazandıran biyomoleküllerden en önemlisi enzimlerdir (Murphy, 2006; Mohanty, 2006).

Enzimler çok eski çağlardan bu zamana kadar insan yaşamında büyük öneme sahip olan ve canlı organizmalardaki biyokimyasal değişimleri kataliz eden moleküllerdir. Enzim, yapılarında genel olarak bileşimce ve görevce farklı olan iki kısım bulunur. Büyük protein moleküllerinden oluşan, enzimin özelliğini ve spesifikliğini sağlayan apoenzim ile apoenzime katalitik aktivite özelliği kazandıran kofaktörden oluşmaktadır.

Enzimlerin apoenzim ve kofaktörün kazandırdığı seçicilik ve spesifiklik özellikleri ile biyosensörlerde biyomolekül olarak kullanımı 1950 yıllarına kadar dayanmaktadır. 1950 yıllarının ortalarında L.C. Clark'ın, glikoz oksidaz enzimini oksijen elektrodu ile kombine ederek bir ameliyat esnasında kanın oksijen miktarını izlemesiyle başlayan enzim biyosensörleri kullanımı, Şekil 1.1'de gösterilen günümüzde aynı enzimin kullanıldığı ve 1 µL kan örneğinin elektrot yüzeyine damlatılmasıyla 10 saniye gibi kısa bir sürede mgdL⁻¹ olarak sonuç alınan glikoz biyosensörlerine kadar ulaşmıştır. Günümüzde, kolesterol oksidaz (Özer, 2007), kolin oksidaz (Gülce, 2003), peroksidaz (Şenel, 2010), üreaz (Kuralay, 2006), ksantin oksidaz (Hu, 2000) gibi çok farklı enzimler kullanılarak hazırlanan biyosensörler ile besin analizleri, tıbbi uygulamalar, çevresel analizler ve savunma-güvenlik sektörü gibi değişik alanlarda kalitatif veya kantitatif analizler yapılmaktadır.



Şekil 1.1. Kandaki glikoz tayini için tasarlanmış ticari bir glikoz biyosensörü

Biyosensörlerde biyomolekül olarak yararlanılan enzimlerden birisi olan ksantin oksidaz enzimi, insan vücudunda ürik asit kristallerinin fazla miktarda birikmesiyle oluşan gut hastalığının teşhisinde, balıklarda ölüm sonrası devam eden pürin bozunmasının takibi ile balık tazeliğinin belirlenmesinde, insan dokularında biriken ve sonra plazmaya geçen ksantin miktarının belirlenmesiyle kalp krizi teşhisinde önemli bir yere sahiptir. Canlı yaşamındaki önemli rolü dolayısıyla araştırmacıların ksantin oksidaz enzimi kullanarak yaptıkları çalışmaların önemli bir bölümünü bu enzim ile hazırladıkları biyosensörler oluşturmaktadır. Böylece hazırlanan ksantin oksidaz biyosensörleri ile gerekli teşhislerin izlenmesinde enzime cevap veren ksantin, hipoksantin gibi substratların miktar tayinleri yapılmaktadır (Mao, 2000; Agui, 2006).

Ksantin ve hipoksantin tayinleri için çoğunlukla biyosensör kullanılmasının nedeni karmaşık bir sisteme uygulanabilmesinin yanında, performans ve maliyet bakımından uygun bir imkan sağlayan güçlü bir yöntem olmasından kaynaklanmaktadır. Belirlenen yöntem ile analizler için en iyi çalışma ve en iyi verim aralığının belirlenmesi için birçok parametrenin etkisinin araştırılması gerekmektedir. Bu yaklaşımla, yapılacak olan deneysel çalışmalar sonucunda hem istenen çalışma parametreleri belirlenecek hem de bu parametrelerde yapılacak analizlerde belirli bir güven aralığında sonuçlar elde edilecektir.

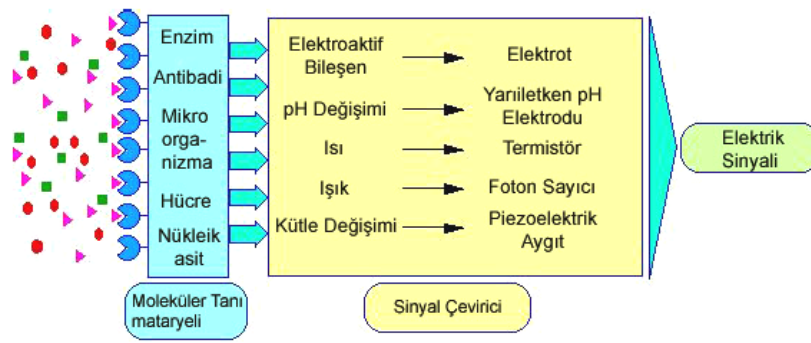
Yukarıda kısaca özetlediğimiz ve biyosensör teknolojisine artan ilginin yanında ksantin oksidazın canlı yaşamındaki önemini de düşünerek ksantin tayini için tasarlanmış olduğumuz beş farklı amperometrik ksantin oksidaz biyosensörü ile bu biyosensörlerin

akım cevapları üzerine uygulama potansiyeli, kullanılan polimerin ve ksantin oksidazın elektrot yüzeyindeki miktarı, sıcaklık, pH gibi parametrelerin etkileri araştırılmıştır. Bu ana parametrelere ek olarak altın ve platin taneciklerinin gösterdiği katalik etkiler de araştırılmış olup, her bir biyosensörün gözlenebilme sınırı, lineer çalışma aralığı, aktivasyon enerjisi ve kararlılığı belirlenerek karşılaştırmalar yapılmıştır. Ayrıca, tasarlanan her bir elektrot yüzeyine immobilize olmuş enzim için Michaelis-Menten sabitleri hesaplanmıştır.

2. BİYOSENSÖRLER

Biyosensör, 1950 yılının ortalarında L.C. Clark'ın bir ameliyat sırasında kanın O_2 miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlayan bir teknolojidir. L.C. Clark ve çalışma arkadaşları daha sonra glikoz oksidaz enzimini O_2 elektrodu ile kombine ederek kanın glikoz düzeyini ölçmeyi başarmışlardır. Şu an bir çok biyolojik bileşen kullanılarak hazırlanan biyosensörler bilim dünyasının vazgeçilmez konularından biri olmuştur (Mohanty, 2006).

Biyosensörler, herhangi bir biyolojik örnek içindeki kimyasal bir ajanın miktarı veya aktivitesine seçici ve tersinir olarak cevap veren analitik teknolojilerdir. Şekil 2.1.'de şematik olarak gösterilen bir biyosensör, biyobileşenler (receptor) ve fiziksel bileşenlerden (transducer) oluşmaktadır.



Şekil 2.1. Bir biyosensörün bileşenleri ve çalışma prensibinin şematik gösterilişi

2.1. Biyobileşenler

Biyobileşenler bir biyolojik numune ile yüksek spesifiklikte etkileşerek analiz için ilk basamağı gerçekleştirmiş olurlar. Fiziksel bileşenler ise biyobileşenlerin biyolojik reaksiyonu sonucunda meydana gelen değişimi ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler. Biyobileşen olarak enzimler, antikorlar, nükleik asitler, mikroorganizmalar, doku kültürleri ve organeller kullanılmaktadır.

Biyobileşen olarak kullanılan ve bir glikoprotein olan antikorlar kullanılarak antijenlere cevap veren biyosensörler hazırlanmaktadır. Antikorlar kandaki proteinlerin %20'sini oluştururlar ve immünoglobulin olarak da adlandırılmaktadır. Antikorları genellikle birbirlerinden ayıran farklılık, Y şeklinde olan iki adet antijen tanıma bölgesine sahip olmalarıdır. Her farklı antikor kendine özgün olan antijeni tanımakta ve

ona geçici olarak bağlanmaktadır. Kovalent olmasa da güçlü bir bağlanma yapmasından dolayı antijen-antikor bağlanma stratejisi birçok modern tanı metodunda kullanılmaktadır. Antikorlar protein yapısında olduklarından enzim immobilizasyonunda kullanılan tüm yöntemler antikor immobilizasyonunda da kullanılmaktadır (Abasıyanık, 2008).

Biyobileşen olarak kullanılan mikroorganizmalar ile ölçüm ortamdaki oksijen, karbondioksit, amonyak gibi gaz miktarındaki ya da amonyum, klorür gibi iyonların miktarlarındaki değişimin amperometrik, potansiyometrik, iletkenlik, optik, kalorimetrik gibi farklı fiziksel bileşenler kullanılarak mikrobiyal biyosensörler hazırlanmaktadır. Hazırlanan ilk mikrobiyal biyosensör “*Sterptococcus faecium*” mikroorganizmasının kullanılmasıyla hazırlanan ve arjine seçimli bir biyosensördür ve ölçüm ortamında oluşan amonyak miktarının tayinine dayanmaktadır (Bişkin, 2002).

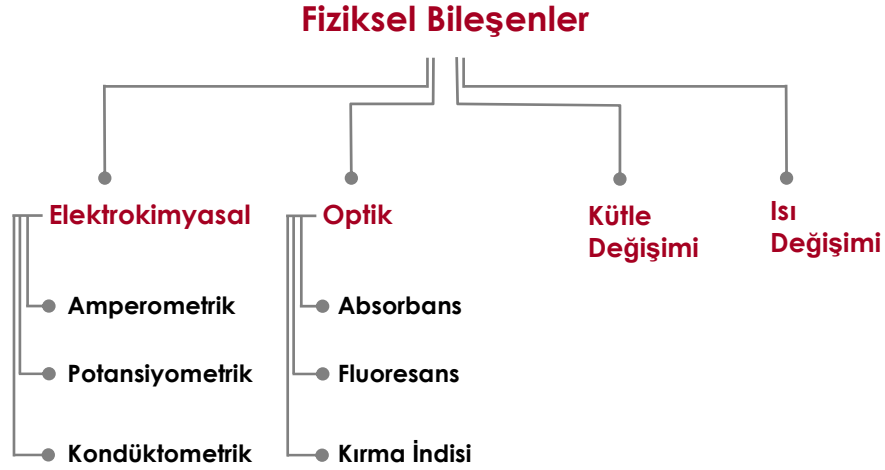
Biyobileşen olarak organel ve dokuların kullanıldığı biyosensörler, izole edilmiş enzimler yerine enzimlerin doğal ortamı olan organeller, hayvansal ve bitkisel dokuların iki yarı geçirgen membran içerisine yerleştirildikten sonra aracı yüzeyine lokalizasyonu ile hazırlanmaktadır.

Biyobileşen olarak nükleik asitlerin kullanıldığı nükleik asit tabanlı biyosensörler toksinler hariç bakteri ve virüs gibi tüm canlıların tesbitinde kullanılabilirler. Çok hassas olan bu tip biyosensörler de her canlının kendine has DNA şifresi bulunmasından dolayı, polimeraz zincir reaksiyon metodu adı verilen bir metot sayesinde çok az miktardaki (femto veya attogram DNA) örnek içinden istenilen analitin tespiti mümkün olmaktadır (Abasıyanık, 2008).

Biyosensörlerin en önemli bileşeni olan biyobileşenler ile biyolojik numune arasında gerçekleşen reaksiyona göre Şekil 2.2’de gösterilen elektrokimyasal, optik, termal veya kütle değişimine dayanan fiziksel bileşenlerden bir tanesinden yararlanılarak bir ölçme tekniği belirlenir.

2.2. Fiziksel Bileşenler

Fiziksel bileşenler biyolojik reaksiyon sonucunda meydana gelen değişime bağlı olarak elde edilmek istenen sinyalin türüne göre elektrokimyasal, optik, kütle ve ısı ölçüm sistemleri olmak üzere sınıflandırılabilir.



Şekil 2.2. Bir biyosensörü oluşturan fiziksel bileşenler

Elektrokimyasal bileşenler ile hazırlanan biyosensörlerde, biyolojik reaksiyon sırasında elektron gibi elektrokimyasal taneciklerin harcanması veya oluşumu sonucunda ortaya çıkan sinyaller elektrokimyasal dedektörler ile ölçülmektedir. Elektrokimyasal biyosensörler, biyokimyasal reaksiyon sonucunda bazı iyonlu yapıların konsantrasyonlarında meydana gelen değişim ile orantılı olarak değişen iletkenliğin ölçümüne dayanan kondüktometrik biyosensör, referans elektroda göre çalışma elektrodundaki potansiyel ölçümüne dayanan potansiyometrik biyosensör ve biyokimyasal reaksiyonda çalışma elektrodunda meydana gelen akım değişikliğine dayanan amperometrik biyosensör olarak üç farklı şekilde sınıflandırılmaktadır.

Kondüktometrik biyosensörlerde çalışma işleyişi, biyokimyasal reaksiyon sonucunda ölçüm ortamındaki bazı iyonların konsantrasyonları ile reaksiyon ortamında meydana gelen iletkenlik değişiminin iki metal elektrot çiftinin arasındaki iletkenlik ölçümünün izlenmesine dayanmaktadır.

Potansiyometrik biyosensörlerde ise çalışma işleyişi referans elektrodu ve çalışma elektrodu ile oluşturulan bir biyokimyasal reaksiyon ortamındaki potansiyel değişimin izlenmesi sonucunda ölçüm ortamındaki türlerin nicel analizine dayanmaktadır. Ölçüm ortamındaki çalışma elektrodu ile aynı ortamda bulunan referans elektrodu arasında oluşan potansiyel değeri ile analizi yapılacak türün konsantrasyonu arasında logaritmik bir ilişki vardır. Potansiyometrik biyosensörler, pH ya da tek değerlikli iyonlara duyarlı cam elektrotlar, anyonlara, katyonlara duyarlı iyon seçimli

elektrotlar, karbondioksit veya amonyağa yönelik gaz duyarlı elektrotlardan oluşmaktadır. İyon aktivitesindeki değişikliğe cevap veren iyon seçimli elektrotlar olarak tanımlanan potansiyometrik sensörler ile Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , H^+ veya NH_4^+ gibi iyonların bulunduğu kompleks biyolojik matrikste, uygun iyon değiştirici membrana iyonların bağlanmasıyla elektrot potansiyelinde oluşan hassas değişiklikten yola çıkarak bu iyonların tayinleri gerçekleştirilmektedir.

Amperometrik biyosensörlerde ise çalışma işleyişi bir çalışma elektrodu ile bir referans elektrodu arasına denge potansiyelinden farklı bir potansiyel uygulandığında, ölçüm ortamında gerçekleşen biyokimyasal reaksiyon sonucunda meydana gelen akım değişikliğinin çalışma elektrodunda yükseltgenen veya indirgenen elektroaktif türlerin konsantrasyonlarında meydana gelen değişime dayanmaktadır. Çalışma elektrodunda indirgenen veya yükseltgenen madde bir katyon, bir anyon veya yüksüz bir bileşik olabilir.

Reaksiyon ortamında destek elektrolit olarak tanımlanan ve elektrotlar arasına uygulanan potansiyellerde elektroaktif olmayan yani elektrot üzerinde indirgenmeyen ve yükseltgenmeyen iyonların fazla miktarda bulunması çözeltinin elektriksel direncini azaltmaktadır. Ayrıca, destek elektrolitin varlığında ve ölçüm ortamının karıştırılmadığı durumda çalışma elektrodunda indirgenen veya yükseltgenen türün elektrot yüzeyine taşınımı sadece difüzyon yoluyla olmaktadır. Bir elektrot reaksiyonunun hızı, yani akım değişimi, ölçüm ortamından elektrot yüzeyine doğru türün kütle aktarım (difüzyon) hızına, çalışma elektrodunda reaksiyona girecek olan maddenin bir kimyasal reaksiyon sonucunda olduğu durumlarda bu kimyasal reaksiyonun hızına, elektrot reaksiyonunun adsorplanan türler üzerinden yürüdüğü durumlarda yüzeye tutunma ve yüzeyden ayrılarak ölçüm ortamına geçme hızlarına ve elektrot yüzeyinde madde ile elektrot arasındaki elektron ya da yük aktarım hızına bağlı olarak değişmektedir.

Biyobileşen olarak enzimlerin kullanıldığı amperometrik biyosensörlerde, enzimatik reaksiyon esnasında harcanan O_2 ve oluşan H_2O_2 değişimleri izlenerek ilgili analit tayini yapılabilir. Örnek olarak glikoz tayini için tasarlanmış bir glikoz biyosensöründe, glikoz ile glikoz oksidaz arasında oksijen varlığında gerçekleşen enzimatik reaksiyonda, harcanan O_2 miktarı veya oluşan H_2O_2 miktarı amperometrik olarak izlenerek ölçüm ortamında meydana gelen akım değişimi ile glikoz miktarı tayini yapılmaktadır.

Optik biyosensörler, iletici olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntem ile biyomolekülün immobilizasyonu ile hazırlanan ve biyokimyasal etkileşim sonucunda meydana gelen değişimin optik özelliklerindeki farklılığına dayanan biyosensörlerdir. Optik biyosensörler, biyokimyasal reaksiyon esnasında absorbands değişimi, reaktantlardan ya da ürünlerden birinin fluoresans özellik göstermesi sonucu meydana gelecek fluoresans şiddetindeki değişimi ve biyokimyasal reaksiyon sonucunda ortam kırma indisindeki değişimi temel almaktadır.

Piezoelektrik biyosensörler karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlelerinin ölçülmesine dayanmaktadır.

Kalorimetrik biyosensörler ise, enzim ile substrat arasında gerçekleşen biyokimyasal reaksiyon sonucunda meydana gelen ısı değişimi ile substrat konsantrasyonunun belirlenmesini temel alan biyosensörlerdir.

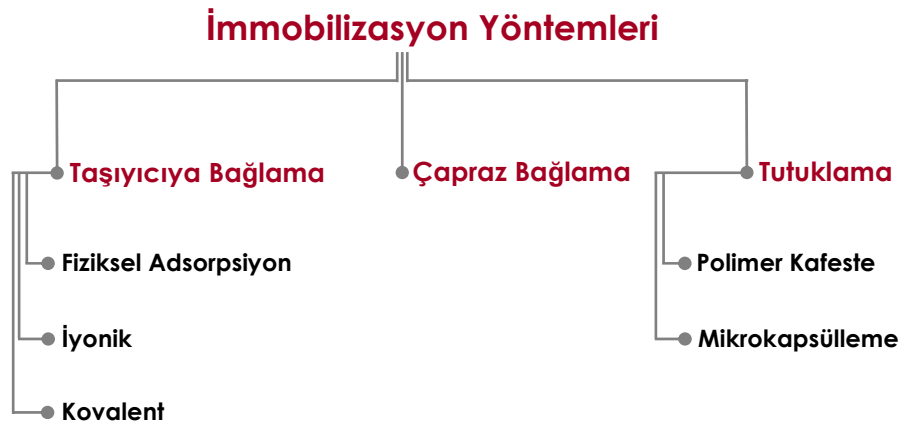
2.3. Enzim İmmobilizasyonu

Enzim immobilizasyonu, enzimlerin aktif bölgelerinin katalitik aktivitelerini kaybetmeksizin, sürekli olarak kullanılması amacıyla çeşitli taşıyıcılara bağlanmasıyla hareketinin sınırlandırılmasıdır. İmmobilize enzimler, reaksiyon sonucunda ortamdan uzaklaştırılmaları, çevre koşullarına karşı dayanıklılıkları, birçok kez ve uzun süre kullanılmaları, sürekli işlemlere uygulanabilmeleri, serbest enzime göre daha kararlı olmaları, ürün oluşumunu kontrol altında tutabilmeleri, çok adımlı reaksiyonlar için uygun olmaları ile serbest enzimden daha üstün özelliklere sahiptirler. İmmobilize edilecek enzime ait aktif merkezin yapısal olarak çok iyi bilinmesi yapılan işlemin kolaylaştırmasını sağlayacaktır.

Enzim immobilizasyonunda enzimin bağlandığı yerde enzimin yapısı ve reaktif grupların değişmeyerek enzim aktivitesini kaybetmeyecek şekilde uygun bir immobilizasyon yönteminin belirlenmesi çok önemlidir.

2.3.1. İmmobilizasyon yöntemleri

İmmobilizasyon yöntemi biyomolekülün kimyasal yapısı ve fiziksel durumu dikkate alınarak en uygun şekilde belirlenmektedir.



Şekil 2.3. İmmobilizasyon yöntemleri

2.3.1.1. Taşıyıcıya bağlanma yöntemi

Taşıyıcıya bağlanma yöntemi enzimler için en eski immobilizasyon yöntemlerdendir. Bu metotda, taşıyıcıya bağlanan enzim miktarı ve immobilize enzimin aktivitesi taşıyıcı özelliklerine bağlıdır. Taşıyıcının partikül boyutu, yüzey alanı, kimyasal yapısı ve hidrofilik grupların hidrofobik gruplara oranı immobilize olan enzimin aktivitesini etkilemektedir.

van der Waals kuvvetlerinin etkin olduğu fiziksel adsorpsiyon yöntemi, yüzey aktif ve suda çözünmeyen adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılarak ve enzimin fazlasının ortamdan uzaklaştırılması ile gerçekleşmektedir. Bir enzimin suda çözünmeyen taşıyıcıya adsorpsiyonu, pH, çözücü, iyon şiddeti, enzim-adsorban oranı ve sıcaklık gibi faktörlere bağlılık göstermektedir.

İyonik bağlanma yöntemi, iyon değiştirme özelliğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması ile gerçekleşmektedir. Bazı durumlarda iyonik bağlanma yanında fiziksel adsorpsiyon da etkili olmaktadır.

Destek yüzeylerinde uygun bir yöntem ile etkin bölgeler oluşturularak enzim moleküllerinin taşıyıcı yüzeylere kovalent olarak bağlanması sonucunda enzim immobilizasyonu sağlanır. Enzim immobilizasyonu için reaksiyon seçiminde iki önemli kriter vardır. Bunlardan birincisi bağlanma reaksiyonunun enzim aktivitesinin düşmeyeceği şartlarda yapılması, ikincisi ise reaksiyonda kullanılan kimyasal maddelerin enzimin aktif merkezini etkilememesidir (Telefoncu, 1999).

2.3.1.2. Çapraz bağlanma yöntemi

Çapraz bağlanma yöntemi, küçük moleküllü bi- veya multi- fonksiyonel reaktifler ile enzim molekülleri arasında suda çözünmeyen kompleks yapıların oluşmasına dayanmaktadır. Bu yöntem ile immobilizasyon işlemi, enzimin bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu, enzimin ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu, enzimin suda çözünen bir taşıyıcı ile adsorpsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu, enzimin bifonksiyonel reaktif tarafında aktive edilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonu gibi farklı şekillerde gerçekleştirilebilir (Telefoncu, 1999).

2.3.1.3. Tutuklama yöntemi

Bu yöntem, polimerizasyon ile çapraz bağlanmanın olduğu bir ortamda enzim moleküllerinin polimerin çapraz bağları arasında kalarak ya da enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanmasına dayanmaktadır. Mikrokapsülleme yönteminde özel olarak hazırlanmış olan zarlardan enzimler dışarı çıkmazken substrat ve ürünün hareketi serbesttir. Polimer kafeste tutuklama yöntemi, biyokimyasal materyallerin suda çözünmeyen çapraz bağlı polimer örgüsü içerisinde tutuklanması şeklinde gerçekleşmektedir. Bu şekilde biyomoleküller polimerin örgü yapısı içinde fiziksel olarak tutuklanmakta ve dışarı çıkamamaktadır.

2.4. Enzim Biyosensörlerinde Substrat Taşınımı ve Elektron Transferi

Amperometrik enzim biyosensörleri sensör yüzeyine substratın taşınımı, sensörde bulunan enzime substratın bağlanması, substratın konveksiyonu ve elektrot yüzeyinde elektron transferi gibi işlemler dikkate alınarak geliştirilmektedir.

2.4.1. Substrat Taşınımı

Bir biyosensörde, substrat reseptör molekül tarafından tayin edilmesi amacıyla çözeltiden enzim elektroduna doğru taşınmalıdır. Substrat taşınımı genel olarak, göçme, konveksiyon ve difüzyon olmak üzere üç farklı şekilde gerçekleşmektedir.

Göç ile substrat taşınımı, elektriksel potansiyeldeki değişime göre yüklü parçacıkların hareketine dayanmaktadır. Bu potansiyel değişimi tam olarak tanımlanmış elektrokimyasal şartlarda ihmal edilebilir. Biyosensör ölçümleri, oluşabilecek herhangi bir potansiyel değişimini aşırı miktarda destek elektrolit kullanılmasıyla önleyebilen bir çözelti ortamında gerçekleşmektedir.

Difüzyon ile substrat taşınımı, moleküllerin düzensiz hareketine bağlı olan konsantrasyon değişiminin bir sonucu olarak partiküllerin kendiliğinden yaptıkları hareketlere dayanmaktadır. Difüzyon taşınımı matematiksel olarak Alman bilim adamı Adolf Eugene Fick'in 1. ve 2. kanunları ile ifade edilmektedir. Fick'in 1. kanunu difüzyon ile taşınan substratın akısını ifade etmektedir. (2.1) eşitliği ile gösterilen difüzyon katsayısı, sıcaklığa, difüzyon olan maddenin yapısına ve difüzyon ortamına bağlı olarak değişmektedir (Vastarella, 1998, Atkins 1998, Eggins, 2002).

$$J = -D \left(\frac{dC}{dx} \right) \quad (2.1)$$

A. E. Fick'in 2. kanunu ise bir substrat konsantrasyonunun zaman ile değişimi difüzyon katsayısına bağlı olarak düzlem boyunca değişen konsantrasyonun ikinci dereceden türevi ile ilişkilendirilmektedir (Vastarella, 1998).

$$\left(\frac{dC}{dt} \right) = D \left(\frac{d^2C}{dx^2} \right) \quad (2.2)$$

Fick'in 1. ve 2. kanunu olarak gösterilen (2.1) ve (2.2) eşitliğinde, J , substratın difüzyon akısını ($\text{atom cm}^{-2}\text{s}^{-1}$), D , difüzyon katsayısını (cm^2s^{-1}), C , substrat konsantrasyonunu (mol cm^{-3}), t , zaman (s), (dC/dt) , konsantrasyonun zamanla değişimi, (dC/dx) ise bir düzlem boyunca konsantrasyon değişimini göstermektedir. (2.1) eşitliğindeki “-” işareti, substrat taneciklerinin yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğru bir akışının olduğunu göstermektedir (Vastarella, 1998).

Eşitlik (2.3)'de verilen Cottrell eşitliği ise potansiyeli kontrol edilen çalışmalarda, zamanla elektrik akımındaki değişimi göstermektedir. Ölçülen akım, elektrot yüzeyine substratın düzlemsel olarak difüzyonu esnasında difüzyon hızına bağlı olarak değişmektedir.

$$i_D = \frac{nFAC_B\sqrt{D}}{\sqrt{\pi t}} \quad (2.3)$$

i_D , akım (amper), n , elektron sayısı, F , faraday sabiti (96500 Cmol^{-1}), A , elektrot alanı (cm^2), C_B , analitin başlangıç konsantrasyonu (mol cm^{-3}), D , difüzyon katsayısını (cm^2s^{-1}), t , zamanı (s) göstermektedir.

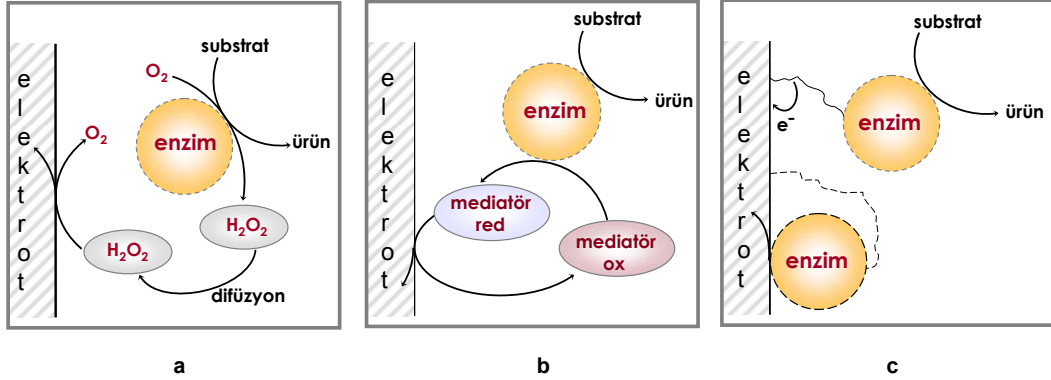
Konveksiyon yoluyla substrat taşınımı, substrat partiküllerinin çözeltinin akması veya karıştırılması yoluyla, elektrot titreşimi veya dönmesi yoluyla, çözelti ortamında meydana gelen yoğunluk değişimi ile fiziksel olarak gerçekleşmektedir. Konveksiyon yoluyla substrat taşınımı, daha karalı ve güvenilir sonuçlar vermesinden dolayı biyosensör analizlerine çok uygundur. Konvektif kütle taşınımı çözelti yönünden elektroda doğru bir hareket (örneğin dönen disk elektrot) ile gerçekleşmesi ya da çözeltiye uygulanacak bir güç (örneğin akış enjeksiyon sistemleri) ile elektroda hareket etmesi ile gerçekleşebilmektedir. Elektrot yüzeyi üzerinde çok ince bir tabakada kütle taşınımı konveksiyon yoluyla değil difüzyon yoluyla meydana gelmektedir. Bu durgun ince tabaka difüzyon tabakası olarak adlandırılır ve bu alanda yüzey reaksiyonu kütle taşınımı ile dengede olmaktadır.

2.4.2. Elektron Transfer Mekanizması

Amperometrik enzim biyosensörlerinde redoks enzimleri ile elektrot arasındaki elektronik ilişki, 1. nesil biyosensörler (Şekil 2.4a) olarak adlandırılan enzim ile substratın elektroaktivitesine, 2. nesil biyosensörler (Şekil 2.4b) olarak adlandırılan ve çözelti ortamında serbest halde ya da biyomolekül ile immobilize halde bulunan redoks aracılarının (mediatör) kullanımına ve 3. nesil biyosensörler (Şekil 2.4c) olarak adlandırılan redoks aktif biyomolekülü ile elektrot yüzeyi arasındaki direkt elektron transferine dayanmaktadır (Freire 2003).

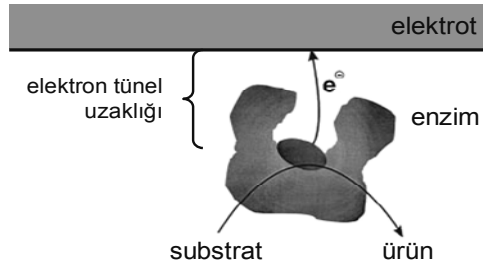
Bir amperometrik biyosensör hazırlanmasında temel amaçlardan bir tanesi elektrot yüzeyi ile enzim içerisindeki redoks merkezinde meydana gelecek elektron transfer işleminin en uygun elektron transfer yolu ile hızlı bir şekilde sağlanmasıdır. Enzimin prostetik grubu ile elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferi enzim yapısında bulunan protein gruplarının engelleyici etkisinden dolayı elektron tünel

mekanizmasına (electron tunneling mechanism) göre daha uzun sürede gerçekleşmektedir.



Şekil 2.4. Enzim biyosensörlerindeki gelişimin şematik gösterilişi (a) 1. nesil biyosensörler, (b) 2. nesil biyosensörler, (c) 3. nesil biyosensörler

Bundan dolayı, bir amperometrik biyosensörde en hızlı elektron transferi, elektrot yüzeyi ve enzimin prostetik grubunun direkt elektrokimyasal etkileşimi ile gerçekleştiği elektron tünel mekanizmasıyla (Şekil 2.5) olmaktadır.



Şekil 2.5. Bir enzimin aktif merkezinden elektrot yüzeyine direkt elektron transferinin şematik gösterilişi (electron tunneling mechanism) (Habermuller, 2000)

Enzim ile elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferi, Rudolph Arthur Marcus'a 1992 yılında kimya dalında Nobel ödülü kazandıran ve bu konu hakkında elde edilen sonuçlar ile çok geniş ölçekte kabul gören bir teori ile açıklanmaktadır. Bu teoriye göre, iki redoks türü arasındaki elektron transfer kinetiği, potansiyel farklılığı gibi bir yürütücü kuvvet, redoks türlerinin yapısal rijiditesini gösteren yeniden yapılanma enerjisi ve iki redoks merkezi arasındaki uzaklık ile ilgilidir (Freire, 2003; Gorton, 1999; Habermuller, 2000). Rudolph A. Marcus'un, teorisindeki en önemli öngörüsü elektron transfer hızının daha ekzotermik bir elektron transfer reaksiyonunda arttığını ifade etmesidir. Kimyasal reaksiyonlarda, reaksiyon hız sabitlerinin sıcaklıkla

değişimini gösteren Arrhenius eşitliği üzerine kurulan Marcus eşitliği aşağıda verilmiştir.

$$k = A \exp\left(\frac{-(\Delta G + \lambda)^2}{4\lambda RT}\right) \quad (2.4)$$

Bu eşitlikte, k , elektron transfer hızını, ΔG , Gibbs serbest enerjisini, λ , elektron transferi esnasında tanecikte meydana gelen elektronik bir değişiklik sonucunda taneciğin geometrisindeki değişim enerjisini göstermektedir ve yeniden yapılanma enerjisi olarak tanımlanmaktadır.

2.5. Biyosensörlerin Performans Kriterleri

2.5.1. Seçicilik

Bir biyosensörün seçiciliği, biyosensörü oluşturan bileşenlerden olan biyomolekülün hedef analite karşı duyarlı olması ve ölçüm ortamında olabilecek diğer maddelerden etkilenmemesiyle ifade edilmektedir. Biyosensörün seçiciliğini etkileyen sensörle girişimlerin olması, biyokatalizatörle girişimlerin olması ve pH değeri gibi bazı faktörler vardır.

2.5.2. Duyarlılık

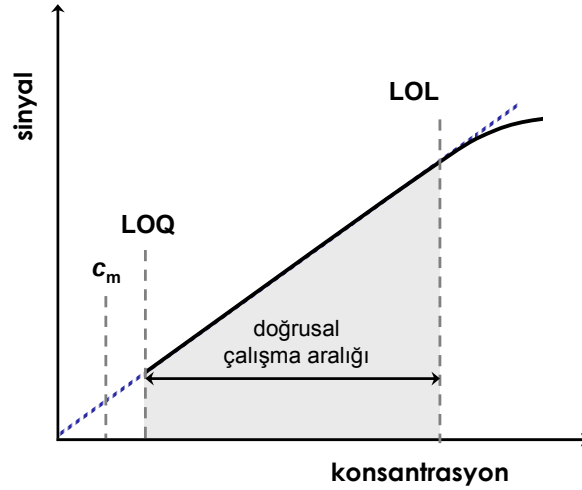
Ölçüm ortamına eklenen analit konsantrasyonu ile elde edilen sinyal değerleri arasındaki kalibrasyon eğrisinin eğimi olarak tanımlanır. Bu eğrinin eğiminin büyüklüğü biyosensörün duyarlılığının bir ölçüsüdür. Eğrinin eğimi büyüdükçe ortama eklenen küçük bir analit konsantrasyondaki değişimi tanıyabilme kabiliyeti yani duyarlılık artmaktadır.

2.5.3. Doğrusallık

Hazırlanan biyosensör ile yapılan çalışmalarda, doğru ölçüm alınabilmesi için ölçüm ortamına analitin belirli miktarlarda ilave edilmesiyle değişen analit konsantrasyonu ile sinyal değişimlerinin doğrusal eğilim gösterdiği lineer bölgeyi

tanımlamak gerekmektedir. Ölçüm ortamına her bir analit eklemesinden sonra artan analit konsantrasyonu ile ölçülen sinyal arasındaki ilişki belirli bir analit konsantrasyonuna kadar doğrusal bir değişim göstermekte, daha sonraki analit konsantrasyonlarında ortam kararlılığının bozulması, biyomolekülün aktivitesinin azalması, elektrot yüzeyinin oluşan bazı radikallere bağlı olarak değişim göstermesi gibi nedenlerden dolayı doğrusallıktan sapma görülmektedir.

Şekil 2.6’da bir analitik yöntemin doğrusal çalışma aralığı gösterilmiştir ve bu aralık, tayin edilebilen en düşük konsantrasyondan (kantitatif ölçüm sınırı, LOQ), kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan sapma gösterdiği (doğrusallık sınırı, LOL) konsantrasyonuna kadar olan aralığı kapsamaktadır (Skoog, 1998).



Şekil 2.6. Bir analitik yöntemin çalışma aralığı

2.5.4. Cevap süresi

Biyosensörler için önemli bir performans parametresi olan cevap süresi ölçüm ortamına analitin eklenmesiyle meydana gelen sinyal değişiminin tekrar kararlı hal değerine ulaştığı zaman aralığı olarak tanımlanmaktadır. Bir biyosensörün cevap süresi, elektrot materyaline, destek maddesinin cinsine, biyomolekülün yapısına, analitin biyomoleküle olan ilgisine ve analitin elektrot yüzeyindeki redoks potansiyeline bağlı olarak değişim göstermektedir.

2.5.5. Gözlenebilme sınırı

Belirli bir güven seviyesinde, hazırlanan biyosensörün cevap verebildiği en küçük analit konsantrasyonu gözlenebilme sınırı olarak tanımlanmaktadır. Bu gözlenebilme sınırı analitik sinyal büyüklüğünün tanık sinyalindeki istatistiksel sapma oranına bağlıdır. Diğer bir ifadeyle, analitik sinyal gürültü sinyalindeki sapmanın k katı kadar büyük olmadığı sürece sinyali belirli bir kesinlikle görmek imkansızdır. Belirlenen en küçük analitik sinyal, S_m , ortalama tanık sinyali, $\bar{S}_{bl}$, ile tanığın standart sapmasının, s_{bl} , k katının toplamına eşittir.

$$S_m = \bar{S}_{bl} + k s_{bl} \quad (2.5)$$

Deneyssel çalışma sonrası elde edilen veriler kullanılarak yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda $\bar{S}_{bl}$ ve s_{bl} belirlenir ve S_m hesaplanır. Konsantrasyon ile değişen sinyal verileri dikkate alınarak çizilen kalibrasyon grafiğinde eğim, m , kullanılarak gözlenebilme sınırı, c_m , aşağıda şekilde bulunur (Skoog, 1998).

$$c_m = \frac{S_m - \bar{S}_{bl}}{m} \quad (2.6)$$

2.5.6. Kararlılık

Performans faktörlerinden bir tanesinde kullanım ömrü hakkında bilgi veren biyosensörlerin kararlılığıdır. Aynı biyosensör ile ne kadar çok sayıda ölçüm yapılabilmesine imkan sağlamasıyla ölçülmektedir. Biyosensörün kararlılığının büyük olması iş gücü ve ekonomik açıdan çok önemli avantajlar sağlamaktadır. Enzimin saflık düzeyi, kaynağı ve immobilizasyon yöntemi enzim sensörünün kararlılığını önemli ölçüde etkilemektedir (Emre, 2007).

2.5.7. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)

Kesinlik, sonuçların tekrarlanabilirliği olarak tanımlanır ve aynı yolla elde edilen deney verilerinin arasındaki uyum dercesini göstermektedir. Kesinlik aynı zamanda rastgele veya belirsiz hataların bir ölçüsüdür. Ölçümün kesinliğinin bulunmasında

standart sapma, varyans ve varyans katsayısı olarak verilen üç sayısal ölçüt kullanılmaktadır (Skoog, 1998).

2.5.8. Kullanım ömrü

Hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümler sonucunda biyomolekülün aktivitesindeki değişimin bir ölçüsü olarak tanımlanan bir faktördür. Gerekli çalışma ve çevre koşullarının oluşturulması biyosensörün aktivitesinin koruyucu yönde etki gösterecek ve böylece biyosensörün kullanım ömrü uzayacaktır.

3. ENZİMLER

Enzimler, canlı için yaşamsal öneme sahip pek çok fonksiyonun kontrolünde rol alan ve canlı organizmasında meydana gelen reaksiyonların gerçekleşmesini sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Biyolojik sistemlerde meydana gelen reaksiyonlar laboratuvar şartlarında oluşturulmak istendiğinde çok yüksek sıcaklık, basınç v.b. gibi ağır yöntemlerin uygulanması gerekir. Örneğin, karbonhidratlar, proteinler ve lipitler, derişik asit ya da baz çözeltileri kullanılarak belirli bir sıcaklıkta hidroliz edilirken, aynı maddeler, biyolojik sistemlerde enzimlerin katalik etkisi ile daha ılıman koşullarda hidroliz olurlar. Bu özelliğı ile enzimler, canlı sisteminde gerçekleşen biyokimyasal değışmelerin birçoğunun yaşam hızıyla dengede gitmesini sağlamaktadır.

3.1. Enzimlerin Yapısı

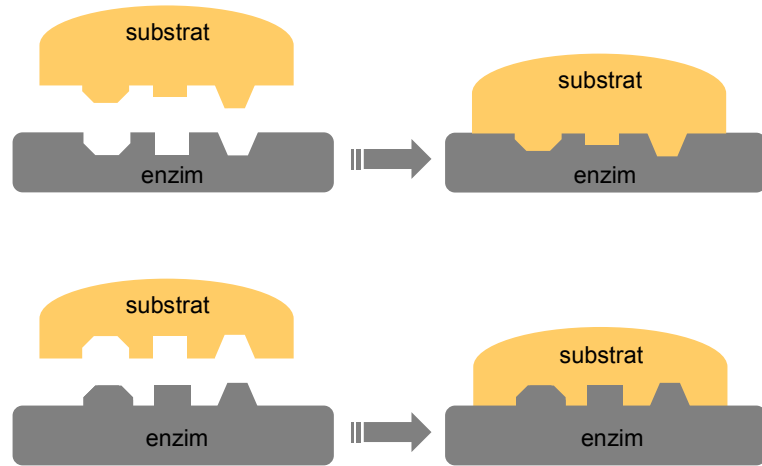
Enzimlerin yapısında, genel olarak apoenzim ve kofaktör adı verilen, hem işlevselliğı hem de yapısı bakımından farklılık gösteren iki kısım bulunur. Enzimlerin apoenzim kısmı, farklı enzimlerde farklı aminoasit türleri bulunduran büyük protein moleküllerinden oluşmuştur ve bu durum apoenzimin enzime özelliğini ve spesifikliğini kazandırmaktadır. Enzimlerin molekül ağırlıklarının büyük olması ise apoenzimlerin büyük protein yapılarından oluşmasından kaynaklanmaktadır.

Apoenzimlere katalitik aktivite özelliğini sağlayan kısım kofaktörlerdir. Kofaktörler, apoenzime bağı etken gruplar ve apoenzimden ayrı halde bulunan etken molekül ya da iyonlar olarak iki şekilde sınıflandırılmaktadırlar. Apoenzime bağı etken gruplar, organik ve inorganik etken gruplardan oluşmaktadır. Apoenzimden ayrı halde bulunan etken moleküller ya da iyonlar ise koenzimler ve aktivatörlerden oluşmaktadır. Apoenzimler yalnız olarak katalitik aktivite göstermezler. Kofaktörler ise yalnız olarak çoğunlukla enzime kıyasla çok düşük, bazı durumlarda hiç katalitik aktiviteleri yoktur. Ancak, bir apoenzim ile kofaktörü bir arada oldukları zaman gerçek enzim aktivitesi gözlenebilir. Örneğin, peroksidaz enziminin apoenzim kısmında katalitik aktivite sıfır olup bu enzimin kofaktörü olan ferri protoporfirinin yalnız başına gösterdiği aktivite peroksidaz enziminin ancak % 0,001'i kadardır.

3.2. Enzimlerde Aktif Merkez ve Substrata Karşı Özgüllük

Emil Fischer 1894 yılında doğal glikozitleri hidrolizleyen enzimlerin sadece bir stereoizomere, örneğin sadece *dekstro* şekline karşı etkin olduğunu ve *levo* şekline etki etmediğini göstermiş ve enzimler ile substratlar arasında anahtar kilit ilişkisine benzer bir ilişkinin olduğunu bulmuştur. Her enzim kendi substratına karşı etki göstermektedir. Bu özgüllük bazı durumlarda kesin olup bazı durumlarda da sınırlı bir genişliğe sahiptir. Fonksiyonlu grup yapısı birbirine benzeyen enzimler birden çok substrata etkiyebilir. Ama bu durum sonucunda etkiye hızlarında (K_m değerleri) farklılıklar oluşmaktadır.

Enzimlerde substratın ve koenzimlerin bağlanarak biyokimyasal tepkimelerin meydana geldiği yerler aktif merkez olarak adlandırılır. Aktif merkezler aminoasit kalıntılarından oluşmuş ve özel geometriye sahip kısımlardır. Aktif merkez büyük enzim molekülünün sadece küçük bir kısmını kaplar. Enzim molekülünün büyük olması, aktif merkezin geometrik yapısının oluşması için gereklidir. Şekil 3.1’de gösterilen modelde substrat, enzimin aktif merkez bölgesine bağlanır ve bir enzim-substrat kompleksi oluşur. Bu kompleksin bozunması sonucu ürün meydana gelir ve enzim yeniden serbest kalır.

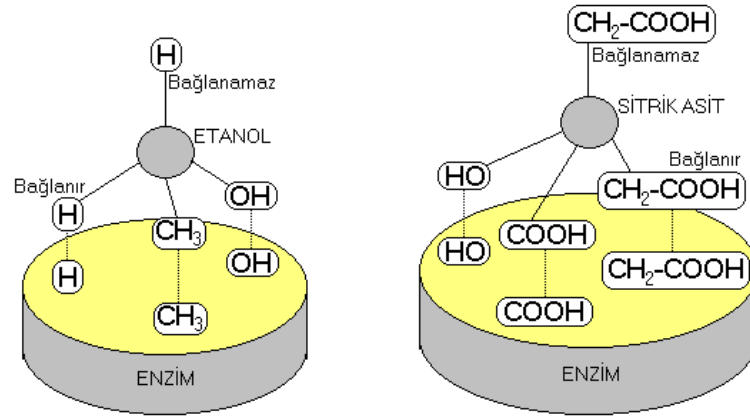


Şekil 3.1. Enzim-substrat kompleksinin oluşması

Substratın enzim yapısında en az üç yere bağlanması, stereospesifikliği ortaya çıkarır. Kiral bir molekülün “R” şekli enzim üzerine yerleşirken, “S” şekli enzim

üzerine yerleşemeyecektir. Bu sonuçla enzim-substrat ilişkisinde stereospesifikliğin önemi ortaya çıkmaktadır.

Bunun yanında substrat molekülündeki bir atoma bağlı aynı iki gruptan bir tanesi enzim üzerindeki aktif merkez üzerine yerleşirken diğer grup yerleşmemektedir. Şekil 3.2’de verilen örneklerde etanol ve sitrik asit molekülündeki karbona bağlı ($-H$) ve ($-CH_2COOH$) gruplarından her iki molekülde de iki tane olmasına rağmen gruplardan sadece bir tanesi aktif merkeze bağlanırken, diğeri bağlanamamaktadır (Tüzün, 1997).



Şekil 3.2. Enzim-substrat kompleksinde stereospesifikliğin gösterilişi

3.3. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimlerin çeşitliğinin ve sayısının fazla olmasından dolayı, enzimlerin belirli gruplar altında toplanmasının enzim bilimi yönünden büyük kolaylık ve bütünlük sağlayacağı düşünülerek Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından yeni bir sınıflandırma sistemi kabul edilmiştir. Bu sınıflandırma sistemi ile birlikte her enzim 4 rakamlı bir numara (örneğin 2.7.1.1. şeklinde) ile kodlanmıştır. Kodlama işleminde ilk sayı enzimin sınıfını, ikinci sayı enzimin alt sınıfını, üçüncü sayı grubunu, dördüncü sayı ise enzimin kendine özgü sayısını göstermektedir.

1. Oksidoredüktazlar : Bu tür enzimler iki substrat arasındaki yükseltgenme, indirgenme reaksiyonlarını kataliz ederler.

2. Transferazlar : Bu sınıfa giren enzimler bir atom grubunun veya molekülün diğer moleküle aktarılmasını sağlarlar.

3. Hidrolazlar : Genel olarak bu tür enzimler ester, eter, peptit, C–C, P–N bağlarının hidrolizini kataliz ederler.

4. Liazlar : Hidroliz dışındaki mekanizmalar ile substratlardan bazı grupların çıkışını sağlayan enzim türleri bu gruba girer. Genellikle, C–C, C–O, C–N, C–S bağlarına etki ederler.

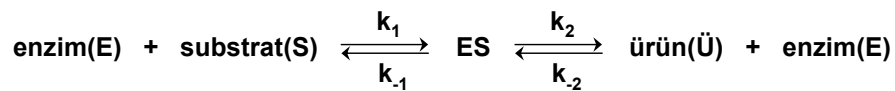
5. İzomerazlar : Moleküldeki karbon atomlarının yerlerini değiştiren ya da çeşitli grupları bir karbon atomundan diğerine kaydıran, başka bir ifadeyle izomerleşmeyi sağlayan enzimlerdir.

6. Ligazlar : Bu enzim türleri ATP'deki ya da ona benzer yapıdaki bileşiklerde bulunan pirofosfat bağının parçalanmasına bağlı olarak meydana gelen enerji ile iki molekülün birbirine bağlanmasını kataliz ederler.

3.4. Enzim Kinetiği

Enzimler, reaksiyona giren substratlar ile kompleksler oluşturur ve oluşan bu kompleksler üzerinden ürünler oluşmaktadır. Ortamın sıcaklığı, pH'ı, iyon şiddeti, hidrolik basıncı, inhibitör ya da aktivatörlerin varlığı gibi durumlar enzim reaksiyonlarının hızını ve kinetiğini büyük ölçüde etkilemektedir. Enzim kinetiğinde en çok kullanılan eşitlik, 1913 yılında Michaelis ve Menten tarafından geliştirilmiştir.

Enzim ile substrat arasındaki reaksiyon sonucu ürün oluşmadan önce enzim ile substrat arasında bir enzim-substrat kompleksi oluştuğu ve sonra bu kompleksin ürün ile enzime ayrıştığı kabul edilmektedir (Pekin, 1979).



Fakat reaksiyonun ilk anlarında ürün konsantrasyonu çok düşük olmasından dolayı, Ü ürünü ile E enziminin birleşerek ara kompleks meydana getirme hızı çok yavaş olmaktadır. Kinetik hesaplamalarda bu küçük hız değeri önemsenmemektedir. Bu haliyle mekanizmanın reaksiyon hızı,

$$v = k_2[\text{ES}] \quad (3.1)$$

şeklinde gösterilir.

Kararlı durum ilkesine göre, [ES] konsantrasyonunun zamanla değişmesi sabit kabul edilerek aşağıdaki eşitlik yazılabilir.

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (3.2)$$

Herhangi bir t anındaki serbest enzim konsantrasyonu ile o andaki enzim substrat kompleksinin konsantrasyonunun toplamı; başlangıçta reaksiyon sistemine konulmuş olan enzim konsantrasyonuna, $[E]_0$, değerine eşit olmasından dolayı, her üç konsantrasyon arasında

$$[E] + [ES] = [E]_0 \quad (3.3)$$

eşitliği yazılır. Bu eşitlikte herhangi bir t anındaki serbest enzim konsantrasyonu aşağıdaki bağıntı ile bulunabilir.

$$[E] = [E]_0 - [ES] \quad (3.4)$$

[E], enzim konsantrasyonu için bulunan bağıntı eşitlik (3.2)'de yerine yazılırsa aşağıdaki bağıntı elde edilmektedir.

$$k_1 \{ [E]_0 - [ES] \} [S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad (3.5)$$

Bu eşitlik düzenlendiğinde aşağıda verilen eşitlik(3.6) elde edilmektedir.

$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]} \quad (3.6)$$

Eşitlik (3.1) ve eşitlik (3.6) kullanılarak enzimatik bir reaksiyonun hız bağıntısı aşağıdaki şekilde ifade edilebilir.

$$v = k_2 \frac{k_1[E]_0[S]}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]} \quad (3.7)$$

(3.7) eşitliğinin sağ tarafında pay ve payda k_1 ile bölünürse,

$$v = k_2 \frac{k_1[E]_0[S]}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]} \quad (3.8)$$

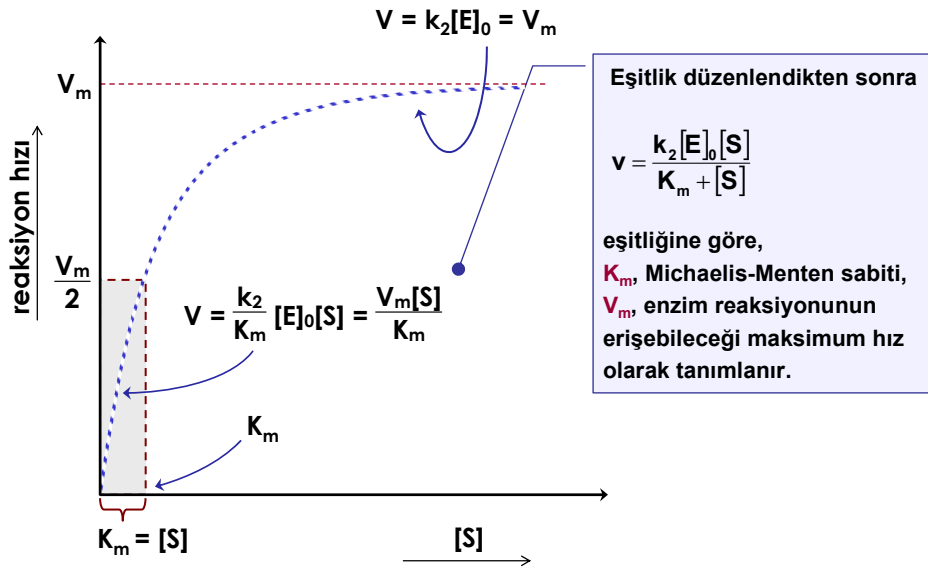
eşitliği elde edilmektedir.

$$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m \quad (3.9)$$

Eşitlik (3.9) göz önüne alınırsa reaksiyon hızı için eşitlik aşağıdaki gibi olmaktadır.

$$v = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_m + [S]} \quad (3.10)$$

Bu eşitlikteki K_m sabitine Michaelis-Menten sabiti adı verilmektedir. Eşitlik (3.10)'a göre reaksiyon hızı, v , ile substrat konsantrasyonu, $[S]$, arasında bir grafik çizildiğinde Şekil 3.3'de görüldüğü gibi bir eğri elde edilmektedir (Pekin, 1979).



