

**OKSALAT ENZİMATİK ELEKTRODUNUN
HAZIRLANMASI VE OKSALİK ASİT GİRİŞİMİNE
KARŞI VOLTAMETRİK ANALİZ KOŞULLARININ
OPTİMİZE EDİLMESİ**

ŞENER ŞENOL



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OKSALAT ENZİMATİK ELEKTRODUNUN HAZIRLANMASI VE OKSALİK
ASİT GİRİŞİMİNE KARŞI VOLTAMETRİK ANALİZ KOŞULLARININ
OPTİMİZE EDİLMESİ**

Şener ŞENOL

Doç. Dr. M. Haluk TÜRKDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA-2011
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Şener ŞENOL tarafından hazırlanan “Oksalat enzimatik elektrodunun hazırlanması ve oksalik asit girişimine karşı voltametrik analiz koşullarının optimize edilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. M. Haluk TÜRKDEMİR

- | | |
|---|------|
| Başkan : Prof. Dr. Şeref GÜÇER
U.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi,
Kimya Anabilim Dalı | İmza |
| Üye : Doç. Dr. M. Haluk TÜRKDEMİR
U.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi,
Kimya Anabilim Dalı | İmza |
| Üye : Yrd. Doç. Dr. Ozan GÜRBÜZ
U.Ü Ziraat Fakültesi,
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı | İmza |
| Üye : Doç. Dr. Belgin İZGİ (Yedek Üye)
U.Ü Fen Edebiyat Fakültesi,
Kimya Anabilim Dalı | İmza |
| Üye : Prof. Dr. Özgür Akgün KARABULUT (Yedek Üye)
U.Ü. Ziraat Fakültesi, | İmza |

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Kadri ARSLAN
Enstitü Müdürü

.... / /

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum tüm eserleri kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

...../...../.....

Şener Şenol

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

OKSALAT ENZİMATİK ELEKTRODUNUN HAZIRLANMASI VE OKSALİK ASİT GİRİŞİMİNE KARŞI VOLTAMETRİK ANALİZ KOŞULLARININ OPTİMİZE EDİLMESİ

Şener ŞENOL

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr M. Haluk TÜRKDEMİR

Yeni kimyasal ve biyokimyasal sensörler hazırlanması, var olanların geliştirilmesi son yıllarda analitik kimyanın temel araştırma konuları arasında yer almaktadır. Elektrokimyasal biyosensörler arasında sayılan enzimatik oksalat elektrotu, hazırlanma zorluğunun azaltılması, seçicilik ve duyarlılığının artırılması için çalışmaların sürdürüldüğü bir sensördür. Bu çalışmada, oksalat tayini için oksalat oksidaz enzimi ile hazırlanan elektrotun, oksalik asit girişimine karşı optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Oksidaz yapısındaki enzimatik elektrotların ölçüm ilkesi oluşan hidrojen peroksit ölçümüne dayalı olduğundan, hidrojen peroksit ve oksalik asidin geniş bir pH bölgesinde farklı çalışma elektrotları ve tampon çözelti bileşimine olan duyarlılığını belirleme çalışmalarına öncelik verildi. Yapılan optimizasyon çalışmaları ile, anodik bölgedeki yükseltgenme pikinin duyarlık ve tekrarlanırlık açısından daha uygun olduğu, platin elektrot ve Britton–Robinson tamponunda en iyi duyarlılığın elde edildiği, oksalik asit eklemelerinin önceden tamponlanmış olmaması halinde ölçüm ortamının pH'si üzerinde etkili olduğu, $\text{pH} \leq 4$ olan bölgede oksalik asit ile hidrojen peroksit piklerinin tamamen girişim yaptığı ve bu iki maddenin piklerinin ancak pH 6,5'de ayrıştığı, dolayısıyla bu koşullarda bir enzimatik sensör hazırlanabileceği belirlendi.

Uygunluğu belirlenen ölçüm koşullarında farklı enzim immobilizasyon yöntemlerinin denenerek, duyarlılık ve kullanım ömrü açısından karşılaştırmalar yapıldı. Başarılı şekilde hazırlanan glutaraldehit ile çapraz bağlı ve nafyon kaplı enzimatik elektrotlarda 0,025-1,000 mM derişim aralığında doğrusal çalışma aralığı elde edildi. Sensör duyarlılığının zamanla değişimi, nafyon yüzdesinin sensör duyarlılığı üzerindeki etkisi çalışmaları yapıldı, gerçek örneklerde başarılı ölçüm ve denemeler gerçekleştirildi.

Anahtar Kelimeler: Oksalat sensörü, biyosensör, oksalat oksidaz, oksalik asit, enzimatik sensör

2011, xii + 106 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

PREPERATION OF OXALATE ENZYMATIC ELECTRODE AND OPTIMIZATION OF THE VOLTAMMETRIC ANALYSIS CONDITIONS AGAINST OXALIC ACID INTERFERENCE

Şener ŞENOL

Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr M. Haluk TÜRKDEMİR

In recent years, preparation of new chemical and biochemical sensors and development of existing ones is among the main research topics of analytical chemistry. Enzymatic oxalate sensor, is regarded as a electrochemical biosensor, which optimization studies still proceed for minimization of difficulties in preparation process and improve selectivity and sensitivity. In this study, optimization studies of the oxalate electrode, prepared with immobilization of oxalate oxidase, have been done against the interference effect of oxalic acid.

Measurement principle of oxidase enzyme type electrodes are based on the measurement of produced hydrogen peroxide, the investigation of working electrode type and pH effect in a wide range with using different buffer solution on sensitivity of hydrogen peroxide and oxalic acid analysis was given priority.

After optimization studies, the oxidation peak in the anodic region which is much proper in terms of sensibility and reproducibility, the best sensitivity was obtained with platinum electrode and in Britton-Robinson buffer, the effect of non-buffered oxalic acid additions on the pH of solution were determined. And also observed that, the anodic peaks of oxalic acid and hydrogen peroxide was completely coincided at the $\text{pH} \leq 4$ and the peaks of these two substances became different at only 6,5 pH, and therefore possibility of an enzymatic sensor preparation in these conditions was determined.

Several immobilization techniques were tested in the determined conditions and comparisons were performed in terms of sensibility and life time of enzymatic electrode. A linear working range between 0,025-1,000 mM concentration were obtained which using successfully prepared with cross-linking of glutaraldehyde and encapsulated with nafion. Some of characteristic determinations like variation of sensibility as a function of time and the effect of % nafion to the sensibility are carried out and also successful studies are performed with real samples.

Key words: Oxalate sensor, biosensor, oxalate oxidase, oxalic acid, enzymatic sensor

2011, xii + 106 pages

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyelerinden Doç. Dr M. Haluk TÜRKDEMİR yönetiminde hazırlanarak, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.

Yüksek lisans tezimi yöneten ve çalışmalarım esnasında yakın ilgi ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman bana destek olup, yol gösteren sayın hocam Doç. Dr M. Haluk TÜRKDEMİR'e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmamda yararlandığım cihaz ve sarf malzemelerinin temininin sağlandığı, aynı zamanda yardımcı araştırmacı olarak görev yapmakta olduğum F2008/58 nolu projeye verilen destek dolayısıyla Uludağ Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimine ve bu olanağı sağlayan yetkililere teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda katkısı bulunan Bilecik Üniversitesi Kimya Bölümü Araştırma Görevlisi arkadaşım Adem SARIHAN'a ve yüksek lisans eğitimim süresince çalışmalarım katkıda bulunan tüm Uludağ Üniversitesi Kimya Bölümü Araştırma Görevlilerine teşekkür ederim.

Tüm tahsil hayatım boyunca benim için her türlü fedakarlığı gösteren anneme, babama ve kardeşime sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca manevi desteklerini bir an olsun üzerimden ayırmayan nişanlım Elvan ER ve ailesine teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca arkadaşlarım Gökhan KAPLAN, Emel DEMİRBEL, Nurettin YANNİ ve Derviş KARABULUT'a manevi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Şener Şenol
...../...../.....

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. Biyosensörler.....	3
2.2. Biyosensörlerin Kullanım Alanları.....	5
2.2.1. Endüstriyel işlem kontrolü.....	5
2.2.2. Klinik analizler.....	5
2.2.3. Yiyecek örnekleri analizleri.....	6
2.2.4. Çevresel örnek analizleri.....	6
2.2.5. Savunma–güvenlik alanı.....	6
2.3. Biyosensör Çeşitleri.....	7
2.3.1. Biyolojik ajanın etki mekanizmasına göre biyosensörler.....	7
2.3.1.1. Biyo – katalitik tanımlama ajanları ile biyosensörler.....	7
2.3.1.2. Biyo – afinite tanımlama ajanları ile biyosensörler.....	7
2.3.2. Dönüştürücü sistemin çeşidine göre biyosensörler.....	7
2.3.2.1. Optik biyosensörler.....	7
2.3.2.2. Kalorimetrik biyosensörler.....	8
2.3.2.3. Piezoelektrik biyosensörler.....	8
2.3.2.4. Elektrokimyasal biyosensörler.....	9
2.4. Enzimler.....	12
2.4.1. Enzimlerin yapısı.....	13
2.4.2. Enzim reaksiyonlarının kinetik yönden incelenmesi.....	13
2.5. Enzim İmmobilizasyonu.....	16
2.5.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	17
2.5.1.1. Bağlama ile immobilizasyon yöntemleri.....	17
2.5.1.2. Çapraz bağlama ile immobilizasyon yöntemi.....	19
2.5.1.3. Hapsetme ile immobilizasyon yöntemi.....	19
2.6. Biyosensör Yapımında Yararlanılan Voltametrik Teknikler.....	21
2.6.1. Doğrusal taramalı voltametri tekniği.....	23
2.6.2. Çevrimsel voltametri tekniği.....	24
2.6.3. Time–Base (akım–zaman) tekniği.....	25
2.6.4. Puls teknikleri.....	26
2.6.4.1. Normal puls voltametrisi.....	27
2.6.4.2. Diferansiyel puls voltametrisi.....	28
2.6.4.3. Kare dalga voltametrisi.....	29
2.7. Literatürde Oksalat Tayini İçin Yapılan Çalışmalar.....	31
2.7.1. Biyosensörler ile yapılan çalışmalar.....	31
2.7.2. Diğer teknikler ile yapılan çalışmalar.....	34

3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	37
3.1. Kullanılan Cihazlar.....	37
3.2. Kullanılan Çözeltiler.....	37
3.3. Kullanılan Yöntemler.....	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. Voltametik Çalışmalar.....	41
4.1.1. H ₂ O ₂ ile ilgili çalışmalar.....	42
4.1.1.1. H ₂ O ₂ için PtE ile yapılan çalışmalar.....	43
4.1.1.2. H ₂ O ₂ için GCE ile yapılan çalışmalar.....	47
4.1.2. Oksalik asit ile ilgili çalışmalar.....	48
4.1.2.1. Oksalik asit için HDME ile yapılan çalışmalar.....	48
4.1.2.2. Oksalik asit için PtE ile yapılan çalışmalar.....	51
4.2. UV-VIS Spektrofotometrik Çalışmalar.....	71
4.3. Biyosensör Hazırlama Çalışmaları.....	73
4.3.1. Elektrokimyasal polimerleşme ile biyosensör hazırlama çalışmaları.....	73
4.3.2. Çapraz bağlama ile biyosensör hazırlama çalışmaları.....	78
4.3.3. Polimer matriks altına hapsetme ile biyosensör hazırlama çalışmaları.....	83
4.3.4. Gerçek örnek ile oksalat tayini çalışması.....	90
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	96
KAYNAKLAR.....	100
ÖZGEÇMİŞ.....	106

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklamalar
FET	Alan Etki Transistörü
HMDE	Askıda Civa Damla Elektrot
BSA	Bovin Serum Albumin
BRT	Britton–Robinson Tamponu
GCE	Camsı Karbon Elektrot
CV	Çevrimsel Voltametri
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DPV	Diferansiyel Puls Voltametrisi
LSV	Doğrusal Taramalı Voltametri
ENFET	Enzim Modifiyeli Alan Etki Transistörü
FT	Fosfat Tamponu
ISFET	İyon Duyarlı Alan Etki Transistörü
ISE	İyon Seçici Elektrot
SWV	Kare Dalga Voltametrisi
MOSFET	Metal Oksit Alan Etki Transistörü
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NPV	Normal Puls Voltametrisi
PtE	Platin Elektrot
Time–Base	Sabit Potansiyelde Akımın Zamanla Değişimi
SIRE	Tanımlama Ajanını Direkt Enjeksiyonuna Dayanan Sensör

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Biyosensörün şematik görünümü.....	3
Şekil 2.2. Enzim aktivitesine pH'nin etkisi.....	15
Şekil 2.3. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	16
Şekil 2.4. İmmobilizasyon yöntemleri.....	17
Şekil 2.5. IUPAC sistemine göre akım–potansiyel yönleri ve işaretleri.....	22
Şekil 2.6. LSV’de potansiyel uygulama programı.....	23
Şekil 2.7. LSV eğrisi.....	23
Şekil 2.8. CV’de potansiyel uygulama programı.....	24
Şekil 2.9. CV eğrisi.....	25
Şekil 2.10. Time–Base eğrisi.....	26
Şekil 2.11. NPV’de uygulanan potansiyel programı.....	27
Şekil 2.12. DPV’de potansiyel uygulama programı.....	28
Şekil 2.13. DPV eğrisi.....	29
Şekil 2.14. NPV eğrisi.....	29
Şekil 2.15. SWV’de potansiyel uygulama programı.....	30
Şekil 2.16. SWV’de ileri okuma, geri okuma ve ikisi arasındaki fark sonucu elde edilmiş akım–potansiyel eğrileri.....	30
Şekil 4.1. 6 mM $K_3Fe(CN)_6$ içerisinde -200 ile +800 mV gerilim aralığında yapılan CV çalışması.....	42
Şekil 4.2. PtE ile pH 3 BRT’de 1 mM H_2O_2 ’ye ait anodik bölgedeki LSV’ler.....	43
Şekil 4.3. PtE ile pH 10 BRT’de 1 mM H_2O_2 ’ye ait anodik bölgedeki LSV’ler....	43
Şekil 4.4. PtE ile pH 4,5 FT’de 1 mM H_2O_2 ’ye ait anodik bölgedeki LSV’ler.....	44
Şekil 4.5. PtE ile pH 9,5 FT’de 1 mM H_2O_2 ’ye ait anodik bölgedeki LSV’ler.....	44

Şekil 4.6. 1 mM H ₂ O ₂ içeren pH 3 BRT içerisinde PtE ile çözünmüş oksijen gideriminin LSV pikleri üzerine etkisi.....	44
Şekil 4.7. PtE ile BRT içerisinde 1 mM H ₂ O ₂ 'ye ait katodik bölgedeki LSV'ler...	45
Şekil 4.8. PtE ile FT içerisinde 1 mM H ₂ O ₂ 'ye ait katodik bölgedeki LSV'ler.....	45
Şekil 4.9. pH 3 BRT içerisinde 1, 2, 3, 5 mM H ₂ O ₂ için PtE ile elde edilen CV'ler	46
Şekil 4.10. GCE ile farklı pH'lerde H ₂ O ₂ için elde edilen CV'ler.....	47
Şekil 4.11. pH 3 BRT içerisinde HDME ile oksalik asit için katodik bölgede elde edilen LSV'ler.....	49
Şekil 4.12 pH 6 BRT içerisinde HDME ile oksalik asit için katodik bölgede elde edilen LSV'ler.....	49
Şekil 4.13. pH 9 BRT içerisinde HDME ile oksalik asit için katodik bölgede elde edilen LSV'ler.....	49
Şekil 4.14. 0,2 M KNO ₃ içerisinde HDME ile oksalik asit için katodik bölgede elde edilen LSV'ler.....	50
Şekil 4.15. 0,2 M KNO ₃ içerisinde HDME ile oksalik asit için katodik bölgede elde edilen DPV'ler.....	51
Şekil 4.16. PtE ile pH 3 BRT içerisinde µM derişim düzeyindeki oksalik asite ait CV'ler.....	52
Şekil 4.17. PtE ile 50 µM oksalik asit içeren pH 3 BRT içerisinde farklı derişimdeki H ₂ O ₂ 'ye ait CV'ler.....	53
Şekil 4.18. PtE ile µM derişim düzeyindeki oksalik asit ve mM derişim düzeyindeki H ₂ O ₂ 'ye ait Time–Base grafiği.....	54
Şekil 4.19. PtE ile pH 3 BRT içerisinde farklı derişimlerdeki oksalik asite ait CV'ler.....	55
Şekil 4.20. PtE ile pH 3 BRT içerisinde oksalik asit ve H ₂ O ₂ 'ye ait CV'ler.....	55
Şekil 4.21. PtE ile mM düzeydeki oksalik asit ve H ₂ O ₂ 'ye ait Time–Base grafiği.....	56
Şekil 4.22. PtE ile pH 6,5 BRT içerisinde farklı derişimlerdeki oksalik asite ait CV'ler.....	57

Şekil 4.23. PtE ile pH 7,6 BRT içerisinde farklı derişimlerdeki oksalik asite ait CV'ler.....	58
Şekil 4.24. PtE ile pH 8,2 BRT içerisinde farklı derişimlerdeki oksalik asite ait CV'ler.....	59
Şekil 4.25. PtE ile aynı derişime sahip farklı pH'lerdeki oksalik asit çözeltilerinden elde edilen CV'ler.....	59
Şekil 4.26. PtE ile pH 8,2 BRT + 10 mM oksalik asit içerisinde farklı derişimlerdeki H ₂ O ₂ 'ye ait CV'ler.....	60
Şekil 4.27. PtE ile pH 8,2 BRT içerisinde farklı derişimde oksalik asit ve H ₂ O ₂ 'ye ait CV'ler.....	61
Şekil 4.28. PtE ile pH 6 BRT'de farklı derişimlerdeki oksalik asite ait CV'ler.....	63
Şekil 4.29. PtE ile pH 6 BRT'de farklı derişimlerdeki oksalik asit ve H ₂ O ₂ 'ye ait CV'ler.....	63
Şekil 4.30. PtE ile pH 6,5 BRT'de farklı derişimlerdeki oksalik asite ait CV'ler.....	64
Şekil 4.31. PtE ile pH 6,5 BRT'de farklı derişimlerdeki oksalik asit ve H ₂ O ₂ 'ye ait CV'ler.....	65
Şekil 4.32. PtE ile pH 6,5 BRT + 50 mM oksalik asit çözeltisi içerisinde H ₂ O ₂ ve oksalik asite ait akım basamaklarını gösteren Time–Base grafiği.....	66
Şekil 4.33. PtE ile pH 6,5 BRT + 50 mM oksalik asit çözeltisi içerisinde µM derişim düzeylerindeki H ₂ O ₂ için elde edilen akım basamaklarını gösteren Time–Base grafiği.....	67
Şekil 4.34. PtE ile yapılan amplitude seçimini gösteren DPV eğrisi.....	68
Şekil 4.35. PtE ile yapılan step seçimini gösteren DPV eğrisi.....	68
Şekil 4.36. PtE ile pH 6,5 BRT'de H ₂ O ₂ için küçük derişim bölgesi kalibrasyon grafiği hazırlama çalışması.....	69
Şekil 4.37. PtE ile pH 6,5 BRT'de H ₂ O ₂ için büyük derişim bölgesi kalibrasyon grafiği hazırlama çalışması.....	69
Şekil 4.38. PtE ile pH 6,5 BRT'de H ₂ O ₂ 'ye ait 0,1–10,0 mM derişim aralığındaki kalibrasyon grafiği.....	70

Şekil 4.39. Farklı pH'lerdeki BRT içerisinde 0,1 mM oksalik asit çözeltilerine ait soğurum pikleri.....	71
Şekil 4.40. pH 4 BRT ve 196 nm'de oksalik asit için yapılan kalibrasyon grafiği hazırlama çalışması.....	72
Şekil 4.41. Oksalik asit için pH 4 BRT'de ve 196 nm'de 5–100 µM derişim aralığında hazırlanmış kalibrasyon grafiği.....	73
Şekil 4.42. PtE yüzeyinde 1 µm kalınlıktaki polipirol kaplaması, büyütme oranı x100.....	74
Şekil 4.43. PtE yüzeyinde 1 µm kalınlıktaki polipirol kaplaması, büyütme oranı x200.....	74
Şekil 4.44. PtE yüzeyinde 1 µm kalınlıktaki polipirol kaplaması, büyütme oranı x500.....	74
Şekil 4.45. pH 6,5 BRT'de polipirol kaplı PtE yüzeyinde H ₂ O ₂ eklemelerine ait Time–Base grafiği.....	75
Şekil 4.46. pH 6,5 BRT + 50 mM oksalik asit içerisinde polipirol kaplı PtE yüzeyinde H ₂ O ₂ ve oksalik asit eklemelerine ait Time–Base grafiği.....	76
Şekil 4.47. Elektrokimyasal polimerleşme ile hazırlanan sensörün oksalik asit ve H ₂ O ₂ 'ye olan duyarlılığını gösteren Time–Base grafiği.....	77
Şekil 4.48. Glutaraldehit ile çapraz bağlanarak hazırlanmış enzim sensörünün 25 µM, 50 µM ve 100 µM'lık oksalik aside karşı duyarlılığı.....	78
Şekil 4.49. Kütlece % 2,5'lik glutaraldehit ile hazırlanmış enzimatik sensörün 50 µM'lık oksalik aside karşı duyarlılığının günden güne değişimi...	79
Şekil 4.50. Glutaraldehit ile hazırlanmış sensörle kalibrasyon grafiği hazırlama çalışmasında 0,025 mM, 0,050 mM, 0,100 mM oksalik asit eklemelerine karşı elde edilen akım basamak büyüklükleri.....	80
Şekil 4.51. Glutaraldehit ile hazırlanmış sensörle kalibrasyon grafiği hazırlama çalışmasında 0,250 mM, 0,500 mM ve 1,000 mM oksalik asit eklemelerine karşı elde edilen akım basamak büyüklükleri.....	80
Şekil 4.52. Kütlece % 2,5'lik glutaraldehit ile hazırlanmış sensöre ait 0,025–1,000 derişim bölgesindeki kalibrasyon grafiği.....	81
Şekil 4.53. Tamponlu ve tamponsuz çözeltiler kullanılarak 1 mM oksalik asite karşı elde edilen akım basamağı büyüklükleri.....	82

Şekil 4.54. Kütlece % 0,5'lik nafyon ile hazırlanmış enzimatik sensörün 0,025 mM, 0,050 mM ve 0,100 mM oksalik asite karşı gösterdiği duyarlılık.....	84
Şekil 4.55. Kütlece % 1'lik nafyon ile hazırlanmış enzimatik sensörün 0,025 mM, 0,050 mM ve 0,100 mM oksalik asite karşı gösterdiği duyarlılık.....	84
Şekil 4.56. Kütlece % 3'lük nafyon ile hazırlanmış enzimatik sensörün 0,025 mM, 0,050 mM ve 0,100 mM oksalik aside karşı gösterdiği duyarlılık.....	85
Şekil 4.57. Kütlece % 5'lik nafyon ile hazırlanmış enzimatik sensörün 0,025 mM, 0,050 mM ve 0,100 mM oksalik asite karşı gösterdiği duyarlılık.....	85
Şekil 4.58. Nafyon film hazırlanmasında kullanılan nafyon çözeltisi derişiminin sensör duyarlılığına etkisi.....	86
Şekil 4.59. Kütlece % 0,5'lik nafyon ile hazırlanmış enzimatik sensörün 50 µM'lık oksalik asite karşı duyarlılığının günden güne değişimi.....	87
Şekil 4.60. Kütlece % 1'lik nafyon ile hazırlanmış enzimatik sensörün 50 µM'lık oksalik asite karşı duyarlılığının günden güne değişimi.....	87
Şekil 4.61. Kütlece % 0,5'lik nafyonlu sensör ile kalibrasyon grafiği hazırlama çalışmasında 0,025 mM, 0,050 mM, 0,100 mM oksalik asit eklemelerine karşı elde edilen akım basamak büyüklükleri.....	88
Şekil 4.62. Kütlece % 0,5'lik nafyonlu sensör ile kalibrasyon grafiği hazırlama çalışmasında 0,250 mM, 0,500 mM, 1,000 mM oksalik eklemelerine karşı elde edilen akım basamak büyüklükleri.....	89
Şekil 4.63. Kütlece % 0,5'lik nafyon ile hazırlanmış sensöre ait 0,025–1,000 derişim bölgesindeki kalibrasyon grafiği.....	90
Şekil 4.64. Standart ekleme metodu kullanılarak yapılan gerçek örnek çalışmasına ait Time–Base grafiği.....	91
Şekil 4.65. pH 6,5 BRT'de 207 nm dalga boyunda farklı derişimlerdeki oksalik asite ait soğurum eğrileri.....	93
Şekil 4.66. pH 6,5 BRT ve 207 nm'de oksalik asite ait kalibrasyon grafiği.....	94
Şekil 4.67. 207 nm'de örnek ve derişimi bilinen oksalik asite ait soğurum pikleri.....	94

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Biyosensörlerle tayin edilebilen maddeler.....	4
Çizelge 4.1. Tampon çözelti derişiminin pH değişimi üzerine etkisi.....	61
Çizelge 4.2. pH 6,5 BRT’de yapılan kalibrasyon grafiği çalışmasında derişimlere karşı elde edilen akım değerleri.....	70
Çizelge 4.3. pH 4 BRT’de ve 196 nm’de farklı derişimlerdeki oksalik asite ait soğurum değerleri.....	72
Çizelge 4.4. 0,025–1,000 mM derişim aralığında glutaraldehit ile hazırlanmış sensörün oksalik asit eklemelerine karşı oluşturduğu akım basamağı büyüklükleri.....	81
Çizelge 4.5. 0,025–1,000 mM derişim aralığında % 0,5’lik nafyon ile hazırlanmış sensörün oksalik asit eklemelerine karşı oluşturduğu akım basamağı büyüklükleri.....	89
Çizelge 4.6. Örnek ve derişimi belinen oksalik asit eklemelerine karşı elde edilen akım basamağı büyüklükleri.....	92
Çizelge 4.7. 100 mL’lik örneğe ait hesaplanan derişim ve miktar değerleri.....	92
Çizelge 4.8. 0,1–0,75 mM derişim aralığında oksalik asite karşı elde edilen soğurum değerleri.....	93
Çizelge 4.9. Örnek ve derişimi bilinen oksalik asite ait soğurum değerleri.....	95
Çizelge 4.10. 100 mL’lik örneğe ait hesaplanan derişim ve miktar değerleri.....	95

1. GİRİŞ

Sanayileşmenin gün geçtikçe arttığı dünyamızda çevre kirliliği, tarımsal kirlilik, temiz ve güvenilir su ve yiyecek bulabilme sorunları gittikçe artmaktadır. Bundan dolayı bu analizlerin de sürekli arttığı ve önem kazandığı görülmektedir. Ayrıca artan hastalıklar klinik analizlerin artışına neden olmaktadır. Bu sebeplerden dolayı bu sektörlerde yapılan analizlerin güvenilir, fazla zaman tüketmeyen ve ucuz teknikler olmaları gerekmektedir. Günümüzde bu işlemler için yaygın olarak kullanılan analiz teknikleri güvenilir fakat fazla zaman harcayan ve genelde ucuz olmayan tekniklerdir. Bu yüzden hala gelişmekte olan biyosensörler bu analizlerin yapılmasında önem teşkil etmektedir. Bu biyosensörler birçok alanda başarılı şekilde uygulama alanı bulmuştur. Fazla zaman tüketmeyen ve ucuz bir teknik oluşunun yanı sıra analitik düzeydeki güvenilirliği ile kolaylıkla uygulanabilir bir teknik oluşu biyosensörlerin önemini daha da arttırmaktadır.

Oksalat, klinik ve gıda analizlerinde önem teşkil etmektedir. Ispanak, mantar, pancar yaprağı, zencefil, horozibiği çiçeği, pazı otu gibi sebzelerde, çikolata gibi gıda maddelerinde ve bira gibi içeceklerde bulunan oksalat, fizyolojik öneme sahip bir maddedir. Ayrıca içme suyunun ozonlama ile dezenfeksiyonu sırasında ve vücuttaki protein yıkımı sonucu oluştuğu bildirilmektedir. Vücuda alınan fazla oksalat böbrek taşı oluşumu, Ca^{2+} ve Mg^{2+} emiliminde azalma gibi sorunlara yol açabilmektedir. Vücut sıvılarındaki oksalat miktarı ise böbrek ve karaciğer rahatsızlıklarının bir belirtisi olduğu için çabuk, etkili, düşük maliyetli ve yüksek analitik duyarlılığa sahip bir yöntem ile analizlenmesi önem taşımaktadır. Oksalat tayini için günümüzde; spektroskopik ve kromatografik tekniklerin yanı sıra, nispeten daha ucuz donanım ve analiz maliyeti ile yeterince duyarlı ve hızlı bir analiz tekniği olarak enzimatik biyosensörler de giderek daha çok kullanılmaktadır.

Biyolojik sıvılarda ve gıda örneklerinde oksalat ve oksalik asit ölçümü için pek çok biyosensör hazırlama çalışması yapıldığı bilinmektedir. Oksalat oksidaz enzimi aracılığıyla parçalanmış oksalik asidin oluşturacağı hidrojen peroksit (H_2O_2) ölçümüne dayalı bu biyosensörlerde, oksalik asidin girişim etkisi göz ardı edilmekte veya elektrot üzerinde bu girişimi engelleyici modifikasyonlar öngörülmektedir. Oksalik asitin

voltametik davranışının ortam ve ölçüm koşullarına bağlılığının çok iyi bilinmiyor olması bu konudaki çalışmaları zorlaştırmakta ve belirsizleştirmektedir. Bu sebeple oksalat biyosensörü hazırlama çalışmalarında öncelikle oksalik asidin elektro aktif olduğu koşulların belirlenmesi ve bu sonuca göre enzim aktivitesini de göz önünde bulundurarak biyosensörün çalışma pH ve potansiyelinin seçilmesi en önemli basamağı oluşturmaktadır. Daha sonrasında ise çeşitli parametreler için optimizasyonlar yapılarak biyosensör için optimal koşullar belirlenmelidir.

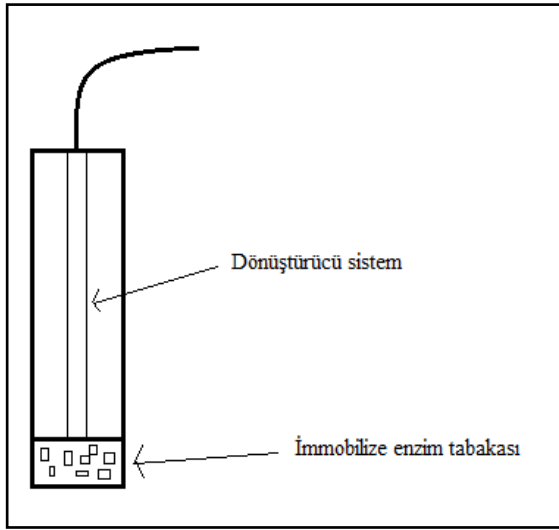
Bu tez çalışmasında; literatürde var olan çeşitli oksalat sensörleri hazırlama çalışmalarının eksik olduğu düşünülen kısımları göz önünde bulundurularak, bu eksik noktaları aydınlatmaya yönelik çalışmalar gerçekleştirildi ve literatürdeki çalışmalara farklı ölçüm ilkesine sahip bir enzimatik sensör kazandırılması amaçlandı. Bu sebeple, oksalik asit ve H₂O₂ için pH optimizasyon çalışmaları yapıp enzimatik sensörler hazırlandı. Bu iki maddenin voltametik olarak analizlenebilirliğini ve oksalik asitin spektrofotometrik analizinin de yapılabileceği hazırlanan kalibrasyon grafikleri ile gösterildi. Hazırlanan enzimatik oksalat sensörü ile gerçek örneklerde de oksalat tayini yapıldı ve elde edilen sonuç spektrofotometrik yöntemle kıyaslandı.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Biyosensörler

Biyosensörler, bir dönüştürücü sistem ve bu sisteme eşlik eden biyolojik algılama ajanından oluşan cihazlar olarak veya başka bir deyişle, üzerlerinde immobilize halde bulunan bir veya birkaç biyolojik ajan vasıtasıyla analit maddenin ortamdaki miktarı ile orantılı olarak sinyal üreten, analitin kantitatif olarak analizlenebilmesini ve sürekli olarak izlenmesini sağlayabilen cihazlardır (Gerard 2002).

Biyosensörleri sadece analiz yapan cihazlar olarak tanımlamak biyosensör tanımının kısıtlanmasına neden olmaktadır. İnsan ve diğer canlı vücutlarında bulunan işitme, görme, koku alma, dokunma, tat alma gibi sistemlerde biyosensör olarak ele alınmalıdır.



Bir biyosensör, istenilen analiti kataliz eden veya istenilen analite afinite gösteren bir biyolojik ajanın bulunduğu biyo-algılayıcı tabaka, kataliz işleminden sonra oluşan yeni ürünleri ölçülebilir büyüklüklere dönüştürüp ölçümün yapılmasını sağlayan dönüştürücü (transduser) sistemlerden oluşmaktadır (Telefoncu 1999).

Şekil 2.1. Biyosensörün şematik görünümü

Biyosensör teknolojisi özellikle son on yıl içerisinde oldukça hız kazanmış, çok geniş uygulama alanı bulmuştur. Bu durum gerçekleşmesinde, biyosensörlerin analitik duyarlılığının en az diğer analiz teknikleri kadar iyi, zaman tüketmeyen ve düşük maliyetli bir teknik oluşu başı çekmektedir. Diğer avantajları ise aşağıdaki şekilde sıralanabilir.

- İn-vivo çalışmalarına olanak sağlamaktadır (potansiyometrik olanlar).
- Örnekler herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan analizlenebilir.
- Diğer analiz tekniklerine göre analiz süresi çok kısadır.
- Potansiyometrik olan sensörler analitin yapısına zarar vermediğinden, örnekler analizden sonra tekrar kullanılabilir.
- Çok küçük cihazlar olduklarından dolayı portatif olarak taşınabilirler, böylece örnekleri kendi doğal ortamlarında analizleme olanağı doğar.
- Türlendirme çalışmalarına olanak sağlamaktadırlar.

Biyosensörler ile birçok madde analiz edilebileceği gibi başlıca analiz edilebilenler Çizelge 2.1’de verilmiştir (Çınar 2006).

Çizelge 2.1. Biyosensörlerle tayin edilebilen maddeler

Aminoasitler	Alanin, arginin, asparagin, aspartik asit, sistin, glutamin, glutamik asit, histidin, leusin, fenil alenin, sarkosin, v.b.
Gazlar	NH ₃ , H ₂ , CH ₄ , SO ₂ , NO
Kofaktörler	AMP, ATP, NAD (P) H, H ₂ O ₂
Amitler ve Aminler	Aminopirin, alinin, aromatik aminler, asetilkolin, kreatinin, kreatin, guanosin, penisilin, spermin, ürik asit, üre, zantin
Karboksilik Asitler	Asetik asit, formik asit, glukonik asit, izositrik asit, askorbik asit, laktik asit, malik asit, oksalik asit, purivik asit
Kompleks Maddeler	Antibiyotikler, kullanılır karbonhidratlar, vitaminler, mutajenler
Karbonhidratlar	Asetaldehit, bilirubin, kolesterol ve esteri, etanol, gliserol ve esterleri, metanol ve fenol
Anorganik İyonlar	F ⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₃ ⁻² , SO ₃ ⁻ , SO ₄ ⁻² , Hg ⁺² , Zn ⁺²

2.2. Biyosensörlerin Kullanım Alanları

Biyosensörler birçok alanda kullanılmakla birlikte en yaygın olarak kullanıldığı alanlar şunlardır;

2.2.1. Endüstriyel İşlem Kontrolü

Biyosensörler endüstri işlemlerinde, çeşitli maddeleri analizlemek için kullanılırlar. Genellikle şekerler, oksijen, karbondioksit, maltlar, alkoller, fenolik bileşiklerin analizinde kullanılmaktadır. Ayrıca kimyasal reaksiyonlar sonucu istenmeyen yan ürünlerin oluşup oluşmadığını takip etmek için de kullanılmaktadırlar. Böylece oluşturulan ürünlerin kalitesini ve verimini artırmakta, dolayısıyla hem ham maddeden hem de enerjiden tasarruf edilmesini sağlamaktadırlar (Eggins 2002).

Santos ve ark. (2007) fenolik bileşiklerin analizi için, Jiang ve ark. (2009) etanol analizi için sensörler geliştirmişlerdir.

2.2.2. Klinik Analizler

Klinik analizler biyosensörlerin temel uygulama alanını oluşturmaktadır. Biyosensörler klinik analizlerde genellikle monitoring işlemlerinde uygulama alanı bulmuştur. Kandaki glukoz ve idrardaki üre tayini, kandaki gazlar, iyonlar ve metabolitler için biyosensörler sıkça kullanılmaktadır (Eggins 2002).

Salimi ve ark. (2009) kolesterol tayini için, Yang ve ark. (2005) asetilkolin ve kolin tayini için, Romero ve ark. (2010) kanda laktat tayini için, Pizzariello ve ark. (2000) penisilin ve üre tayini için, Kim ve ark. (2006) glikoz tayini için biyosensörler geliştirmişlerdir.

2.2.3. Yiyecek örnekleri analizleri

Biyosensörler yiyecek ürünlerinin genellikle kalite ve güvenlik açısından analizlerini yapmak üzere kullanılmaktadır. Süt örneklerinde; laktoz, glukoz, bira ve şarap örneklerinde; alkol, fermentasyon işlemi sırasında ise; etanol, glukoz, sukroz, galaktoz, laktoz, laktat tayini için kullanılır. Sarkar ve ark. (1999) peynir, bira, yoğurt gibi fermente olmuş yiyeceklerde yiyeceklerin bakteriyel kirliliğinin bir ölçütü olan L ve D-amino asitlerin tayini için biyosensör geliştirmişlerdir.

Günümüzde birkaç ticari biyosensör çeşidi bulunmaktadır. Tek tek örneklerin analizlendiği laboratuvar cihazları veya taşınabilir tipte olanların yanı sıra otoanalizörlerde de kullanılabilir. Bunlar, Apec Glikoz Analiz Sistemi, ESAT Glikoz Analiz Sistemi, Glucoprocasseur, Amperometrik Biyosensör Detektör, ISI Analiz Sistemi ve Oriental Tazelik Ölçer gibi ya oksijen elektrotu ya da hidrojenperoksit elektrotuna bağlanmış oksidaz sistemleri içeren benzer teknolojilere sahiptirler (Aykut ve Temiz 2006).

2.2.4. Çevresel örnek analizleri

Biyosensörler çevresel ve tarımsal örnekler içindeki kirletici maddelerin monitoring uygulamalarında ve örneklerdeki kirletici maddelerin konsantrasyon tayininde kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılmak üzere geliştirilmiş fenol ve türevleri, ağır metalleri ve fosforlu pestisitleri analizlemek üzere geliştirilmiş biyosensörler bulunmaktadır. Rodriguez ve ark. (2004) su ve katı örneklerde ağır metallerin takibi için, Arvinte ve ark. (2006) pestisit analizi için biyosensörler geliştirmişlerdir.