Şekil 3.3. Reaksiyon hızı-substrat konsantrasyonu grafiği

Grafikten de görüldüğü gibi belirli bir substrat konsantrasyonundan sonra reaksiyon hızı sınır bir değere ulaşmakta ve daha sonra sabit kalmaktadır. V_m ile gösterilen bu sınır değer enzim reaksiyonunun erişebileceği maksimum hızdır. V_m değeri substrat konsantrasyonuna bağımlı değildir. Bu sonuçla maksimum hız olarak

adlandırılan V_m değeri ancak başlangıçta alınan enzim konsantrasyonu ile değişmektedir. Substrat konsantrasyonunun çok yüksek olduğu sınır bölgelerde

$$v = k_2[E]_0 = V_m \quad (3.11)$$

eşitliği geçerli olmaktadır. Bu eşitlik, sınır hızın geçerli olduğu konsantrasyon bölgelerinde reaksiyonun substrata göre sıfırıncı mertebeden olduğunu göstermektedir. Grafikten de görüleceği gibi bu bölgede reaksiyon hızı, substrat konsantrasyonu ile değişmemektedir. V_m , sınır hızı grafikten hesaplanabilir ve reaksiyon sistemine katılan $[E]_0$, enzim konsantrasyonunun bilinmesiyle k_2 , hız sabiti

$$k_2 = \frac{V_m}{[E]_0} \quad (3.12)$$

şeklinde hesaplanmaktadır. Şekil 3.3'deki eğrinin sınır hıza kadar olan kısmında hız ile substrat konsantrasyonu arasında

$$v = \frac{k_2}{K_m} [E][S] \quad (3.13)$$

eşitliği geçerli olmaktadır. Bu bağıntı eşitlik (3.11) göz önüne alınarak yazılırsa, reaksiyon hızı için yeni bir eşitlik elde edilmektedir.

$$v = \frac{V_m}{K_m} [S] \quad (3.14)$$

Substrat konsantrasyonlarının büyük olduğu bu bölgelerde reaksiyon birinci mertebededir. Substrat konsantrasyonunun K_m sabitine eşit olduğu durumda

$$[S] = K_m \quad (3.15)$$

eşitlik aşağıdaki gibi olmaktadır.

$$v = \frac{k_2[E]_0[S]}{2[S]} \quad (3.16.a)$$

Buradan da eşitlik,

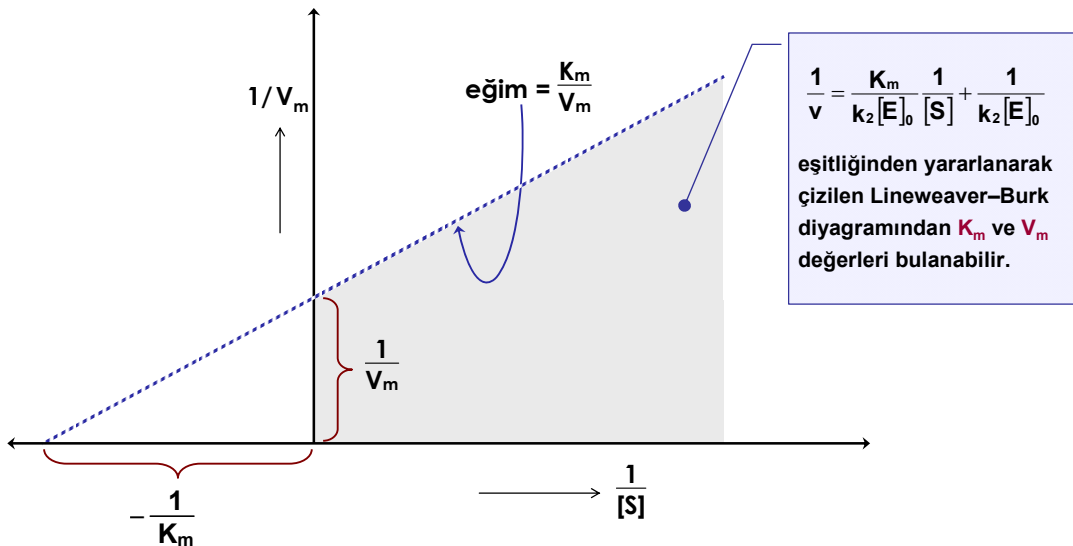
$$v = \frac{k_2[E]_0}{2} \quad (3.16.b)$$

ya da

$$v = \frac{V_m}{2} \quad (3.16.c)$$

olarak yazılabilir. Eşitlik (3.16.c)'de sınır hızın yarısına eşit olan değer, Şekil 3.3'de ki grafiğin ordinatı üzerinde işaretlenerek apsise paralel bir doğru çizildiğinde, bu doğrunun eğriyi kestiği noktanın apsisi Michaelis-Menten sabitine, K_m , değerine eşit olmaktadır. Substrat konsantrasyonunun daha düşük olduğu durumlarda reaksiyon hızı substrat konsantrasyonu ile doğrusal olarak değişmektedir. Bu değişimin olduğu bölgede enzim reaksiyonunun hızı ölçülerek grafikten substrat konsantrasyonu bulunmaktadır. Şekil 3.3'de ki grafikten V_m sınır hızları, K_m sabitleri ve substrat konsantrasyonları bulunabilir.

Eşitlik (3.10)'un aşağıdaki gibi düzenlenerek grafik çizimi yapılırsa Şekil 3.4'de ki gibi bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğiminden ve doğrunun ordinatı kestiği noktadan Michaelis-Menten sabitleri bulunabilir.



Şekil 3.4. Lineweaver – Burk diyagramı

Eşitlik (3.10) yeniden düzenlendiğinde,

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{k_2[E]_0} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{k_2[E]_0} \quad (3.17)$$

ya da

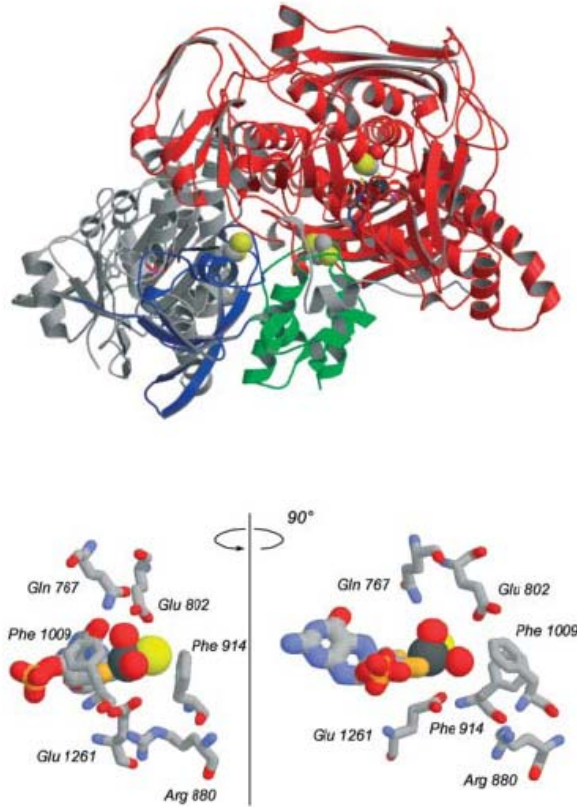
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (3.18)$$

eşitlikleri elde edilmektedir.

Bu eşitliklere göre $1/v$ ile $1/[S]$ arasında çizilen grafikte, doğrunun ordinatı kestiği değerden $1/V_m$, doğrunun eğiminden de K_m/V_m değerleri bulunur. Bulunan bu değerlerden de Michaelis-Menten sabitleri hesaplanabilmektedir (Pekin, 1979).

4. KSANTİN OKSİDAZ ENZİMİ

Ksantin oksidaz enzimi, oksidoredüktaz grubu enzimlerinden olup bir flavoproteindir. Ksantin oksidaz, ilk olarak yaklaşık 85 yıl önce M. Dixon ve S. Thurlow adlı bilim insanları tarafından inek sütünden izole edilmiştir. Enzimin kaynağı olarak memelilerin bazı organları (karaciğerde, böbrekte, mukoza hücrelerinde), kuşlar ve sürüngenler gösterilebilir. Memelilerde hepatositler, mukoza hücreleri, renal hücreler, kapiler endotelial hücreler, meme epitelyum hücreleri ve sütte bulunmaktadır (Saatçi, 1997). Çeşitli insan dokularında araştırıldığında ise kalp, böbrek, beyin, akciğer ve mezenterde bulunmaktadır. Bu bilgilere ek olarak, karaciğer ve bağırsak enzim aktiviteleri bakımından bir karşılaştırma yapıldığında, insanlarda diğer memelilere oranla daha düşük seviyede sonuçlar elde edilmiştir.

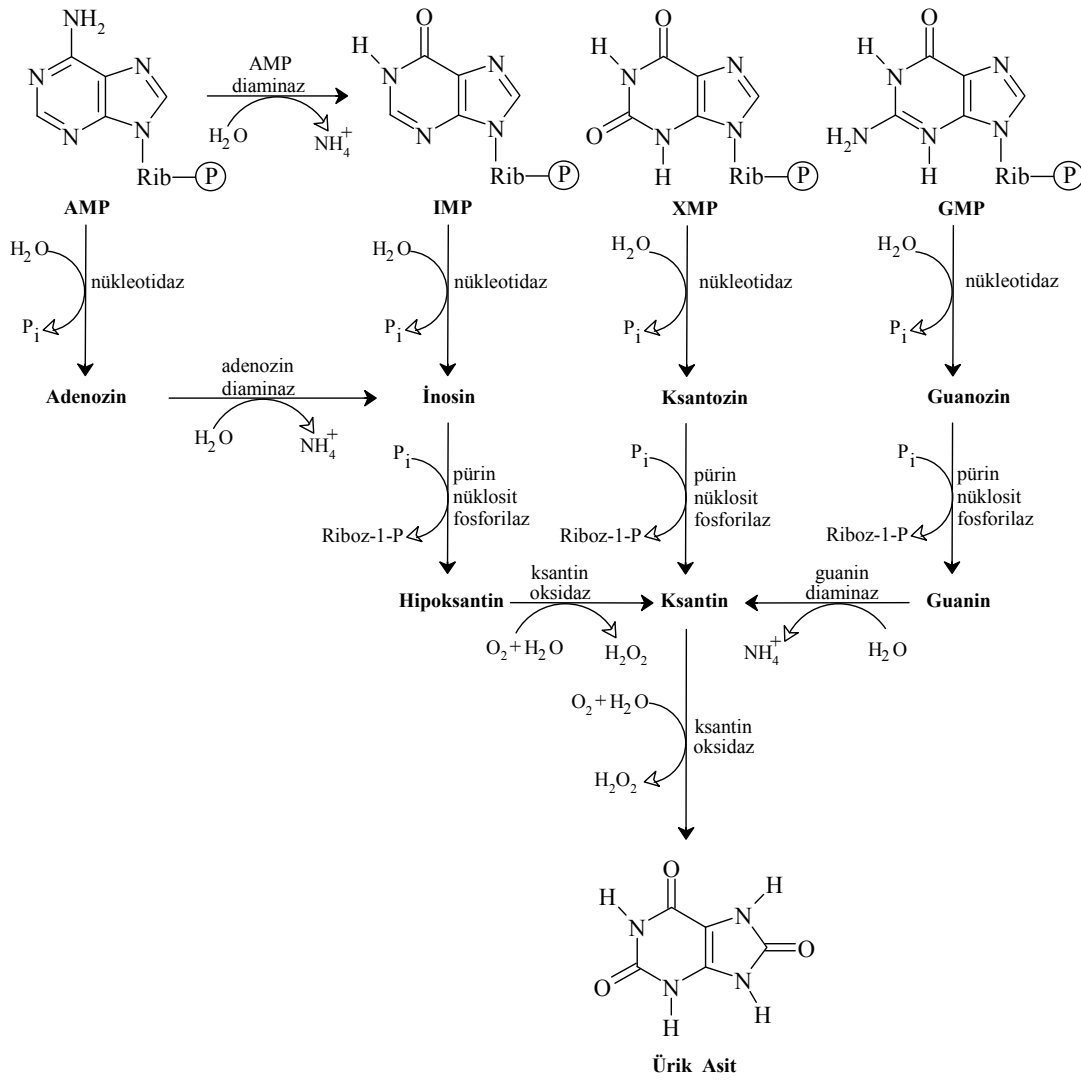


Şekil 4.1. Ksantin oksidazın yapısı (Hille, 2006)

Ksantin oksidazın moleküler kompozisyonu için geniş bir protein bölümü ile buna bağlı olarak FAD, Fe ve Mo ihtiva eden bir modeli verilmiş ve bir çok araştırmalar sonucunda Fe/FAD/Mo oranının 8/2/1-2 olduğu belirlenmiştir. Molekül ağırlığı aralığı

ise 75000-400000 Dalton olarak bulunmuştur. Ksantin oksidaz enziminin optimum pH değeri yaklaşık 8,3, izoelektrik noktası ise 5,3-5,4 olarak belirlenmiştir (Dixon, 1924; Yıldız, 1979; Yıldız, 1982; Hille, 2006).

Şekil 4.1’de sığırdan elde edilen ksantin oksidazın yapısı verilmiştir. Üst kısımdaki şekilde, mavi ve yeşil kısımlar Fe-S bölgesini, gri kısım FAD bölgesini, kırmızı kısım protein molibden bağıını göstermektedir. Alt kısımdaki şekilde ise enzimin aktif merkezi iki farklı şekilde gösterilmiştir.

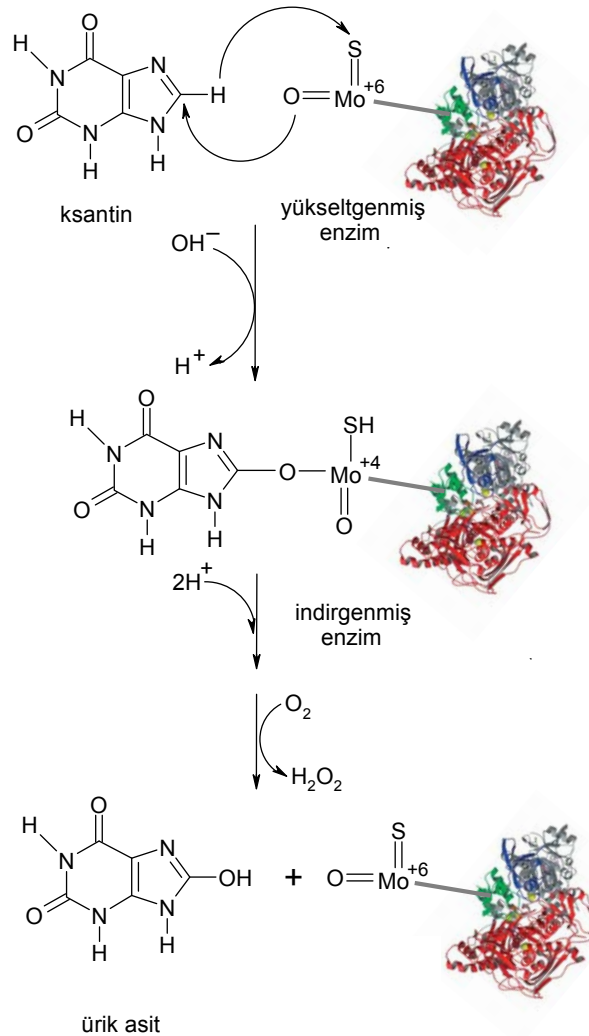


Şekil 4.2. Pürin nükleotitleri ve dioksinükleotitlerinin ürik aside dönüşümü (Horton, 2006)

Ksantin oksidaz, insan ve memeli vücudunda pürin metabolizmasının bir bölümünü kontrol eden bir enzim olması bakımından önemlidir. Pürin nükleotitlerinin yıkımı (Şekil 4.2) 5-nükleotidaz etkisi sonucunda fosfat grubunun ayrılması ile başlar

ve pürin nükleosit fosforilaz etkisiyle devam eder. Son olarak ksantin oksidaz enzimi ile ürik asit oluşmaktadır.

Şekil 4.3’de gösterilen, ksantin oksidaz enzimi ile ksantin substratı arasında meydana gelen enzimatik reaksiyonda, enzim Mo aktif bölgesindeki oksijen ile substrata nükleofilik atak yaparak etkileşir. $\text{Mo}=\text{S}$ bağı açılmasıyla $\text{Mo}^{+6}(\text{OS})$ yapısı $\text{Mo}^{+4}\text{O}(\text{SH})$ yapısına dönüşür ve Mo^{+6} , Mo^{+4} ’e indirgenir. Ksantin’in ürik asite yükseltgenmesi gerçekleşirken, aktif merkezde Mo^{+4} birkaç ara basamak sonucunda tekrar Mo^{+6} durumuna geçer. İndirgenme reaksiyonu Mo aktif merkezinde gerçekleşirken, yükseltgenme yarı reaksiyonu enzimin FAD bölgesinde gerçekleşmektedir.



Şekil 4.3. Ksantin oksidaz enzimi ile ksantinden ürik asit oluşum mekanizması (Hille, 2006)

Fe-S merkezi ise bölgeler arası elektron transferini kolaylaştırdığı ve enzimin katalitik etkisini arttırdığı düşünülmektedir. FAD iki elektron alarak indirgenir ve FADH₂ oluşur. FADH₂ ortamda elektron alıcısı olarak görev alan oksijen ile etkileşerek FAD oluşur ve enzim rejenere olarak tekrar eski yapısına döner. Bu enzimatik reaksiyon sonucunda oksijen yükseltgenerek H₂O₂ oluşmaktadır (Whirter, 1991; Harrison, 2002; Metiyurt, 2003; Hille, 2006).

Ksantin ve hipoksantin tayinleri tıbbi, biyolojik alanlarda ve gıda endüstrisinde önemli bir ilgiye sahiptir. Ksantin ve hipoksantinden ürik asit dönüşümü göz önüne alınarak, vücutta ürik asit kristallerinin fazla miktarda birikmesiyle oluşan gut hastalığının teşhisinde ksantin oksidaz enziminin faydalanılmaktadır. Aynı şekilde balıklarda ölüm sonrasında da devam eden pürin bozunması ürik asit oluşumuyla sonlanmaktadır. Bozunma sırasında hipoksantin ve ksantin oluşmakta ve bu maddelerin miktarları ksantin oksidaz enzimi ile belirlenmektedir. Bu tayin sonuçları, ilk olarak Japonya ve daha sonra birçok ülkenin benimsediği bir kalite standardı olarak gösterilen K değeri ile tanımlanmaktadır. Buna göre eşitlik (4.1)'de verilen K değerinin %20 olması tazelik limiti olarak belirlenmiştir. Eşitlik 4.1'de INO, inosin, HX, hipoksantin, IMP ise inosin monofosfat miktarlarını göstermektedir (Ghosh, 1998; Carsol, 1998; Watanabe, 2005).

$$K = \frac{[INO] + [HX]}{[IMP] + [INO] + [HX]} \times 100 \quad (4.1)$$

Bir organa ya da vücudun bir bölümüne atardamarlarla gelen kanın azalması ya da hiç gelmemesi olarak tanımlanan iskemide, dokular yeterince oksijen elde edemez ve kan aracılığıyla atıkları artık maddeleri temizleyemeyip biriktirmeye başlarlar. İskemi sonrası, dokuda süperoksit radikallerinin büyük kısmının kaynağı ksantin oksidaz enzim sistemidir. İskemik dokuda iki önemli değişiklik meydana gelmektedir. Birincisi yeni bir enzim aktivitesi yani ksantin oksidaz, ikincisi ise bu enzimin iki önemli substratından biri olan hipoksantin oluşumudur. Diğer substrat yani moleküler O₂'nin de reperfüzyonu ile dokuda ani ve çok miktarda süperoksit radikali ve hidrojen peroksit oluşmaktadır. Çok reaktif ve sitotoksik olan serbest O₂ radikalleri kapiler geçirgenliği artırarak doku ödeme, trombositlerin damar duvarına yapışma özelliğini artırarak mikro dolaşımın bozulmasına neden olmaktadır. Bu durum sonucunda substrat

birikmesi meydana gelerek dokularda ksantin fazlalığı oluşmaktadır ve doku kaybı oluşmaktadır. Dokuda biriken ksantin bir kısmı plazmaya geçmektedir ve bu geçiş sayesinde ksantin miktarı analizi ile kalp krizi tanısında kullanılmaktadır (Arslan, 2004; Tomur, 2005; Kul, 2006).

Ksantin oksidaz aktivitesinin, ksantin ve hipoksantin tayinlerinin tıbbi, biyolojik ve gıda açısından önemi farklı tayin metotlarının geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Ksantin oksidaz aktivitesinin tayini üzerine yapılan çalışmalarda, spektrofotometrik ve spektrofotometrik metotların yanında radyometri ve mikrokolorimetrik metotlar da kullanılmıştır. Radyometrik metotta radyoaktiflenmiş substratlar kullanılarak tayinler yapılırken, mikrokolorimetrik metotta enzim ile substrat arasında gerçekleşen reaksiyon esnasında meydana gelen ısı değişiminden faydalanılarak tayinler yapılmıştır. Spektrofotometrik metotta ise tayin substratlara ait dalga boylarındaki azalan absorbans değerlerinden veya enzimatik reaksiyon esnasında oluşan ürünün spesifik dalga boyundaki absorbans değerlerinden yapılmıştır. Substratlardan ksantin 271 nm’de, hipoksantin 250 nm’de, reaksiyon ürünü olan ürik asit ise 292 nm’de kuvvetli absorbans göstermektedir. Spektrofotometre ile yapılan çalışmalarda ise uyarma dalga boyu 315 nm emisyon dalga boyu 425 nm olan ortam şartlarında tayin yapılmıştır (Yıldız, 1979; Yıldız, 1982).

Yukarıda ifade edilen tayin metotlarına ek olarak günümüzde de sıkça kullanılan elektrokimyasal teknikleri içeren metotlar vardır. Bu metotlarda tayin genellikle diğer metotlara göre daha hızlı ve maliyeti daha düşük olan ksantin oksidaz elektrodu ile yapılmaktadır ve enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksidin yükseltgenmesi dikkate alınmaktadır.

Aşağıdaki çizelgelerde literatürlerde yer alan ksantin oksidaz enzimi ile hazırlanmış farklı biyosensörler verilmiştir. Çizelge 4.1(a) ve 4.1(b)’de, biyosensörlerin kullanıldığı substratlar (ksantin, hipoksantin) ya da analitler (balık, hücre kültürü, rat beyni), tayin için kullanılan teknik, uygulama potansiyeli, biyosensörün lineer aralığı ve biyosensörlerin ömrü verilerek bazı özellikler yönünden karşılaştırılması yapılmıştır.

Çizelge 4.1(a). Hazırlanan Bazı Ksantin Oksidaz Biyosensörleri ve Özellikleri *

Biyosensör	E _{uyg.} , yöntem	Analit, Numune	Çalışma aralığı, μ M	Sensörün Ömrü	Referans
XO-PtE	0,65 V(H ₂ O ₂) yada -0,65 V (O ₂), Ag/AgCl, amp.	Hx	2,5 – 375	50 gün (4 °C)	Haemmerli 1990
XO-CPE	0,4 V, Ag/AgCl, amp.	Hx, X	5 – 130, 5 – 100	6 gün	Gonzalez, 1991
XO-HMeFe/CPE ^a	0,29 V, Ag/AgCl,amp.	Hx, balık	0,6 – 700	30 gün (5 °C)	Okuma, 1991
DAB/resorcinol-XO-PtE ^b	0,50 V, SCE, amp.	Hx, balık	5 – 300	60 gün (4 °C)	Nguyen, 1991
Nafion/NP/XO-PtE ^c	0,60 V, Ag/AgCl, amp.	Hx, HxR ^d , balık	max. 200	20 gün	Yao, 1993
XO-TTF-TCNQ-PtE	0,125 V, Ag/AgCl,amp.	Hx, X, balık	max. 6000 (Hx), 12500 (X)	75 gün	Nguyen, 1993
XO-TTF-hp β CyD-GCE ^e	0,100 V, Ag/AgCl,amp.	Hx	max. 35	-	Zhao, 1993
XO streptavidin-biotin-SSE ^f	0,67 V, SCE,amp.	X	max. 1000	5 gün	Rehak, 1994
XO-PPy-PtE	0,60 V, SCE,amp.	X	0,1 – 1000	-	Xue, 1995
XO-PMBQ-AuGCE ^g	0,30 V, Ag/AgCl,amp.	Hx, X	1 – 50 (HX), 1 – 80 (X)	-	Arai, 1996
XO-PtE	0,65 V, Ag/AgCl,amp.	Hx, balık	0,05 – 100	4 gün	Shen, 1996
XO-PtE	0,65 V, Ag/AgCl,amp.	Hx, balık	1,0 – 20	-	Volpe, 1996
XO-Au _{coll} -GCE ^h	0,4 V, Ag/AgCl	X	max. 30	-	Zhao, 1996
XO-SPE ⁱ	0,45 V, Ag/AgCl, FI	Hx, balık	max. 50	7 gün (4 °C)	Carsol, 1997
Nafion-MV-NT-NP-XO-GCE ^j	- 0,70 V, SCE, amp.	IMP ^k , HxR, Hx, balık	2 – 18 (Hx)	-	Hu, 1997
Nafion-MV-XO-GCE	- 0,68 V vs. SCE, amp.	Hx, balık	1,0 – 200	21 gün	Hu, 1997
XO-FCAPPy-ITO ^l	0,70 V vs. SCE, amp.	Hx	max. 2000	3 gün	Ghosh, 1998

Çizelge 4.1(b). Hazırlanan Bazı Ksantin Oksidaz Biyosensörleri ve Özellikleri *

Biyosensör	E _{uyg.} , yöntem	Analit, Numune	Çalışma aralığı, μM	Sensörün Ömrü	Referans
XO-PtE	0,65 V vs. Ag/AgCl, amp.	Hx, balık	0,1 – 10	7 gün	Qiong, 1998
Os-gel-HRP-XO-GCE	0,0 ya da - 0,20V vs. Ag/AgCl, FI	Hx	0,5 – 80	42 gün	Mao, 2000
XO-SGGE ^m	0,58 V (H ₂ O ₂) yada -1,4 V (O ₂), voltamp.	Hx, balık	5,6 – 950 1,5 – 1200	6 gün	Niu, 2000
XO-BV-SGGE ⁿ	- 0,95 V (O ₂), voltamp.	Hx, balık	1,2 – 1100	2 ay	Hu, 2000
PANI-XO-NaMont/MV/CPE ^o	- 0,72 V vs. SCE, amp.	Hx, balık	1 – 400	20 gün	Mao, 2001
Nafion/XO/PPh/CFME ^p	0,60V vs. Ag/AgCl, amp.	Hx, hücre kültürü	5 – 1800	14 gün (1–5 °C)	Xu, 2002
Nafion-GO/XO-PdIrO ₂ /GCE	0,70V vs. Ag/AgCl, amp., HPLC	Glu, Hx, rat beyni	1,0 – 500 (Hx)	14 gün	Shi, 2002
Nafion-XO-Au _{coll} -PtE ^h	0,60 V vs. SCE, amp.	Hx, hücre kültürü	0,2 – 20	20 gün (4 °C)	Kirgoz, 2004
XO-GCPE ^q	0,9 V vs. Ag/AgCl, amp.	-	20 – 80	1 gün (4 °C)	Crumbliss, 1992

* ^a HMeFe: hidroksimetilferrosen, ^b DAB: 1,3-diaminobenzen, CFM: karbon fiber mikro elektrot, ^c NP: nükleotit fosforilaz, ^d HxR: inosin, ^e hp β CyD: 2-hidroksipropil- β -siklodekstrin, ^f SSE: çelik elektrot, ^g PMBQ: poli(merkaptobenzokinin), ^h Au_{coll}: koloidal altın, ⁱ SPE: screen-printed elektrot, ^j NT: 5'-nükleotidaz, MV: metil violegen, ^k IMP: inosin monofosfat, ^l FCAPPy: ferrosin karboksil asit polipirol, ITO: indiyum tinoksit cam elektrot, ^m SGGE: sol-gel grafit elektrot, ⁿ BV: benzil violegen, ^o NaMont: sodyum montmorillonit, ^p PPh: polifenol, ^q GCPE: camsı karbon pasta elektrot.

5. REDOKS POLİMERLERİ

Redoks polimeri, elektroaktif olan veya elektroaktif olmayan ana polimer zincirine kovalent veya elektrostatik olarak bağlı redoks aktif geçiş metalleri içeren, yükseltgenme veya indirgenme özelliğine sahip bölgelerden oluşan polimerler olarak tanımlanmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, redoks polimerleri gibi elektroaktif polimerler ile hazırlanan elektrotlarda yüksek elektrokatalitik özelliğe sahip yeni polimerik materyallerin geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

Polimerlerle modifiye edilmiş elektrot matriksine, elektrokatalitik özellikli geçiş metali türlerinin yerleştirilmesi, elektrot ile substrat arasında gerçekleşen elektron transferini kolaylaştırıcı bir aracı (mediator) görevi sağlamaktadır. Ayrıca, elektrokatalik olarak desteklenen yeni polimerik materyallerde, elektrodun kimyasal, elektrokimyasal, optiksel ve immobilize molekül özelliklerinin istenilen yönde geliştirilmesi, uygulanan potansiyel ve akım yardımı ile reaksiyon hızını kontrol edilebilme, elektrokatalitik bölgelerin elektroda yakın olması, az bir materyal miktarı ile yüksek konsantrasyonlu aktif merkezler oluşturma, polimerdeki diğer katalitik bölgelerin yakınlığından kaynaklanan kümülatif etkisi, katalizörün substrat ortamından kolay ayrılabilmesi gibi özelliklerin geliştirilmesi hedeflemektedir (Cameron, 2000; Kavanoz, 2009).

Elektron transferi bakımından karşılaştırıldığında, iletken polimerlerden farklı olarak redoks polimerleri dar bir potansiyel aralığında iletkenlik göstermektedirler ve gösterdikleri bu iletkenlik, polimer filmde indirgenen ve yükseltgenen yapıların konsantrasyonları eşit olduğu durumda redoks merkezlerinin formal potansiyel değerlerinde maksimum olmaktadır. Polimerlerdeki redoks iletimi, Kaufman ve çalışma arkadaşları tarafından önerilen elektron transferinin ardışık redoks grupları arasında kendiliğinden gerçekleşen bir seri elektron atlama (hopping) işleminin ilerlemesi yoluyla sağlandığı öngörülmektedir. Kaufman ve çalışma arkadaşları, elektrot ile polimerin redoks bölgeleri arasındaki yük transferi hakkında yaptıkları öneriyi aşağıdaki eşitlik (5.1) ile ifade etmişlerdir.

$$R_{SE} = k_{ET} C_{yük} C_{ind} \quad (5.1)$$

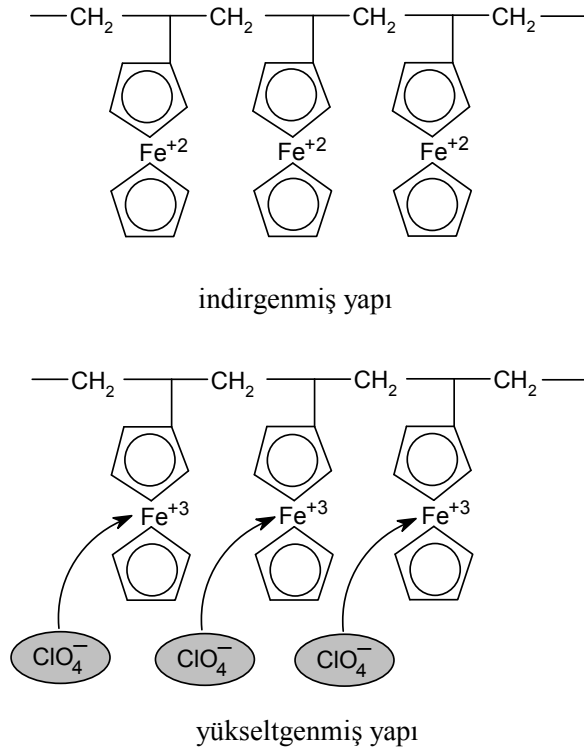
Bu eşitlikte, $C_{yük}$, yükseltgenmiş türlerin konsantrasyonunu, C_{ind} , indirgenmiş türlerin konsantrasyonunu, R_{SE} , kendiliğinden değişme hızını, ET, elektron transferini göstermektedir. Polimer filmde bütün redoks türünün konsantrasyonları $C_{yük} + C_{ind} = C_{toplam}$ şeklinde sabitlendiğinde kendiliğinden değişme hızı, indirgenen ve yükseltgenen türlerin konsantrasyonlarının birbirine eşit olduğu şartlarda ($C_{yük} = C_{ind}$) maksimum olmaktadır ve bundan dolayı maksimum iletkenliğe E° değerinde ulaşılmaktadır (Kaufman, 1979; Kaufman, 1980).

Redoks polimerler kullanılarak mikoelektrokimyasal diyotlar, transistörler, sensörler ve biyosensörler gibi etkin elektrokatalitik özelliklere sahip malzemelerin geliştirilmesi günümüzde yapılan çalışmalar arasında oldukça fazla yer almaktadır (Silva 1989; Sasaki 1973). Bu polimerlerden bir tanesi de elektroaktif bir polimer olan polivinilferrosen (PVF) polimeridir. Polivinilferrosen, tersinir elektron prosesinin sağladığı avantajı, yüksek kararlılığı, çeşitli metotlar kullanılarak ince filmler hazırlayabilme kolaylığı ile iletken polimer sistemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Yu, 2005). Polivinilferrosen polimeri, elektroanalizde (Gülce, 1995), elektrokatalizde (Gülce, 1994a; Gülce, 1994b), elektrokimyasal diyot olarak (Wang, 1991), referans elektrot olarak (Kannuck, 1987), biyosensör hazırlanmasında (Dong, 1991; Nguyen, 1993; Gülce, 1995a; Gülce, 1995b; Gülce, 2002a; Gülce, 2002b; Gülce, 2002c; Gülce, 2003; Gülce, 2005; Şen, 2004; Kuralay, 2005; Kuralay, 2006; Sulak, 2006) ve ikincil piller (Kawai, 1989) gibi çeşitli uygulama alanlarında kullanılmaktadır.

Polivinilferrosen polimerinde elektriksel iletkenlik, polimerin yapısındaki yükseltgenmiş ve indirgenmiş gruplar arasında elektron atlaması (hopping) yoluyla sağlanmaktadır (Şekil 5.1). Polimerin yapısında bulunan ferrosen, tersinir bir elektron aktarımıyla kolaylıkla ferrosenyum katyonuna yükseltgenebilen fonksiyonel bir moleküldür. Böylece ferrosen grubundaki Fe merkezi tersinir olarak yükseltgenip-indirgenmekte ve böylece yük ferrosen grupları arasında elektron atlama yoluyla polimer zinciri boyunca taşınmaktadır (Aso, 1969; Umana, 1980; Gülce, 1993; Kavanoz, 2009).

Kimyasal polimerizasyonla elde edilmiş polivinilferrosenin elektrot yüzeyine kaplanması, PVF çözeltisine daldırılan elektrodun daldırıp-kurutulması (dip coating) ile, PVF çözeltisinin çok küçük hacimlerde elektrot yüzeyine damlatılarak çözücünün buharlaşması (droplet evaporation) ile, PVF çözeltisinin elektrot yüzeyine damlatıldıktan sonra elektrodun çevrilmesi (spin coating) ile, PVF çözeltisine daldırılan

elektrot yüzeyinde elektrokimyasal çöktürme (electrochemical precipitation) ile yapılabilir (Umana, 1980; Gülce, 1993).



Şekil 5.1. Polivinilferrosenin indirgenmiş ve yükseltgenmiş yapıları

Elektrokimyasal çöktürme ile hazırlanmış PVF elektrotları, metilen klorürde çözünmüş PVF'nin sabit potansiyeldeki anodik elektrolizi ile hazırlanmıştır. Elektrot yüzeyine biriktirilen polimerin ClO_4^- karşıt anyonu ile ferrosen ve ferrosenyum gruplarını içeren kısmen yükseltgenmiş bir yapıda olduğu dağılmış yansıma (electronic diffuse reflection) spektrumunda sırasıyla 460 nm ve 625 nm'de ferrosen ve ferrosenyuma ait absorpsiyon pikleri gözlenerek belirlenmiştir (Shirota, 1984).

Polivinilferrosenin yalnız olarak kullanılmasının yanında ferrosenin hem direkt polimerleşmeye katılmasıyla oluşan kopolimerleri hem de polimer zincirine sonradan bağlanarak oluşan modifiye ferrosen polimerleri hazırlanmıştır. Bu polimerler ile elektrot üzerinde oluşturulan polimer filmlerine enzim immobilize edilerek amperometrik çalışmalarda kullanılmıştır. Şekil 5.2'de yapıları gösterilen, glisidil metakrilat ile vinil ferrosenden hazırlanmış kopolimeri (a), 2-hidroksietilmetakrilat ile vinilferrosenden hazırlanmış kopolimeri (b), ferrosen içeren çapraz bağlı polialilamin modifiye polimerini (c), N-izosiklopropil akrilamit ve N-izopropil akrilamit kullanılarak

6. KAYNAK ARAŞTIRMASI

6.1. Ksantin Okisadaz Biyosensörleri ile İlgili Kaynak Araştırması

J. Pei ve çalışma grubu tarafından CuPtCl_6 ile kimyasal olarak modifiye edilen camı karbon elektrot üzerine ksantin oksidaz immobilize edilmiştir. Hazırlanan elektrot yüzeyinde meydana gelen enzim reaksiyonu esnasında açığa çıkan hidrojen peroksitin yükseltgenmesine dayanan akım cevapları ksantin ve hipoksantin için hızlı ve seçici sonuçlar vermiştir. Bu elektrodun performansı üzerine, enzim immobilizasyonunun etkisi, pH'nın etkisi, sıcaklığın etkisi ve uygulanan potansiyelin etkisi araştırılmıştır. Biyosensörün gözlenebilme sınırı 1×10^{-7} M olarak bulunmuş, lineer cevap aralığı ise $6 \times 10^{-7} - 2 \times 10^{-4}$ M ksantin ve $5 \times 10^{-7} - 2 \times 10^{-4}$ M hipoksantin olarak belirlenmiştir. Hipoksantin ve ksantin karışımında analiz için elektrokimyasal dedektör olarak enzim elektrodu ile birleştirilmiş sıvı kromatografik ayırma sistemi kullanılmıştır (Pei, 2000).

S. Hu ve çalışma grubu tarafından hipoksantin tayini için sodyum montmorillonit-metil violejen karbon pasta modifiye elektrodu kullanılarak yeni bir hipoksantin biyosensörü hazırlanmıştır. Hipoksantin biyosensörü, montmorillonit-metil violejen karbon pasta modifiye elektrodu ile anilin ve ksantin oksidaz içeren çözelti içerisinde +1,2 ile -0,5V arasında dönüşümlü potansiyel taraması yapılması sonucunda anilinin polimerleşmesi ve ksantin oksidazın bu polimer film içerisine immobilizasyonu ile hazırlanmıştır. Hipoksantin tayini ksantin oksidaz ile substrat arasındaki enzimatik reaksiyon sonucunda harcanan oksijen miktarına dayanmaktadır. Hazırlanan biyosensör için lineer çalışma aralığı $1 \mu\text{M} - 0,4 \text{ mM}$ hipoksantin gözlenebilme sınırı ise $0,8 \mu\text{M}$ hipoksantin olarak belirlenmiştir. Ayrıca hazırlanan biyosensör ile farklı balık eti numulerinde hipoksantin tayini için denemeler yapılmıştır (Hu, 2000).

D. Xu ve çalışma grubu tarafından camı karbon elektrodu H_2O_2 'nin yükseltgenmesine katalitik etki sağlayan Pd/IrO_2 ile modifiye edilerek bienzim elektrodu hazırlamıştır. Glikoz ve hipoksantin sensörleri hazırlanırken, glikoz oksidaz ve ksantin oksidaz enzimleri elektrodun nafyon film ile kaplanmasından sonra immobilize edilmiştir. Hazırlanan bienzim biyosensörü HPLC'nin dedektöründe de kullanılmıştır. Gözlenebilme sınırları, glikoz için $1,0 \times 10^{-6}$ M, hipoksantin için $2,0 \times 10^{-7}$ M olarak bulunmuştur. Lineer konsantrasyon aralığını ise sırasıyla $5,0 \times 10^{-6} - 2,5 \times 10^{-3}$ M glikoz ve $1,0 \times 10^{-6} - 5,0 \times 10^{-4}$ M hipoksantin olarak tespit edilmiştir (Xu, 2002).

Ü. A. Kırgöz ve çalışma grubu tarafından ksantin tayini için camı karbon pasta elektrodu üzerine ksantin oksidaz immobilizasyonu yapılarak bir enzim elektrodu hazırlanmıştır. Hazırlanan biyosensörde ksantin ve hipoksantin tayini, GCP materyaline immobilize edilmiş kssantin oksidaz tarafından katalizlenen enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan H_2O_2 'nin amperometrik tayinine dayanmaktadır. Biyosensör için optimum şartlar araştırılmış, hipoksantin ve ksantin her ikisi içinde çalışılan parametreler optimize edilmiştir. Hazırlanan biyosensör $5,0 \times 10^{-7}$ – $4,0 \times 10^{-5}$ M ksantin ve $2,0 \times 10^{-5}$ – $8,0 \times 10^{-5}$ M hipoksantin konsantrasyon aralıklarında lineerlik göstermiştir. Gözlenebilme sınırları ise ksantin substratı için $1,0 \times 10^{-7}$ M, hipoksantin substratı için $5,3 \times 10^{-6}$ M olarak elde edilmiştir (Kırgöz, 2004).

F. Arslan ve çalışma grubu tarafından tetrabutylamonyum tetrafluoroborat ve elektron aracısı olarak ferrosenin bulunduğu bir ortamda, pirolün 50 mVs^{-1} tarama hızı ve 0,0 – 0,9 V potansiyel aralığında voltametrik metot ile platin elektrot yüzeyine elektrokimyasal polimerizasyon ile polimer film kaplı bir elektrot hazırlanmıştır. Elektropolimerizasyon basamağından sonra, glutaraldehit ve bovine serum albumin kullanılarak polipirol film üzerine ksantin oksidazın immobilizasyonu sağlanmıştır. Hazırlanan biyosensörün enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan H_2O_2 'in elektrokimyasal tayine dayalı amperometrik cevaplar +0,7 V sabit potansiyelde alınmıştır. Biyosensörün performansını belirleyen parametreler hazırlanan ksantin oksidaz biyosensörü üzerinde incelenmişlerdir. Buna göre biyosensörün optimum şartlardaki lineer çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-5}$ – $4,0 \times 10^{-4}$ M ksantin, gözlenebilme sınırı $1,0 \times 10^{-6}$ M ksantin, cevap süresi 25 s, enzim miktarı 1,02 Unit, pH değeri 7,4 olarak belirlenmiştir (Arslan, 2006).

T. Hoshi ve çalışma grubu tarafından platin disk elektrot yüzeyine ksantin oksidazın immobilizasyonu ile bir amperometrik ksantin biyosensörü hazırlanmıştır. İlk olarak platin elektrot, ksantin enzimatik yükseltgenme reaksiyonundan oluşan ürik asitin elektrokimyasal olarak yükseltgenerek girişime sebebiyet vermesinden dolayı elektrot yüzeyine ulaşımını engellemek için polivinilsülfat ve polialilaminhidroklorit polimerlerinden oluşan polielektrolit çoklu tabaka filmi(PEM) ile kaplanmıştır. PEM ile kaplanan platin elektrot ksantin oksidaz ve polidimetildialilamonyum klorit ile hazırlanan çoklu tabaka filmi ile modifiye edilmiştir. Hazırlanan ksantin biyosensörü 3–300 μM konsantrasyon aralığında başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Hoshi, 2006).

L. Agüi ve çalışma grubu tarafından hipoksantinın amperometrik tayini için altın nanopartikülleri ile modifiye edilmiş bir karbon pasta elektrot (CPE) üzerine ksantin oksidaz immobilize edilerek bir enzim biyosensörü hazırlanmıştır. Modifiye edilmeksizin hazırlanan CPE-XO enzim elektrodu ile, altının elektrokimyasal olarak biriktirilmesi ile modifiye edilen altın disk elektrot ve camı karbon elektrot kullanılarak hazırlanan biyosensörler karşılaştırılmıştır. Hipoksantin için en yüksek amperometrik sinyal, enzimin glutaraldehit ve BSA çapraz bağlayıcıları ile immobilize edilmesi sonucunda hazırlanan XOD-nAu-CPE biyosensöründe gözlenmiş ve gözlenebilme sınırı $2,2 \times 10^{-7}$ M olarak bulunmuştur. Sardalye ve tavuk etindeki hipoksantin tayini için yapılan gerçek numune çalışmalarında ise bu biyosensörlerin kullanılabilirliği gösterilmiştir (Agüi, 2006).

6.2. Polivinilferrosen Modifiye Elektrotlar ile İlgili Kaynak Araştırması

Elektrokimyasal mikrocihazların geliştirilmesine yönelik bir çalışmanın parçası olarak elektrokimyasal yöntemle biriktirilmiş polivinilferrosen polimerinin morfolojisi, yoğunluğu ve elektrokimyasal özellikleri incelenmiştir. Platin disk elektrot üzerine +0,8 V sabit potansiyelde polivinilferrosen polimer filminin elektrokimyasal olarak kaplanmasında perklorat, tetrafloroborat, hidrojen sülfat, hekzaflorofosfat, dihidrojenfosfat, klorür gibi çeşitli tuzlar ile *p*-toluensülfonat ve potasyum hekzafloroarsenat farklı elektrolitlerin kullanılması sonucunda elde edilen polimer filmler ile fiziksel ve elektrokimyasal çalışmalar yapılmış, filmlerin yoğunluğunda ve morfolojisinde belirgin farklılıklar olduğu gözlenmiştir (D'Silva, 1989).

Elektrot yüzeyinin polivinilferrosen polimeri ile kaplanması, polivinilferrosenin metilen klorür içerisindeki çözeltisinden; elektrot yüzeyine elektrokimyasal çöktürme, daldırıp kurutma ya da damlatma-döndürerek buharlaştırma yöntemleri ile yapılabilmektedir. Elektrokimyasal çöktürme yönteminde polimer çözeltisine daldırılan elektroda uygun bir potansiyel uygulanarak yapılan elektrolizle polimerin yükseltgenmiş formu elektrot yüzeyinde biriktirilmektedir. Daldırıp-kurutma yönteminde elektrot polimer çözeltisinde bir süre bekletildikten sonra kurutularak, damlatma-döndürerek buharlaştırma yönteminde ise elektrot yüzeyine polimer çözeltisi damlatılıp elektrodun döndürülmesi sonucunda çözücü buharlaştırılmasıyla hazırlanmaktadır. Değişik yöntemler kullanılarak PVF ile kaplanan elektrotlarda yüzeye

bağlanmış bir ferrosen polimerinin tersinir bir yükseltgenme indirgenme tepkimesi verdiği bulunmuştur (Umana, 1980, Gülce, 1993).

H. Gülce ve çalışma grubu tarafından aerobik ortamda basit, duyarlı, kararlı, düşük maliyetli bir glikoz biyosensörü hazırlanmıştır. Enzimin $PVF^+ClO_4^-$ film kaplı platin elektrot yüzeyine immobilizasyonu ile hazırlanan biyosensörün akım cevapları hem voltametrik pik akım değerleri hem de kararlı kal akım değerleri ölçülerek belirlenmiştir. Çalışmada biyosensörün akım cevaplarına glikoz konsantrasyonu, immobilize enzim miktarı, polimer film kalınlığı ve sıcaklığın etkisi incelenmiş ve optimize edilmiştir (Gülce, 1995a).

H. Gülce ve çalışma grubu tarafından sükroz tayini için hazırlanan biyosensörde glikoz oksidaz ve invertaz $PVF^+ClO_4^-$ film üzerine immobilize edilmiştir. İvertazin varlığında sükrozun yükseltgenmesi ile oluşan α -glukozun β -glukoza dönüşümü için üçüncü bir enzim olarak mutoratoaz enzimi kullanılmamış, mutarasyon için fosfat iyonları kullanılmıştır. Çalışmada biyosensörün akım cevaplarına substrat konsantrasyonu, immobilize enzim miktarı, fosfat konsantrasyonu, pH ve sıcaklığın etkisi incelenmiş ve optimize edilmiştir (Gülce, 1995b).

H. Gülce ve çalışma grubu tarafından galaktoz tayini için galaktoz oksidaz $PVF^+ClO_4^-$ film kaplı platin elektrot yüzeyine immobilize edilerek bir galaktoz biyosensörü hazırlanmıştır. Çalışmada biyosensörün akım cevaplarına substrat konsantrasyonu ve sıcaklığın etkisi incelenmiş ve optimize edilmiştir. Biyosensörün akım cevabı 30-40 s olarak belirlenirken, lineer çalışma aralığının üst sınırı 40,0 mM galaktoz olarak bulunmuştur (Gülce, 2002a).

H. Gülce ve çalışma grubu tarafından laktoz tayini için hazırlanan biyosensörde β -galaktosidaz ve glikoz oksidaz $PVF^+ClO_4^-$ film üzerine immobilize edilmiştir. Hazırlanan biyosensörün amperometrik cevapları enzimatik reaksiyon sonucu oluşan H_2O_2 'in elektrokimyasal yükseltgenmesine dayanarak +0,7 V'da sabit potansiyelde ölçülmüştür. Biyosensörün akım cevabı üzerine pH etkisi incelenmiş ve maksimum akım değeri pH 7,8 de elde edilmiştir. Ayrıca, biyosensör 0,5 mM dan daha düşük laktoz konsantrasyonuna olanak sağlamıştır. Biyosensöre askorbik asit gibi girişim maddesinin etki etmediği belirlenmiştir (Gülce, 2002b).

H. Gülce ve çalışma grubu tarafından $PVF^+ClO_4^-$ film kaplı platin elektrot yüzeyine alkol oksidaz immobilize edilerek alkol tayini için yeni bir elektrot

geliştirilmiştir. Biyosensörün akım cevapları enzimatik olarak üretilen H_2O_2 'nin elektroyükseltgenmesine dayanarak +0,7 V'da ölçülen akım cevaplarından elde edilmiştir. Çalışmada biyosensörün akım cevaplarına substrat konsantrasyonu, immobilize enzim miktarı, fosfat konsantrasyonu, pH ve sıcaklığın etkisi incelenmiş ve optimize edilmiştir. Hazırlanan alkol biyosensörünün duyarlılığı sırasıyla metanol > etanol > n-butanol > benzil alkol şeklinde belirlenmiştir. Lineer cevabın metanol için 3,7 mM, etanol için 3,0 mM, n-butanol için 6,2 mM, benzil alkol için 5,2 mM'a kadar olduğu belirlenmiştir. Metanol için Michaelis-Menten sabiti, 5,78 mM ve aktivasyon enerjisi $38,07 \text{ kJmol}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Gülce, 2002c).

H. Gülce ve çalışma grubu tarafından, kolin tayini için $PVF^+ClO_4^-$ film kaplı platin çalışma elektrodu üzerine kolin oksidaz enziminin immobilizasyon ile yeni bir enzim elektrodu hazırlanmıştır. Enzim elektrodunun amperometrik cevapları enzimatik reaksiyon sunucunda oluşan H_2O_2 'in elektrokimyasal yükseltgenmesine dayanarak elde edilmiştir. Hazırlanan enzim elektrodunun cevabı üzerine, enzim çözeltisi konsantrasyonunun, kolin konsantrasyonunun, pH'ın ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Enzim elektrodunun amperometrik cevapları doğrultusunda elde edilen lineer çalışma aralığı üst limiti 1,2 mM ve gözlenebilme sınırı ise $4,0 \times 10^{-6}$ M kolin olarak belirlenmiştir. Michaelis-Menten sabiti, 2,32 mM, aktivasyon enerjisi $38,91 \text{ kJmol}^{-1}$ bulunmuştur. Enzim elektrodunun 25 gün boyunca kararlılığını koruduğu gözlenmiştir (Gülce, 2003).

S. Şen ve çalışma grubu tarafından, $PVF^+ClO_4^-$ film ile kaplanan platin elektrodu yüzeyine kolin oksidaz ve asetilkolinesteraz enzimleri iyon değiştirme yoluyla immobilize edilmiş, kolin ve asetil kolin tayini için bir biyosensör hazırlanmıştır. Enzim elektrodunun amperometrik cevapları, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan H_2O_2 'in elektrokimyasal yükseltgenmesine dayanarak +0,7 V'da sabit potansiyelde elde edilmiştir. Hazırlanan enzim elektrodunun cevabı üzerine, polimer film kalınlığının, enzim çözeltisi konsantrasyonunun, pH'ın ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Enzim elektrodunun amperometrik cevapları doğrultusunda elde edilen lineer çalışma aralığı üst limiti 1,2 mM ve gözlenebilme sınırı ise $1,0 \times 10^{-6}$ M asetilkolin olarak belirlenmiştir. Michaelis-Menten sabiti, 1,74 mM, aktivasyon enerjisi $14,92 \text{ kJmol}^{-1}$ bulunmuştur. Enzim elektrodunun 25 gün boyunca kararlılığını koruduğu gözlenmiştir (Şen, 2004).

A. Gülce ve H. Gülce tarafından, oksijensiz ortam şartlarında glikoz tayini için $PVF^+ClO_4^-$ film ile kaplanan elektrot yüzeyine glikoz oksidaz enzim immobilizasyonu sonucunda yeni bir glikoz biyosensörü hazırlanmıştır. Glikoz oksidaz ile glikoz arasında gerçekleşen enzimatik reaksiyon sonucunda glikoz oksidazın indirgenen flavin adenin dinükleotit merkezinin ferosen aracılığıyla tekrar yükseltgenmesi ve indirgenen ferrosen aracısının sabit bir potansiyelde yükseltgenmesi sonucunda elde edilen amperometrik cevaba dayanarak hazırlanan enzim biyosensörü üzerine immobilize enzim miktarı, aracı miktarı, glikoz konsantrasyonu, uygulama potansiyeli, pH ve sıcaklık parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Enzim elektrodunun amperometrik cevapları doğrultusunda elde edilen lineer çalışma aralığı üst limiti 5,0 mM ve gözlenebilme sınırı ise 0,0075 mM glikoz olarak belirlenmiştir. Michaelis-Menten sabiti, 6,05 mM, aktivasyon enerjisi $41,3 \text{ kJmol}^{-1}$ bulunmuştur (Gülce, 2005).

F. Kuralay ve çalışma grubu tarafından polivinilferrosen matrix içerisine üreaz enziminin immobilizasyonu ile üre tayini için yeni bir potansiyometrik enzim biyosensörü geliştirilmiştir. $PVF^+ClO_4^-$ film, 0,1 M tetrabutylamonyum perklorat içeren metilen klorür içerisinde polivinilferrosenin +0,7 V da sabit potansiyelde elektrokimyasal yükseltgenme ile platin çalışma elektrodu üzerine kaplanmasıyla hazırlanmış ve bu modifiye elektrot pH'ı 7,4 olan 0,1 M fosfat tamponu içerisindeki üreaz çözeltisinde immobilize edilerek üreaz biyosensörü hazırlanmıştır. Ölçülen potansiyel değerleri üzerine polimer film kalınlığı, enzim çözeltisi konsantrasyonu, enzim immobilizasyon süresi, pH, sıcaklık, tampon çözeltisinin konsantrasyonu ve girişim parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Potansiyometrik enzim elektrodunun lineer konsantrasyon aralığı $5 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-1} \text{ M}$, gözlenebilme sınırı $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ üre olarak belirlenmiştir. Enzim elektrodunun 24 gün boyunca kararlı kaldığı gözlenmiştir. Michaelis-Menten sabiti, $4,48 \times 10^{-5} \text{ M}$, aktivasyon enerjisi $4,97 \text{ kcalmol}^{-1}$ bulunmuştur (Kuralay, 2005).

F. Kuralay ve çalışma grubu tarafından polivinilferrosen matrix içerisine üreaz enziminin immobilizasyonu ile üre tayini için yeni bir amperometrik enzim biyosensörü geliştirilmiştir. $PVF^+ClO_4^-$ film, 0,1 M tetrabutylamonyum perklorat içeren metilen klorür içerisinde polivinilferrosenin +0,7 V da sabit potansiyelde elektrokimyasal yükseltgenme ile platin çalışma elektrodu üzerine kaplanmasıyla hazırlanmıştır. Polimer film kaplanan elektrot pH'ı 7,4 olan 0,1 M fosfat tamponu içerisindeki üreaz çözeltisinde bir süre bekletilerek üreaz enziminin polimer film yüzeyine immobilizasyonu

sağlanmıştır. Hazırlanan üreaz elektrodu ile polimer film kalınlığı, enzim çözeltisi konsantrasyonu, enzim immobilizasyon süresi, pH, sıcaklık, tampon çözeltisinin konsantrasyonu ve girişim parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Enzim elektrodunun amperometrik cevapları doğrultusunda elde edilen lineer çalışma aralığı 1–250 μM , gözlenebilme sınırı ise 1 μM üre olarak belirlenmiştir. Enzim elektrodunun 29 gün boyunca kararlılığını devam ettiği gözlenmiştir. Michaelis-Menten sabiti, $2,54 \times 10^{-4} \text{ M}$, aktivasyon enerjisi $5,90 \text{ kcalmol}^{-1}$ bulunmuştur (Kuralay, 2006).

Ö. Gökdoğan ve çalışma grubu tarafından, oksijenin elektrokimyasal indirgenmesi camsı karbon elektrot ve polivinilferrosen kaplı camsı karbon elektrot kullanılarak çeşitli 0,1 M NaClO_4 çözeltisi ve çeşitli pH değerlerindeki fosfat tamponlarında dönüşümlü voltametri ve konoamperometri metotları kullanılarak araştırılmıştır. Camsı karbon elektrot için indirgenme piki $-0,80 \text{ V}$ 'da, polivinilferrosen kaplı camsı karbon elektrot için indirgenme pikleri $-0,55$ ve $-0,80 \text{ V}$ 'da gözlenmiştir. Polivinilferrosen kaplı camsı karbon elektrotta gözlenen bu değişimin nedeni olarak oksijenin iki basamakta indirgendiği gösterilmiştir. İlk pikin O_2 'nin H_2O_2 'e indirgenmesi, ikinci pikin ise H_2O_2 'in H_2O ya indirgenmesi şeklinde tanımlanmıştır. Çalışmada, polimer film kalınlığının, oksijen konsantrasyonunun, pH'ın ve potansiyel tarama hızının etkisi araştırılmıştır (Gökdoğan, 2006).

C. Özer ve çalışma grubu tarafından, $\text{PVF}^+\text{ClO}_4^-$ film üzerine kolesterol oksidaz immobilizasyonu sonucunda kolesterol tayini için amperometrik bir biyosensör geliştirilmiş ve amperometrik cevaplar $+0,7 \text{ V}$ sabit potansiyelde alınmıştır. Hazırlanan elektrodun cevabı üzerine enzim çözeltisi konsantrasyonu, polimer film kalınlığı, çalışma sıcaklığı, çözünen oksijen miktarı ve pH parametrelerinin etkileri incelenmiştir. Enzim elektrodunun amperometrik cevapları doğrultusunda elde edilen lineer çalışma aralığı 0,1–0,5 mM kolesterol olarak belirlenmiştir. Enzim elektrodunun 2 hafta boyunca kararlı kaldığı gözlenmiştir. Michaelis-Menten sabiti, 0,62 mM, aktivasyon enerjisi $20,6 \text{ kcalmol}^{-1}$ bulunmuştur (Özer, 2007).

M. S. Çelebi ve çalışma grubu tarafından, sabit poansiyelde elektroliz işlemi sonucunda polivinilferrosen ile kaplanan platin elektrodu kullanarak Hg^{2+} iyonlarının tayini için yeni bir elektrot geliştirilmiştir. $\text{PVF}^+\text{ClO}_4^-$ film kaplı elektrot Cl^- iyonu içeren çözelti içerisinde iyon değişim prosesi sonucunda PVF^+Cl^- şeklinde modifiye edilmiştir. Daha sonra bu modifiye elektrot Hg^{2+} çözeltine yerleştirilerek Hg^{2+} iyonlarının adsorpsiyon ve Cl^- iyonu ile kompleksleşme reaksiyonu sonucunda polimer

matrikse tutunması sağlanmıştır. Hg^{2+} indirgenmesinden sonra, Hg^{2+} tayini diferansiyel puls sıyırma voltametrisi ile yapılmıştır. Hazırlanan elektrot ile Hg^{2+} tayini, 5×10^{-10} M Hg^{2+} konsantrasyonuna kadar gözlemlendiği daha düşük konsantrasyonlarda pik akımlarında önemli bir değişimin olmadığı ve bağıl standart sapmanın 1×10^{-6} M konsantrasyonda % 6,35 olduğu bulunmuştur. Ayrıca, Ag^+ , Pb^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarıyla girişim çalışmaları yapılmıştır (Çelebi, 2009).

6.3. Metal Taneciklerinin Kullanıldığı Elektrotlar ile İlgili Kaynak Araştırması

M. Kavanoz ve çalışma grubu tarafından, modifiye camı karbon elektrot kullanılarak anodik sıyırma voltametrisi ile klorür iyonları içeren bir çözelti ortamında altın tayini yapılmıştır. Modifiye elektrot, platin elektrodun metilen klorür içerisindeki polivinilferrosen polimer çözeltisine bekletilmesi ve metilen klorürün buharlaşması sonucunda elde edilmesiyle hazırlanmıştır. Çalışmada, Au(III) iyonları içeren çözeltide bekletilmesi esnasında altın iyonları polimer kaplı camı karbon elektrot yüzeyinde metalik altına indirgenerek biriktiği ve potansiyel uygulamaksızın gerçekleşen bu kimyasal indirgenme reaksiyonu voltametrik olarak gösterilmiştir. Voltametrik sonuçlara göre, Au(III) iyonları ile polivinilferrosen arasında gerçekleşen reaksiyonda, altın iyonları indirgenirken polivinilferrosenin yükseltgenmiş forma geçtiği gösterilmiştir (Kavanoz, 2004).

M. T. Sulak ve çalışma grubu tarafından glikoz tayini için iki farklı enzim biyosensörü hazırlanmış ve performansları karşılaştırılmıştır. Bu iki farklı enzim biyosensöründe glikoz oksidaz enzimi birincisinde polivinilferrosen kaplı platin elektrot (PVF-GOD) yüzeyine, ikincisinde ise polivinilferrosen ile kaplı film üzerine altın biriktirilmesiyle hazırlanan modifiye elektrot yüzeyine immobilize edilerek (PVF-Au-GOD) hazırlanmıştır. PVF-Au-GOD elektrodu, polivinilferrosen kaplı platin elektrodun her hangi bir potansiyel uygulamadan altın çözeltisinde bekletilerek altın ile polivinilferrosenin etkileşmesi sonucunda altının indirgenmesiyle elektrot yüzeyinde birikmesine dayanarak hazırlanmıştır. Enzim elektrotlarının amperometrik cevapları enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan H_2O_2 'in elektrokimyasal yükseltgenmesine dayanarak elde edilmiştir. Hazırlanan iki elektrot karşılaştırıldığında, PVF-Au-GOD olarak tanımlanan elektrot PVF-GOD olarak tanımlanan elektroda göre maksimum akım değerinde 6,6 kat, duyarlılığı 3,8 kat, lineer çalışma aralığında ise 1,6 kat büyük

olarak gözlenmiştir. Biyosensörlerin akım cevaplarına uygulama potansiyeli, polimer film kalınlığı, immobilize enzim miktarı, pH, sıcaklık, biriktirilen altın miktarı ve substrat konsantrasyonu parametrelerinin etkileri incelenmiştir. Ayrıca, hazırlanan enzim elektrotları ile girişim, kararlılık ve gerçek numune çalışmaları da yapılmıştır. Michaelis-Menten sabiti, PVF-GOD elektrodu için 20,38 mM, PVF-Au-GOD elektrodu için 30,40 mM, aktivasyon enerjisi ise PVF-GOD elektrodu için 24,05 kJmol⁻¹, PVF-Au-GOD elektrodu için 24,89 kJmol⁻¹ olarak bulunmuştur (Sulak, 2006).

Y. Zou ve çalışma grubu tarafından çok katlı karbon nanotüpler içerisine platin nanopartiküllerinin elektrokimyasal olarak biriktirilmesine dayanan glikoz biyosensörleri hazırlanmıştır. Modifiye elektrot, camı karbon elektrot yüzeyinin dimetilformamid çözücüsü içerisindeki karbon nanotüplerin süspansiyonundan damlatılması ve çözücünün infarered lambası altında buharlaştırılmasından sonra 0,1 M HCl içeren 10 mM H₂PtCl₆ çözeltisinde 5 dakika boyunca -0,2 V sabit potansiyel uygulanarak platin nanopartiküllerinin biriktirilmesiyle hazırlanmıştır. Sonra, modifiye elektrot yüzeyine fosfat tamponu içerisindeki glikoz oksidaz çözeltisi ve kitosan-SiO₂ sol-gel karışımının damlatılmasıyla glikoz oksidaz immobilizasyonu sağlanmıştır. Son olarak elektrot yüzeyi koruyucu film görevi üstlenmesi için nasyon ile kaplanmıştır. Hazırlanan biyosensörün yüksek elektrokatalitik aktivite ve kararlılığa sahip olduğu ifade edilmiştir. Lineer çalışma aralığı 1 µM – 23 mM, gözlenebilirlik sınırı 1 µM olarak belirlenmiştir (Zou, 2008).

S. Chakraborty ve çalışma grubu tarafından, H₂O₂'in amperometrik tayini için elektron aracı ve enzim kullanmaksızın platin nanopartikülleri ile desteklenen yüksek seçicilikte bir elektrot hazırlanmıştır. Bu elektrot hazırlanması, ilk olarak poli(dialildimetilamonyum)klorür (PDDA) polimerinin camı karbon yüzeyine çözücüsünün buharlaşması sonucunda kaplanması, ikinci basamakta ise polimer film kaplı elektrodun H₂PtCl₆ çözeltisi içerisinde bir süre bekletilerek platin nanopartiküllerinin kimyasal indirgenme yoluyla elektrot üzerine birikmesiyle gerçekleşmiştir. Platin nanopartikülleri biriktirilmiş polimer film yüzeyi alan emisyon taramalı elektron mikroskopi, X-ray kırınımı, spektral ve elektrokimyasal ölçümleri ile karakterize edilmiştir. Elektrot yüzeyindeki platin nanopartiküllerinin ortalama boyutu 17 nm olarak belirlenmiştir. Platin nanopartiküllerinin H₂O₂'in yükseltgenmesine çok iyi elektrokatalitik aktivite gösterdiği ve platin elektroda göre yükseltgenmenin daha düşük potansiyelde gerçekleştiği gözlenmiştir. Hazırlanan bu elektrot, platin elektrodun

akisine, çözelti içerisindeki yüzey oksitleri ve diğer türlerin aktivasyon engelleyici etkisinden etkilenmemiştir. Platin nanopartikül biriktirilerek hazırlanan bu elektrodun duyarlılığı $9,15 \mu\text{AmM}^{-1}$ ve linner cevabının üst limiti 3 mM olarak belirlenmiştir (Chakraborty, 2009).

S. Liu ve çalışma grubu tarafından elektrokimyasal bir yöntem kullanmaksızın altın nanopartikülleri ile modifiye ettikleri bir DNA biyosensörü geliştirilmiştir. Elektrot yüzeyinde altın nanopartiküllerinin biriktirilmesi, altın elektrot ve polielektrolit çoklu tabaka ile kaplı altın elektrodun HAuCl_4 çözeltisinde bekletilmesi ile hazırlanmıştır. Çözelti içerisine elektrolit katkısı yapması amacıyla KNO_3 ilave edilmiştir. Altın nanopartikülleri ile modifiye edilen elektrodun morfolojisi farklı HAuCl_4 konsantrasyonlarında ve farklı biriktirme sürelerinde incelenmiştir. Altın nanopartikülleri ile modifiye edilen elektrot üzerine DNA immobilizasyonu ile hazırlanan biyosensör dönüşümlü voltametri ve diferansiyel puls voltametrisi ile karakterize edilmiştir. Elektrodun gözlenebilme sınırı 1×10^{-11} M olarak bulunmuştur (Liu, 2010).

7. MATERYAL VE METOT

7.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Ksantin oksidaz (EC 1.17.3.2, Fluka) ve ksantin (Fluka) çözeltilerinin hazırlanmasında ve deneysel çalışmaların yapıldığı ölçüm ortamında kullanılan tampon çözelti NaH_2PO_4 (Merck) ve NaOH (Merck) kimyasal maddeleri ile hazırlanmış ve çözeltiler hazırlanırken ultra saf su kullanılmıştır. Tampon çözeltisinin pH'ı istenilen değere ayarlanırken H_3PO_4 (Merck) ve NaOH (Merck) kimyasal maddelerinden hazırlanan çözeltiler kullanılmıştır.

Deneysel çalışma boyunca hazırlanan enzim biyosensörlerinde kullanılan ksantin oksidaz enzimi (Fluka), pH 7,4 olan 0,01 M fosfat tampon çözeltisi içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Ksantin oksidaz çözeltisi seri çalışmalar için günlük olarak hazırlanmış ve çalışmalar boyunca $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

Farklı konsantrasyonlardaki substrat çözeltileri, belirli miktarlarda tartılan ksantin (Sigma) maddesinin 0,1 M NaOH çözeltisi ile çözünmesi sağlanmış ve daha sonra pH'ı 7,4 olan 0,1 M fosfat tamponu ile kullanılarak hazırlanmıştır.

Altın biriktirilerek hazırlanan ksantin oksidaz biyosensörlerinde kullanılan potasyumtetrakloroaurat çözeltisi, KAuCl_4 (Aldrich) maddesinin 0,01 M KCl (Merck) çözeltisinde çözülmesi ile hazırlanmıştır.

Platin biriktirilerek hazırlanan ksantin oksidaz biyosensörlerinde kullanılan platin bromür stok çözeltisi, 50 mg PtBr_2 (Aldrich) kimyasal maddesinin 15 mL ultra saf su ve 15 mL % 47'lik HBr kullanılarak çözülmesi ile hazırlanmıştır.

Sabit potansiyel elektrokimyasal biriktirme yöntemi ile hazırlanan platin biriktirilmiş ksantin oksidaz biyosensörlerinde kullanılan hekzakloroplatinik asit çözeltisi $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Alfa Easer) katısının 0,5 M HCl çözeltisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Daldırıp-kurutma metodu ile hazırlanan ksantin oksidaz biyosensörlerinde elektrodun polimer film ile kaplanmasında kullanılan polivinilferrosen çözeltisi, polivinilferrosenin metilen klorürde çözülmesi ile hazırlanmıştır.

Polivinilferrosenin sabit potansiyelde elektrokimyasal çöktürme yoluyla kaplanmasında kullanılan polivinilferrosen çözeltisi, polivinilferrosenin 0,1 M tetrabutilamonyum perklorat (TBAP) içeren metilen klorürde çözülmesi ile hazırlanmıştır.

Tetrabutilamonyum perklorat, perklorik asitin (Merck) tetra-n-butilamonyum hidroksit (BDH) ile reaksiyonundan elde edilmiştir. Destek elektrolit tuzu 1:9 oranında su-etil alkol karışımında kristallendirilerek yüksek vakum altında 120 °C’ de 12 saat kurutulduktan sonra azot atmosferinde saklanmıştır.

Deneysel çalışmalarda kullanılan, polivinilferrosen çözeltisinin hazırlanmasında çözücü olarak kullanılan metilen klorür, sırasıyla H₂SO₄ (Merck), ultra saf su, %5’lik Na₂CO₃ (Merck) ve tekrar ultra saf su ile yıkanmış ve daha sonra CaCl₂ eklenerek ön destilasyon işlemi yapılmıştır. Son olarak, P₂O₅ üzerinden iki defa distilasyon işlemi kullanılarak arıtılmıştır.

Gerçek numune analizlerinde kullanılan teokap adlı ilaç için 1 tablet kullanılmış ve 0,111 M’lık çözeltisinden, aminocardol adlı ilaç için ise 1 ampül kullanılmış ve 0,114 M’lık çözeltisinden yararlanılmıştır.

Girişim çalışmaları, belirli konsantrasyonlarda hazırlanan ürik asit (Alfa Easer) ve askorbik asit (Alfa Easer) çözeltileri ile yapılmış ve bu maddelerden kaynaklanan girişimlerin giderilmesinde % 5’lik nasyon (Aldrich) çözeltisi kullanılmıştır.

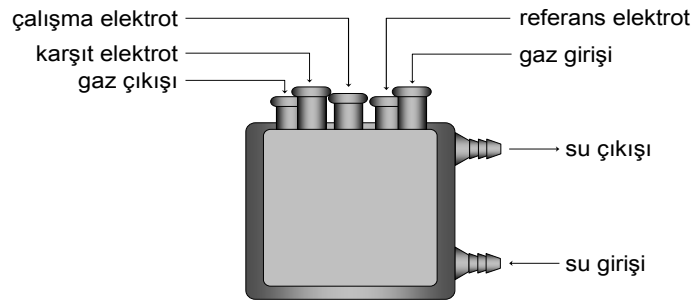
7.1.1. Vinilferrosen’in kimyasal polimerizasyonu

Polimerizasyon için Carius tüpü kullanılmıştır. 4,24 g vinilferrosen (Aldrich), 5,00 mL benzen ve katalizör olarak 0,0328 g AIBN (azobisisobutironitril) azot atmosferinde Carius tüpüne konulmuştur. Elde edilen çözelti birkaç kez sıvı azotta dondurulup eritilerek gazsızlaştırılmış ve benzen ortamdan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra tüp vakumda kapatılarak 70°C’de 24 saat süre ile polimerizasyon yapılmıştır. Tüpün ağız kısmı kırılmış ve PVF destile benzende çözülerek dışarı alınmıştır. Çözelti, içinde saf metil alkol bulunan behere aktarılarak PVF çöktürülmüştür. Birkaç kez benzende çözme ve metil alkolde çöktürme işlemleri tekrarlanmıştır. Elde edilen çökelek süzülerek ayrılmış ve vakum etüvünde 24 saat 60 °C’de

kurutulmuştur (Smith, 1976). Çalışmalar boyunca, A. Gülce ve grubunun hazırlamış olduğu PVF polimerinden faydalanılmıştır.

7.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Hücre ve Elektrotlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan cam hücre, sıcaklık kontrolünün sağlanması için çift çeperli olarak tasarlanmış olup, çalışma elektrodunun, referans elektrodunun, karşıt elektrodunun, gaz giriş borusunun ve gaz çıkış borusunun yerleştirildiği beş rodajlı girişe sahiptir (Şekil 7.1).



Şekil 7.1. Deneysel çalışmaların yapıldığı cam hücre

Deneysel çalışmalar boyunca ksantin analizinde kullandığımız üçlü elektrot sisteminde çalışma elektrotu olarak $0,0314 \text{ cm}^2$ yüzey alanında platin disk elektrot, referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot ve karşıt elektrot olarak platin spiral tel elektrot kullanılmıştır. Polivinilferrosenin sabit potansiyelde elektrokimyasal çöktürme yoluyla kaplanması işleminde referans elektrot olarak susuz Ag/AgCl elektrodu kullanılmıştır. Platin disk çalışma elektrodu her çalışmadan önce sırasıyla $1 \mu\text{m}$, $0,3 \mu\text{m}$, $0,05 \mu\text{m}$ tanecik boyutuna sahip alümina tozu ile temizlenmiş ve sonra elektroda ultrasonik banyoda 10 dakika boyunca sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Son olarak, çalışma elektrodu sırasıyla distile su ve metilen klorür çözücüsü ile yıkanıp kurutulduktan sonra kullanılmıştır.

7.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Çalışmalarda potansiyostat olarak CHI marka (660C model) bir elektrokimyasal analizör kullanılmıştır. Harici sirkülasyonlu su banyosu olarak Nüve marka (BM402

model) su banyosu, pH ölçümlerinde WTW marka (pH/ion/cond 750 model) pH metre, çalışma elektrotların temizlenmesinde Branson marka (1510-MTH model) ultrasonik banyo, karıştırıcı olarak Precise marka (SH-3 model) manyetik karıştırıcı kullanılmıştır. SEM görüntüleri Zeiss marka (EVO-LS10 model) taramalı elektron mikroskopunda 5×10^{-7} atm'lik vakum altında LaB 6 (Lantanum heksaborit) lamba kullanılarak alınmıştır.

7.4. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler

7.4.1. Gerilim kontrollü kulometri

Gerilim kontrollü kulometri yöntemi, bir elektrokimyasal hücredeki elektroliz edilen elektroaktif madde veya maddelerin miktarının harcanan elektrik yükü miktarıyla doğru orantılı olmasına dayanmaktadır.

Gerilim kontrollü kulometri yöntemi ile elektrot yüzeyindeki tek bir maddenin indirgenmesi ya da yükseltgenmesi sonucunda gerçekleşen elektrolizde harcanan elektrik yükü (7.1) eşitliği ile gösterilmektedir.

$$Q_{\infty} = \int_0^{\infty} i \, dt = n F N \quad (7.1)$$

Eşitlikte, i , akımı (amper), t , elektroliz süresini, n , aktarılan elektron mol sayısını, F faraday sabitini, N , elektroliz olan maddenin mol sayısını, Q ise N mol maddenin yükseltgenmesi ya da indirgenmesi sırasında harcanan toplam elektrik yük miktarı (Coulomb) göstermektedir (Bard, 2001).

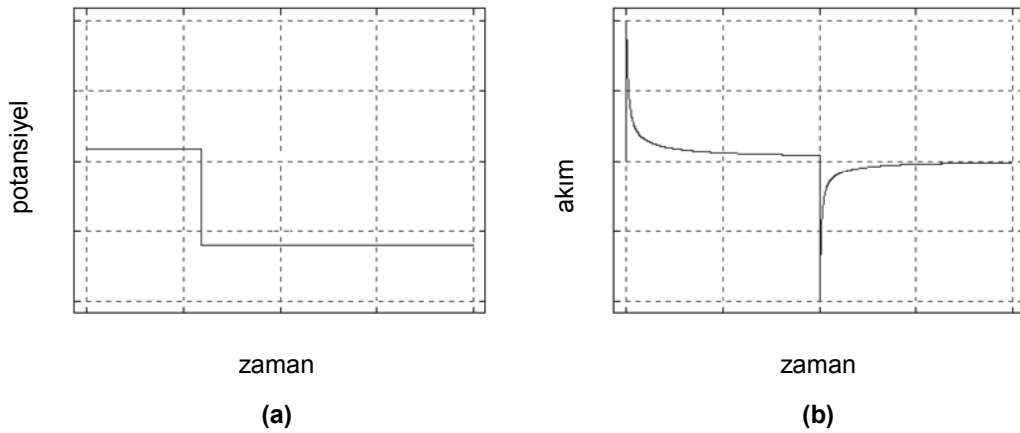
Deneysel çalışmalarda, platin çalışma elektrodunun $PVF^+ClO_4^-$ filmi ile elektrokimyasal çöktürme yoluyla kaplanmasında ve $PVF^+ClO_4^-$ polimer film üzerine platinin biriktirilmesinde gerilim kontrollü kulometri yönetimi kullanılmıştır.

7.4.2. Kronoamperometri

Bu yöntemde, çalışma elektrodu ile referans elektrot arasına uygulanan sabit potansiyel sonrasında sistemin termodinamik dengesi değişmekte ve elektrodun bulunduğu ortamda tayin edilecek maddenin, elektrot yüzeyinde indirgenmesi veya

yükseltgenmesi sonucu bir akım oluşmaktadır. Amperometrenin esası oluşan bu akımın ölçülmesine dayanmaktadır. Bu sistemde oluşan akım miktarı, difüzyon hızına, madde moleküllerinin elektrot yüzeyine ve dolayısıyla da çözelti içindeki derişime bağlıdır. Amperometrik yöntemin kullanıldığı biyosensör uygulamalarında elektrot seçimliliği ve duyarlılığı büyük ölçüde biyokatalizörün elektrot yüzeyinde tutuklanmasına bağlıdır.

Durgun bir çözeltide çalışma elektrodu ile karşılaştırma elektrodu arasında incelenen sistemin voltamogramında plato bölgesinde sabit bir gerilim değeri uygulandığında basit elektrot reaksiyonu için zamanın karekökü ile azalan bir akım oluşmaktadır. Uygulanan sabit bir gerilimde akımın zamanla değişiminin ölçüldüğü bu yöntem kronoamperometri olarak adlandırılır. Kronoamperometrik çalışmalarda, çalışma elektroduna uygulanan etki sabit bir gerilim basamağı uyarmasıdır (Şekil 7.2(a)). Başlangıçta çalışma elektrodunun gerilimi pozitifdir. $t=0$ anında çalışma elektrodunun gerilimi elektrot yüzeyinde tepkiyen derişimini bir anda sıfıra götürecek ölçüde negatif olan bir E_{son} değerine atlatılmaktadır. Sistemin bu uyarıya cevabı zamana bağlı olarak değişen bir akımdır (Şekil 7.2(b)).



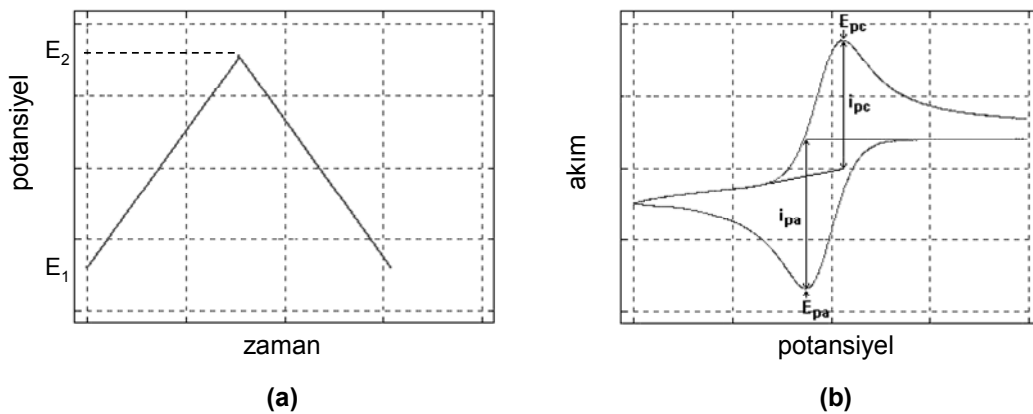
Şekil 7.2. (a) kronoamperometrik uyarı, (b) kronoamperometrik cevap

Deneyisel çalışmalarda, tasarlanan her bir biyosensör daha önceden tespit edilmiş uygulama potansiyelinde kararlı hal akım eğrisi elde edilene kadar elektroliz yapılmıştır. Kararlı hal akım değerine ulaşıldıktan sonra ortama konsantrasyonu belirli ksantin çözeltisinden belirli miktarlarda eklenerek amperometrik akım cevapları kaydedilmiştir. Ortama her bir substrat ilavesinden sonra meydana gelen akım

değişiminin kararlı hal akım değerine ulaştığı gözlemlendikten sonra diğer substrat eklemesi yapılmıştır.

7.4.3. Dönüşümlü voltametri

Dönüşümlü voltametri yönteminde karşıt elektroduna göre çalışma elektrodunun geriliminin belirli bir gerilim programına uyacak şekilde değiştirilmesi esas alınmaktadır. Gerilim taraması bir başlangıç gerilimi (E_1) değerinden başlar. Zamanla doğrusal olarak değişen ileri yöndeki gerilim taraması belirli bir gerilim değerine (E_2) ulaştıktan sonra tarama yönü ters çevrilir. Yeniden başlangıç gerilim değerine ulaşıldığında gerilim taraması tamamlanır. İleri ve geri yöndeki gerilim tarama hızı aynı olmakla birlikte istenildiğinde farklı gerilim tarama hızları da uygulanabilir. İleri yöndeki gerilim taraması sırasında çalışma ve karşıt elektrotlar arasında geçen akım kaydedilirse pik şeklinde bir akım-gerilim eğrisi elde edilir. Bu pik çözeltideki elektroaktif maddenin yükseltgenmesine (ya da indirgenmesine) aittir. Gerilim tarama yönü ters çevrildiğinde yükseltgenmiş elektroaktif türün yeniden indirgenmesine (ya da yükseltgenmesine) karşı gelen bir geri pik gözlenir. Gerilim programı ard arda uygulandığında ise çok döngülü dönüşümlü voltamogram elde edilir. Bu yöntemde voltametrik uyarma sinyali ve tersinir bir elektroyükseltgenme sistemi için elde edilen dönüşümlü voltamogram Şekil 7.3'de gösterilmiştir. Şekil 7.3(b)'de verilen bir dönüşümlü voltamogramda, E_{pc} , katodik pik potansiyelini, E_{pa} , anodik pik potansiyelini, i_{pc} , katodik pik akımını ve i_{pa} , anodik pik akımını göstermektedir.



Şekil 7.3. (a) Voltamogramın elde edilmesinde kullanılan dönüşümlü voltametrik uyarma sinyali
(b) Tersinir bir elektrokimyasal reaksiyon için elde edilen dönüşümlü voltamogram

Tersinir bir sistem için dönüşümlü voltamogramda anodik ve katodik pik akımları birbirine eşittir. Ayrıca bu piklerin gerilimleri E_{pa} ve E_{pk} ile gösterilirse 25 °C’de voltametrik yarı dalga gerilimi, $E_{1/2}$, ile bu yöntemde ölçülen pik gerilimleri arasında

$$E_{pa} = E_{1/2} + \frac{0,029}{n} \quad (7.2)$$

$$E_{pk} = E_{1/2} - \frac{0,029}{n} \quad (7.3)$$

eşitlikleri yazılabilir. Anodik ve katodik pikler arasındaki gerilim farkı (7.4) eşitliği ile verilebilir.

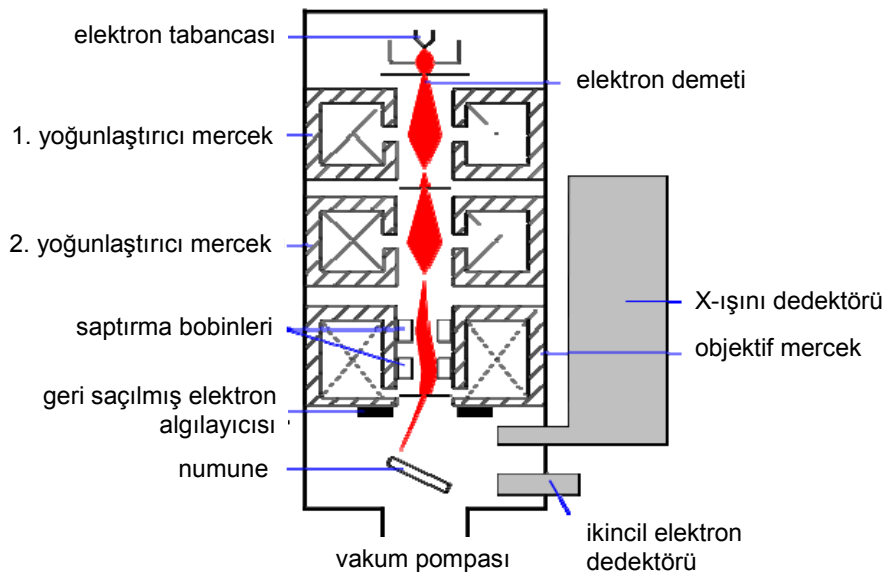
$$E_{pa} - E_{pk} = \frac{0,058}{n} \quad (7.4)$$

Deneyisel çalışmalarda, tasarlanan her bir biyosensörün çalışma şartları optimize edildikten sonra voltametrik davranışları dönüşümlü voltametri yöntemi ile belirli bir aralıkta potansiyel taraması yapılarak incelenmiş ve kararlı akım eğrisi elde edildikten sonra belirli konsantrasyonlarda ksantin çözeltisi eklenerek elde edilen voltamogramlar kaydedilmiştir.

7.4.4. Taramalı elektron mikroskobu

Taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM), elektron demetinin incelenen örneğin yüzeyi ile yaptığı fiziksel etkileşmelerin (elastik, elastik olmayan çarpışmalar ve diğerleri) sonucunda ortaya çıkan sinyallerin toplanması ve incelenmesi prensibine dayanarak görüntü elde eden elektrooptik prensipler kapsamında tasarlanmış bir cihazdır. Taramalı Elektron Mikroskobu, birçok dalda araştırma-geliştirme çalışmalarında kullanımının yanında, mikro elektronikte yonga üretiminde, sanayinin değişik kollarında hata analizlerinde, biyolojik bilimlerde, tıp ve kriminal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Taramalı elektron mikroskopunda görüntü, yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların numune üzerine odaklanması, bu elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ve sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla elde edilir. Modern sistemlerde bu algılayıcılardan gelen sinyaller dijital sinyallere çevrilip bilgisayar monitörüne verilmektedir. Gerek ayırım gücü, gerek odak derinliği gerekse görüntü ve analizi birleştirebilme özelliği, taramalı elektron mikroskopunun kullanım alanını genişletmektedir.



Şekil 7.4. Taramalı elektron mikroskopunun şematik görünüşü

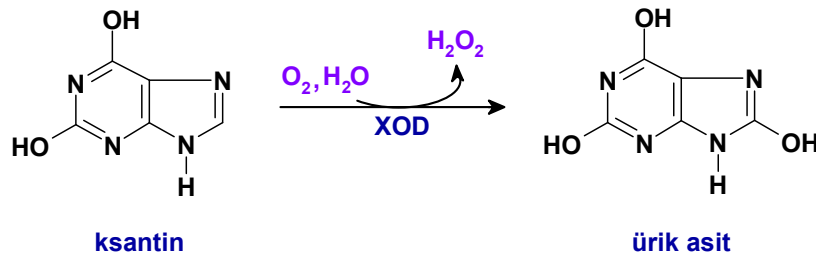
Taramalı elektron mikroskobu, optik kolon, numune hücresi ve görüntüleme sistemi olmak üzere üç temel kısımdan oluşmaktadır (Şekil 7.4). Optik kolon kısmında; elektron demetinin kaynağı olan elektron tabancası, elektronları numuneye doğru hızlandırmak için yüksek gerilimin uygulandığı anot plakası, ince elektron demeti elde etmek için yoğunlaştırıcı mercekler, demeti numune üzerinde odaklamak için objektif merceği, bu merceğe bağlı çeşitli çapta apatürler ve elektron demetinin numune yüzeyini taraması için tarama bobinleri yer almaktadır. Mercek sistemleri elektromanyetik alan ile elektron demetini inceltmekte veya numune üzerine odaklamaktadır. Tüm optik kolon ve numune 10^{-4} Pa gibi bir vakumda tutulmaktadır. Görüntü sisteminde, elektron demeti ile numune girişimi sonucunda oluşan

çeşitli elektron ve ışımaları toplayan dedektörler, bunların sinyal çoğaltıcıları ve numune yüzeyinde elektron demetini görüntü ekranıyla senkronize tarayan manyetik bobinler bulunmaktadır.

Deneysel çalışmalarda tasarlanan beş farklı ksantin oksidaz biyosensörün hazırlanmasında polimer film oluşturma, metal biriktirme ve enzim immobilizasyonu gibi her bir basamaktan sonra SEM görüntüleri alınmıştır. SEM görüntüleri için Delta marka (CG-50IN-CUV model) indium kalay oksit (ITO) elektrotlar kullanılmış ve her bir işlem basamağı için daha önceden optimize edilen şartlarda çalışmalar yapılmıştır.

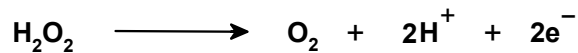
7.5. Ksantin Oksidaz Biyosensörlerinin Hazırlanması ve İşleyişi

Deneysel çalışmada 5 farklı ksantin oksidaz biyosensörü hazırlanmış ve bu biyosensörler kullanılarak elde edilen amperometrik cevaplar yardımıyla ksantin tayini yapılmıştır. Hazırlanan her bir biyosensörün işleyişi Şekil 7.5’de gösterilen ksantin oksidaz ile ksantin arasında meydana gelen enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan H_2O_2 ’in yükseltgenme akımının ölçümü üzerinden gerçekleşmektedir.

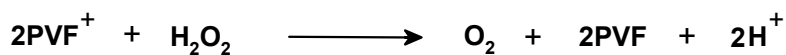


Şekil 7.5. Ksantin oksidaz ile ksantin arasındaki enzimatik reaksiyon

Enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan H_2O_2 ’in yükseltgenmesi, hem sabit potansiyelde elektrokimyasal olarak,

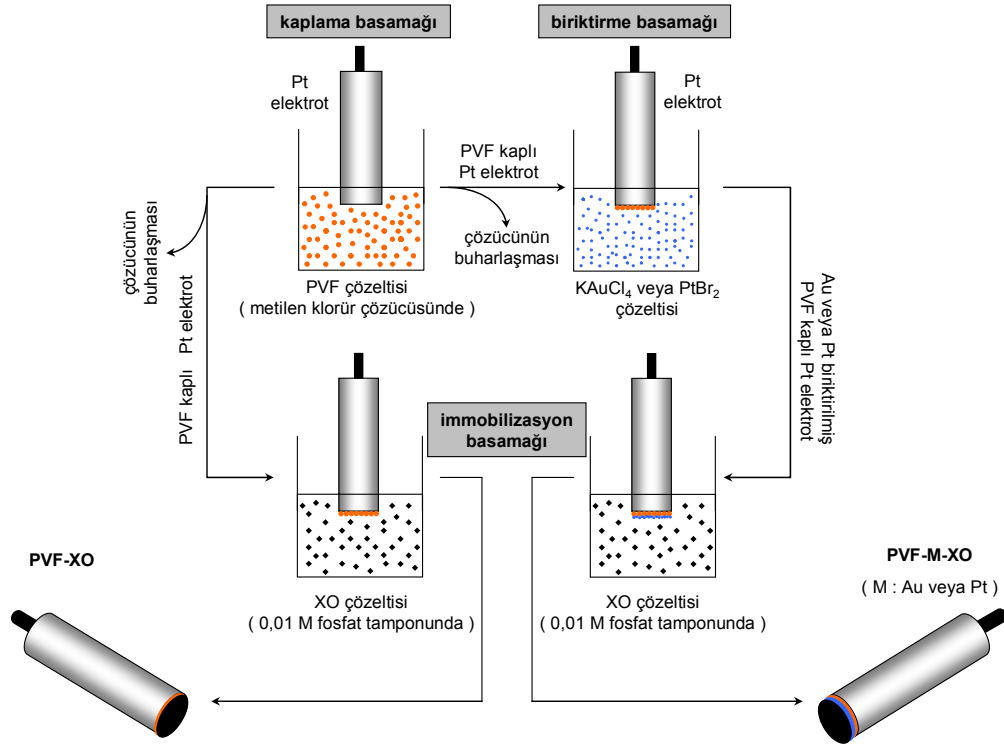


hem de elektrot yüzeyinin kaplandığı polimerdeki PVF^+ merkezlerinin katalitik etkisi ile kimyasal olarak (Gölce, 1995; Hiratsuka, 2005)



şeklinde gerçekleşmektedir.

Ksantin tayini için tasarladığımız biyosensörlerin hazırlanmasında çalışma elektrodu yüzeyine PVF polimeri iki farklı metot kullanılarak kaplanmıştır. Bu metotlardan bir tanesi PVF polimerinin çalışma elektroduna nötral formda kaplandığı daldırıp-kurutma metodudur. Aşağıda, PVF-XO, PVF-Au-XO ve PVF-Pt-XO şeklinde tanımladığımız biyosensörlerin bu metot ile hazırlanışı şematik olarak Şekil 7.6'da gösterilmiş ve her bir basamak hakkında bilgiye yer verilmiştir.



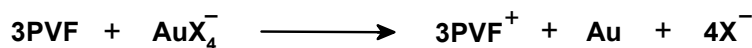
Şekil 7.6. Daldırıp-kurutma metodu ile hazırlanan biyosensörlerin şematik gösterilişi

PVF-XO olarak tanımladığımız enzim elektrodu hazırlanırken, ilk aşamada platin çalışma elektrodu belirli bir konsantrasyondaki polivinilferrosen çözeltisinde bir süre bekletilerek elektrodun polimer film ile kaplanması sağlanmıştır. İkinci aşamada ise polimer film ile kaplanan elektrot belirli konsantrasyondaki enzim çözeltisinde bir süre bekletilerek polimer film yüzeyinde enzimin immobilizasyonu sağlanmıştır. Hazırlanan PVF-XO enzim elektrodu ile uygulama potansiyeli belirlendikten sonra, PVF-XO enzim elektrodunun aktivitesine polimer kaplanmasında kullanılan polivinilferrosen çözeltisinin konsantrasyonu, polivinilferrosen çözeltisinde bekletme süresi, ksantin oksidaz konsantrasyonu, ksantin oksidaz çözeltisinde bekletme süresi, pH değeri ve sıcaklık gibi deneysel parametrelerin etkisi araştırılmıştır.

PVF-Au-XO olarak tanımladığımız ikinci enzim elektrodu da daldırıp-kurutma metodu ile hazırlanmıştır. Kaplamada kullanılan polivinilferrosen konsantrasyonu, polivinilferrosen çözeltisinde bekletme süresi, ksantin oksidaz konsantrasyonu ve ksantin oksidaz çözeltisinde bekletme süresi parametreleri yukarıdaki çalışmada optimize edilerek belirlendikten sonra çalışma elektrodunun polimer film kaplanması ve enzim immobilizasyonu optimum şartlarda yapılmıştır. Çalışma elektrodu polimer film ile kaplandıktan sonra belirli bir konsantrasyondaki KAuCl_4 çözeltisinde bir süre bekletilerek elektrot yüzeyinde altın biriktirilmesi sağlanmıştır. Hazırlanan PVF-Au-XO enzim elektrodu ile uygulama potansiyeli belirlendikten sonra, optimize edilen parametrelerin yanında PVF-Au-XO enzim elektroduna KAuCl_4 çözeltisi konsantrasyonu, KAuCl_4 çözeltisinde bekletme süresi ve sıcaklık etkisi araştırılmıştır.

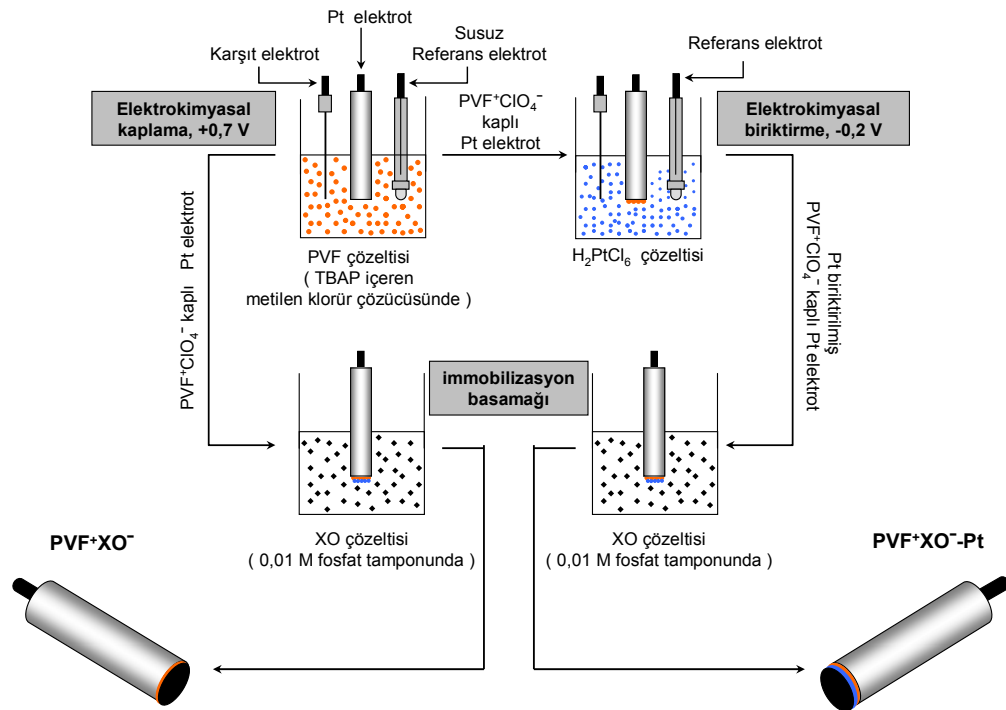
PVF-Pt-XO olarak tanımladığımız üçüncü enzim elektrodu da yukarıda tanımlanan daldırıp-kurutma metodu ile hazırlanmıştır. Polivinilferrosen konsantrasyonu, polivinilferrosen çözeltisinde bekletme süresi, ksantin oksidaz konsantrasyonu ve ksantin oksidaz çözeltisinde bekletme süresi optimizasyon şartlarında sabit tutulmuş olup, polimer film kaplanması ve enzim immobilizasyonu bu şartlarda yapılmıştır. Çalışma elektrodu polimer film kaplandıktan sonra belirli bir konsantrasyondaki PtBr_2 çözeltisinde bir süre bekletilerek elektrot yüzeyinde platin biriktirilmesi sağlanmıştır. Hazırlanan PVF-Pt-XO enzim elektrodu ile uygulama potansiyeli belirlendikten sonra, PVF-Pt-XO enzim elektroduna PtBr_2 çözeltisi konsantrasyonu, PtBr_2 çözeltisinde bekletme süresi ve sıcaklık etkisi araştırılmıştır.

PVF-Au-XO ve PVF-Pt-XO olarak tanımladığımız biyosensörler hazırlanırken PVF kaplı elektrot yüzeyinde altın ve platin metal taneciklerinin biriktirilmesi herhangi bir potansiyel uygulamaksızın kimyasal olarak gerçekleştirilmiştir. KAuCl_4 ve PtBr_2 çözeltileri kullanılarak yapılan işlemde, Au^{+3} ve Pt^{+2} iyonları PVF kaplı elektrot yüzeyinde kimyasal indirgenme yoluyla metalik altın (Au^0) ve metalik platin (Pt^0) olarak biriktirilmiştir. Daha önce yapılan literatür çalışmaları incelendiğinde, Kavanoz ve arkadaşlarının altın tayini için yaptıkları voltametrik çalışmanın sonuçlarına göre Au^{+3} iyonları ile PVF arasında gerçekleşen ve aşağıda gösterilen reaksiyonda PVF yükseltgenmiş forma geçerken altın iyonlarının indirgendiği belirlenmiştir (Kavanoz, 2004).



Sulak ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise PVF kaplı yüzeye kimyasal olarak altın biriktirerek glikoz oksidaz enzimi ile hazırladıkları biyosensörlerin akım cevaplarını hem voltametrik hem de amperometrik olarak gözlemlemiş ve modifiye elektrot yüzeyinde altın taneciklerinin varlığında akım cevaplarında meydana gelen değişimi incelemişlerdir (Sulak, 2006).

PVF kaplanmasında kullanılan ikinci metotda ise çalışma elektrodu polimerin yükseltgenmiş formu olan $PVF^+ClO_4^-$ ile kaplanmıştır. Aşağıda, PVF^+XO^- ve PVF^+XO^- -Pt biyosensörlerinin bu metot kullanılarak hazırlanışı Şekil 7.7’de şematik olarak gösterilmiş ve her bir basamak hakkında bilgiye yer verilmiştir.



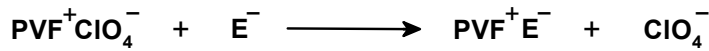
Şekil 7.7. Elektrokimyasal çöktürme metodu ile hazırlanan biyosensörlerin şematik gösterilişi

PVF^+XO^- olarak tanımladığımız dördüncü enzim elektrodunun hazırlanmasında ilk aşama PVF'nin platin çalışma elektrodu yüzeyine elektrokimyasal çöktürme metodu ile kaplanmasıdır. Gerilim kontrollü elektrolizle çalışma elektrodunun polimer film ile kaplanması, 0,1 M TBAP içeren metilen klorürde, $1,0 \text{ mgmL}^{-1}$ PVF çözeltisinin +0,7 V'da ki elektrolizi ile gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada ise, $PVF^+ClO_4^-$ ile kaplanan elektrot belirli konsantrasyondaki enzim çözeltisinde bir süre bekletilerek polimer film yapısında enzimin immobilizasyonu sağlanmıştır. Hazırlanan PVF^+XO^- enzim elektrodu ile uygulama potansiyeli belirlendikten sonra, PVF^+XO^- enzim elektroduna

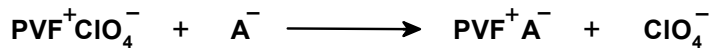
polimer film kalınlığı, ksantin oksidaz konsantrasyonu, ksantin oksidaz çözeltisinde bekletme süresi, pH değeri ve sıcaklık gibi deneysel parametrelerin etkisi araştırılmıştır.

PVF⁺XO⁻-Pt olarak tanımladığımız beşinci enzim elektrodu hazırlanırken ilk aşamada elektrokimyasal çöktürme metodu kullanılarak platin çalışma elektrodu PVF⁺ClO₄⁻ polimer filmi ile kaplanmıştır. İkinci aşamada ise belirli konsantrasyondaki H₂PtCl₆ çözeltisi içerisine yerleştirilen modifiye çalışma elektrodu -0,20 V'da sabit potansiyelde elektroliz edilerek polimer film üzerine platin biriktirilmiştir. Son olarak platin biriktirilmiş polimer film kaplı elektrot belirli konsantrasyondaki enzim çözeltisinde bir süre bekletilerek enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. PVF⁺XO⁻-Pt enzim elektrodun uygulama potansiyeli belirlendikten sonra, elektrodunun platin biriktirme potansiyeli, platin kaplama kalınlığı, H₂PtCl₆ çözeltisi konsantrasyonu ve sıcaklık parametre çalışmaları yapılmış ve bu parametreler optimize edilmiştir.

PVF⁺ClO₄⁻ polimer filmi ile kaplanarak hazırlanan biyosensörlerde enzim immobilizasyon basamağında enzimin polimer film üzerine immobilizasyonu aşağıda verilen reaksiyona göre gerçekleşmektedir.



Bu reaksiyonda, polimer film ile enzim arasındaki etkileşimin gerçekleşebilmesi için immobilizasyon ortam pH değerinin enzimin izoelektrik noktasının üzerinde olması gerekmektedir. Ortamın pH değeri izoelektrik noktanın üzerinde tutularak enzimin negatif yüklü olması sağlanmaktadır. Negatif yüklenen enzim polimer filmdeki ClO₄⁻ iyonları ile yer değiştirerek immobilizasyon gerçekleşmektedir. Bu immobilizasyon yöntemi, daha önce yapılan çalışma sonucunda PVF⁺ClO₄⁻ polimer filminin çözelti ortamında bulunan anyonlar ile aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi



yer değiştirme reaksiyonu vermesinden yararlanılarak geliştirilmiştir (Gölce, 1995).

Çalışma elektrodu olarak yukarıda hazırlanma basamakları verilen XO elektrotları, karşıt elektrot olarak platin spiral elektrot, referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot kullanılarak düzenlenen cam hücre içerisine belirli miktarda fosfat tamponu eklendikten sonra tampon içerisinden oksijen gazı geçirilerek tampon çözeltisinin oksijen ile doymuş hale gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra belirlenen uygulama potansiyelinde kararlı hal akım eğrisi elde edildikten sonra belirli konsantrasyondaki

ksantin çözeltisinden ölçüm ortamına eklemeler yapılarak akım cevapları kaydedilmiştir.

Deneysel çalışmada, hazırlanan her bir XO biyosensörünün farklı çalışma parametrelerinde optimize edilmesinin yanı sıra biyosensörlerin doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, kararlılığı, tekrarlanabilirliği, duyarlılığı, Michaelis-Menten sabiti ve aktivasyon enerjisi belirlenmiştir.

Doğrusal çalışma aralığı ölçüm ortamına eklenen substrat ile akım cevaplarındaki değişimler izlenerek belirlenmiş, substrat konsantrasyonu ile akım cevaplarının lineer bir şekilde değişim gösterdiği aralık olarak tanımlanmıştır. Bu çalışma en az 3 defa tekrarlanarak her bir akım cevabı için standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

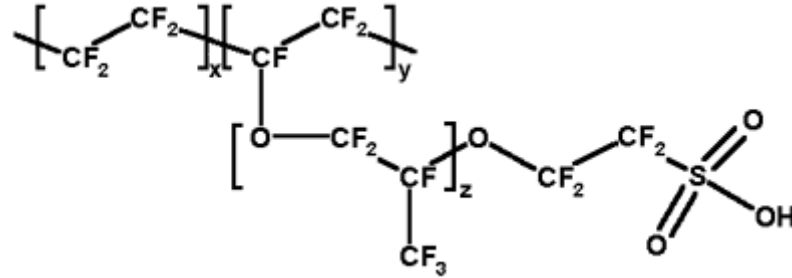
Gözlenebilme sınırı seyreltik substrat çözeltisinin ölçüm ortamına eklenmesi sonucunda akım cevaplarındaki değişimler izlenerek belirlenmiştir. En az 3 defa takrarlanan çalışma sonucunda doğrusal çalışma grafiğinde bulunan akım cevaplarına karşılık gelen konsantrasyon değerleri belirlenmiş ve standart sapması hesaplanmıştır. Bu standart sapma kullanılarak gözlenebilme sınırı ve tayin sınırı bulunmuştur.

Hazırlanan biyosensörlerin tekrarlanabilirlikleri de tanımlanmıştır. Biyosensörlerin tekrarlanabilirliği aynı şartlarda hazırlanan 5 enzim elektrodunun aynı substrat konsantrasyonuna verdiği akım cevapları izlenerek bağıl standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Biyosensörlerin duyarlılığı ise her bir enzim elektrodu için çizilen Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla belirlenmiş, $\mu\text{A mM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ olarak ifade edilmiştir.

Ayrıca, hazırlanan biyosensörler ile gerçek numune ve girişim çalışmaları yapılmıştır. Her bir XO biyosensörü için teokap ve aminocardol adlı ilaçlar kullanılarak gerçek numune çalışmaları yapılmış ve her biyosensörün doğrusal çalışma aralığı dikkate alınarak bu ilaçlardan hazırlanan çözeltilerden uygun hacimlerde kullanılmıştır. Girişim çalışmaları ise ürik asit ve askorbik asit ile yapılmış ve bu maddelerin PVF-XO, PVF-Au-XO ve PVF-Pt-XO biyosensörlerinde girişime neden olduğu tespit edilmiştir. Bu maddelerden kaynaklanan girişimlerin giderilmesinde % 5'lik nafyon çözeltisi kullanılmıştır.

Nafyon, elektrokimyasal uygulamalarda girişim yapan maddelerin girişimlerinin engellenmesi için geliştirilen metotlarda yaygın olarak kullanılan yarı geçirgen anyonik bir polimerdir.



Şekil 7.8. Nafyonun yapısı

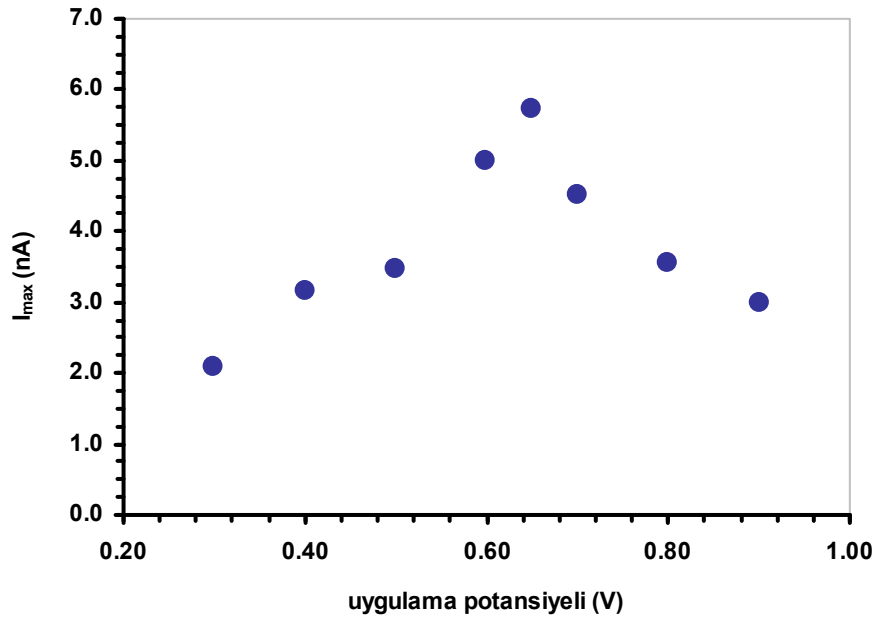
Hidrofobik tetrafloroetilen ana zincire bağlı hidrofilik sülfonat gruplarından oluşan nafyon anyonik yapıların yüzeye tutunmasını engelleyerek askorbik asit ve ürik asit gibi maddelerin geçişini kısıtlarken, hidrojen peroksitin geçişine izin vermektedir (Yuan, 2005).

8. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

8.1. PVF-XO Biyosensörüne Ait Araştırma Sonuçları

8.1.1. Uygulama potansiyelinin etkisi

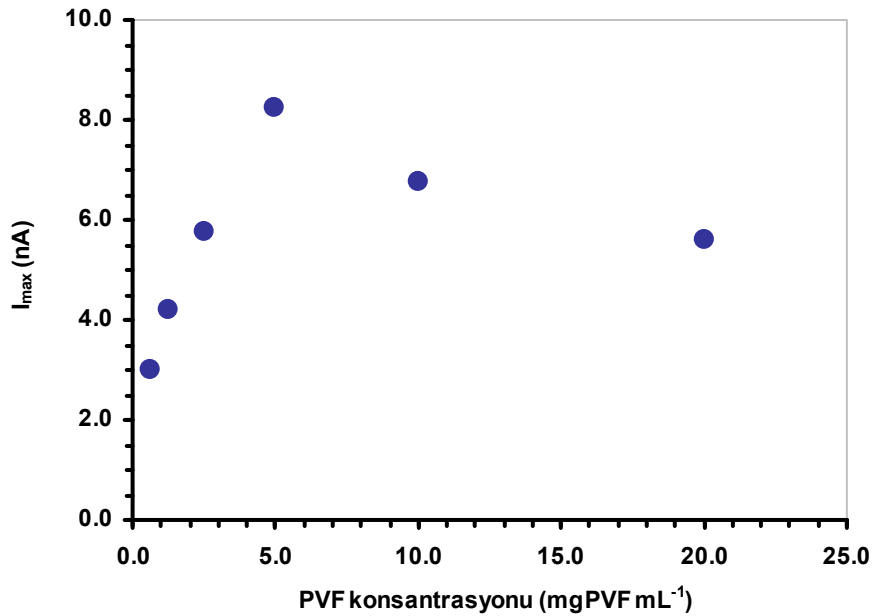
PVF-XO biyosensörüne uygulama potansiyelinin etkisinin incelenmesi amacıyla 0,30-0,90 V potansiyel aralığında çalışmalar yapılmıştır. Uygulama etkisinin araştırılması için yapılan her bir çalışmada kullanılan PVF-XO biyosensörleri, platin çalışma elektrodunun 2,5 mg mL⁻¹ PVF çözeltisinde 5 dakika bekletilmesi ve daha sonra polimer film kaplı çalışma elektrodunun 1,0 mg XO mL⁻¹ enzim çözeltisinde 5 dakika bekletilmesiyle hazırlanmıştır. Belirlenen uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına eklenen ksantin ile hazırlanan PVF-XO biyosensörlerinin akım cevapları izlenmiş ve maksimum akım değerleri bulunmuştur. Her bir uygulama potansiyelinde bulunan maksimum akım değerleri Şekil 8.1'de gösterilmiş ve elektrodun aktivitesinin maksimum olduğu potansiyel değeri 0,65 V olarak belirlenmiştir. PVF-XO biyosensörü üzerine diğer parametrelerin etkileri 0,65 V uygulama potansiyelinde incelenmiştir.