2.2.5. Savunma-güvenlik alanı

Biyolojik saldırı amacıyla kullanılan maddeler biyolojik yapıdaki toksin, hasta yapıcı veya vücut dengesini bozucu maddeler olup son yılların savaş ve terörist saldırılarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu biyolojik maddelerin tanı ve teşhisinde biyosensörlerden yararlanılmaktadır. Bu amaçla özellikle organofosfor ve siyanür türevleri için

biyosensörler geliştirilmiştir. Keusgen ve ark. (2004) siyanür bileşiklerini analizlemek için, Mulchandani ve ark. (1999) organofosfor türevlerini analizlemek için biyosensörler geliştirmişlerdir.

2.3. Biyosensör Çeşitleri

Biyosensörleri içerdikleri biyolojik ajanın etki mekanizmasına göre iki, dönüştürücü sistemine göre (transduser çeşidine göre) dört farklı grupta incelemek mümkündür (Thevenot ve ark. 2001)

2.3.1. Biyolojik ajanın etki mekanizmasına göre biyosensörler

2.3.1.1. Biyo–katalitik tanımlama ajanları ile biyosensörler

Hazırlanacak biyosensörde kullanılacak biyolojik ajan eğer istenilen analite karşı katalitik etki gösteriyor ise biyosensör bu sınıf içerisinde yer almaktadır. Bu amaçla kullanılan biyolojik ajanlar; enzimler, mikroorganizmalar, hücre organelleri ve hayvan veya bitki dokularıdır (Thevenot ve ark. 2001).

2.3.1.2. Biyo–afinite tanımlama ajanları ile biyosensörler

Bu biyosensörlerdeki ajanlar biyo–katalitik tanımlama ajanlarından farklı olarak istenilen analite karşı afinite özelliği gösteren ajanlardır. Antijen–antikor, reseptör ve DNA biyosensörleri bu sınıf içerisinde yer almaktadır (Thevenot ve ark. 2001).

2.3.2. Dönüştürücü sistemin çeşidine göre biyosensörler

2.3.2.1. Optik biyosensörler

Optik biyosensörler dönüştürücü sistem olarak ışınım ölçümüne dayalı yapısında immobilize biyolojik ajan bulduran aygıttır. Ölçümü yapılan ışık sinyali ışık yansımaları, saçılımı ya da yayımı sonucu oluşmakta, yani bu tip biyosensörler

absorbsiyon, fluoresans, bioluminesans ölçümü yaparak istenilen analitin analizini yapmaktadır. Bu biyosensörlerde ışık yansıması, yayılımı ya da saçılımı sonucu oluşan sinyaller fiber optik kablolarla uygun dedektörlere iletilerek ölçülür. Bu biyosensörler ile üre, penisilin, etanol, kreatin, laktat vb. tayinler yapılabilmektedir (Telefoncu 1999).

2.3.2.2. Kalorimetrik biyosensörler

Kalorimetrik biyosensörler bir biyolojik ajanın reaksiyonunda entalpi ölçümüne dayalı olarak istenilen analitin analizini yapan cihazlardır. Bu biyosensörlerin yapımında en çok kullanılan biyolojik ajan enzimlerdir. Enzimlerin katalitik reaksiyonu sonucu oluşan ısı değişiminden reaksiyona ait entalpi değeri ve analit miktarı belirlenir (Telefoncu 1999). Bu tip biyosensörler portatif olarak bulunabilmektedir. Uygulanması gayet kolay bir tekniktir ve eğer reaksiyonun bittiğini gösteren bir renk değiştiricisi kullanıldıysa tayin çıplak gözle bile yapılabilmektedir (Lee ve ark. 2006).

2.3.2.3. Piezoelektrik biyosensörler

Piezoelektrik etki, bir dielektrik özellikteki kristal üzerine etki uygulandığında moleküldeki karşıt yük merkezlerinin birbirinden ayrılması, moleküle dipol özellik kazandırması ile ortaya çıkan etkidir. Piezoelektrik özellikler molekülün kristal yapısına bakarak öngörülebilir (Bunde ve ark. 1998).

Piezoelektrik özellikteki bir kristal üzerine immobilize edilen biyomolekül ile analitin reaksiyonu sonucu piezoelektrik kristalin rezonans frekansındaki değişiklikten analit miktarı tayin edilmektedir (Telefoncu 1999).

İnsan vücudundaki alyuvar, herpes virüsü, ürede protein analizleri için piezoelektrik immunosensörler mevcuttur (Wang 1995).

Ayrıca çevre örneklerinde bakteriyel kirliliği tayin etmek amacıyla da piezoelektrik sensörler geliştirilmiştir (Tombelli ve ark. 2000).

2.3.2.4. Elektrokimyasal biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler adında anlaşılacağı gibi biyosensörün analit derişimine bağlı olarak oluşturduğu sinyallerin elektrik sinyalleri olarak okunduğu biyosensörlerdir. Elektrokimyasal biyosensörler de kendi aralarında; amperometrik biyosensörler, potansiyometrik biyosensörler ve yarı iletken alan etki biyosensörleri olmak üzere üç grupta incelenmektedir.

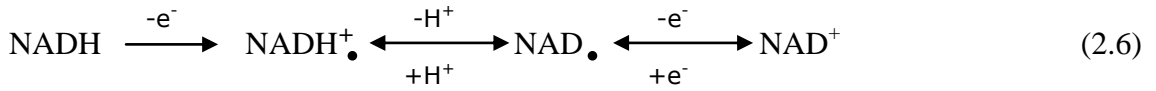
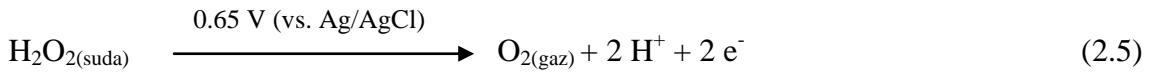
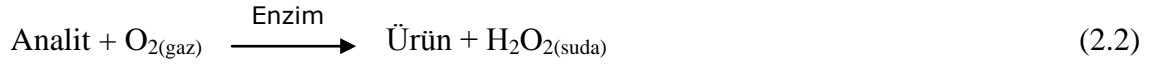
Elektrokimyasal biyosensörler, biyosensör sınıfı içerisinde, elektrokimyasal enzimatik biyosensörler de elektrokimyasal biyosensörler sınıfı içerisinde en büyük bölümü oluşturmakta ve genellikle bu tip biyosensörlerden elektrokimyasal enzimatik biyosensörler olarak bahsedilmektedir. Elektrokimyasal biyosensörleri üç alt başlıkta incelemek mümkündür.

a-) Amperometrik biyosensörler

Amperometrik sistemler, sıvı veya gaz formundaki elektro aktif maddelerin sabit potansiyel altında geçirdikleri akımı ölçmeye dayalı üç elektrotlu sistemlerdir. Uygulanan gerilim, çözeltideki elektrokimyasal dengenin indirgenmeden yükseltgenmeye veya yükseltgenmeden indirgenmeye doğru bozulmasına neden olur. Bu durumda elektrot çözelti ara yüzeyindeki yük transferi elektriksel akım olarak gözlenir. Bu akım piklerinden yararlanılarak elektro aktif maddeye ait indirgenme ve yükseltgenme potansiyelleri ve elektro aktif maddenin derişimi belirlenebilmektedir (Wang ve ark. 2008).

Amperometrik biyosensörler bir immobilize tabaka, dönüştürücü sistem (çalışma elektrodu) ve ölçüm sistemi olmak üzere üç parçadan oluşmaktadır. Bu sensörlerin çalışma prensibi şu şekildedir; çözelti ortamında öncelikle analit ile immobilize biyomolekül arasındaki reaksiyon sonucu indirgenebilen veya yükseltgenebilen (redoks) bir ürün oluşur. Oluşan ürün elektrot yüzeyi üzerinde indirgenip yükseltgenerek elektrik sinyalleri oluşturur. Sinyaller ölçüm sistemi tarafından ölçülür.

Prodromidis ve Karayannis'e (2002) göre amperometrik biyosensörlerin immobilize enzim tabakasında ve dönüştürücü sisteminde şu reaksiyonlar gerçekleşmektedir;



Amperometrik biyosensörlerde en yaygın olarak platin, altın, gümüş, bakır, camsı karbon elektrotları dönüştürücü sistem olarak kullanılırlar (Zhang ve ark. 2000).

Amperometrik biyosensörler yüksek duyarlılık ve seçiciliği, düşük maliyeti, güvenilirliği ve kolay uygulanabilir oluşu ile klinik, çevre ve gıda analizlerinde oldukça sık kullanılmaktadır (Gülce 2002a).

Gülce ve ark. (2002b) alkol tayini için, Kafi ve Chen (2009) nitrofenol tayini için, Wang ve ark. (2000) H₂O₂ tayini için, Zhu ve ark. (2002) glikoz tayini için amperometrik biyosensörler geliştirmişlerdir.

b-) Potansiyometrik biyosensörler

Potansiyometri, akımsız koşullarda bir çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas alır. Elektrot potansiyelinin belirlenmesi doğrudan analit derişimini tanımlar. Potansiyometrik biyosensörlerde kullanılan temel sensörler, pH ya da tek değerlikli iyonlara duyarlı olan cam elektrotlar, anyon ya da katyonlara

duyarlı olan iyon seçimli elektrotlar (ISE) ve karbondioksit ya da amonyağa yönelik gaz duyarlı elektrotlardır (Türkdemir 2008).

Potansiyometrik bir biyosensörün çalışma mekanizması şu şekildedir; analizlenecek analit öncelikle seçici geçirgen membrandan geçerek enzim immobilize tabakaya gelir ve burada ölçülebilen bir türe dönüşür, ölçülebilen tür diğer bir seçici geçirgen membrandan geçerek iç çözeltiliye ulaşır, iç çözeltide bulunan iki elektrotlu ölçüm sistemi; bir referans elektrot bir tane de çalışma elektrotundan oluşmaktadır. Referans elektrot çok bilinen Ag/AgCl, kalomel elektrot veya iç çözeltisi jel olan Ag/AgCl referans elektrotlardan olabilmektedir.

Çalışma elektrotu ise ölçülecek maddeye göre pH duyarlı, iyon duyarlı (ISE; F⁻, I⁻, CN⁻, Na⁺, K⁺, Ca⁺², NH₄⁺ gibi iyonlara duyarlı) veya CO₂, NH₃ gibi gaz moleküllerine duyarlı olabilmekte ve bu elektrotlar ticari olarak bulunabilmektedirler (Koncki 2007). İç çözeltiliye geçen ölçülebilen tür uygun çalışma elektrotu kullanıldığında iki elektrotlu hücre içinde bir potansiyel fark oluşturur.

En yaygın olarak kullanılan potansiyometrik biyosensörler; üre sensörü, laktat sensörü, kreatinin sensörü ve glukoz sensörüdür (Shin ve ark. 1998).

Ercole ve ark. (2003) yiyeceklerde E.coli tayini için, Reddy ve ark. (2001) trigliserit tayini için, Santini ve ark. (2008) çeşitli yiyecek örneklerindeki sakarin miktarını tayin etmek için potansiyometrik sensörler geliştirmişlerdir.

c-) Yarı iletken alan etki biyosensörleri

Alan etki transistörler (FET; field effect transistor) birçok elektronik devrede kullanılan devredeki akım akışını kontrol eden bir katı-hal yarı iletken devre elemanıdır. Elektrot malzemesi olarak kullanılmaya başlandıktan sonra metal oksit alan etki transistörler (MOSFET) ve iyon seçici alan etki transistörler (ISFET) geliştirilmiştir. MOSFET bir FET tabanlı üzeri birbirine çok yakın metal oksit tabakaları ile kaplı elektrottur. ISFET

de yine FET tabanlı üzeri yarı iletken tabaka ile kaplı iyon seçici bir elektrottur (Skoog ve ark 1996).

Bu elektrotların yüzeyleri üzerine enzim immobilize edilmesiyle ENFET'ler geliştirilmiştir (Wan ve ark. 2000). Benzer şekilde bu elektrotların yüzeylerine istenilen analite duyarlı bir biyomolekül immobilize edilerek yarı iletken alan etki biyosensörleri hazırlanmıştır.

Kharitonov ve ark. (2001) laktat tayini için ENFET, Gonçalves ve ark. (2008) DNA ve protein analizleri için ISFET sensörleri geliştirmişlerdir.

2.4. Enzimler

Enzimler biyolojik sistemlerdeki canlı organizmalar tarafından sentezlenen ve yine organizmalardaki canlı hücrelerde gerçekleşen kimyasal reaksiyonları katalizleyen (hızını arttıran) biyolojik aktiviteye sahip moleküllerdir. İnsanlar farkında olmadan binlerce yıldır enzimlerden faydalanmışlardır. Örnek vermek gerekirse; bira yapımı, şarap yapımı, sirke oluşumu, ekmek yapımı, peynir yapımı gibi işlemler hep enzimler vasıtasıyla oluşan ürünlerdir. Fakat enzimlerle ilgili yapılan ilk bilimsel çalışmalar sadece geçtiğimiz birkaç yüzyıl önce yapılmıştır.

“1783 yılında; Spallanzani'nin atmaca mide suyunun eti eritebildiğini bulması, 1811 yılında; Kirchoff'un buğday nişastasını zamanla dekstrin ve şekere dönüştüğünü belirlemesi, 1830 yılında; Robiquet, Boutron ve Chalan' nın amigdalinin acı badem tarafından hidrolizlenebildiğini keşfetmesi enzimoloji konusundaki ilk çalışmalar olarak gösterilebilir” (Telefoncu 1997).

Enzim terimi ilk defa 1878 yılında W. Kühne tarafından kullanılmış olup maya anlamına gelmektedir.

Enzimler ile ilgili çalışmalar 1900'lü yıllardan sonra hız kazanmıştır. İlk enzim izole edilmesi çalışması 1920'li yıllarda yapılmış ve üreaz izole edilmiştir. İlk enzim yapısı

aydınlatma çalışmaları ise 1963 yılında yapılmıştır. Günümüzde, hala enzimler ile ilgili tüm ayrıntılar bilinmemektedir. Ancak bu kapsamda yapılan çalışmalar tüm hızı ile devam etmektedir (Telefoncu 1997).

2.4.1. Enzimlerin yapısı

Enzimler genel olarak protein yapısında biyolojik aktiviteye sahip moleküllerdir. Enzim proteinleri çok özgül (spesifik) proteinlerdir. Enzim proteinlerinin özgül oluşundan dolayı, enzimler sadece belirli maddeler (substratlar) arasındaki kimyasal reaksiyonları kataliz ederler.

Enzimlerin bir kısmı basit protein yapısındadır. Bazı enzimler ise enzimin protein kısmına protein olmayan daha küçük molekül büyüklüğüne sahip organik veya anorganik moleküller bağlanarak proteid yapısında bulunurlar. Bu durumda, enzimin protein olan kısmına apoenzim protein olmayan organik veya anorganik bir molekül olan diğer kısmına ise kofaktör adı verilir. Eğer organik molekül enzim kısmı ile iyi birleşmişse ve kolay kolay protein kısmından ayrılmıyorsa prostetik grup, çok iyi birleşmemiş ve kolay ayrılabiliriyorsa koenzim adını alır.

Sağlığımız için düzenli olarak vücudumuza almamız gerek vitaminlerde koenzim olarak görev alan bileşiklerdir (İnal 1996). Koenzimi ile birlikte bulunan apoenzim–koenzim çiftine haloenzim denir. Haloenzimin sadece protein kısmı değil kofaktörü ile birlikte katalitik etki gösterir. Protein yapıları farklı olup da aynı kimyasal reaksiyon üzerinde katalitik etki gösteren enzimlere ise izoenzim denmektedir.

2.4.2. Enzim reaksiyonlarının kinetik yönden incelenmesi

Enzimler de reaksiyon kinetiği bakımından kimyasal katalizatörlere benzemektedirler. Enzimler söz konusu kimyasal reaksiyona ait aktivasyon enerjisinin bir kısmını karşılayarak reaksiyon hızını arttıran moleküllerdir.

Örnek vermek gerekirse, H₂O₂ yavaş bir reaksiyon ile su ve oksijene parçalanmaktadır ve 1 mol H₂O₂'nin parçalanması için 18 kcal/mol enerjiye gereksinim vardır. Bu reaksiyonda katalizör olarak Fe⁺² kullanıldığında aynı reaksiyona 13 kcal/mol enerji gerekmektedir. Katalizör olarak platin kullanıldığında 11,7 kcal/mol enerji gerekirken, aynı reaksiyonda bir karaciğer enzimi olan katalaz kullanıldığında ise 2 kcal/mol enerji yeterli olmaktadır (Özata ve Kutlu 2000).

Enzim reaksiyonlarında öncelikle substrat ile enzim arasında bir ara bileşik (kompleks) oluşmaktadır. Enzim ile substrat birleşmesinden sonra substrat molekülünde bazı kimyasal değişiklikler (bağ kopması gibi vs.) olur ve böylece substrat molekülü kimyasal reaksiyona hazır hale gelir. Ara bileşiğin oluşma hızı enzim ve substrat moleküllerinin derişimine bağlıdır. Daha sonra reaksiyon gerçekleşerek ürün oluşur (Atasağungil 1965).

Bu reaksiyona ait reaksiyon denklemleri şu şekildedir;



Burada *E*; enzimi, *S*; substratı, *ES*; enzim – substrat ara bileşimini, *P*; ürünü, *k*₁–*k*₂–*k*₃–*k*₄; ilgili reaksiyonlara ait hız sabitlerini ifade etmektedir. Enzim reaksiyonlarına ait hız ifadesi Michaelis–Menten eşitliği ile ifade edilir (Telefoncu 1997).

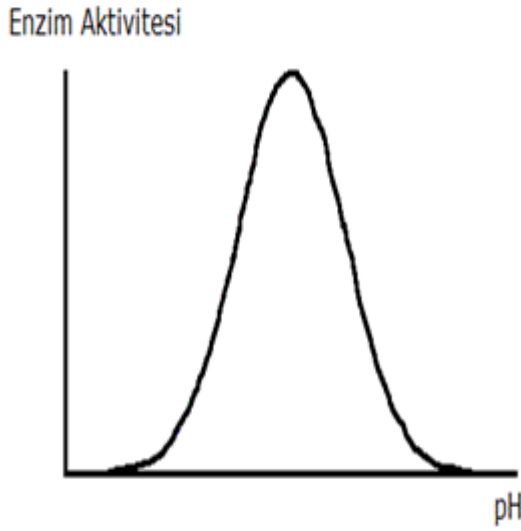
$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Michaelis–Menten eşitliği}) \quad (2.8)$$

Eşitlik 9.'daki *K*_m değeri Michaelis–Menten sabiti olarak bilinmektedir. *K*_m bir enzimin substratına olan ilgisini göstermektedir. Eğer enzimin substrata olan ilgisi fazla ise *K*_m değeri küçüktür, bunun anlamı; düşük substrat derişimlerinde bile enzim ile substrat [*ES*] ara kompleksini oluşturmasıdır. Enzimin substratına ilgisi zayıf ise *K*_m büyüktür. Michaelis–Menten eşitliğinden faydalanarak bir enzimatik reaksiyona ait hızı belirlemek için; Michaelis–Menten eşitliği ters çevrilir ve uygun biçimde düzenlenirse;

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.9)$$

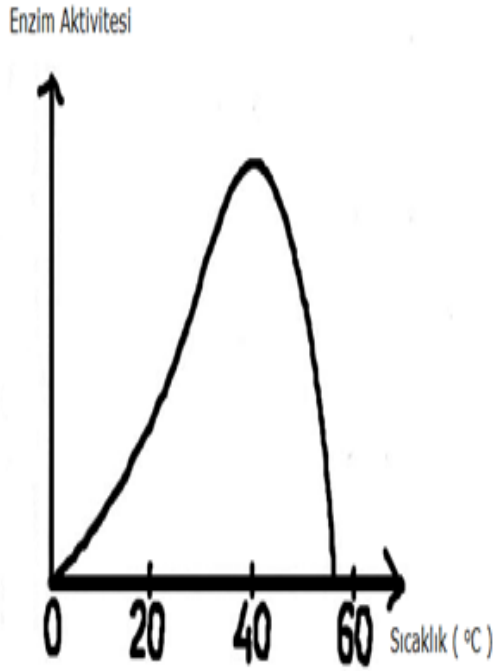
elde edilir. $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğrunun $y = mx + b$ şeklinde bir doğru denklemi oluşturduğu görülmektedir. Buradan hareketle, doğru denkleminde ait b değerinden V_{max} , doğrunun eğiminden yararlanarak ise K_m değerleri bulunabilir.

Gerçekleşen bu reaksiyonun hızına bağlı olarak enzim aktivitesi kavramı oluşmaktadır. Bu kavram enzim ünitesi ile tanımlanmaktadır. 1 ünite enzim; 25 °C'de, 1 µmol substratı, 1dk'da ürüne çeviren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Enzim aktivitesi değişen bazı ortam koşullarına göre değişmektedir. Enzim aktivitesini etkileyen en önemli etmenler ortam pH'si ve sıcaklığıdır.



Şekil 2.2. Enzim aktivitesine pH'nin etkisi

Enzim aktivitesi pH'ye duyarlı olarak değişmektedir. Enzimlerin aktiviteleri pH ile normal dağılım göstermektedir. Enzimler belli bir pH değerinde maksimum aktivite gösterirken bu pH değerinden uzaklaşılınca aktiviteleri kaybolmaktadır. Enzimlerle yapılan çalışmalarda, enzimin aktivitesinin yüksek olduğu pH çalışma bölgesinde çalışılmalı ve enzim aktivitesini sabit bir değerde tutabilmek için tampon sistemler kullanılarak pH değeri sürekli sabit tutulmalıdır.



Şekil 2.3. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Enzimatik reaksiyonların hızı sıcaklık ile belli bir sıcaklığa kadar artmaktadır. Ortamın sıcaklığı artınca ortamdaki moleküllerin kinetik enerjileri artmakta, böylece reaksiyona giren moleküllerin arasındaki çarpışma hızı ve buna bağlı olarak da aktivasyon enerjisini aşabilecek çarpışmaların sayısı artmaktadır. Belli bir sıcaklık değerine gelindiğinde enzimatik reaksiyon maksimum aktivite değerine ulaşır. Sıcaklığın biraz daha artması sonucunda ise reaksiyon ortamındaki enzim molekülleri protein yapısında olduklarından dolayı yapısal bozukluklara uğrarlar.

2.5. Enzim İmmobilizasyonu

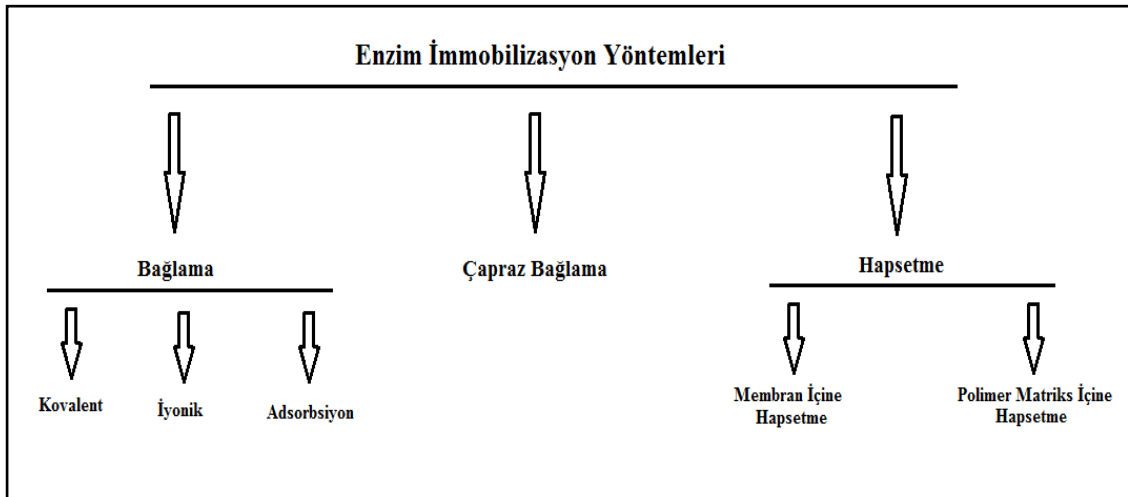
Günümüzde, enzimler substratına karşı çok yüksek seçiciliğe sahip olduğu, sulu çözeltilerde kolaylıkla çözülebildiği ve tekrar tekrar aynı reaksiyonlarda kullanılabilirdiği için kimya ve biyoteknoloji alanlarında çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, enzimler bu üstün özelliklerinin yanında kullanım açısından dezavantaj yaratan bazı özelliklere de sahiplerdir (Telefoncu 1997).

Endüstride kapalı ve sürekli sistemlerde gerçekleştirilen reaksiyon ortamlarında enzimatik reaksiyonların kontrolü oldukça güçtür. Ayrıca reaksiyonda kullanılan enzimlerin istenilen anda aktivitelerinde bir kayıp olmadan geri kazanımı da söz konusu değildir. Enzimlerin reaksiyon ortamından geri kazanımının yapılamaması her defasında yeni enzim kullanımını gerektirir, enzim izolasyon ve saflaştırma işlemleri de çok maliyetli işlemlerdir. Bu nedenle, enzimlerin hem kullanım maliyetini düşürmek hem de daha kullanışlı hale getirmek için immobilize (tutuklanmış) enzim tekniği geliştirilmiştir (Sheldon 2007).

Geliştirilen bu teknik ile sulu ortamda çözünebilen ve serbest halde bulunan enzim molekülleri, katı bir yüzeyde tutuklanarak veya hapsedilerek, sulu çözeltide çözünemez ve serbest halde bulunamaz duruma getirildi. Böylece hem enzimatik reaksiyonlar kontrollü duruma hem de enzim geri kazanımı yapılarak enzimler tekrar kullanılabilir hale getirildi (Telefoncu 1997).

2.5.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Literatürde çok fazla ve farklı immobilizasyon çalışmaları olmakla birlikte, bu çalışmaları genel olarak üç ana başlık altında incelemek mümkündür. Şekil 2.4 immobilizasyon yöntemlerini göstermektedir.



Şekil 2.4. İmmobilizasyon yöntemleri

2.5.1.1. Bağlama ile immobilizasyon yöntemleri

Bu bağlama yönteminde enzim suda çözünmeyen katı bir yüzey üzerine bağlanmaktadır. Bu yüzey yapay, sentetik, organik veya anorganik özelliklere sahip bir yüzeydir. Enzim molekülleri protein yapısında amino asit zincirlerindeki aktif uçlar vasıtasıyla yüzey ile kolaylıkla kovalent veya iyonik bağ ve moleküller arası etkileşim oluşturabilir. Yüzey seçilirken; hidrofilik karakter, suda çözünmeme, gözenekli olma, partikül büyüklüğü gibi bazı özelliklere dikkat edilmelidir. En yaygın olarak kullanılan

yüzeyler; selüloz, cam, silikajel, aktif karbon, iyon değiştirici reğineler, metal ve metal oksitler, kitin ve kitozan, poliakrilamit, naylon'dur (Telefoncu 1997).

a-) Kovalent bağlanma ile immobilizasyon

Bu immobilizasyon yönteminde enzim kovalent bağlar oluşturabilen yüzeylere doğrudan veya yüzey modifiye edilerek kovalent bağlarla bağlanarak immobilize edilir. Bu yöntemde enzimlerin yüzeyden kopması zordur, bu nedenle yapı sağlamdır. Difüzyon problemi en az olan yöntemdir. Kovalent bağlanmanın en önemli dezavantajı enzimin yüzeye aktif uçlarından bağlanarak aktivite kaybı oluşmasıdır (Söylemez ve Fadıloğlu 1996).

b-) İyonik bağlanma ile immobilizasyon

“Bu yöntemde kullanılan taşıyıcı sistemi iyon değiştirme yeteneğine sahip, suda çözünmeyen bir taşıyıcı olmalıdır. İyonik bağlanma çok yumuşak koşullarda gerçekteştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçışı söz konusu olabilmektedir” (Telefoncu 1997).

c-) Adsorbsiyon ile immobilizasyon

Bu bağlama türü, en basit immobilizasyon yöntemleridir. Buradaki adsorpsiyonu sağlayan kuvvetler elektrostatik kuvvetler, hidrojen bağları, Wan der Waals kuvvetleridir. Adsorpsiyon çok zayıf elektrostatik etkileşmeler ile oluştuğundan enzimin desorpsiyonu kolaydır. Enzim denatürasyonu (yapısının zarar görmesi) azdır. Fakat enzim desorbsiyonu; pH, çözücü türü, sıcaklık gibi parametrelere fazlasıyla bağımlıdır. Bu parametrelerin birinin değişimi bile enzimi kolaylıkla desorbe olabilmektedir (Teles ve Fonseca 2008).

2.5.1.2. Çapraz bağlama ile immobilizasyon yöntemi

Çapraz bağlama diğer immobilizasyon tekniklerine göre daha yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu yöntemde biyomolekül az miktarda çapraz bağlayıcı ile karıştırılarak immobilize edilmektedir. Difüzyon kontrollü olan bir yöntemdir. Enzim denatürasyonu diğer tekniklere göre oldukça düşüktür ve kullanım ömrünü uzatmaktadır. Ancak apraz bağlama sırasında enzim aktif uçlarıyla çapraz bağlanmışsa aktivitede kayıplar olabilmektedir (Sheldon 2007).

“En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri, glutaraldehit, kloroformat ve karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinil slfonlar, p–benzokinon, transizyon metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir” (Telefoncu 1997).

2.5.1.3. Hapsetme ile immobilizasyon yöntemleri

Hapsetme enzim molekülünü belli bir alanda tutmaya zorlamaktır. Bu yöntemi bağlanma yöntemlerinden ayıran en önemli fark enzimin herhangi bir taşıyıcıya bağlı olmayışıdır. Bu yöntemde enzim polimer bir matriks içerisinde, jel bir matriks içerisinde veya bir yarı geçirgen membran içerisinde hapsedilebilir. Bu yöntemin en büyük dezavantajı enzimatik reaksiyonun difüzyon tarafından kısıtlanmasıdır.

a-) Membran içine hapsederek immobilizasyon

Bu immobilizasyon yönteminde enzim yarı geçirgen bir membran içerisine hapsedilerek immobilize edilir. Fazla miktarda enzim kullanılmaktadır ve enzim denatürasyonu azdır. Bu yüzden enzim aktivitesinde neredeyse hiç kayıp olmamaktadır. Enzim yarı geçirgen bir membran içerisine hapsedildiğinden gerçekleşecek enzimatik reaksiyon difüzyona bağlı kalmaktadır. Difüzyon hızı membran gözeneklerinin çapına ve substrat moleküllerinin molekül büyüklüğüne bağlı olarak değişmektedir (Söylemez ve Fadiloğlu 1996).

En yaygın olarak kullanılan membranlar selüloz asetat membranlar, sol-jel türevi kompozit membranlar ve poliüretan membranlardır.

b-) Polimer matrisi içerisinde hapsederek immobilizasyon

Polimerik membranlar enzim immobilizasyonu için yaygın olarak kullanılan matrislerdir. Çeşitli polimerik filmler biyosensör yapımında kullanılmaktadır. Bu polimerler iletken veya iletken olmayan polimerler olabilmektedirler. Immobilizasyonda kullanılan polimerik filmler hem başlatıcı madde kullanılarak polimerleşme, hem de elektrokimyasal polimerleşme ile hazırlanabilmektedir (Prodromidis ve Karayannis 2002).

Başlatıcı kullanılarak yapılan polimerleşmede en çok kullanılan polimer N-N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamittir. Bu yöntemde polimer zincirlerinin çapraz bağ yüzdesi çok iyi ayarlanmalıdır. Çapraz bağ yüzdesinin çok fazla oluşu hem substratın enzim molekülüne erişimini kısıtlamakta hem de enzimin zincir yapısını zorlayıp aktivite kaybına neden olabilmektedir. Bu olumsuzluğa rağmen, bu tekniğin en büyük avantajı enzimin rastgele yönlendirmediği bir teknik oluşudur. Bu yüzden enzim molekülünde konformasyonel değişimler yüzünden herhangi bir aktivite kaybı olmaz (Teles ve Fonseca 2008).

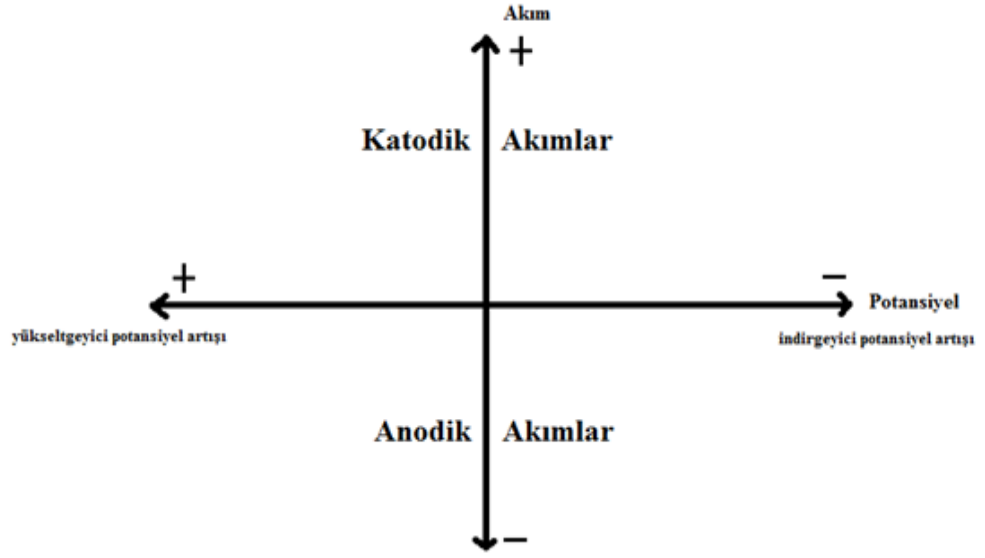
Elektrokimyasal polimerleşme ise, elektrokimyasal olarak polimerleşebilen bir monomer ile enzim içeren sulu çözeltiye daldırılmış çalışma elektrotuna uygun potansiyel uygulanarak gerçekleştirilir. Elektrokimyasal olarak enzim hapsedilmiş polimerik filmler, hapsedilen biyomolekülün aktivitesini etkileyen kimyasal reaksiyonlar olmadan, kolay ve hızlı olarak tek basamaklı bir prosedürle üretilir. Ayrıca bu metod polimer tabakasının kalınlığını kontrol etmeyi olanaklı kılar. Film tabakasının kalınlığı elektrokimyasal polimerleşme işlemi süresince devreden geçen yük miktarı hesaplanarak kontrol edilebilir. Bu yöntemin önemli avantajlarından bir tanesi polimerleşme işlemini çok küçük bir yüzeyde kontrollü biçimde yapabilmesidir. Bu yöntemle hazırlanmış polimer filmlerin çoğu poliasetilen, polianilin, polipirol gibi iletken polimerlerdir. İletken olmalarından dolayı polimer filmler farklı kalınlıklarda

olabilmektedir, iletken olmayanların aksine filmler ince olmak zorunda değildirler (Teles ve Fonseca 2008).

2.6. Biyosensör Yapımında Yararlanılan Voltametrik Teknikler

Voltametri üç elektrolu hücreler kullanılarak istenilen türlerin nitel ve nicel analizini yapmaya yarayan elektrokimyasal bir tekniktir. Ayrıca elektrot yüzeylerini modifiye etme, biyosensör hazırlama gibi çalışmalarda da voltametrik tekniklerden yararlanır. Voltametri diğer analiz tekniklerine göre oldukça hızlı bir tekniktir ve çok yüksek analitik duyarlılığa sahiptir. Voltametrik teknikler ile çalışma elektrotlarının potansiyel sınır değerleri içerisinde elektro aktif olan tüm bileşikler analizlenebildiği gibi türlendirme çalışmalarına da çok yatkın bir tekniktir. Son yıllarda özellikle biyosensör teknolojisinin ivmeli bir şekilde gelişmesi nedeniyle voltametrik tekniklerin kullanımının da önemli derecede artış gösterdiği düşünülmektedir.

Voltametrik çalışmalar; çalışma elektrotu, referans elektrot ve yardımcı elektrot olmak üzere üç elektrotlu hücre içerisinde ve düzenli bir şekilde değiştirilen potansiyel tarama işlemi ile yapılır. Üç elektrotlu hücrede çalışma elektrotunun potansiyel kontrolü için potansiyostat adı verilen cihazdan yararlanır. Çalışma elektrotunun potansiyelinin bir temel karşılaştırma elektrotuna (referans elektrot) istenilen değere ulaşması için çalışma elektrotu üzerinden, yardımcı bir elektrot aracılığıyla gerektiği kadar akım geçirilir, geçirilen bu akım büyüklüğü, çalışma elektrotunun potansiyeline karşı grafiğe geçirilerek voltamogram denilen akım–potansiyel eğrisi elde edilir. Bu eğri yardımıyla, hem istenilen türün indirgenme veya yükseltgenme potansiyeli belirlenirken hem de oluşan pikin büyüklüğü (pik akımı) vasıtasıyla o türün kantitatif analizi yapılabilmektedir. Şekil 2.5 IUPAC tarafından benimsenmiş akım–potansiyel gösterim yönleri ve kabul edilen işaretlerini göstermektedir.

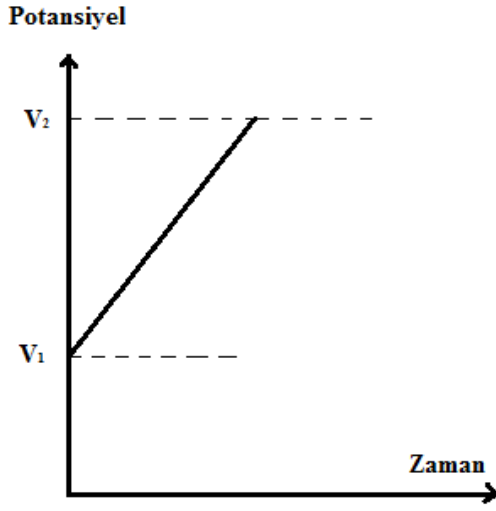


Şekil 2.5. IUPAC sistemine göre akım–potansiyel yönleri ve işaretleri

Voltametik çalışmalarda genellikle çalışma elektrotu olarak platin, altın, camsı karbon, grafit, bor içeren elmas, askıda civa damla elektrot gibi çalışılan ortama inert davranan elektrotlar, referans elektrot olarak ise Ag/AgCl, kalomel elektrotlar gibi temel karşılaştırma elektrotları kullanılmaktadır. HF gibi cam elektrot gövdelerinin zarar görebileceği koşullar için plastik gövdelerle hazırlanmış, ölçüm ortamı bileşiminden etkilenmemesi için sulu elektrolit yerine elektrolitik jel içeren gibi özel amaçlı referans elektrotlar da hazırlanabilmektedir (Şenol ve ark. 2009).

Biyosensör hazırlanması çalışmalarında, çevrimsel voltametri (CV), doğrusal taramalı voltametri (LSV), sabit potansiyelde akımın zamanla değişimi (Time-Base) ve puls teknikleri yaygın olarak kullanılan voltametik teknikleridir.