Şekil 8.1. PVF-XO biyosensörüne uygulama potansiyelinin etkisi (2,5 mg PVF mL⁻¹, 1,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 25 °C)

8.1.2. PVF konsantrasyonunun etkisi

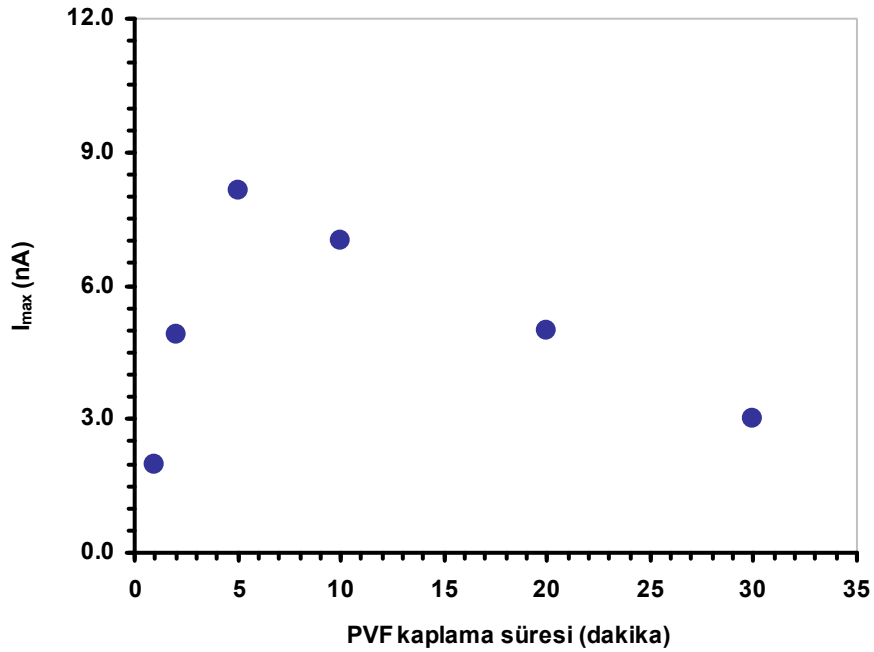
PVF-XO biyosensörü hazırlanırken elektrot yüzeyine kaplanan polimer film kalınlığı polimer çözeltisinin konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Bu bağıllık dolayısıyla, PVF-XO biyosensörüne PVF konsantrasyonunun etkisi $0,625 \text{ mg mL}^{-1}$ ($1,09 \times 10^{-7} \text{ mol PVF cm}^{-2}$)- 20 mg mL^{-1} ($5,52 \times 10^{-7} \text{ mol PVF cm}^{-2}$) aralığındaki PVF çözeltileri kullanılarak çalışmalar yapılmıştır. PVF konsantrasyonunun etkisi araştırılırken her bir çalışmada kullanılan PVF-XO biyosensörleri, platin çalışma elektrodunun farklı konsantrasyonlardaki PVF çözeltisinde 5 dakika ve daha sonra polimer film kaplı çalışma elektrodunun $1,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$ enzim çözeltisinde 5 dakika bekletilmesiyle hazırlanmıştır. $0,65 \text{ V}$ uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan $0,10 \text{ M}$ fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına eklenen ksantin ile hazırlanan PVF-XO biyosensörlerinin akım cevapları izlenmiş ve bulunan maksimum akım değerleri Şekil 8.2'de gösterilmiştir. Grafikte görüldüğü gibi, maksimum akım cevapları $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ($3,75 \times 10^{-7} \text{ mol PVF cm}^{-2}$) PVF konsantrasyonuna kadar artmış daha büyük konsantrasyonlarda ise azalmıştır. Polimer filminin kalınlığı belirli bir değere ulaştıktan sonra polimer film elektrot yüzeyinde difüzyon kısıtlayıcı etki göstererek maksimum akım cevaplarında azalmaya neden olmuştur.



Şekil 8.2. PVF-XO biyosensörüne PVF konsantrasyonunun etkisi ($1,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$, $0,10 \text{ M}$ pH 7,4 fosfat tamponu, $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $0,65 \text{ V}$)

8.1.3. PVF çözeltisinde bekletme süresinin etkisi

Biyosensörün daldırıp-kurutma metodu ile hazırlanmasında incelenmesi gereken parametrelerden bir tanesinde çalışma elektrodunun PVF çözeltisinde bekletme süresidir. PVF çözeltisinde bekletme süresinin araştırılması amacıyla, biyosensörün hazırlama aşamasında çalışma elektrotları $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ PVF çözeltisinde 1-30 dakika aralığındaki farklı sürelerde bekletilerek polimer film kaplanmıştır. Farklı kalınlıklarda polimer film kaplı elektrotlar $1,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$ enzim çözeltisinde 5 dakika bekletilerek enzim immobilizasyonu sağlanarak biyosensörler hazırlanmıştır. Böylece hazırlanan her bir biyosensörün $0,65 \text{ V}$ uygulama potansiyelindeki akım cevapları pH'ı 7,4 olan $0,10 \text{ M}$ fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına eklenen ksantin ile izlenmiş ve maksimum akım değerleri bulunmuştur. Şekil 8.3'de gösterilen maksimum akım cevapları karşılaştırıldığında çalışma elektrodunun PVF çözeltisinde bekletme süresi 5 dakika olarak belirlenmiştir.

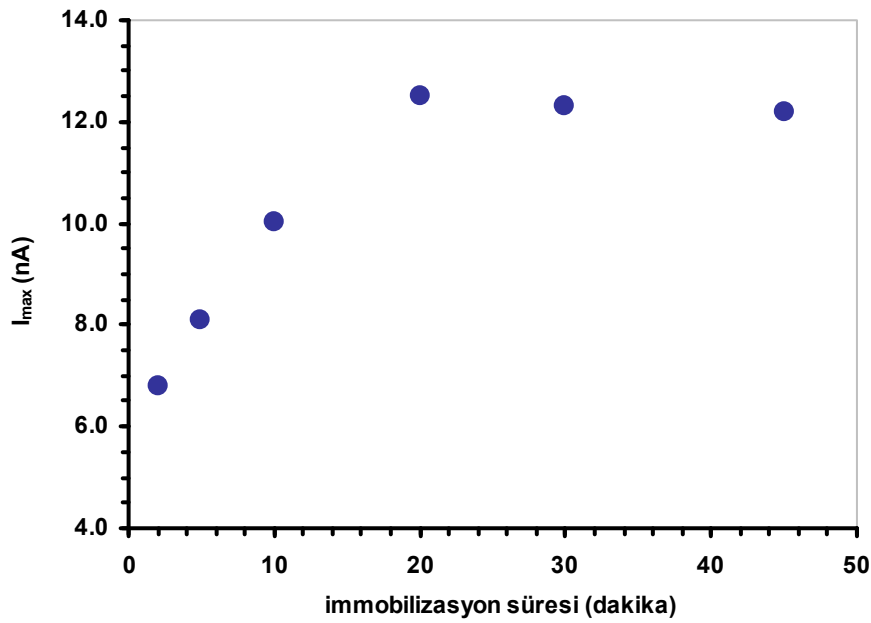


Şekil 8.3. PVF-XO biyosensörüne PVF çözeltisinde bekletme süresinin etkisi ($5,0 \text{ mgPVF mL}^{-1}$, $1,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$, $0,10 \text{ M}$ pH 7,4 fosfat tamponu, $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $0,65 \text{ V}$)

8.1.4. XO çözeltisinde bekletme süresinin etkisi

Polimer film kaplı elektrodun enzim çözeltisinde bekletme süresi 2-45 dakika aralığındaki farklı zamanlarda değiştirilerek hazırlanan PVF-XO biyosensörlerine enzim

çözeltisinde bekletme süresinin etkisi araştırılmıştır. PVF-XO biyosensörleri, çalışma elektrotlarının $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ PVF çözeltisinde 5 dakika bekletilerek polimer film kaplanması ve daha sonra polimer film kaplı elektrotların $1,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$ enzim çözeltisinde belirli bir süre bekletilmesi sonucunda hazırlanmıştır. $0,65 \text{ V}$ uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan $0,10 \text{ M}$ fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına eklenen ksantin ile hazırlanan her bir PVF-XO biyosensörünün akım cevapları izlenmiş ve bulunan maksimum akım değerleri Şekil 8.4'de gösterilmiştir. Polimer matriks içerisine enzim immobilizasyonunun elektrodun enzim çözeltisinde bekletme süresi ile orantılı olduğu düşünüldüğünde, 20 dakika bekletme süresine kadar maksimum akım değerlerinde artış gözlenmiştir. 20 dakikanın üzerindeki bekletme sürelerinde ise akım değerlerinde gözlenen sabit değer polimer matriks içerisine immobilize olan enzim miktarının doygunluk noktasına ulaştığını göstermektedir.

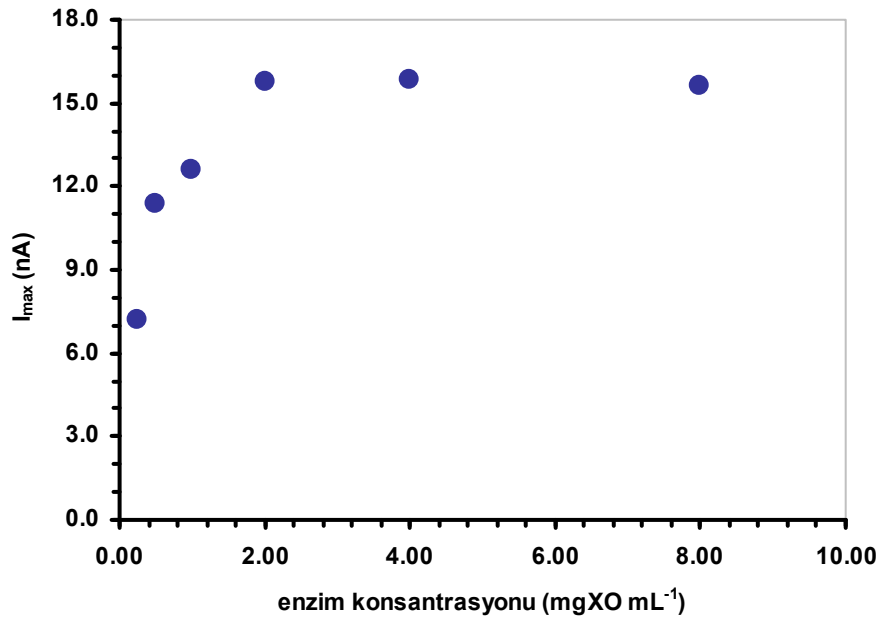


Şekil 8.4. PVF-XO biyosensörüne XO çözeltisinde bekletme süresinin etkisi ($5,0 \text{ mg PVF mL}^{-1}$, $1,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$, $0,10 \text{ M}$ pH 7,4 fosfat tamponu, $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $0,65 \text{ V}$)

8.1.5. XO konsantrasyonunun etkisi

Polimer film kaplı elektrodun enzim immobilizasyonu için bekletildiği enzim çözeltisinin konsantrasyonu $0,25\text{-}8,0 \text{ mg mL}^{-1}$ aralığında değiştirilerek PVF-XO biyosensörüne enzim konsantrasyonunun etkisi araştırılmıştır. PVF-XO biyosensörü, platin çalışma elektrodunun $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ PVF çözeltisinde 5 dakika ve daha sonra

polimer film kaplı çalışma elektrodunun farklı konsantrasyonlardaki enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesiyle hazırlanmıştır. 0,65 V uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına eklenen ksantin ile hazırlanan her bir PVF-XO biyosensörünün akım cevapları izlenmiş ve bulunan maksimum akım değerleri Şekil 8.5'de gösterilmiştir. Maksimum akım değerleri incelendiğinde $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ XO konsantrasyonuna kadar akım artışı gözlenirken, daha sonraki konsantrasyonlarda bir değişim gözlenmemektedir. Polimer film kaplı elektrodu enzim çözeltisinde bekletme süreleri eşit olmasına rağmen, $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ XO konsantrasyonuna kadar olan akım değişimlerinin enzim konsantrasyonlarının farklı olmasından kaynaklanmakta olduğu ve $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ 'dan düşük enzim konsantrasyonlarında belirlenen bekletme süresinde polimer matriks içerisine immobilize olan enzim miktarının daha düşük olduğu düşünülmektedir. $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ 'dan büyük enzim konsantrasyonlarında ise polimer matriks içerisine immobilize olan enzim miktarının doygunluk seviyesine ulaşmasından dolayı akım değerlerinde önemli bir değişim gözlenmemiştir.

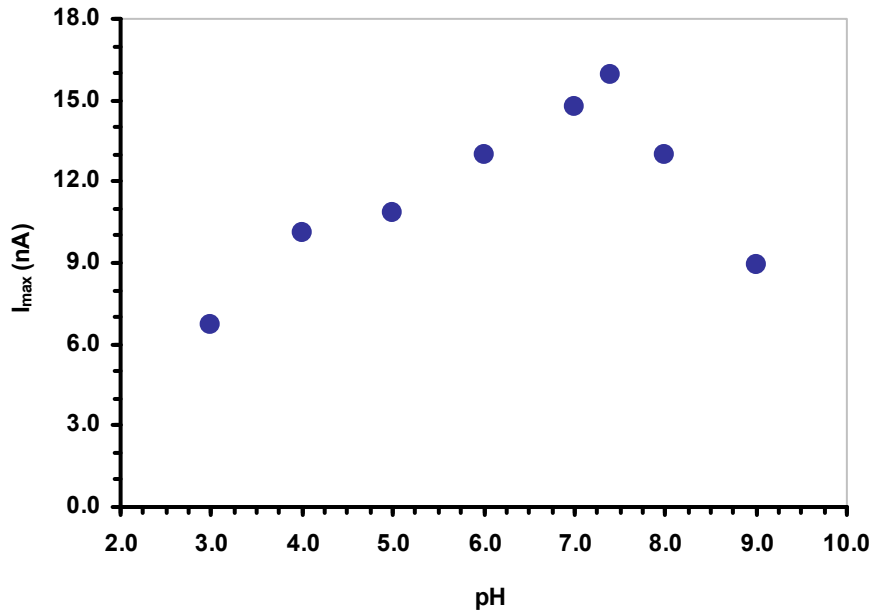


Şekil 8.5. PVF-XO biyosensörüne XO konsantrasyonunun etkisi ($5,0 \text{ mg PVF mL}^{-1}$, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 25°C , 0,65 V)

8.1.6. pH etkisi

0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamının pH değeri 3,0-9,0 aralığında değiştirilerek PVF-XO biyosensörüne pH değerinin etkisi araştırılmıştır.

PVF-XO biyosensörü, çalışma elektrotlarının $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ PVF çözeltisinde 5 dakika bekletilerek polimer film kaplanması ve daha sonra polimer film kaplı elektrotların $2,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesi sonucunda hazırlanmıştır. $0,65 \text{ V}$ uygulama potansiyelinde, PVF-XO biyosensörlerinin akım cevapları farklı pH değerlerindeki $0,10 \text{ M}$ fosfat tamponları ile oluşturulan ölçüm ortamında incelenmiştir. Ölçüm ortamına eklenen ksantin ile PVF-XO biyosensörün akım cevapları izlenmiş ve Şekil 8.6'da gösterilen maksimum akım değerleri bulunmuştur. Maksimum akım değerleri karşılaştırıldığında ölçüm ortamında kullanılan fosfat tamponunun pH değeri $7,4$ olarak belirlenmiştir.

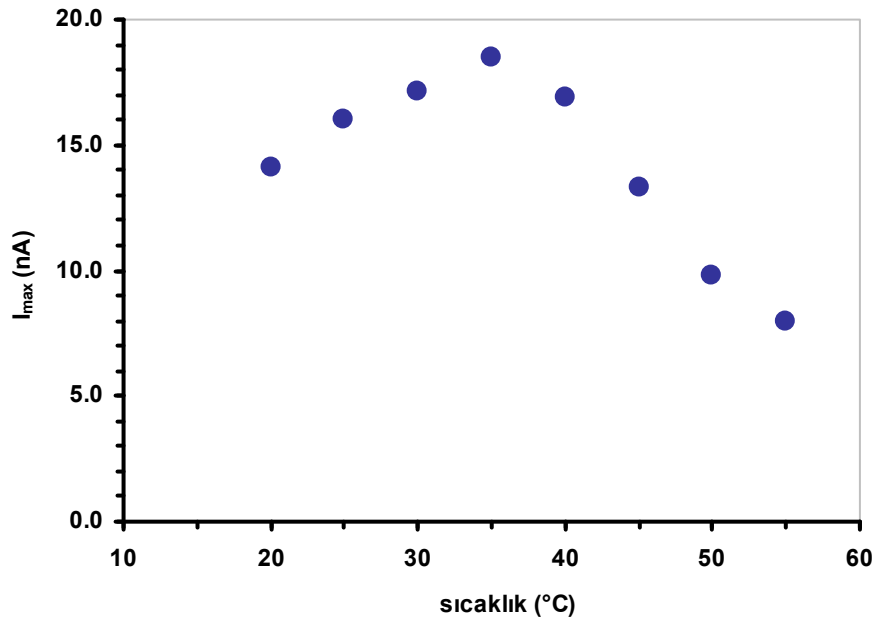


Şekil 8.6. PVF-XO biyosensörüne pH etkisi ($5,0 \text{ mg PVF mL}^{-1}$, $2,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$, $0,10 \text{ M}$ fosfat tamponu, 25°C , $0,65 \text{ V}$)

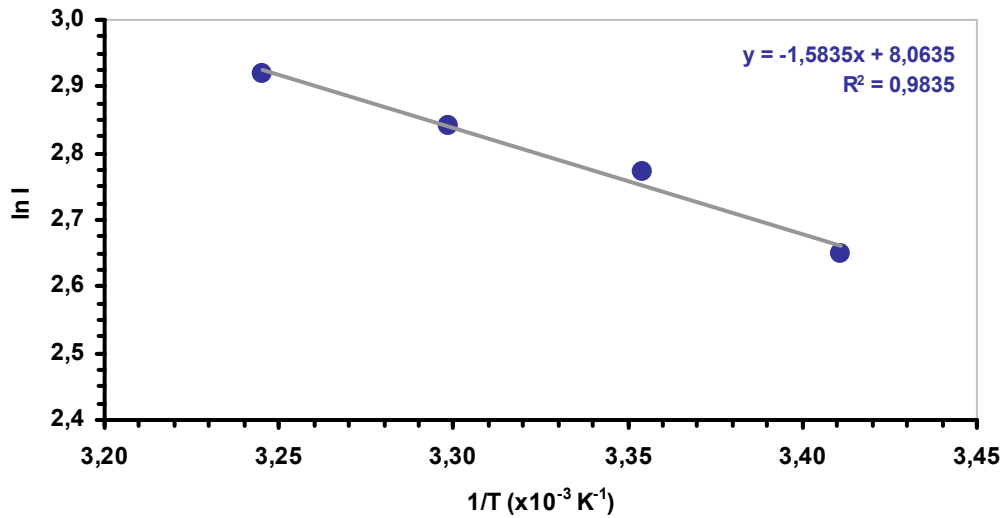
8.1.7. Sıcaklık etkisi

pH'ı $7,4$ olan $0,10 \text{ M}$ fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamının sıcaklığı $20-55^\circ \text{C}$ aralığında değiştirilerek PVF-XO biyosensörüne sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. PVF-XO biyosensörleri, çalışma elektrotlarının $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ PVF çözeltisinde 5 dakika bekletilerek polimer film kaplanması ve daha sonra polimer film kaplı elektrotların $2,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesi sonucunda hazırlanmıştır. $0,65 \text{ V}$ uygulama potansiyelinde, pH'ı $7,4$ olan $0,10 \text{ M}$ fosfat tamponu

kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına eklenen ksantin ile hazırlanan her bir PVF-XO biyosensörünün akım cevapları izlenmiş ve bulunan maksimum akım değerleri Şekil 8.7’de gösterilmiştir. Maksimum akım değerleri incelendiğinde, 35 °C’ye kadar artış gözlenmiş, bu sıcaklıktan sonra hem akım cevapları düzensizleşmiş hemde düşmüştür. 35 °C’den daha yüksek sıcaklıklılarda akım cevaplarındaki düzensizlik immobilize olan enzimin kararlılığına azaltıcı yönde etki yaparak denatüre olmasına neden olduğu ve böylece akım cevaplarında bir düşüşe sebep olduğu düşünülmektedir.



Şekil 8.7. PVF-XO biyosensörüne sıcaklığın etkisi (5,0 mg PVF mL⁻¹, 2,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 25 °C, 0,65 V)

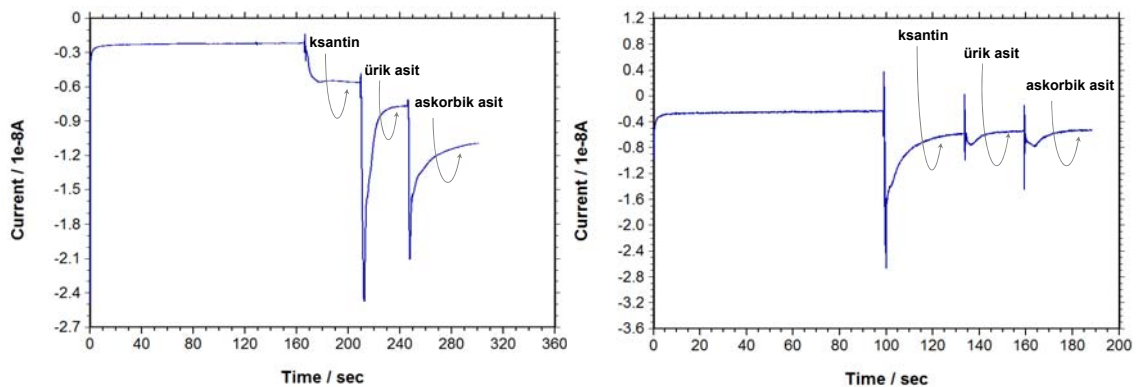


Şekil 8.8. PVF-XO biyosensörü için $\ln I$ - $1/T$ grafiği

PVF-XO biyosensörünün 20 °C'den 45 °C'ye kadar artan maksimum akım değerleri kullanılarak enzimatik reaksiyonunun hızının sıcaklıkla değişimi ve bu reaksiyonunun aktivasyon enerjisi belirlenmiştir. Enzimatik reaksiyonunun aktivasyon enerjisi Arrhenius eşitliği kullanılarak çizilen $\ln I-1/T$ grafiğinin eğiminden 13,165 kJ mol⁻¹ olarak bulunmuştur.

8.1.8. Girişim etkisi

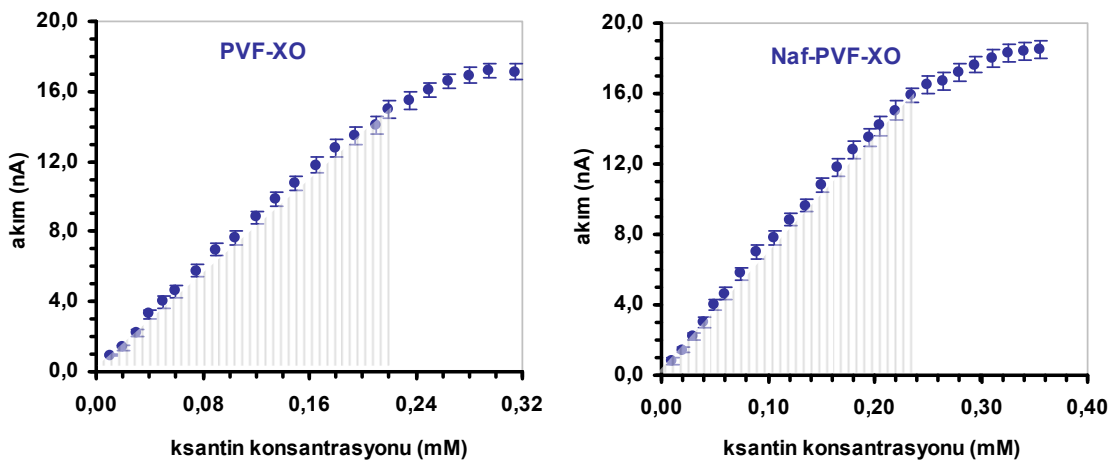
Ölçüm ortamında bulunabilecek askorbik asit ve enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan ürik asit gibi girişim yapabilen maddelerin hazırlanan PVF-XO biyosensöründe akım cevapları incelenmiştir. Bu çalışmada PVF-XO biyosensörü, platin çalışma elektrodunun 5,0 mg mL⁻¹ PVF çözeltisinde 5 dakika bekletilerek polimer film kaplanması ve daha sonra polimer film kaplı elektrodun 2,0 mg XO mL⁻¹ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesi sonucunda hazırlanmıştır. 0,65 V uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına konsantrasyonları 0,05 mM'da sabit tutulan ksantin, ürik asit ve askorbik asit çözeltileri eklenmesi ile hazırlanan PVF-XO biyosensörünün akım cevapları izlenmiştir. Şekil 8.9(a)'da görüldüğü gibi ürik asit ve askorbik asitin girişime neden olduğu belirlenmiştir. Girişimin engellenmesi amacıyla çalışma elektrodu nafyon ile modifiye edilmiş ve Naf-PVF-XO olarak tanımladığımız biyosensör ile aynı şartlarda çalışma tekrar edilmiştir. Hazırlanan Naf-PVF-XO biyosensörü ile ürik asit ve askorbik asitin gösterdiği girişimin engellendiği belirlenmiş ve Şekil 8.9(b)'de gösterilmiştir.



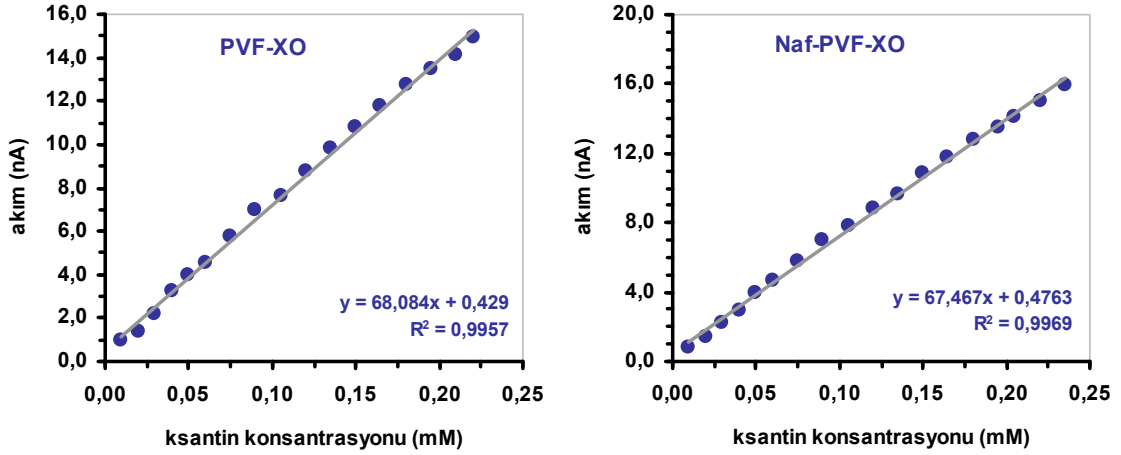
Şekil 8.9.(a) PVF-XO **(b)** Naf-PVF-XO biyosensörlerinin 0,05 mM ksantin, ürik asit ve askorbik asit eklenmesi ile elde edilen akım cevapları (5,0 mg PVF mL⁻¹, 2,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,65 V)

8.1.9. Substrat konsantrasyonunun etkisi

PVF-XO biyosensörünün doğrusal çalışma aralığının belirlenmesi amacıyla, 0,65 V uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına eklenen ksantin konsantrasyonu ile biyosensörün akım cevaplarındaki değişim incelenmiştir. PVF-XO biyosensörü, önceki çalışmalarda optimize edilen şartlarda, yani çalışma elektrodunun $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ PVF çözeltisinde 5 dakika bekletilerek polimer film kaplanması ve daha sonra polimer film kaplı elektrodun $2,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesi sonucunda hazırlanmıştır. Her bir ekleme kararlı hal akım eğrisi elde edildikten sonra yapılmış ve aynı şartlarda çalışma üç defa tekrarlanmıştır. Ölçüm ortamına eklenen ksantin konsantrasyonları dikkate alınarak, bu konsantrasyonlardaki akım değişimleri kaydedilmiş ve standart sapmaları hesaplanarak Şekil 8.10(a)'da gösterilmiştir. Aynı şartlarda yapılan çalışmalar sonucunda Naf-PVF-XO biyosensörü için elde edilen değişim ise Şekil 8.10(b)'de gösterilmiştir. PVF-XO biyosensörü için doğrusal çalışma aralığı Şekil 8.11(a)'da gösterildiği gibi $1,67 \times 10^{-2}$ – $0,22 \text{ mM}$, Naf-PVF-XO biyosensörü için doğrusal çalışma aralığı ise Şekil 8.11(b)'de gösterildiği gibi $2,17 \times 10^{-2}$ – $0,24 \text{ mM}$ olarak bulunmuştur. Her iki elektrot için gözlenebilme sınırları belirlenmiş ve PVF-XO biyosensörü için $5,00 \times 10^{-3} \text{ mM}$, Naf-PVF-XO için $6,50 \times 10^{-3} \text{ mM}$ ksantin olarak bulunmuştur.

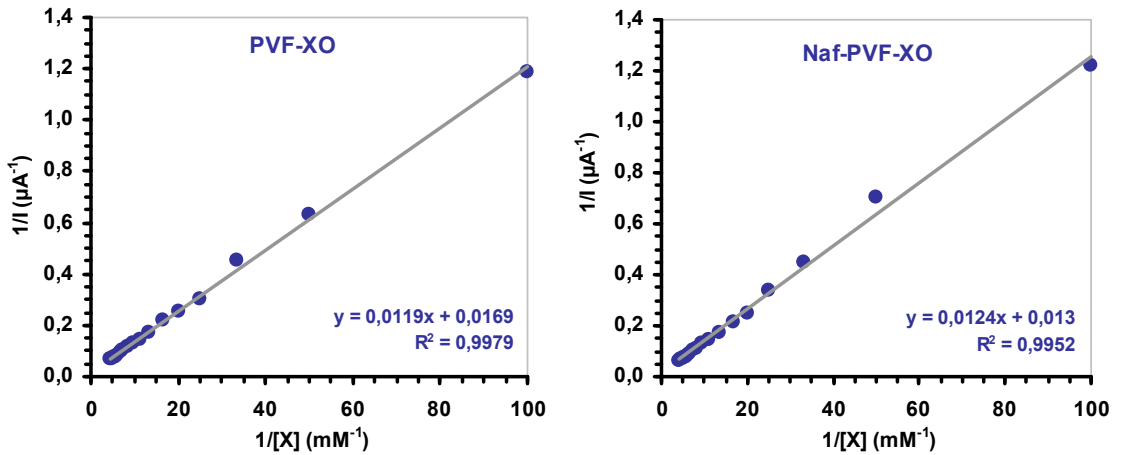


Şekil 8.10.(a) PVF-XO **(b)** Naf-PVF-XO biyosensörlerine ksantin konsantrasyonunun etkisi ($5,0 \text{ mg PVF mL}^{-1}$, $2,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30°C , 0,65 V)



Şekil 8.11.(a) PVF-XO (b) Naf-PVF-XO biyosensörlerinin doğrusal çalışma aralıkları

Enzimin ölçüm ortamındaki substrata karşı olan affinitesini gösteren Michaelis-Menten sabiti farklı ksantin konsantrasyonlarında elde edilen akım değişimlerinden yararlanarak çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplanmıştır (Şekil 8.12). Görünür Michaelis-Menten sabiti, K_{mapp} , PVF-XO biyosensörü için 0,704 mM ksantin, Naf-PVF-XO biyosensörü için 0,954 mM ksantin olarak bulunmuştur. Ayrıca Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla her iki biyosensörün duyarlılığı hesaplanmış ve PVF-XO biyosensörü için $2,68 \mu A mM^{-1} cm^{-2}$, Naf-PVF-XO biyosensörü için $2,57 \mu A mM^{-1} cm^{-2}$ olarak belirlenmiştir.



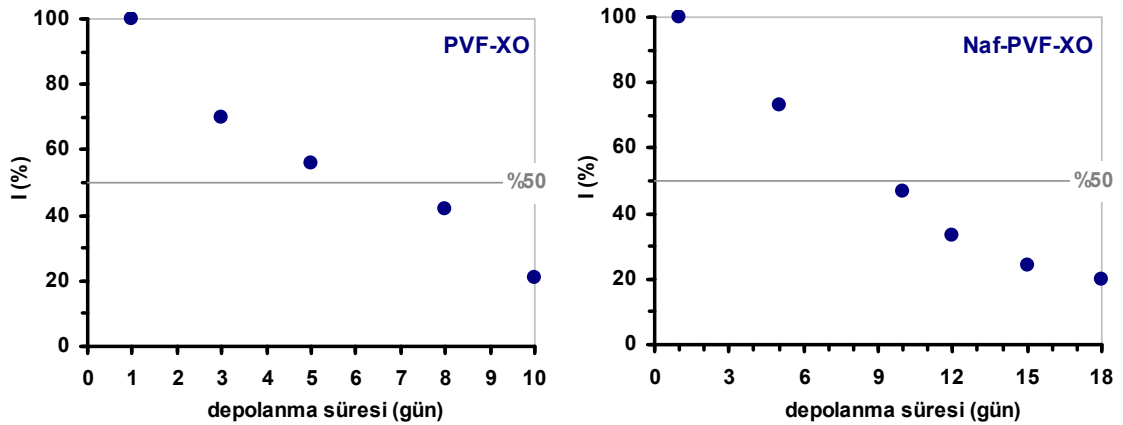
Şekil 8.12.(a) PVF-XO (b) Naf-PVF-XO biyosensörleri için Lineweaver-Burk grafikleri

8.1.10. PVF-XO biyosensörünün kararlılığı ve tekrarlanabilirliği

PVF-XO biyosensörünün kullanım kararlılığının araştırılması için PVF-XO biyosensörü, önceki çalışmalarda optimize edilen şartlarda, yani çalışma elektrodunun

5,0 mg mL⁻¹ PVF çözeltisinde 5 dakika bekletilerek polimer film kaplanması ve daha sonra polimer film kaplı elektrodun 2,0 mg XO mL⁻¹ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesi sonucunda hazırlanmıştır. 0,65 V uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına ksantin eklemesi (ölçüm ortamında 0,10 mM ksantin çözeltisi) yapılarak PVF-XO biyosensörünün akım cevaplarının gün içinde tekrar kullanımlar sonucunda değişimi incelenmiştir. Buna göre, PVF-XO biyosensörü gün içinde yapılan 4 ayrı ölçümden sonra aktivitesini %60 oranında koruduğu belirlenmiştir.

PVF-XO biyosensörünün depolanma kararlılığı araştırılması için PVF-XO biyosensörü önceki çalışmalarda optimize edilen şartlarda hazırlanmıştır. 0,65 V uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına ksantin eklemesi (ölçüm ortamında 0,10 mM ksantin çözeltisi) yapılarak PVF-XO biyosensörünün akım cevaplarının günlük periyotlarda yapılan ölçümler sonucundaki değişimi incelenmiştir. Biyosensör kullanılmadığı zamanlarda +4°C'de buzdolabında ve pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde muhafaza edilmiştir. PVF-XO biyosensörü yapılan çalışmalar sonucunda, biyosensör aktivitesinin 10 gün sonunda %80 oranında kaybettiği belirlenmiştir (Şekil 8.13(a)). Naf-PVF-XO biyosensörü ile yapılan çalışmalarda ise biyosensörün aktivitesinin 10 gün sonunda %50, 18 gün sonunda %80 oranında azaldığı belirlenmiştir (Şekil 8.13(b)).



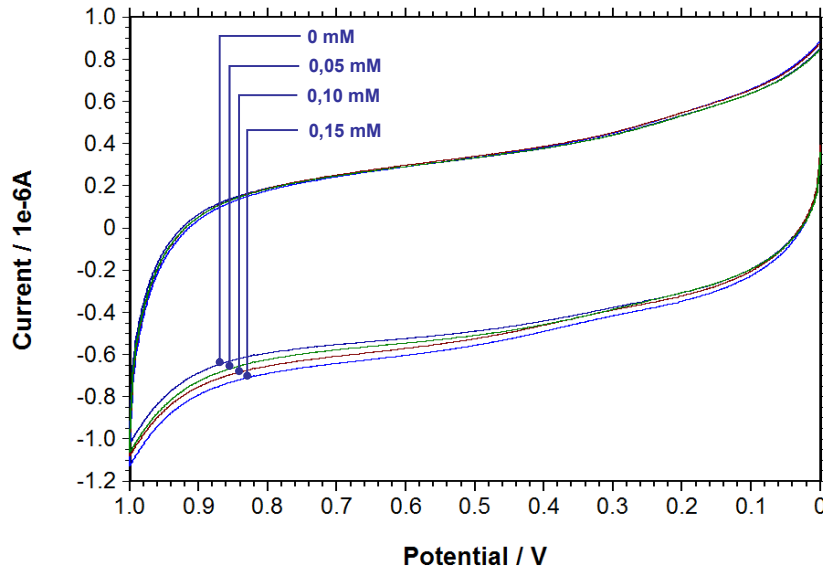
Şekil 8.13.(a) PVF-XO **(b)** Naf-PVF-XO biyosensörlerinin depolanma kararlılığı (5,0 mg PVF mL⁻¹, 2,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,65 V)

PVF-XO ve Naf-PVF-XO biyosensörlerinin akım cevapları arasındaki uyum derecesini belirlemek amacıyla tekrarlanabilirlik araştırılması yapılmıştır. Kararlılık çalışmasındaki şartlara uygun olarak PVF-XO ve Naf-PVF-XO biyosensörleri

hazırlanmış ve aynı ksantin çözeltisine (ölçüm ortamında 0,10 mM ksantin çözeltisi) verdiği akım cevapları belirlenerek bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Aynı şartlarda hazırlanan 5 biyosensör ile yapılan çalışma sonucunda bağıl standart sapma değerleri PVF-XO için %4,99 ve Naf-PVF-XO %5,42 olarak bulunmuştur.

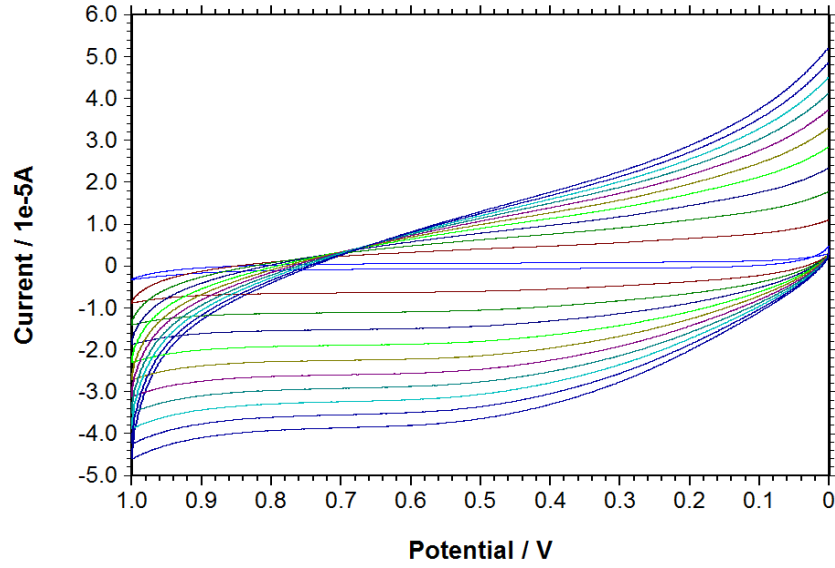
8.1.11. PVF-XO biyosensörünün voltametrik yöntem ile incelenmesi

PVF-XO biyosensörüne ait parametrelerin optimizasyonu sonrasında biyosensörün akım değerleri dönüşümlü voltametri yöntemi ile 0,0-1,0 V arasında potansiyel taraması yapılarak incelenmiştir. Kararlı akım eğrisi elde edildikten sonra ölçüm ortamına artan ksantin konsantrasyonlarında substrat eklenmiş ve her ekleme sonrasında elde edilen voltamogramlar Şekil 8.14’de gösterilmiştir. Grafikte, PVF-XO biyosensörünün akım değerlerinin artan ksantin konsantrasyonu ile orantılı olarak arttığı gözlenmiştir.

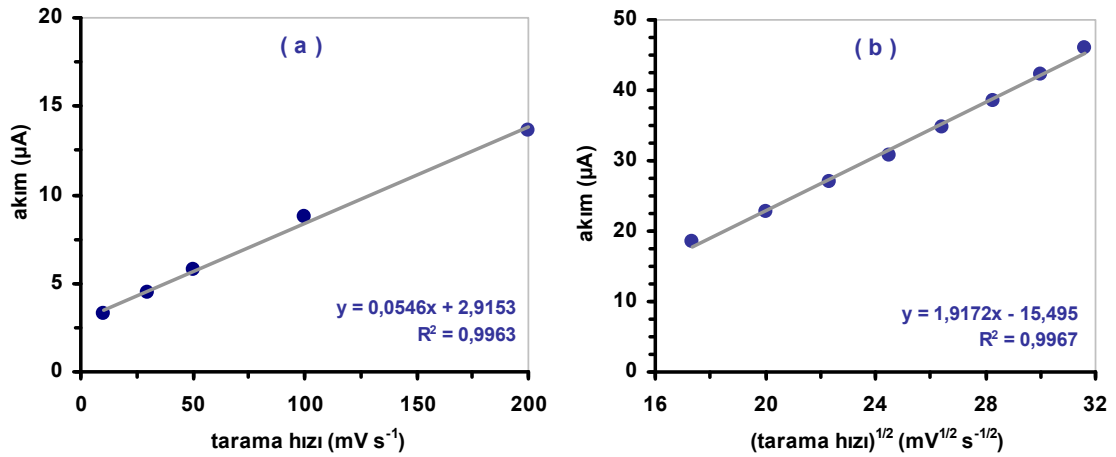


Şekil 8.14. PVF-XO biyosensörü için elde edilen voltamogramlar (5,0 mg PVF mL⁻¹, 2,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)

Enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan H₂O₂'in yükseltgenmesine potansiyel tarama hızının etkisini incelemek amacıyla pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde PVF-XO biyosensörü için 10-1000 mV s⁻¹ aralığındaki farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltamogramlar kaydedilmiştir (Şekil 8.15).



Şekil 8.15. PVF-XO biyosensörü için farklı potansiyel tarama hızlarında elde edilen voltamogramlar (5,0 mg PVF mL⁻¹, 2,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)



Şekil 8.16. PVF-XO biyosensörüne ait akım cevaplarının (a) farklı potansiyel tarama hızları, (b) potansiyel tarama hızlarının karekökü ile değişimi

H_2O_2 'in yükseltgenmesine ait pik akımlarının potansiyel tarama hızı ile arttığı belirlenmiş ve bu Şekil 8.16(a)'da gösterilmiştir. Şekilde, 10-200 mVs^{-1} tarama hızı aralığında bir doğrusallık gözlenmiş, daha sonra bir sapma oluşmuştur. Bu durum düşük tarama hızlarında elektrot üzerinde gerçekleşen reaksiyonda elektrokimyasal prosesin yüzey kontrollü olduğunu göstermektedir. Şekil 8.16(b)'de potansiyel tarama hızının karekökü ile H_2O_2 'in yükseltgenmesine ait pik akımlarının değişimi incelendiğinde ise 200-1000 mVs^{-1} aralığında bir doğrusallık tespit edilmiştir. Bu doğrusallık yüksek

tarama hızlarında elektrot üzerindeki reaksiyonun difüzyon kontrollü gerçekleştiğini göstermektedir.

8.1.12. PVF-XO biyosensörü ile gerçek numune çalışması

Çoğunlukla astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi solunum güçlüğü ataklarının uzun dönemli önlenmesinde kullanılan ksantin içerikli ilaçlar kullanılarak hazırlanan PVF-XO biyosensörünün gerçek numunelerdeki akım cevapları incelenmiştir. Gerçek numune çalışması Novartis ilaç firmasının ürettiği aminocardol(numune-I) ve Nobel ilaç firmasının ürettiği teokap(numune-II) ilaçları ile yapılmıştır.

Çizelge 8.1. PVF-XO biyosensörü için gerçek numune analizleri

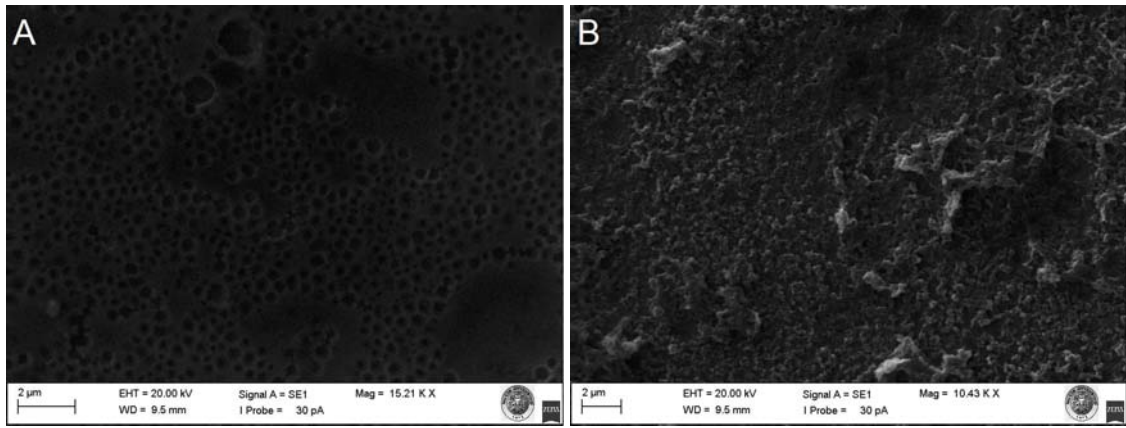
Numune	Gerçek değer, mM	Eklenen ksantin kons., mM	Analiz değeri*, mM	Geri kazanım, %
I	0,0570	0	0,0616 ± 0,0130	-
		0,1000	0,1560 ± 0,0156	94,44
		0,2000	0,2496 ± 0,0177	94,00
		0,3000	0,3426 ± 0,0194	93,65
II	0,0416	0	0,0431 ± 0,0122	-
		0,1000	0,1366 ± 0,0143	93,54
		0,2000	0,2298 ± 0,0162	93,33
		0,3000	0,3213 ± 0,0185	92,72

* 3 analizin ortalaması ve bu analize ait standart sapma gösterilmektedir.

Gerçek numune analizinde PVF-XO biyosensörü belirlenen optimum şartlarda hazırlanmış ve analizde numune-I çözeltisinden 10 µL, numune-II çözeltisinden 7,5 µL kullanılmıştır. Ölçüm ortamına eklenen gerçek numune ve substrat çözeltilerinden 0,65 V uygulama potansiyelinde elde edilen akım cevaplarındaki değişim incelenmiş ve bu bilgiler kullanılarak Çizelge 8.1’de verilen sonuçlar bulunmuştur.

8.1.13. PVF-XO biyosensörüne ait SEM görüntüleri

PVF-XO biyosensörünün yüzey morfolojisinin araştırılması amacıyla, optimum şartlarda hazırlanan iki farklı yüzeyin SEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 8.17(a)'da verilen sadece PVF kaplı yüzeye ait SEM görüntüsüdür. Şekil 8.17(b)'de ise PVF kaplı yüzey üzerine enzim immobilizasyonu sonrasında elde edilen SEM görüntüsü verilmiş ve iki görüntü incelendiğinde enzimin yüzeyde tutunduğu açıkça gözlenmiştir.

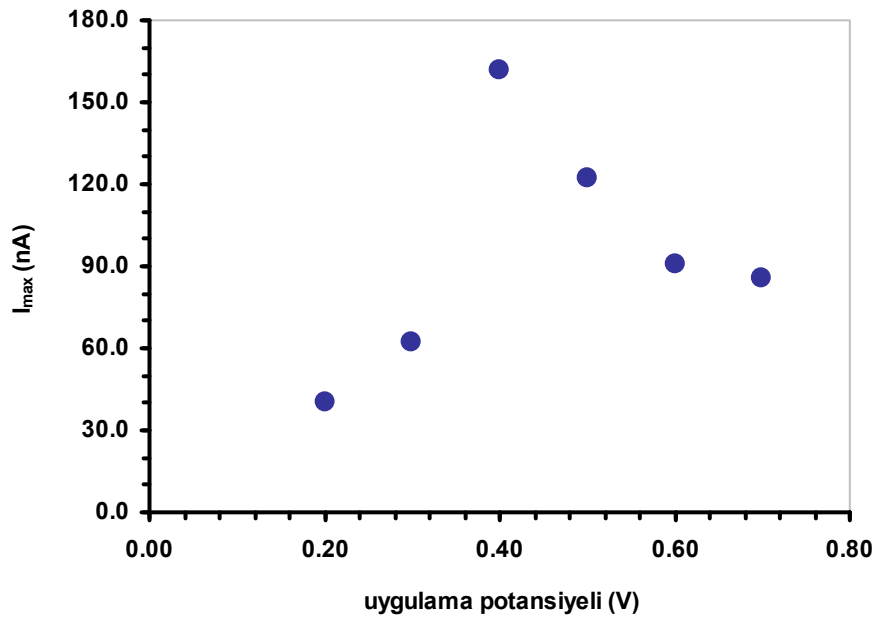


Şekil 8.17. PVF-XO biyosensörüne ait SEM görüntüleri, **(a)** PVF yüzeyi, **(b)** PVF-XO yüzeyi

8.2. PVF-Au-XO Biyosensörüne Ait Araştırma Sonuçları

8.2.1. Uygulama potansiyelinin etkisi

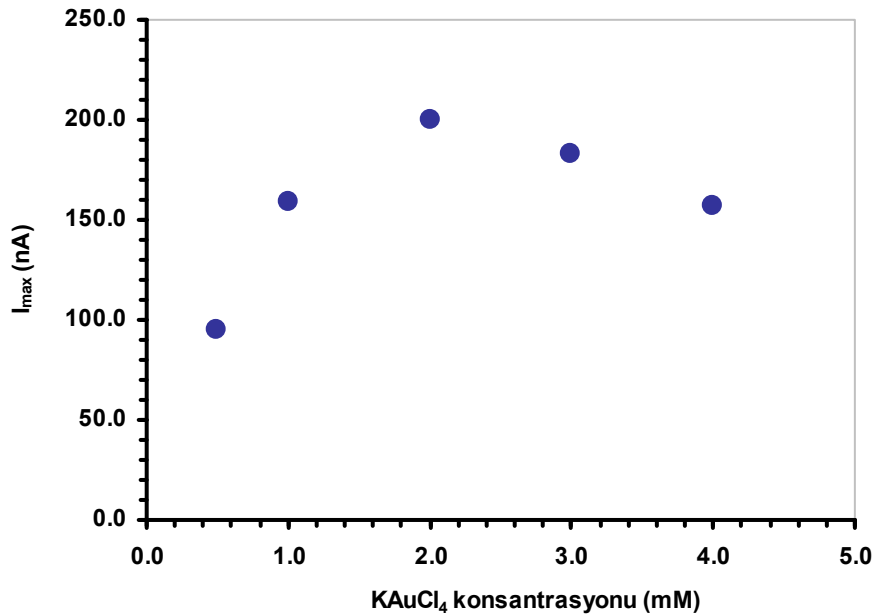
PVF-Au-XO biyosensörüne uygulama potansiyelinin etkisinin incelenmesi amacıyla 0,20-0,70 V potansiyel aralığında çalışmalar yapılmıştır. Uygulama potansiyelinin etkisinin araştırılması için yapılan her bir çalışmada kullanılan PVF-Au-XO biyosensörleri hazırlanırken, platin çalışma elektrodu $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ PVF çözeltisinde 5 dakika bekletilmiş, sonra polimer film kaplı çalışma elektrodu $1,0 \text{ mM KAuCl}_4$ çözeltisinde 1 dakika bekletildikten sonra $2,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilerek enzim immobilizasyon aşaması tamamlanmıştır. Belirlenen uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan $0,10 \text{ M}$ fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına eklenen ksantin ile hazırlanan PVF-Au-XO biyosensörlerinin akım cevapları izlenmiş ve maksimum akım değerleri bulunmuştur. Her bir uygulama potansiyelinde bulunan maksimum akım değerleri Şekil 8.18'de gösterilmiş ve maksimum aktivite $0,40 \text{ V}$ 'da bulunmuştur.



Şekil 8.18. PVF-Au-XO biyosensörüne uygulama potansiyelinin etkisi ($5,0 \text{ mg PVF mL}^{-1}$, $1,0 \text{ mM KAuCl}_4$, $2,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$, $0,10 \text{ M}$ pH 7,4 fosfat tamponu, 25°C)

8.2.2. KAuCl₄ konsantrasyonunun etkisi

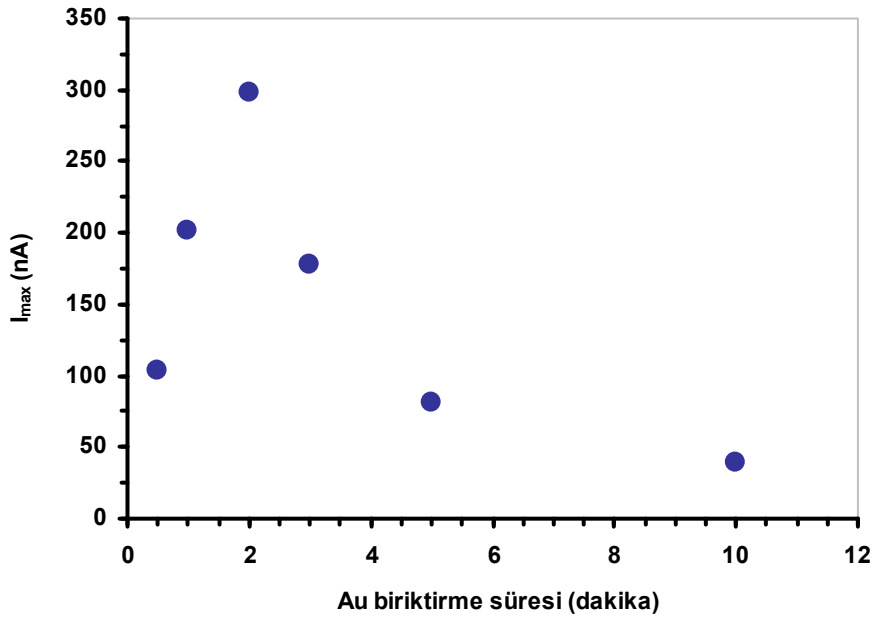
Polimer film kaplı çalışma elektrodu üzerine altın partiküllerinin biriktirilmesinde kullanılan KAuCl₄ çözeltisinin konsantrasyonu 0,5 mM–4,0 mM aralığında değiştirilerek PVF-Au-XO biyosensörüne KAuCl₄ konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. PVF-Au-XO biyosensörü, platin çalışma elektrodunun ilk olarak 5,0 mg mL⁻¹ PVF çözeltisinde 5 dakika, sonra polimer film kaplı çalışma elektrodunun farklı konsantrasyondaki KAuCl₄ çözeltisinde 1 dakika, son olarak 2,0 mg XO mL⁻¹ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesiyle immobilizasyon aşaması tamamlanarak hazırlanmıştır. 0,40 V uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına eklenen ksantin ile hazırlanan PVF-Au-XO biyosensörlerinin akım cevapları izlenmiş ve bu cevaplar kullanılarak bulunan maksimum akım değerleri Şekil 8.19'da verilmiştir. Grafikte her bir KAuCl₄ konsantrasyonu için bulunan maksimum akım değerleri karşılaştırıldığında en büyük akım değeri 2 mM KAuCl₄ konsantrasyonunda elde edilmiştir. 2 mM'ın üzerindeki konsantrasyonlarda akım değerlerinde azalma gözlenmiştir. Bu durumun elektrot yüzeyinde biriken altın partiküllerinin büyüklüklerinin artmasıyla yüzey alanındaki azalmadan kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 8.19. PVF-Au-XO biyosensörüne KAuCl₄ konsantrasyonunun etkisi (5,0 mg PVF mL⁻¹, 2,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 25 °C, 0,40 V)

8.2.3. KAuCl₄ çözeltisinde bekletme süresinin etkisi

Polimer film kaplı elektrodun KAuCl₄ çözeltisinde bekletme süresi 15 saniye ile 15 dakika arasındaki farklı zamanlarda değiştirilerek hazırlanan PVF-Au-XO biyosensörlerine KAuCl₄ çözeltisinde bekletme süresinin etkisi araştırılmıştır. PVF-Au-XO biyosensörü, platin çalışma elektrodunun ilk olarak 5,0 mg mL⁻¹ PVF çözeltisinde 5 dakika, sonra polimer film kaplı çalışma elektrodunun 2,0 mM KAuCl₄ çözeltisinde belirli bir süre, son olarak 2,0 mg XO mL⁻¹ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesiyle immobilizasyon aşaması tamamlanarak hazırlanmıştır. 0,4 V uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına eklenen ksantin ile hazırlanan PVF-Au-XO biyosensörlerinin akım cevapları izlenmiş ve bulunan maksimum akım değerleri Şekil 8.20'de gösterilmiştir.

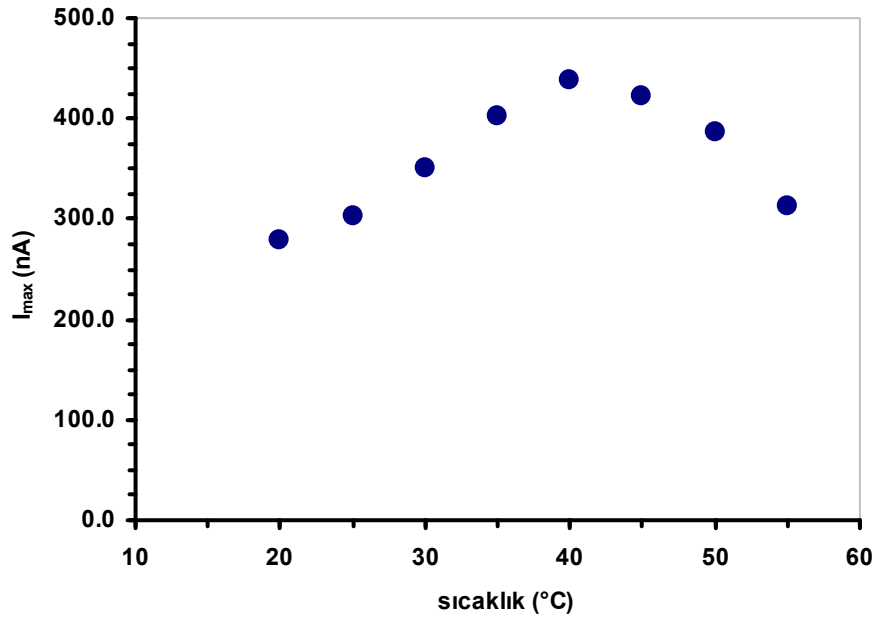


Şekil 8.20. PVF-Au-XO biyosensörüne KAuCl₄ çözeltisinde bekletme süresinin etkisi (5,0 mg PVF mL⁻¹, 2,0 mM KAuCl₄, 2,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 25 °C, 0,40 V)

Elde edilen grafikte, çalışılan bekletme sürelerine göre maksimum akım değerleri karşılaştırıldığında, 2 dakikadan sonra akım değerlerinde bir azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlar dikkate alınarak, bundan sonraki çalışmalarda KAuCl₄ çözeltisinde bekletme süresi 2 dakika olarak belirlenmiştir.

8.2.4. Sıcaklık etkisi

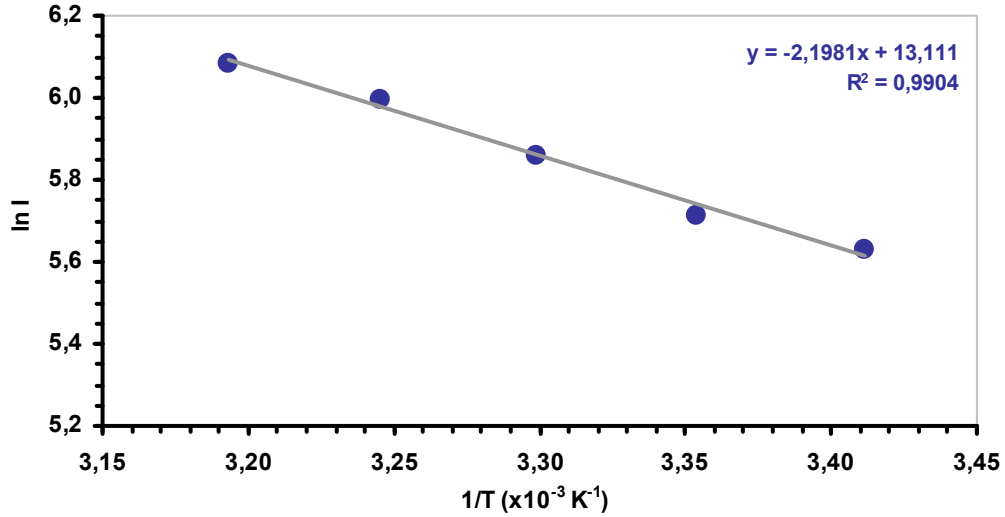
PVF-Au-XO biyosensörüne sıcaklığın etkisi ölçüm ortamı sıcaklığının 20-55 °C aralığında değiştirilmesi ile araştırılmıştır. PVF-Au-XO biyosensörü, platin çalışma elektrodunun ilk olarak 5,0 mg mL⁻¹ PVF çözeltisinde 5 dakika, sonra polimer film kaplı çalışma elektrodunun 2,0 mM KAuCl₄ çözeltisinde 2 dakika, son olarak 2,0 mg XO mL⁻¹ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesiyle hazırlanmıştır. pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamının 20-55 °C aralığında bir sıcaklıkta eklenen ksantin ile PVF-Au-XO biyosensörlerinin akım cevapları 0,4 V uygulama potansiyelinde izlenmiştir. Farklı sıcaklıklarda elde edilen amperomogramlardan maksimum akım değerleri bulunmuş ve bu değişim Şekil 8.21'de gösterilmiştir. Maksimum akım değerleri incelendiğinde, 40 °C'ye kadar artış gözlenmiş, bu sıcaklıktan sonra akım cevaplarında bir azalma meydana gelmiştir. Daha yüksek sıcaklıklarda akım cevaplarındaki azalmanın elektrot yüzeyindeki immobilize enzimin denatürasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 8.21. PVF-Au-XO biyosensörüne sıcaklığın etkisi (5,0 mg PVF mL⁻¹, 2,0 mM KAuCl₄, 2,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 25 °C, 0,40 V)

PVF-Au-XO biyosensörünün 20 °C'den 40 °C'ye kadar artan maksimum akım değerleri kullanılarak enzimatik reaksiyonunun hızının sıcaklıkla değişimi ve bu

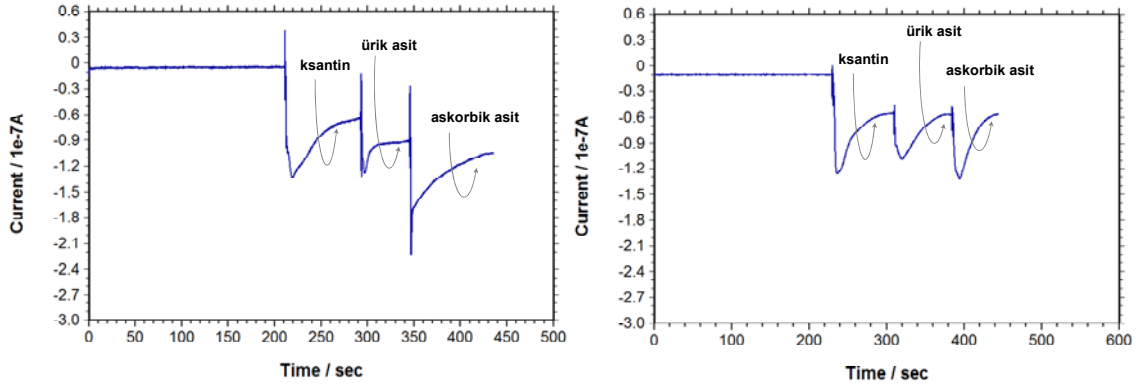
reaksiyonunun aktivasyon enerjisi belirlenmiştir. Enzimatik reaksiyonunun aktivasyon enerjisi Arrhenius eşitliği kullanılarak çizilen $\ln I$ - $1/T$ grafiğinin eğiminden $18,275 \text{ kJ mol}^{-1}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 8.22. PVF-Au-XO biyosensörü için $\ln I$ - $1/T$ grafiği

8.2.5. Girişim etkisi

Ölçüm ortamında bulunabilecek askorbik asit ve enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan ürik asit gibi girişim yapabilen maddelerin hazırlanan PVF-Au-XO biyosensöründe akım cevapları incelenmiştir. Bu çalışmada, PVF-Au-XO biyosensörü, platin çalışma elektrodunun ilk olarak $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ PVF çözeltisinde 5 dakika, sonra polimer film kaplı çalışma elektrodunun $2,0 \text{ mM KAuCl}_4$ çözeltisinde 2 dakika, son olarak $2,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesiyle hazırlanmıştır. $0,40 \text{ V}$ uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan $0,10 \text{ M}$ fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına konsantrasyonları $0,10 \text{ mM}$ 'da sabit tutulan ksantin, ürik asit ve askorbik asit çözeltileri eklenmesi ile PVF-Au-XO biyosensörünün akım cevapları izlenmiştir. Şekil 8.23(a)'da görüldüğü gibi ürik asit ve askorbik asitin girişime neden olduğu belirlenmiş ve girişimin engellenmesi amacıyla çalışma elektrodu nafyon ile modifiye edilmiştir. Nafyon ile modifiye edilen ve Naf-PVF-Au-XO olarak tanımlanan Naf-PVF-Au-XO biyosensörü ile aynı şartlarda çalışma tekrar edilmiştir. Çalışmalar sonucunda, Naf-PVF-Au-XO biyosensörü ile ürik asit ve askorbik asitin gösterdiği girişimin engellendiği belirlenmiş ve Şekil 8.23(b)'de gösterilmiştir.

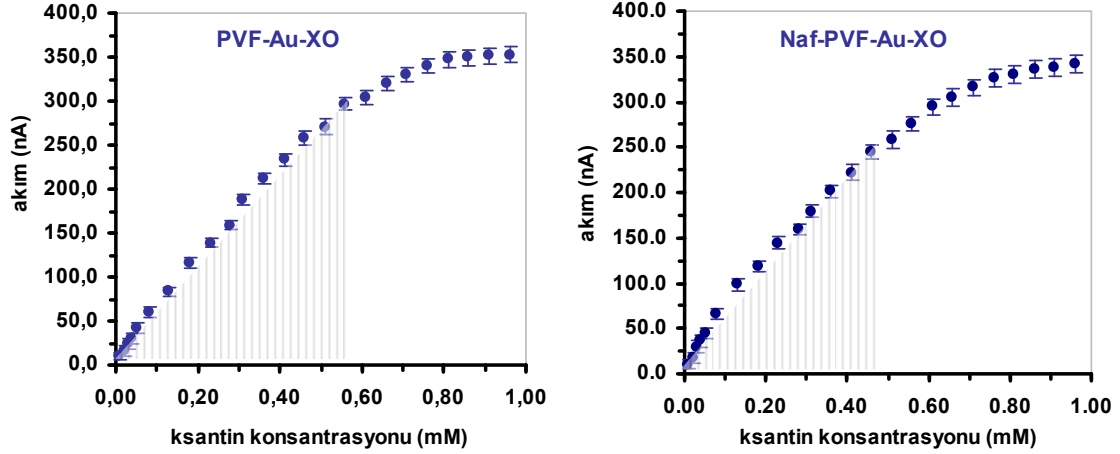


Şekil 8.23.(a) PVF-Au-XO **(b)** Naf-PVF-Au-XO biyosensörlerinin 0,10 mM ksantin, ürik asit ve askorbik asit eklenmesi ile elde edilen akım cevapları (5,0 mg PVF mL⁻¹, 2,0 mM KAuCl₄, 2,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,40 V)

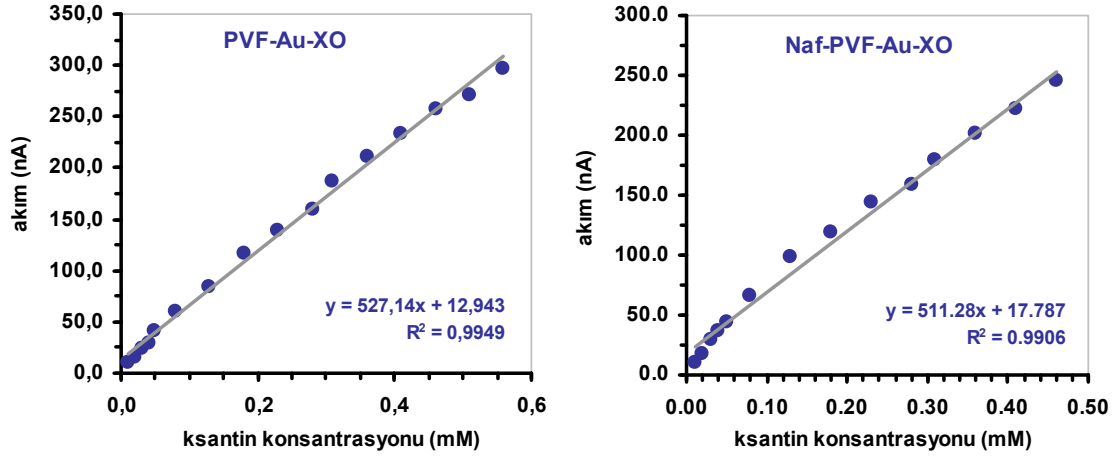
8.2.6. Substrat konsantrasyonunun etkisi

PVF-Au-XO biyosensörünün doğrusal çalışma aralığının belirlenmesi amacıyla, 0,40 V uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına eklenen ksantin konsantrasyonu ile biyosensörün akım cevaplarındaki değişim incelenmiştir. PVF-Au-XO biyosensörü, platin çalışma elektrodunun ilk olarak 5,0 mg mL⁻¹ PVF çözeltisinde 5 dakika, sonra polimer film kaplı çalışma elektrodunun 2,0 mM KAuCl₄ çözeltisinde 2 dakika, son olarak 2,0 mg XO mL⁻¹ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesiyle hazırlanmıştır. Her bir ekleme kararlı hal akım eğrisi elde edildikten sonra yapılmış ve aynı şartlarda çalışma üç defa tekrarlanmıştır. Ölçüm ortamına eklenen ksantin konsantrasyonları dikkate alınarak, bu konsantrasyonlardaki akım değişimleri kaydedilmiş ve standart sapmaları hesaplanarak Şekil 8.24(a)'da gösterilmiştir. Aynı şartlarda yapılan çalışmalar sonucunda Naf-PVF-Au-XO biyosensörü için elde edilen değişim ise Şekil 8.24(b)'de gösterilmiştir.

PVF-Au-XO biyosensörü için doğrusal çalışma aralığı Şekil 8.25(a)'da gösterildiği gibi $2,50 \times 10^{-3}$ –0,56 mM, Naf-PVF-Au-XO biyosensörü için doğrusal çalışma aralığı ise Şekil 8.25(b)'de gösterildiği gibi $3,33 \times 10^{-3}$ –0,46mM olarak bulunmuştur. Her iki elektrot için gözlenebilme sınırları belirlenmiş ve PVF-Au-XO biyosensörü için $7,50 \times 10^{-4}$ mM, Naf-PVF-Au-XO için $1,00 \times 10^{-3}$ mM ksantin olarak bulunmuştur.

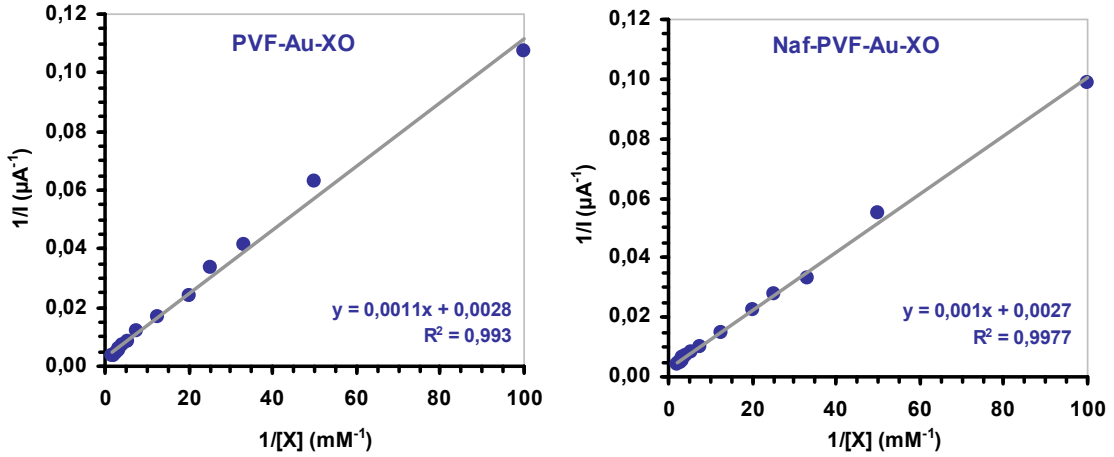


Şekil 8.24. (a) PVF-Au-XO (b) Naf-PVF-Au-XO biyosensörlerine ksantin konsantrasyonunun etkisi (5,0 mg PVF mL⁻¹, 2,0 mM KAuCl₄, 2,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,40 V)



Şekil 8.25.(a) PVF-Au-XO (b) Naf-PVF-Au-XO biyosensörlerinin doğrusal çalışma aralıkları

Farklı ksantin konsantrasyonlarında elde edilen akım değişimlerinden yararlanarak Michaelis-Menten sabiti çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplanmıştır (Şekil 8.26). Görünür Michaelis-Menten sabiti, K_{mapp} , PVF-Au-XO biyosensörü için 0,393 mM ksantin, Naf-PVF-Au-XO biyosensörü için 0,370 mM ksantin olarak bulunmuştur. Ayrıca Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla her iki biyosensörün duyarlılığı hesaplanmış ve PVF-Au-XO biyosensörü için 28,95 $\mu\text{A mM}^{-1}\text{cm}^{-2}$, Naf-PVF-Au-XO biyosensörü için 31,85 $\mu\text{A mM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 8.26.(a) PVF-Au-XO,(b) Naf-PVF-Au-XO biyosensörleri için Lineweaver-Burk grafikleri

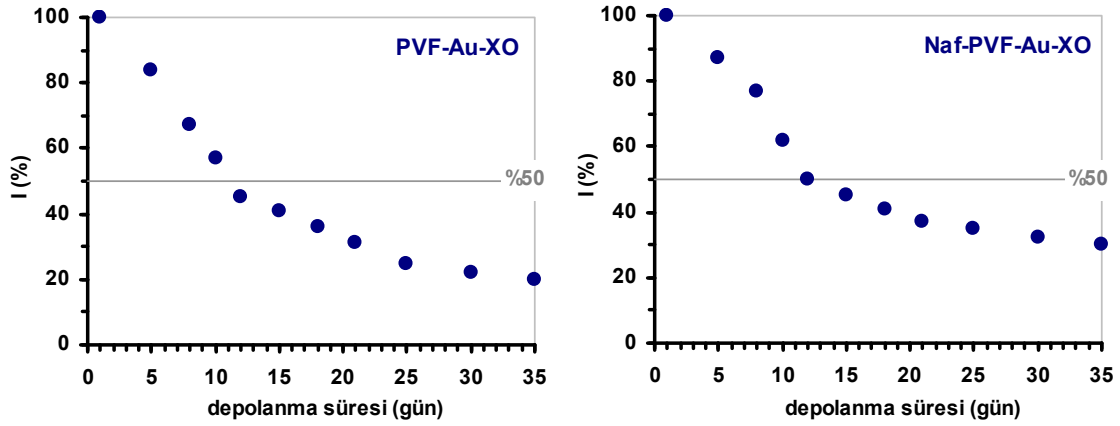
8.2.7. PVF-Au-XO biyosensörünün kararlılığı ve tekrarlanabilirliği

PVF-Au-XO biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğinin araştırılması için PVF-Au-XO biyosensörü, önceki çalışmalarda optimize edilen şartlarda, yani çalışma elektrodunun $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ PVF çözeltisinde 5 dakika, sonra $2,0 \text{ mM}$ KAuCl_4 çözeltisinde 2 dakika ve son olarak $2,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilerek hazırlanmıştır. Gün içinde tekrar kullanımlarda PVF-Au-XO biyosensörü ile pH'ı 7,4 olan $0,10 \text{ M}$ fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına ksantin eklemesi (ölçüm ortamında $0,30 \text{ mM}$ ksantin çözeltisi) yapılarak $0,40 \text{ V}$ uygulama potansiyelindeki akım cevapları incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda, PVF-Au-XO biyosensörünün gün içinde yapılan 8 ayrı ölçümden sonra aktivitesini %50 oranında koruduğu belirlenmiştir.

PVF-Au-XO biyosensörünün depolama kararlılığı araştırılması için biyosensör optimum şartlarda hazırlanmıştır. $0,40 \text{ V}$ uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan $0,10 \text{ M}$ fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına ksantin eklemesi (ölçüm ortamında $0,30 \text{ mM}$ ksantin çözeltisi) yapılarak PVF-Au-XO biyosensörünün akım cevaplarının günlük periyotlarda yapılan ölçümler sonucundaki değişimi incelenmiştir.

PVF-Au-XO biyosensörü için yapılan 35 günlük inceleme sonucunda, biyosensörün 15 gün sonunda aktivitesini %50 oranında, 25 gün sonunda ise %75 kaybettiği belirlenmiştir (Şekil 8.27(a)). Aynı optimum şartlar kullanılarak hazırlanan Naf-PVF-Au-XO biyosensör ile yapılan depolanma kararlılığı çalışmasında, biyosensör

18 gün sonunda aktivitesini %50 oranında, 25 gün sonunda ise %65 kaybetmiştir (Şekil 8.27(b)).

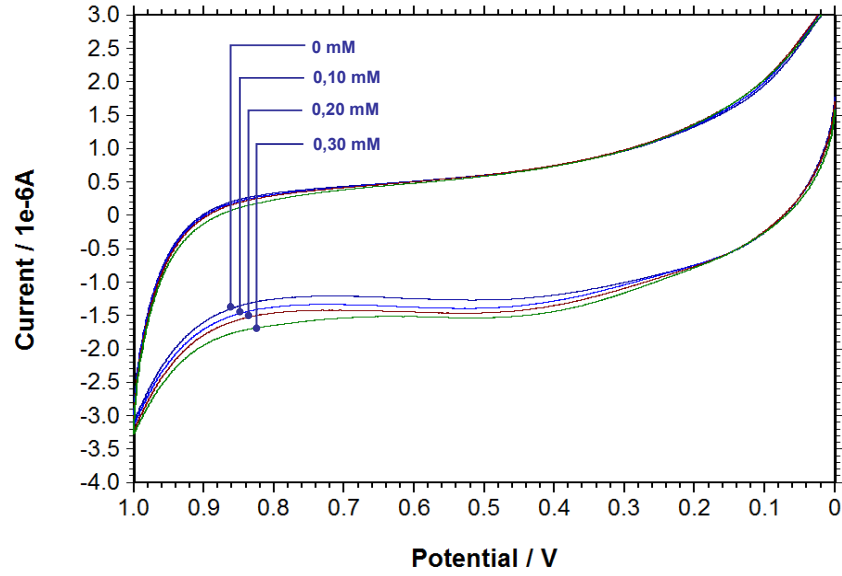


Şekil 8.27.(a) PVF-Au-XO, **(b)** Naf-PVF-Au-XO biyosensörlerinin depolanma kararlılığı (5,0 mg PVF mL⁻¹, 2,0 mM KAuCl₄, 2,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,40 V)

PVF-Au-XO ve Naf-PVF-Au-XO biyosensörlerinin akım cevapları arasındaki uyum dercesini belirlemek amacıyla tekrarlanabilirlik araştırılması yapılmıştır. Kararlılık çalışmasındaki şartlara uygun olarak PVF-Au-XO ve Naf-PVF-Au-XO biyosensörleri hazırlanmış ve aynı ksantin çözeltisine (ölçüm ortamında 0,30 mM ksantin çözeltisi) verdiği akım cevapları belirlenerek bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Aynı şartlarda hazırlanan 5 biyosensör ile yapılan çalışma sonucunda bağıl standart sapma değerleri PVF-Au-XO için %3,41 ve Naf-PVF-Au-XO %4,03 olarak bulunmuştur.

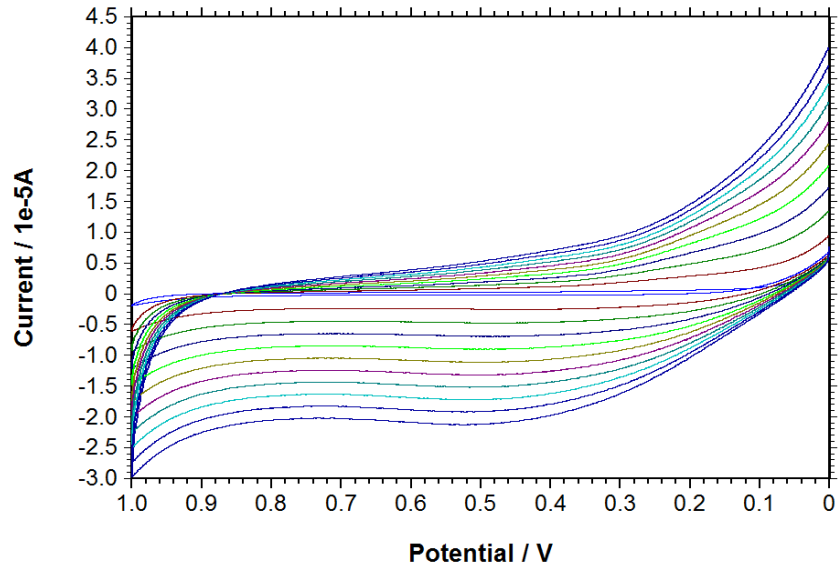
8.2.8. PVF-Au-XO biyosensörünün voltametrik yöntem ile incelenmesi

Önceki çalışmalarda optimize edilen şartlarda hazırlanan PVF-Au-XO biyosensörünün akım değerleri dönüşümlü voltametri yöntemi ile 0,0-1,0 V arasında potansiyel taraması yapılarak gözlenmiştir. Kararlı akım eğrisi elde edildikten sonra ölçüm ortamına artan ksantin konsantrasyonlarında substrat eklenmiş ve her ekleme sonrasında elde edilen voltamogramlar kaydedilmiştir (Şekil 8.28). Bütün voltamogramların gösterildiği grafikte, PVF-Au-XO biyosensörünün akım değerlerinin artan ksantin konsantrasyonu ile orantılı olarak arttığı belirlenmiştir.

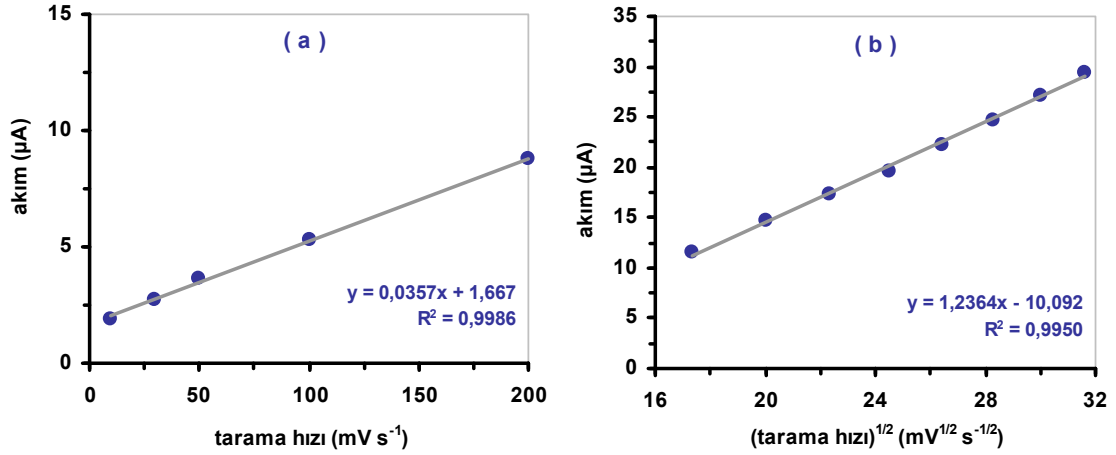


Şekil 8.28. PVF-Au-XO biyosensörü için elde edilen voltamogramlar (5,0 mg PVF mL⁻¹, 2,0 mM KAuCl₄, 2,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)

Enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan H₂O₂'in yükseltgenmesine potansiyel tarama hızının etkisini incelemek amacıyla pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde PVF-XO biyosensörü için 10-1000 mV s⁻¹ aralığındaki farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltamogramlar kaydedilmiştir (Şekil 8.29).



Şekil 8.29. PVF-Au-XO biyosensörü için farklı potansiyel tarama hızlarında elde edilen voltamogramlar (5,0 mg PVF mL⁻¹, 2,0 mM KAuCl₄, 2,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)



Şekil 8.30. PVF-Au-XO biyosensörüne ait akım cevaplarının (a) farklı potansiyel tarama hızları, (b) potansiyel tarama hızlarının karekökü ile değişimi

H_2O_2 'in yükseltgenmesine ait pik akımlarının potansiyel tarama hızı ile değişimi Şekil 8.30(a)'da gösterilmiştir. Şekilde 10-200 mVs^{-1} tarama hızı aralığında gözlenen doğrusallık elektrot üzerinde gerçekleşen reaksiyonun düşük tarama hızlarında yüzey kontrollü olduğunu göstermektedir. Şekil 8.30(b)'de potansiyel tarama hızının karekökü ile H_2O_2 'in yükseltgenmesine ait pik akımlarının değişimi incelendiğinde ise 200-1000 mVs^{-1} aralığında bir doğrusallık tespit edilmiştir. Bu sonuç ise yüksek tarama hızlarında elektrot üzerindeki reaksiyonun difüzyon kontrollü gerçekleştiğini göstermektedir.

8.2.9. PVF-Au-XO biyosensörü ile gerçek numune çalışması

Novartis ilaç firmasının ürettiği aminocardol(numune-I) ve Nobel ilaç firmasının ürettiği teokap(numune-II) ilaçları ile PVF-Au-XO biyosensörünün gerçek numunelerdeki akım cevapları incelenmiştir. Gerçek numune analizinde PVF-Au-XO biyosensörü önceki çalışmalarda optimize edilen şartlarda hazırlanmış ve ölçüm ortamına eklenen ilaç numunesi içerisindeki ksantin tayini yapılmıştır. PVF-Au-XO biyosensörü ile yapılan analizde numune-I çözeltisinden 20 μL , numune-II çözeltisinden 15 μL kullanılmıştır. Ölçüm ortamına eklenen gerçek numune ve substrat çözeltilerinin 0,4 V uygulama potansiyelindeki akım cevapları incelenmiş ve bu akım cevaplarından yararlanarak Çizelge 8.2'de verilen sonuçlar bulunmuştur.

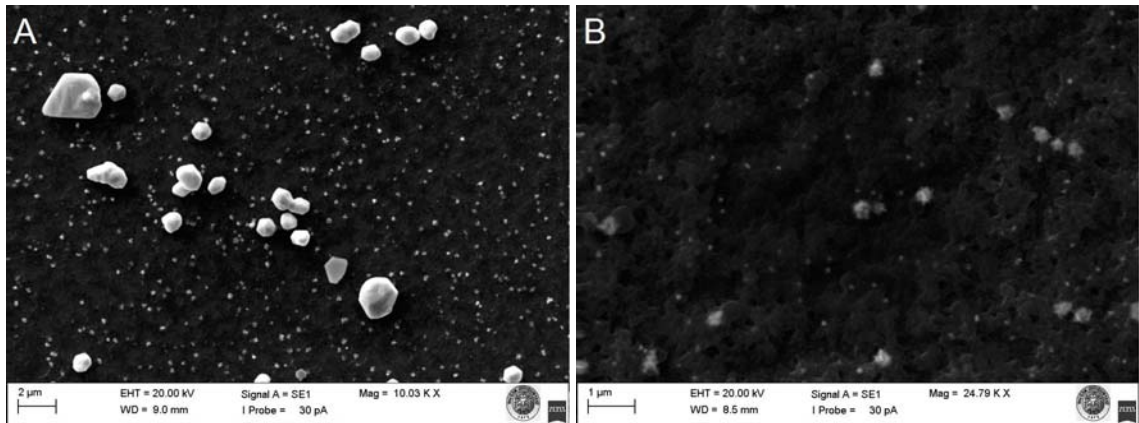
Çizelge 8.2. PVF-Au-XO biyosensörü için gerçek numune analizleri

Numune	Gerçek değer, mM	Eklenen ksantin kons., mM	Analiz değeri*, mM	Geri kazanım, %
I	0,1140	0	0,1120 ± 0,0102	-
		0,1000	0,2081 ± 0,0160	96,11
		0,2000	0,3028 ± 0,0185	95,42
		0,3000	0,3965 ± 0,0196	94,82
II	0,0833	0	0,0820 ± 0,0115	-
		0,1000	0,1778 ± 0,0182	95,80
		0,2000	0,2705 ± 0,0190	94,27
		0,3000	0,3633 ± 0,0195	93,76

* 3 analizin ortalaması ve bu analize ait standart sapma gösterilmektedir.

8.2.10. PVF-Au-XO biyosensörüne ait SEM görüntüleri

PVF-Au-XO biyosensörünün yüzey morfolojisinin araştırılması amacıyla, optimum şartlarda hazırlanan iki farklı yüzeyin SEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 8.31(a)'da verilen SEM görüntüsünde PVF kaplı yüzey üzerine altın partikülleri biriktirilmiştir. Şekilde altın taneciklerinin polimer yüzey üzerine farklı büyüklüklerde dağıldığı görülmektedir. Şekil 8.31(b)'de ise altın biriktirilmiş PVF kaplı yüzey üzerine enzim immobilizasyonu sonrasında elde edilen SEM görüntüsü verilmiştir. Enzim immobilizasyonu sonrasında yüzeyin tamamen enzim molekülleri ile kaplandığı gözlenmiştir. Ayrıca, Şekil 8.31(b)'de gösterilen elektrot yüzeyinde, altın partiküllerinin bir kısmı immobilize olan enzim molekülleri ile kaplanmıştır.

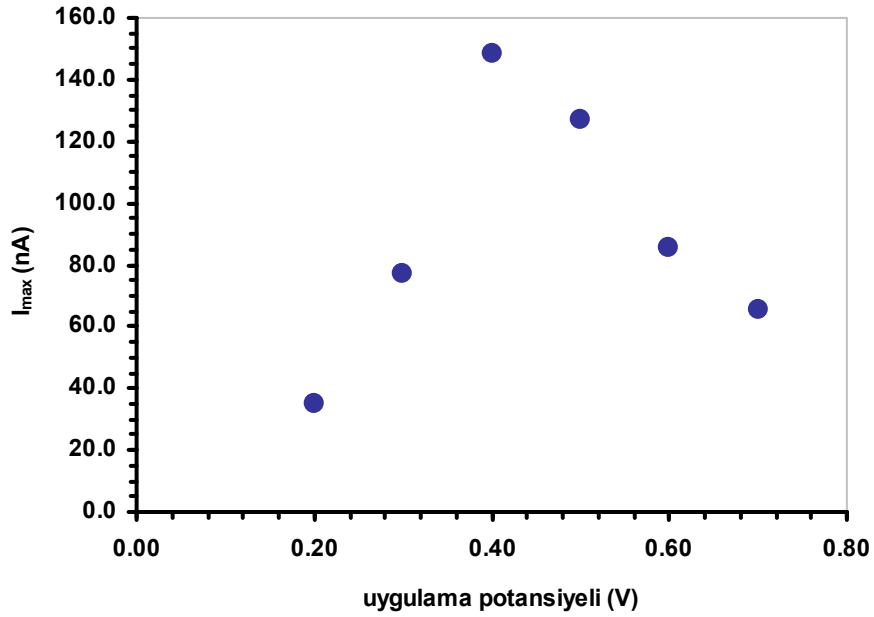


Şekil 8.31. PVF-Au-XO biyosensörüne ait SEM görüntüleri, (a) PVF-Au yüzeyi, (b) PVF-Au-XO yüzeyi

8.3. PVF-Pt-XO Biyosensörüne Ait Araştırma Sonuçları

8.3.1. Uygulama potansiyelinin etkisi

PVF-Pt-XO biyosensörüne uygulama potansiyelinin etkisinin incelenmesi amacıyla 0,20-0,70 V potansiyel aralığında çalışmalar yapılmıştır. Uygulama etkisinin araştırılmasında kullanılan PVF-Pt-XO biyosensörleri hazırlanırken, platin çalışma elektrodu $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ PVF çözeltisinde 5 dakika bekletilmiş, sonra polimer film kaplı çalışma elektrodu $1,0 \text{ mM PtBr}_2$ çözeltisinde 3 dakika bekletildikten sonra $2,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilerek enzim immobilizasyon aşaması tamamlanmıştır. Belirlenen uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan $0,10 \text{ M}$ fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına eklenen ksantin ile hazırlanan PVF-Pt-XO biyosensörlerinin akım cevapları izlenmiş ve maksimum akım değerleri bulunmuştur. Şekil 8.32'de her bir uygulama potansiyeli için bulunan maksimum akım değerleri gösterilmiş ve en büyük maksimum akım değeri $0,40 \text{ V}$ 'da gözlenmiştir.

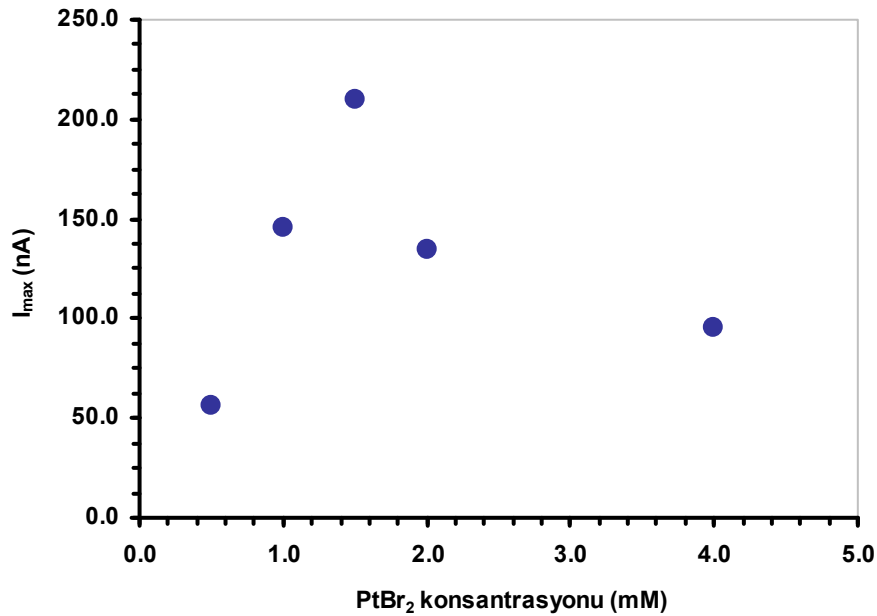


Şekil 8.32. PVF-Pt-XO biyosensörüne uygulama potansiyelinin etkisi ($5,0 \text{ mg PVF mL}^{-1}$, $1,0 \text{ mM PtBr}_2$, $2,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$, $0,10 \text{ M}$ pH 7,4 fosfat tamponu, 25°C)

8.3.2. PtBr_2 konsantrasyonunun etkisi

Polimer film kaplı çalışma elektrodu üzerine altın partiküllerinin biriktirilirken kullanılan PtBr_2 çözeltisinin konsantrasyonu $0,5 \text{ mM}$ – 4 mM aralığında değiştirilerek

PVF-Pt-XO biyosensörüne PtBr_2 konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. PVF-Pt-XO biyosensörü, platin çalışma elektrodunun ilk olarak $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ PVF çözeltisinde 5 dakika, sonra polimer film kaplı çalışma elektrodunun farklı konsantrasyonlardaki PtBr_2 çözeltisinde 3 dakika ve son olarak $2,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesiyle hazırlanmıştır. pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına eklenen ksantin ile hazırlanan PVF-Pt-XO biyosensörlerinin akım cevapları 0,40 V uygulama potansiyelinde izlenmiş ve akım cevapları kullanılarak bulunan maksimum akım değerleri Şekil 8.33'de verilmiştir. Grafik incelendiğinde maksimum akım değerleri arasındaki en büyük akım değeri 1,5 mM PtBr_2 konsantrasyonunda elde edilmiştir. 1,5 mM'ın üzerindeki konsantrasyonlarda akım değerlerinde azalmanın nedeninin elektrot yüzeyinde biriken platin partiküllerinin büyüklüklerinin artmasıyla yüzey alanındaki azalmadan kaynaklandığı düşünülmektedir.

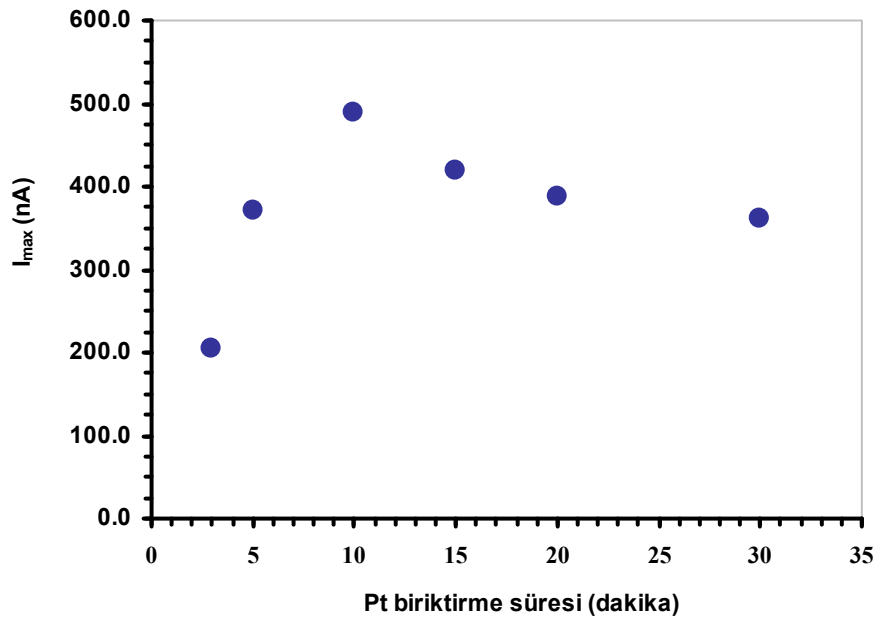


Şekil 8.33. PVF-Pt-XO biyosensörüne PtBr_2 konsantrasyonunun etkisi ($5,0 \text{ mg PVF mL}^{-1}$, $2,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 25°C , 0,40 V)

8.3.3. PtBr_2 çözeltisinde bekletme süresinin etkisi

Polimer film kaplı elektrodun 1,5 mM PtBr_2 çözeltisindeki bekletme süresi 3-30 dakika arasında seçilen farklı zamanlarda değiştirilerek hazırlanan PVF-Pt-XO

biyosensörlerine PtBr_2 çözeltisinde bekletme süresinin etkisi araştırılmıştır. PVF-Pt-XO biyosensörü, platin çalışma elektrodunun ilk olarak $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ PVF çözeltisinde 5 dakika, sonra polimer film kaplı çalışma elektrodunun $1,5 \text{ mM}$ PtBr_2 çözeltisinde farklı sürelerde ve son olarak $2,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesiyle hazırlanmıştır. $0,4 \text{ V}$ uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan $0,10 \text{ M}$ fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına eklenen ksantin ile hazırlanan PVF-Pt-XO biyosensörlerinin akım cevapları izlenmiş ve bulunan maksimum akım değerleri Şekil 8.34'da gösterilmiştir. Grafik incelendiğinde maksimum aktivite 10 dakikadaki bekletme süresinde belirlenmiştir. Bu zamanın üzerindeki sürelerde akım değerlerinde meydana gelen azalmaya polimer matrikste biriken platin miktarındaki artışın sonucunda difüzyon kısıtlamasının neden olduğu gözlenmiştir.

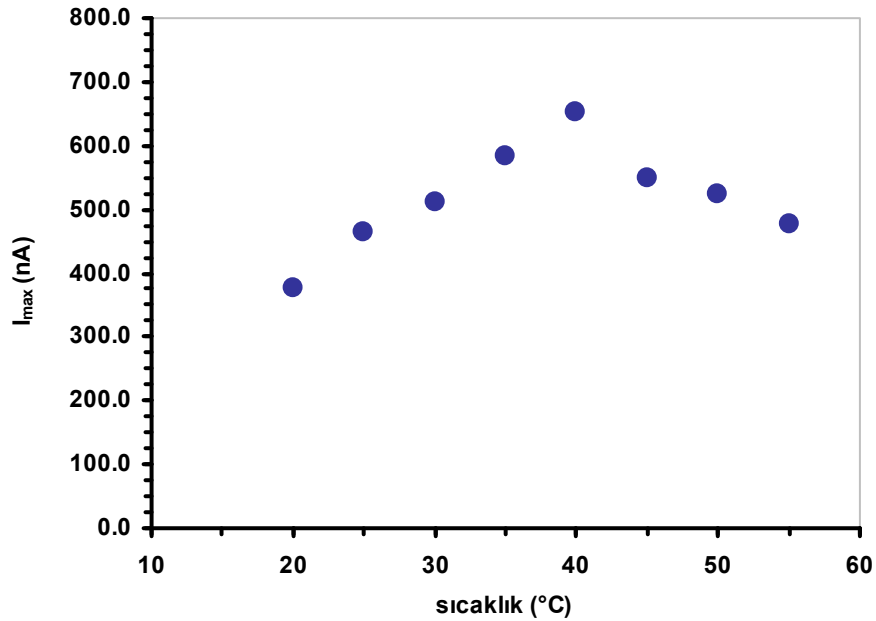


Şekil 8.34. PVF-Pt-XO biyosensörüne PtBr_2 çözeltisinde bekletme süresinin etkisi ($5,0 \text{ mg PVF mL}^{-1}$, $1,5 \text{ mM PtBr}_2$, $2,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$, $0,10 \text{ M}$ pH 7,4 fosfat tamponu, 25°C , $0,40 \text{ V}$)

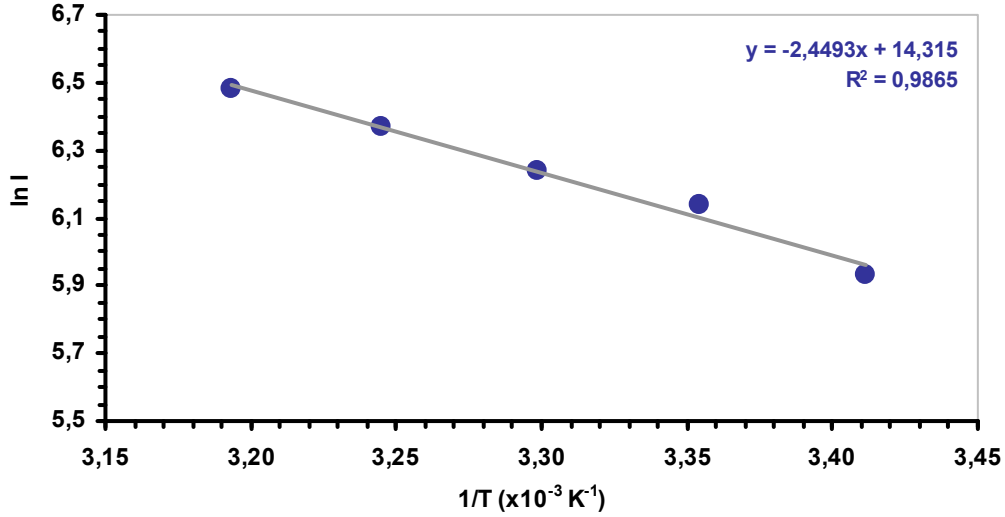
8.3.4. Sıcaklık etkisi

pH'ı 7,4 olan $0,10 \text{ M}$ fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamının sıcaklığı $20\text{--}55^\circ\text{C}$ aralığında değiştirilerek PVF-Pt-XO biyosensörüne sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Sıcaklık etkinin incelenmesinde kullanılan PVF-Pt-XO biyosensörü,

platin çalışma elektrodunun ilk olarak $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ PVF çözeltisinde 5 dakika, sonra polimer film kaplı çalışma elektrodunun $1,5 \text{ mM PtBr}_2$ çözeltisinde 10 dakika ve son olarak $2,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesiyle hazırlanmıştır. $0,40$ uygulama potansiyelinde, farklı sıcaklıklardaki ölçüm ortamında ksantin eklenerek akım cevaplarındaki değişimler gözlenmiş ve her bir sıcaklık çalışması için maksimum akım değerleri bulunmuştur. Şekil 8.35’de gösterilen maksimum akım değerleri 40°C ’ye kadar artış göstermiş, bu değerden sonraki sıcaklıklarda immobilize enzimin kararlılığını kaybetmesi sonucunda hem akım değerlerinde azalma hem de akım cevaplarında bir düzensizlik oluşmuştur. Biyosensörün yapısında bulunan platin partiküllerinin etkisi ile PVF-Pt-XO biyosensörünün kararlılığını PVF-XO biyosensörüne göre daha yüksek sıcaklıklarda koruduğu gözlenmektedir. PVF-Pt-XO biyosensörünün 20°C ’den 40°C ’ye kadar artan maksimum akım değerleri kullanılarak enzimatik reaksiyonunun hızının sıcaklıkla değişimi ve bu reaksiyonunun aktivasyon enerjisi belirlenmiştir. Enzimatik reaksiyonunun aktivasyon enerjisi Arrhenius eşitliği kullanılarak çizilen $\ln I - 1/T$ grafiğinin eğiminden $20,363 \text{ kJ mol}^{-1}$ olarak bulunmuştur.



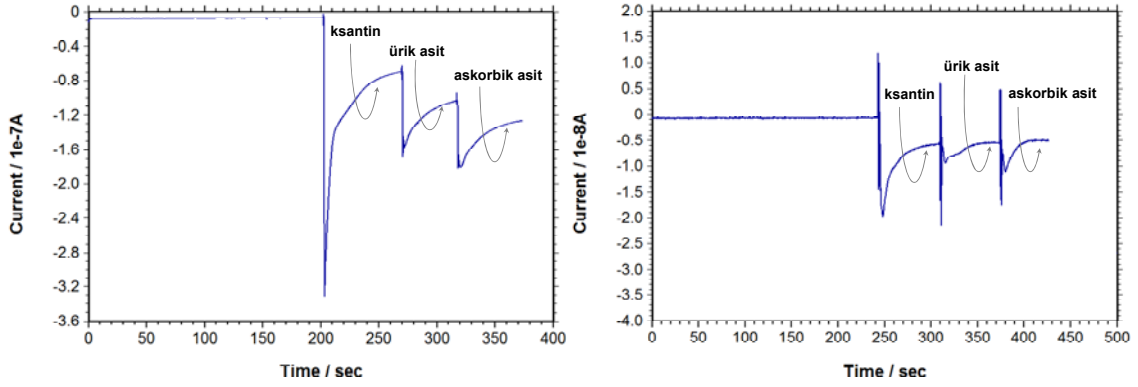
Şekil 8.35. PVF-Pt-XO biyosensörüne sıcaklığın etkisi ($5,0 \text{ mg PVF mL}^{-1}$, $1,5 \text{ mM PtBr}_2$, $2,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$, $0,10 \text{ M pH } 7,4$ fosfat tamponu, 25°C , $0,40 \text{ V}$)



Şekil 8.36. PVF-Pt-XO biyosensörü için $\ln I$ - $1/T$ grafiği

8.3.5. Girişim etkisi

PVF-Pt-XO biyosensörüne ölçüm ortamında bulunabilecek askorbik asit ve ürik asit gibi maddelerin girişim etkileri incelenmiştir. Çalışmada kullanılan PVF-Pt-XO biyosensörü, platin çalışma elektrodunun ilk olarak $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ PVF çözeltisinde 5 dakika, sonra polimer film kaplı çalışma elektrodunun $1,5 \text{ mM PtBr}_2$ çözeltisinde 3 dakika ve son olarak $2,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesiyle hazırlanmıştır. $0,40 \text{ V}$ uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan $0,10 \text{ M}$ fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına konsantrasyonları $0,10 \text{ mM}$ 'da sabit tutulan ksantin, ürik asit ve askorbik asit çözeltileri eklenmesi ile PVF-Pt-XO biyosensörünün akım cevapları izlenmiştir. Şekil 8.37(a)'da görüldüğü gibi ürik asit ve askorbik asitin girişime neden olduğu belirlenmiş ve girişimin engellenmesi amacıyla çalışma elektrodu nafyon ile modifiye edilmiştir. Nafyon ile modifiye edilen ve Naf-PVF-Pt-XO olarak tanımlanan Naf-PVF-Pt-XO biyosensörü ile aynı şartlarda çalışma tekrar edilmiştir. Çalışmalar sonucunda, Naf-PVF-Pt-XO biyosensörü ile ürik asit ve askorbik asitin gösterdiği girişimin engellendiği belirlenmiş ve Şekil 8.37(b)'de gösterilmiştir.

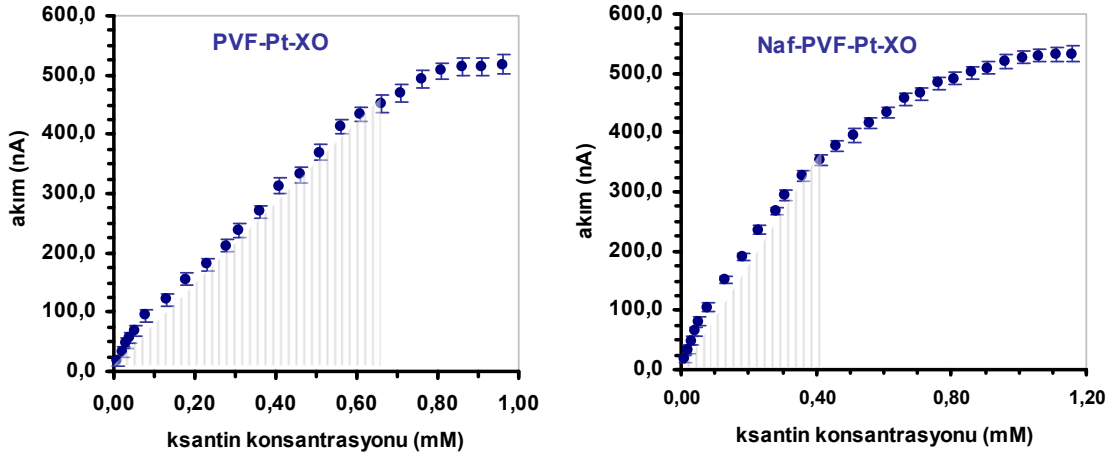


Şekil 8.37.(a) PVF-Pt-XO **(b)** Naf-PVF-Pt-XO biyosensörlerinin 0,10 mM ksantin, ürik asit ve askorbik asit eklenmesi ile elde edilen akım cevapları (5,0 mg PVF mL⁻¹, 1,5 mM PtBr₂, 2,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,40 V)

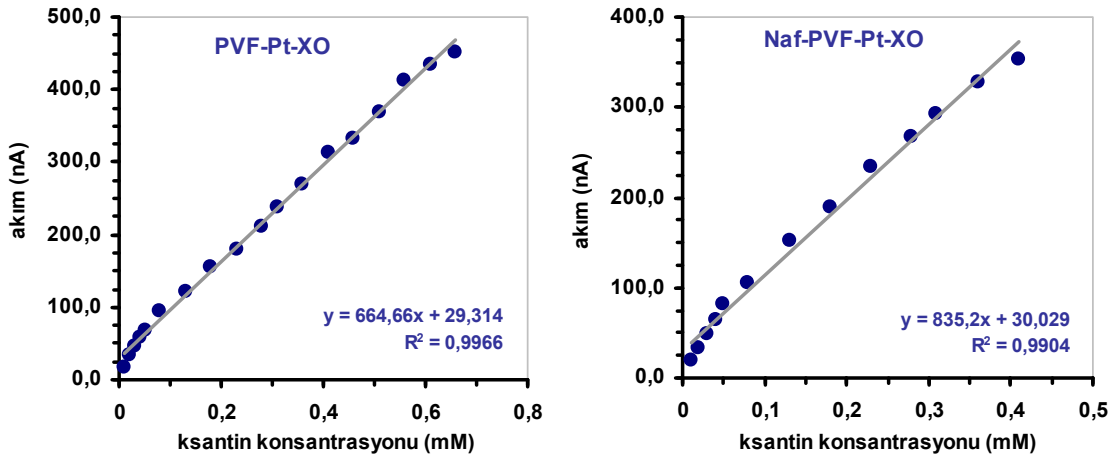
8.3.6. Substrat konsantrasyonunun etkisi

Optimize edilen şartlarda hazırlanan PVF-Pt-XO biyosensörünün doğrusal çalışma aralığının belirlenmesi amacıyla pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına eklenen ksantin konsantrasyonu ile biyosensörün 0,65 V uygulama potansiyelindeki akım cevapları incelenmiştir. PVF-Au-XO biyosensörü, platin çalışma elektrodunun ilk olarak 5,0 mg mL⁻¹ PVF çözeltisinde 5 dakika, sonra polimer film kaplı çalışma elektrodunun 1,5 mM PtBr₂ çözeltisinde 3 dakika ve son olarak 2,0 mg XO mL⁻¹ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesiyle hazırlanmıştır. Doğrusal çalışma aralığının bulunması için yapılan çalışma üç defa tekrarlanmış ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Kararlı hal akım eğrisi elde edildikten sonra ksantin eklemesi yapılmış ve değişen akım cevapları Şekil 8.38(a)'da gösterilmiştir. Aynı şartlarda yapılan çalışmalar sonucunda Naf-PVF-Pt-XO biyosensörü için elde edilen değişim ise Şekil 8.38(b)'de gösterilmiştir.