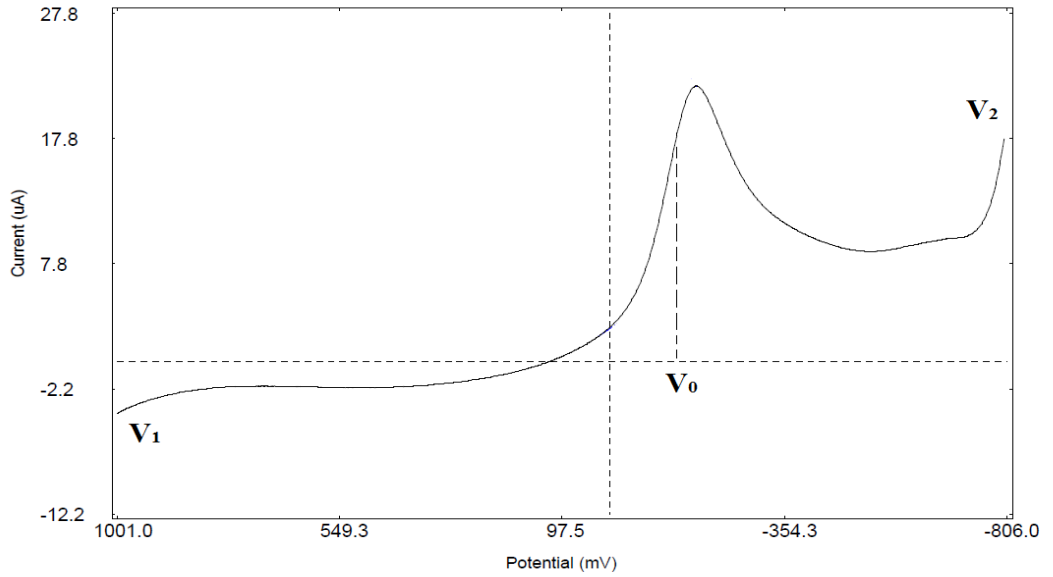
2.6.1. Doğrusal taramalı voltametri tekniği



Doğrusal taramalı voltametri adından da anlaşılacağı gibi potansiyel tarama programının sadece bir yöne doğru uygulandığı voltametrik tekniktir. Burada potansiyel V_1 gibi bir başlangıç potansiyelinden V_2 gibi bir bitiş potansiyeline sabit hız ile değiştirilir (Şekil 2.6). Değişen potansiyele karşı akımlar ölçülerek Şekil 2.7’de görülen grafik elde edilir.

Şekil 2.6. LSV’de potansiyel uygulama programı

Potansiyel tarama işlemi, analizi yapılacak türün tepkime vermesi düşünülen potansiyelinden (V_0) en az $220/n$ mV öncesinden başlatılarak (V_1), tepkimenin gerçekleştiği potansiyel yeterince aşıncaya kadar (V_2) sürdürülür (Bard ve Faulkner 2001). Şekil 2.7, LSV voltamogramı üzerinde V_1 , V_2 ve V_0 noktalarını göstermektedir.

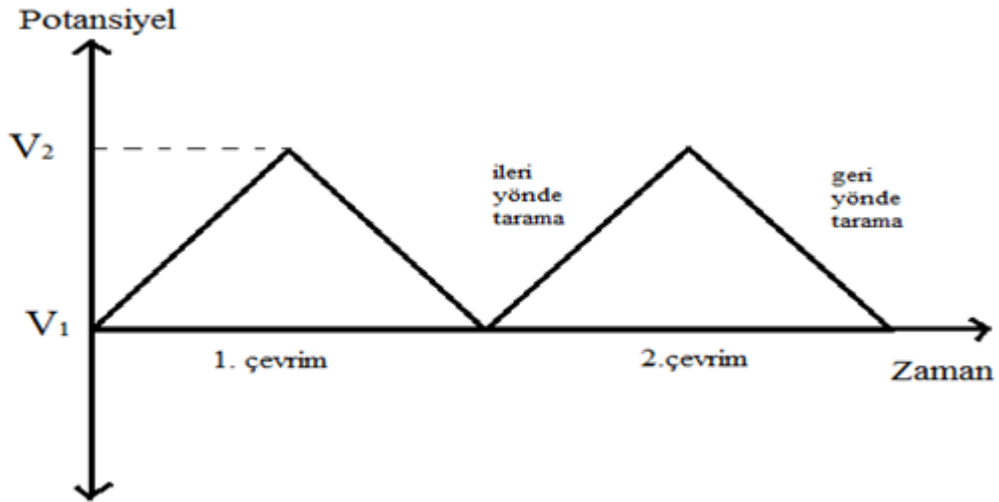


Şekil 2.7. LSV eğrisi

2.6.2. Çevrimsel voltametri tekniği

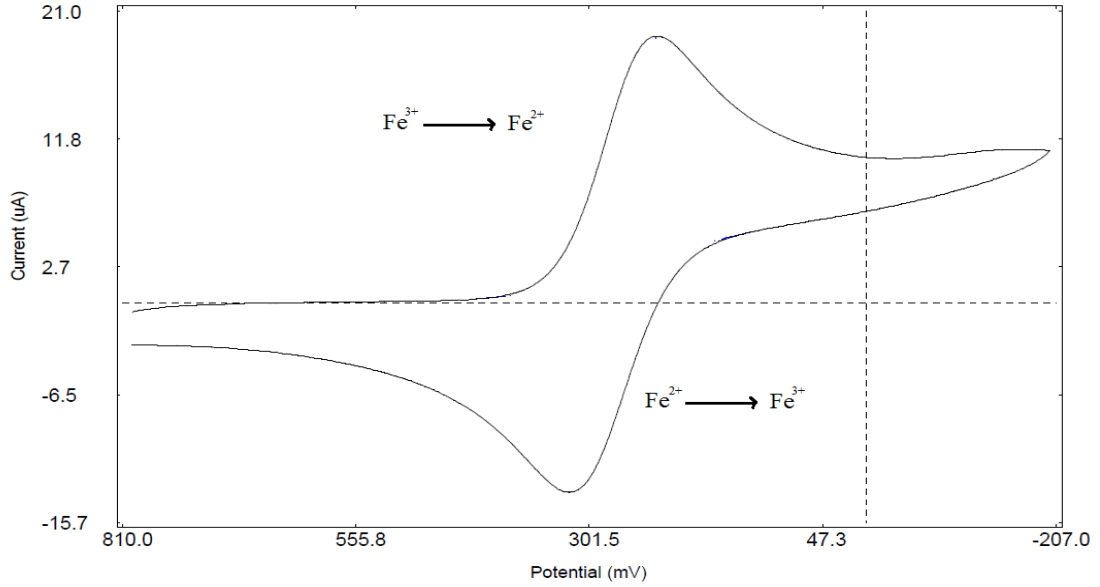
Çevrimsel voltametri (CV) bir kimyasal türün elektroaktivitesinin belirlenmesinde ve elektrokimyasal reaksiyonların aydınlatılmasında en yaygın olarak kullanılan tekniktir. Elektrokimyasal reaksiyonların kinetiği, heterojen elektron transfer reaksiyonları, kimyasal reaksiyonları, kimyasal reaksiyonlar ve adsorbsiyon işlemlerini aydınlatmada yararlanılır. Çevrimsel voltametri, 10^{-4} M ile sınırlı olduğundan çoğunlukla nicel analiz amaçlarıyla kullanılmaz. Bu yöntem genellikle istenilen türün redoks potansiyelini belirlemek için kullanılır (Wang 2006).

Çevrimsel voltametri de uygulanan potansiyel programı LSV'den farklı olarak iki kademe de uygulanır. İlk kademe de V_1 gibi bir başlangıç potansiyelinden başlanarak V_2 potansiyeli kadar tarama yapılır, ikinci kademe potansiyel uygulama yönü tersine çevrilir ve V_2 'den aynı tarama hızı ile tekrar V_1 (veya farklı bir V_3) potansiyeline kadar potansiyel düzgün hızla değiştirilir ve çalışma elektrotunun potansiyeline karşı okunan akımlar okunarak grafiğe geçirilir. Şekil 2.8 çevrimsel voltametriye ait potansiyel uygulama programını göstermektedir. Potansiyel uygulama programı Şekil 2.8'de görüldüğü gibi çok çevrimli olarak gerçekleştirilebilir.



Şekil 2.8. CV'de potansiyel uygulama programı

Şekil 2.9, 6 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ 'ya ait çevrimsel voltamogramı göstermektedir. Voltamogram incelendiğinde, çözelti ara yüzeyinde bulunan Fe^{3+} iyonlarının indirgeyici potansiyel bölgesine doğru yapılan tarama ile Fe^{3+} 'ün Fe^{2+} 'ya indirgendiği, potansiyelin ters tarafa değiştirilmesi sırasında oluşan Fe^{2+} iyonlarının uygun potansiyelde tekrar Fe^{3+} 'e yükseltgendiği görülmektedir.



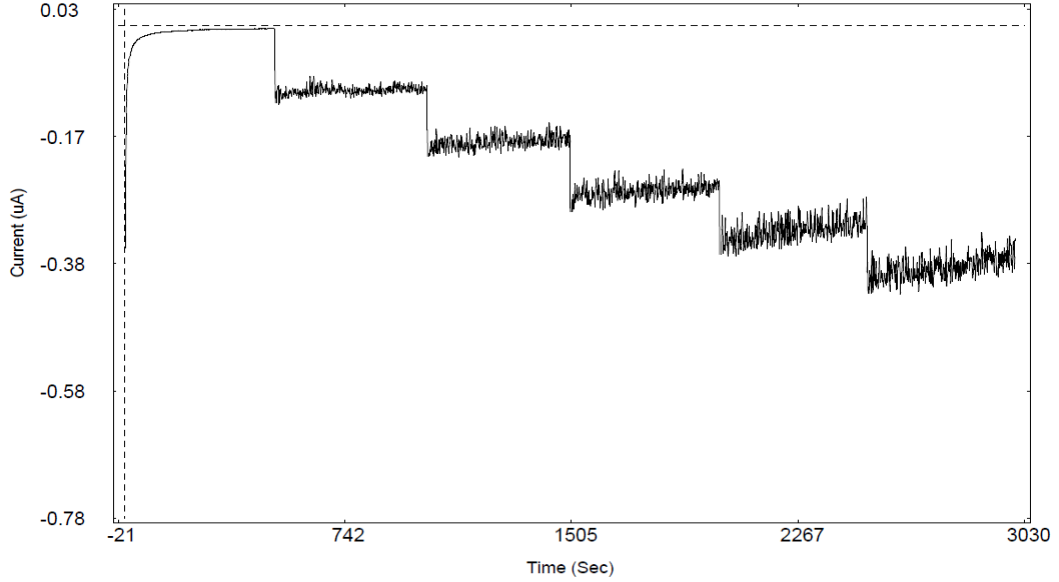
Şekil 2.9. CV eğrisi

2.6.3. Time–Base (akım–zaman) tekniği

Bu teknikte CV ve LSV'deki gibi potansiyel tarama işlemi yapılmamakta analiz süresince potansiyel sabit tutulmaktadır. Time–Base tekniği ile analiz yapabilmek için öncelikle CV veya LSV gibi teknikler kullanıp analiz edilmek istenen türün indirgenme veya yükseltgenme potansiyeli bulunmalıdır. Uygulanan potansiyel gerekli minimum potansiyelden biraz daha büyük olarak seçilebilir. Bu teknikte, eğer çözeltide var olan bir türü indirgemek istiyor ve ona ait indirgenme potansiyeli uyguluyorsak ortamda bu uygulanan potansiyelden daha düşük potansiyellerde indirgenen başka türlerin girişim etkileri dikkat edilmesi gereken en önemli husustur.

Time–Base tekniği, hazırlanan sensörün duyarlılığının ve olası interferentlerin etkisizliğinin gösterilmesi açısından çok kullanışlıdır. Bu teknikte çözelti ortamına

yapılan analiz edilmek istenilen türe ait hacim eklemeleri sonucunda akım basamakları oluşmakta oluşan basamak büyüklükleri de türün değişimi ile orantılı olmaktadır. Bu şekilde akım basamağı büyüklükleri okunarak kantitatif analiz yapılabilmektedir. Şekil 2.10 Time–Base tekniğine ait bir eğriyi göstermektedir.



Şekil 2.10. Time–Base eğrisi

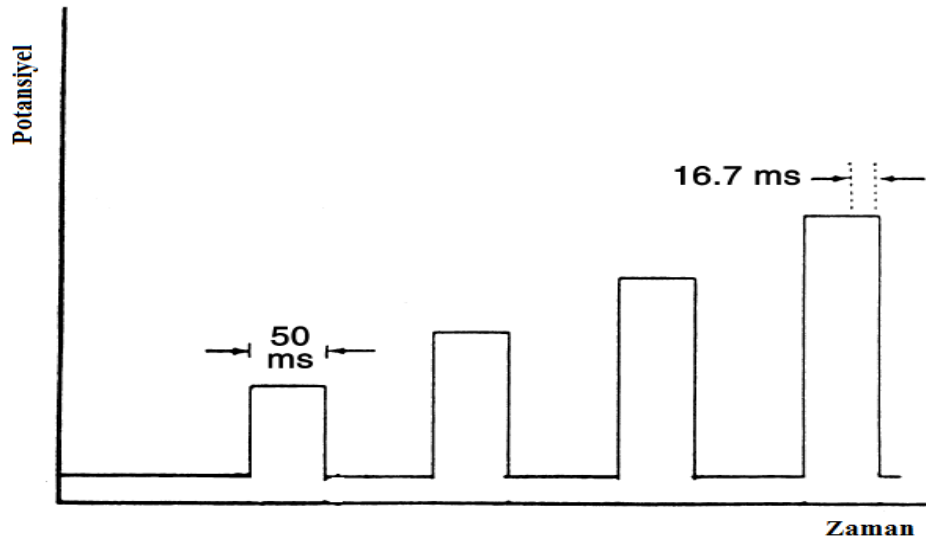
2.6.4. Puls teknikleri

Puls teknikleri daha düşük miktarlarda madde analizi yapmak için geliştirilmiş tekniklerdir. 10^{-8} M derişim gibi iyi bir tayin sınırları vardır. Puls tekniklerinin ortaya çıkışı ile elektroanalitik kimyacıların çok yaygın olarak kullandığı polorografi tekniğinin yerini almaya başlamıştır. Bu tekniklerde faradayik ve kapasitif akımların oranı çok fazla derecede arttırılmış ve bu sayede yüksek duyarlılık sağlanmıştır. Puls tekniklerini normal puls (NPV), diferansiyel puls (DPV) ve kare dalga voltametri (SWV) olmak üzere üç kısımda incelemek mümkündür. Bu tekniklerde çalışma elektrotunun üzerine 50 ms'lik sürelerde potansiyel basamağı dizisi uygulanır ve bu basamağın son kısmında akım okunur. Bunun nedeni, potansiyel basamağı uygulandıktan sonra kapasitif akımlar hızla düşerken faradayik akımlar daha yavaş düşmekte, dolayısıyla potansiyel basamağın sonunda okunan akım içerisinde derişimle doğru orantılı olan faradayik akımların payı büyümektedir (Wang 2006).

Bu tekniklerde dikkat edilmesi gereken en önemli husus her ölçümden önce elektrot yüzey alanının aynı olup olmadığıdır. Puls teknikleri hem katı elektrotlar (platin, camsi karbon v.b.) ile hem de askıda civa damla elektrot (HMDE) ile yapılabilmektedir. Damlayan civa damla elektrot ile yapılan voltametrik çalışmalarda puls tekniklerinin kullanılması ile puls polarografisi gelişmiştir.

2.6.4.1. Normal puls voltametri

Normal puls voltametrisinde, uygulanan potansiyel puls yüksekliği düzenli olarak arttırılmak suretiyle çalışmalar gerçekleştirilir. 50 ms boyunca puls uygulanır ve bu pulsün son 16,7 ms'sinde akım okuması yapılarak eğri oluşturulur. Okunan akımlar içerisinde faradayik akımların belirgin olması nedeniyle diğer lineer potansiyel tarama tekniklerine oranla 5 ile 10 kat daha iyi duyarlılık elde edilebilir (Bard ve Faulkner 2001). Şekil 2.11 NPV'ye ait potansiyel uygulama programını göstermektedir.

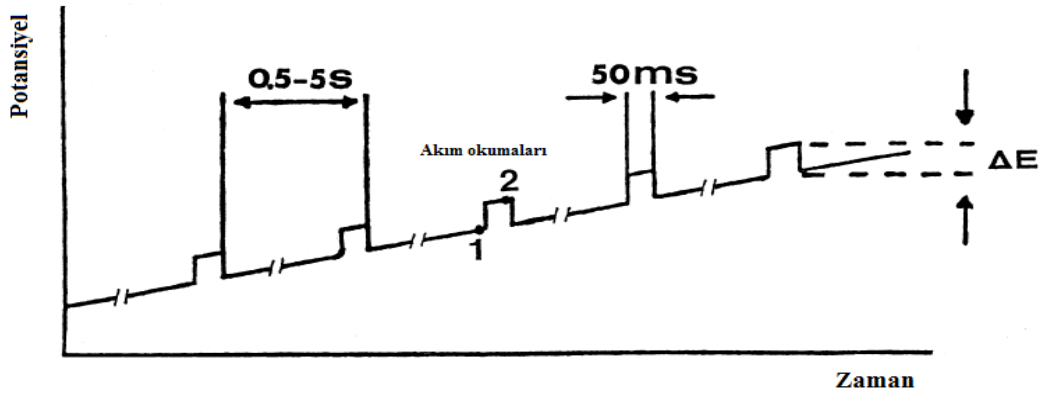


Şekil 2.11. NPV'de uygulanan potansiyel programı

2.6.4.2. Diferansiyel puls voltametrisi

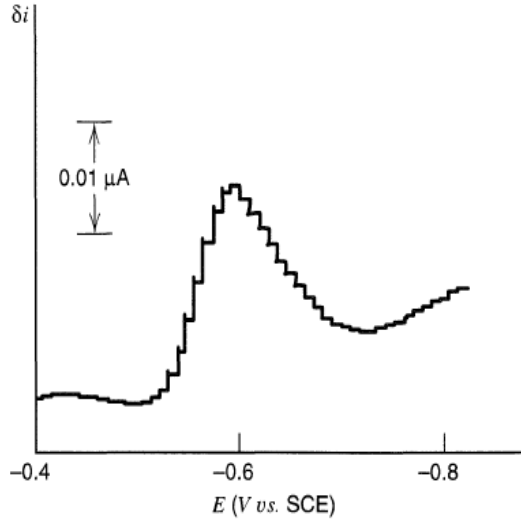
Diferansiyel puls voltametrisinde uygulanan puls şekli, doğrusal olarak artan bir potansiyel uygulama programı (RAMP) üzerine puls uygulama programının yerleştirilmesi ile oluşmaktadır. Bu teknikte NPV'den farklı olarak iki kez akım okuması yapılır. İlk akım okuması puls uygulanmaya başlamadan 16,7 ms önce, ikinci okuma ise puls uygulanıp kapasitif akımların minimum değere ulaştığı anda okunur ve bu iki okuma arasındaki fark potansiyele karşı grafiğe geçirilerek eğri elde edilir (Wang 2006).

DPV tekniğinde uygulanan pulsun potansiyel büyüklüğü genelde 10–100 mV potansiyel arasındadır (Bard ve Faulkner 2001). DPV, NPV'den 5 veya 6 kat daha duyarlı bir teknik olduğu için 2–10 ppb tayin sınırlarında çalışma yapma imkanı sağlamaktadır (Türkdemir 2008). Şekil 2.12 DPV'de uygulanan potansiyel programını göstermektedir.

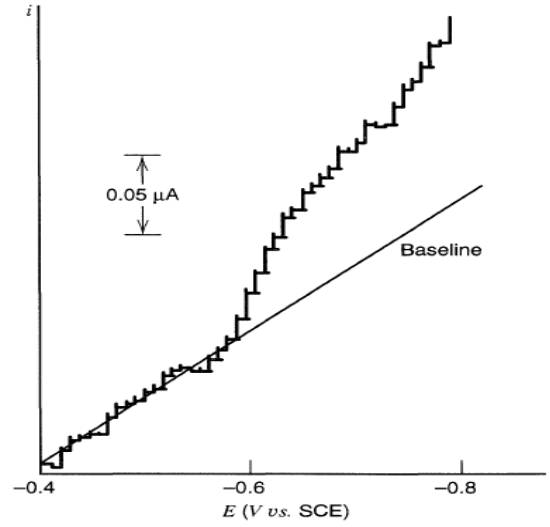


Şekil 2.12. DPV'de potansiyel uygulama programı

Bard ve Faulkner (2001) tarafından civa damla elektrot ile 0,01 M HCl içerisinde 10^{-6} M Cd^{2+} 'ye ait DPV ve NPV teknikleri ile elde edilmiş eğriler Şekil 2.13 ve Şekil 2.14 göstermektedir. İki şekil incelendiğinde NPV ile Cd^{2+} 'ye karşı düzgün bir pik oluşumu gözlenmezken, DPV ile yapılan çalışmada oldukça iyi ve gözlenebilirliği yüksek bir pik elde edilmiştir.



Şekil 2.13. DPV eğrisi



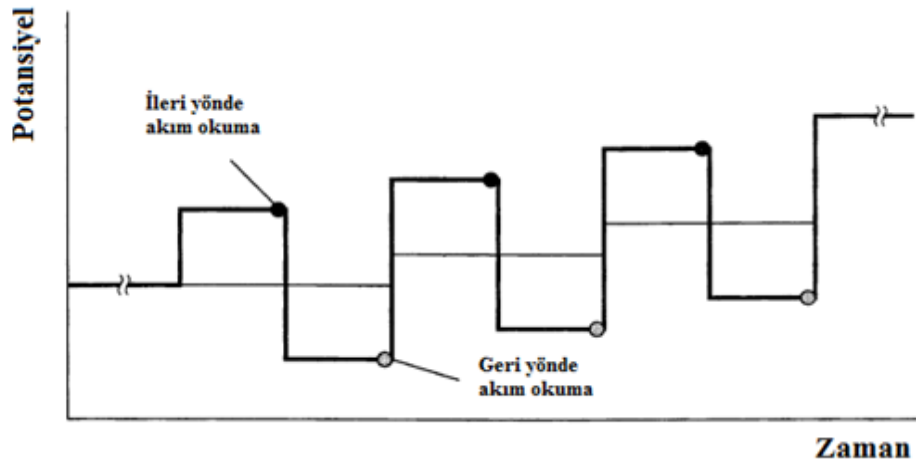
Şekil 2.14. NPV eğrisi

2.6.4.3. Kare dalga voltametri

Kare dalga voltametrisinde, çalışma elektrotuna hem ileri yönde hem de geri yönde simetrik bir şekilde kare dalgaları şeklinde potansiyel uygulaması yapılır. Bu teknikte de akım ölçümü için iki okuma yapılır. Okumalar ileri ve geri yöndeki pulsların son zaman dilimlerinde yapılarak kapasitif akımlardan kaçınılmış olunur (Wang 2006).

Kare dalga voltametrisinde uygulanan potansiyel basamak yüksekliği ve genişliği ayarlanarak çok yüksek tarama hızlarına çıkılabildiği için elde edilen piklerin yükseklikleri yani tekniğin duyarlılığı diğer puls tekniklerine göre daha iyidir.

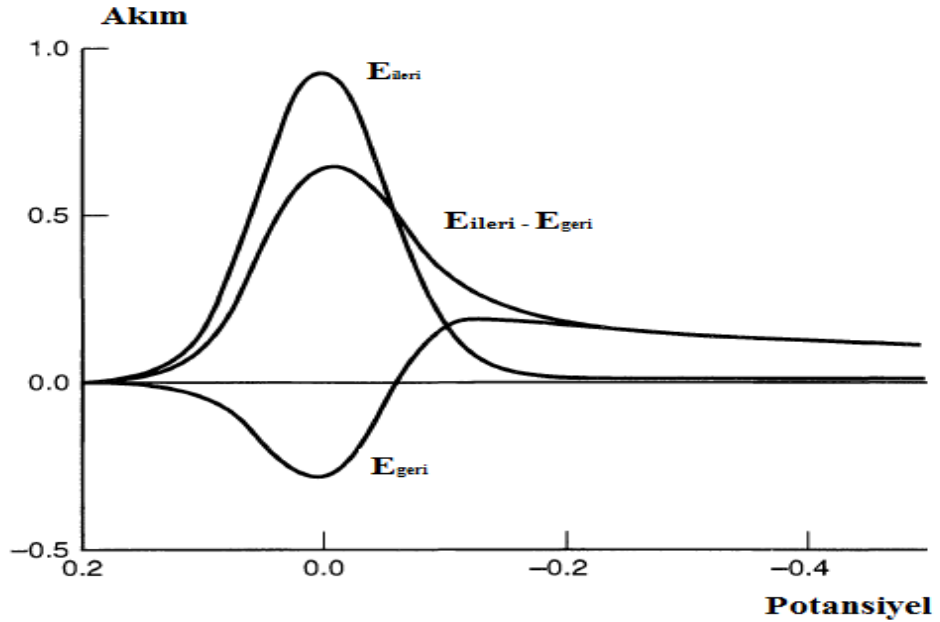
Nitekim bu teknik ile 10^{-8} M derişimlere kadar çalışmalar yapmak mümkündür (Wang 2006). Şekil 2.15 kare dalga voltametrisinde uygulanan potansiyel programını göstermektedir.



Şekil 2.15. SWV'de potansiyel uygulama programı

Bu teknikte, ileri yönde yapılan akım okumalarından, geri yönde akım okumaları çıkarılarak eğri elde edilir (Bard ve Faulkner 2001).

Şekil 2.16 yapılan ileri ve geri yönlerdeki okumalar ile elde edilen eğrileri ve sonuç olarak elde edilen eğriyi göstermektedir.



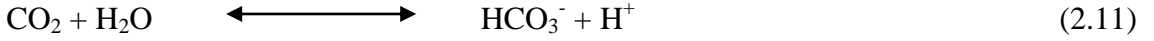
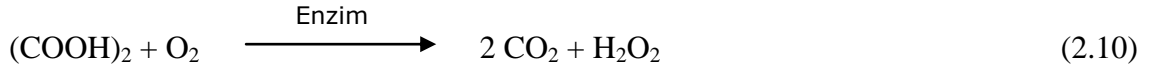
Şekil 2.16. SWV'de ileri okuma, geri okuma ve ikisi arasındaki fark sonucu elde edilmiş akım-potansiyel eğrileri

2.7. Literatürde Oksalat Tayini İçin Yapılan Çalışmalar

Oksalatın, ıspanak, mantar, pancar yaprağı, zencefil, horozibiği çiçeği, pazı otu gibi sebzelerde, çikolata gibi gıda maddelerinde, bira gibi içeceklerde olduğu ve ayrıca içme suyunun ozonlama ile dezenfekte edilmesi esnasında ve vücuttaki protein yıkımı sonucu oluştuğu bildirilmektedir. Vücuda alınan fazla miktarda oksalat Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarla çözünmeyen bileşikler oluşturarak vücudun gereksinim duyduğu Ca^{2+} ve Mg^{2+} emiliminde azalma gibi sorunlara yol açabilmektedir. Oksalatın oluşturduğu bu çözünmeyen bileşikler böbrek ve organlarda çökerek bazı fonksiyonel bozukluklara ve böbrek taşlarına neden olduğu bilinmektedir. Oksalat ayrıca endüstriyel sistemlerde de sorunlara neden olan bir maddedir. Fazla oksalat bira yapımının ilk aşamalarında biranın rengini bozucu etki gösterirken, ilerleyen aşamalarında ise sistemin içerisinde çökerek tıkanıklıklara neden olmaktadır. Benzer şekilde ozonlanma sonucu suda oluşan oksalat da sistemlerde çökerek tıkanıklık ve hasarlara neden olabilmektedir. Ozonlanma sonucu oluşan oksalatın ayrıca sudaki bakteriyel gelişmeye (kirliliğe) katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Oksalat bu tip sorunlara neden olduğu için rutin yöntemlerle sürekli takip edilmesi ve analizlenmesi büyük önem teşkil etmektedir.

2.7.1. Biyosensörler ile yapılan çalışmalar

Oksalat biyosensörleri genel olarak üç farklı tiptedir; bir oksijenmetre ve oksalat oksidaz (OXO) enzimi ile modifiye edilmiş oksijen sensöründen oluşan oksalat biyosensöründe aşağıdaki reaksiyona bağlı olarak çözülmüş oksijen derişimindeki azalma ölçülürken, amperometrik oksalat sensöründe aynı tepkime ile açığa çıkan H_2O_2 'nin indirgenme tepkimesi sonucu oksalat miktarı belirlenir. Oksalat tayini için bienzimatik (iki enzimli) amperometrik biyosensörler de mevcuttur. Bienzimatik sensörlerde oksalat oksidaz ve horseradish peroxidase enzimleri birlikte kullanılarak genellikle bir mediatörün yükseltgenerek değişen derişimi ölçülmektedir. Potansiyometrik oksalat sensörü ise aşağıdaki reaksiyon sonucu oluşan CO_2 'nin biyosensörün iç çözeltisi içinde karbonat – bikarbonat dengesini oluşturması sonucu ortamın değişen pH'si ölçümü ilkesine dayanmaktadır (Yablotskii ve Shekhovtsova 2010).



Oksalat tayini için ayrıca kalorimetrik ölçüm ilkesine dayalı ve SIRE teknolojisi diye adlandırılan, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan türün elektrot yüzeyindeki reaksiyonuna değil de enzimatik reaksiyonun kendisinden kaynaklanan elektriksel sinyallerin ölçümüne dayalı biyosensörlerde mevcuttur (Pundir ve Sharma 2010). Ancak bu tip biyosensörlerin sayısı çok azdır. En yaygın olarak bulunan sensörler H_2O_2 'nin indirgenmesi esasına dayanan sensörlerdir.

Bradley ve Rechnitz (1986), idrarda oksalat tayini için hem potansiyometrik hem de amperometrik oksalat sensörleri geliştirmişlerdir. Potansiyometrik sensör oksalat oksidazın gaz geçirgen membran yüzeyine immobilize edilip CO_2 elektrotunun yüzeyine yerleştirilmesi ile, Amperometrik sensör ise oksalat oksidazın Gor–Tex membran ile diyaliz membranı arasına immobilize edilmesiyle oluşturulmuştur. Potansiyometrik sensör ile tayin sınırı $3,4 \cdot 10^{-5}$ M, amperometrik sensör ile $2 \cdot 10^{-6}$ M olarak bulunmuştur.

Dinçkaya ve Telefoncu (1994), oksalat tayini için çözünmüş oksijen elektrotu ile oksalat oksidaz kullanılarak bir biyosensör hazırlamışlardır. Önce oksijen elektrot üzerine selüloz asetat membran tutturmuşlar, bu selüloz asetat membran, oksalat oksidazın birleşebileceği fonksiyonel grupların sayısını arttırmak için BSA ile birleştirilmiş ve aktive edilmiştir. Oksalat oksidaz selüloz asetat–BSA membranına glutaraldehit ile bağlanmıştır. Doğrusal çalışma aralığı $1 \cdot 10^{-5}$ – $3,5 \cdot 10^{-4}$ M olarak belirlenmiştir.

Reddy ve ark. (1997), idrarda oksalat tayini için oksalat oksidazı glutaraldehit ve BSA ile polikarbonat veya dializ membranı ile selüloz asetat membran arasına immobilize ederek bir biyosensör oluşturmuşlardır. Doğrusal çalışma aralığı seyreltilmiş idrarda 2–200 μM , seyreltilmemiş ise 80–800 μM olarak belirlenmiştir.

Milardovic ve ark. (2000a), rutenyum, nikel ve demir hegzasiyanometalat (Ru-FeNiHCM) ile modifiye edilmiş grafit elektrot yüzeyine glutaraldehit ve BSA ile oksalat oksidaz immobilize ederek biyosensör hazırlanmıştır. Doğrusal çalışma aralığının alt sınırı 20 µL olarak elde edilmiştir.

Milardovic ve ark (2000b), krom (III) hegzasiyano ferrat (II) ile grafit elektrotu modifiye ederek yeni bir yüzey oluşturmuşlar oluşan yeni yüzeye de oksalat oksidazı BSA ve glutaraldehit ile immobilize ederek gerçek yiyecek örnekleri ve idrar örneklerinde oksalat tayini için bir biyosensör geliştirmişlerdir. Doğrusal çalışma aralığı 2,5–400 µM olarak bulunmuştur.

Perez ve ark. (2001), hem oksalat oksidaz hem de horseradish peroksidaz içeren çift enzim sistemli bir elektrot hazırlanmıştır. Oksalat oksidaz, titanyum dioksit ile modifiye edilmiş olan silika jele glutaraldehit ile çapraz bağlanarak immobilize edilmiştir. HRP karbon di-imit ile grafit tozuna kovalent bağlanarak immobilize edilmiştir. Doğrusal çalışma aralığı 0,1–2 mmol/L olarak belirlenmiştir.

Sezgintürk ve Dinçkaya (2003), idrardaki oksalat tayini için ıspanak dokularının immobilizasyonuna dayalı bir biyosensör geliştirilmişlerdir. Biyosensör çözünmüş oksijen elektrodu üzerine yüksek seçiciliğe sahip teflon membran entegre edilerek, bu membrana ıspanak dokularının immobilize edilmesiyle yapılmıştır. Enzim immobilizasyonu jelatin–glutaraldehit çifti ile çapraz bağlama yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Doğrusal çalışma aralığı 1.10^{-5} – 10.10^{-5} M olarak belirlenmiştir.

Hong ve ark. (2003), yaptıkları çalışmada oksalat tayini için SIRE teknolojisini kullanarak kolorimetrik yöntemle idrarda oksalat tayini için bir biyosensör geliştirmişlerdir. Tayin sınırını 20 µM, dorusal çalışma aralığını 0–5 mM olarak belirlemişlerdir.

Fiorito ve Torresi ark. (2004), oksalat tayini için purusya mavisi ve dop edilmiş analin ile modifiye edilmiş camı karbon elektrot yüzeyine oksalat oksidazı glutaraldehit ile immobilize ederek bir biyosensör geliştirmişlerdir. Doğrusal çalışma aralığı 0,08–0,45 mM olarak bulunmuştur.

Capra ve ark. (2005), idrarda oksalat tayini için oksalat oksidazı glutaraldehit–müsin–karbopol matrikse çapraz bağlayarak bir biyosensör oluşturmuşlardır. Ayrıca glutaraldehit–müsin–enzim ve glutaraldehit– albumin–enzim bileşimlerini kıyaslamışlardır. Doğrusal çalışma aralığı 2–400 μ M olarak belirlemişlerdir.

Milardovic ve ark. (2008), idrarda oksalat tayini için altın elektrot yüzeyine oksalat oksidaz ve peroksidaz enzimlerini BSA (bovin serum albumin) ve glutaraldehit ile immobilize ederek biyosensör geliştirmişlerdir. Ölçümler hem standart oksalik asit için (doğrusal çalışma aralığı 50 μ M–10 mM) hem de idrar örneği için (doğrusal çalışma aralığı 5 μ M–10 mM) akış hücresinde doğrudan enjeksiyon yapılarak yapılmıştır.

Mishra ve ark. (2010), idrar ve birada oksalat tayini için karbon tozu, parafin yağı oksalat oksidaz, BSA ve glutaraldehiti karıştırarak bir enzimatik elektrot oluşturmuşlardır. Sensör 20 mg/mL'ye kadar doğrusal olarak çalışmaktadır.

2.7.2. Diğer tekniklerle yapılan çalışmalar

Masar ve ark. (2003), alan elektroforez sistemi ile biradaki oksalat tayini için polimetilmetakrilat kapiler elektroforez ciplerini kullanmışlardır. Bu sayede yüksek örnek yükleme kapasiteli bir ayırma sistemi (500 nL örnek enjeksiyon kanalı ile birleştirilmiş 8500 nL ayırma kanalı) elde etmişler, ayrıca çipte ayırma bölümündeki çözeltinin hidrodinamik ve elektro-osmatik taşımaları engellenmiş ve elektroforez çipteki ayırmalarda baskın taşıma işlemi haline getirilmiştir. Doğrusal çalışma aralığı 2–25 mM olarak bulunmuştur. Uygulama için altı farklı bira örneği ile çalışılmıştır.

Suzuki ve ark. (2005), serumda oksalat tayini için 190 nm’de direkt absorbans tayinine dayanan alan elektroforez sistemini elektrik alan–büyütmeli ön deriştirme tekniği ile birleştirilip bir analiz sistemi oluşturmuşlardır. Tayin sınırı (S/N = 3 iken) 1,14 nM, doğrusal çalışma aralığı ise 5,68 nM–11,36 μ M, $R^2= 0,9999$ olarak belirlenmiştir. Daha sonra dört farklı serum örneğinde uygulama yapılmıştır.

Sljukic ve ark. (2007), oksalik asit tayini için ikisi polipirolitik karbon, diğer ikisi sadece karbon tabanlı elektrotlar ile oksalik asitin yükseltgenmesine dayanan bir tayin yöntemi geliştirmeyi amaçlamışlardır. Polipirolitik elektrotların oksalik asite karşı oldukça duyarlı olduğunu gözlemlemişler ve yapılan çalışmalar sonucunda tayin sınırını 0,7 μ M olarak belirlemişlerdir.

Kumar ve ark. (2008), idrarda oksalat tayini için aktifleştirilmiş polistiren küvetler kullanarak bir metot geliştirmişlerdir. Polistiren küvet ışık altında yzeeye bağlanabilen çift aktif uçlu olan 1–floro–2–nitro–4–azidobenzen ile modifiye edildikten sonra bu bileşiğe oksalat oksidazın takılması ile aktive edilmektedir. Oksalat tayini absorbansa dayalı olarak yapılmıştır. Doğrusal alışma aralığı 20–200 μ M olarak belirlenmiştir.

Şenol ve ark. (2009), oksalik asit analizi için öncelikle Britton–Robinson tamponunda oksalik asitin pH ile duyarlılığındaki değişmeyi belirlemişler, ardından optimize ettikleri çalışma koşullarında kalibrasyon grafiği hazırlamışlardır. Doğrusal alışma aralığını 0,5–5 mM olarak belirlemişlerdir.

Zheng ve ark. (2009), ıspanakta oksalik asit tayini için camsı karbon elektrotu karbon nano tüp ile modifiye edip bir elektrot hazırlamışlardır. Oksalik asitin yükseltgenmesi vasıtasıyla tayin etmişlerdir. Doğrusal alışma aralığı 5.10^{-5} – $1,2.10^{-2}$ M olarak belirlenmiştir.

Chamjangali ve ark. (2009) tarafından, sebze ve su örneklerinde eser miktarlarda oksalat tayini için yeni, basit, seçici ve duyarlı katalitik–kinetik spektrofotometrik bir metot geliştirilmiştir. Metot sülfürik asit ortamında dikromat ile oksalatın rengi mora dönene kadar titre edilerek yükseltgenmesine dayanır. Sonrasında mor renkli çözelti 630 nm’de ölçülerek oksalat tayin edilir. Doğrusal çalışma aralığı 0,2–5,5 mg/mL ve tayin sınırı 0,05 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Pundir ve ark. (2009), yumurta kabuğu üzerine oksalat oksidaz immobilize ederek oksalat için yeni bir tayin yöntemi geliştirmişlerdir. Tayin sınırını 1,5 μ M olarak belirlemişlerdir.

Sikora ve ark. (2009), vücudunda kalsiyum oksalat olduklarından şüphe duyulan ve duyulmayan 59 kişideki oksalat miktarını belirlemek ve bu sonuçları yaşlara ve göre kategorilendirmek amacıyla, infrared spektroskopisini kullanarak plazmada oksalat tayini çalışmaları yapmışlardır.

Yamazaki ve ark. (2010), rodyum ftalosiyanın ile camsı karbon elektrot yüzeyini modifiye ederek oksalik asit tayini için yeni bir modifiye elektrot yapmışlardır. Tayin sınırını da 1 μ M olarak belirlemişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

Voltametik çalışmalar; bilgisayar kontrollü BASİ Epsilon marka potansiyostat ile C3 Cell Stand ve Civa Damla Elektrot (HMDE) kullanılarak, spektrofotometrik çalışmalar; Hitachi U-3900H marka çift ışın yollu UV-VIS spektrofotometre kullanılarak yapıldı. pH ayarlama ve ölçümleri için Termo-Orion 4 Star Plus marka pH metre ve 8102BNUWP kodlu Orion cam pH elektrottan, tartım işlemleri için Shimadzu AUW220D marka 0,01 mg duyarlılıktaki hassas teraziden yararlanıldı. Çözelti hazırlama işlemlerinde kullanılan ısı kontrollü manyetik karıştırıcı Wisestir MSH-20D markadır. Çeşitli işlemlerde Branson 1510 model ultrasonik banyo ve ölçüm çözeltilerinden çözünmüş O₂ uzaklaştırılmasında yararlanılan yüksek saflıkta (%99,9) Ar gazının temizlenmesi için VCl₃ absorpsiyon cam düzeneğinden yararlanıldı. Ayrıca elektrot yüzeylerini kontrol ve kaplama işlemleri sonucu elde edilen yeni yüzeyleri fotoğraflamak amacıyla, x500 kata kadar büyütme 122Cu Dijital Görüntüleme Sistemine sahip NIM 100 Ters Tip Metalürjik Mikroskop'tan yararlanıldı.

Voltametik çalışmalarda, çalışma elektrotu olarak; Basi marka, MF-2013 kodlu 1,6 mm çapında platin elektrot (PtE), MF-2012 kodlu 3 mm çapında camsı karbon elektrot (GCE), yardımcı elektrot olarak; Basi marka MV-1032 kodlu 7,5 cm uzunluğunda platin tel elektrot ve spiral şekilde bükülerek paralel düz yüzey haline getirilmiş platin elektrot, referans elektrot olarak; Basi marka MF-2052 kodlu RE -5B Ag/AgCl referans elektrot; voltametik ölçüm hücresi olarak; 50 mm çapında yaklaşık 25 mL örnek alabilen Basi marka MR-1208 kodlu hücreler kullanıldı.

3.2. Kullanılan Çözeltiler

Kullanılacak çözeltiler, temin edilebilen yüksek saflık derecesindeki kimyasallar ve Zeeman 1 model tersozmoz ultrasafsu cihazından alınan çok yüksek saflıktaki (18,2 Mohm) su kullanılarak hazırlandı. Çözeltiler aynı titizlik ve özenle, 2-3 haftadan daha eski tarihli olmalarına izin verilmeksizin sık sık tazelendi.

a-) 0,04 M Britton–Robinson tampon (BRT) çözeltisi

Borik asit (Merck, GR for analysis), % 85’lik fosforik asit (Sigma – Aldrich, puriss) ve % 100’lük glasiyel asetik asidin (Merck, anhydrous GR for analysis) her birinden 0,04 M içerecek şekilde arzu edilen hacimlerde hazırlanan karışımın pH si 2–10 arasında istenilen değere tamponlanarak hazırlandı.

b-) 0,4 M hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi

% 35’lik H₂O₂ (Merck) çözeltisinden yararlanılarak arzu edilen hacimlerde 0,4 M H₂O₂ sık periyotlarla hazırlandı. Bu çözeltinin seri seyreltmeleri ile kalibrasyon grafiği hazırlama çalışmalarında kullanılan 0,04 M, 0,004 M, 0,0004 M gibi seyreltik H₂O₂ çözeltileri “A” tipi balon jöjeler kullanılarak hazırlandı.

c-) 0,4 M oksalik asit (C₂H₂O₄) çözeltisi

Oksalik asit dihidrat (Merck, GR for analysis) arzu edilen hacimde 0,4 M oksalik asit içerecek şekilde hazırlandı. Kalibrasyon grafiği hazırlama çalışmalarında kullanılan daha düşük derişimlerdeki oksalik asit çözeltileri (0,04 M, 0,004 M, 0,0004 M) seyreltme işlemi ile 0,4 M oksalik asit çözeltisinden hazırlandı.

d-) BRT ile tamponlanmış 0,1 M oksalik asit çözeltisi

Oksalik asit dihidrat arzu edilen hacim içerisinde 0,1 M oksalik asit içerecek şekilde hazırlanıp 0,04 M BRT çözeltisi ile istenilen pH’ye tamponlanarak hazırlandı. Kalibrasyon grafiği hazırlama çalışmalarında kullanılan daha düşük derişimlerdeki oksalik asit çözeltileri (0,01 M, 0,001 M, 0,0001 M) seyreltme işlemi ile 0,1 M oksalik asit çözeltisinden hazırlandı.

f-) 0,1 M fosfat (NaH₂PO₄) tampon çözeltisi

Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat (Sigma–Aldrich, puriss) öncelikle 120 °C’de etüvde kurutuldu. Ardından arzu edilen hacim içerisinde 0,1 M fosfat içerecek şekilde pH 3–10 arasında istenilen pH’ye tamponlanarak hazırlandı.

g-) 6 mM potasyum hegzasiyanoferrit [K₃(Fe (CN)₆)] çözeltisi

Potasyum hegzasiyanoferrit (Merck, GR for analysis) arzu edilen hacim içerisinde 6 mM potasyum hegzasiyanoferrit ve destek elektrolit olarak 1 M potasyum nitrat (KNO₃, Merck, GR for analysis) içerecek şekilde hazırlandı.

h-) 0,1 M sülfürik asit (H₂SO₄) çözeltisi

Sülfürik asit çözeltisi, % 95–98’lik sülfirik asitten (Merck) arzu edilen hacim içerisinde 0,1 M sülfirik asit içerecek şekilde hazırlandı.

ı -) 10 mM potasyum klorür (KCl) içerisinde 0,125 M Pirol içeren çözelti

Pirol çözeltileri, \geq % 97’lik pirolden (Merck, for synthesis) toplam hacim 10 mL olmak koşuluyla 10 mM KCl destek elektroliti içerisinde 0,125 M pirol içerecek şekilde hazırlandı.

i-) Enzim çözeltilisinin hazırlanışı

pH 3,8 süksinat tampon çözeltisi içerisinde 0,008 mg/ μ L’lik oksalat oksidaz (Sigma–Aldrich, from barley seedlings) içeren enzim çözeltileri hazırlandı.

j-) Nafyon çözeltilerinin hazırlanışı

Kütlece % 0,5, % 1, % 3 nafyon çözeltileri, kütlece % 5’lik nafyon (Sigma–Aldrich) çözeltilerinden % 100’lük etanol ile seyreltilerek hazırlandı.

k-) K tलेce % 2,5'lik glutaraldehit c zeltisi hazırlanışı

K tलेce % 2,5'lik glutaraldehit, k tलेce % 50'lik glutaraldehitten (Sigma–Aldrich) saf su ile seyreltilerek hazırlandı.

3.3. Kullanılan Yöntemler

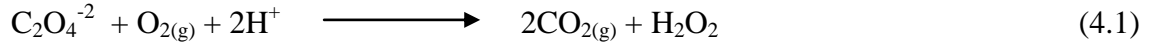
Voltametrik tekniklerden CV ve LSV, H₂O₂ ve oksalik asitin duyarlılığının pH ile değişimini ve elektrot yüzey aktifliğini belirleme calışmalarında, DPV ise daha iyi duyarlılık dolayısıyla daha iyi tayin sınırlarında analiz yapabilmek için kalibrasyon grafiği hazırlama calışmalarında kullanıldı. Time–Base tekniğinden ise sabit potansiyelde H₂O₂ ve oksalik asite ait akım basamağı oluşumunu belirleme, elektrokimyasal polimerleşme ve hazırlanan enzimatik sensörlerin oksalata olan duyarlılıklarının belirlenmesi calışmalarında yararlanıldı.

Spektrofotometrik teknikle genellikle dalga boyu tarama calışmaları yapılarak oksalik asitin analizlenebilirliği çizilen kalibrasyon grafikleri ile gösterilmeye calışıldı.

Voltametrik ve spektrofotometrik calışmaların tümü klima kontrollü laboratuvar koşullarında ve 25  C oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

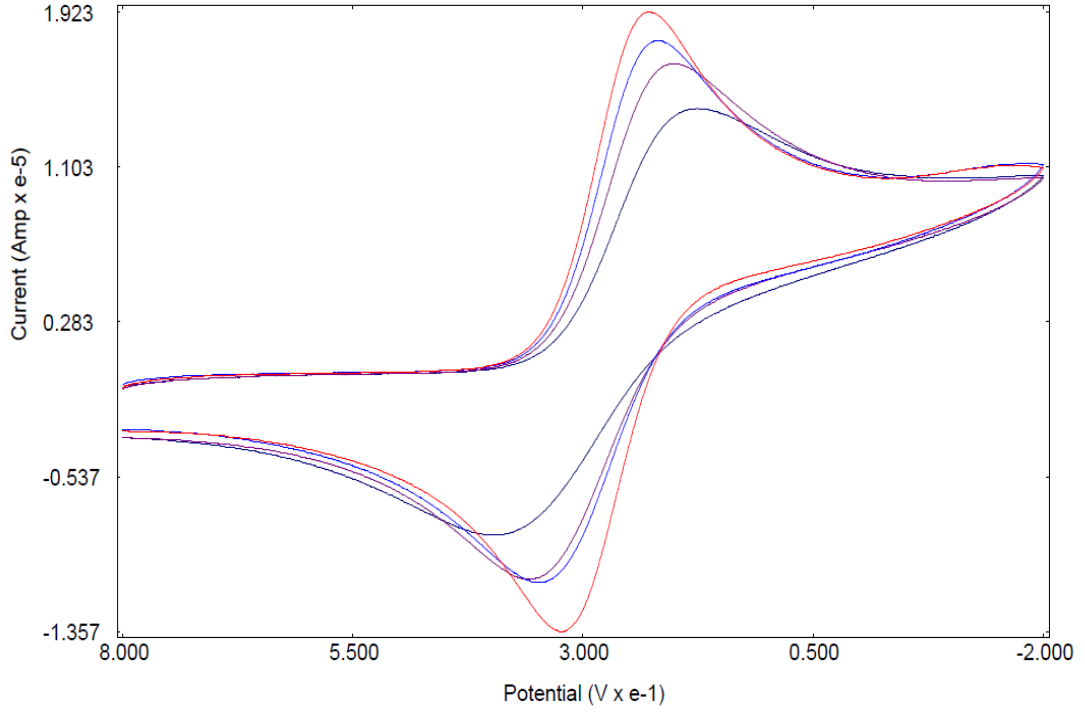
4.BULGULAR

Bu tez çalışmasında oksalat molekülünün enzimatik reaksiyonu sonucu oluşan H_2O_2 ölçümüne dayalı bir amperometrik oksalat sensörü hazırlanması amaçlanmıştır. Tez kapsamında yapılan çalışmaları voltametrik, spektrofotometrik ve biyosensörün hazırlanması ve karakterize edilmesi çalışmaları olmak üzere üç başlıkta ele almak mümkündür. Voltametrik çalışmaları; H_2O_2 'nin voltametrik davranışının incelenmesi, oksalik asitin H_2O_2 pikleri ile olası girişim etkisinin, voltametrik davranışının ve analizlenebilirliğinin incelenmesi olmak üzere üç alt başlıkta incelemek mümkündür. Spektrofotometrik çalışmalarda ise oksalik asitin analizlenebilirliği incelenmiş ve voltametrik çalışmalara ek olarak sunulmuştur. Biyosensörün hazırlanması ve karakterize edilmesi çalışmaları ise elektrokimyasal polimerleşme ile immobilizasyon, çapraz bağlama ile immobilizasyon ve polimer matriks altına immobilizasyon çalışmaları olmak üzere üç alt başlıkta incelenebilir.



4.1. Voltametrik Çalışmalar

Voltametrik çalışmalar 10 ve 20 mL örnek hacimleri kullanılarak; referans elektrot, yardımcı elektrot ve çalışma elektrotunun birlikte bulunduğu üç elektrotlu hücre içerisinde gerçekleştirildi. Çevrimsel voltametri (CV) ve doğrusal taramalı voltametri (LSV) çalışmaları genellikle potansiyostat üzerinden okunan rest potansiyel (denge potansiyeli) değerinden başlatılmış ve yine aynı potansiyelde sonlandırılarak tek çevrim üzerinden tamamlanmıştır. Voltametrik çalışmalarda x eksenindeki potansiyel değerleri $Ag/AgCl/3M NaCl$ referans elektroda karşı verilmiş, voltamogram gösteriminde IUPAC gösterimleri benimsenmiştir. Çalışma elektrodu, referans elektrot ve çalışma sisteminin kontrolü, belli aralıklarda ve kuşkulanan durumlarda 6 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ içerisinde -200 ile +800 mV gerilim aralığında CV çalışması yapılarak karşılaştırma yapılmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. 6 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ içerisinde -200 ile +800 mV gerilim aralığında yapılan CV çalışması

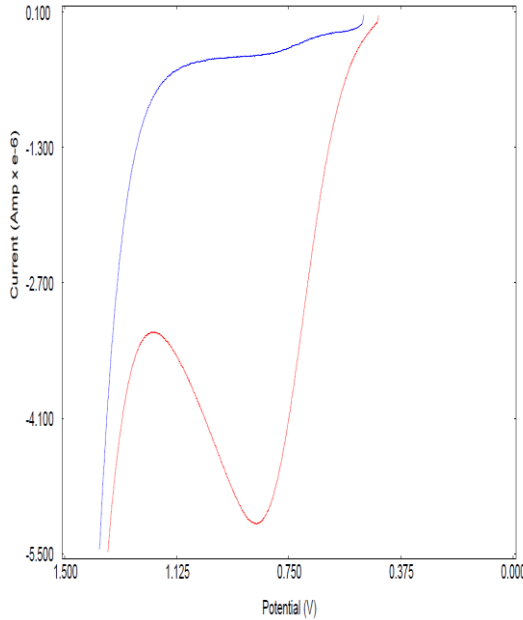
4.1.1. H_2O_2 ile yapılan çalışmalar

Hazırlanmak istenen sensörünün ölçüm ilkesi enzimatik reaksiyon sonucu oluşan H_2O_2 molekülünün çalışma elektrotu üzerinde indirgenmesi veya yükseltgenmesi ilkesine dayalı olduğundan, öncelikle çalışma ortamında H_2O_2 molekülünün elektrokimyasal olarak aktif olduğu çalışma bölgesi ve sınırlarını belirlemeye yönelik bir seri voltametik çalışma gerçekleştirilerek H_2O_2 'ye ait indirgenme ve yükseltgenme piklerinin optimizasyonu çalışmaları yapıldı. Bu çalışmalar kapsamında, platin elektrot (PtE) ve camsı karbon elektrot (GCE) olmak üzere iki tip çalışma elektrotu ile farklı tampon çözeltiler ve pH değerlerinde, 1 mM, 2 mM ve 3 mM, 5 mM H_2O_2 içerisinde LSV ve CV çalışmaları yapıldı. H_2O_2 'nin elektrokimyasal olarak yükseltgenme ve indirgenme potansiyellerine pH ve çalışma elektrodunun cinsi, pik akımlarının derişimle değışimleri incelenmeye çalışıldı.

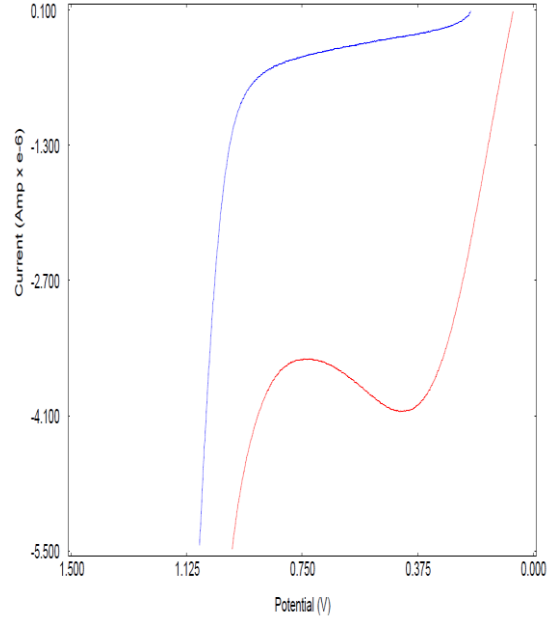
4.1.1.1. H₂O₂ için PtE ile yapılan çalışmalar

Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan H₂O₂'nin duyarlılığının pH'ye olan bağımlılığını belirlemek amacıyla geniş bir çalışma aralığı sunan Britton–Robinson tamponu (BRT) ile pH 2–10 ve fosfat tamponu ile pH 2–9 (FT) aralığında hem anodik hem de katodik bölgelerde LSV çalışmaları yapıldı. Yapılan çalışmalar argon atmosferi altında tekrarlanarak çözünmüş oksijenin uzaklaştırılmasının pik potansiyelleri ve pik akımları üzerindeki etkisi incelendi.

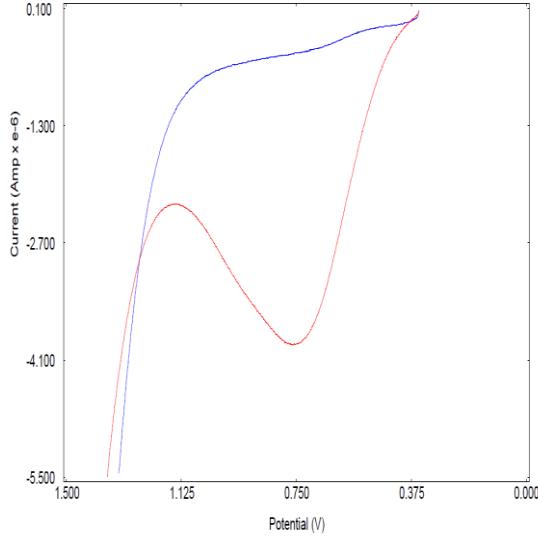
H₂O₂ için anodik bölgede LSV tekniği ile elde edilen voltamogramlar incelendiğinde (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5), H₂O₂'ye ait +360 ve +925 mV potansiyel değerleri arasında değişen, tampon çözelti ile elde edilen zemin eğrisinde bulunmayan, yalnızca H₂O₂ eklemeleri sonucu ortaya çıkan bir pik gözlemlendi. Bu pikin potansiyelinin ve pik akım büyüklüğünün çalışılan tampon çözeltinin pH'sine bağlı olduğu görüldü. H₂O₂ için BRT ve FT ile yapılan anodik bölgedeki LSV çalışmalarında en iyi duyarlılık pH 3 BRT içerisinde elde edildi (Şekil 4.2). H₂O₂ için anodik bölgede en iyi duyarlılığın elde edildiği bu çalışma koşullarında bir enzimatik sensör hazırlanabileceği öngörüldü.



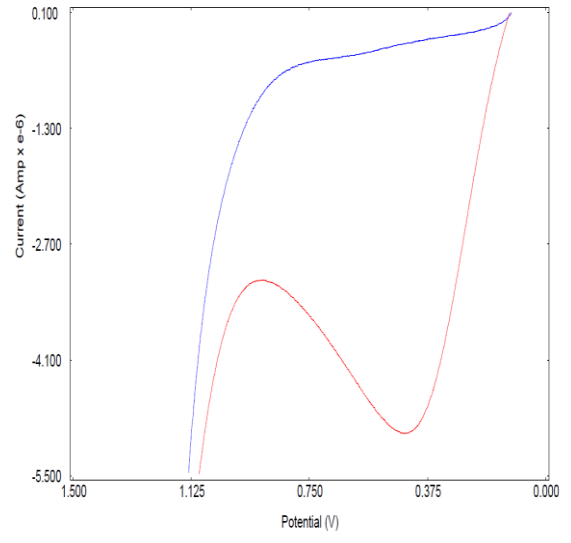
Şekil 4.2. PtE ile pH 3 BRT'de 1 mM H₂O₂'ye ait anodik bölgedeki LSV'ler, **1 mM H₂O₂** ve **zemine ait** LSV'ler



Şekil 4.3. PtE ile pH 10 BRT'de 1 mM H₂O₂'ye ait anodik bölgedeki LSV'ler, **1 mM H₂O₂** ve **zemine ait** LSV'ler

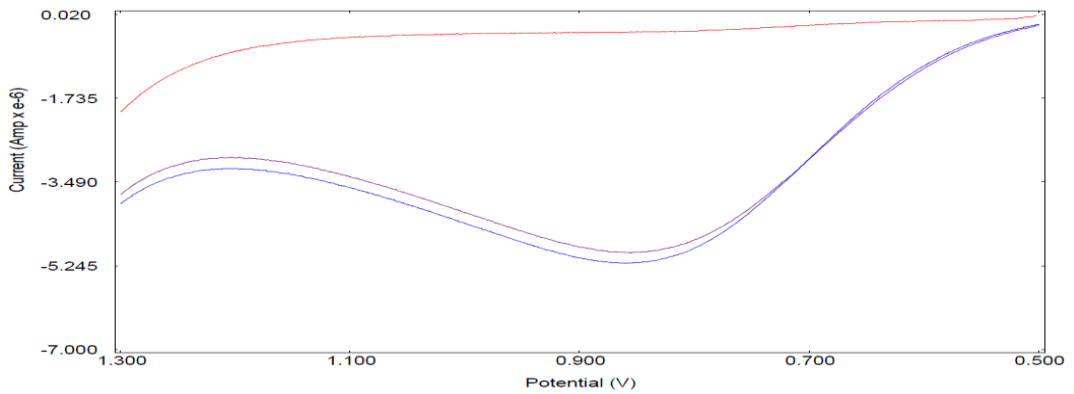


Şekil 4.4. PtE ile pH 4,5 FT'de 1 mM H_2O_2 'ye ait anodik bölgedeki LSV'ler, **1 mM H_2O_2** ve **zemine ait** LSV'ler



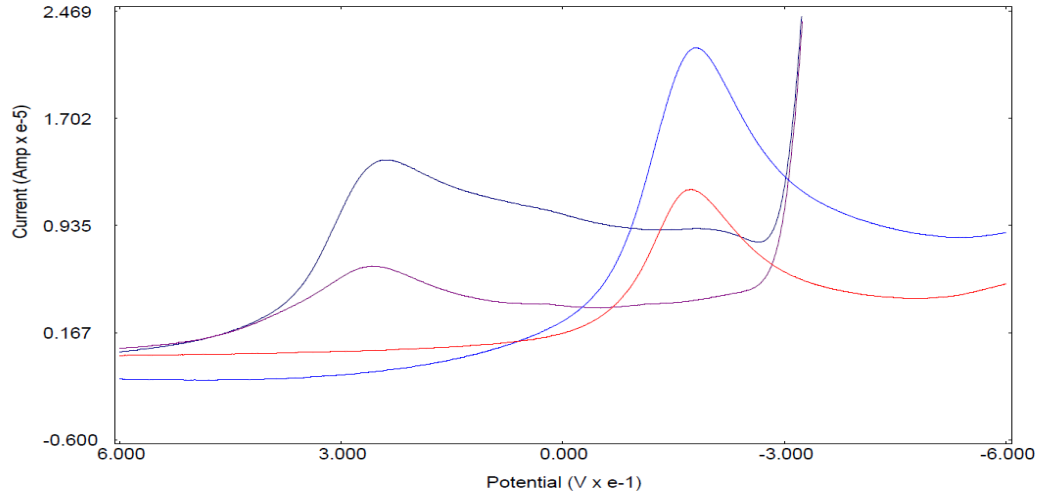
Şekil 4.5. PtE ile pH 9,5 FT'de 1 mM H_2O_2 'ye ait anodik bölgedeki LSV'ler, **1 mM H_2O_2** ve **zemine ait** LSV'ler

Anodik bölgede H_2O_2 için en iyi duyarlılığın elde edildiği koşullar belirlendikten sonra çözülmüş oksijen giderme işleminin H_2O_2 pikleri üzerinde olumlu bir etkisinin olup olmadığı incelendi. Şekil 4.6'da, pH 3 BRT çözeltisinde oksijen giderme işlemi yapılarak ve yapılmadan elde edilen doğrusal taramalı voltametri eğrileri (LSV) gösterilmiştir. LSV eğrileri incelendiğinde, çözülmüş oksijen giderme işleminin H_2O_2 yükseltgenme piki üzerinde herhangi bir iyileştirici etki yapmadığı görüldü. Bu nedenle ileriki çalışmalarda argon gazı ile çözülmüş oksijen giderme işlemi yapılmasına gerek duyulmadı.

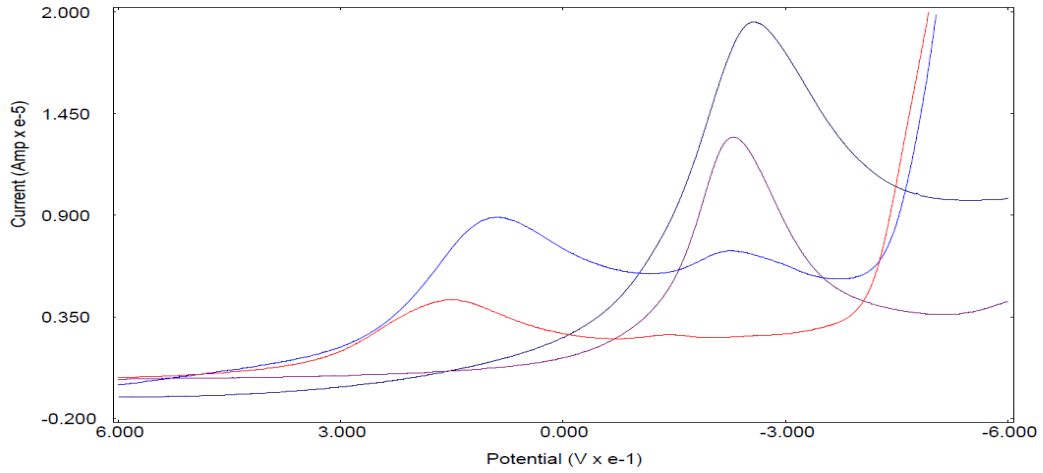


Şekil 4.6. 1 mM H_2O_2 içeren pH 3 BRT içerisinde PtE ile çözülmüş oksijen gideriminin LSV pikleri üzerine etkisi, **çözülmüş oksijen giderme işlemi yapılarak** ve **oksijen giderme işlemi yapılmadan, zemine ait** LSV'ler

H₂O₂'nin anodik bölgedeki elektrokimyasal davranışı belirlendikten sonra, H₂O₂ için LSV ile katodik bölgede potansiyel tarama çalışmaları yapıldı. Bu çalışmalara ait LSV voltamogramları Şekil 4.7'de ve Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. PtE ile BRT içerisinde 1 mM H₂O₂'ye ait katodik bölgedeki LSV'ler, pH 10; **zemin**e ve 1 mM H₂O₂'ye ait, pH 2; **zemin**e ve 1 mM H₂O₂'ye ait LSV'ler

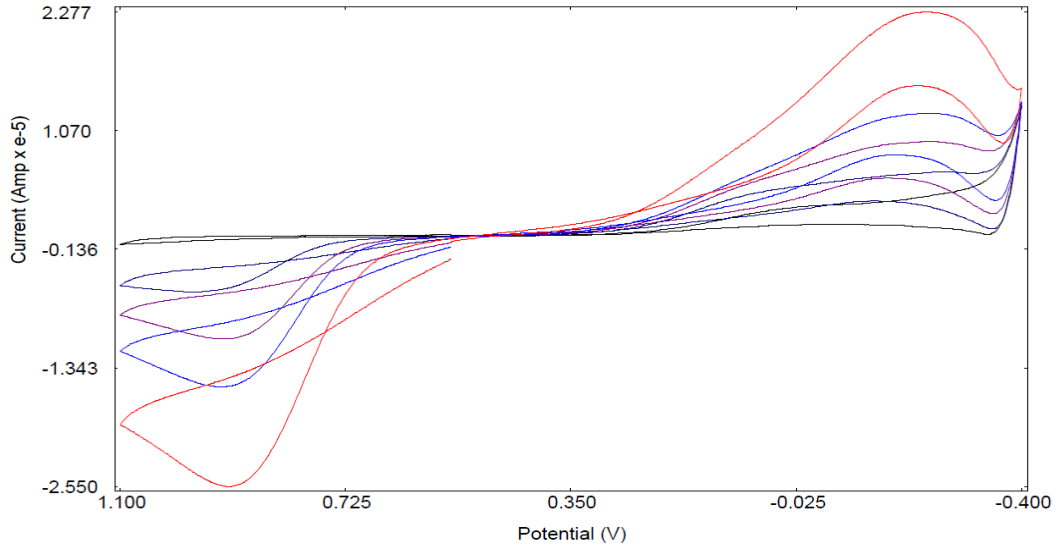


Şekil 4.8. PtE ile FT içerisinde 1 mM H₂O₂'ye ait katodik bölgedeki LSV'ler, pH 2.5; **zemin**e ve 1 mM H₂O₂'ye ait, pH 9.5; **zemin**e ve 1 mM H₂O₂'ye ait LSV'ler

Katodik bölgedeki potansiyel taramaları sonucu elde edilen Şekil 4.7'deki ve Şekil 4.8'deki LSV voltamogramları incelendiğinde, zeminde var olan bir pikin H₂O₂ eklenmesi ile arttığı gözlemlendi. Katodik bölgede zeminde var olan bu pikin, çözeltinin bileşimi ve pH'sine bağımlı olarak, pH'nin 2'den 10'a çıkarılması ile +280 mV

potansiyelden -240 mV potansiyele kadar kaydığı gözlemlendi. Katodik bölgede yapılan çalışmalarda elde edilen indirgenme piklerinin, anodik bölgedeki yükseltgenme piklerinden daha büyük olduğu belirlendi. Ancak katodik bölgede elde edilen pikin zeminde var olup H_2O_2 eklemeleri ile büyüyen bir pik olması ve zeminde var olan pikin tekrarlanırlılığının çok iyi olmaması nedeniyle, ayrıca katodik potansiyelerde O_2 uzaklaştırması gerekebileceği, bu işlemin ise uçucu H_2O_2 bileşiminin eksilmesine neden olabileceği gibi çekincelerle, katodik bölgede çalışan bir oksalat sensörü yerine anodik bölgede H_2O_2 yükseltgenmesi esasıyla çalışan bir sensörün hazırlanmasının daha uygulanabilir olacağı öngörüldü.

PtE ile yapılan çalışmalarda en duyarlı çalışma koşulu olan pH 3 BRT’de anodik bölgede artan derişim ile H_2O_2 piklerinin nasıl değiştini belirlemek amacıyla CV çalışması yapıldı. Şekil 4.9’da PtE ile H_2O_2 için en iyi duyarlılığın elde edildiği pH 3 BRT çözeltisi içerisindeki CV voltamogramları gösterilmiştir. Elde edilen eğriler incelendiğinde, anodik bölgede +925 mV potansiyel değerinde zeminde var olmayıp H_2O_2 eklenmesiyle oluşan ve artan H_2O_2 derişimi ile düzenli şekilde büyüyen bir yükseltgenme piki gözlemlendi.

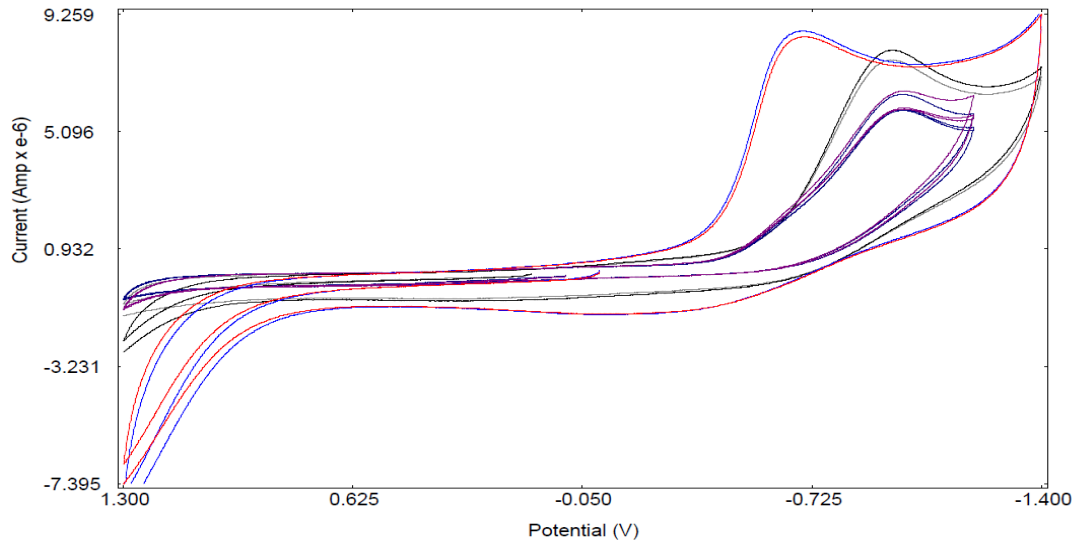


Şekil 4.9. pH 3 BRT içerisinde 1, 2, 3, 5 mM H_2O_2 için PtE ile elde edilen CV’ler, zemine ait, **1 mM**, **2 mM**, **3 mM**, **5 mM** H_2O_2 ’ye ait CV eğrileri

H₂O₂ için PtE ile yapılan çalışmaların ardından aynı çözelti koşullarında GCE ile H₂O₂'ye ait akım değişimlerinin gözlenip gözlenemeyeceği araştırıldı.

4.1.1.2. H₂O₂ için GCE ile yapılan çalışmalar

GCE ile H₂O₂'nin elektrokimyasal davranışını ve en duyarlı olduğu koşulları belirlemek amacıyla geniş bir pH bölgesinde (pH 3 ile pH 9) BRT ile CV çalışmaları yapıldı.



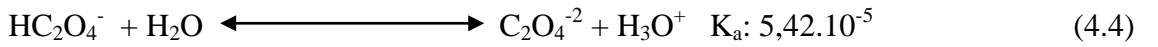
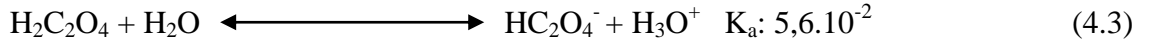
Şekil 4.10. GCE ile farklı pH'lerde H₂O₂ için elde edilen CV'ler, pH 3; **zemine ait, 1 mM H₂O₂'ye ait**, pH 6; **zemine ait, 1 mM H₂O₂'ye ait**, pH 9; **zemine ait, 1 mM H₂O₂'ye ait** CV'ler

GCE ile farklı pH'lerde H₂O₂ varlığında elde edilen eğriler (Şekil 4.10) incelendiğinde, zemin eğrilerinde pH'ye bağımlı olarak -730 ile -990 mV potansiyelleri arasında ortaya çıkan katodik akım bölgelerinin H₂O₂ eklenmesinden sonra da değişmediği, dolayısıyla GCE ile H₂O₂'ye karşı duyarlılık elde edilemeyeceği görüldü.

H₂O₂ tayini için farklı elektrolit ve çalışma elektrotlarıyla LSV ve CV yöntemleri ile yapılan optimizasyon çalışmalarında H₂O₂'ye ait en duyarlı ve kullanışlı pikler, PtE ile anodik bölgede pH 3 BRT içerisinde elde edildi ve bu koşullarda bir enzim sensörü hazırlanabileceği öngörüldü. Ancak olası oksalik asit girişimi incelenmeden enzimatik sensörün çalışma pH'si direk bu pH olarak benimsenmedi.

4.1.2. Oksalik asit ile yapılan çalışmalar

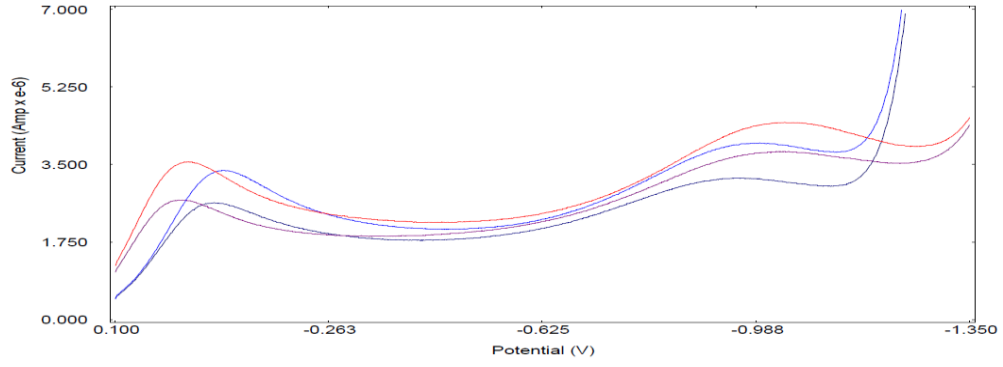
Zayıf bir asit olan oksalik asit sulu çözeltilerinde, oksalik asit/bioksalat/oksalat dengesini oluşturmaktadır (4.3, 4.4). Oluşan oksalat, oksalat oksidaz enzimi ile parçalanarak H₂O₂ oluşumuna neden olmaktadır. H₂O₂'nin çalışma elektrotunun yüzeyindeki elektrokimyasal reaksiyonu sonucu oksalat miktarı tayin edilebilmektedir.



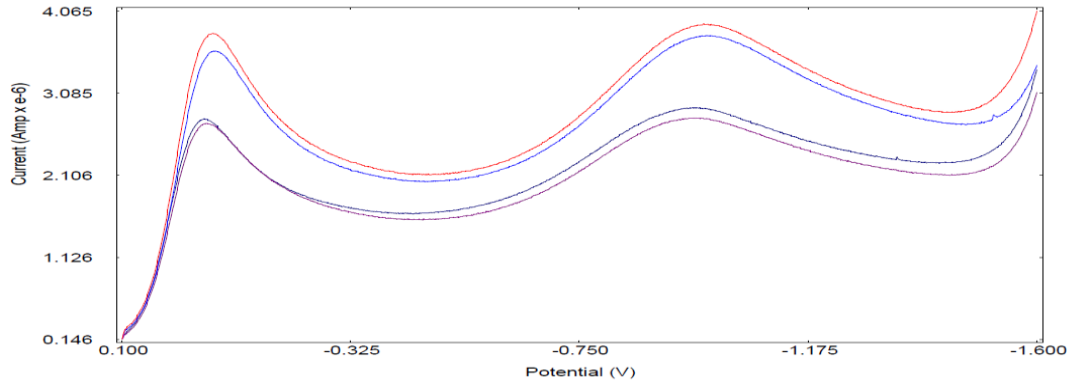
Buradaki temel endişe, oksalik asit–oksalat dengesi sonucu sulu çözeltide dengedeki oksalat türlerinin, H₂O₂ yükseltgenme piki ile girişim yapıp yapmadığıdır. Bu amaçla geniş bir pH aralığında ve farklı çalışma elektrotları kullanılarak oksalik asitin elektrokimyasal davranışı incelenmiştir. Bu amaçla çalışmalarda, oksalik asitin yükseltgenme ve indirgenme davranışını incelemek için farklı pH'lerdeki BRT çözeltileri ile PtE ve Civa Damla Elektrot (HDME) çalışma elektrotları denenmiştir.