Şekil 8.39'da gösterilen substrat konsantrasyonu grafiklerine göre, PVF-Pt-XO biyosensörü için doğrusal çalışma aralığı $2,00 \times 10^{-3}$ –0,66 mM, Naf-PVF-Au-XO biyosensörü için doğrusal çalışma aralığı ise $4,00 \times 10^{-3}$ –0,41 mM olarak bulunmuştur. Her iki elektrot için gözlenebilme sınırları belirlenmiş ve PVF-Pt-XO biyosensörü için $6,00 \times 10^{-4}$ mM, Naf-PVF-Pt-XO için $1,20 \times 10^{-3}$ mM ksantin olarak bulunmuştur.

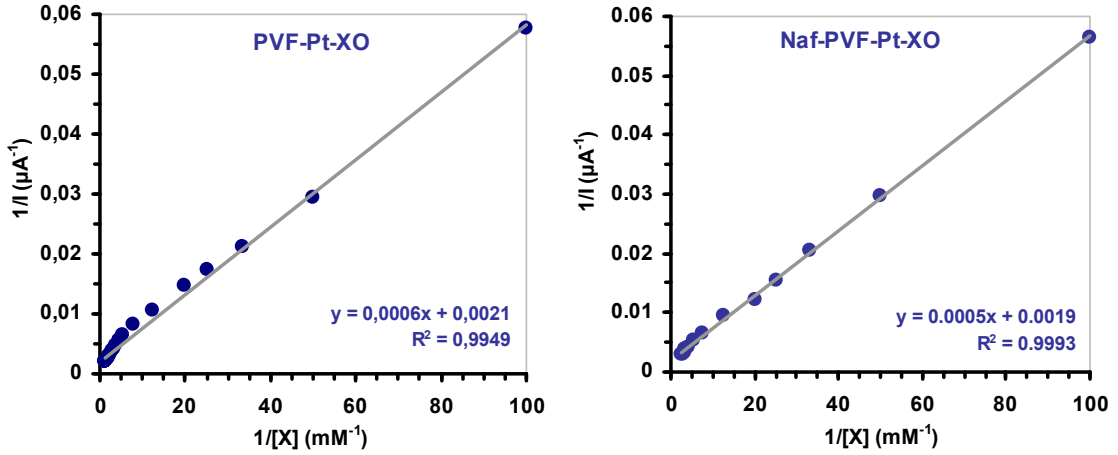


Şekil 8.38. (a) PVF-Pt-XO (b) Naf-PVF-Pt-XO biyosensörlerine ksantin konsantrasyonunun etkisi (5,0 mg PVF mL⁻¹, 1,5 mM PtBr₂, 2,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,40 V)



Şekil 8.39. (a) PVF-Pt-XO (b) Naf-PVF-Pt-XO biyosensörlerinin doğrusal çalışma aralıkları

Farklı ksantin konsantrasyonlarında elde edilen akım değişimlerinden yararlanarak Michaelis-Menten sabiti çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplanmıştır (Şekil 8.40). Görünür Michaelis-Menten sabiti, K_{mapp} , PVF-Pt-XO biyosensörü için 0,286 mM ksantin, Naf-PVF-Pt-XO biyosensörü için 0,263 mM ksantin olarak bulunmuştur. Ayrıca Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla her iki biyosensörün duyarlılığı hesaplanmış ve PVF-Pt-XO biyosensörü için 53,08 $\mu\text{A mM}^{-1}\text{cm}^{-2}$, Naf-PVF-Pt-XO biyosensörü için 63,69 $\mu\text{A mM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ olarak belirlenmiştir.



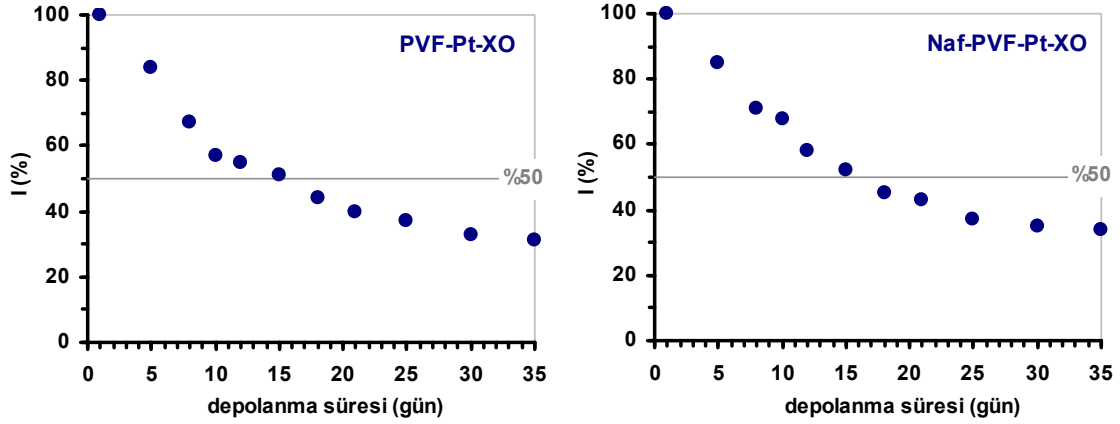
Şekil 8.40.(a) PVF-Pt-XO (b) Naf-PVF-Pt-XO biyosensörleri için Lineweaver-Burk grafikleri

8.3.7. PVF-Pt-XO biyosensörünün kararlılığı ve tekrarlanabilirliği

PVF-Pt-XO biyosensörünün kullanım kararlılığının araştırılması için PVF-Pt-XO biyosensörü, önceki çalışmalarda optimize edilen şartlarda, yani çalışma elektrodunun ilk olarak $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ PVF çözeltisinde 5 dakika, sonra polimer film kaplı çalışma elektrodunun $1,5 \text{ mM PtBr}_2$ çözeltisinde 3 dakika ve son olarak $2,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesiyle hazırlanmıştır. Gün içinde tekrar kullanımlarda PVF-Pt-XO biyosensörü ile pH'ı 7,4 olan $0,10 \text{ M}$ fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına ksantin eklemesi (ölçüm ortamında $0,30 \text{ mM}$ ksantin çözeltisi) yapılarak $0,40 \text{ V}$ uygulama potansiyelindeki akım cevapları incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda, PVF-Pt-XO biyosensörünün gün içinde yapılan 9 ayrı ölçümden sonra aktivitesini %50 oranında koruduğu belirlenmiştir.

Depolanma kararlılığı araştırılması için PVF-Pt-XO biyosensörü yukarıda yarıntılı olarak verilen optimum şartlarda hazırlanmış ve $0,40 \text{ V}$ uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan $0,10 \text{ M}$ fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına ksantin eklemesi (ölçüm ortamında $0,30 \text{ mM}$ ksantin çözeltisi) yapılarak PVF-Pt-XO biyosensörünün akım cevaplarının günlük periyotlarda yapılan ölçümler sonucundaki değişimi incelenmiştir. PVF-Pt-XO biyosensörü ile 35 gün boyunca yapılan çalışmalar sonucunda, biyosensör aktivitesinin 15 gün sonunda % 50 oranında kaybettiği belirlenmiştir (Şekil 8.41(a)). Naf-PVF-Pt-XO biyosensörü ile yapılan

çalışmalarda ise biyosensörün aktivitesinin 8 gün sonunda %30, 15 gün sonunda %50, 35 gün sonunda % 65 oranında azaldığı belirlenmiştir (Şekil 8.41(b)).

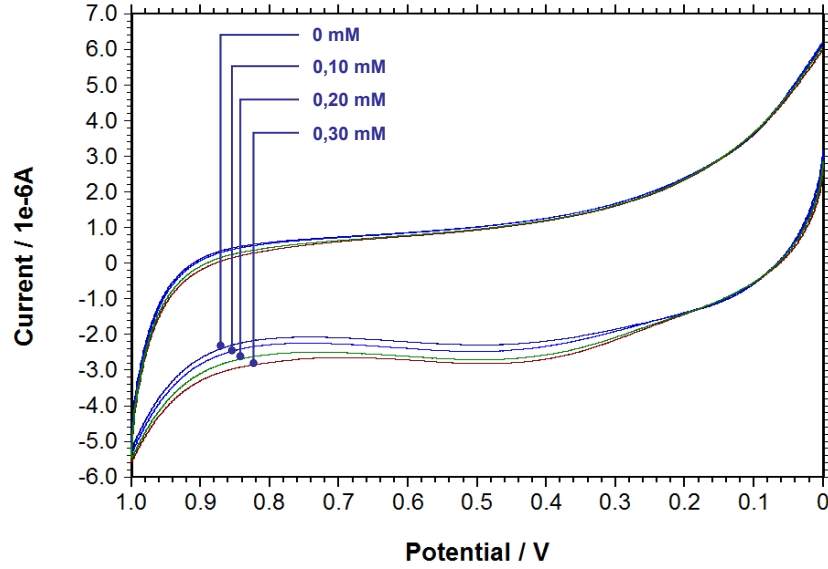


Şekil 8.41.(a) PVF-Pt-XO (b) Naf-PVF-Pt-XO biyosensörlerinin depolanma kararlılığı (5,0 mg PVF mL⁻¹, 1,5 mM PtBr₂, 2,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,40 V)

PVF-Pt-XO ve Naf-PVF-Pt-XO biyosensörlerinin ksantin çözeltisine verdikleri akım cevapları arasındaki uyum dercesini belirlemek amacıyla tekrarlanabilirlik araştırılması yapılmıştır. Kararlılık çalışmasındaki şartlara uygun olarak PVF-Pt-XO ve Naf-PVF-Pt-XO biyosensörleri hazırlanmış ve aynı ksantin çözeltisine (ölçüm ortamında 0,30 mM ksantin çözeltisi) verdiği akım cevapları belirlenerek bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Aynı şartlarda hazırlanan 5 biyosensör ile yapılan çalışma sonucunda bağıl standart sapma değerleri PVF-Pt-XO için %4,70 ve Naf-PVF-Pt-XO %2,78 olarak bulunmuştur.

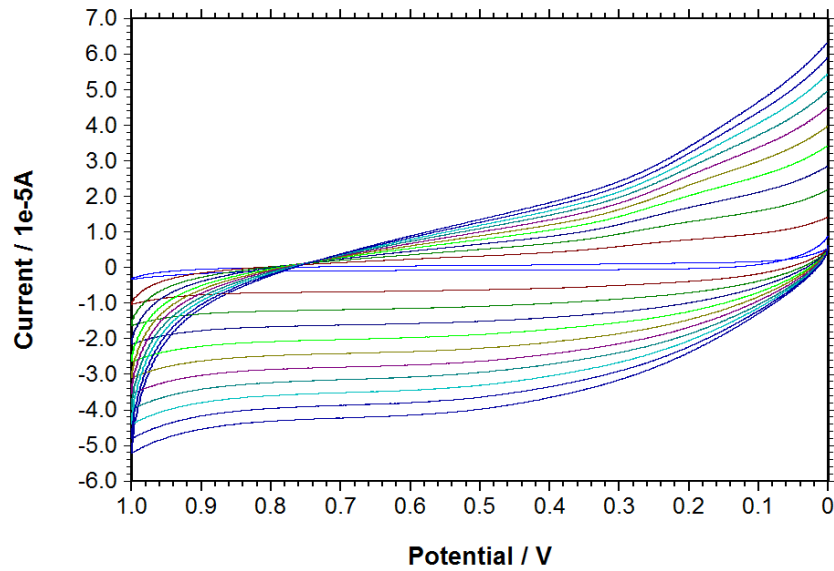
8.3.8. PVF-Pt-XO biyosensörünün voltametrik yöntem ile incelenmesi

PVF-Pt-XO biyosensörünün akım cevapları voltametrik olarak dönüşümlü voltametri yöntemi ile 0,0-1,0 V arasında potansiyel taraması yapılarak gözlenmiştir. Bu yöntemde kullanılan PVF-Pt-XO biyosensörü optimum şartlarda hazırlanmış ve voltamogramlar pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamında kaydedilmiştir.

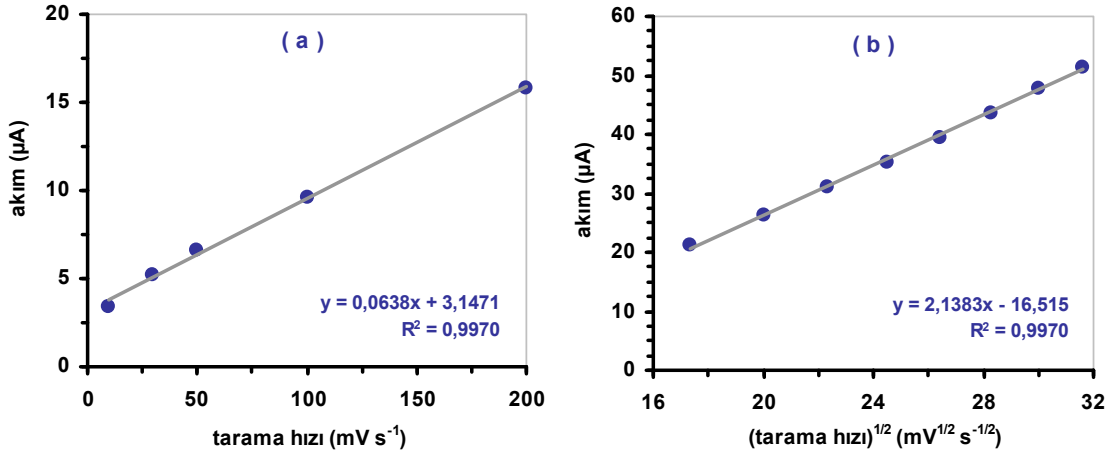


Şekil 8.42. PVF-Pt-XO biyosensörü için elde edilen voltamogramlar (5,0 mg PVF mL⁻¹, 1,5 mM PtBr₂, 2,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)

Enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan H₂O₂'in yükseltgenmesine potansiyel tarama hızının etkisini incelemek amacıyla pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde PVF-XO biyosensörü için 10-1000 mV s⁻¹ aralığındaki farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltamogramlar kaydedilmiştir (Şekil 8.43).



Şekil 8.43. PVF-Pt-XO biyosensörü için farklı potansiyel tarama hızlarında elde edilen voltamogramlar (5,0 mg PVF mL⁻¹, 1,5 mM PtBr₂, 2,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)



Şekil 8.44. PVF-Pt-XO biyosensörüne ait akım cevaplarının (a) farklı potansiyel tarama hızları, (b) potansiyel tarama hızlarının karekökü ile değişimi

H_2O_2 'in yükseltgenmesine ait pik akımlarının potansiyel tarama hızı ile değişimi Şekil 8.44(a)'da gösterilmiştir. PVF-Pt-XO biyosensörü için elde edilen veriler PVF-XO ve PVF-Au-XO biyosensörlerinde elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. 10-200 mVs^{-1} tarama hızı aralığındaki düşük tarama hızlarında gözlenen doğrusallık bu tarama hızı aralığında elektrokimyasal reaksiyonun yüzey kontrollü olduğunu göstermektedir. Şekil 8.44(b)'de potansiyel tarama hızının karekökü ile H_2O_2 'in yükseltgenmesine ait pik akımlarının değişimi incelendiğinde ise 200-1000 mVs^{-1} aralığında tespit edilen doğrusallık ise yüksek tarama hızlarında elektrot üzerindeki reaksiyonun difüzyon kontrollü gerçekleştiğini göstermektedir.

8.3.9. PVF-Pt-XO biyosensörü ile gerçek numune çalışması

Aminocardol(numune-I) ve Teokap(numune-II) ilaçları ile PVF-Pt-XO biyosensörünün gerçek numunelerdeki akım cevapları incelenmiştir. Gerçek numune analizinde PVF-Pt-XO biyosensörü önceki çalışmalarda optimize edilen şartlarda hazırlanmış ve ölçüm ortamına eklenen ilaç numunesi içerisindeki ksantin tayini yapılmıştır. PVF-Pt-XO biyosensörü ile yapılan analizde numune-I çözeltisinden 20 μL , numune-II çözeltisinden 15 μL kullanılmıştır. Ölçüm ortamına eklenen gerçek numune ve substrat çözeltisi ile 0,40 V uygulama potansiyelinde elde edilen akım cevaplarındaki değişim izlenmiş ve bu akım cevapları kullanılarak bulunan sonuçlar Çizelge 8.3'de verilmiştir.

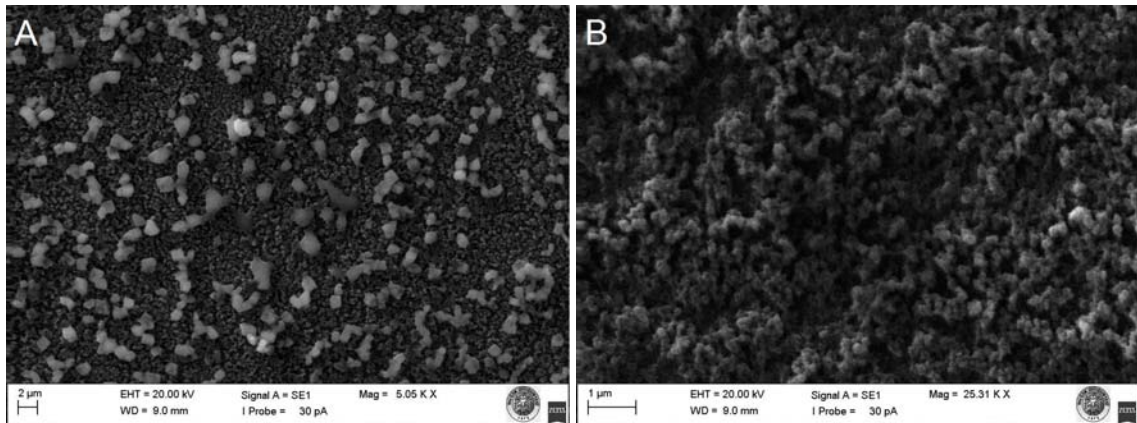
Çizelge 8.3. PVF-Pt-XO biyosensörü için gerçek numune analizleri

Numune	Gerçek değer, mM	Eklenen ksantin kons., mM	Analiz değeri*, mM	Geri kazanım, %
I	0,1140	0	0,1200 ± 0,0141	-
		0,1000	0,2165 ± 0,0160	96,51
		0,2000	0,3104 ± 0,0171	95,22
		0,3000	0,4042 ± 0,0211	94,72
II	0,0833	0	0,0757 ± 0,0117	-
		0,1000	0,1714 ± 0,0145	95,72
		0,2000	0,2648 ± 0,0174	94,57
		0,3000	0,3579 ± 0,0205	94,06

* 3 analizin ortalaması ve bu analize ait standart sapma gösterilmektedir.

8.3.10. PVF-Pt-XO biyosensörüne ait SEM görüntüleri

PVF-Pt-XO biyosensörünün yüzey morfolojisinin araştırılması amacıyla, optimum şartlarda hazırlanan iki farklı yüzeyin SEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 8.45(a)'da verilen SEM görüntüsünde PVF kaplı yüzey üzerine platin tanecikleri biriktirilmiştir. Şekilde platin taneciklerinin PVF-Au-XO biyosensöründe biriktirilen altın taneciklerine göre daha büyük patikül boyutunda olduğu gözlenmiştir. Şekil 8.45(b)'de ise platin biriktirilmiş PVF kaplı yüzey üzerine enzim immobilizasyonu sonrasında elde edilen SEM görüntüsü verilmiştir. Enzim immobilizasyonu sonrasında platin tanecikleri ile kaplı yüzeyin tamamen enzim molekülleri ile kaplandığı gözlenmiştir.

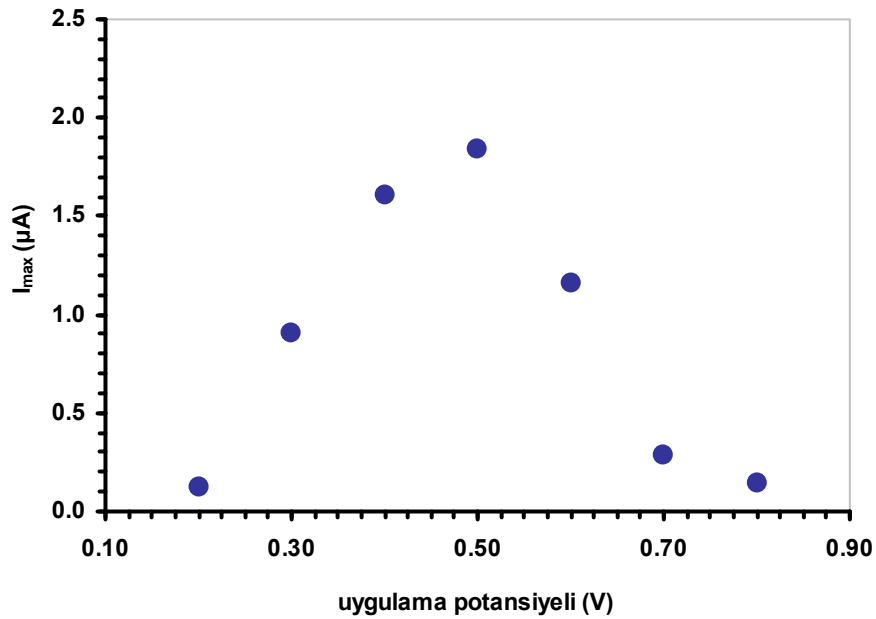


Şekil 8.45. PVF-Pt-XO biyosensörüne ait SEM görüntüleri, (a) PVF-Pt yüzeyi, (b) PVF-Pt-XO yüzeyi

8.4. PVF⁺XO⁻ Biyosensörüne Ait Araştırma Sonuçları

8.4.1. Uygulama potansiyelinin etkisi

PVF⁺XO⁻ biyosensörüne uygulama potansiyelinin etkisinin incelenmesi amacıyla 0,20–0,80 V potansiyel aralığında çalışmalar yapılmıştır. PVF⁺XO⁻ biyosensörü 0,7 V’da hazırlanan $9,900 \times 10^{-7}$ mol PVF cm⁻² (3 mC) kalınlığındaki PVF film ile kaplanmış çalışma elektrodu 1 mg mL⁻¹ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilerek hazırlanmıştır. 0,20-0,80 V potansiyel aralığında, pH’ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına eklenen ksantin ile hazırlanan PVF⁺XO⁻ biyosensörlerinin akım cevapları izlenmiş ve maksimum akım değerleri bulunmuştur. Şekil 8.46’de her bir uygulama potansiyelinde bulunan maksimum akım değerleri incelendiğinde maksimum aktivitesi 0,50 V olduğu belirlenmiş ve bundan sonra PVF⁺XO⁻ biyosensörü ile yapılan bütün çalışmalarda uygulama potansiyeli olarak 0,50 V belirlenmiştir.

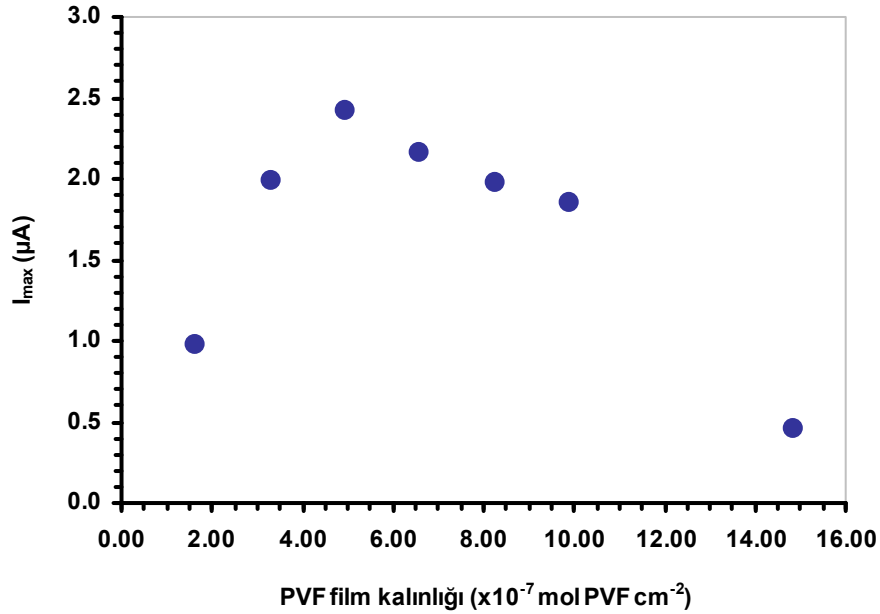


Şekil 8.46. PVF⁺XO⁻ biyosensörüne uygulama potansiyelinin etkisi ($9,900 \times 10^{-7}$ mol PVF cm⁻², 1,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 25 °C)

8.4.2. PVF⁺ClO₄⁻ film kalınlığının etkisi

PVF⁺XO⁻ biyosensörü ile incelenmesi gereken parametrelerden bir tanesinde çalışma elektrodu üzerine kaplanan polimer filmin kalınlığıdır. Bu amaçla, $1,650 \times 10^{-7}$

mol PVF cm^{-2} (0,5 mC) – $1,485 \times 10^{-6}$ mol PVF cm^{-2} (4,5 mC) kalınlıktaki aralıkta 0,7 V sabit potansiyelde hazırlanan polimer filmleri kullanılmıştır. Hazırlanan polimer film kaplı elektrotlar 1 mg mL^{-1} enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilerek biyosensörler hazırlanmış ve pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına eklenen ksantin miktarı ile akım değişimleri gözlenmiştir. Elde edilen akım değişimleri ile maksimum akım değerleri bulunmuş ve Şekil 8.47'de gösterilmiştir.



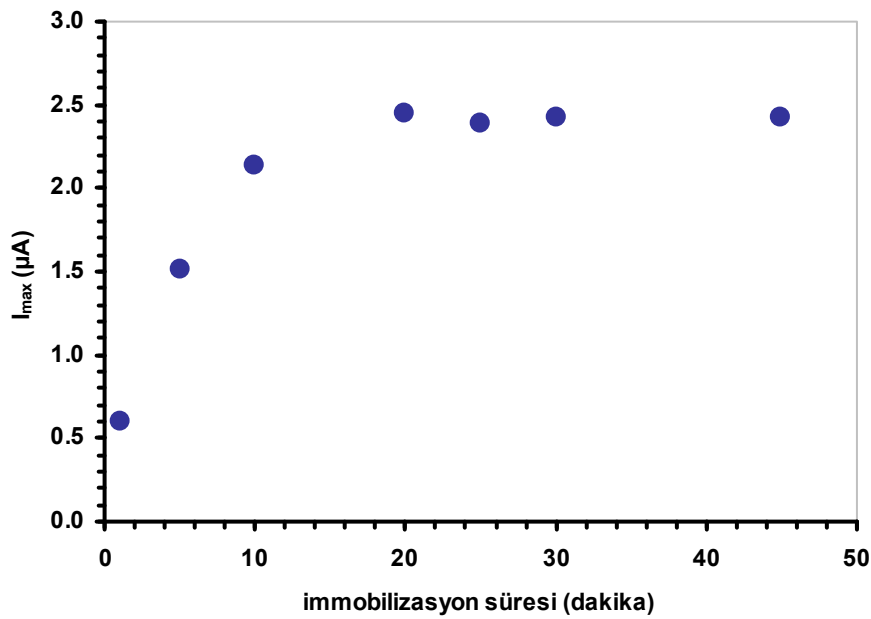
Şekil 8.47. PVF^+XO^- biyosensörüne PVF film kalınlığının etkisi ($1,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 25°C , 0,50 V)

Grafikte maksimum akım değerleri incelendiğinde, $4,950 \times 10^{-7} \text{ mol PVF cm}^{-2}$ film kalınlığına kadar akım değerlerinde artış gözlenirken, bu kalınlığın üzerinde ise akım değerlerinde azalma gözlenmiştir. Polimer film kalınlığının artması sonucunda difüzyon hızını kısıtlaması nedeniyle akım değerlerinde azalma gözlenmektedir.

8.4.3. XO çözeltisinde bekletme süresinin etkisi

$\text{PVF}^+\text{ClO}_4^-$ polimer film kaplı elektrodun enzim çözeltisinde bekletme süresi 1-45 dakika aralığındaki farklı zamanlarda değiştirilerek hazırlanan PVF^+XO^- biyosensörlerine enzim çözeltisinde bekletme süresinin etkisi araştırılmıştır. PVF^+XO^- biyosensörleri, platin çalışma elektrodu $4,950 \times 10^{-7} \text{ mol PVF cm}^{-2}$ film kalınlığında polimer film ile kaplandıktan sonra $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ enzim çözeltisinde belirli sürelerde bekletilerek hazırlanmıştır. 0,50 V uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan 0,10 M

fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına eklenen ksantin ile hazırlanan her bir PVF^+XO^- biyosensörünün akım cevapları izlenmiş ve bulunan maksimum akım değerleri Şekil 8.48’de gösterilmiştir. Polimer matriks içerisine enzim immobilizasyonunun elektrodun enzim çözeltisinde bekletme süresi ile orantılı olduğu düşünüldüğünde, 20 dakika bekletme süresine kadar maksimum akım değerlerinde artış gözlenmiştir. 20 dakikanın üzerindeki bekletme sürelerinde ise akım değerlerinde herhangi bir akım değişiminin gözlenmemiş olması polimer matriks içerisine immobilize olan enzim miktarının doygunluk noktasına ulaşması şeklinde yorumlanmıştır.

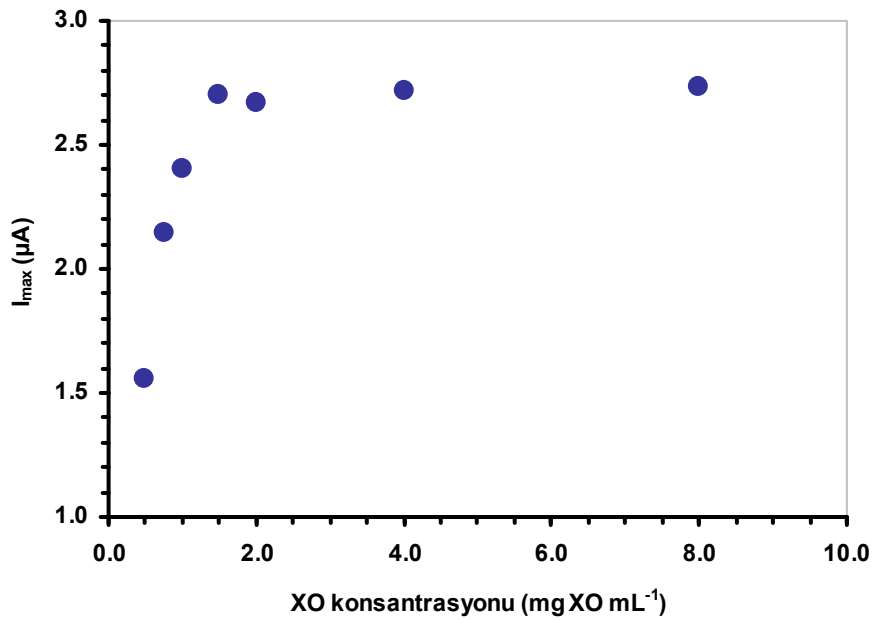


Şekil 8.48. PVF^+XO^- biyosensörüne XO çözeltisinde bekletme süresinin etkisi ($4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm^{-2} , 1,0 mg XO mL^{-1} , 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 25 °C, 0,50 V)

8.4.4. XO konsantrasyonunun etkisi

$PVF^+ClO_4^-$ polimer film kaplı elektrodun enzim immobilizasyonu için kullanılan enzim çözeltisinin konsantrasyonu $0,50-8$ $mgmL^{-1}$ aralığında değiştirilerek PVF^+XO^- biyosensörüne enzim konsantrasyonunun etkisi araştırılmıştır. Bu çalışma için, PVF^+XO^- biyosensörü ilk olarak çalışma elektrodunun $4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm^{-2} film kalınlığında polimer film ile kaplanması, diğer aşamada ise polimer film kaplı elektrodun farklı konsantrasyonlardaki enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesiyle hazırlanmıştır. PVF^+XO^- biyosensörü ile pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu

kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına ksantin eklenmesiyle değişen akım değerleri incelenmiş ve her bir enzim konsantrasyon değeri için maksimum akım değerleri belirlenmiştir (Şekil 8.49). Maksimum akım değerleri incelendiğinde $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ XO konsantrasyonuna kadar akım artışı gözlenirken, daha sonraki konsantrasyonlarda bir değişim gözlenmemektedir. PVF^+XO^- biyosensörleri XO çözeltisinde eşit sürelerde bekletilmiş olmalarına rağmen, $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ XO konsantrasyonunun altında daha düşük akım değerleri gözlenmiştir. Bu durum, $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ XO konsantrasyonunun altında kullanılan enzim çözeltilerinde enzimin polimer matriks içerisinde doygunluk seviyesine ulaşmadığı şeklinde açıklanmıştır.

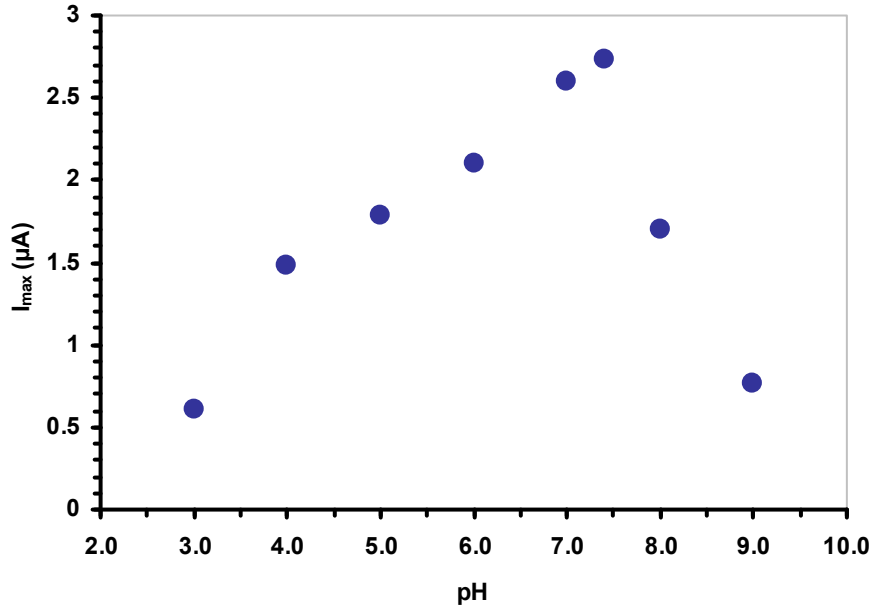


Şekil 8.49. PVF^+XO^- biyosensörüne XO konsantrasyonunun etkisi ($4,950 \times 10^{-7} \text{ mol PVF cm}^{-2}$, $0,10 \text{ M}$ pH 7,4 fosfat tamponu, 25°C , $0,50 \text{ V}$)

8.4.5. pH etkisi

$0,10 \text{ M}$ fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamının pH değeri 3-9 aralığında değiştirilerek PVF^+XO^- biyosensörüne pH değerinin etkisi araştırılmıştır. PVF^+XO^- biyosensörü çalışma elektrodunun $4,950 \times 10^{-7} \text{ mol PVF cm}^{-2}$ film kalınlığında polimer film ile kaplanmasından sonra elektrodun $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesiyle hazırlanmıştır. $0,50 \text{ V}$ uygulama potansiyelinde, PVF^+XO^- biyosensörlerinin akım cevapları farklı pH değerlerindeki $0,10 \text{ M}$ fosfat tamponları ile oluşturulan ölçüm ortamında incelenmiştir. Her bir pH değerinde elde edilen akım

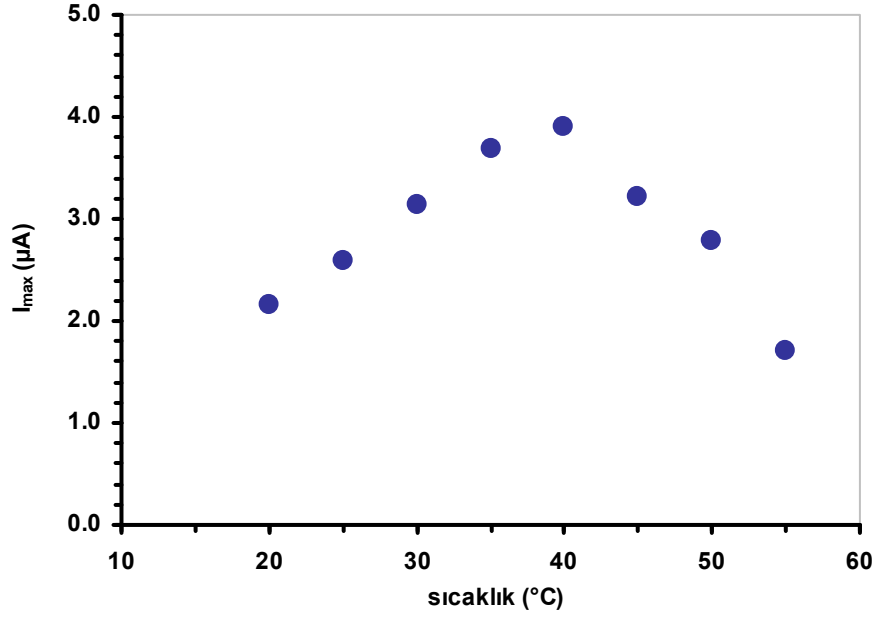
cevapları kullanılarak Şekil 8.50’de gösterilen maksimum akım değerleri bulunmuştur. Grafikte maksimum akım değeri en yüksek pH değeri 7,4 olarak bulunmuştur.



Şekil 8.50. PVF⁺XO⁻ biyosensörüne pH etkisi ($4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm⁻², 1,5 mg XO mL⁻¹, 0,10 M fosfat tamponu, 25 °C, 0,50 V)

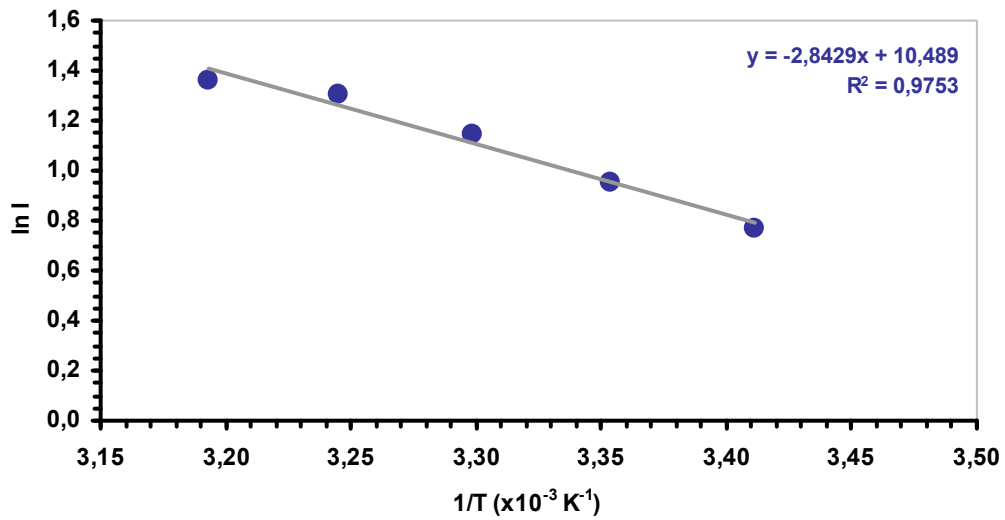
8.4.6. Sıcaklık etkisi

pH’ı 7,4 olarak belirlenen 0,10 M fosfat tamponu ile oluşturulan ölçüm ortamının sıcaklığı 20-55 °C aralığında değiştirilerek PVF⁺XO⁻ biyosensörüne sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. PVF⁺XO⁻ biyosensörü çalışma elektrodunun $4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm⁻² film kalınlığında polimer film ile kaplanmasından sonra elektrodun 1,5 mg mL⁻¹ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesiyle hazırlanmıştır. 0,50 V uygulama potansiyelinde, ölçüm ortamına eklenen ksantin çözeltisinin konsantrasyonu ile değişen akım cevapları izlenmiş ve çalışılan sıcaklıklarda maksimum akım değerleri bulunarak değerlendirilmiştir. Buna göre Şekil 8.51’de gösterilen maksimum akım değerleri incelendiğinde 40°C sıcaklığa kadar bir artış gözlenirken daha yüksek sıcaklıklarda önceki sıcaklık çalışmalarında belirtildiği gibi enzimin denatürasyonundan kaynaklanan bir azalma gözlenmiştir.



Şekil 8.51. PVF⁺XO⁻ biyosensörüne sıcaklığın etkisi ($4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm⁻², 1,5 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 0,50 V)

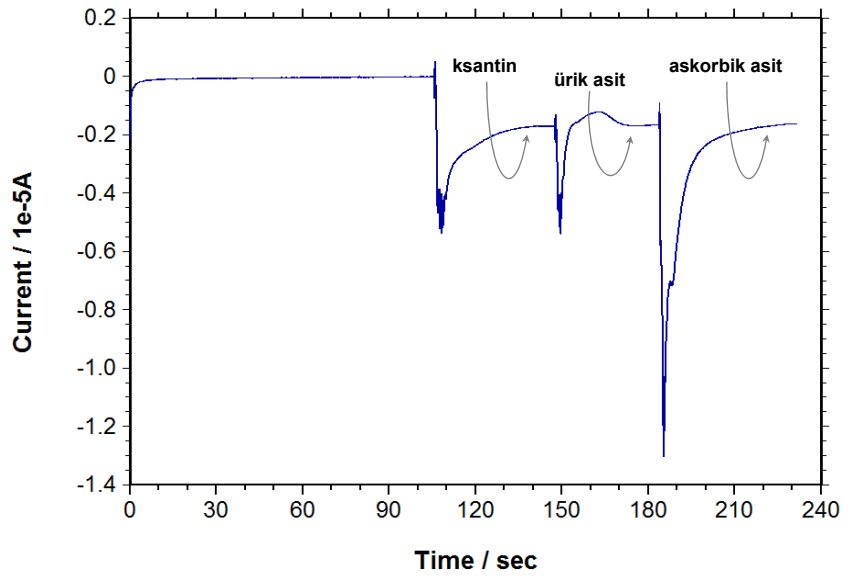
20-40°C sıcaklık aralığında PVF⁺XO⁻ biyosensörü ile gerçekleşen enzimatik reaksiyonun hızındaki değişimin sonucunda artan maksimum akım değerleri kullanılarak Şekil 8.52’de gösterilen $\ln I$ - $1/T$ grafiği çizilmiştir. Enzimatik reaksiyonunun aktivasyon enerjisi Arrhenius eşitliği kullanılarak çizilen $\ln I$ - $1/T$ grafiğinin eğiminden 23,636 kJ mol⁻¹ olarak bulunmuştur.



Şekil 8.52. PVF⁺XO⁻ biyosensörü için $\ln I$ - $1/T$ grafiği

8.4.7. Girişim etkisi

Enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan ürik asit ve ölçüm ortamında bulunabilecek askorbik asit gibi girişim yapabilen maddeler kullanılarak hazırlanan PVF^+XO^- biyosensörüne bu maddelerin girişim etkileri incelenmiştir. Çalışmalarda kullanılan PVF^+XO^- biyosensörü hazırlanırken çalışma elektrodu $4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm^{-2} film kalınlığında polimer film ile kaplanmış daha sonra polimer film kaplı elektrot $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilerek enzim immobilizasyon aşaması tamamlanmıştır. pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına konsantrasyonları 0,50 mM'da sabit tutulan ksantin, ürik asit ve askorbik asit çözeltileri eklenmesi ile hazırlanan PVF^+XO^- biyosensörünün 0,50 V uygulama potansiyelinde akım cevapları izlenmiştir. Şekil 8.53'de gösterilen akım cevapları incelendiğinde, ölçüm ortamına ürik asit ve askorbik asit eklemelerinde herhangi bir akım değişimi olmadığı gözlenmiş ve PVF^+XO^- biyosensörüne ürik asit ve askorbik asitin girişim etkilerinin olmadığı belirlenmiştir.

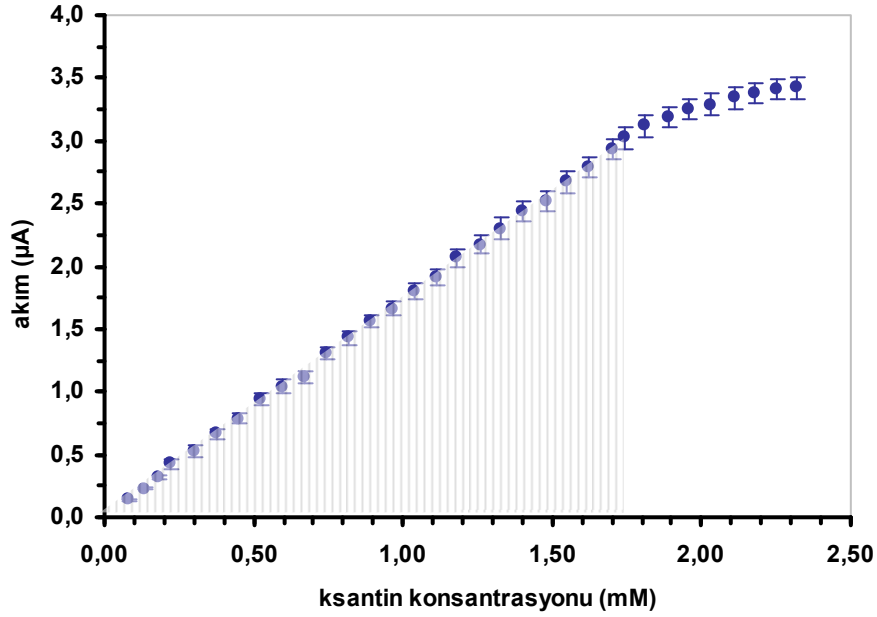


Şekil 8.53. PVF^+XO^- biyosensörünün 0,50 mM ksantin, ürik asit ve askorbik asit eklenmesi ile elde edilen akım cevapları ($4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm^{-2} , $1,5 \text{ mg XO mL}^{-1}$, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, $30^\circ C$, 0,50 V)

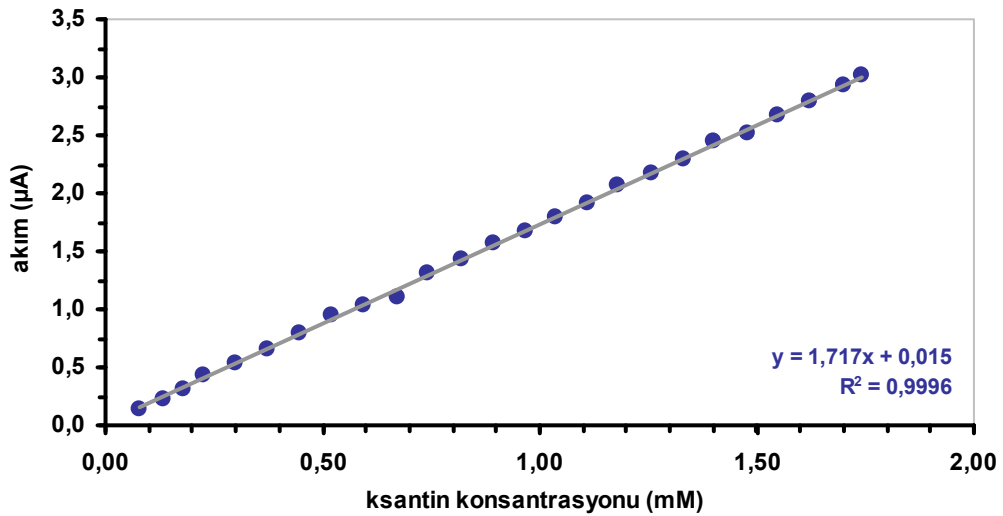
8.4.8. Substrat konsantrasyonunun etkisi

PVF^+XO^- biyosensörünün doğrusal çalışma aralığının belirlenmesi amacıyla, pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına eklenen

ksantin konsantrasyonu ile biyosensörün 0,50 V uygulama potansiyelinde akım cevaplarındaki değişim incelenmiştir. Bu çalışma için PVF⁺XO⁻ biyosensörü, ilk olarak çalışma elektrodunun $4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm⁻² film kalınlığında polimer film ile kaplanması ve daha sonra polimer film kaplı elektrodun 1,5 mg mL⁻¹ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesiyle hazırlanmıştır. Doğrusal çalışma aralığının bulunması için yapılan çalışma üç defa tekrarlanmış ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Şekil 8.54).

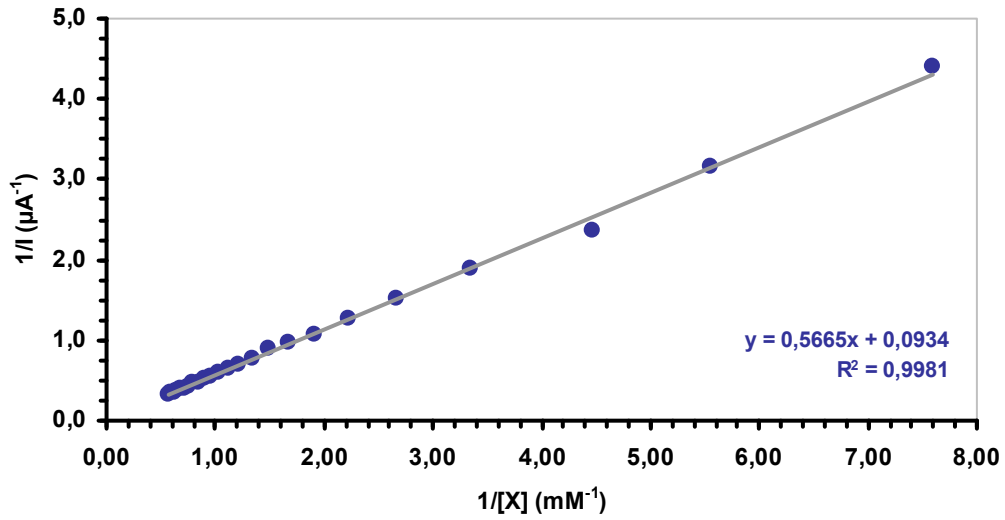


Şekil 8.54. PVF⁺XO⁻ biyosensörüne ksantin konsantrasyonunun etkisi ($4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm⁻², 1,5 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,50 V)



Şekil 8.55. PVF⁺XO⁻ biyosensörünün doğrusal çalışma aralığı

Şekil 8.55’de gösterilen substrat konsantrasyonu grafiğine göre, PVF^+XO^- biyosensörü için doğrusal çalışma aralığı $1,73 \times 10^{-3}$ – $1,74$ mM olarak bulunmuştur. Ayrıca, PVF^+XO^- biyosensörü için gözlenebilme sınırı da belirlenmiş ve $5,20 \times 10^{-4}$ mM ksantin olarak bulunmuştur. Doğrusal çalışma aralığında elde akım değişimlerinden yararlanarak Michaelis-Menten sabiti çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplanmıştır (Şekil 8.56). Görünür Michaelis-Menten sabiti, K_{mapp} , PVF^+XO^- biyosensörü için 6,065 mM ksantin olarak bulunmuştur. Ayrıca Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla PVF^+XO^- biyosensörünün duyarlılığı da hesaplanmış ve $56,22 \mu A mM^{-1} cm^{-2}$ olarak belirlenmiştir.

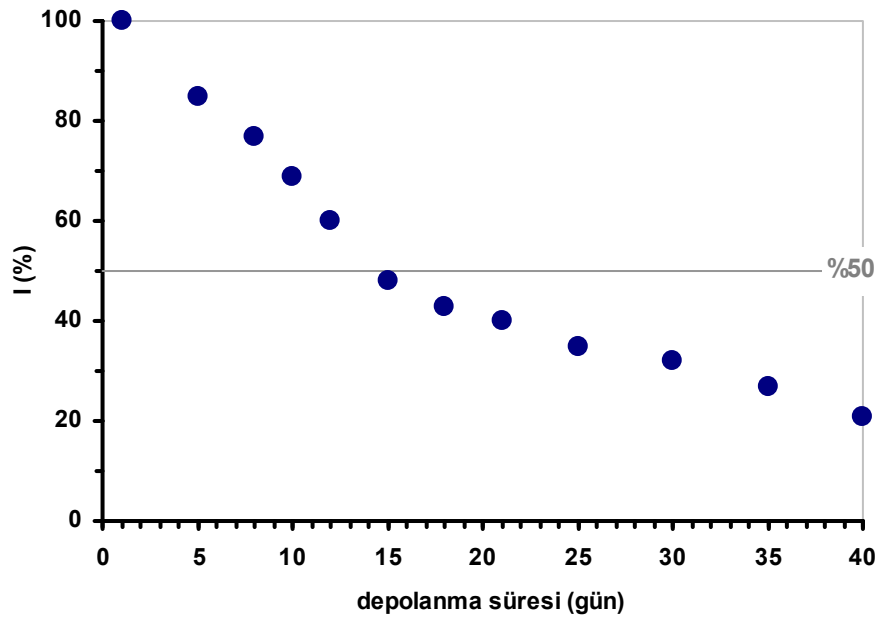


Şekil 8.56. PVF^+XO^- biyosensörü için Lineweaver-Burk grafikleri

8.4.9. PVF^+XO^- biyosensörünün kararlılığı ve tekrarlanabilirliği

PVF^+XO^- biyosensörünün kullanım kararlılığının araştırılması için $4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm^{-2} film kalınlığındaki polimer film kaplı elektrodun $1,5 mg mL^{-1}$ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesiyle hazırlanan PVF^+XO^- biyosensörü kullanılmıştır. 0,50 V uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına ksantin eklemesi (ölçüm ortamında 0,75 mM ksantin çözeltisi) yapılarak PVF^+XO^- biyosensörünün akım cevaplarının gün içinde tekrar kullanımlar sonucunda değişimi incelenmiştir. Buna göre, PVF^+XO^- biyosensörü gün içinde yapılan 12 ayrı ölçümden sonra aktivitesini %50 koruduğu belirlenmiştir.

PVF⁺XO⁻ biyosensörünün depolama kararlılığı araştırılması için PVF⁺XO⁻ biyosensörü, önceki çalışmalarda optimize edilen şartlarda hazırlanmıştır. Biyosensör çalışmalar dışında +4°C’de buzdolabında ve pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde muhafaza edilmiştir. 0,50 V uygulama potansiyelinde, pH’ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına ksantin eklemesi (ölçüm ortamında 0,75 mM ksantin çözeltisi) yapılarak PVF⁺XO⁻ biyosensörünün akım cevaplarının günlük periyotlarda yapılan ölçümler sonucundaki değişimi incelenmiştir. PVF⁺XO⁻ biyosensörü ile 40 gün boyunca yapılan çalışmalar sonucunda, biyosensör aktivitesinin 15 gün sonunda % 50 oranında koruduğu belirlenmiştir (Şekil 8.57).

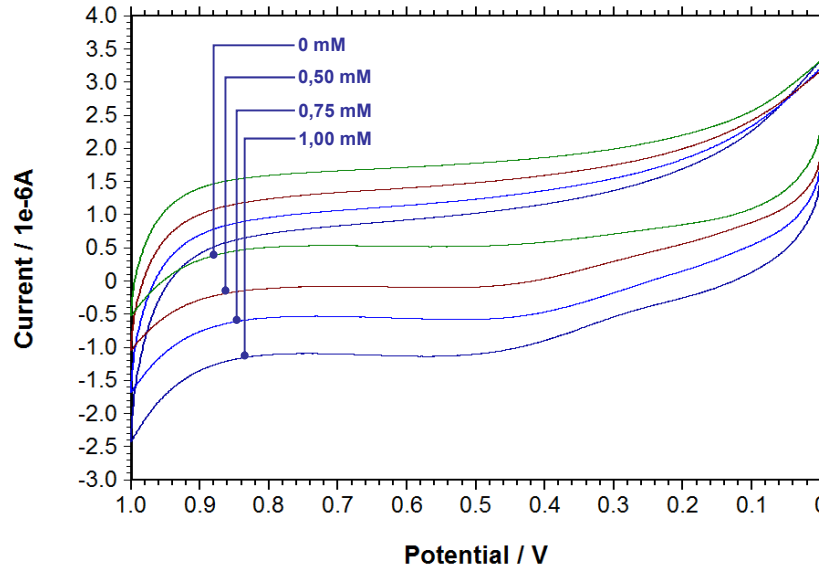


Şekil 8.57. PVF⁺XO⁻ biyosensörünün depolanma kararlılığı ($4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm⁻², 1,5 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,50 V)

Akım cevapları arasındaki uyum dercesini gösteren tekrarlanabilirliğin (kesinlik) araştırılması için kararlılık çalışmasındaki şartlara uygun olarak PVF⁺XO⁻ biyosensörleri hazırlanmış ve aynı ksantin çözeltisine (ölçüm ortamında 0,75 mM ksantin çözeltisi) verdiği akım cevapları belirlenerek bağıl standart sapma değeri hesaplanmıştır. Aynı şartlarda hazırlanan 5 biyosensör ile yapılan çalışma sonucunda bağıl standart sapma %3,30 olarak bulunmuştur.