4.1.2.1. Oksalik asit için HDME ile yapılan çalışmalar

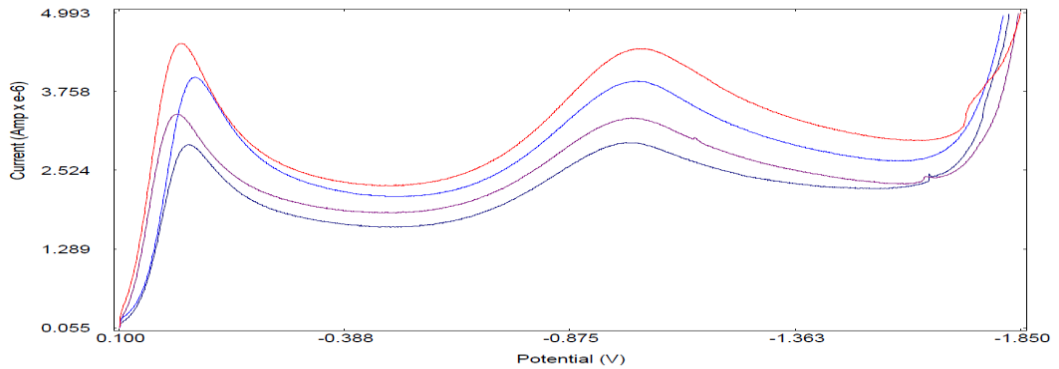
Platin elektrot ile incelenme imkanının bulunmadığı geniş katodik potansiyel bölgelerinde (-500 ile -2000 mV), HDME ile pH 3, pH 6 ve pH 9 BRT içerisinde 25 mM, 50 mM ve 100 mM oksalik asit içeren çözeltilerde, 50 mV/s ve 100 mV/s tarama hızları ile LSV tekniği kullanılarak oksalik asitin katodik bölgedeki elektro aktifliği incelendi. Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13; pH 3, pH 6 ve pH 9 BRT'de 100 mM oksalik aside ait LSV eğrilerini göstermektedir.



Şekil 4.11. pH 3 BRT içerisinde HDME ile oksalik asit için katodik bölgede elde edilen LSV'ler, 100 mV/s tarama hızında; **zemine ait, 100 mM oksalik asite ait**, 50 mV/s tarama hızında; **zemine ait, 100 mM oksalik asite ait** LSV'ler



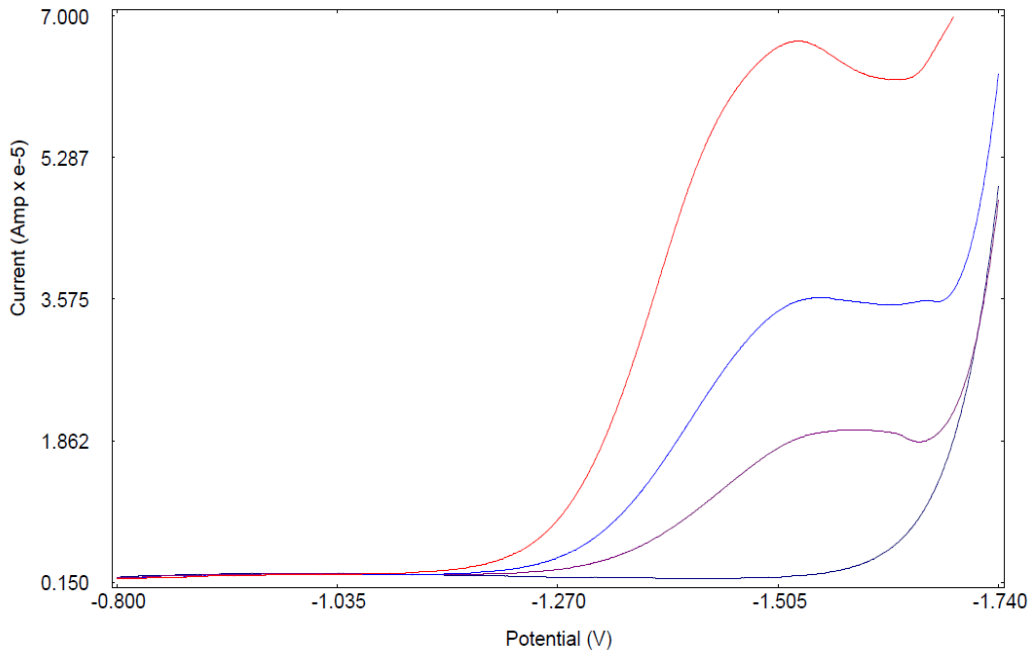
Şekil 4.12 pH 6 BRT içerisinde HDME ile oksalik asit için katodik bölgede elde edilen LSV'ler, 100 mV/s tarama hızında; **zemine ait, 100 mM oksalik asite ait**, 50 mV/s tarama hızında; **zemine ait, 100 mM oksalik asite ait** LSV'ler



Şekil 4.13. pH 9 BRT içerisinde HDME ile oksalik asit için katodik bölgede elde edilen LSV'ler, 100 mV/s tarama hızında; **zemine ait, 100 mM oksalik asite ait**, 50 mV/s tarama hızında; **zemine ait, 100 mM oksalik asite ait** LSV'ler

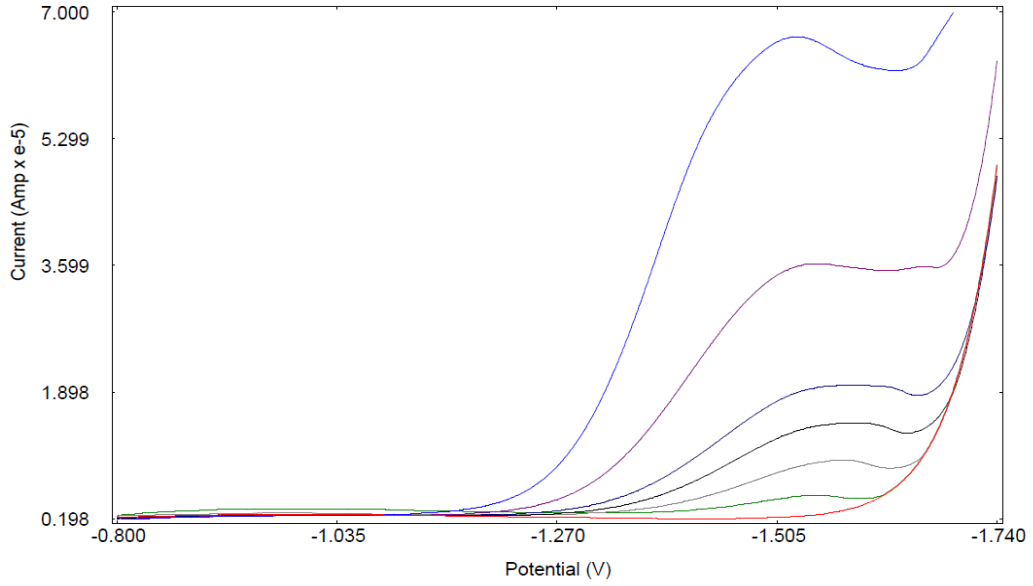
Yapılan LSV çalışmalarından elde edilen eğriler incelendiğinde (Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13), çözeltilerde 100 mM oksalik asidin bulunduğu koşullarda bile BRT’de pH 3 ile pH 9 arasında oksalik asidin indirgenmesine ait bir pik gözlenmedi.

BRT’de pH 3 ile pH 9 arasında yapılan çalışmaların ardından, nötral koşullarda (0,2 M KNO_3) oksalik asidin LSV ve DPV teknikleri kullanılarak elektro aktif olup olmadığı incelendi. KNO_3 içerisinde LSV ve DPV teknikleri kullanılarak 1 mM, 2 mM ve 4 mM oksalik asit ile yapılan çalışmalarda, katodik bölgede -1520 mV potansiyelde, zeminde var olmayıp oksalik asit eklemeleri sonucu oluşan, bir indirgenme piki oluştuğu ve oluşan pikin artan oksalik asit derişimi ile düzenli bir şekilde büyüdüğü gözlemlendi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. 0,2 M KNO_3 içerisinde HDME ile oksalik asit için katodik bölgede elde edilen LSV’ler, **zeminde** ait, **1 mM**, **2 mM**, **4 mM** oksalik asite ait LSV’ler

Oksalik asitin 0,2 M KNO_3 içerisinde -1520 mV potansiyelde indirgenme piki gözlemlendikten sonra oksalik asitin bu koşullarda gözlenebileceği minimum derişim değeri, yapılan DPV çalışmaları ile belirlendi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. 0,2 M KNO₃ içerisinde HDME ile oksalik asit için katodik bölgede elde edilen DPV'ler, **zemine ait, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,7 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM** oksalik asite ait DPV eğrileri

Şekil 4.15'deki DPV eğrileri incelendiğinde, LSV çalışmalarına benzer şekilde, katodik bölgede -1520 mV'ta yayvan olarak büyüyen bir indirgenme piki elde edildiği görülmektedir. Yapılan çalışmalarda KNO₃ içerisinde oksalik asite ait en küçük gözlenebilir pik akım değeri, 0,2 mM oksalik asit derişimi için belirlendi.

HDME ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen eğriler incelendiğinde, oksalik asitin sadece nötral koşullarda indirgenme eğilimi gösterdiği ve artan derişim değeri ile oksalik asitin katodik bölgedeki indirgenme pikinin düzenli olarak büyüdüğü belirlendi. Diğer pH değerlerinde (pH 3, pH 6, pH 9) ise oksalik asitin indirgenmediği belirlendi.

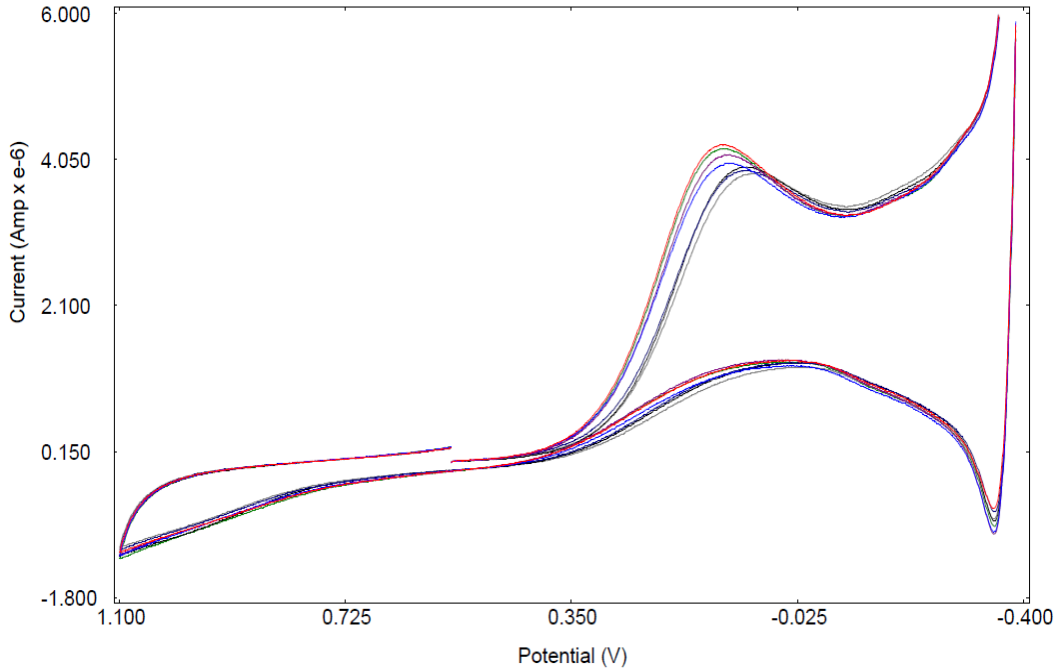
4.1.2.2. Oksalik asit için PtE ile yapılan çalışmalar

PtE ile oksalik asitin anodik bölgedeki elektro aktifliğini ve H₂O₂ pikleri ile girişimini incelemek amacıyla hem tamponlanmamış oksalik asit çözeltileri hem de oksalik asit eklemeleri sonucu pH değişiminden kuşkulandırdığı için tamponlu oksalik asit çözeltileri ile çalışmalar yapıldı.

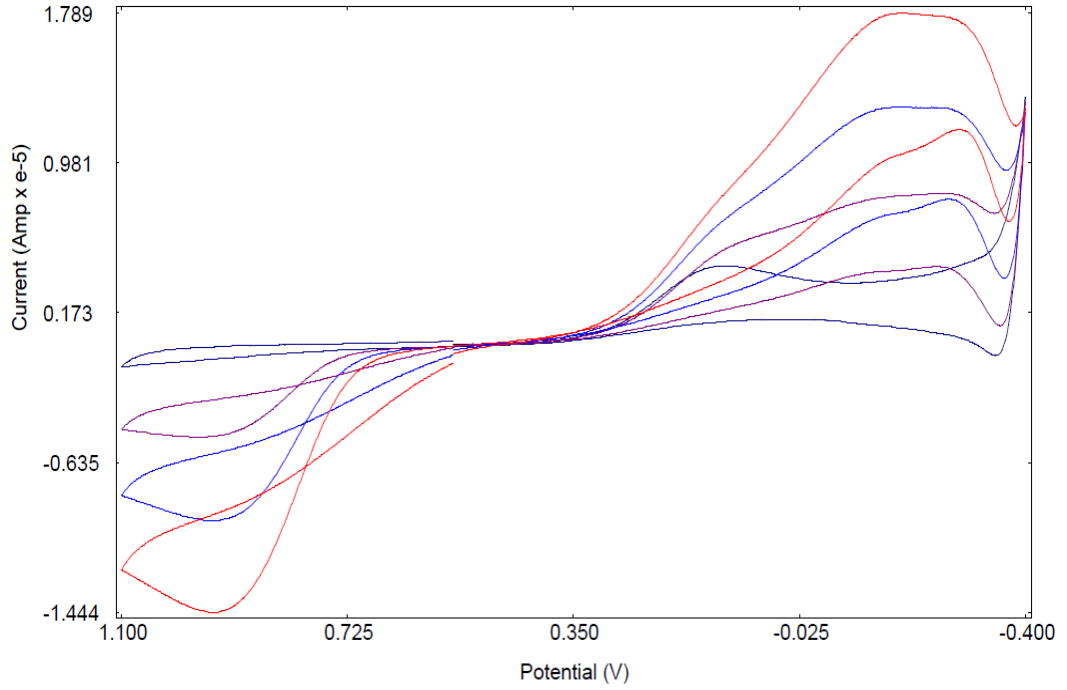
a-) Tamponlanmamış oksalik asit ile yapılan çalışmalar

Tamponlanmamış oksalik asit ile ilgili çalışmalar hem μM hem de mM düzeyde oksalik asit içeren çözeltilerde oksalik asitin elektro aktifliğinin ve H_2O_2 ile olan girişiminin incelenmesine dayanmaktadır. Bu nedenle, öncelikle H_2O_2 için en iyi piklerin elde edildiği pH 3 BRT’de CV ve Time–Base (sabit potansiyelde akımın zamanla değişimi) teknikleri kullanılarak çalışmalar yapıldı.

Şekil 4.16’da elde edilen CV eğrileri incelendiğinde, pH 3 BRT’de μM derişim düzeylerindeki oksalik asit çözeltileri için herhangi bir pik oluşumu gözlenmemiş, oluşan eğrilerin zemin eğrisi ile birebir örtüştüğü gözlenmiştir. Bu nedenle, oksalik asitin μM derişim düzeylerinde pH 3 BRT’de elektro aktif davranmadığına karar verilmiş, ancak yine de H_2O_2 ile girişim yapıp yapmadığı CV ve Time–Base çalışmaları ile incelenmiştir.



Şekil 4.16. PtE ile pH 3 BRT içerisinde μM derişim düzeyindeki oksalik asite ait CV’ler, **zemine ait**, **5 μM** , **10 μM** , **20 μM** , **30 μM** , **40 μM** , **50 μM** oksalik asite ait CV eğrileri

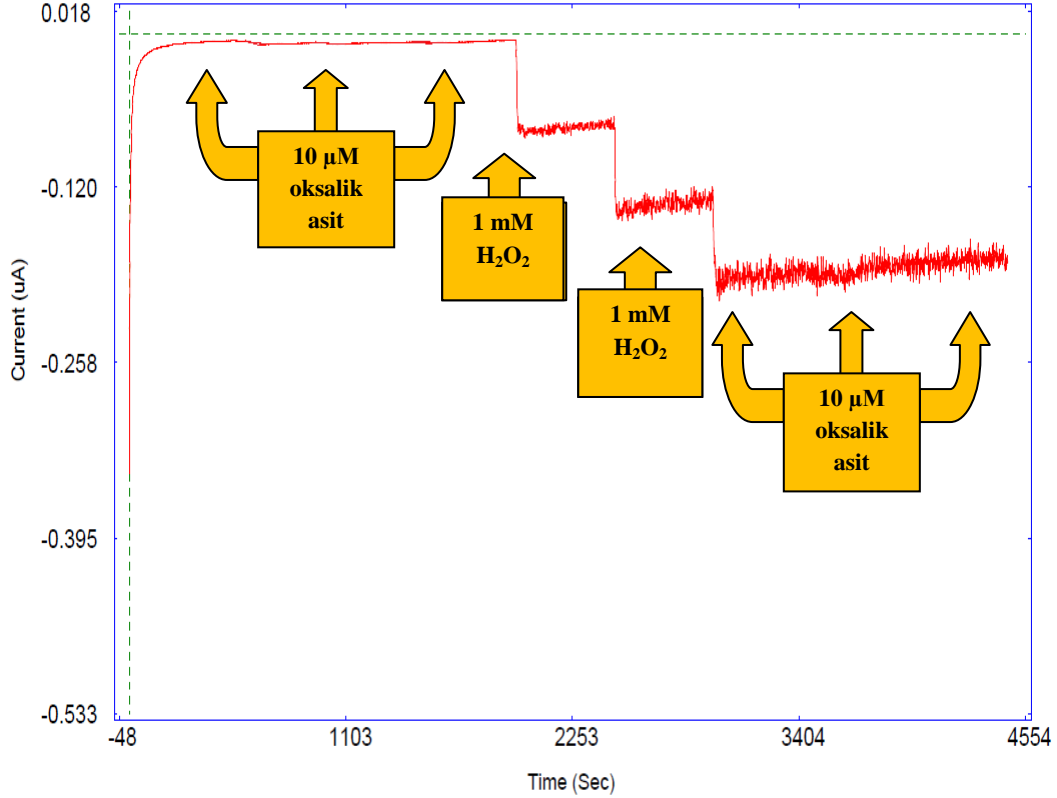


Şekil 4.17. PtE ile 50 µM oksalik asit içeren pH 3 BRT içerisinde farklı derişimdeki H₂O₂'ye ait CV'ler, **zemine ait, 1 mM, 2 mM, 3 mM** H₂O₂'ye ait CV eğrileri

Şekil 4.17'deki CV eğrileri incelendiğinde, zemin elektrolitinde var olan 50 µM oksalik asite ait herhangi bir pik oluşumu gözlenmedi. Daha sonra seri eklemeler yapılarak ölçümleri alınan 1 mM, 2 mM ve 3 mM H₂O₂ için, daha önce de +925 mV potansiyel değerinde gözlenen anodik bölgedeki yükseltgenme pikinin, derişimin artmasıyla düzenli bir şekilde arttığı belirlendi. Sonuç olarak, oksalik asidin H₂O₂ piki ile girişim veya herhangi bir bozucu etki yapmadığı gözlemlendi.

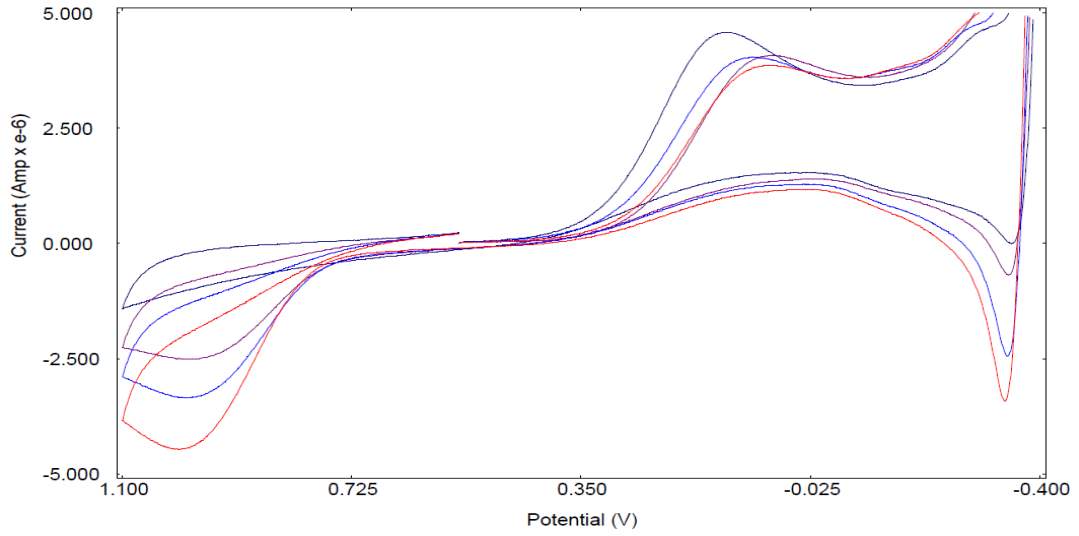
Yapılan Time–Base çalışmasında (Şekil 4.18), pH 3 BRT'de H₂O₂'ye ait anodik bölgedeki yükseltgenme pik potansiyeli +925 mV olduğundan, çalışma hücrelerine uygulanan potansiyel değeri de +925 mV olarak benimsendi. Yapılan çalışmada, sabit potansiyelde akımın zamanla değişimi incelenirken, ilk 500 sn de çözeltinin başlangıç akımının dengelenmesi beklendi. Daha sonra 500 s'lik periyotlar ile art arda üç defa 10'ar µM oksalik asit eklendi, ardından 500 s'lik periyotlarla art arda iki kez 1'er mM H₂O₂ ve son olarak yine 500 s'lik periyotlar ile üç defa 10'ar µM oksalik asit eklenerek sabit potansiyelde akımın zamanla değişimi gözlemlendi. Şekil 4.18'de elde edilen Time–Base grafiği incelendiğinde, pH 3 BRT'de, µM derişim düzeyindeki oksalik

asitin, H_2O_2 'nin yükseltgendiği potansiyel değeri olan +925 mV potansiyel değerinde, yükseltgendiğini gösteren bir basamak oluşumu (akım artışı) gözlenmezken, mM derişim düzeylerindeki H_2O_2 eklemeleri ile H_2O_2 'nin yükseltgendiğini gösteren basamak oluşumu gözlemlendi. Sonuç olarak, μM derişim düzeyindeki oksalik asitin mM derişim düzeyindeki H_2O_2 'ye bir girişim etkisinin olmadığı belirlendi.



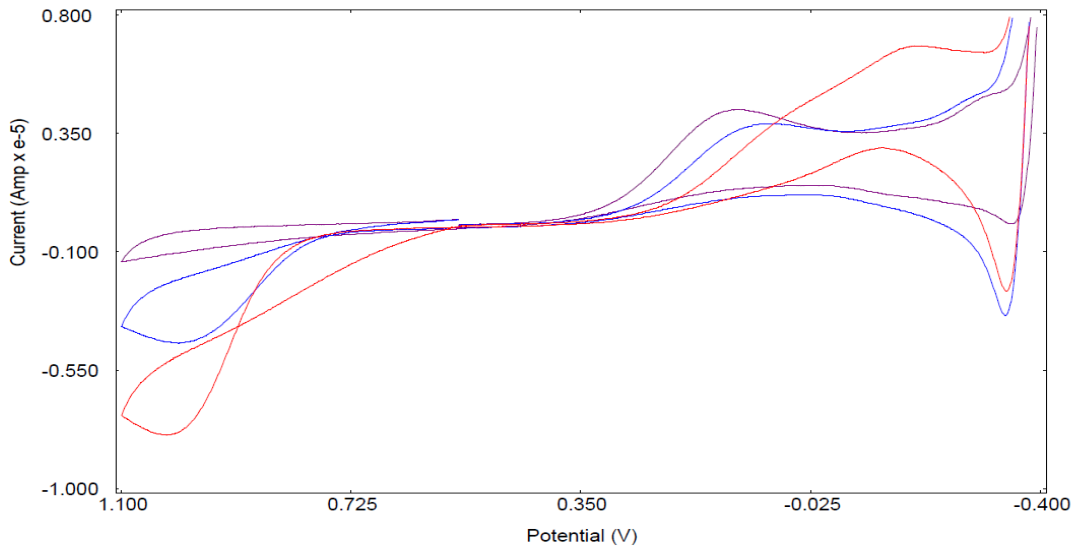
Şekil 4.18. PtE ile μM derişim düzeyindeki oksalik asit ve mM derişim düzeyindeki H_2O_2 'ye ait Time–Base grafiği, $E_{uyg} : +925$ mV

μM derişimli oksalik asitin çözeltide var oluşunun H_2O_2 pikleri üzerine herhangi bir bozucu etkisinin olmadığı belirlendikten sonra, H_2O_2 için en duyarlı akım yanıtlarının elde edildiği pH 3 BRT'de, mM düzeyde oksalik asit içeren ve mM düzeyde hem oksalik asit hem de H_2O_2 içeren çözeltilerle, oksalik asitin H_2O_2 pikleri üzerine girişim etkisi yapılan CV çalışmaları ile incelendi. Şekil 4.19, pH 3 BRT'de mM derişim düzeyindeki oksalik asit çözeltilerine ait CV eğrilerini göstermektedir.



Şekil 4.19. PtE ile pH 3 BRT içerisinde farklı derişimlerdeki oksalik asite ait CV'ler, **zemine ait, 1 mM, 2 mM, 3 mM** oksalik asite ait CV eğrileri

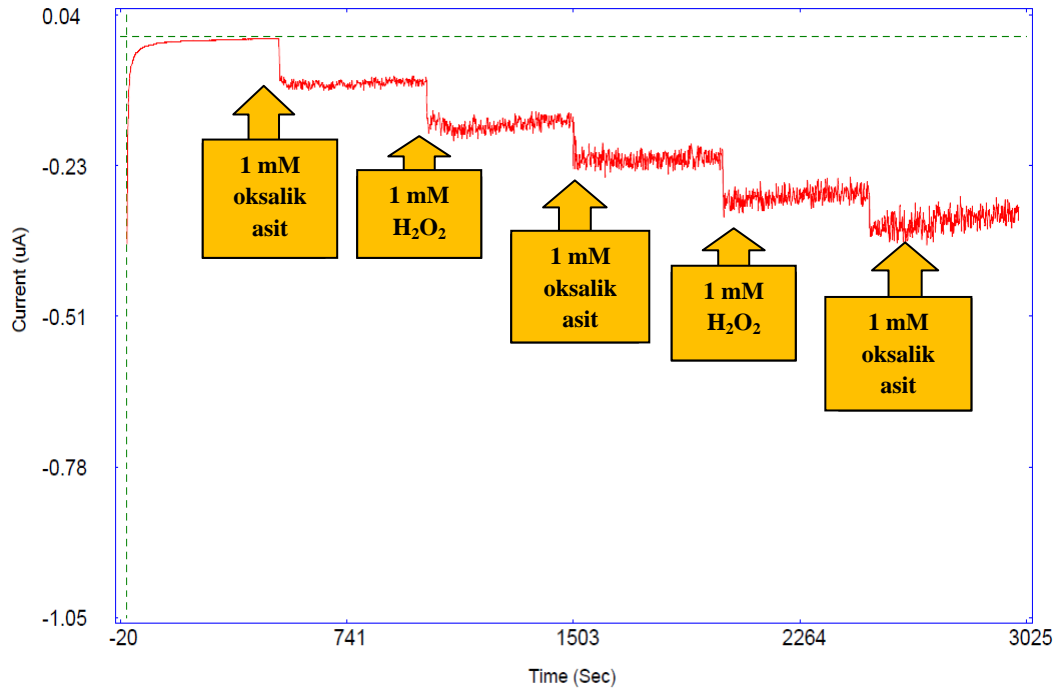
Şekil 4.19 incelendiğinde, mM düzeylerdeki oksalik asitin pH 3 BRT içerisinde, katodik bölgede herhangi bir pik oluşumu gözlenmezken anodik bölgede ise H_2O_2 'nin yükseltgendiği potansiyel değeri olan +925 mV potansiyel değerinde artan derişimle birlikte düzenli olarak büyüyen bir yükseltgenme piki oluşturduğu gözlemlendi. Bunun üzerine yapılan CV çalışmasında oksalik asit ile H_2O_2 piklerinin girişimleri gözlenmeye çalışıldı.



Şekil 4.20. PtE ile pH 3 BRT içerisinde oksalik asit ve H_2O_2 'ye ait CV'ler, **zemine ait, 3 mM oksalik asite ait, 3 mM oksalik asit + 1 mM H_2O_2 ye ait** CV eğrileri

Şekil 4.20 incelendiğinde, bu iki maddeye ait anodik bölgedeki yükseltgenme piklerinin +925 mV potansiyel değerinde girişim yaptıkları gözlemlendi.

H₂O₂'nin ve oksalik asitin piklerinin girişim etkileri, yapılan Time–Base çalışması ile de gösterilmeye çalışıldı (Şekil 4.21). Bu amaçla yapılan Time–Base çalışmasında, pH 3 BRT'de H₂O₂'ye ait anodik bölgedeki yükseltgenme pik potansiyeli +925 mV olduğundan, çalışma hücrelerine uygulanan potansiyel değeri de +925 mV olarak benimsendi. İlk 500 sn akımın dengelenmesi beklenildikten sonra 500 s'lik periyotlarla üç defa 1 mM oksalik asit, iki defa da 1 mM H₂O₂ eklenerek çalışma tamamlandı.



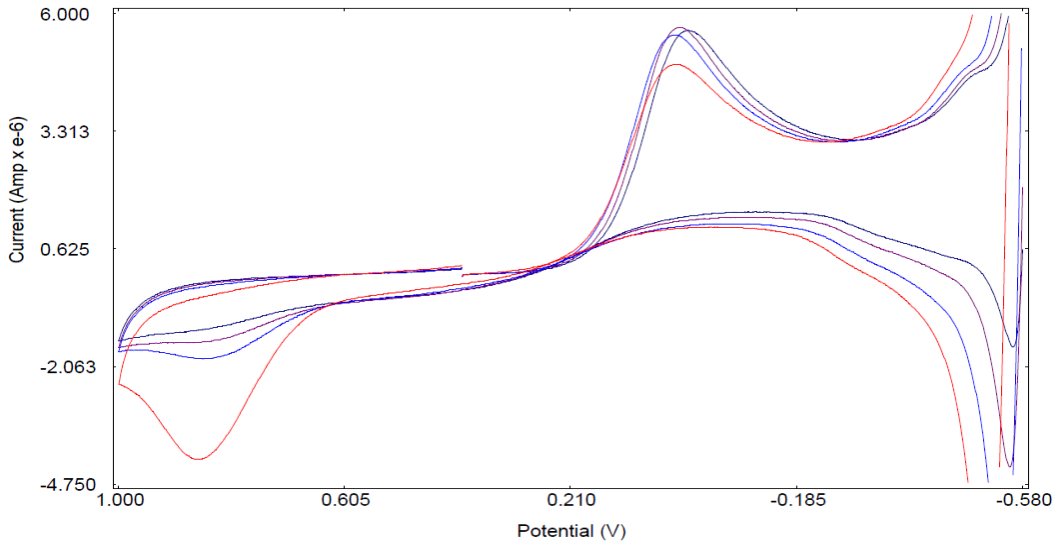
Şekil 4.21. PtE ile mM düzeydeki oksalik asit ve H₂O₂'ye ait Time–Base grafiği, E_{uyg}: + 925 mV

Şekil 4.21 incelendiğinde, pH 3 BRT'de +925 mV sabit potansiyelde hem oksalik asit hem de H₂O₂ eklemelerine karşı duyarlılık elde edildi.

Yapılan CV ve Time–Base çalışmaları sonucunda, H₂O₂ için uygunluğu belirlenmiş bu çalışma koşullarında µM derişim düzeylerinde oksalik asitin mM derişim düzeylerindeki H₂O₂ pikleri üzerine herhangi bir girişimi gözlenmezken, mM derişim

düzeylerindeki oksalik asit ile mM derişim düzeylerindeki H₂O₂'nin yükseltgenme piklerinin pH 3 BRT'de girişim yaptığı gözlendi. pH 3 BRT çalışma koşullarında hazırlanacak olan bir enzimatik sensör üzerinde hem H₂O₂ hem de oksalik asitin akım değişimine yol açacağı ve dolayısıyla ölçümlerin hatalı olabileceği düşünülerek bu koşullarda hazırlanacak bir enzimatik sensörün seçiciliğinin arttırılması, oksalik asit ve oksalat türlerinden etkilenmeyecek çalışma koşullarının belirlenmesi hedeflendi.

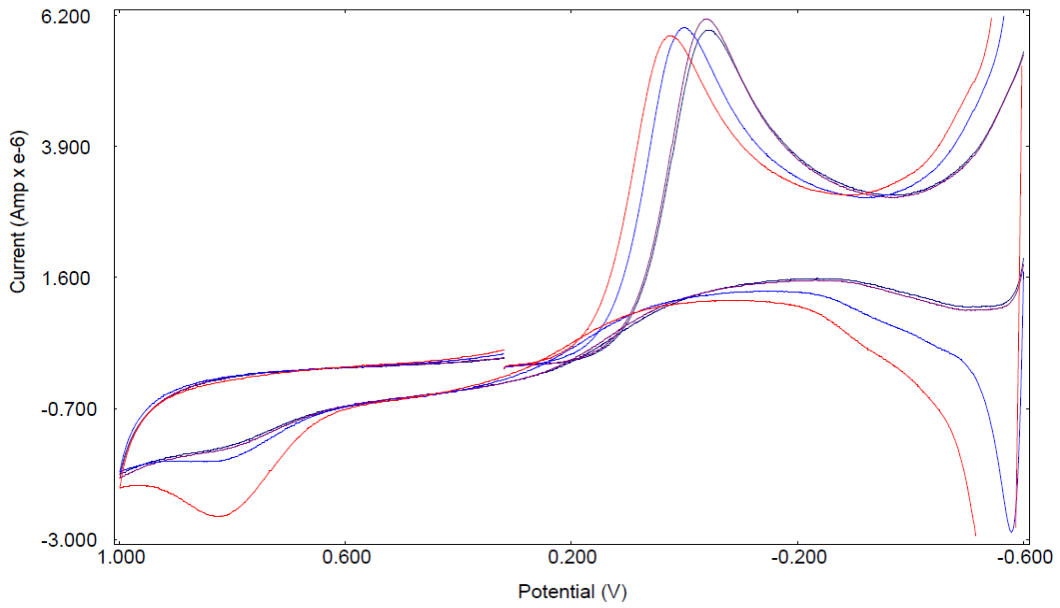
Elde edilen bu sonucun ardından, oksalik asitin PtE elektrot üzerinde duyarlılık göstermediği pH'yi belirlemek amacıyla CV tekniği kullanılarak pH tarama çalışmaları yapıldı. Tamponlanmamış oksalik asit çözeltileri PtE ile BRT çözeltilisinde pH 3 ile pH 9 arasında, H₂O₂ ile olan girişim etkilerini incelemek amacıyla 1 mM, 2 mM, 3 mM, 6 mM ve 10 mM oksalik asit çözeltileri ile CV çalışmaları yapıldı.



Şekil 4.22. PtE ile pH 6,5 BRT içerisinde farklı derişimlerdeki oksalik asite ait CV'ler, zemine ait, 3 mM, 6 mM, 10 mM oksalik asite ait CV eğrileri

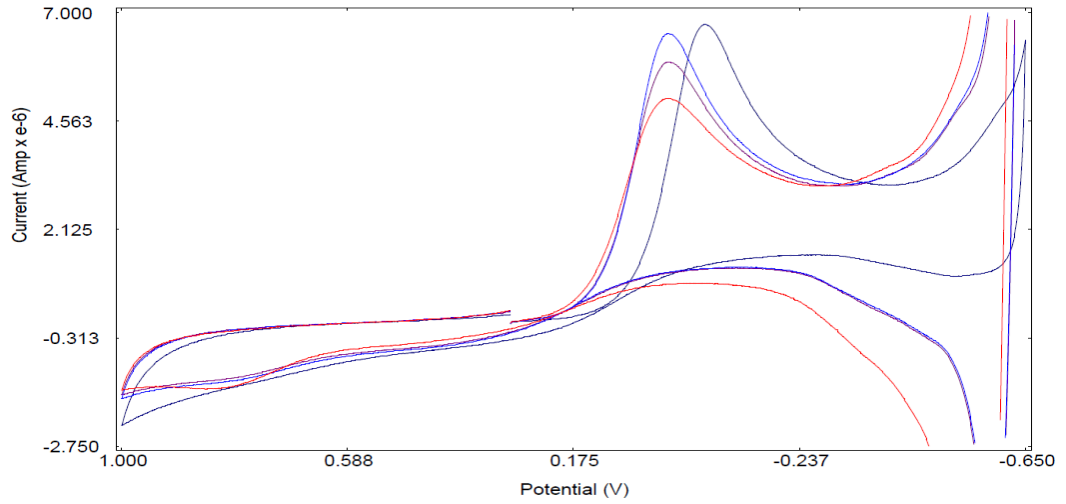
Şekil 4.19 ve Şekil 4.22 incelendiğinde, oksalik asit için her iki grafikte de katodik bölgede herhangi bir pik oluşumu gözlenmezken, anodik bölgede hem pH 3 hem de pH 6,5'te oksalik asite ait yükseltgenme pikleri gözlenmiştir. Bu pikler ve akım büyüklükleri incelendiğinde, pH 3'te +925 mV potansiyel değerinde olan oksalik asitin anodik bölgedeki yükseltgenme piki pH 6,5'e çıkarıldığında pik potansiyelinin +830 mV potansiyel değerine kaydığı görülmüştür. Ayrıca pH 3'te 3 mM oksalik asite karşı

elde edilen akım büyüklüğünün, pH 6,5'te neredeyse 10 mM oksalik asite karşılık geldiği gözlenmiştir. pH değerinin pH 3'ten pH 6,5'e çıkarılması sonucu oksalik asite ait anodik bölgedeki yükseltgenme piki potansiyelinin indirgen potansiyel bölgesine doğru bir miktar kaydığı ve artan pH değeriyle oksalik asitin duyarlılığının azaldığı belirlenmiştir. Elde edilen bu bilgiler doğrultusunda oksalik asidin duyarlılık göstermediği pH'yi belirlemek için nötral pH bölgesinde (Şekil 4.23) ve hafif bazik pH bölgesinde (Şekil 4.24) çalışmalar sürdürülmüştür.



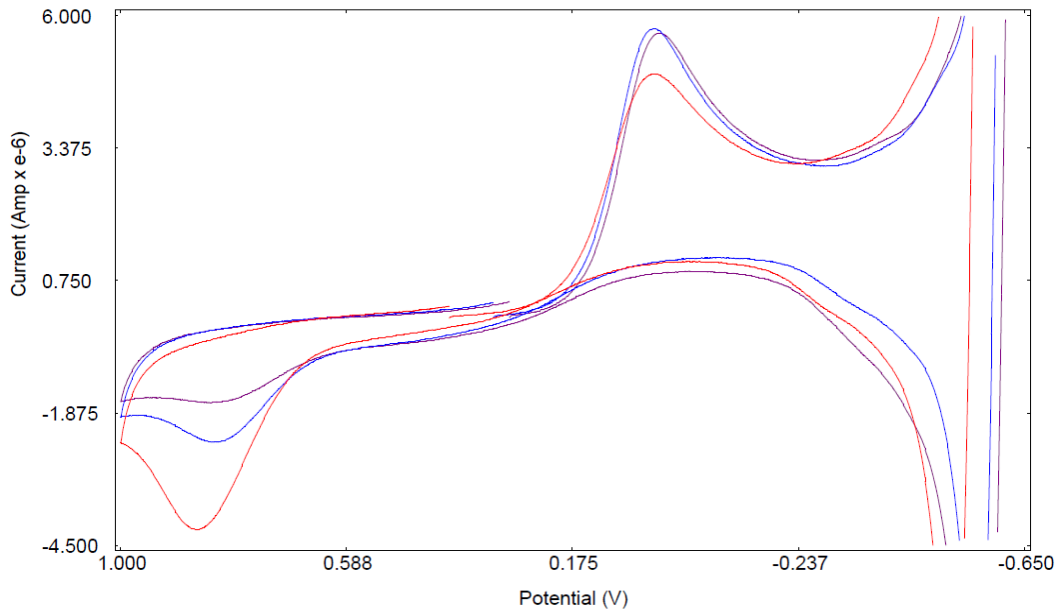
Şekil 4.23. PtE ile pH 7,6 BRT içerisinde farklı derişimlerdeki oksalik asite ait CV'ler, zemine ait, 3 mM, 6 mM, 10 mM oksalik asite ait CV eğrileri

Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'deki eğriler incelendiğinde, Şekil 4.19 ve Şekil 4.22'den elde edilen sonuçlara benzer şekilde, oksalik asitin pik potansiyelinde indirgen potansiyel bölgesine doğru bir miktar kayma ve artan pH ile duyarlılığında azalma gözlenmiştir. pH 6,5'te oksalik asitin anodik bölgedeki yükseltgenme pik potansiyeli +830 mV iken pH'nin pH 7,6'ya çıkarılmasıyla aynı pikin pik potansiyeli +800 mV'a kaymıştır. pH'nin 8,2'ye getirilmesi ise oksalik asitin PtE yüzeyindeki duyarlılığını tamamen kaybetmesine neden olmuş ve oksalik asite ait bir yükseltgenme piki gözlenmemiştir.



Şekil 4.24. PtE ile pH 8,2 BRT içerisinde farklı derişimlerdeki oksalik asite ait CV'ler, zemine ait, 3 mM, 6 mM, 10 mM oksalik asite ait CV eğrileri

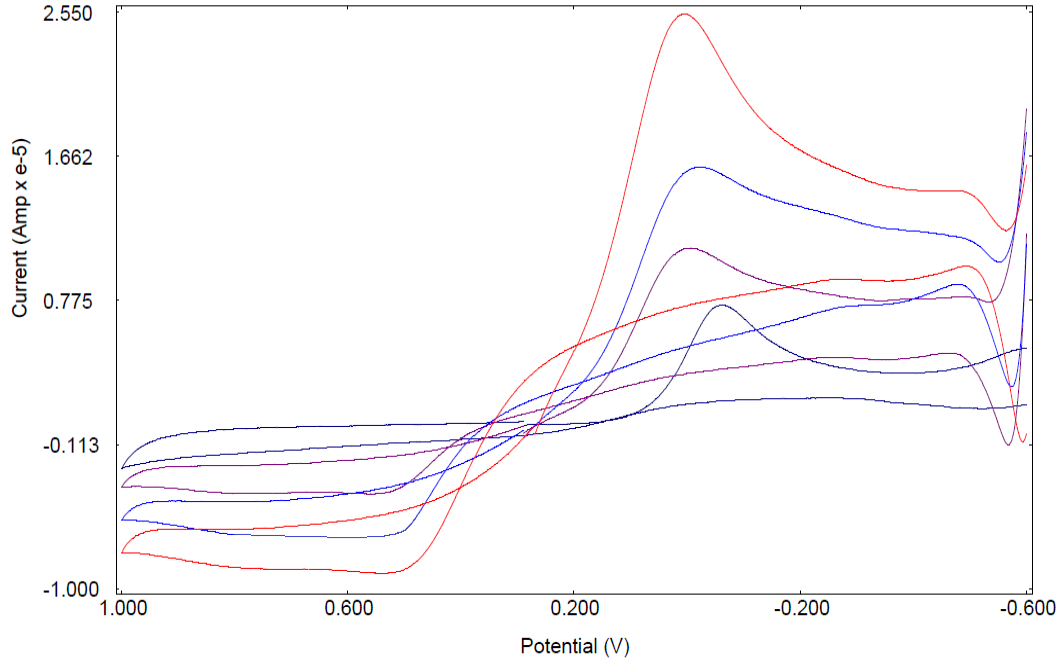
Şekil 4.25, 10'ar mM oksalik asit içeren pH 6,5, pH 7,6 ve pH 8,2 BRT'da oksalik asitin pik potansiyelinin ve duyarlılığının değişimini göstermektedir.



Şekil 4.25. PtE ile aynı derişime sahip farklı pH'lerdeki oksalik asit çözeltilerinden elde edilen CV'ler, pH 6,5; 10 mM oksalik asite ait, pH 7,6; 10 mM oksalik asite ait, pH 8,2; 10 mM oksalik asite ait CV eğrileri

Oksalik asitin duyarlılık göstermediği pH belirlendikten sonra, oksalik asitin bu pH'de H₂O₂ ile olan girişim etkisi incelendi. Bunun için, önce zemin çözeltisi üzerine 10 mM

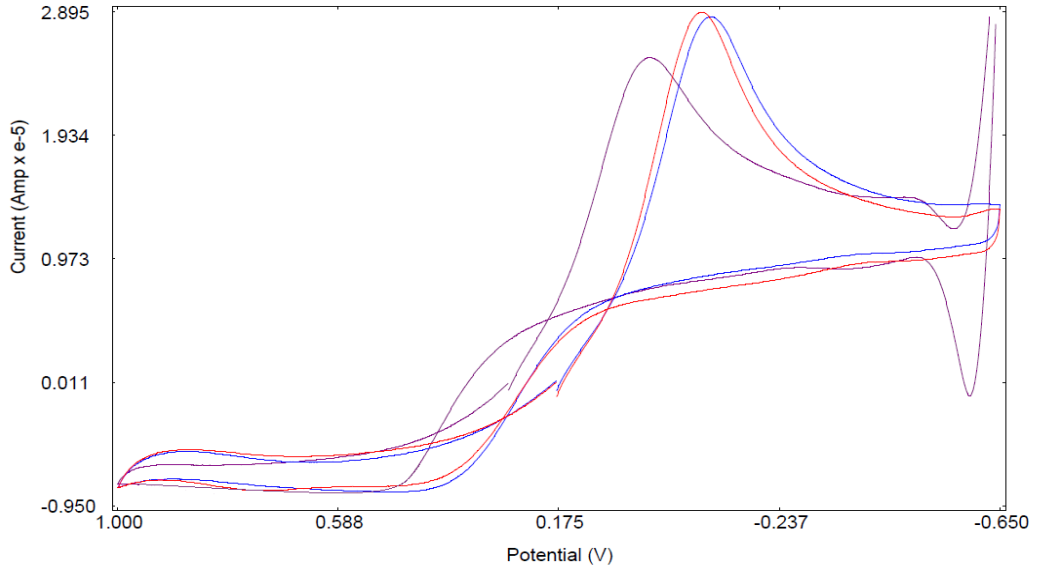
oksalik asit ardından 1 mM, 2 mM, 3 mM H₂O₂ eklenerek bir CV çalışması (Şekil 4.26) , sonra 3 mM H₂O₂ üzerine 10 mM oksalik asit eklenerek bir başka CV çalışması (Şekil 4.27) yapıldı.



Şekil 4.26. PtE ile pH 8,2 BRT + 10 mM oksalik asit içerisinde farklı derişimlerdeki H₂O₂'ye ait CV'ler, **zemine ait, 1 mM, 2 mM, 3 mM** H₂O₂'ye ait CV eğrileri

Şekil 4.26 incelendiğinde, pH 8,2'de 10 mM oksalik asit içeren çözelti içerisinde oksalik asitin H₂O₂ piklerini bozucu veya arttırıcı bir etkisinin olmadığı, H₂O₂ piklerinin +525 mV potansiyelde gözlemlendiği ve artan derişim ile piklerin düzenli bir şekilde büyüdüğü görülmektedir.

Şekil 4.27 incelendiğinde, çözelti içerisinde oksalik asit ilavesi sonucu pH'de bir değişme olduğu (pH 8,2'den pH 6,3'e), pH 8,2'de H₂O₂ yükseltgenme pikinin aslında +400 mV değerinde iken oksalik asit ilavesi sonucu bu pikin +525 mV potansiyele kaydığı görülmüştür. Oksalik asit ilavesi sonucu yükseltgenme pikinin büyüklüğünde ve yapısında bir değişim oluşmadığı, iki pikin de sadece H₂O₂ yükseltgenme piki olduğu, oksalik asitin H₂O₂ piklerini bozucu veya arttırıcı bir etkisinin olmadığı yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir.



Şekil 4.27. PtE ile pH 8,2 BRT içerisinde farklı derişimde oksalik asit ve H₂O₂'ye ait CV'ler, **3 mM H₂O₂'ye ait, 3 mM H₂O₂ + 10 mM oksalik asite ait, pH'si düzeltilmiş 3 mM H₂O₂ + 10 mM oksalik asite ait** CV eğrileri

Yapılan çalışmalar sonucunda, oksalik asitin anodik bölgede PtE üzerindeki duyarlılığının artan pH ile azaldığı belli bir pH değerine gelindiğinde (pH 8,2) ise duyarlılık göstermediği gözlemlendi. Ayrıca, oksalik asit ilaveleri ile pH değiştiğinden enzimatik süreçte H₂O₂ oluşumu için çözeltiye eklenen her oksalik asit ilavesi ile pH, dolayısıyla H₂O₂'ye ait pik potansiyeli ve duyarlılık değişeceğinden tampon çözelti derişimi artırılarak pH değişimi önlenmeye çalışıldı.

Çizelge 4.1. Tampon çözelti derişiminin pH değişimi üzerine etkisi

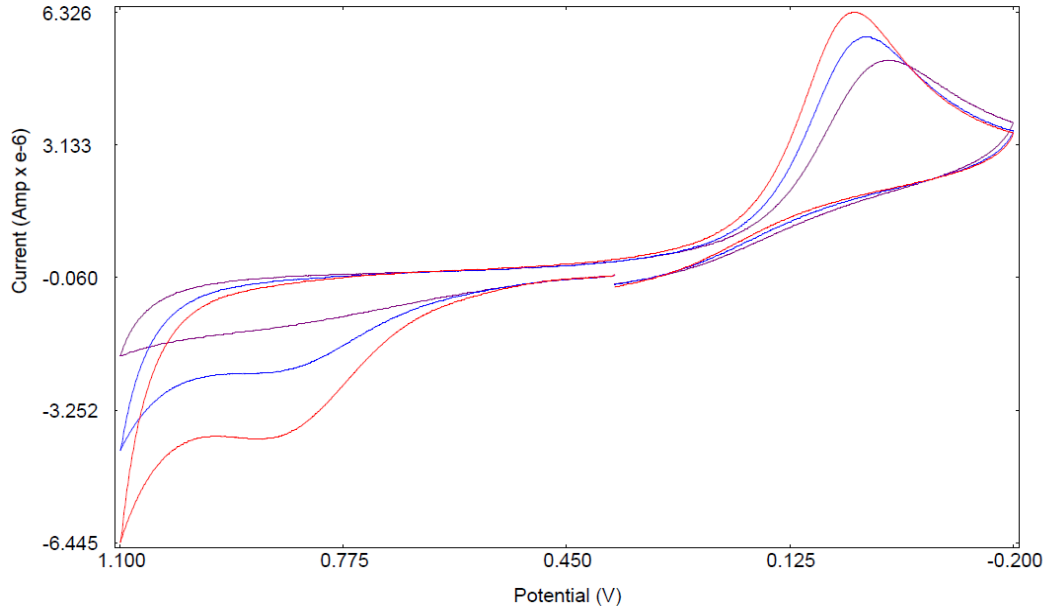
Tampon çözelti derişimi (Molar)	İlk pH değeri	Eklenen miktar	Son pH değeri
0,04	8,20	10 mM oksalik asit	6,30
0,08	8,20	10 mM oksalik asit	7,10
0,2	8,20	10 mM oksalik asit	7,50

Çizelge 4.1 BRT derişiminin pH değişimi üzerine etkisini göstermektedir. Çizelge 4.1 incelendiğinde, BRT derişiminin iki katına ardından da beş katına çıkarılmasıyla pH değişiminin azaldığı ancak yine de kayda değer bir değişim olduğunu görülmektedir. Elde edilen bu sonuç ile pH değişiminin olmaması için daha derişik BRT ile çalışılması gerektiği belirlenmiştir. Ancak tampon derişimi arttırılsa bile artan oksalik asit derişimi ile (> 10 mM) pH değişimi olacağı açıkça görülmektedir. Elde edilen bu bilgiler doğrultusunda, oksalik asit eklemeleri sonucu pH'nin değişiminden kaynaklanacak hataları engellemek için tamponlanmış oksalik asit çözeltileri ile pH tarama çalışmaları yapılmasının daha uygun olacağı ön görüldü.

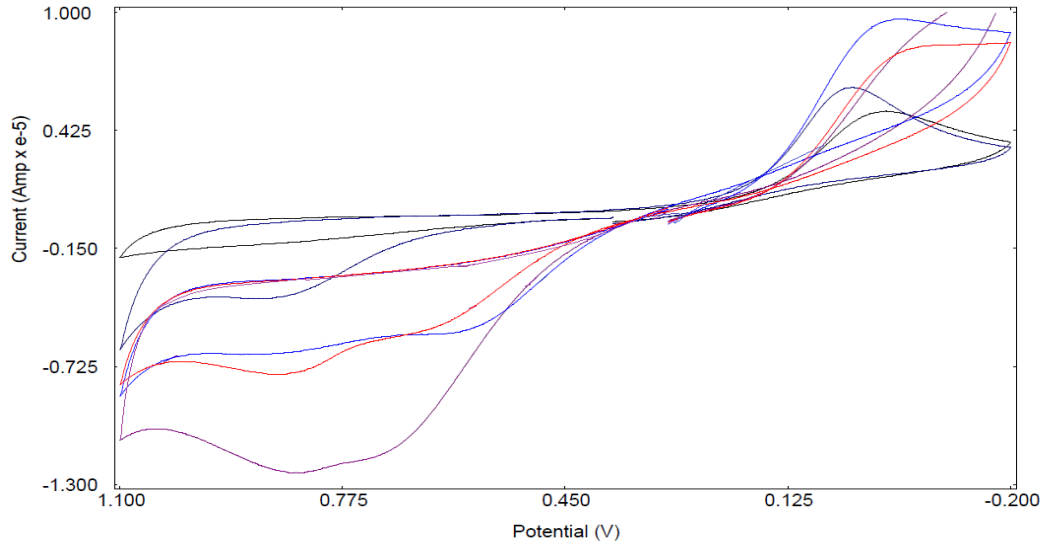
b-) Tamponlanmış oksalik asit ile yapılan çalışmalar

Tamponlanmamış oksalik asit için pH 8,2 BRT'de 10 mM oksalik asit ilavesi ile pH'nin 6,3'e düştüğü belirlendi. Bu bilgi vasıtasıyla, tamponlanmış oksalik asit çözeltilerinde oksalik asitin pH 6,3 veya civarlarında duyarlılık göstermeyeceği öngörüldü. Bu yüzden, pH 6 ve pH 6,5 arasında oksalik asitin PtE üzerindeki duyarlılığını belirlemek ve H₂O₂ girişim etkisini incelemek amacıyla CV çalışmaları gerçekteştirildi.

şekil 4.28, pH 6'da oksalik asitin elektro aktifliğini belirleme çalışmalarını göstermektedir. şekil 3.28 incelendiğinde, pH 6'da oksalik asite ait +800 mV potansiyel değerinde bir yükseltgenme piki elde edilmiş ve artan oksalik asit derişimi ile yükseltgenme pikinin büyüdüğü görülmüştür. Oksalik asitin bu pH'de 10 mM ve üzerindeki derişim değerlerinde PtE üzerinde duyarlı olduğu belirlenmiştir. Çalışılan pH değerinde oksalik asite karşı duyarlılık elde edilmesine rağmen oksalik asit ve H₂O₂'nin girişim etkileri yapılan CV çalışmaları ile incelendi (şekil 4.29).



Şekil 4.28. PtE ile pH 6 BRT’de farklı derişimlerdeki oksalik asite ait CV’ler, **zemine ait**, **10 mM** ve **11 mM** oksalik asite ait CV eğrileri

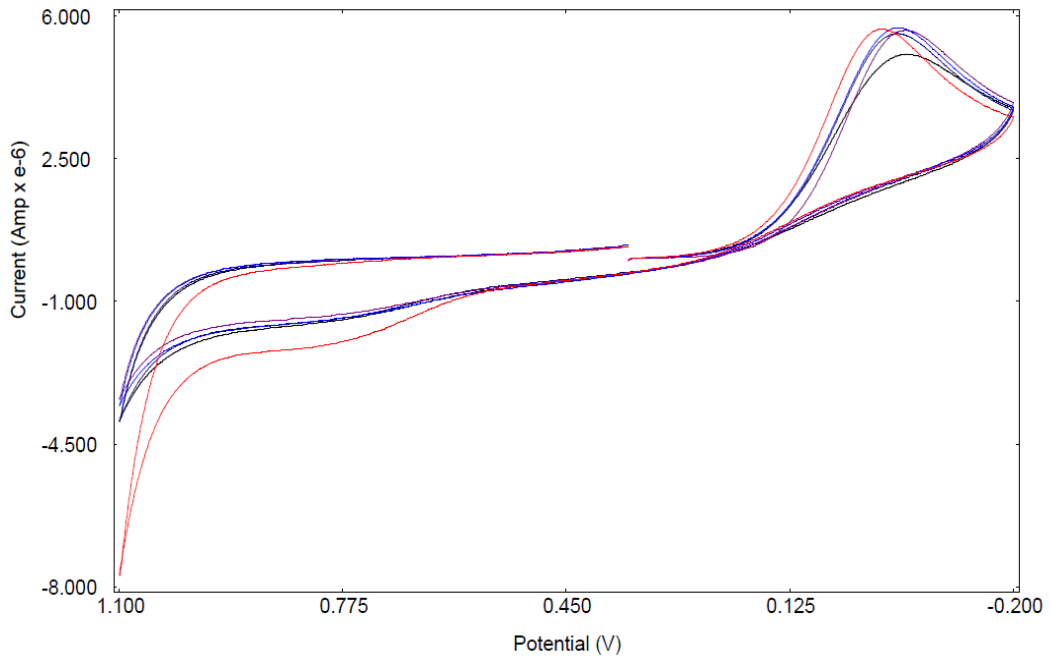


Şekil 4.29. PtE ile pH 6 BRT’de farklı derişimlerdeki oksalik asit ve H₂O₂’ye ait CV’ler, **zemine ait**, **11 mM oksalik asite ait**, **11 mM oksalik asit + 1 mM H₂O₂’ ye ait**, **12 mM oksalik asit + 1 mM H₂O₂’ye ait**, **12 mM oksalik asit + 2 mM H₂O₂’ye ait** CV eğrileri

Şekil 4.29 incelendiğinde, oksalik asit üzerine H₂O₂ eklenmesiyle iki bileşige ait yükseltgenme pikinin de +730 ile +800 mV potansiyel değerleri arasında bir pikin üzerindeki iki ayrı yükseltgenme bölgesi şeklinde oluştuğu gözlemlendi. Bu iki bileşikten

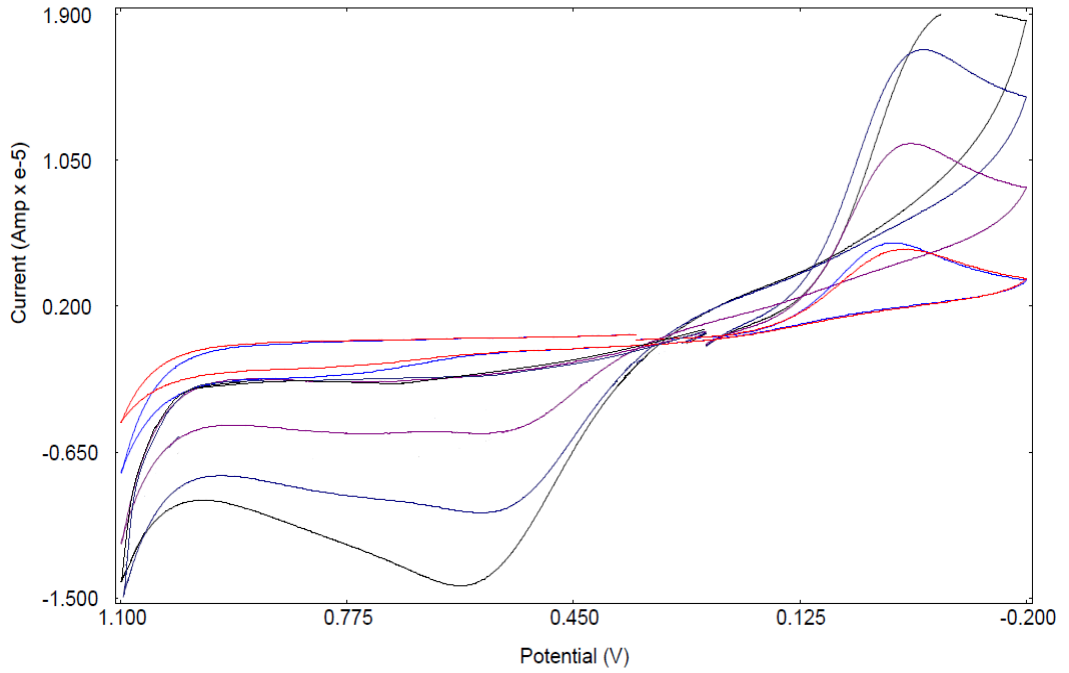
herhangi birinin artan derişimi ile derişimi artan bileşigin yükseltgenme pikinin sivrilip daha belirgin hale gelirken diğer pikin gözlenebilirliğinin azaldığı ve piklerin birbirinden tam olarak ayrışmadığı görüldü. Bu yüzden oksalik asitin daha yüksek derişimlerde bile elektro aktif olmayacağı düşünölen pH 6,5 BRT’de CV çalışmaları yapıldı.

Tamponlanmış oksalik asit ile pH 6,5 BR tamponunda yapılan çalışmalarda ise oksalik asite karşı 40 mM derişime kadar duyarlılık gözlenmediğı, 50 mM derişime çıkıldığında ise +750 mV potansiyelde oksalik asite ait bir yükseltgenme piki oluştuğı gözlendi. Şekil 4.30’da, pH 6,5 BRT’de 10–50 mM derişim aralığında oksalik asit için elde edilmiş CV eğrileri görünmektedir.



Şekil 4.30. PtE ile pH 6,5 BRT’de farklı derişimlerdeki oksalik asite ait CV’ler, **zemin** **ait, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM** oksalik asit çözeltilerine ait CV eğrileri

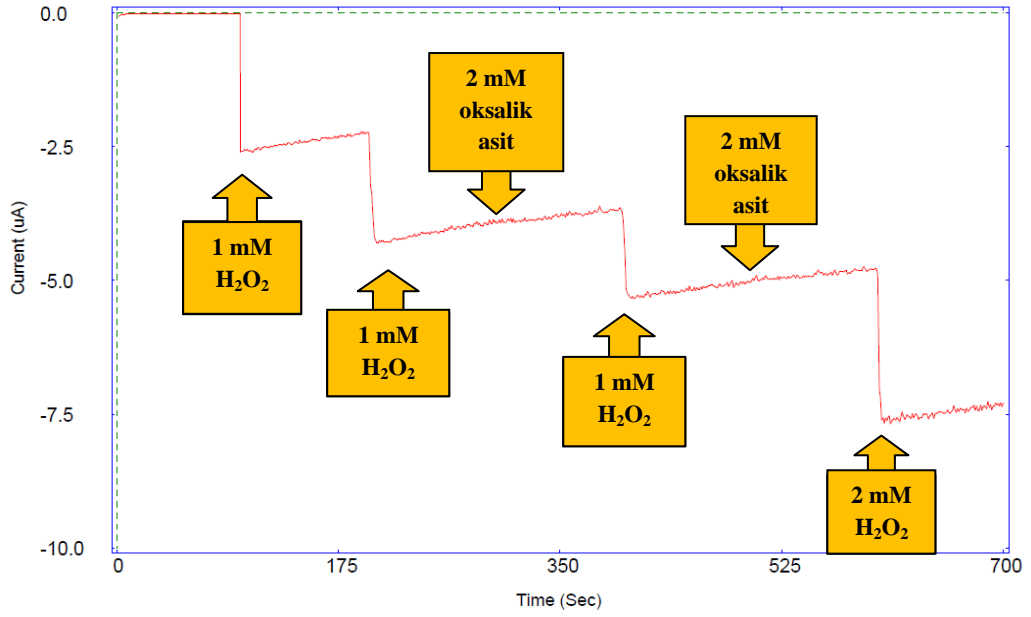
Oksalik asitin pH 6,5’teki duyarlılığı belirlendikten sonra H₂O₂ ile olan girişim etkisini belirlemek için CV çalışmaları yapıldı. Şekil 4.31, pH 6,5 BRT’de oksalik asit ile H₂O₂’nin girişim etkisini göstermektedir.



Şekil 4.31. PtE ile pH 6,5 BRT’de farklı derişimlerdeki oksalik asit ve H₂O₂’ye ait CV’ler, **zemine ait, 50 mM oksalik asite ait, 50 mM oksalik asit + 1 mM H₂O₂’ye ait, 50 mM oksalik asit + 2 mM H₂O₂’ye ait, 50 mM oksalik asit + 3 mM H₂O₂’ye ait** CV eğrileri

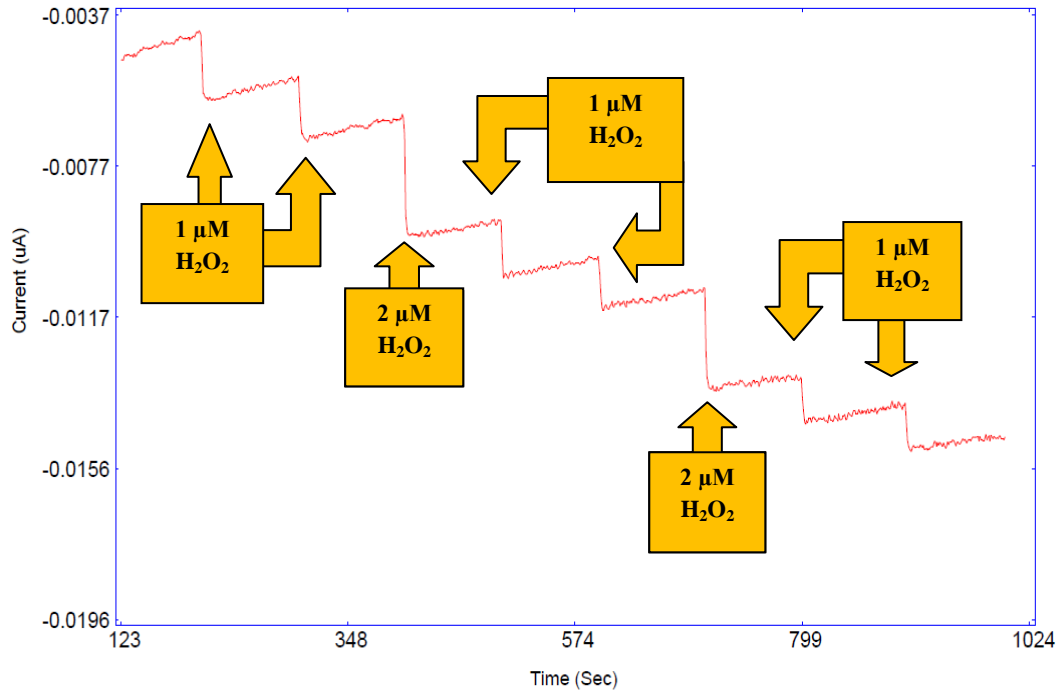
Şekil 4.31 incelendiğinde, oksalik asit üzerine H₂O₂ eklenmesiyle iki bileşiğe ait yükseltgenme pikinin +530 ile +750 mV potansiyel değerleri arasında bir pikin üzerindeki iki ayrı yükseltgenme bölgesi şeklinde oluştuğu gözlemlendi. Oksalik aside ait yükseltgenme pikinin +750 mV, H₂O₂’ye ait yükseltgenme pikinin ise +530 mV potansiyelde ortaya çıktığı belirlendi.

pH 6,5 BRT’de oksalik asit ile H₂O₂ girişim etkisini daha detaylı incelemek ve pH 6,5’te iki bileşiği sabit potansiyel uygulanarak birbirinden farklılaştırmanın mümkün olup olmadığını incelemek amacıyla Time–Base çalışmaları yapıldı. Yapılan ilk Time–Base çalışmasında zemin çözeltisi olarak pH 6,5 BRT + 50 mM oksalik asit olarak seçildi ve bu çözeltinin üzerine belli derişimlerde oksalik asit ve H₂O₂ eklemeleri her bir ekleme arası 100 s olacak şekilde yapıldı. Uygulanan potansiyel pH 6,5 BRT’de H₂O₂’nin yükseltgenme potansiyeli olan +530 mV olarak seçildi.



Şekil 4.32. PtE ile pH 6,5 BRT + 50 mM oksalik asit çözeltisi içerisinde H₂O₂ ve oksalik asite ait akım basamaklarını gösteren Time–Base grafiği, E_{uyg}: +530 mV

Şekil 4.32 incelendiğinde, zemin çözeltisi olan pH 6,5 BRT + 50 mM oksalik asit çözeltisinde ilk 100 s boyunca sabit potansiyelde zemin çözeltisine ait akım değerinin sabitlenmesi beklendi. Zemin akımının μA seviyesinden çok daha düşük oluşu (4 nA) zemin çözeltisindeki herhangi bir bileşenin yükseltgenmediğini göstermektedir. Daha sonra yapılan H₂O₂ eklemelerinde ise akım basamağı oluşumu ve basamak büyüklüklerinin derişimle orantılı olarak büyüdüğü gözlenmiştir. Yapılan oksalik asit eklemeleri ile herhangi bir akım basamağı oluşumu gözlenmemiştir. Elde edilen bu sonuçlar vasıtasıyla, oksalik asit ile H₂O₂'nin pH 6,5 BRT'de +530 mV sabit potansiyelde herhangi bir girişim yapmadığı belirlenmiştir. Ancak yine de mM derişim düzeyindeki oksalik asitin μM derişim düzeylerindeki H₂O₂'ye etkisi olup olmadığı yapılan ikinci bir Time–Base çalışması ile incelenmiştir (Şekil 4.33). Yapılan çalışmada bir öncekine benzer şekilde, zemin çözeltisi olarak pH 6,5 BRT + 50 mM oksalik asit olarak seçildi ve bu çözeltinin üzerine μM derişim düzeylerinde H₂O₂ eklemeleri her bir ekleme arası 100 s olacak şekilde yapıldı. Uygulanan potansiyel, pH 6,5 BRT'de H₂O₂'nin yükseltgenme potansiyeli olan +530 mV olarak seçildi.

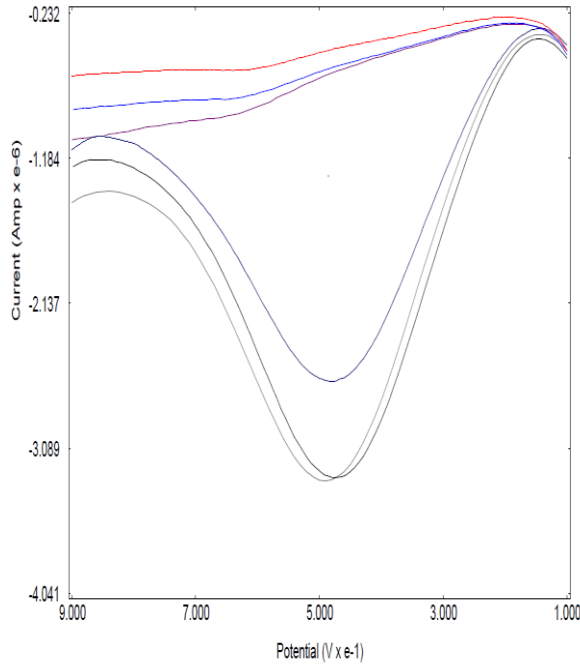


Şekil 4.33. PtE ile pH 6,5 BRT + 50 mM oksalik asit çözeltisi içerisinde μM derişim düzeylerindeki H_2O_2 için elde edilen akım basamaklarını gösteren Time–Base grafiği, E_{uyg} : +530 mV

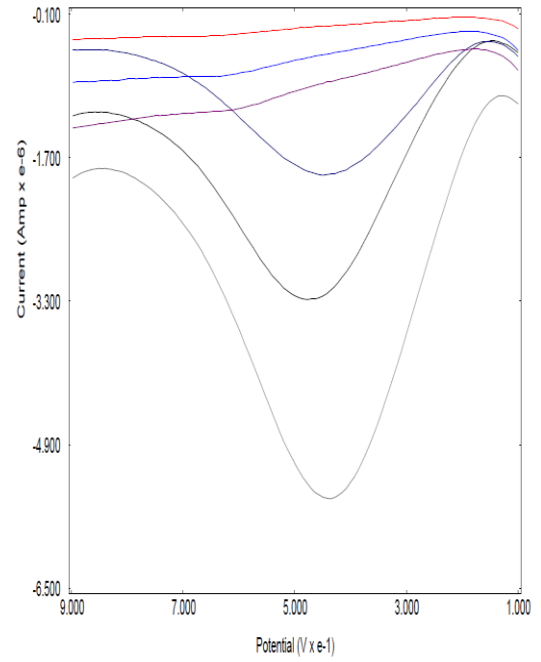
Şekil 4.33 incelendiğinde, Şekil 4.32’dekine benzer şekilde pH 6,5 BRT + 50 mM oksalik asit çözeltisinde ilk 100 s boyunca sabit potansiyelde zemin çözeltisine ait akım değerinin sabitlenmesi beklendi. Zemin akımının 4 nA değerinde oluğu zemin çözeltisindeki herhangi bir bileşenin yükseltgenmediğini göstermektedir. Daha sonra eklemeleri yapılan H_2O_2 ’nin akım basamakları oluşturduğu ve basamak büyüklüklerinin derişim ile doğru orantılı olarak büyüdüğu görülmektedir. pH 6,5 BRT’de yapılan Time–Base çalışmaları H_2O_2 ’nin çözeltide oksalik asite göre $1:5 \cdot 10^4$ derişim oranında olduğu durumlarda bile oksalik asit girişiminden etkilenmediğini ve pH 6,5’de kolaylıkla analizlenebileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, pH 6,5’te enzimatik sensörün hazırlanabileceği ve oksalik asit girişiminin pH optimizasyonu ile engellendiği yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir.

H_2O_2 için uygunluğu gösterilmiş olan bu pH koşullarında H_2O_2 ’ye ait bir kalibrasyon grafiği oluşturulması amaçlandı ve DPV tekniği ile daha yüksek duyarlılık elde edileceği öngörülerek H_2O_2 için DPV tekniği kullanılarak bir kalibrasyon grafiği hazırlama

çalışmaları yapıldı. Öncelikle DPV tekniğinde, potansiyel uygulama işleminde duyarlılığı belirleyen, puls yüksekliği (amplitude) ve potansiyel basamak büyüklüğü (step) parametreleri optimize etme çalışmaları yapıldı. Önce puls yüksekliği (amplitude) default değeri olan 25 mV değerindeyken 4, 7, 10 mV (basamak) step büyüklüğü değerleriyle 2 mM H₂O₂ çözeltisi ile çalışıldı. Çalışılan step değerlerinden en iyi sonuç step 7 mV ve 10 mV'ta gözlemlendi, ancak step 10 mV iken tarama hızı çok yükseldiğinden tekrarlanır sonuçlar elde edilemedi ve step değeri 7 mV olarak seçildi. Puls yüksekliği (amplitude) için 25, 50, 75 mV ile denemeler yapıldı, bu değerlerin büyümesi ile pik akımının da büyüdüğü ve 75 mV değerinde en iyi pik yüksekliğinin elde edildiği belirlendi. Yapılan çalışmalar sonucu puls yüksekliği olarak 75 mV, basamak büyüklüğü olarak ise 7 mV seçildi. Şekil 4.34 ve Şekil 4.35 step ve amplitude değerlerini belirleme çalışmaları ile ilgili DPV eğrilerini göstermektedir.