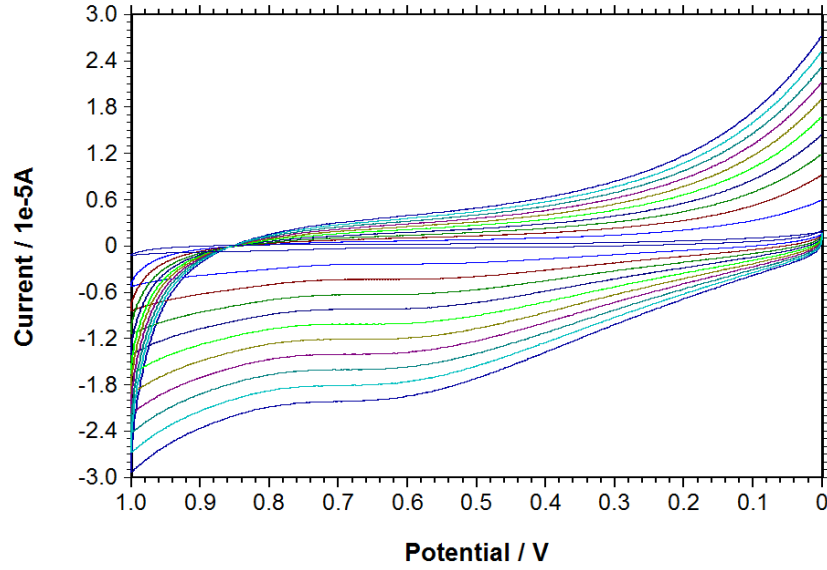
8.4.10. PVF⁺XO⁻ biyosensörünün voltametrik yöntem ile incelenmesi

Çalışma elektrodunun $4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm⁻² film kalınlığında polimer film ile kaplanması ve daha sonra polimer film kaplı elektrodun 1,5 mg mL⁻¹ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesiyle hazırlanan PVF⁺XO⁻ biyosensörü ile akım değerleri dönüşümlü voltametri yöntemi ile 0,0-1,0 V arasında potansiyel taraması yapılarak incelenmiştir. Kararlı akım eğrisi elde edildikten sonra ölçüm ortamına artan ksantin konsantrasyonlarında substrat eklenmiş ve her ekleme sonrasında elde edilen voltamogramlar Şekil 8.58’de gösterilmiştir. Grafikte verilen voltamogramlar incelendiğinde, PVF⁺XO⁻ biyosensörünün akım değerlerinin artan ksantin konsantrasyonu ile orantılı olarak arttığı gözlenmiştir.

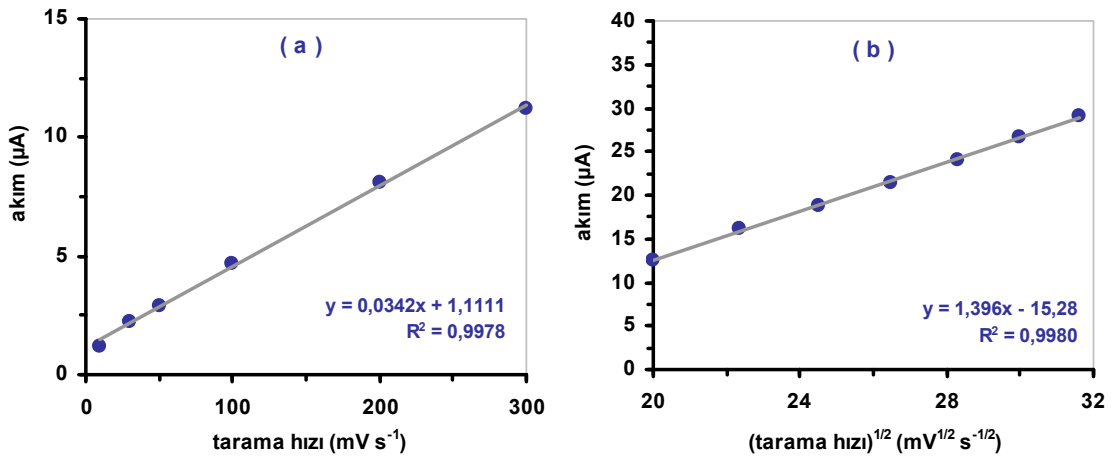


Şekil 8.58. PVF⁺XO⁻ biyosensörü için elde edilen voltamogramlar ($4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm⁻², 1,5 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)

Enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan H₂O₂’in yükseltgenmesine potansiyel tarama hızının etkisini incelemek amacıyla pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde PVF⁺XO⁻ biyosensörü için 10-1000 mV s⁻¹ aralığındaki farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltamogramlar kaydedilmiştir (Şekil 8.59).



Şekil 8.59. PVF⁺XO⁻ biyosensörü için farklı potansiyel tarama hızlarında elde edilen voltamogramlar ($4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm⁻², 1,5 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)



Şekil 8.60. PVF⁺XO⁻ biyosensörüne ait akım cevaplarının (a) farklı potansiyel tarama hızları, (b) potansiyel tarama hızlarının karekökü ile değişimi

Farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltamogramlar alınarak yapılan çalışmada, H₂O₂'in yükseltgenmesine ait pik akımlarının potansiyel tarama hızı ile arttığı belirlenmiştir ve 10-300 mVs⁻¹ tarama hızı aralığında bir doğrusallık gözlenmiştir (Şekil 8.60(a)). Bu durum düşük tarama hızlarında elektrot üzerinde gerçekleşen reaksiyonda elektrokimyasal prosesin yüzey kontrollü olduğunu göstermektedir. Şekil 8.60(b)'de potansiyel tarama hızının karekökü ile H₂O₂'in yükseltgenmesine ait pik akımlarının değişimi incelendiğinde ise 300-1000 mVs⁻¹ aralığında bir doğrusallık tespit edilmiştir.

Bu doğrusallık yüksek tarama hızlarında elektrot üzerindeki reaksiyonun difüzyon kontrollü gerçekleştiğini göstermektedir.

8.4.11. PVF^+XO^- biyosensörü ile gerçek numune çalışması

Solunum güçlüğü rahatsızlıklarının önlenmesinde kullanılan ksantin içerikli ilaçlar ile yapılan gerçek numune analizinde PVF^+XO^- biyosensörünün 0,50 V uygulama potansiyelinde akım cevapları incelenmiştir. Gerçek numune çalışmasında Novartis ilaç firmasının ürettiği aminocardol(numune-I) ve Nobel ilaç firmasının ürettiği teokap(numune-II) ilaçları kullanılmıştır. PVF^+XO^- biyosensörü ile yapılan analizde numune-I çözeltisinden 60 μ L, numune-II çözeltisinden 40 μ L kullanılmıştır. Çizelge 8.4’de bu analiz için bulunan sonuçlar gösterilmiştir.

Çizelge 8.4. PVF^+XO^- biyosensörü için gerçek numune analizleri

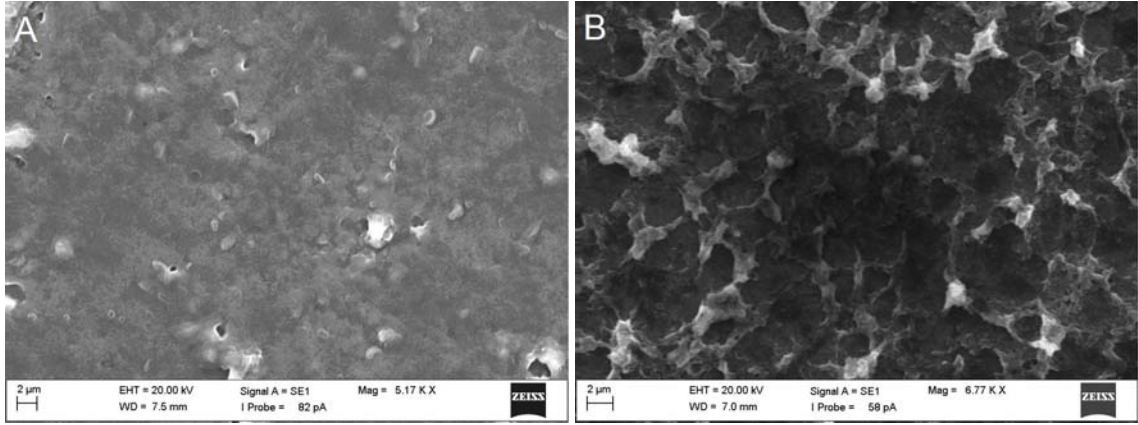
Numune	Gerçek değer, mM	Eklenen ksantin kons., mM	Analiz değeri*, mM	Geri kazanım, %
I	0,342	0	0,334 $\pm$ 0,053	-
		0,250	0,578 $\pm$ 0,063	97,55
		0,500	0,816 $\pm$ 0,071	96,32
		0,750	1,046 $\pm$ 0,095	94,87
II	0,222	0	0,218 $\pm$ 0,042	-
		0,250	0,458 $\pm$ 0,066	96,00
		0,500	0,697 $\pm$ 0,075	95,80
		0,750	0,925 $\pm$ 0,092	94,33

* 3 analizin ortalaması ve bu analize ait standart sapma gösterilmektedir.

8.4.12. PVF^+XO^- biyosensörüne ait SEM görüntüleri

PVF^+XO^- biyosensörünün yüzey morfolojisinin araştırılması amacıyla, optimum şartlarda hazırlanan iki farklı yüzeyin SEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 8.61(a)’da $PVF^+ClO_4^-$ kaplı yüzeyin SEM görüntüsü verilmiştir. Şekilde yüzeyin tamamen polimer film ile kaplandığı gözlenmiştir. Şekil 8.61(b)’de ise $PVF^+ClO_4^-$ kaplı yüzey üzerine enzim immobilizasyonu sonrasında elde edilen SEM görüntüsü verilmiştir.

Şekilde immobilizasyon sonrası yüzeyde meydana gelen değişme ve enzimin polimer yüzeyde tutunduğu açıkça gözlenmiştir.

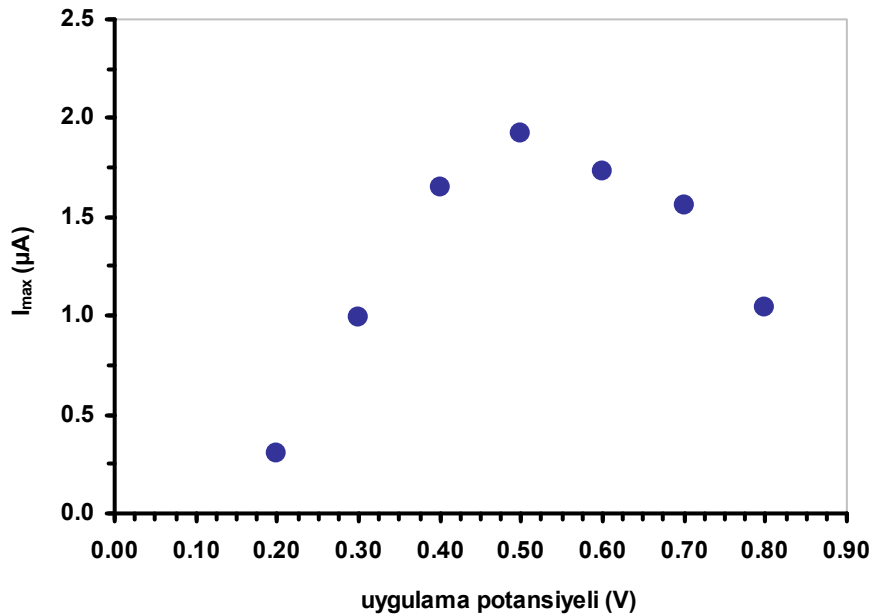


Şekil 8.61. PVF^+XO^- biyosensörüne ait SEM görüntüleri, **(a)** $\text{PVF}^+\text{ClO}_4^-$ yüzeyi, **(b)** $\text{PVF}^+\text{ClO}_4^- - \text{XO}$ yüzeyi

8.5. PVF⁺XO⁻-Pt Biyosensörüne Ait Araştırma Sonuçları

8.5.1. Uygulama potansiyelinin etkisi

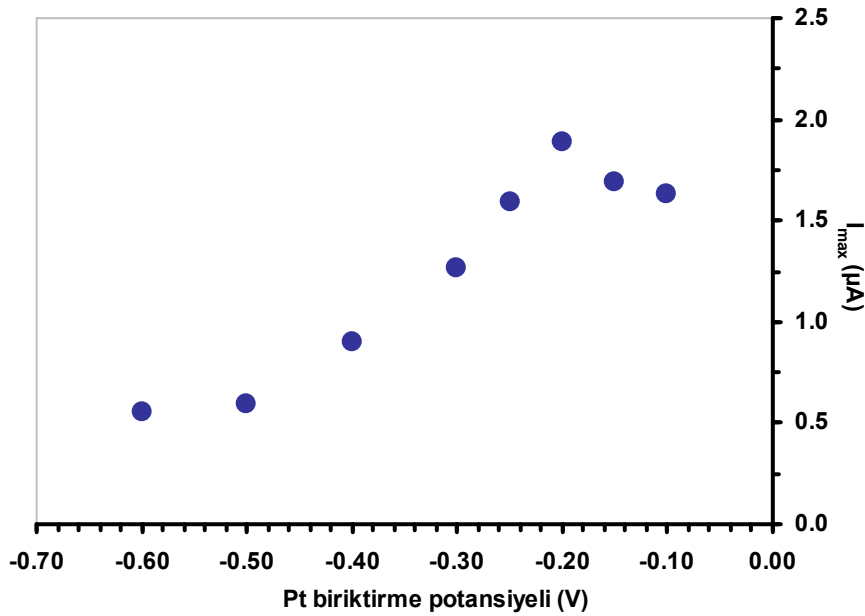
PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörünün akım cevaplarının uygulama potansiyeli ile değişimi 0,2–0,80 V potansiyel aralığında çalışmalar yapılarak incelenmiştir. Bu çalışmada kullanılan PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörü hazırlanırken ilk olarak çalışma elektrodu 0,7 V'da $4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm⁻² kalınlığındaki PVF film ile kaplanmış, daha sonra -0,20 V da sabit potansiyelde 4,0 mM H₂PtCl₆ çözeltisinde $2,00 \times 10^{-2}$ C yük geçirilerek polimer film üzerinde platin biriktirilmiş ve son olarak 1,5 mg mL⁻¹ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilerek hazırlanmıştır. 0,20-0,80 V potansiyel aralığında, pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına eklenen ksantin ile hazırlanan PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörlerinin akım cevapları izlenmiştir. Her bir uygulama potansiyelinde elde edilen akım cevapları kullanılarak maksimum akım değerleri bulunmuş ve Şekil 8.62'de gösterilmiştir. Grafik incelendiğinde, en yüksek maksimum akım değerinin 0,50 V uygulama potansiyelinde olduğu belirlenmiştir.



Şekil 8.62. PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörüne uygulama potansiyelinin etkisi ($4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm⁻², 4,0 mM H₂PtCl₆, $2,00 \times 10^{-2}$ C Pt film kalınlığı, 1,5 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 25 °C)

8.5.2. Platin biriktirme potansiyelinin etkisi

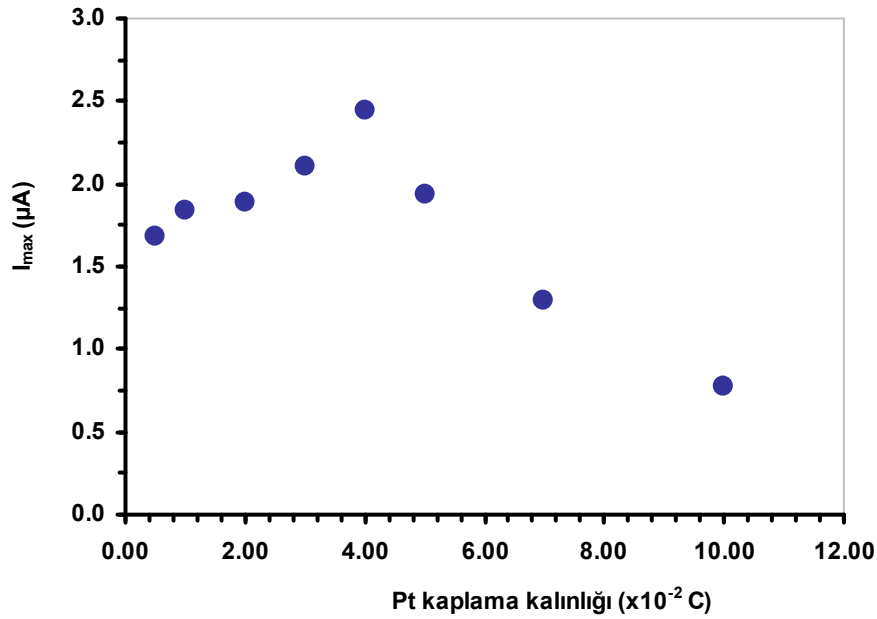
Çalışma elektrodunun polimer film ile kaplanmasından sonra film yüzeyinde platin biriktirme işlemi farklı potansiyeller uygulanarak gerçekleştirilmiş ve böylece biriktirme potansiyelinin PVF^+XO^- -Pt biyosensörünün akım cevapları üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışmada kullanılan PVF^+XO^- -Pt biyosensörü üç aşamada hazırlanmıştır. Birinci aşamada çalışma elektrodu $0,7\text{ V}$ 'da $4,950 \times 10^{-7}\text{ mol PVF cm}^{-2}$ kalınlığına kadar PVF film ile kaplanmıştır. İkinci aşamada ise polimer film kaplı elektrodun $4,0\text{ mM H}_2\text{PtCl}_6$ çözeltisinde farklı potansiyel aralıklarında $2,0 \times 10^{-2}\text{ C}$ yük geçmesi ile film yüzeyinde platin biriktirilmiştir. Son aşamada ise modifiye edilmiş çalışma elektrodu enzim immobilizasyonu için $1,5\text{ mg mL}^{-1}$ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmiştir. Platin biriktirme işlemi $-0,1\text{ V}$ ile $-0,6\text{ V}$ arasındaki potansiyellerde çalışılmış ve her bir potansiyelde hazırlanan biyosensörlerin akım cevapları izlenmiştir. Bu akım cevapları yardımıyla bulunan maksimum akım değerleri Şekil 8.63'de gösterilmiş ve en büyük akım değeri $-0,2\text{ V}$ 'da elde edilmiştir.



Şekil 8.63. PVF^+XO^- -Pt biyosensörüne platin biriktirme potansiyelinin etkisi ($4,950 \times 10^{-7}\text{ mol PVF cm}^{-2}$, $4,0\text{ mM H}_2\text{PtCl}_6$, $2,00 \times 10^{-2}\text{ C}$ Pt film kalınlığı, $1,5\text{ mg XO mL}^{-1}$, $0,10\text{ M pH } 7,4$ fosfat tamponu, $25\text{ }^\circ\text{C}$, $0,50\text{ V}$)

8.5.3. Platin film kalınlığının etkisi

PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörünün akım cevapları üzerine polimer film üzerinde biriktirilen platin filmin kalınlığının etkisi kullanılan 4,0 mM H₂PtCl₆ çözeltisinden -0,2 V potansiyelde 0,5×10⁻²-8,0×10⁻² C aralığında yük geçirilerek araştırılmıştır. Çalışma elektrodu polimer film ile 0,7 V'da 4,950×10⁻⁷ mol PVF cm⁻² kalınlığında hazırlanmıştır. Enzim immobilizasyon işlemi ise modifiye edilmiş çalışma elektrodunun 1,5 mg mL⁻¹ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada elde edilen akım cevapları incelenmiş ve maksimum akım değerleri bulunarak Şekil 8.64'de gösterilmiştir. Grafik incelendiğinde, 4,00×10⁻² C film kalınlığına kadar akım değerlerinde bir artış gözlenirken daha sonraki film kalınlıklarında ise akım değerlerinde bir azalma gözlenmiştir.

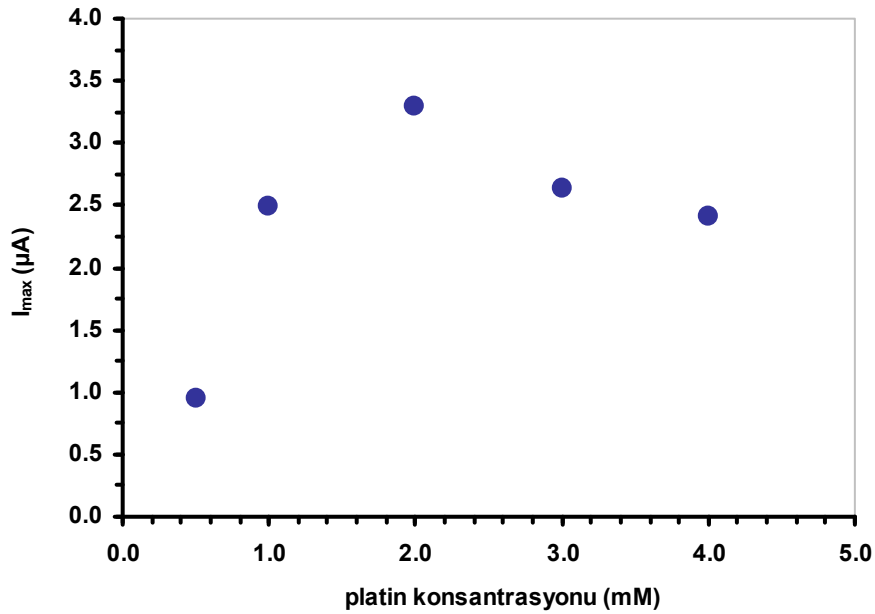


Şekil 8.64. PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörüne platin film kalınlığının etkisi (4,950×10⁻⁷ mol PVF cm⁻², 4,0 mM H₂PtCl₆, 1,5 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 25 °C, 0,50 V)

8.5.4. H₂PtCl₆ konsantrasyonunun etkisi

Bu çalışmada, PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörü hazırlanırken platin biriktirme basamağında kullanılan H₂PtCl₆ çözeltisinin konsantrasyonu 0,5-4,0 mM aralığında değiştirilerek akım cevapları izlenmiştir. PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörü, ilk olarak çalışma

elektrodunun polimer film ile 0,7 V'da $4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm^{-2} kalınlığında kaplanmasıyla hazırlanmış, daha sonra polimer film yüzeyinde farklı konsantrasyonlarda H_2PtCl_6 çözeltisi kullanılarak -0,2 V'da $4,00 \times 10^{-2}$ C film kalınlığında platin biriktirilmiş ve son olarak elektrot $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilerek immobilizasyon süreci tamamlanmıştır. Hazırlanan biyosensörlerin akım cevapları 0,5 V uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamında alınmıştır. Ölçüm ortamına eklenen ksantin çözeltisi ile akım değişimleri gözlenmiş ve çalışılan her bir H_2PtCl_6 konsantrasyonu için maksimum akım değerleri bulunmuştur. Şekil 8.65'de gösterilen maksimum akım değerleri incelendiğinde en büyük akım değerinin 2,0 mM H_2PtCl_6 çözeltisinde elde edildiği belirlenmiştir. 2,0 mM H_2PtCl_6 çözeltisinin üzerindeki konsantrasyonlarda aynı kaplama kalınlığı kullanılmasına rağmen akım değerlerinde azalma gözlenmiştir.

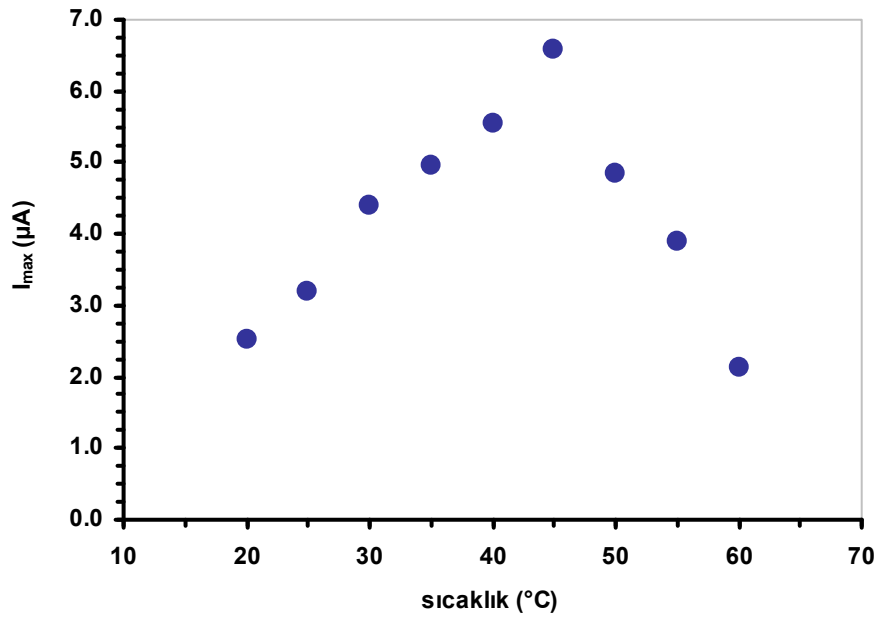


Şekil 8.65. PVF^+XO^- -Pt biyosensörüne H_2PtCl_6 konsantrasyonunun etkisi ($4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm^{-2} , $4,00 \times 10^{-2}$ C Pt film kalınlığı, $1,5 \text{ mg XO mL}^{-1}$, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 25 °C, 0,50 V)

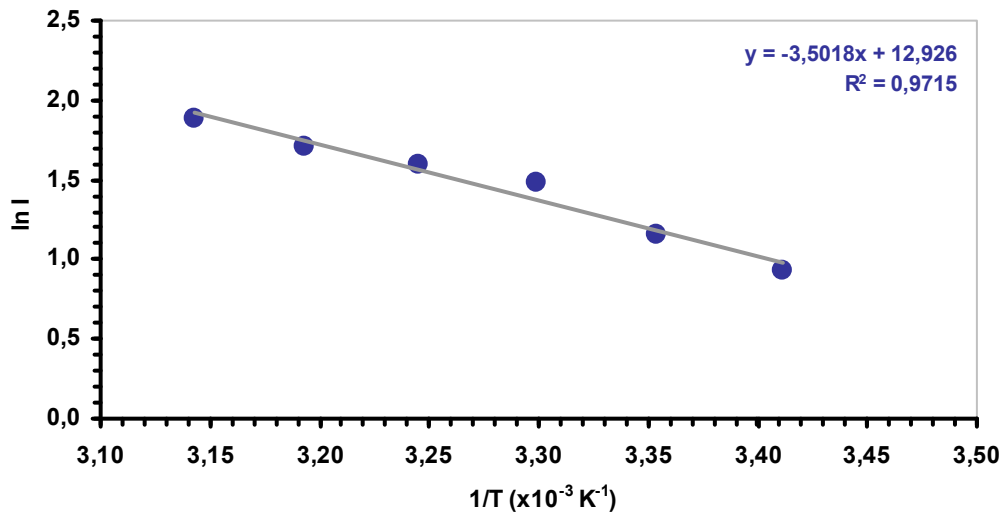
8.5.5. Sıcaklık etkisi

PVF^+XO^- -Pt biyosensörüne sıcaklığın etkisinin araştırılması amacıyla 20-60 °C arasında çalışmalar yapılmıştır. $4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm^{-2} kalınlığındaki polimer film üzerine 2,0 mM H_2PtCl_6 çözeltisinden $4,00 \times 10^{-2}$ C'luk yük geçirilmesiyle platin biriktirilerek ve $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesiyle

hazırlanan PVF^+XO^-Pt biyosensörünün pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına ksantin eklenmesiyle akım cevaplarındaki değişim izlenmiştir. 0,50 V uygulama potansiyelinde yapılan çalışmada, elde edilen akım cevaparı kullanılarak her bir sıcaklık için maksimum akım değerleri bulunmuş. Şekil 8.66'de verilen maksimum akım değerleri incelendiğinde, 45 °C'ye kadar akım değerlerinde artış gözlenmiş, bu sıcaklıktan sonra hem akım cevaplarında bir azalma hem de cevaplarda bir düzensizlik belirlenmiştir.



Şekil 8.66. PVF^+XO^-Pt biyosensörüne sıcaklığın etkisi ($4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm^{-2} , 2,0 mM H_2PtCl_6 , $4,00 \times 10^{-2}$ C Pt film kalınlığı, 1,5 mg XO mL^{-1} , 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 0,50 V)

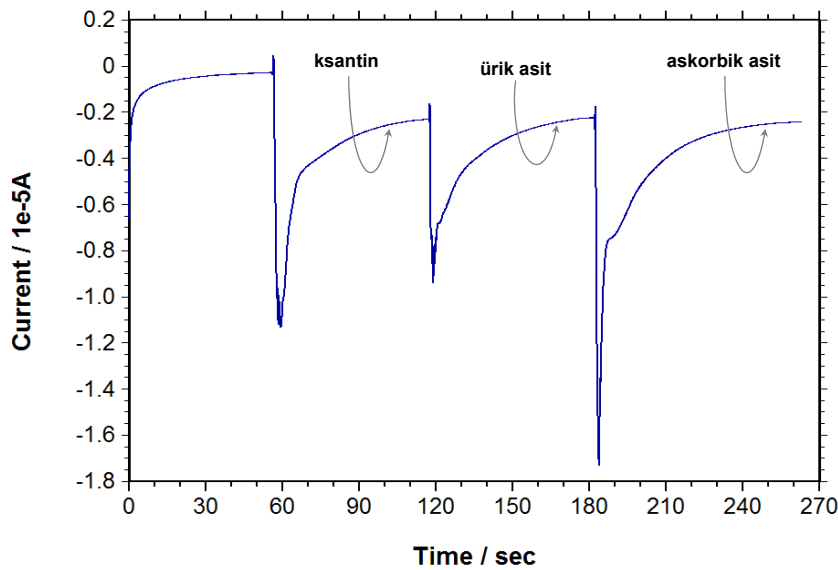


Şekil 8.67. PVF^+XO^-Pt biyosensörü için $\ln I$ - $1/T$ grafiği

20-45 °C sıcaklık aralığında bulunana maksimum akım cevaplarını kullanarak Şekil 8.67’de gösterilen $\ln I-1/T$ grafiği çizilmiş ve PVF^+XO^- -Pt biyosensörü ile gerçekleşen enzimatik reaksiyon için aktivasyon enerjisi $29,114 \text{ kJ mol}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

8.5.6. Girişim etkisi

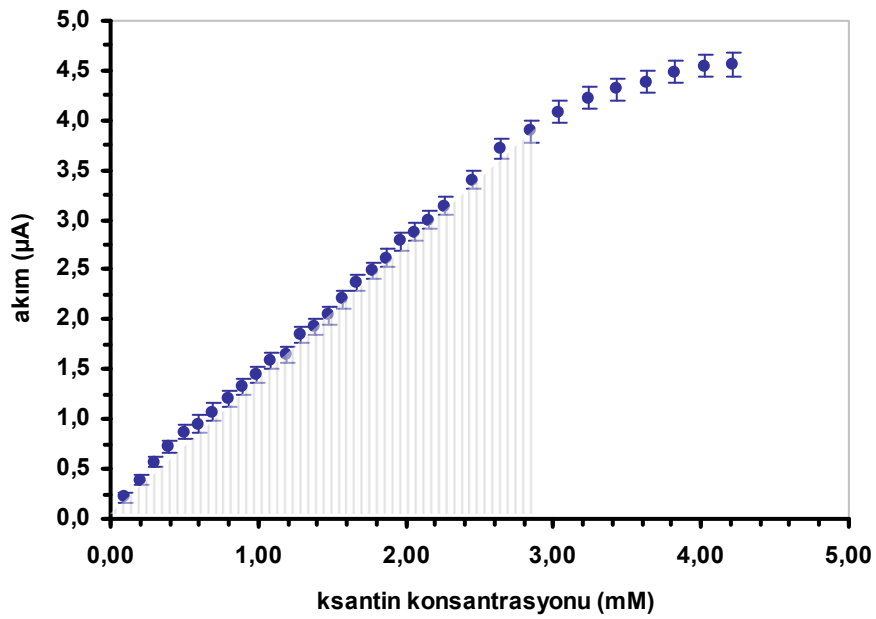
PVF^+XO^- -Pt biyosensörüne ölçüm ortamında bulunabilecek askorbik asit ve ürik asit gibi maddelerin girişim etkileri incelenmiştir. Çalışmada kullanılan PVF^+XO^- -Pt biyosensörü ilk olarak çalışma elektrodunun $0,7 \text{ V}$ ’da $4,950 \times 10^{-7} \text{ mol PVF cm}^{-2}$ kalınlığındaki PVF film ile kaplanması, daha sonra $-0,20 \text{ V}$ da sabit potansiyelde $2,0 \text{ mM H}_2\text{PtCl}_6$ çözeltisinde $4,00 \times 10^{-2} \text{ C}$ yük geçirilerek polimer film üzerinde platin biriktirilmesi ve son olarak $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan biyosensörlerin akım cevapları $0,5 \text{ V}$ uygulama potansiyelinde, pH’ı 7,4 olan $0,10 \text{ M}$ fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına konsantrasyonları $1,00 \text{ mM}$ ’da sabit tutulan ksantin, ürik asit ve askorbik asit çözeltileri eklenmesi ile incelenmiştir. Şekil 8.68’de gösterilen akım cevapları incelendiğinde, ölçüm ortamına eklenen ürik asit ve askorbik asit ile herhangi bir akım değişimi olmadığı gözlenmiş ve PVF^+XO^- biyosensörüne ürik asit ve askorbik asitin girişim etkilerinin olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 8.68. PVF^+XO^- -Pt biyosensörünün $1,00 \text{ mM}$ ksantin, ürik asit ve askorbik asit eklenmesi ile elde edilen akım cevapları ($4,950 \times 10^{-7} \text{ mol PVF cm}^{-2}$, $2,0 \text{ mM H}_2\text{PtCl}_6$, $4,00 \times 10^{-2} \text{ C}$ Pt film kalınlığı, $1,5 \text{ mg XO mL}^{-1}$, $0,10 \text{ M}$ pH 7,4 fosfat tamponu, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $0,50 \text{ V}$)

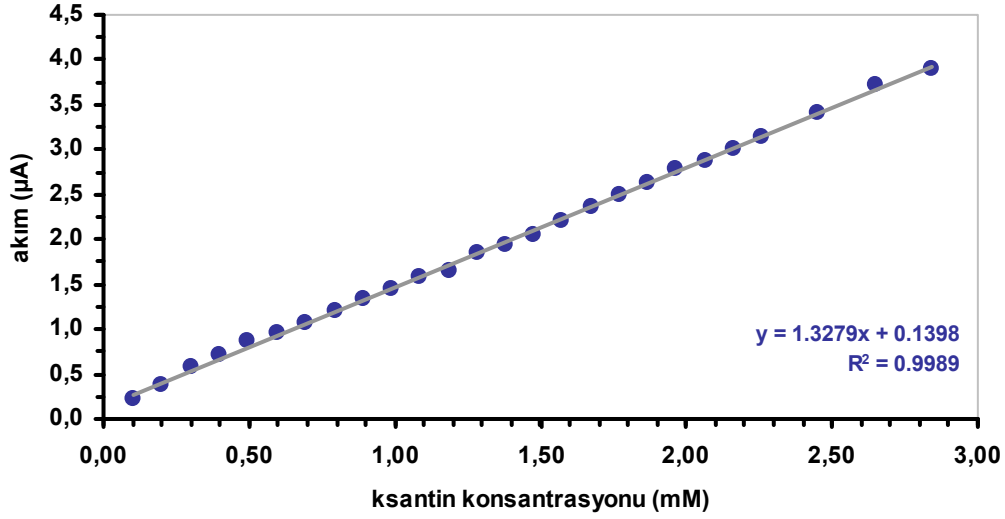
8.5.7. Substrat konsantrasyonunun etkisi

Optimize edilen şartlarda hazırlanan PVF^+XO^-Pt biyosensörünün doğrusal çalışma aralığının belirlenmesi amacıyla 0,50 V uygulama potansiyelinde pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına eklenen ksantin konsantrasyonu ile biyosensörün akım cevapları incelenmiştir. Doğrusal çalışma aralığının bulunması için yapılan çalışma üç defa tekrarlanmış ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Şekil 8.69).

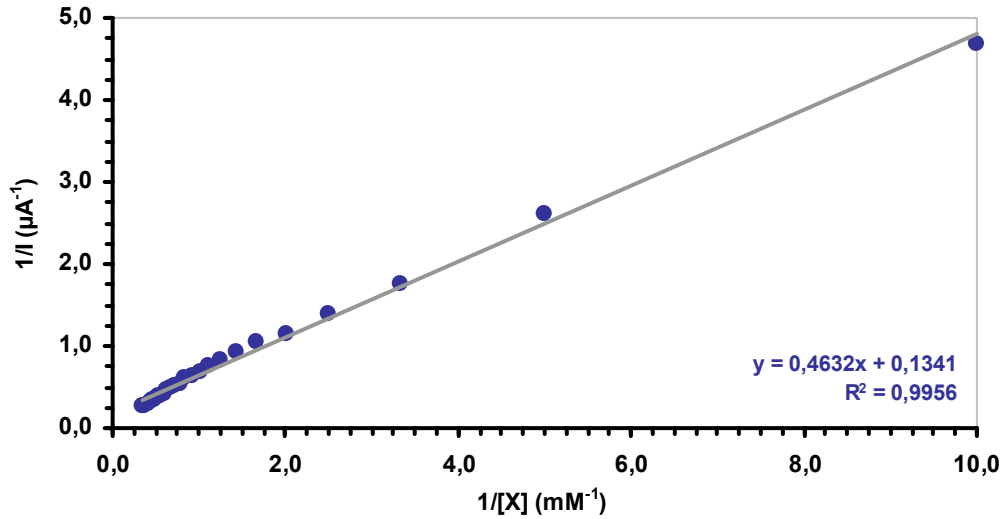


Şekil 8.69. PVF^+XO^-Pt biyosensörüne ksantin konsantrasyonunun etkisi ($4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm^{-2} , 2,0 mM H_2PtCl_6 , $4,00 \times 10^{-2}$ C Pt film kalınlığı, 1,5 mg XO mL^{-1} , 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,50 V)

Şekil 8.69'da gösterilen grafik incelendiğinde PVF^+XO^-Pt biyosensörü için doğrusal çalışma aralığı $0,43 \times 10^{-3}$ –2,84 mM ksantin olarak bulunmuştur (Şekil 8.70). Ayrıca, PVF^+XO^-Pt biyosensörü için gözlenebilme sınırı $1,30 \times 10^{-4}$ mM olarak bulunmuştur. Şekil 8.70'de verilen akım değerlerinden yararlanarak Michaelis-Menten sabiti çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplanmıştır (Şekil 8.71). Görünür Michaelis-Menten sabiti, K_{mapp} , PVF^+XO^-Pt biyosensörü için 3,454 mM ksantin olarak bulunmuştur. Ayrıca Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla PVF^+XO^-Pt biyosensörünün duyarlılığı da hesaplanmış ve $68,75 \mu A mM^{-1} cm^{-2}$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 8.70. PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörünün doğrusal çalışma aralığı



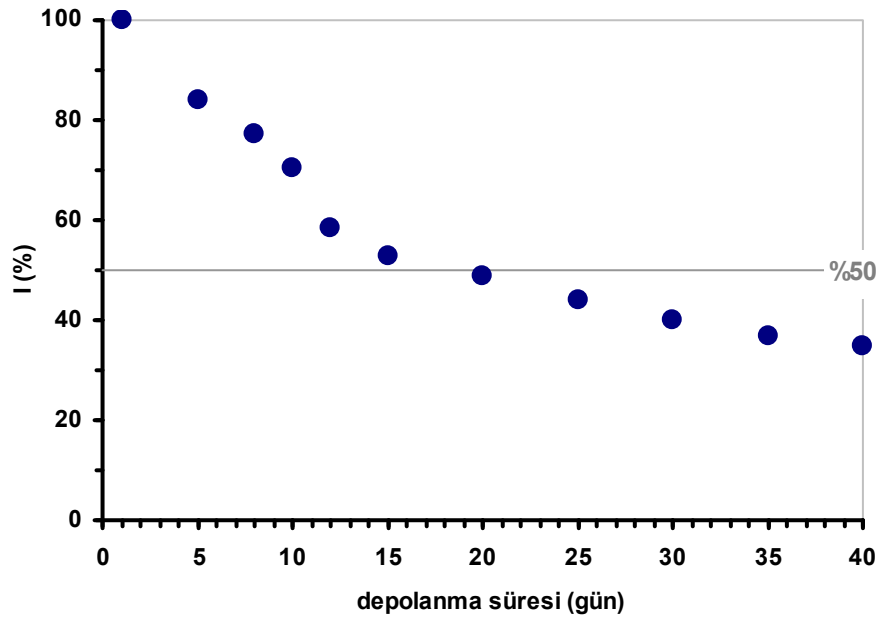
Şekil 8.71. PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörü için Lineweaver-Burk grafikleri

8.5.8. PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörünün kararlılığı ve tekrarlanabilirliği

PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörünün kullanım kararlılığının araştırılması amacıyla $4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm⁻² film kalınlığındaki polimer film kaplı elektrot 2,0 mM H₂PtCl₆ çözeltisinden $4,00 \times 10^{-2}$ C'luk yük geçirilmesiyle platin kaplanmış ve daha sonra 1,5 mg mL⁻¹ enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilmesiyle hazırlanan PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörü kullanılmıştır. 0,50 V uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına ksantin eklemesi (ölçüm ortamında 1 mM ksantin çözeltisi) yapılarak PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörünün akım cevaplarının gün içinde tekrar kullanımlar sonucunda değişimi incelenmiştir. Buna göre,

PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörü gün içinde yapılan 20 ayrı ölçümden sonra aktivitesini yaklaşık %50 koruduğu belirlenmiştir.

Depolama kararlılığı araştırılması için yukarıdaki parametreler aynı tutularak PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörü hazırlanmış ve 0,50 V uygulama potansiyelinde, pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamına ksantin eklemesi (ölçüm ortamında 1 mM ksantin çözeltisi) yapılarak PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörünün akım cevapları incelenmiştir. Günlük periyotlarda yapılan ölçümler sonucundaki akımcıevaplarındaki değişim incelenmiş ve 40 gün boyunca devam eden çalışmalar sonucunda biyosensörün aktivitesini 20 gün sonunda % 50 oranında koruduğu belirlenmiştir (Şekil 8.72).

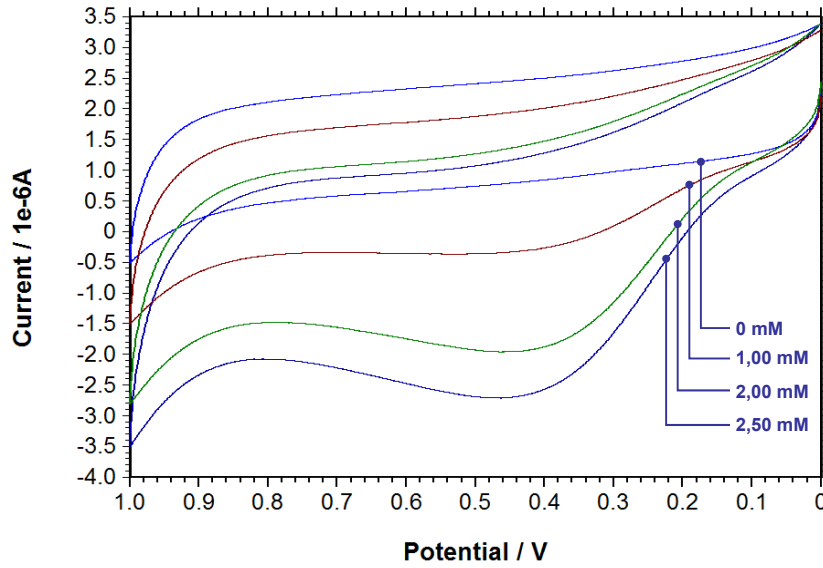


Şekil 8.72. PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörünün depolanma kararlılığı ($4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm⁻², 2,0 mM H₂PtCl₆, $4,00 \times 10^{-2}$ C Pt film kalınlığı, 1,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,50 V)

Akım cevapları arasındaki uyum dercesini gösteren tekrarlanabilirliğin (kesinlik) araştırılması için karalılık çalışmasındaki şartlara uygun olarak PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörleri hazırlanmış ve aynı ksantin çözeltisine (ölçüm ortamında 1 mM ksantin çözeltisi) verdiği akım cevapları belirlenerek bağıl standart sapma değeri hesaplanmıştır. Aynı şartlarda hazırlanan 5 biyosensör ile yapılan çalışma sonucunda bağıl standart sapma %5,76 olarak bulunmuştur.

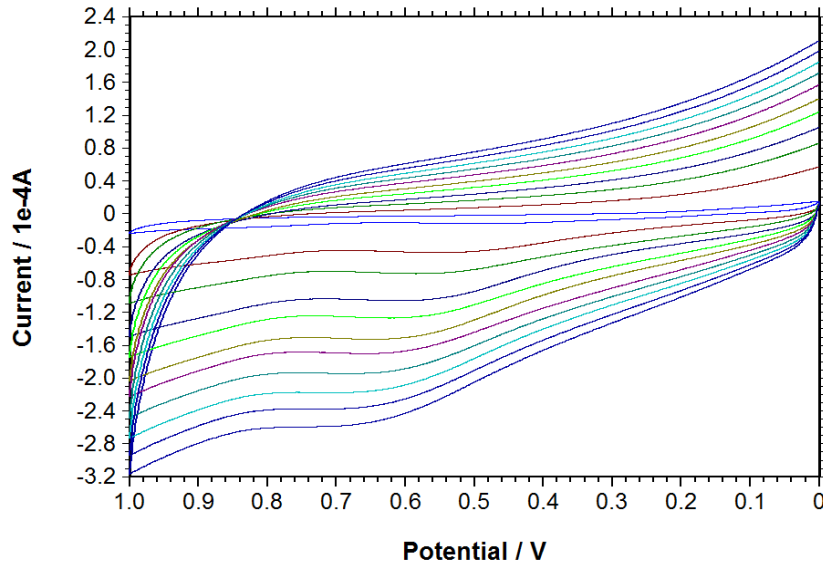
8.5.9. PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörünün voltametrik yöntem ile incelenmesi

PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörünün akım cevapları voltametrik olarak dönüşümlü voltametri yöntemi ile 0,0-1,0 V arasında potansiyel taraması yapılarak gözlenmiştir. Bu yöntemde kullanılan PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörü optimum şartlarda hazırlanmış ve voltamogramlar pH'ı 7,4 olan 0,10 M fosfat tamponu kullanılarak oluşturulan ölçüm ortamında kaydedilmiştir (Şekil 8.73). Grafikte verilen voltamogramlar incelendiğinde, ölçüm ortamına ksantin eklemeleri ile PVF⁺XO⁻ biyosensörünün akım değerleri arasında bir orantı olduğu gözlenmiştir.

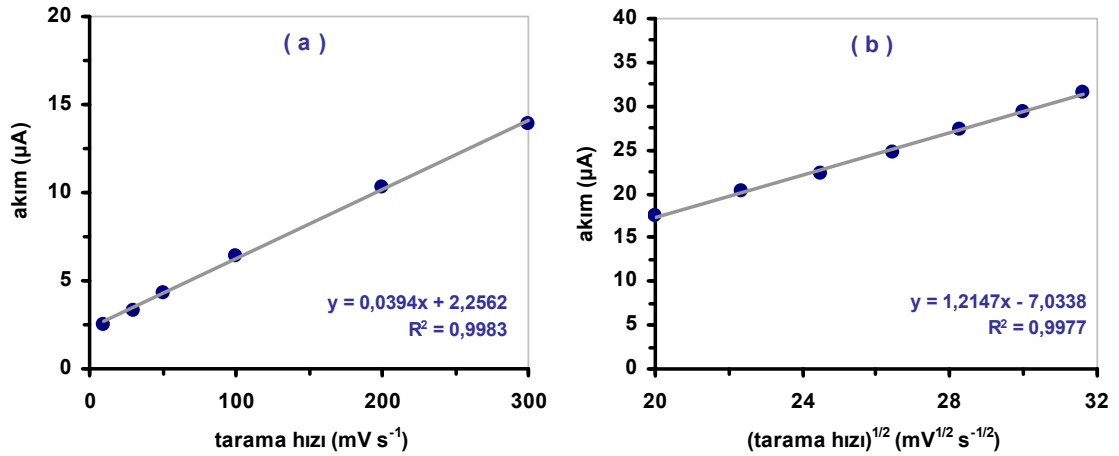


Şekil 8.73. PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörü için elde edilen voltamogramlar ($4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm⁻², 2,0 mM H₂PtCl₆, $4,00 \times 10^{-2}$ C Pt film kalınlığı, 1,5 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)

Enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan H₂O₂'in yükseltgenmesine potansiyel tarama hızının etkisini incelemek amacıyla pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörü için 10-1000 mV s⁻¹ aralığındaki farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltamogramlar kaydedilmiştir (Şekil 8.74).



Şekil 8.74. PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörü için farklı potansiyel tarama hızlarında elde edilen voltamogramlar ($4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm⁻², 2,0 mM H₂PtCl₆, $4,00 \times 10^{-2}$ C Pt film kalınlığı, 1,5 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)



Şekil 8.75. PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörüne ait akım cevaplarının (a) farklı potansiyel tarama hızları, (b) potansiyel tarama hızlarının karekökü ile değişimi

Şekil 8.75(a)'da H₂O₂'in yükseltgenmesine ait pik akımlarının farklı tarama hızlarındaki değişimi verilmiştir. Şekil incelendiğinde 10-300 mVs⁻¹ tarama hızı aralığında bir doğrusallık gözlenmiştir. Bu durum düşük tarama hızlarında elektrokimyasal reaksiyonun yüzey kontrollü olduğunu göstermektedir. Şekil 8.75(b)'de potansiyel tarama hızının karekökü ile H₂O₂'in yükseltgenmesine ait pik akımlarının değişimi incelendiğinde ise 300-1000 mVs⁻¹ aralığında bir doğrusallık tespit edilmiştir. Bu sonuç yüksek tarama hızlarında elektrot üzerindeki reaksiyonun difüzyon kontrollü gerçekleştiğini göstermektedir.

8.5.10. PVF^+XO^- -Pt biyosensörü ile gerçek numune çalışması

Aminocardol(numune-I) ve Teokap(numune-II) ilaçları ile PVF^+XO^- -Pt biyosensörünün gerçek numunelerdeki akım cevapları incelenmiştir. Gerçek numune analizinde PVF^+XO^- -Pt biyosensörü önceki çalışmalarda optimize edilen şartlarda hazırlanmış ve ölçüm ortamına eklenen ilaç numunesi içerisindeki ksantin tayini yapılmıştır. PVF^+XO^- -Pt biyosensörü ile yapılan analizde numune-I çözeltisinden 100 μ L, numune-II çözeltisinden 80 μ L kullanılmıştır. Ölçüm ortamına sırasıyla gerçek numune ve ksantin çözeltisi eklenerek 0,50 V uygulama potansiyelinde elde edilen akım cevapları izlenmiş ve bulunan sonuçlar aşağıda verilen Çizelge 8.5’de gösterilmiştir.

Çizelge 8.5. PVF^+XO^- -Pt biyosensörü için gerçek numune analizleri

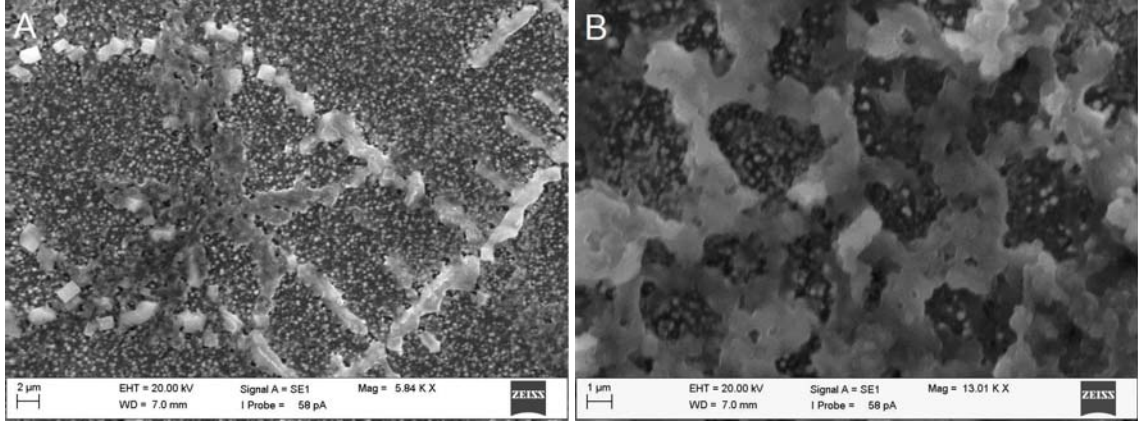
Numune	Gerçek değer, mM	Eklenen ksantin kons., mM	Analiz değeri*, mM	Geri kazanım, %
I	0,570	0	0,594 $\pm$ 0,079	-
		0,250	0,839 $\pm$ 0,081	98,10
		0,750	1,346 $\pm$ 0,087	100,32
		1,000	1,562 $\pm$ 0,092	96,79
		1,500	2,006 $\pm$ 0,105	94,11
II	0,440	0	0,439 $\pm$ 0,060	-
		0,250	0,683 $\pm$ 0,084	97,76
		0,750	1,169 $\pm$ 0,086	97,32
		1,000	1,392 $\pm$ 0,087	95,30
		1,500	1,853 $\pm$ 0,091	94,27

* 3 analizin ortalaması ve bu analize ait standart sapma gösterilmektedir.

8.5.11. PVF^+XO^- -Pt biyosensörüne ait SEM görüntüleri

PVF^+XO^- -Pt biyosensörünün yüzey morfolojisinin araştırılması amacıyla, optimum şartlarda hazırlanan iki farklı yüzeyin SEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 8.76(a)’da verilen SEM görüntüsünde $PVF^+ClO_4^-$ kaplı yüzey üzerine platin tanecikleri elektrokimyasal olarak biriktirilmiştir. Şekilde platin taneciklerinin yüzeye homojen bir

şekilde biriktiği gözlenmiştir. Şekil 8.76(b)'de ise platin biriktirilmiş $PVF^+ClO_4^-$ kaplı yüzey üzerine enzim immobilizasyonu sonrasında elde edilen SEM görüntüsü verilmiştir. Enzim moleküllerinin platin biriktirilmiş polimer yüzeyde tutunduğu açıkça gözlenmiştir.



Şekil 8.76. PVF^+XO^- -Pt biyosensörüne ait SEM görüntüleri, (a) $PVF^+ClO_4^-$ -Pt yüzeyi, (b) PVF^+XO^- -Pt yüzeyi

9. SONUÇ VE ÖNERİLER

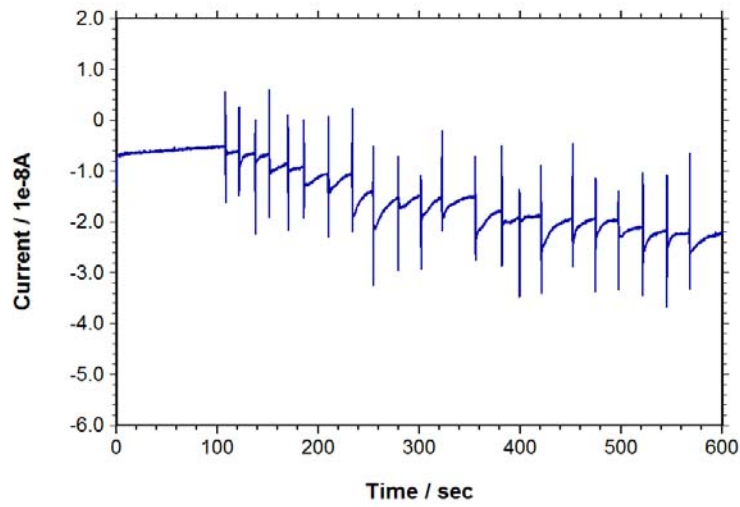
Ksantin tayini için tasarladığımız biyosensörlerin hazırlanmasında PVF polimeri çalışma elektrodu yüzeyine iki farklı yöntem kullanılarak kaplanmıştır. Bu yöntemlerden birincisinde, platin çalışma elektrodu PVF çözeltisinde belirli bir süre bekletildikten sonra kurutularak elektrot yüzeyinin polimerin nötral formu ile kaplanması sağlanmıştır. Daldırıp-kurutma olarak adlandırılan bu yöntem ile polimer kaplanan çalışma elektrodu ksantin oksidaz çözeltisinde belirli bir süre bekletilerek immobilizasyon işlemi tamamlanmıştır. Altın ve platin taneciklerinin ksantin oksidaz biyosensörü üzerine etkisinin incelenmesinde ise PVF kaplı çalışma elektrodu metal iyonları içeren çözeltide belirli bir süre bekletildikten sonra immobilizasyon basamağına geçilmiş ve enzim çözeltisinde bir süre bekletilerek hazırlanmıştır.