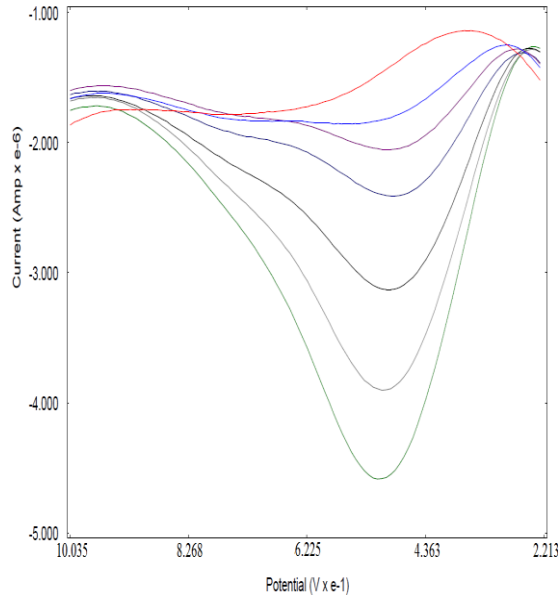
Şekil 4.34. PtE ile yapılan amplitude seçimini gösteren DPV eğrisi, amplitude 50 mV default değerindeyken, zemine ait; **step 4 mV, step 7 mV, step 10 mV** ve 2 mM H₂O₂'ye ait; **step 4 mV, step 7 mV, step 10 mV** DPV eğrileri



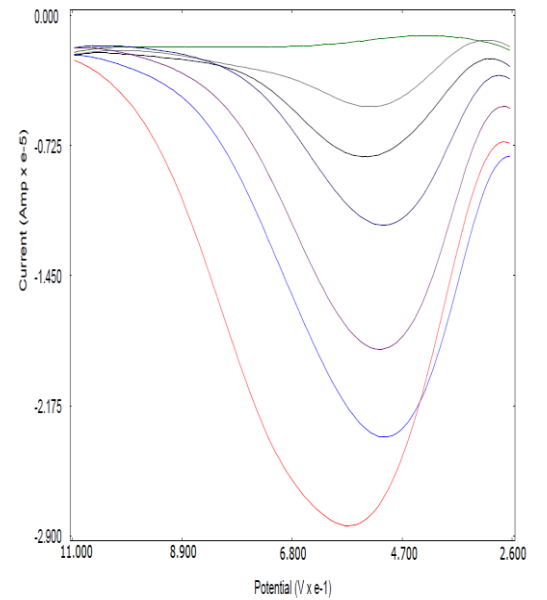
Şekil 4.35. PtE ile yapılan step seçimini gösteren DPV eğrisi, step 7 mV değerindeyken zemine ait; **amplitude 25 mV, amplitude 50 mV, amplitude 75 mV** ve 2 mM H₂O₂'ye ait; **amplitude 25 mV, amplitude 50 mV, amplitude 75 mV** DPV eğrileri

DPV tekniği ile belirlenen çalışma koşullarında kalibrasyon grafiği hazırlamak amacıyla elde edilen eğrilerin derişimle değişimi, küçük derişim bölgesi için 0,1–0,9 μM aralığında H_2O_2 zelteleri ile çalışılırken, yüksek derişim bölgesindeki doğrusallığı göstermek amacıyla 1,0–10,0 mM derişim aralığında üç tekrarlı olarak çalışılmıştır.

şekil 4.36 pH 6,5 BRT’de küçük derişim bölgesi için 0,1–0,9 μM derişim aralığında H_2O_2 zeltelerine ait DPV eğrilerini göstermektedir. Elde edilen eğriler incelendiğinde artan H_2O_2 derişimi ile DPV eğrilerinin pik büyüklüklerinin de düzenli bir şekilde büyüdüğü görülmektedir.



şekil 4.36. PtE ile pH 6,5 BRT’de H_2O_2 için küçük derişim bölgesi kalibrasyon grafiği hazırlama çalışması, **zemin** **ait**, **100 μM** , **200 μM** , **300 μM** , **500 μM** , **700 μM** , **900 μM** H_2O_2 ’ye ait DPV eğrileri



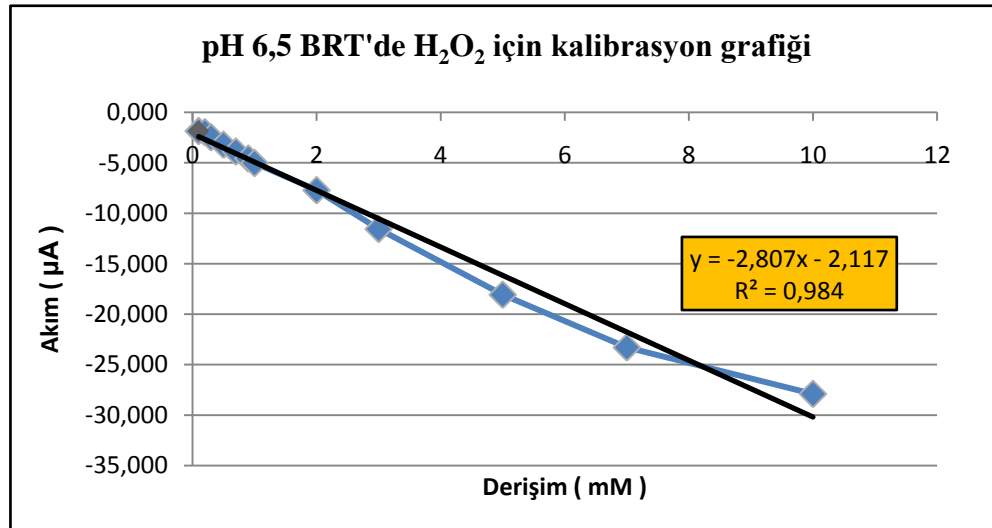
şekil 4.37. PtE ile pH 6,5 BRT’de H_2O_2 için büyük derişim bölgesi kalibrasyon grafiği hazırlama çalışması, **zemin** **ait**, **1 mM**, **2 mM**, **3 mM**, **5 mM**, **7 mM**, **10 μM** H_2O_2 ’ye ait, DPV eğrileri

şekil 4.37 pH 6,5 BRT’de yüksek derişim bölgesi için 1,0–10,0 mM derişim aralığında H_2O_2 zeltelerine ait DPV eğrilerini göstermektedir. Elde edilen eğriler incelendiğinde, artan H_2O_2 derişimi ile DPV eğrilerinin pik büyüklüklerinin de düzenli bir şekilde büyüdüğü görülmektedir.

Şekil 4.36 ve Şekil 4.37’den elde edilen eğriler vasıtasıyla hesaplanan pH 6,5 BRT’de H₂O₂’ye ait anodik bölgedeki yükseltgenme pik akımları derişime karşı grafiğe geçirildiğinde, elde edilen kalibrasyon grafiğinin çalışılan konsantrasyon bölgesinde yeterince doğrusal olduğu Şekil 4.38’deki kalibrasyon grafiğinden anlaşılmaktadır. Elde edilen grafiğin korelasyon katsayısı, $R^2 = 0,984$ olarak bulunmuştur. Çizelge 4.2 pH 6,5 BRT’de DPV tekniği ile yapılan kalibrasyon grafiği hazırlama çalışmalarında derişimlere karşılık ölçülen akım değerlerini göstermektedir.

Çizelge 4.2. pH 6,5 BRT’de yapılan kalibrasyon grafiği çalışmasında derişimlere karşı elde edilen akım değerleri

Konsantrasyon (mM)	1. Ölçüm (µA)	2. Ölçüm (µA)	3. Ölçüm (µA)	Ortalama (µA)	Standart Sapma (µA)
0	-1,750	-1,755	-1,740	-1,748	0,008
0,1	-1,861	-1,875	-1,837	-1,858	0,019
0,2	-2,060	-1,938	-1,920	-1,973	0,076
0,3	-2,550	-2,467	-2,418	-2,478	0,067
0,5	-3,330	-3,152	-3,152	-3,211	0,103
0,7	-3,950	-3,920	-3,814	-3,895	0,071
0,9	-4,584	-4,584	-4,584	-4,584	0,000
1	-5,116	-5,028	-4,939	-5,028	0,089
2	-7,910	-7,650	-7,600	-7,720	0,166
3	-11,240	-11,780	-11,670	-11,563	0,285
5	-18,650	-17,930	-17,660	-18,080	0,512
7	-23,480	-23,080	-23,350	-23,303	0,204
10	-28,480	-27,630	-27,630	-27,913	0,491



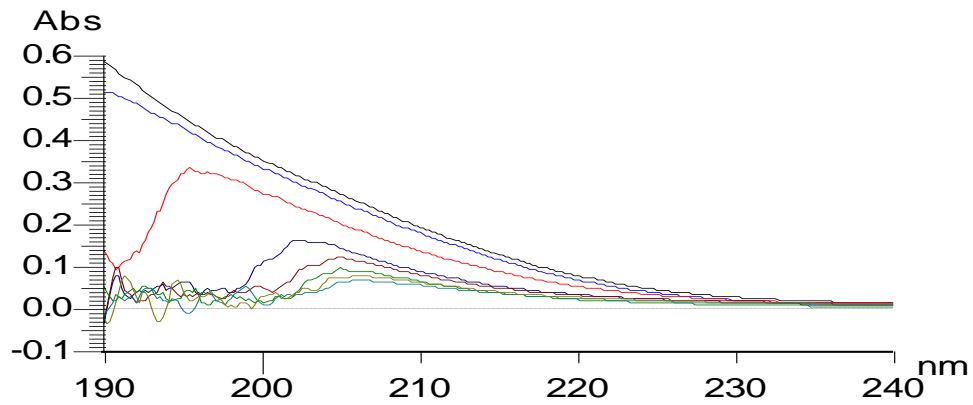
Şekil 4.38. PtE ile pH 6,5 BRT’de H₂O₂’ye ait 0,1–10,0 mM derişim aralığındaki kalibrasyon grafiği

Sonuç olarak enzimatik sensör hazırlanabilirliği belirlenmiş olan pH 6,5 BRT koşullarında H₂O₂ analizinin de yapılabileceği 0,1–10,0 mM derişim aralığında doğrusallığı belirlenen kalibrasyon grafiği ile gösterilmiştir.

4.2. UV–VIS Spektrofotometrik Çalışmalar

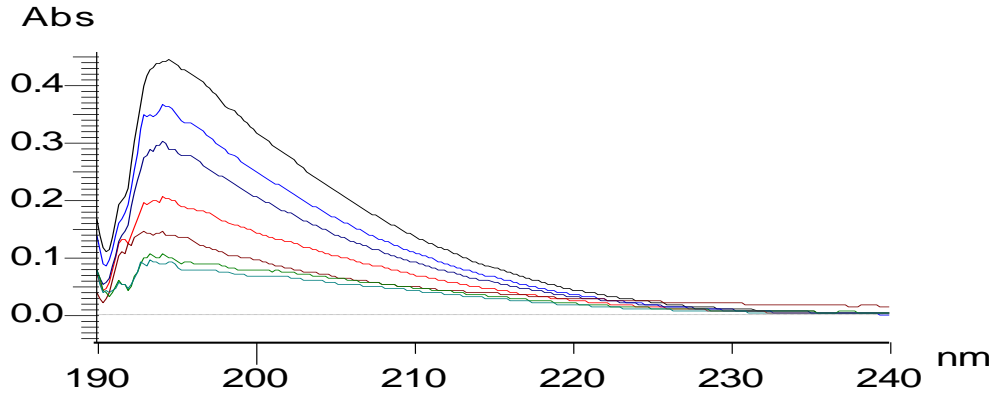
Oksalik asit molekülünün UV-VIS spektrofotometrik özelliğini incelemek amacıyla UV–VIS bölgede spektrofotometrik çalışmalar gerçekleştirildi. Görünür bölgede herhangi bir ışın soğurumu yapmayan oksalik asitin vakum UV bölge yakınlarında oldukça yüksek bir soğuruma neden olduğu gözlenmiştir. Bu soğurumun pH ile değişimini görebilmek açısından 0,1 mM oksalik asit çözeltisinin pH 2–9 aralığında Britton-Robinson ile tamponlanmış koşullardaki spektrumları alınmıştır (Şekil 4.39).

Şekil 4.39'dan da görüldüğü gibi, yapılan dalga boyu tarama çalışmalarında (190–500 nm) oksalik asite ait soğurum pikinin pH 2 ve pH 3'de 190 nm'nin de altına kaydığı, pH yükseldikçe pikin küçülerek 200 nm'nin üzerine taşındığı belirlenmiştir. Gözlenebilir olarak en iyi absorbans değeri pH 4'de ve 196 nm dalga boyunda elde edilmiştir. Bu bölgede çalışma zorluğuna karşın oksalik asit için UV bölgede soğuruma dayalı bir kalibrasyon grafiği hazırlama çalışması gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.39. Farklı pH'lerdeki BRT içerisinde 0,1 mM oksalik asit çözeltilerine ait soğurum pikleri, **pH 2**, **pH 3**, **pH 4**, **pH 5**, **pH 6**, **pH 7**, **pH 8**, **pH 9**'da oksalik asite ait soğurum pikleri

200 nm'nin altında kullanılan kuartz küvetlerin sınırlayıcı etkisi nedeniyle tekrarlanma sorunu yaşanan çalışmada, üç tekrarlı olarak 196 nm'deki soğurum değerleri ölçülerek ortalamaları alınmış ve kalibrasyon grafiği aşağıdaki şekilde hazırlanabilmiştir. Şekil 4.40, pH 4 BRT'de farklı derişimlerdeki oksalik asite ait soğurum piklerini göstermektedir.

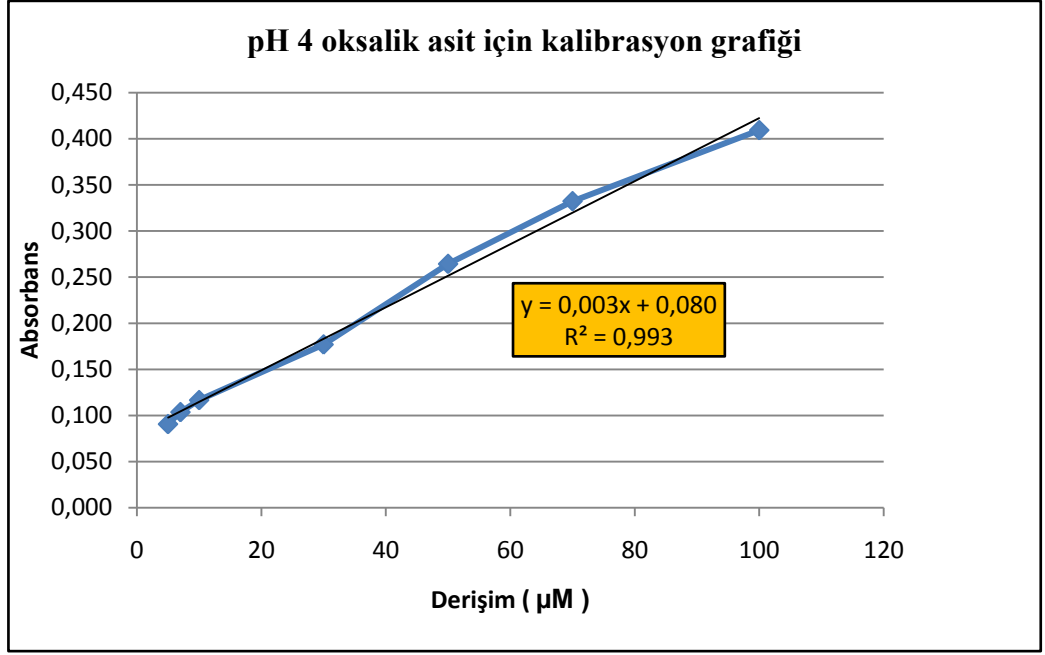


Şekil 4.40. pH 4 BRT ve 196 nm'de oksalik asit için yapılan kalibrasyon grafiği hazırlama çalışması, **0,1 mM, 0,07 mM, 0,05 mM, 0,03 mM, 0,01 mM, 0,007 mM, 0,005 mM** oksalik asite ait soğurum pikleri

Çizelge 4.3, yapılan kalibrasyon grafiği oluşturma çalışmasında derişimlere karşılık gelen soğurum değerlerini, Şekil 4.41 ise elde edilen kalibrasyon grafiğini göstermektedir. Elde edilen kalibrasyon grafiği için korelasyon katsayısı, R^2 : 0,993 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.3. pH 4 BRT'de ve 196 nm'de farklı derişimlerdeki oksalik asite ait soğurum değerleri

Derişim (μM)	Ölçüm 1 (A)	Ölçüm 2 (A)	Ölçüm 3 (A)	Ortalama (A)	Standart Sapma (A)
5	0,079	0,091	0,102	0,091	0,012
7	0,090	0,105	0,116	0,104	0,013
10	0,120	0,116	0,114	0,117	0,003
30	0,166	0,180	0,185	0,177	0,010
50	0,253	0,263	0,277	0,264	0,012
70	0,340	0,325	0,332	0,332	0,008
100	0,396	0,413	0,419	0,409	0,012



Şekil 4.41. Oksalik asit için pH 4 BRT’de ve 196 nm’de 5–100 µM derişim aralığında hazırlanmış kalibrasyon grafiği

Oksalik asit için yapılan spektrofotometrik çalışmalar sonucunda oksalik asitin spektrofotometrik yöntemle de analizinin yapılabileceği gösterilmiş ve çizilen kalibrasyon grafiği ile tekniğin doğrusal çalışma aralığı belirlenmiştir.

4.3. Biyosensör Hazırlama Çalışmaları

Enzimatik sensörün çalışma koşulları optimize edildikten sonra sensörü hazırlama çalışmalarına başlandı. Üç farklı enzim immobilizasyon yöntemi (elektrokimyasal polimerleşme, çapraz bağlama ve polimer matriks altına hapsedme) kullanılarak sensör hazırlama çalışmaları ve ardından gerçek örnek çalışması yapıldı.

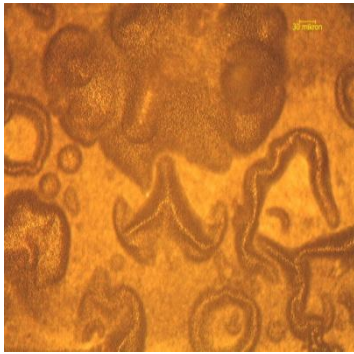
4.3.1. Elektrokimyasal polimerleşme ile biyosensör hazırlama çalışmaları

Elektrokimyasal polimerleşme işlemi için PtE yüzeyinde uygun potansiyel uygulandığında kolayca polimerleştiği bilinen, iyi bir iletken polimer olan ve bu işlem için çok yaygın olarak kullanılan C_4H_5N formül yapısında heterosiklik bir organik bileşik olan pirol düşünüldü.

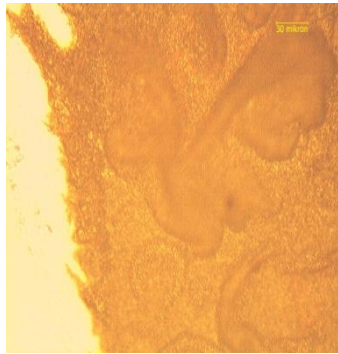
Elektrokimyasal polimerleşme için elde edilecek polimerik kaplamanın H_2O_2 ve oksalik asite olan duyarlılıklarını incelemek amacıyla öncelikle enzimsiz koşullarda çalışmalar yapıldı.

Yapılan çalışmada PtE (2 mm^2) yüzeyinde biriken polipirol kalınlığı devreden geçen toplam yük hesaplamaları ile tespit edildi. PtE yüzeyinde $1 \text{ }\mu\text{m}$ kalınlıkta polipirol birikimi elde etmek için devreden geçen toplam yük 450 mC/cm^2 ($9 \cdot 10^{-3} \text{ C}$) olarak benimsendi (Ekinci ve ark. 1995).

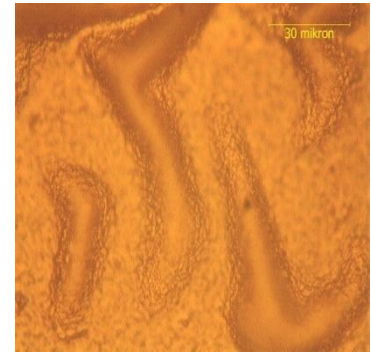
Elektrokimyasal polimerleşme için öncelikle PtE yüzeyi $0,05 \text{ }\mu\text{m}$ Al_2O_3 ile parlatıldı. Ardından $0,1 \text{ M}$ H_2SO_4 içerisinde tekrarlanır akım–potansiyel eğrileri elde edilene kadar H_2 ve O_2 gaz çıkış sınırları arasında (-250 ile $+1000 \text{ mV}$) 20 mVs^{-1} tarama hızı ile CV çalışması yapılarak PtE yüzeyi elektrokimyasal polimerleşme işlemi için hazır hale getirildi. Daha sonra üç elektrotlu hücrede toplam hacim 10 mL olacak şekilde $0,125 \text{ M}$ pirol + 10 mM KCl çözeltisi içerisinde, argon atmosferi varlığında ve $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de, $+800 \text{ mV}$ sabit potansiyel uygulanarak elektrokimyasal polimerleşme işlemi gerçekleştirildi. Toplam yük $9 \cdot 10^{-3} \text{ C}$ değerine geldiğinde potansiyel uygulama işlemi bitirildi. Daha sonra hazırlanan polipirol kaplı PtE 12 saat boyunca pH 6,5 BRT'de bekletildi. Biriktirme işleminden önce metalik gri olan PtE yüzeyinin biriktirme işlemi sonrasında siyah bir renge dönüştüğü gözlemlendi. Elde edilen polipirol kaplamaları mikroskop vasıtasıyla farklı büyütme seçenekleri ile incelenip fotoğrafları çekildi.



Şekil 4.42. PtE yüzeyinde $1 \text{ }\mu\text{m}$ kalınlıktaki polipirol kaplaması, büyütme oranı x100



Şekil 4.43. PtE yüzeyinde $1 \text{ }\mu\text{m}$ kalınlıktaki polipirol kaplaması, büyütme oranı x200

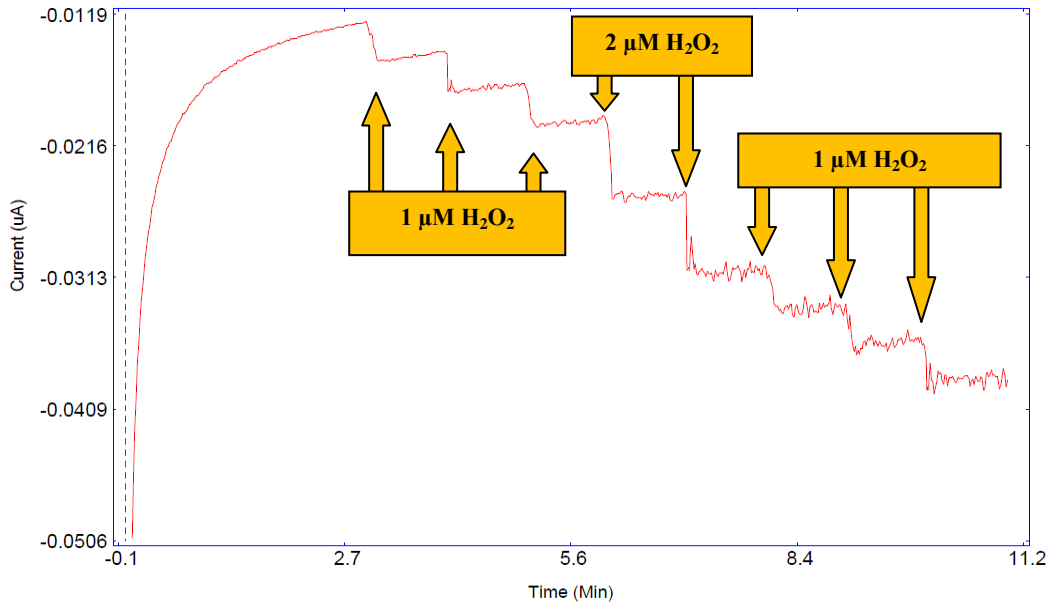


Şekil 4.44. PtE yüzeyinde $1 \text{ }\mu\text{m}$ kalınlıktaki polipirol kaplaması, büyütme oranı x500

Şekil 4.42 PtE yüzeyini 100 kat büyütülerek, Şekil 4.43 PtE yüzeyini 200 kat büyütülerek ve Şekil 4.44 ise PtE yüzeyini 500 kat büyütülerek çekilmiş fotoğrafları göstermektedir. Üç şekil de incelendiğinde yüzeyin tamamen polipirol ile kaplandığı görülmektedir. Özel olarak Şekil 4.43 incelendiğinde PtE yüzeyinde sadece metalik kısımların kaplandığı daha iyi bir şekilde görülmektedir. PtE yüzeyi 1 µm polipirol ile kaplandıktan sonra elde edilen yeni yüzeyde H₂O₂'nin belirlenen çalışma koşullarındaki duyarlılığını incelemek amacıyla +530 mV sabit potansiyelde pH 6,5 BRT'de Time-Base çalışması yapıldı (Şekil 4.45).

Time-Base çalışmalarına başlamadan önce, elektrokimyasal polimerleşme işlemi tamamlandıktan sonra yüzeyde tam olarak polimerleşmeden kalmış dimerler, trimerler, oligomerler gibi küçük molekül kütlelerine sahip moleküllerin polimer zincirine katılmaları için zemin akımı 12 nA'ye düşene kadar, pH 6,5 BR tamponunda, +800 mV sabit potansiyel uygulandı.

Time-Base çalışmasında zemin akımının sabitlenmesinden sonra, her bir ekleme arası 60 s olacak şekilde ayarlanarak altı kez 1 µM ve iki kez 2 µM'lık eklemeler yapılarak çalışma gerçekleştirildi.

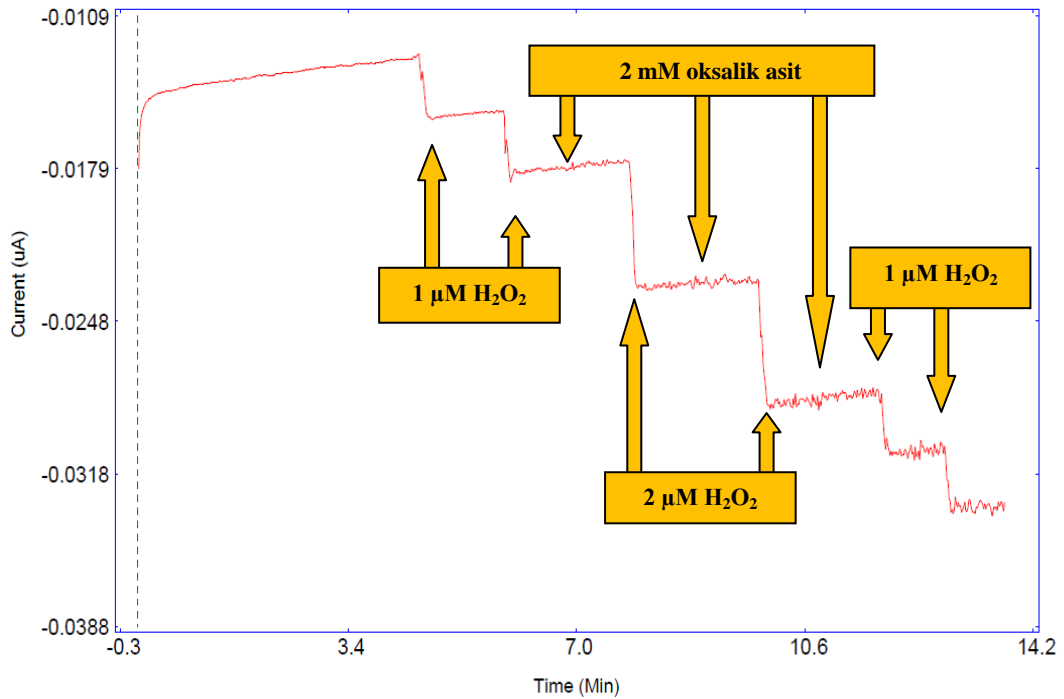


Şekil 4.45. pH 6,5 BRT'de polipirol kaplı PtE yüzeyinde H₂O₂ eklemelerine ait Time-Base grafiği, E_{uyg}: +530 mV

Şekil 4.45 incelendiğinde, polipirol kaplı PtE elektrot yüzeyinin önceden belirlenmiş koşullarda H_2O_2 için oldukça duyarlı olduğu, çalışılan μM düzeydeki H_2O_2 çözeltilerine karşı oldukça iyi yükseltgenme basamakları oluşturduğu ve artan derişimle basamaklarında düzenli bir şekilde büyüdüğü görülmektedir.

Yapılan diğer bir Time–Base çalışmasıyla, elde edilen yeni polipirol kaplı PtE elektrot yüzeyinin pH 6,5 BRT + 50 mM oksalik asit çözeltilisinde +530 mV sabit potansiyelde oksalik asitin duyarlılığını arttırıcı yönde bir katkısının olup olmadığı ve oksalik asit ile H_2O_2 'nin olası girişim etkisi incelendi.

Deney sırasında zemin akımının dengelenmesinden sonra her bir ekleme arası 60 s olacak şekilde ayarlandı ve dört kez $1 \mu M H_2O_2$, iki kez $2 \mu M H_2O_2$ ve üç kez 2 mM oksalik asit eklemeleri yapılarak çalışma gerçekleştirildi.



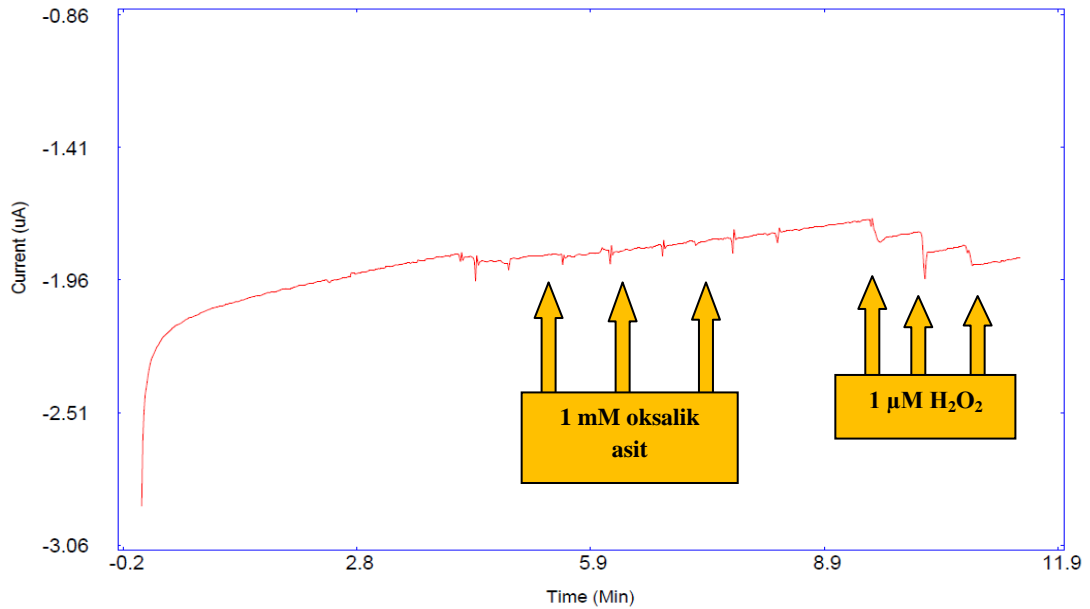
Şekil 4.46. pH 6,5 BRT + 50 mM oksalik asit içerisinde polipirol kaplı PtE yüzeyinde H_2O_2 ve oksalik asit eklemelerine ait Time–Base grafiği, $E_{uyg.} = +530$ mV

Şekil 4.46 incelendiğinde, ilk 60 sn zemin çözeltilisinin akım değerinin sabitlenmesi (13 nA'de) için beklendi, bu süre zarfında zemin çözeltilisinde bulunan oksalik aside ait

bir akım büyümesi gözlenmedi ve ardından yapılan H_2O_2 eklemelerinde H_2O_2 'ye ait akım büyümesi gözlenirken oksalik asit eklemelerinde yine bir akım büyümesi gözlenmedi. Toplamda 56 mM oksalik asit bulunduğu pH 6,5 BRT'de +530 mV sabit potansiyelde oksalik asite karşı herhangi bir duyarlılık göstermediği gözlemlendi.

Polipirol kaplı PtE ile yapılan Time-Base çalışmaları sonucu, hazırlanan elektrotun istenen seçicilik ve duyarlık özelliğini taşıdığı ve enzimatik sensörün bu polimerleştirme süreci ile hazırlanabileceği öngörüldü. Aynı işlem basamakları kullanılarak 1 mg, 2 mg ve 3 mg enzim içeren çözeltiler kullanılarak çalışmalar yapıp bir enzimatik sensör oluşturulmaya çalışıldı.

Aynı elektrokimyasal polimerleştirme prosedürü ile yapılan enzimatik sensör oluşturma çalışmaları sonrasında, sensörün oksalik asit ve H_2O_2 eklemelerine karşı duyarlılığı yapılan Time-Base çalışması ile belirlenmiş ve Şekil 4.47'de gösterilmiştir. Şekil 4.47 incelendiğinde, art arda yapılan sekiz kez 1 mM'lık oksalik asit eklemeleri sonucu bir duyarlılık elde edilemediği, art arda yapılan üç kez 1 μ M'lık H_2O_2 eklemelerine karşı ise oldukça iyi duyarlılık elde edildiği görülmektedir.



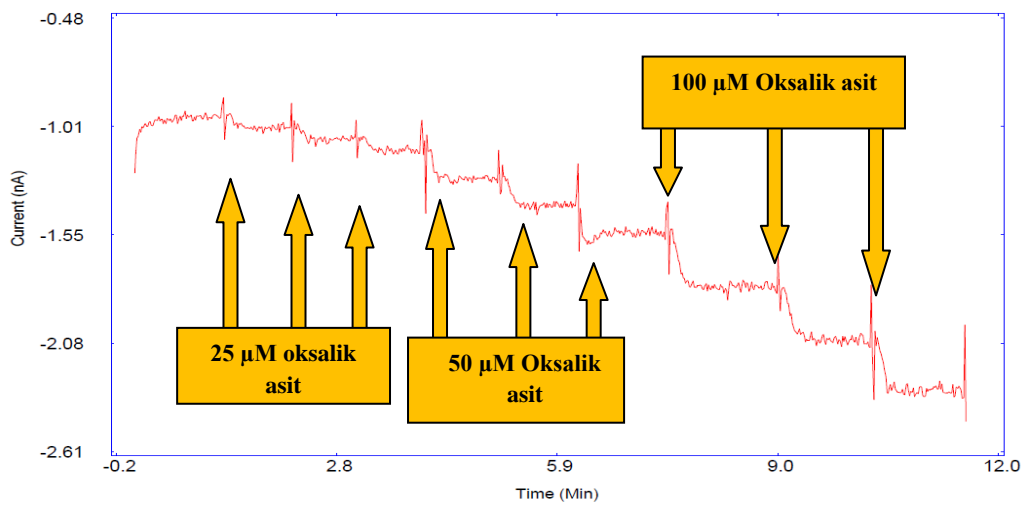
Şekil 4.47. Elektrokimyasal polimerleşme ile hazırlanan sensörün oksalik asit ve H_2O_2 'ye olan duyarlılığını gösteren Time-Base grafiği, E_{uyg} : +530 mV

Sonuç olarak, elektrokimyasal polimerleşme ile yapılan enzimatik sensör hazırlama çalışmalarında başarılı olunamamıştır. Bunun olası nedenleri; elektrokimyasal polimerleşme sırasında enzimin, molekül büyüklüğüne bağlı olarak, polimer matris içerisine giremiyor veya girse bile aktivite göstereceği aktif uçlarını kaybediyor, yani polimer yapısına aktif uçlarından bağlanarak girdiği düşünülebilir.

4.3.2. Çapraz bağlama ile biyosensör hazırlama çalışmaları

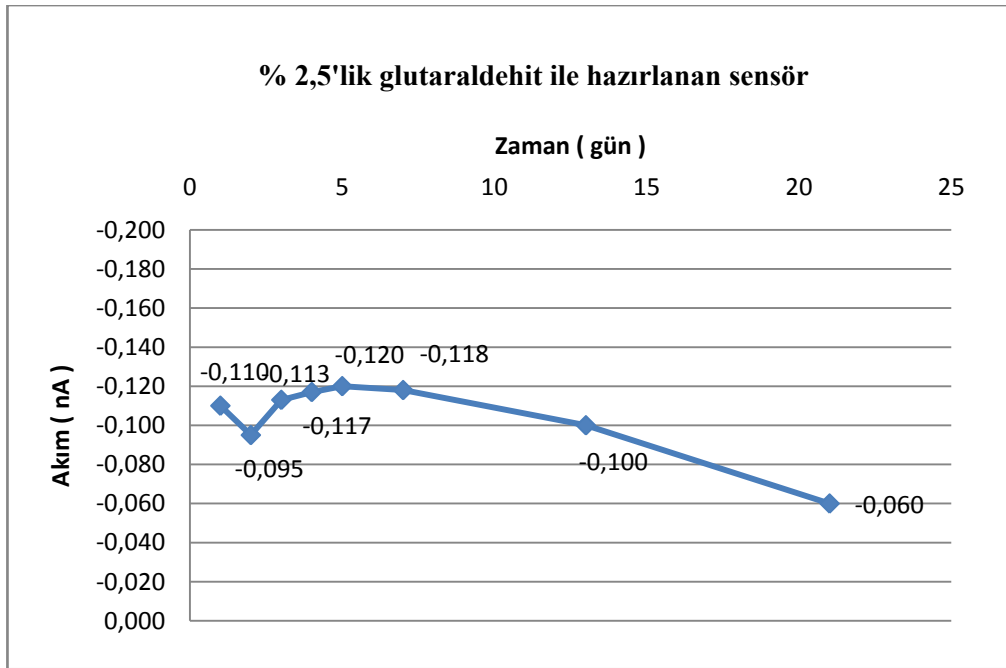
Oksalat oksidaz enziminin elektrot yüzeyine çapraz bağlama ile immobilizasyonu çalışmalarında, bu işlem için çok sık olarak kullanılan bir çapraz bağlayıcı olan $H_2C_5O_2$ molekül formülüne sahip glutaraldehit ile çalışıldı.

Oksalat oksidazın çapraz bağlama ile immobilizasyonu için; öncelikle pH 3,8 süksinat tamponu içerisinde $0,008 \text{ mg}/\mu\text{L}$ 'lik enzim çözeltisi hazırlandı. Enzim çözeltisinin $15 \mu\text{L}$ 'si ile $15 \mu\text{L}$ kütlece % 2,5'luk glutaraldehit çözeltisi karıştırıldı. Hazırlanan karışımdan 2 mm^2 'lik PtE yüzeyine $2 \mu\text{L}$ eklendi ve oda sıcaklığında kurutuldu. Sensör kullanılmadığı zamanlarda $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de ve pH 3,8 süksinat tamponunda bekletildi. Hazırlanan sensörün daha önceden belirlenmiş çalışma koşullarında (pH 6,5 BRT ve $+530 \text{ mV}$ 'ta) oksalik asit eklemelerine karşı nasıl duyarlılık göstereceğinin belirlemek için Time-Base çalışması yapıldı (Şekil 4.48).