Çizelge 9.1. PVFXO, PVF-Au-XO ve PVF-Pt-XO biyosensörlerinin optimum şartları

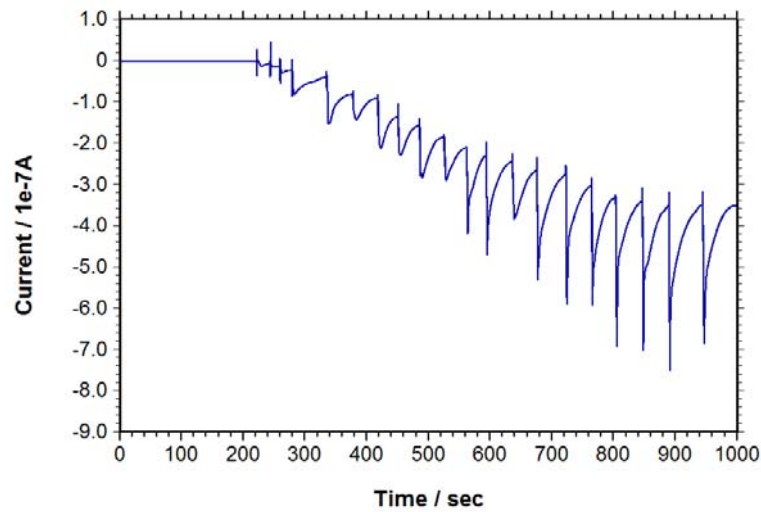
Parametreler	Biyosensör		
	PVF-XO	PVF-Au-XO	PVF-Pt-XO
Uygulama potansiyeli, V	0,65	0,40	0,40
PVF konsantrasyonu, mg mL ⁻¹	5,0	5,0	5,0
PVF çözeltisinde bekletme süresi, dakika	5	5	5
KAuCl ₄ konsantrasyonu, mM	-	2,0	-
KAuCl ₄ çöz. bekletme süresi, dakika	-	2	-
PtBr ₂ konsantrasyonu, mM	-	-	1,5
PtBr ₂ çöz. bekletme süresi, dakika	-	-	10
XO konsantrasyonu, mg XO mL ⁻¹	2,0	2,0	2,0
XO çözeltisinde bekletme süresi, dakika	20	20	20
Sıcaklık, °C (<i>max. akım değerlerine göre</i>)	35	40	40
Cevap süresi, saniye	20-25	35-40	35-40
Doğrusal çalışma aralığı, mM	1,67×10 ⁻² -0,22	2,50×10 ⁻³ -0,56	2,00×10 ⁻³ -0,66
Gözlenebilme sınırı, mM	5,0×10 ⁻³	7,5×10 ⁻⁴	6,0×10 ⁻⁴
Kullanım kararlılığı, ölçüm sayısı (%50 aktivite kaybına göre)	3	8	9
Depolama kararlılığı, gün (%50 aktivite kaybına göre)	6	10	15
Tekrarlanabilirlik, %BSS	4,99	3,41	4,70
Duyarlık, µA mM ⁻¹ cm ⁻²	2,68	28,95	53,08
E _a , kJ mol ⁻¹	13,165	18,275	20,363
K _{mapp} , mM	0,704	0,393	0,286

Yukarıda verilen yöntem ve işlem basamakları dahilinde hazırlanan üç farklı biyosensöre ait optimizasyon çalışmaları ve diğer parametreler için elde edilen sonuçlar Çizelge 9.1’de gösterilmiştir.

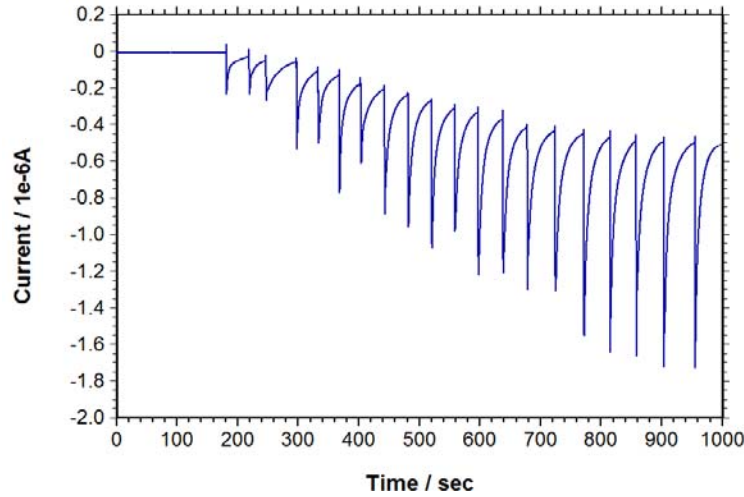
Daldırıp-kurutma metodu ile hazırladığımız üç farklı biyosensör için Şekil 9.1’de gösterilen akım cevapları incelendiğinde, polimer film üzerinde biriktirilen altın ve platin partiküllerinin etkisi biyosensörlerin akım değerlerinin büyüklüğüne yansımaktadır. PVF-XO biyosensörü için akım cevapları 0,5-2,5 nA aralığında gözlenirken, PVF-Au-XO ve PVF-Pt-XO biyosensörleri için bu aralık sırasıyla 0,5-350 nA ve 0,5-500 nA’de gözlenmiştir (Agui, 2006).



Şekil 9.1(a). PVF-XO biyosensörünün akım cevaplarının ölçüm ortamına eklenen ksantin konsantrasyonu ile değişimi (5,0 mg PVF mL⁻¹, 2,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,65 V)



Şekil 9.1(b). PVF-Au-XO biyosensörünün akım cevaplarının ölçüm ortamına eklenen ksantin konsantrasyonu ile değişimi (5,0 mg PVF mL⁻¹, 2,0 mM KAuCl₄, 2,0 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,40 V)



Şekil 9.1(c). PVF-Pt-XO biyosensörünün akım cevaplarının ölçüm ortamına eklenen ksantin konsantrasyonu ile değişimi ($5,0 \text{ mg PVF mL}^{-1}$, $1,5 \text{ mM PtBr}_2$, $2,0 \text{ mg XO mL}^{-1}$, $0,10 \text{ M pH } 7,4$ fosfat tamponu, 30°C , $0,40 \text{ V}$)

Biyosensörlerin cevap süreleri karşılaştırıldığında ise, PVF-XO biyosensörünün cevap süresi 20-25 saniye dolaylarında olurken, PVF-Au-XO ve PVF-Pt-XO biyosensörleri için cevap süresi 35-40 aralığında olmaktadır. Altın ve platin partiküllerinin polimer film yüzeyinde biriktirilmesiyle kalınlaşan elektrot yüzey tabakası biyosensörlerin cevap süresi uzatmaktadır. Bu durum Sulak ve çalışma arkadaşlarının hazırladıkları glikoz oksidaz biyosensörlerinde elde ettikleri sonuçlar ile paralellik göstermektedir. PVF film üzerine glikoz oksidazın immobilizasyonu ile hazırlanan biyosensörün cevap süresi 30-40 saniye aralığında olurken, altın biriktirilmiş PVF film yüzeyine glikoz oksidazın immobilizasyonu ile hazırlanan biyosensörün cevap süresi 40-60 saniye aralığında gözlenmiştir (Sulak, 2006).

PVF polimer film yüzeyindeki metal tanecikleri biyosensörün uygulama potansiyelinde de değişikliğe neden olmuştur. PVF-XO biyosensörü için uygulama potansiyeli $0,65 \text{ V}$ olarak belirlenirken, PVF-Au-XO ve PVF-Pt-XO biyosensörleri için $0,40 \text{ V}$ olarak bulunmuştur. Benzer olarak, ksantin tayini için H_2O_2 'in yükseltgenme akımının ölçülmesine dayanarak yapılan çalışmalarda da metal partiküllerinin uygulama potansiyelini daha düşük pozitif potansiyele kaydırması belirlenmiştir (Kırgöz, 2004; Çubukçu, 2007; Sulak, 2006). Celej ve arkadaşlarının glikoz tayini için hazırladıkları glikoz oksidaz biyosensörlerinde altın partiküllerinin etkisi incelenmiş ve altın partikülleri kullanılarak hazırlanan elektrot ile H_2O_2 'in yükseltgenme potansiyelinin 200 mV kadar düştüğü belirlenmiştir (Celej, 1998). Altın partiküllerinin elektrokatalitik etki gösterdiği bir diğer karşılaştırmalı çalışma ise Raj ve arkadaşlarının askorbat varlığında

dopamine tayini için yaptıkları voltametrik çalışmadır. Bu çalışmada, altın partikülleri kullanılarak hazırlanan elektrot ile askorbatın yükseltgenme potansiyeli daha düşük pozitif potansiyele kaydığı, bunun yanında dopamin için elde edilen akım değerlerinde yükselme olduğu belirlenmiştir (Raj, 2003).

PVF-Au-XO ve PVF-Pt-XO biyosensörleri hazırlanmasında kullanılan KAuCl_4 ve PtBr_2 çözeltilerin konsatrasyonları ve bu çözeltilerdeki metal biriktirme süreleri araştırılmıştır. KAuCl_4 ve PtBr_2 çözeltilerin konsatrasyonlarının ve metal biriktirme sürelerinin hazırlanan biyosensörlerin akım cevaplarını etkilediği belirlenmiş, Chen ve arkadaşlarının hazırladıkları glikoz oksidaz biyosensöründe altın nanopartiküllerinin etkisini inceledikleri, Geng ve arkadaşlarının karbon monooksit'in yükseltgenmesinde altın parçacık büyüklüklerinin elektrokatalitik etkisini araştırdıkları, Male ve arkadaşlarının karbonhidratların elektrokimyasal olarak tayininde bakır nanopartiküllerinin etkisini inceledikleri literatür çalışmalarında elde ettikleri veriler ile benzer sonuçlar elde edilmiştir (Chen, 1998; Male, 2004; Geng, 2007).

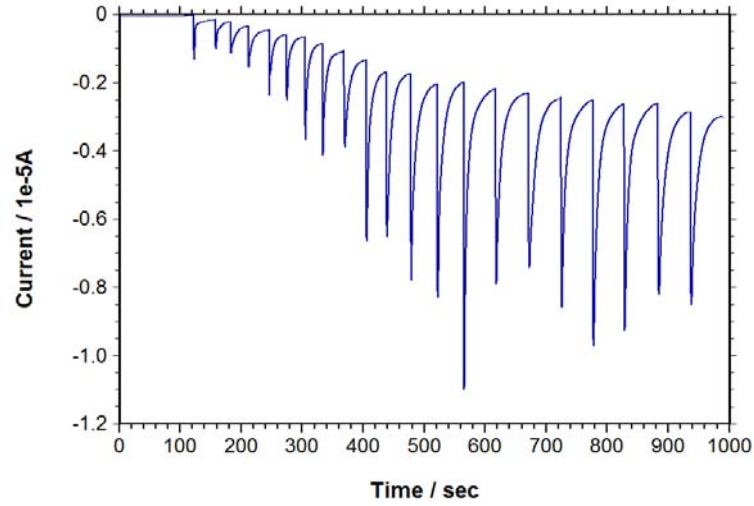
PVF kaplı elektrot yüzeyinde altın ve platin parçacıklarının biriktirilmesi cevap akımlarının artmasına, H_2O_2 'in yükseltgenme potansiyelinin daha düşük pozitif değerlere kaymasına, duyarlılığın ve doğrusal çalışma aralığının artmasına neden olmuştur. Metal parçacıklarının varlığında K_{mapp} değerinin düştüğü belirlenmiştir. K_{mapp} değerinin düşmesi enzimin substrata karşı affinitesinin arttığını göstermektedir. Ayrıca, metal parçacıklarının aktivasyon enerjisini bir miktar arttırdığı belirlenmiştir. Bu artışın reaksiyon mekanizmasında meydana gelen değişimden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışma elektrodunun polimer film ile kaplanmasında kullandığımız ikinci yöntemde, $\text{PVF}^+\text{ClO}_4^-$ modifiye elektrodu tetrabutylamonyum perklorat içeren metilen klorür çözeltisindeki PVF'nin sabit potansiyelli elektrolizi ile hazırlanmıştır. Elektrokimyasal çöktürme olarak adlandırılan bu yöntemde polimer film kaplı çalışma elektrodu ksantin oksidaz çözeltisinde belirli bir süre bekletilerek enzim biyosensörü hazırlanmıştır. Platin biriktirilmiş $\text{PVF}^+\text{ClO}_4^-$ modifiye elektrodu ise polimer film kaplı çalışma elektrodunun metal iyonları içeren çözeltide sabit potansiyelde elektroliz işlemi sonucunda hazırlanmış ve bu elektrot yüzeyine enzim immobilizasyonu önceki elektrotlarda kullanılan yol izlenerek yapılmıştır. Hazırlanan her iki biyosensör için belirlenen optimum şartlar ve diğer parametreler Çizelge 9.2'de gösterilmiştir.

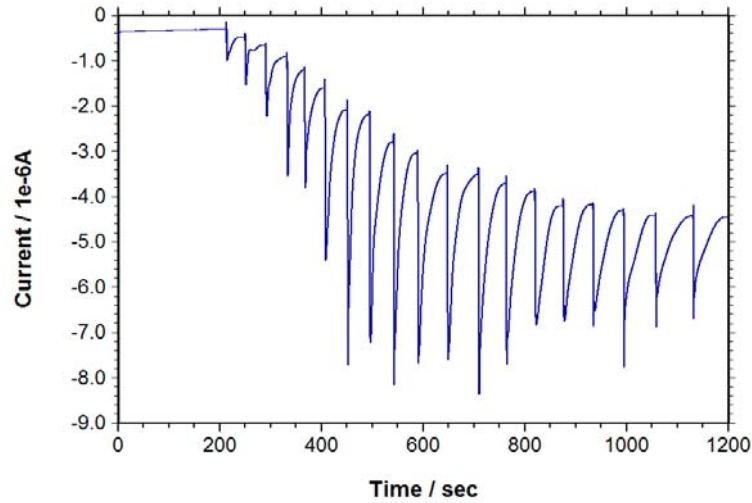
Çizelge 9.2. PVF⁺XO⁻ ve PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörlerinin optimum şartları

Parametreler	Biyosensör	
	PVF ⁺ XO ⁻	PVF ⁺ XO ⁻ -Pt
Uygulama potansiyeli, V	0,50	0,50
PVF ⁺ ClO ₄ ⁻ film kalınlığı, mol PVF cm ⁻²	4,950×10 ⁻⁷	4,950×10 ⁻⁷
XO konsantrasyonu, mg XO mL ⁻¹	1,5	1,5
XO çözeltisinde bekletme süresi, dakika	20	20
Pt biriktirme potansiyeli, V	-	-0,2
Pt film kalınlığı, C	-	4,0×10 ⁻²
H ₂ PtCl ₆ konsantrasyonu, mM	-	2,0
Sıcaklık, °C (max. akım değerlerine göre)	40	45
Cevap süresi, saniye	40-45	45-50
Doğrusal çalışma aralığı, mM	1,73×10 ⁻³ -1,74	0,43×10 ⁻³ -2,84
Gözlenebilme sınırı, mM	5,2×10 ⁻⁴	1,3×10 ⁻⁴
Kullanım kararlılığı, ölçüm sayısı (%50 aktivite kaybına göre)	12	16
Depolanma kararlılığı, gün (%50 aktivite kaybına göre)	15	20
Tekrarlanabilirlik, %BSS	3,30	5,76
Duyarlık, µA mM ⁻¹ cm ⁻²	56,22	68,75
E _a , kJ mol ⁻¹	23,636	29,114
K _{mapp} , mM	6,065	3,454

Elektrokimyasal çöktürme metodu ile hazırladığımız PVF⁺XO⁻ ve PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörleri için Şekil 9.2’de gösterilen akım cevapları incelendiğinde, PVF⁺ClO₄⁻ film üzerine elektrokimyasal olarak biriktirilen platin partiküllerinin etkisi biyosensörlerin akım değerleri arttırmıştır. PVF⁺XO⁻ biyosensörü için akım cevapları 0,25-3,10 µA aralığında gözlenirken, PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörü için bu aralık 0,15-4,40 µA olarak gözlenmiştir. Akım cevaplarına Pt partiküllerinin elektrokatalitik etkisi birçok literatürde de benzer sonuçlar göstermiştir. (Tang, 2004; Zou, 2008; Wang, 2010).



Şekil 9.2(a). PVF⁺XO⁻ biyosensörünün akım cevaplarının ölçüm ortamına eklenen ksantin konsantrasyonu ile değişimi ($4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm⁻², 1,5 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,50 V)



Şekil 9.2(b). PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörünün akım cevaplarının ölçüm ortamına eklenen ksantin konsantrasyonu ile değişimi ($4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm⁻², 2,0 mM H₂PtCl₆, $4,00 \times 10^{-2}$ C Pt film kalınlığı, 1,5 mg XO mL⁻¹, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,50 V)

PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörünün akım cevabı üzerine PVF⁺ClO₄⁻ filmin yüzeyine platin partiküllerinin elektrokimyasal biriktirilmesi basamağında kullanılan H₂PtCl₆ çözeltisinin konsantrasyonu etkisi 0,5-4,0 mM aralığında incelenmiştir. Teorik olarak H₂PtCl₆ çözeltisinin konsantrasyonu artışı ile artan tanecik büyüklüğünün bir sonucu olarak Pt partiküllerinin biyosensörün verimini artacağı öngörülmesine rağmen, çalışılan konsantrasyon aralığında optimum konsantrasyon değeri 2,0 mM olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu veriler dikkate alınarak literatür çalışmaları incelendiğinde benzer sonuçların olduğu bulunmuştur. Huang ve arkadaşları hazırladıkları sensörde

H_2PtCl_6 çözeltisinin konsantrasyonunun etkisini araştırmışlar ve 10 mM H_2PtCl_6 konsantrasyonuna kadar keskin bir akım artışı gözlenirken, bu konsantrasyondan sonra akım cevaplarında bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir. 10 mM'dan daha düşük H_2PtCl_6 konsantrasyonlarında gözlenen bu durum küçük boyutlu Pt taneciklerinin düşük elektrokatalitik aktivite gösterdiği, 10 mM konsantrasyon değerinden sonra ise yüzeyde artan Pt partiküllerinin belirli kararlılığa ulaştığı şeklinde açıklanmıştır (Huang, 2008).

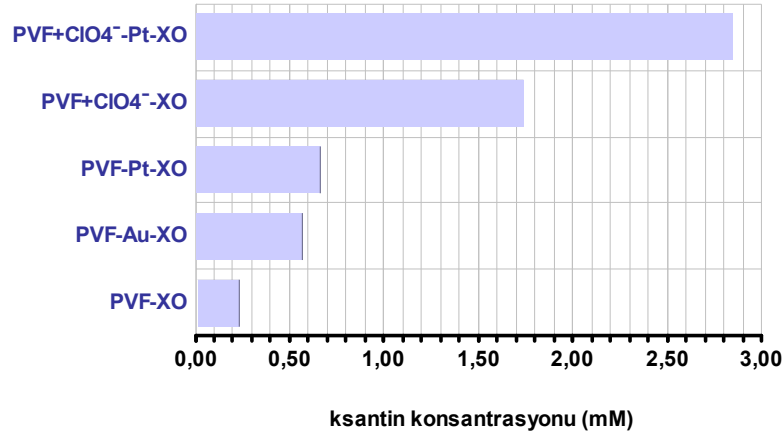
H_2PtCl_6 çözeltisinin konsantrasyonunun etkisi ile paralel olarak incelenebilecek ve bazı çalışmalarda elektrokimyasal biriktirme süresi olarak ele alınan bir diğer parametrede platin film kalınlığıdır. Platin biriktirme kalınlığı parametresi ile yaptığımız çalışmanın sonuçları incelediğimiz birçok literatür çalışması ile paralel sonuçlar göstermektedir. Bu çalışmalardan bir tanesi Zou ve arkadaşlarının hazırladıkları glikoz biyosensörün akım cevaplarının platin partiküllerinin biriktirme süresi ile değişimini araştırdıkları çalışmadır. Çalışmada platin partiküllerinin elektrokimyasal biriktirme süresi için optimum değer 5 dakika olarak tespit edilmiştir. 5 dakikanın üzerinde ki biriktirme sürelerinde biyosensörün akım cevaplarında bir azalma olduğu belirlenmiş ve bu durum elektrot yüzeyinde biriken platin partiküllerinin artışı sonucunda elektrodun gerçek yüzey alanında meydana gelebilecek küçülme ile ilişkilendirilmiştir (Zou, 2008). Bir diğer çalışmada, salisilik asit tayini için hazırlanan elektrotta platin partikülleri elektrot yüzeyine dönüşümlü voltametri metodu ile farklı çevrim sayılarında biriktirilmiştir. Salisilik asit için maksimum akım değeri 135 çevrim ile kaplanan elektrotta elde edilmiştir. K_2PtCl_6 çözeltisi kullanılarak yapılan elektrokimyasal biriktirme işlemi 20-150 arasında farklı çevrim sayılarında gerçekleştirilmiş ve her bir elektrot yüzeyinin biriktirme işleminde sonra SEM görüntüleri incelenmiştir. 135 çevrime kadar olan platin biriktirme işlemlerinden sonra alınan SEM görüntüleri incelendiğinde, çevrim sayısı ile birlikte yüzeydeki platin partikül sayısında giderek artış olduğu ve 135 çevrim ile hazırlanan elektrotta yüzeyin platin partikülleri ile tamamen kaplandığı gözlenmiştir. Bu çevrim sayısından daha büyük değerlerde hazırlanan elektrotlarda ise elektrot yüzeyinde platin partiküllerinin büyüdüğü gözlenmiştir. Wang ve arkadaşlarının yaptıkları bu çalışma sonucunda çevrim sayısındaki artış ile yüzeyde meydana gelen değişimin sonucu hem akım cevapları hem de SEM görüntüleri incelenerek yapılmış ve platin partiküllerindeki büyümenin akım cevaplarında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Wang, 2010). Bu çalışmalara ek olarak, elektrot yüzeyinde platin partiküllerinin elektrokimyasal

biriktirilmesi işleminde benzer literatür sonuçlarıyla karşılaşmak mümkündür (Wang, 2006; Chen, 2007; Wu 2009).

PVF⁺XO⁻-Pt biyosensörü hazırlanırken PVF⁺ClO₄⁻ filmi yüzeyinde platin biriktirme işlemi sabit potansiyelde yapılmış ve farklı potansiyellerde yapılan biriktirme işlemlerinde biyosensörün akım cevapları incelenmiştir. Platin biriktirme potansiyeli olarak -0,2 V belirlenmiştir. Daha negatif potansiyellerde yapılan biriktirme işlemlerinde elektrot yüzeyinde platin birikme hızının arttığı gözlenmiştir. Oysa, küçük negatif potansiyellerde platin biriktirme işleminin daha uzun sürdüğü ve polimer film yüzeyinde oluşan kaplamanın daha sağlam olduğu gözlenmiştir. Yapmış olduğumuz bu gözlem Kim ve arkadaşları tarafından hazırlanan glikoz biyosensöründe de belirlenmiş, çalışmalarında farklı platin biriktirme potansiyellerinde hazırlanan yüzeylerin SEM görüntüleri ile karşılaştırmalar yapılmıştır (Kim, 1996).

Biyosensörün akım cevabının etkisi üzerine yapılan bir başka çalışma ise PVF⁺ClO₄⁻ filminin kalınlığının optimizasyonudur. Bu çalışmanın sonuçları incelendiğinde, maksimum akım değeri $4,950 \times 10^{-7}$ mol PVF cm⁻² kalınlığındaki PVF⁺ClO₄⁻ filmi ile hazırlanan biyosensörde elde edilmiştir. Daha kalın polimer filmlerinde akım değerinde azalma gözlenmiştir. Akım değerindeki bu azalma literatürdeki birçok sonuç ile örtüşmekte olup, polimer filmin kalınlığındaki artışın ölçüm ortamındaki substratın polimerin iç bölgelerine difüzyon hızını engelleyici yönde etki yapmasından kaynaklandığı belirlenmiştir (Şen 2004; Gülce, 2005). Gülsev ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise PVF⁺ClO₄⁻ filmi kalınlığının biyosensörün akım değerlerinde meydana getirdiği değişimin tespitinin yanında her bir film kalınlığı için hazırlanan biyosensörlerin Görünür Michaelis-Menten sabiti hesaplanmış ve polimer film kalınlığı artıkça K_{mapp} değerlerinde de bir artış olduğu belirlenmiştir (Aydın, 2002).

Hazırlanan beş farklı biyosensörün optimizasyon parametrelerinin belirlenmesinden sonra performans özelliklerinin araştırılması amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan bir tanesi de biyosensörlerin doğrusal çalışma aralığının bulunmasıdır. Doğrusal çalışma aralığının tespiti için her bir biyosensör kendi optimizasyon şartlarında hazırlanmış ve ölçüm ortamına ksantin çözeltisinden yapılan eklemeler ile akım cevapları arasındaki lineer değişim aralığı belirlenmiştir. Şekil 9.3'de 5 ksantin biyosensörü için bulunan doğrusal çalışma aralıklarının karşılaştırılması verilmiştir.

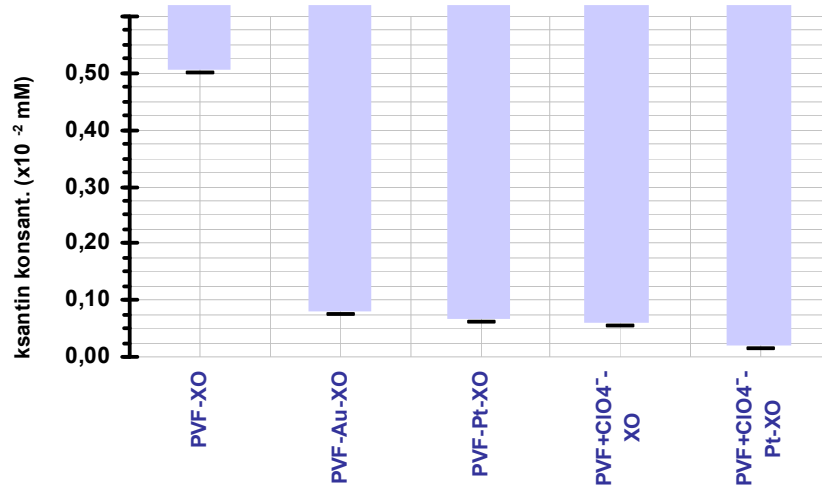


Şekil 9.2. Biyosensörlerin doğrusal çalışma aralıklarının karşılaştırılması

Grafikten de görüldüğü gibi elektrokimyasal çöktürme yoluyla kaplanan $\text{PVF}^+\text{ClO}_4^-$ ile hazırlanan biyosensörler daldırıp-kurutma yoluyla kaplanan PVF ile hazırlanan biyosensörlere göre daha geniş bir çalışma aralığı göstermektedir. PVF modifiye elektrodunun $\text{PVF}^+\text{ClO}_4^-$ modifiye elektroduna göre polimer film kalınlığının daha ince olması, enzimin bu polimer yüzeyindeki immobilizasyon türü elektrodun cevap verebileceği substrat miktarını etkilemiş ve PVF-XO biyosensörü için doğrusal çalışma aralığı üst değeri 0,22 mM olarak tespit edilmiştir. Aynı polimer yüzeyine altın ve platin biriktirilerek hazırlanan biyosensörlerde ise doğrusal çalışma aralığının yaklaşık 3 kat genişlediği görülmektedir. PVF^+XO^- -Pt biyosensöründe ise PVF^+XO^- biyosensörüne göre doğrusal çalışma aralığının platin partiküllerinin etkisi ile yaklaşık 1,5 kat genişlediği belirlenmiştir.

Hazırladığımız biyosensörlerin doğrusal çalışma aralıkları literatür araştırmalarında hazırlanan ksantin biyosensörleri ile karşılaştırılmış ve birçok biyosensörde daha geniş doğrusal aralık gösterdiği belirlenmiştir. Buna göre, Arslan ve arkadaşları hazırladıkları ksantin biyosensöründe doğrusal çalışma aralığını 0,01-0,4 mM, Kirgöz ve arkadaşları 5×10^{-4} -0,04 mM, Çubukçu ve arkadaşları 5×10^{-4} -0,01 mM, Hoshi ve arkadaşları 3-300 μM , Pei ve arkadaşları 6×10^{-4} -0,2 mM, Liu ve arkadaşları 1×10^{-3} -0,02 mM, Shan ve arkadaşları $3,9 \times 10^{-5}$ - $2,1 \times 10^{-2}$ mM, Gao ve arkadaşları 2×10^{-4} -0,01 mM olarak bulmuştur (Arslan, 2006; Kirgöz, 2004; Çubukçu, 2007; Hoshi, 2006; Pei, 2000; Liu, 2004; Shan, 2009; Gao, 2009). Bazı literatür araştırmalarında ise hazırladığımız biyosensörlerde elde ettiğimiz aralıktan daha geniş doğrusal çalışma aralığına sahip biyosensörler hazırlandığı tespit edilmiştir. Bunlardan bir tanesi Villalonga ve çalışma arkadaşlarının hazırladıkları amperometrik ksantin

biyosensörüdür ve doğrusal çalışma aralığı 0,3-10,4 mM olarak bulunmuştur (Villalonga, 2007). Bir diğer amperometrik ksantin biyosensöründe ise doğrusal çalışma aralığı 1-15 mM olarak bulunmuştur (Kılınç, 1998).



Şekil 9.1. Biyosensörlerin gözlenebilme sınırlarının karşılaştırılması

Hazırladığımız biyosensörlerin Şekil 9.2’de gösterilen gözlenebilme sınırları karşılaştırıldığında, doğrusal çalışma aralığında gözlenen sonuca paralel olarak PVF-XO biyosensörü için sınır değeri diğer 4 biyosensörden daha yüksek bulunmuştur. Literatür araştırmalarında elde edilen sonuçlarda ise gözlenebilme sınırını Arslan ve arkadaşları 1×10^{-3} mM, Kirgöz ve arkadaşları 1×10^{-4} mM, Pei ve arkadaşı 1×10^{-4} mM, Shan ve arkadaşları 1×10^{-5} mM, Gao ve arkadaşları 1×10^{-4} mM, Villalonga ve arkadaşları 0,2 mM olarak bulmuştur (Arslan, 2006; Kirgöz, 2004; Pei, 2000; Shan, 2009; Gao, 2009; Villalonga, 2007).

KAYNAKLAR

- Agüi, L., Manso, J., Seden, P., Pingarron, J., 2006, Amperometric biosensor for hypoxanthine based on immobilized xanthine oxidase on nanocrystal gold-carbon paste electrodes, *Sensors and Actuators B*, 113, 272-280.
- Arai, G., Takahashi, S., Yasumori, I., 1996, Xanthine and hypoxanthine sensors based on xanthine oxidase immobilized in poly(mercapto-*p*-benzoquinone) film, *J. Electroanal. Chem.*, 410, 173-179.
- Arslan, F., Yasar, A., Kılıç, E., 2006, An Amperometric Biosensor for Xanthine Determination Prepared from Xanthine Oxidase Immobilized in Polypyrrole Film, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 34, 113–128.
- Arslan, F., 2004, Ksantin Tayini İçin Poliprol Filme Ksantin Oksidazın İmbolizasyonu ve Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması, *Gazi üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Doktora Tezi, Ankara.
- Aso, B.C., Kunitake, T. and Nakashima, T., 1969, Cationic Polymerization and Copolymerization of Vinilferrocene, *Die Makromolekulare Chemie*, 124, 232-240.
- Atkins, P.W., 1998, *Physical Chemistry*, 8th ed. New York.
- Aydın, G., Çelebi, S.S., Özyörük, H., Yıldız, A., 2002, Amperometric enzyme electrode for L(+)-lactate determination using immobilized L(+)-lactate oxidase in poly(vinylferrocenium) film, *Sensors and Actuators B*, 87, 8–12.
- Bard, A.J., Faulkner, L.R., 2000, *Electrochemical Methods: Fundamentals And Applications*, 2nd edition, Wiley.
- Cameron, C., 2000. Enhanced Rates of electron Transport in Conjugated Redox Polymer Hybrids, Memorial University of Newfoundland St. John's, Canada.
- Carsol, M.A. and Macsini, M., 1998, Development of a system with enzyme reactors for the determination of fish freshness, *Talanta*, 47, 335-342.
- Carsol, M.A., Volpe, G., Macsini, 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*, 44, 2151-2159.
- Celej, M. S. and Rivas, G., 1998, Amperometric Glucose Biosensor Based on Gold-Dispersed Carbon Paste, *Electroanalysis*, 10, 771-775.
- Chakraborty, S., Raj, R., 2009, Pt nanoparticle-based highly sensitive platform for the enzyme-free amperometric sensing of H₂O₂, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 3264–3268.

- Chen, X., Li, J., Li, X., and Jiang, L., 1998, A New Step to the Mechanism of the Enhancement Effect of Gold Nanoparticles on Glucose Oxidase, *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 245, 352–355.
- Chen, X., Li, N., Eckhard, K., Stoica, L., Xia, W., Assmann, J., Muhler, M., Schuhmann, W., 2007, Pulsed electrodeposition of Pt nanoclusters on carbon nanotubes modified carbon materials using diffusion restricting viscous electrolytes, *Electrochemistry Communications*, 9, 1348–1354.
- Crumbliss, A.L., O'Daly, J.P., Perine, S.C., Stonehuerner, J., Tubergen, K.R., Zhao, J., Henkens, R.W., 1992, Colloidal gold as a biocompatible immobilization matrix suitable for the fabrication of enzyme electrodes by electrodeposition, *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 483-490.
- Çelebi, M. S., Özyörük, H., Yıldız, A., Abacı, S., 2009, Determination of Hg^{2+} on poly(vinylferrocenium) (PVF⁺)-modified platinum electrode, *Talanta*, 78, 405–409.
- Çubukçu, M., Timur, S., Anik, Ü., 2007, Examination of performance of glassy carbon paste electrode modified with gold nanoparticle and xanthine oxidase for xanthine and hypoxanthine detection, *Talanta*, 74, 434-439.
- D'Silva, C., Wang, X. and Pethig, R., 1989, Physical and electrochemical characterisation of polyvinylferrocene films, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 22, 1591-1597.
- Dixon, M., Thurlow, S.T., 1924, Studies on Xanthine Oxidase: Preparation and Properties of the Active Material, *Biochem. J.*, 18, 971-976.
- Dong, S., Che, G., 1991, Electrocatalysis at a microdisk electrode modified with a redox species, *J. Electroanal. Chem.*, 309, 103-114.
- Dursun, F., 2009, Medyatör Bağlı Matrikslerin Tyrosinase Tabanlı Fenol Biyosensörüne Uygulanması, *Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gebze.
- Eggins, B.R., 2002, *Chemical Sensors and Biosensors*, John Wiley, USA.
- Emre, F. B., 2007, Kolesterol Biyosensörü Tasarımında Bazı Polimerik Materyallerin Enzim İmmobilizasyon Ortamı Olarak Kullanımı, *İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Doktora Tezi, Malatya.
- Freire, R.S., Pessoa, C.A., Mello, L.D. and Kubota, L.T., 2003, Direct Electron Transfer: An Approach for Electrochemical Biosensors with Higher Selectivity and Sensitivity, *J. Braz. Chem. Soc.*, 14 (2), 230-243.
- Gao, Y., Shen, C., Di, J., Tu, Y., 2009, Fabrication of amperometric xanthine biosensors based on direct chemistry of xanthine oxidase, *Materials Science and Engineering C*, 29, 2213–2216.

- Geng, D. and Lu, G., 2007, Size effect of gold nanoparticles on the electrocatalytic oxidation of carbon monoxide in alkaline solution, *Journal of Nanoparticle Research*, 9, 1145–1151.
- Ghosh(Hazra), S., Sarker, D. and Misra, T.N., 1998, Development of an amperometric enzyme electrode biosensor for fish freshness detection, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 53, 58-62.
- Gonzalez, E., Pariente, F., Lorenzo, E., Hernandez, L., 1991, Amperometric sensor for hypoxanthine and xanthine based on the detection of uric acid, *Anal. Chim. Acta*, 242, 267-273.
- Gorton, L., Lindgren, A., Larsson, T., Munteanu, F.D., Ruzgas, T., Gararyan, I., 1999, Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors, *Analytica Chimica Acta*, 400, 91–108.
- Gökdoğan, Ö., Sulak, M., Gülce, H., 2006, Investigation of oxygen electroreduction on polyvinylferrocene coated glassy carbon electrodes, *Chemical Engineering Journal*, 116, 39–45.
- Gülce, H., 1993, Polivinilferrosen Modifiye Elektrodunun Sulu ve Susuz Ortamlardaki Elektrokimyasal Davranışı, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, Ankara.
- Gülce, H., Özyörük, H., Yıldız, A., 1994a, Electrochemical reduction of anthracenes on poly(vinylferrocenium) coated Pt electrodes in acetonitrile, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 98, 228-233.
- Gülce, H., Özyörük, H., Yıldız, A., 1994b. Electrochemical oxidation of anthracenes on poly(vinylferrocenium) coated Pt electrodes in acetonitrile, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 98, 828-832.
- Gülce, H., Özyörük, H., Yıldız, A., 1995. Electrochemical response of the poly(vinylferrocenium) coated Pt electrodes towards some anions in aqueous medium. *Electroanalysis*, 7, 178-183.
- Gülce, H., Özyörük, H., Çelebi, S.S., Yıldız, A., 1995a, Amperometric enzyme electrode for aerobic glucose monitoring prepared by glucose oxidase immobilized in poly(vinylferrocenium), *J. Electroanal. Chem.*, 394, 63–70.
- Gülce, H., Özyörük, H., Çelebi, S.S., Yıldız, A., 1995b. Amperometric enzyme electrode for sucrose determination prepared from glucose oxidase and invertase co-immobilized in polyvinylferrocenium, *J. Electroanal. Chem.*, 397, 217–223.
- Gülce, H., Ataman, İ., Gülce, A., Yıldız, A., 2002a, A new amperometric enzyme electrode for galactose determination, *Enzyme Microb. Tech.*, 30, 41-44.
- Gülce, H., Gülce, A., Yıldız, A., 2002b. A novel two-enzyme amperometric electrode for lactose determination, *Anal. Sci.*, 18, 1-3.

- Gülce, H., Gülce, A., Kavanoz, M., Coşkun, H., Yıldız, A., 2002c. A new amperometric enzyme electrode for alcohol determination, *Biosens. Bioelectron.*, 17, 517-521.
- Gülce, H., Aktaş, Y.S., Gülce, A., Yıldız, A., 2003, Polyvinylferrocenium immobilized enzyme electrode for choline analysis, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 895-899.
- Gülce, A., Gülce, H., 2005, Polyvinylferrocenium modified Pt electrode for anaerobic glucose monitoring, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 62, 81-92.
- Habermuller, K., Mosbach, M., Schuhmann, W., 2000, Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366, 560-568.
- Haemmerli, S.D., Suleiman, A.A., Guilbault, G.G., 1990, Amperometric Determination of Hypoxanthine and Inosine by Use of Enzyme Sensors, *Analytical Letters*, 23 (4), 577-588.
- Harrison, R., 2002, Structure and Function of Xanthine Oxidoreductase: Where Are We Now?, *Free Radical Biology & Medicine*, 33 (6), 774-797.
- Hille, R., 2006, Structure and Function of Xanthine Oxidoreductase, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 1913-1926.
- Hiratsuka, A., Kojima, K., Mugurumac, H., Lee, K., Suzuki, H., Karube, I., 2005, Electron transfer mediator micro-biosensor fabrication by organic plasma process, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 957-964.
- Horton, R., Moran, L. A., Scrimgeour, G., Perry, M., Rawn, D., 2006, *Principles of Biochemistry*, 4th Edition, Prentice Hall.
- Hoshi, T., Noguchi, T., Anzai, J., 2006, The preparation of amperometric xanthine sensors based on multilayer thin films containing xanthine oxidase, *Materials Science & Engineering C*, 26, 100-103.
- Hu, S., Liu, C.C., 1997, A bienzyme sensor for the determination of hypoxanthine and inosine, *Electroanalysis*, 5, 1229-1233.
- Hu, S., Liu, C.C., 1997, Development of a hypoxanthine biosensor based on immobilized xanthine oxidase chemically modified electrode, *Electroanalysis*, 5, 372-377.
- Hu, S., Xu, C., Luo, J., Cui, D., 2000, Biosensor for detection of hypoxanthine based on xanthine oxidase immobilized on chemically modified carbon paste electrode, *Analytica Chimica Acta*, 412, 55-61.
- Huang, Y., Wen, Q., Jiang, J., Shen, G., Yu, R., 2008, A novel electrochemical immunosensor based on hydrogen evolution inhibition by enzymatic copper deposition on platinum nanoparticle-modified electrode, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 600-605.

- Kannuck, R.M., Bellama, J.M., Blubaugh, E.A., Durst, R.A., 1987, Crosslinked Poly(vinylferrocene)-Modified Reference Electrode for Nonaqueous Electrochemistry, *Anal. Chem.*, 59, 1473-1475.
- Kaufman, F.B., Engler, E.M., 1979, Solid-state spectroelectrochemistry of crosslinked donor bound polymer films, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (3), 547-549.
- Kaufman, F.B., Schroeder, A.H., Engler, E.M., Kramer, S.R., Chambers, J.Q., 1980, Ion and electron transport in stable, electroactive tetrathiafulvalene polymer coated electrodes, *J. Am. Chem. Soc.*, 102 (2), 483-488.
- Kavanoz, M., 2009, Electrochemical Preparation and Characterization of Polyvinylferrocene/Polyaniline Composite Electrode and Using for Determination of Phenolic Compounds, *Hacettepe üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Doktora Tezi, Ankara.
- Kavanoz, M., Gülce, H., Yıldız, A., 2004, Anodic Stripping Voltammetric Determination of Gold on a Polyvinylferrocene Coated Glassy Carbon Electrode, *Turk J Chem*, 28, 287-297.
- Kawai, T., Iwakura, C., Yoneyama, H., 1989, Electrochemical characteristics of poly(vinylferrocene) derivatives for battery application, *Electrochim. Acta*, 34, 1357-1361.
- Kilinc, E., Erdem, A., Gokgunec, L., Dalbasti, T., Karaoglan, M., Ozsoz, M., 1998, Butternilk based cobalt phthalocyanine dispersed ferricyanide mediated amperometric biosensor for the determination of xanthine, *Electroanal.*, 10, 273–275.
- Kim, C.S. and Oh, S.M., 1996, Enzyme sensors prepared by electrodeposition on platinized platinum electrodes, *Electrochimica Acta*, 41, 2433-2439.
- Kirgöz, U.A., Timur, S., Wang, J., Telefoncu, A., 2004, Xanthine oxidase modified glassy carbon paste electrode, *Electrochem. Commun.*, 6, 913-916.
- Koide, S., Yokoyama, K., 1999, Electrochemical characterization of an enzyme electrode based on a ferrocene-containing redox polymer, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 468, 193-201.
- Kul, Z., 2006, Yağ Dokusu Kaynaklı Stromal Vasküler Fraksiyonun Random Paternli Cilt Fleplerinin Yaşayabilirliği Üzerine Etkisi Deneysel Çalışma, Uzmanlık Tezi, İstanbul.
- Kuralay, F., Özyörük, H., Yıldız, A., 2005, Potentiometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly(vinylferrocenium) film, *Sensors and Actuators B*, 109, 194–199.
- Kuralay, F., Özyörük, H., Yıldız, A., 2006, Amperometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly(vinylferrocenium) film, *Sensors and Actuators B*, 114, 500-506.

- Kuramoto, N. and Shishido, Y., 1998, Property of thermo-sensitive and redox-active poly(N-cyclopropylacrylamide-co-vinylferrocene) and poly(Nisopropylacrylamide-co-vinylferrocene), *Polymer*, 39(3), 669-675.
- Liu, S., Liu, J., Wang, L., Zhao, F., 2010, Development of electrochemical DNA biosensor based on gold nanoparticle modified electrode by electroless deposition, *Bioelectrochemistry*, 79, 37-42.
- Liu, Y., Nie, L., Tao, W., Yao, S., 2004, Amperometric Study of Au-Colloid Function on Xanthine Biosensor Based on Xanthine Oxidase Immobilized in Polypyrrole Layer, *Electroanalysis*, 16, 1271-1278.
- Male, K. B., Hrapovic, S., Liu, Y., Wang D., Luong, J.H.T., 2004, Electrochemical detection of carbohydrates using copper nanoparticles and carbon nanotubes, *Analytica Chimica Acta*, 516, 35-41.
- Mao, L., Xu, F., Xu, Q., Jin, L., 2001, Miniaturized Amperometric Biosensor Based on Xanthine Oxidase for Monitoring Hypoxanthine in Cell Culture Media, *Anal. Biochem.*, 292, 94-101.
- Mao, L., Yamamoto, K., 2000, Amperometric on-line sensor for continuous measurement of hypoxanthine based on osmium-polyvinylpyridine gel polymer and xanthine oxidase bienzyme modified glassy carbon electrode, *Anal. Chim. Acta*, 415, 143-150.
- Metinyurt, G., 2003, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Plazma Ksantin Oksidaz Aktivitesi Ölçümü ve Hipogonadizmlili Hastalarda Ksantin Oksidaz Düzeylerinin Belirlenmesi, Uzmanlık Tezi, *Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri tıp Fakültesi*, Ankara.
- Mohanty, S.P. Kougianos, E., 2006, Biosensors: a tutorial review, *Potentials IEEE*, 25(2), 35-40.
- Murphy, L., 2006, Biosensors and bioelectrochemistry, *Current Opinion in Chemical Biology*, 10, 177-184.
- Nguyen, A.L., Luong, J.H.T., 1993, Development of mediated amperometric biosensors for hypoxanthine, glucose and lactate: a new format, *Biosens. Bioelectron.*, 8, 421-431.
- Nguyen, A.L., Luong, J.H.T., 1993, Mediated glucose biosensor based on polyvinylferrocene, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 43, 117-132.
- Nguyen, A.L., Luong, J.H.T., Yacynych, A.M., 1991, Retention of enzyme by electropolymerized film: A new approach in developing a hypoxanthine biosensor, *Biotechnol. Bioeng.*, 37, 729-735.
- Niu, J., Lee, J.Y., 2000, Bulk-modified amperometric biosensors for hypoxanthine based on sol-gel technique, *Sens. Actuators B*, 62, 190-198.

- Okuma, H., Takahashi, H., Sekimukai, S., Kawahara, K., Akahoshi, R., 1991, Mediated amperometric biosensor for hypoxanthine based on a hydroxymethylferrocene-modified carbon paste electrode, *Anal. Chim. Acta*, 244, 161-164.
- Özer, B.C., Özyörük, H., Çelebi, S.S., Yıldız, A., 2007, Amperometric enzyme electrode for free cholesterol determination prepared with cholesterol oxidase immobilized in poly(vinylferrocenium) film, *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 262-265.
- Pei, J., Li, X., 2000, Xanthine and hypoxanthine sensors based on xanthine oxidase immobilized on a CuPtCl_6 chemically modified electrode and liquid chromatography electrochemical detection, *Analytica Chimica Acta*, 414, 205-213.
- Pekin, B., 1979, Biyokimya Mühendisliği (Temel İlkeler), İzmir.
- Qiong, C., Tuzhi, P., Liju, Y., 1998, Silk fibroin/cellulose acetate membrane electrodes incorporating xanthine oxidase for the determination of fish freshness, *Anal. Chim. Acta*, 369, 245-251.
- Raj, C. R., Okajima, T., Ohsaka, T., 2003, Gold nanoparticle arrays for the voltammetric sensing of dopamine, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 543, 127-133.
- Rehak, M., Snejdarkova, M., Otto, M., 1994, Application of biotin-streptavidin technology in developing a xanthine biosensor based on a self-assembled phospholipid membrane, *Biosens. Bioelectron.*, 9, 337-341.
- Saatçi, E., 1997, İnek sütü ksantin oksidazının saflaştırılması ve bazı kinetik özelliklerinin incelenmesi, *Ersiyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri.
- Saito, T., Watanabe, M., 1998, Characterization of poly(vinylferrocene-co-2-hydroxyethyl methacrylate) for use as electron mediator in enzymatic glucose sensor, *Reactive & Functional Polymers*, 37, 263-269.
- Sasaki, Y., Walker, L.L., Hurst, E.L. and Pittman, C.U., 1973, Preparation of Polyvinylferrocene, *Journal of Polymer Science*, 11, 1213-1224.
- Shan, D., Wang, Y.N., Xue, H.G., Cosnier, S., Ding, S.N., 2009, Xanthine oxidase/laponite nanoparticles immobilized on glassy carbon electrode: Direct electron transfer and multielectrocatalysis, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 3556-3561.
- Shen, L., Yang, L., Peng, T., 1996, Amperometric determination of fish freshness by a hypoxanthine biosensor, *J. Sci. Food Agric.*, 70, 298-302.
- Shi, G., Liu, M., Zhu, M., Zhou, T., Chen, J., Jin, L., Jin, J.Y., 2002, The study of nafion/xanthine oxidase/au colloid chemically modified biosensor and its

- application in the determination of hypoxanthine in myocardial cells in vivo, *Analyst*, 127, 396–400.
- Shirota, Y., Kakuta, T., Mikawa, H., 1984, Electrochemical oxidation of poly(vinylferrocene) with concurrent precipitation on the electrode; preparation of an electrically conducting polymer, *Makromol. Chem.*, 5, 337-340.
- Skoog, D., Holler, F., Nieman, T., 1998, Principles of Instrumental Analysis.
- Smith, T.W., Kuder, J.E., Wychick, D., 1976. Voltammetric behavior of polyvinylferrocene, *J. Polym. Sci.*, 14, 2433–2448.
- Sulak, M. T., Gökdoğan, Ö., Gülce, A., Gülce, H., 2006, Amperometric glucose biosensor based on gold-deposited polyvinylferrocene film on Pt electrode, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 1719–1726.
- Şen, S., Gülce, A., Gülce, H., 2004, Polyvinylferrocenium modified Pt electrode for the design of amperometric choline and acetylcholine enzyme electrodes, *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 1261–1268.
- Şenel, M., Çevik, E., Abasıyanık, M.F., 2010, Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on covalent immobilization of horseradish peroxidase on ferrocene containing polymeric mediator, *Sensors and Actuators B*, 145, 444–450.
- Tang, H., Chen, J., Yao, S., Nie, L., Deng, G. and Kuang, Y., 2004, Amperometric glucose biosensor based on adsorption of glucose oxidase at platinum nanoparticle-modified carbon nanotube electrode, *Analytical Biochemistry*, 331, 89-97.
- Telefoncu, A., 1999, *Biyosensörler*, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Kuşadası.
- Tomur, A., Etlik, O., Gundogan, N.U., 2005, Hyperbaric oxygenation and antioxidant vitamin combination reduces ischemia-reperfusion injury in a rat epigastric island skin-flap model, *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, 16 (4), 275-85.
- Tüzün, C., 1997, Biyokimya, Palme Yayınları, Ankara.
- Umana, M., Rolinson, D. R., Nowak, R., Daum, P., Murray, R. W., 1980, X-Ray photoelectron spectroscopy of metal, metal oxide and carbon electrode surfaces chemically modified with ferrocene and ferricenium, *Surface science*, 101, 295-309.
- Vastarella, W., 1998, Enzyme Modified Electrodes in Amperometric Biosensors, *Università Degli Studi Di Bari Dipartimento Di Chimica*, Italy.
- Villalonga, R., Matos, M., Cao, R., 2007, Construction of an amperometric biosensor for xanthine via supramolecular associations, *Electrochemistry Communications*, 9, 454–458.

- Volpe, G., Macsini, M., 1996, Enzyme Sensors for Determination of Fish Freshness, *Talanta*, 43, 283-289.
- Wang, X.B., Bonnett, J.M., Pethig, R., Baker, P.K., Parri, O.L., Underhill, A.E., 1991, Electrochemical properties of substituted polycinylferrocene films, *J. Mol. Electron.* 7 : 167-178.
- Wang, Z., Qiu, K., 2006, Electrocatalytic oxidation of formic acid on platinum nanoparticle electrode deposited on the nichrome substrate, *Electrochemistry Communications*, 8, 1075–1081.
- Wang, Z., Xu, F.A., Yang, Q., Yu, J.H., Huang, W., Zhao, Y., 2010, Electrocatalytic activity of salicylic acid on the platinum nanoparticles modified electrode by electrochemical deposition, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76, 370–374.
- Watanabe, E., Tamada, Y., Hamada-Sato, N., 2005, Development of quality evaluation sensor for fish freshness control based on KI value, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 534-538.
- Whirter, B.R., Hille, R., 1991, The Reductive Half Reactşno of Xanthine Oxidase, *The Journal of Biological Chemistry*, 266 (35), 23724-23731.
- Wu, H., Wang, J., Kang, X., Wang, C., Wang, D., Liu, J., Aksay, I.A., Lin, Y., 2009, Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in platinum nanoparticles/graphene/chitosan nanocomposite film, *Talanta*, 80, 403–406.
- Xu, D., Wang, L., Gao, M., Jin, L., Jin, J., 2002, Amperometric sensor for glucose and hypoxanthine based on a Pd- IrO_2 modified electrode by a co-crosslinking bienzymic system, *Talanta*, 57, 365-373.
- Xue, H., Mu, S., 1995, Bioelectrochemical response of the polypyrrole xanthine oxidase electrode, *Electroanal. Chem.*, 397, 241-247.
- Yao, T., 1993, Enzyme electrode for the successive detection of hypoxanthine and inosine, *Anal. Chim. Acta*, 281, 323-326.
- Yıldız, S., 1979, Xanthine oxidase enzimi aktivitesinin spektrofotometrik yöntemle tayini, *D. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 293-302.
- Yıldız, S., Pekin, B., 1979, Xanthine'in Xanthine Oxidase ile Enzimatik olarak Yükseltgenmesinin Fluorometrik Yönetemle İncelenmesi ve Bazı Parametrelerin Tayini, *D. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 303-313.
- Yıldız, S., Pekin, B., 1982, Determination of Xanthine Oxidase by Microcalorimetric Method, *Analytical Letters*, 15 (B4), 405-412.
- Yuan, C.J., Hsu, C.L., Wang, S.C., Chang, K.S., 2005, Eliminating the interference of ascorbic acid and uric acid to the amperometric glucose biosensor by cation exchangers membrane and size exclusion membrane, *Electroanalysis*, 17, 24, 2239-2245.

- Zhao, J., O'Daly, J.P., Henkens, R.W., Stonehuerner, J., Crumbliss, A.L., 1996, A xanthine oxidase/colloidal gold enzyme electrode for amperometric biosensor applications, *Biosens. Bioelectron.*, 11, 493-502.
- Zhao, S., Luong, J.H.T., 1993, Bioelectrocatalysis of a water-soluble tetrathiafulvalene-2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex, *Anal. Chim. Acta*, 282, 319-327.
- Zou, Y., Xiang, C., Sun, L., Xu, F., 2008, Glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles onto carbon nanotubes and immobilizing enzyme with chitosan-SiO₂ sol-gel, *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 1010–1016.
- <http://www.fatih.edu.tr/~abasiyanik/BSA%20ve%20biyosensorler.pdf> (Abasıyanık, M.F., Şakalar, E., Şenel, M., 2008, Biyosensörlere genel bir bakış ve biyosavunmada kullanılan Biyosensörler).
- <http://www.biyomedtek.com/bmt-konular-no4.htm> (Bişkin, 2002, “Sağlık için Biyoteknoloji” yazıdan derlenmiş).

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Salih Zeki Baş
Uyruğu : T. C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Karaman, 1980
Telefon : 0332 223 3877
Faks : -
e-mail : szeki@selcuk.edu.tr

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Fatih Lisesi, Karaman	1998
Üniversite	: S.Ü., Fen-Edebiyat F., Kimya Bölümü, Konya	2002
Yüksek Lisans	: S.Ü., Fen Bilimleri E., Kimya ABD, Konya	2004
Doktora	: S.Ü., Fen Bilimleri E., Kimya ABD, Konya	2011

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2003-devam ediyor	S.Ü. Fen F., Kimya Bölümü	Araş. Gör.

YABANCI DİLLER

İngilizce

YAYINLAR

Bas, S.Z., Yildiz, S., 2003, Chemical modification kinetics of polystyrenes having various molecular weights, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 298, 123–128 (Yüksek Lisans)