Şekil 4.48. Glutaraldehit ile çapraz bağlanarak hazırlanmış enzim sensörünün $25 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$ ve $100 \mu\text{M}$ 'lık oksalik aside karşı duyarlılığı

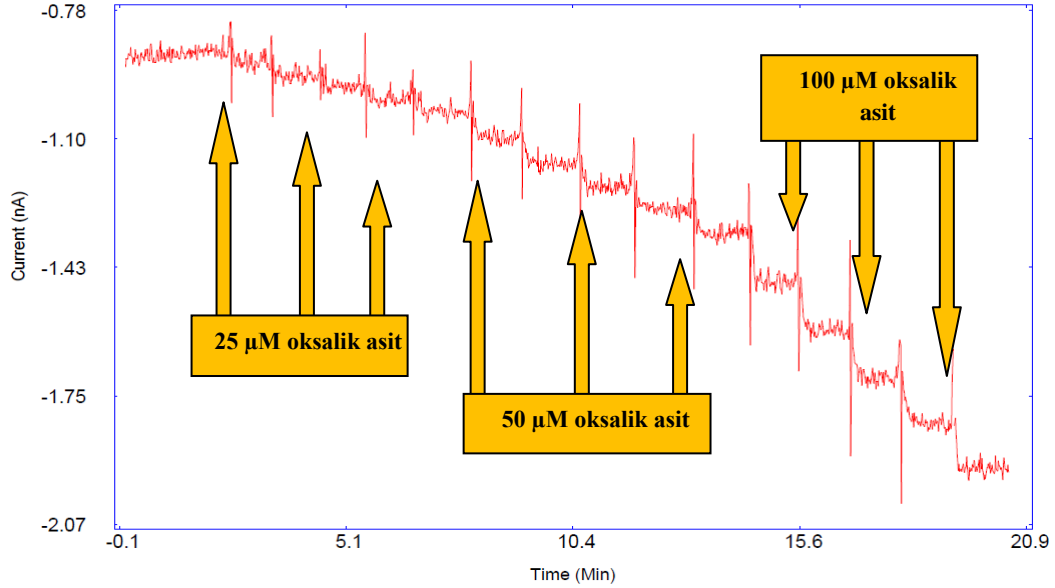
Şekil 4.48 incelendiğinde, hazırlanmış olan enzimatik sensörün beklendiği gibi oksalata karşı duyarlı olduğu ve artan derişim ile oluşturduğu akım basamağı büyüklerinin düzenli olarak büyüdüğü görülmektedir. Çapraz bağlama ile immobilizasyon vasıtasıyla daha önceden belirlenen koşullarda oksalat ölçümü için bir enzimatik sensör hazırlanabileceği belirlendikten sonra, hazırlanan sensörün aynı derişimdeki oksalik asit eklemelerine karşı gösterdiği duyarlılığın günden güne değişimini belirlemeye yönelik çalışmalar yapıldı. Oksalik asidin 21 gün boyunca belli aralıklar ile ölçümleri alındı ve grafiğe geçirilerek 21 günlük periyot boyunca duyarlılığının nasıl değiştiği gösterildi (Şekil 4.49).



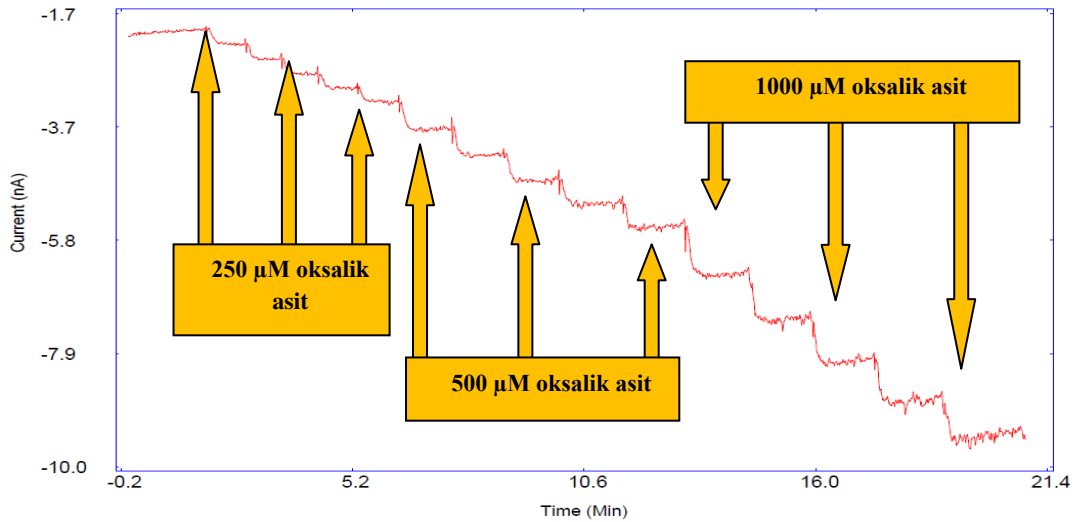
Şekil 4.49. Kütlece % 2,5'lik glutaraldehit ile hazırlanmış enzimatik sensörün 50 μM 'lık oksalik asite karşı duyarlılığının günden güne değişimi

Şekil 4.49 incelendiğinde sensörün duyarlılığının ilk 14 gün boyunca neredeyse değişmediğini, ancak 14. ve 21. günler arasında ise sensör duyarlılığının önemli düzeyde azalma gösterdiği görülmektedir. Enzimatik sensörün duyarlılığının günden güne değişimi belirlendikten sonra, 21. gündeki duyarlılık değerinde bir kalibrasyon grafiği hazırlanarak sensörün doğrusal çalışma aralığı belirlenmeye çalışıldı.

Şekil 4.50, küçük derişim bölgesi için (0,025–0,100 mM) beş tekrarlı olarak ölçüm alınmış akım basamağı oluşumlarına ait Time–Base grafiğini, Şekil 4.51 ise yüksek derişim bölgesi için (0,250–1,000 mM) beş tekrarlı olarak ölçüm alınmış akım basamağı oluşumlarına ait Time–Base grafiğini göstermektedir.



Şekil 4.50. Glutaraldehit ile hazırlanmış sensörle kalibrasyon grafiği hazırlama çalışmasında 0,025 mM, 0,050 mM, 0,100 mM oksalik asit eklemelerine karşı elde edilen akım basamak büyüklükleri



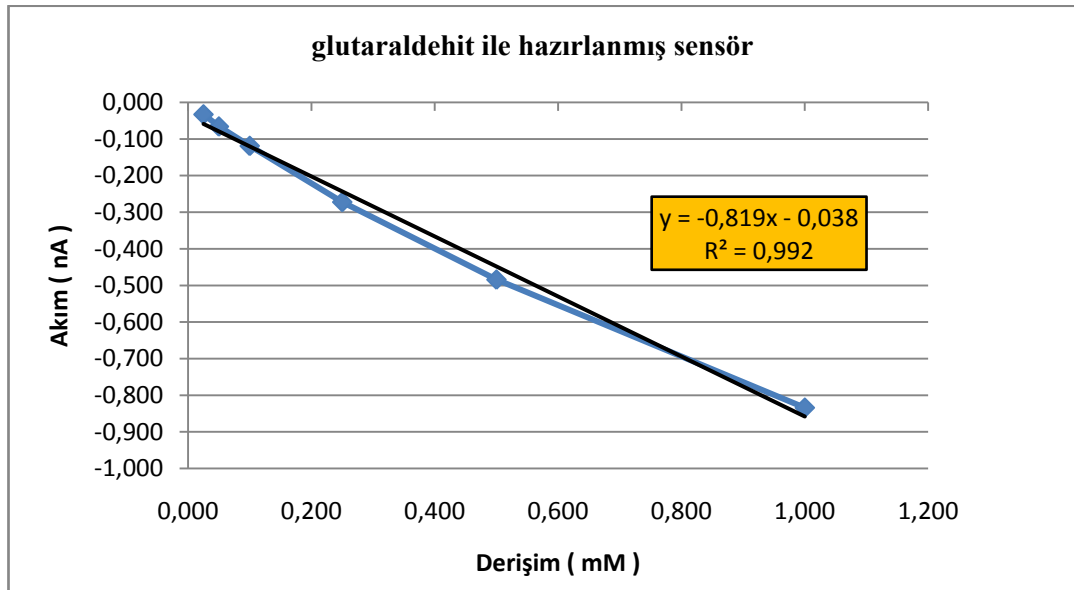
Şekil 4.51. Glutaraldehit ile hazırlanmış sensörle kalibrasyon grafiği hazırlama çalışmasında 0,250 mM, 0,500 mM ve 1,000 mM oksalik asit eklemelerine karşı elde edilen akım basamak büyüklükleri

Çizelge 4.4, 0,025–1,000 mM derişim bölgesinde farklı derişimde oksalik asit eklemeleri sonucu oluşan akım basamağı büyüklüklerini göstermektedir.

Çizelge 4.4. 0,025–1,000 mM derişim aralığında glutaraldehit ile hazırlanmış sensörün oksalik asit eklemelerine karşı oluşturduğu akım basamağı büyüklükleri

Derişim (mM)	1.Ölçüm (nA)	2.Ölçüm (nA)	3.Ölçüm (nA)	4.Ölçüm (nA)	5.Ölçüm (nA)	Ortalama (nA)	Standart Sapma (nA)
0,025	-0,030	-0,037	-0,032	-0,035	-0,029	-0,033	0,003
0,050	-0,070	-0,061	-0,064	-0,067	-0,066	-0,066	0,003
0,100	-0,116	-0,118	-0,128	-0,118	-0,113	-0,119	0,006
0,250	-0,280	-0,290	-0,270	-0,230	-0,290	-0,272	0,025
0,500	-0,520	-0,490	-0,470	-0,480	-0,460	-0,484	0,023
1,000	-0,860	-0,820	-0,810	-0,800	-0,880	-0,834	0,034

Çizelge 4.4'deki derişimlere karşılık gelen akım basamağı büyüklükleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen kalibrasyon eğrisinden (Şekil 4.52), hazırlanmış olan enzimatik sensörün 0,025–1,00 mM derişim aralığında yeterince doğrusal yanıtlar verdiği görülmektedir.

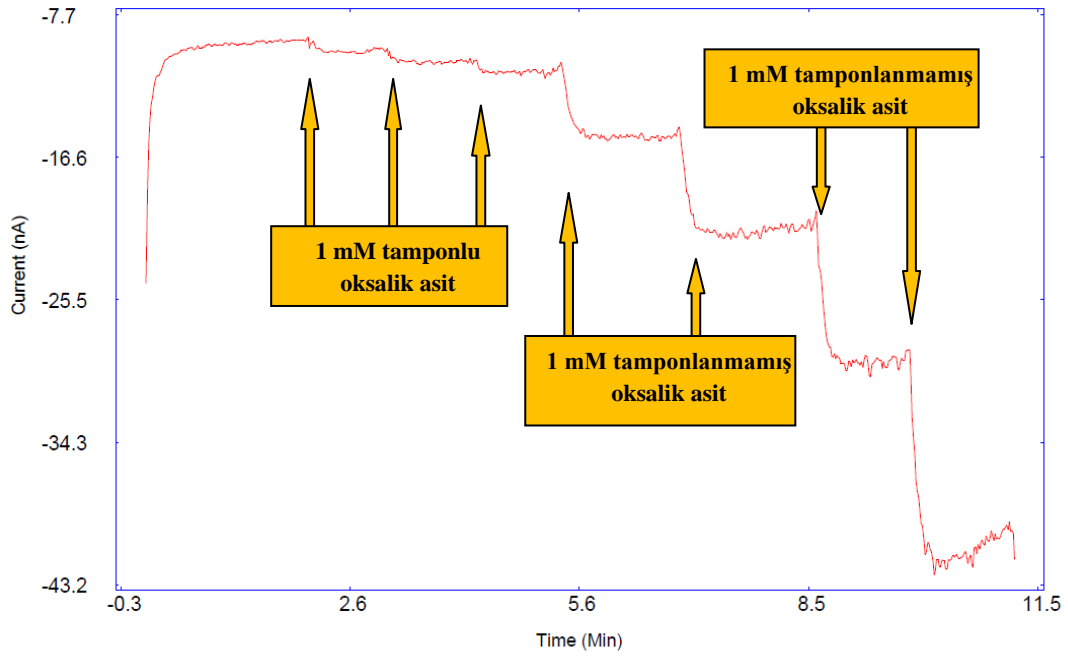


Şekil 4.52. Kütlece % 2,5'lik glutaraldehit ile hazırlanmış sensöre ait 0,025–1,000 derişim bölgesindeki kalibrasyon grafiği

Glutaraldehit ile yapılan çalışmalar sonucunda enzimatik oksalat sensörü hazırlanabildi ve sensörün doğrusal çalışma aralığı belirlendi. Ayrıca çizilmiş olan kalibrasyon grafiği

21. güne ait olduğundan duyarlılığı değişse bile doğrusallığın değişmediği böylece hazırlanmış sensör ile standart ekleme yöntemi kullanılarak gerçek örneklerle de çalışılabileceği belirlendi.

Oksalik asit ile yapılan önceki çalışmalarda, tamponsuz oksalik asit ile çalışıldığında oksalik asit eklemeleri sonucu pH'nin düştüğü ve düşen pH ile oksalik asitin PtE elektrot üzerindeki duyarlılığının arttığı belirlenmişti. Tamponlu oksalik asit ile çalışılmasının önemini bir kez daha göstermek adına, kütlece % 2,5'lik glutaraldehit ile hazırlanmış sensör ile hem tamponlu hem de tamponsuz oksalik asit ile Time-Base çalışması yapıldı. Şekil 4.53 yapılan Time-Base çalışmasını göstermektedir.



Şekil 4.53. Tamponlu ve tamponsuz çözeltiler kullanılarak 1 mM oksalik asite karşı elde edilen akım basamağı büyüklükleri

Şekil 4.53 incelendiğinde, tamponlu oksalik asit çözeltisinden yapılan 1 mM'lık eklemelerde duyarlılığın değişmediği, tamponsuz oksalik asit çözeltisinden yapılan 1 mM'lık eklemelerde ise duyarlılığın değiştiği görülmektedir. Tamponsuz oksalik asit çözeltisinden yapılan eklemelerde duyarlılığın değişmesinin iki nedeni bulunmaktadır; oksalik asitin düşük pH değeri vasıtasıyla kendisinin PtE yüzeyinde yükseltgenmesi ile duyarlılığı arttırması ve düşük pH değeriyle enzim aktivitesinin artmasıdır. Bu iki faktör

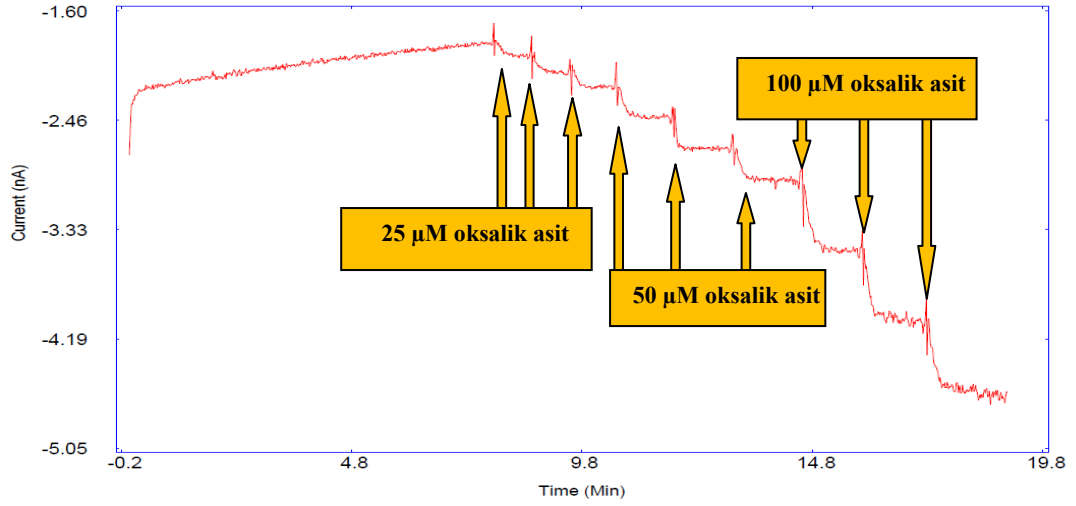
aynı anda değişim gösterdiği ve duyarlılığın her ekleme sonrası değiştığı için tamponsuz oksalik asit ile yapılan çalışmaların sağlıklı olmadığı bir kez daha gösterilmiştir.

4.3.3. Polimer matriks altına hapsedme ile biyosensör hazırlama çalışmaları

Oksalat oksidazın polimer matrik altına hapsedilerek immobilize edilmesi ile enzimatik sensör hazırlama çalışmalarında, bu işlem için yaygın olarak kullanılan, polimerik film tabakaları oluşturarak yüzeyde çözücüsü uçarken polimerleştiği bilinen Nafyon kullanıldı.

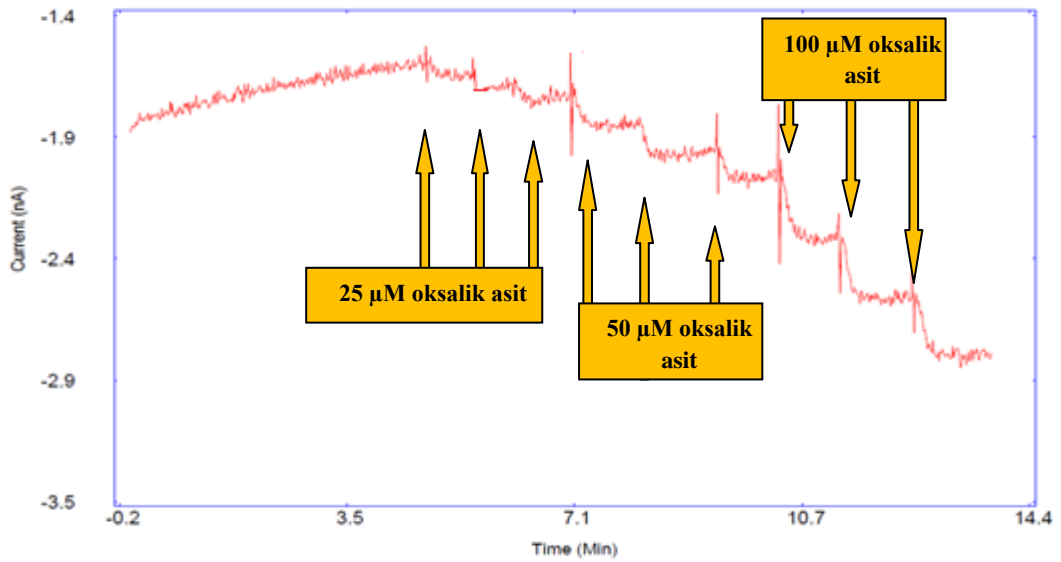
Yüzeyde enzimin adsorbsiyonu için; öncelikle pH 3,8 süksinat tamponu içerisinde 0,008 mg/ μ L'lik enzim çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan enzim çözeltisinden 2 mm²'lik PtE yüzeyine 2 μ L eklendi ve oda sıcaklığında kurutuldu, ardından tekrar 2 μ L eklendi ve oda sıcaklığında kurutuldu. Farklı nafyon yüzdelerinde enzimatik sensörler hazırlamak için kurutulmuş enzim çözeltisi üzerine farklı nafyon yüzdelerinde (kütlece % 0,5, % 1, % 3, % 5) 2 μ L nafyon eklendi ve oda sıcaklığında kurularak dört farklı nafyon yüzdelerine sahip enzimatik sensörler hazırlandı. İmmobilizasyon işleminden sonra hazırlanan dört farklı sensörün oksalik asit eklemelerine duyarlılık gösterip göstermeyeceğini belirlemek için Time–Base çalışmaları yapıldı. Şekil 4.54, kütlece % 0,5'lik nafyon ile hazırlanmış sensörün oksalik asit eklemelerine karşı duyarlılığını göstermektedir.

Şekil 4.54 incelendiğinde, kütlece % 0,5'lik nafyon ile hazırlanmış sensörün oksalik asit eklemelerine karşı duyarlılık gösterdiği ve artan derişim miktarına göre oluşan akım basamağı büyüklüklerinin de düzenli olarak büyüdüğü görülmektedir. Şekil 4.55, kütlece % 1'lik nafyon ile hazırlanmış sensörün oksalik asit eklemelerine karşı gösterdiği duyarlılığı göstermektedir.



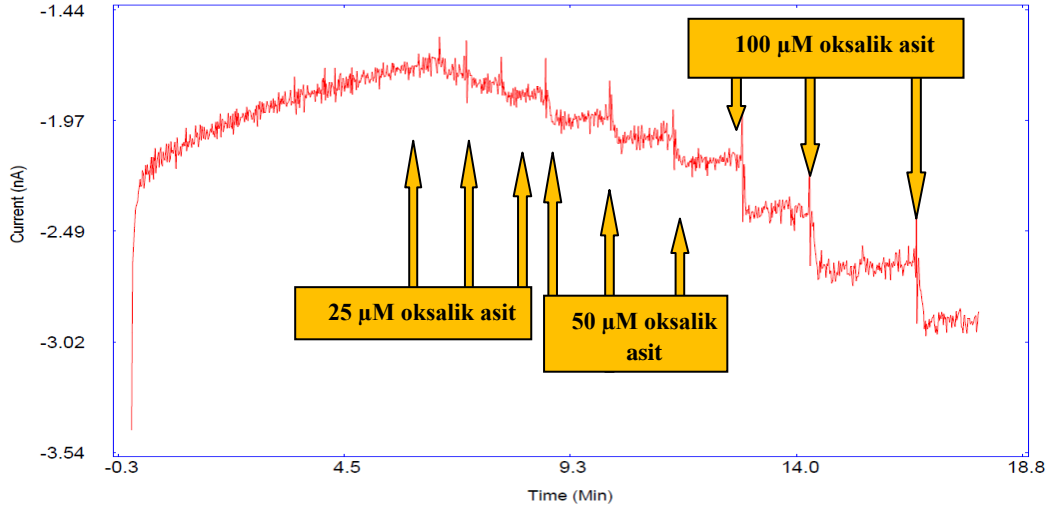
Şekil 4.54. Kütlece % 0,5'lik nafyon ile hazırlanmış enzimatik sensörün 0,025 mM, 0,050 mM ve 0,100 mM oksalik asite karşı gösterdiği duyarlılık

Şekil 4.55 incelendiğinde, kütlece % 1'lik nafyon ile hazırlanmış sensörün oksalik asit eklemelerine karşı duyarlılık gösterdiği ve artan derişim miktarına göre oluşan akım basamağı büyüklüklerinin de düzenli olarak büyüdüğü görülmektedir. Şekil 4.56, kütlece % 3'lük nafyon ile hazırlanmış sensörün oksalik asit eklemelerine karşı duyarlılığını göstermektedir.



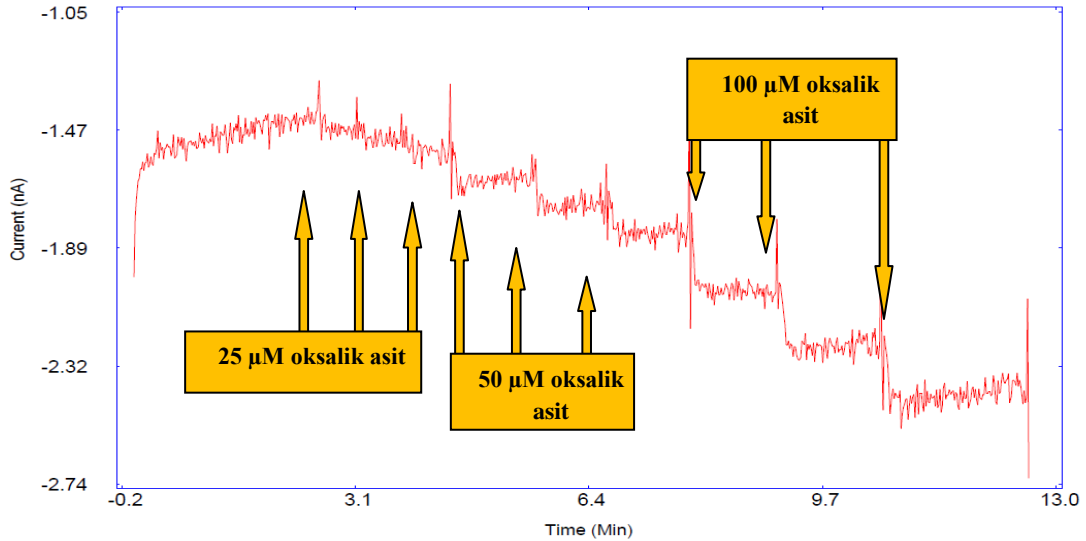
Şekil 4.55. Kütlece % 1'lik nafyon ile hazırlanmış enzimatik sensörün 0,025 mM, 0,050 mM ve 0,100 mM oksalik asite karşı gösterdiği duyarlılık

Şekil 4.56 incelendiğinde, kütlece % 3'lik nafyon ile hazırlanmış sensörün oksalik asit eklemelerine karşı duyarlılık gösterdiği ve artan derişim miktarına göre oluşan akım basamağı büyüklüklerinin de düzenli olarak büyüdüğü görülmektedir.



Şekil 4.56. Kütlece % 3'lük nafyon ile hazırlanmış enzimatik sensörün 0,025 mM, 0,050 mM ve 0,100 mM oksalik aside karşı gösterdiği duyarlılık

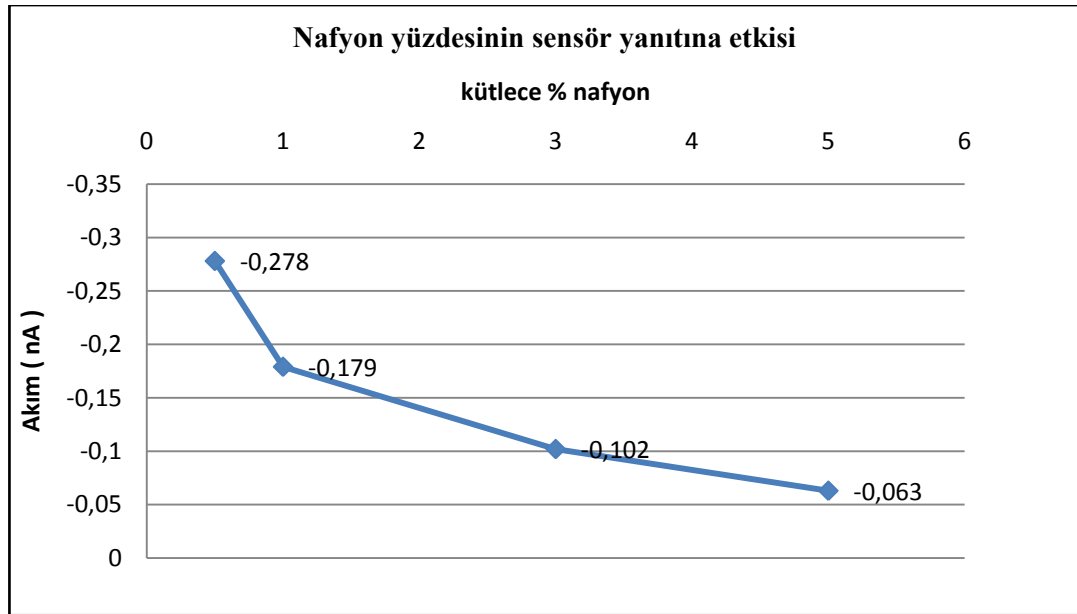
Şekil 4.57, kütlece % 5'lik nafyon ile hazırlanmış sensörün oksalik asit eklemelerine karşı duyarlılığını göstermektedir.



Şekil 4.57. Kütlece % 5'lik nafyon ile hazırlanmış enzimatik sensörün 0,025 mM, 0,050 mM ve 0,100 mM oksalik asite karşı gösterdiği duyarlılık

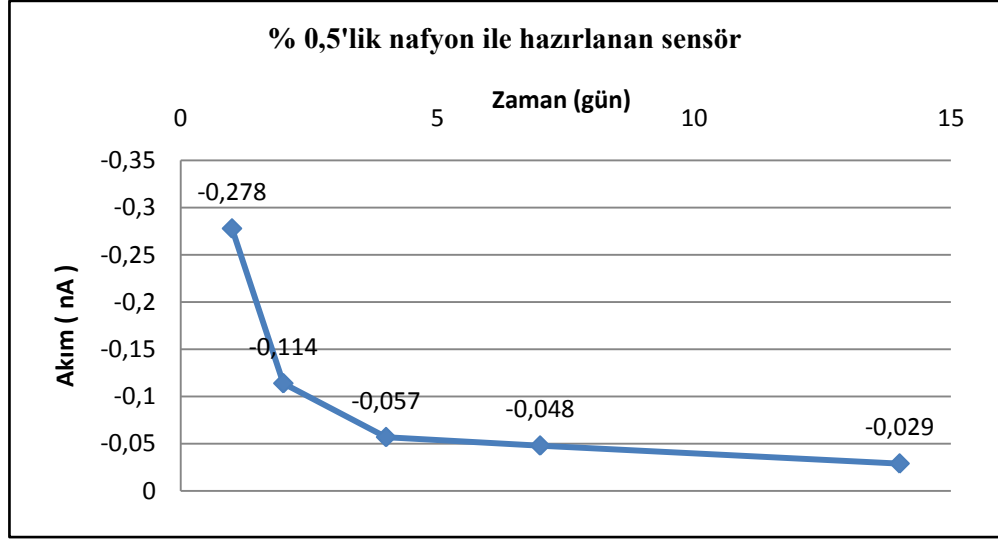
Şekil 4.57 incelendiğinde, kütlece % 5'lik nafyon ile hazırlanmış sensörün oksalik asit eklemelerine karşı duyarlılık gösterdiği ve artan derişim miktarına göre oluşan akım basamağı büyüklüklerinin de düzenli olarak büyüdüğü görülmektedir.

Farklı nafyon yüzdeleri ile hazırlanmış enzimatik sensörlerin duyarlılıkları karşılaştırıldığında, artan nafyon yüzdesi ile duyarlılığın azaldığı en iyi duyarlılığın kütlece % 0,5'lik nafyon ile hazırlanan enzimatik sensör ile elde edildiği belirlendi. Şekil 4.58, hazırlanan sensörlerin ilk günkü yanıtlarına göre duyarlılıklarının karşılaştırılmasını göstermektedir.



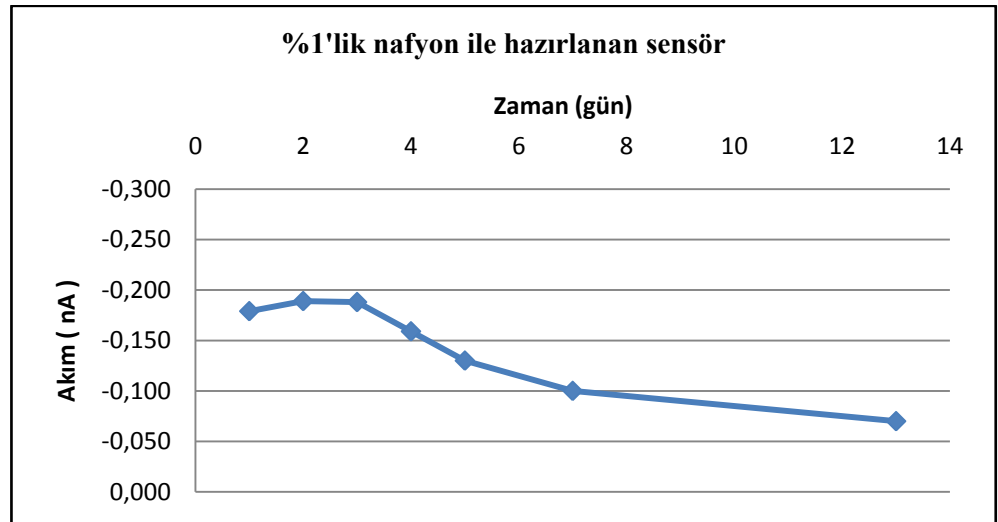
Şekil 4.58. Nafyon film hazırlanmasında kullanılan nafyon çözeltisi derişiminin sensör duyarlılığına etkisi

Polimer matriks altına immobilize etme ile daha önceden belirlenen koşullarda oksalat ölçümü için bir enzimatik sensör hazırlanabileceği belirlendikten sonra, en iyi duyarlılıkların elde edildiği kütlece % 1'lik ve % 0,5'lik sensörlerin aynı derişimdeki oksalik asit eklemelerine karşı gösterdiği duyarlılığın günden güne değişimini belirlemeye yönelik çalışmalar yapıldı. Şekil 4.59, kütlece % 0,5'lik nafyonun 0,05 mM oksalik aside olan duyarlılığının günden güne değişimini göstermektedir.



Şekil 4.59. Kütlece % 0,5'lik nafyon ile hazırlanmış enzimatik sensörün 50 μM 'lık oksalik asite karşı duyarlılığının günden güne değişimi

Şekil 4.59 incelendiğinde, kütlece % 0,5'lik nafyon ile hazırlanmış enzimatik sensörün oksalik asite karşı duyarlılığının ilk dört gün içerisinde çok hızlı bir şekilde azaldığı, dördüncü günden sonra ise duyarlılığının azalmaya devam ettiği, ancak ilk dört güne nazaran azalmaların daha düşük olduğu görülmektedir. Şekil 4.60, kütlece % 1'lik nafyonun 0,05 mM oksalik asite olan duyarlılığının günden güne değişimini göstermektedir.

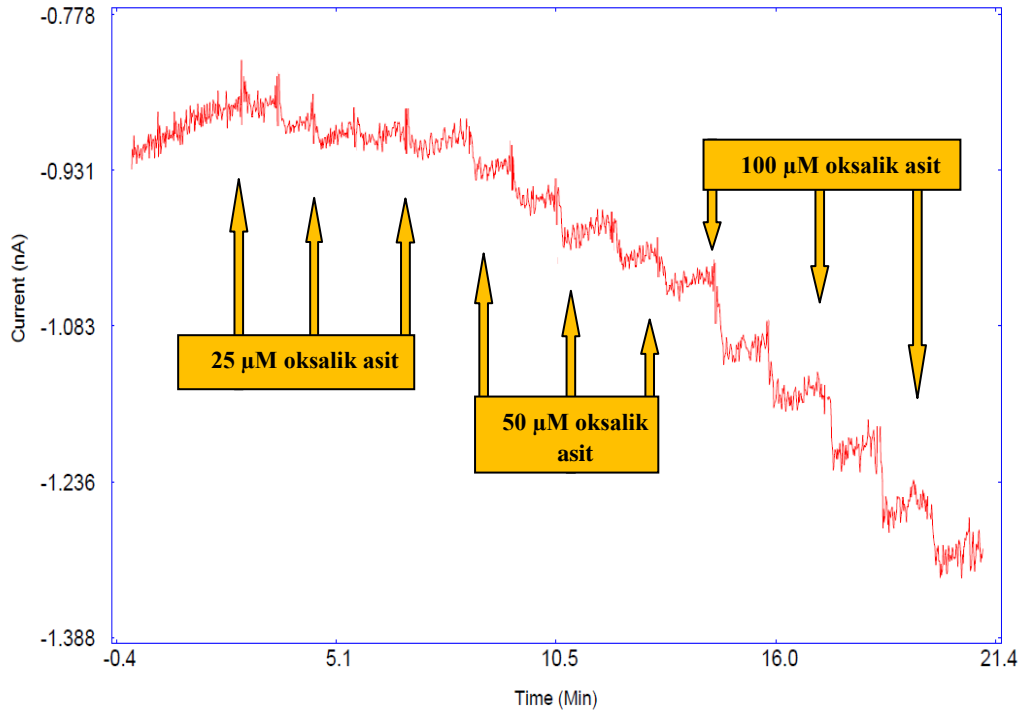


Şekil 4.60. Kütlece % 1'lik nafyon ile hazırlanmış enzimatik sensörün 50 μM 'lık oksalik asite karşı duyarlılığının günden güne değişimi

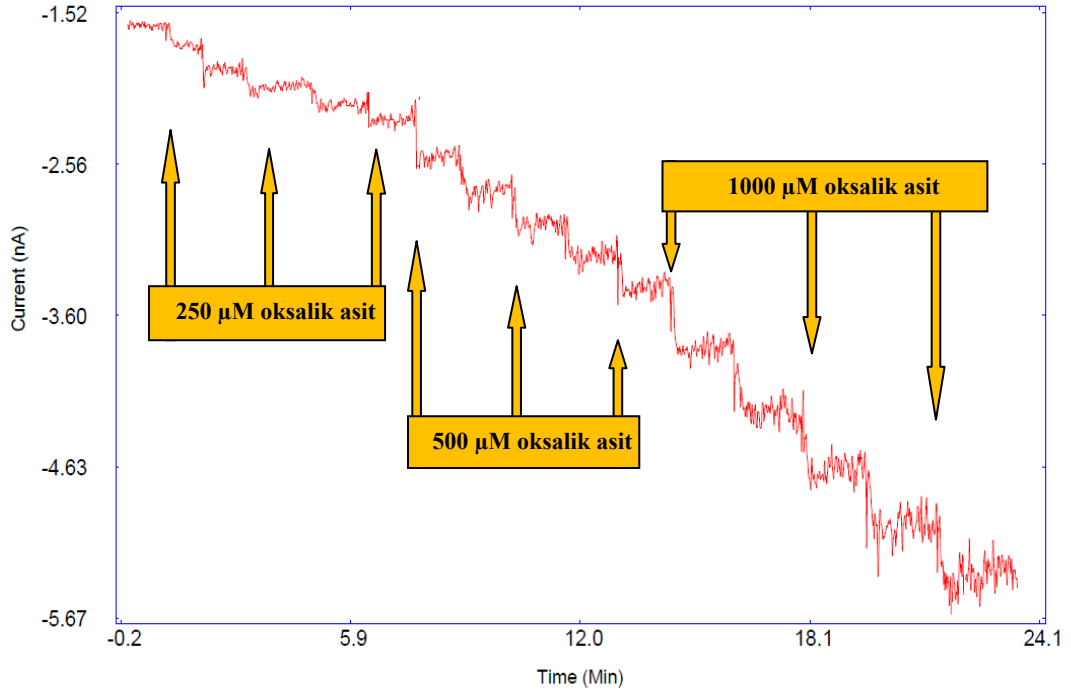
Şekil 4.60 incelendiğinde, kütlece % 1'lik nafyon ile hazırlanmış enzimatik sensörün oksalik asite olan duyarlılığının ilk dört gün içerisinde neredeyse aynı olduğu, dördüncü günden sonra ise duyarlılığın azaldığı görülmektedir.

Enzimatik sensörlerin duyarlılığının günden güne değişimi belirlendikten sonra, en iyi duyarlılığın elde edildiği kütlece %0,5'lik nafyon ile hazırlanan sensör ile 14. gündeki duyarlılık değerinde bir kalibrasyon grafiği hazırlanarak sensörün doğrusal çalışma aralığı belirlenmeye çalışıldı.

Şekil 4.61, küçük derişim bölgesi için (0,025–0,1 mM) beş tekrarlı olarak ölçüm alınmış akım basamağı oluşumlarına ait Time–Base grafiğini, Şekil 4.62 ise yüksek derişim bölgesi için (0,250–1,000 mM) beş tekrarlı olarak ölçüm alınmış akım basamağı oluşumlarına ait Time–Base grafiğini göstermektedir.



Şekil 4.61. Kütlece % 0,5'lik nafyonlu sensör ile kalibrasyon grafiği hazırlama çalışmasında 0,025 mM, 0,050 mM, 0,100 mM oksalik asit eklemelerine karşı elde edilen akım basamak büyüklükleri



Şekil 4.62. Kütlece % 0,5'lik nafyonlu sensör ile kalibrasyon grafiği hazırlama çalışmasında 0,250 mM, 0,500 mM, 1,000 mM oksalik eklemelerine karşı elde edilen akım basamak büyüklükleri

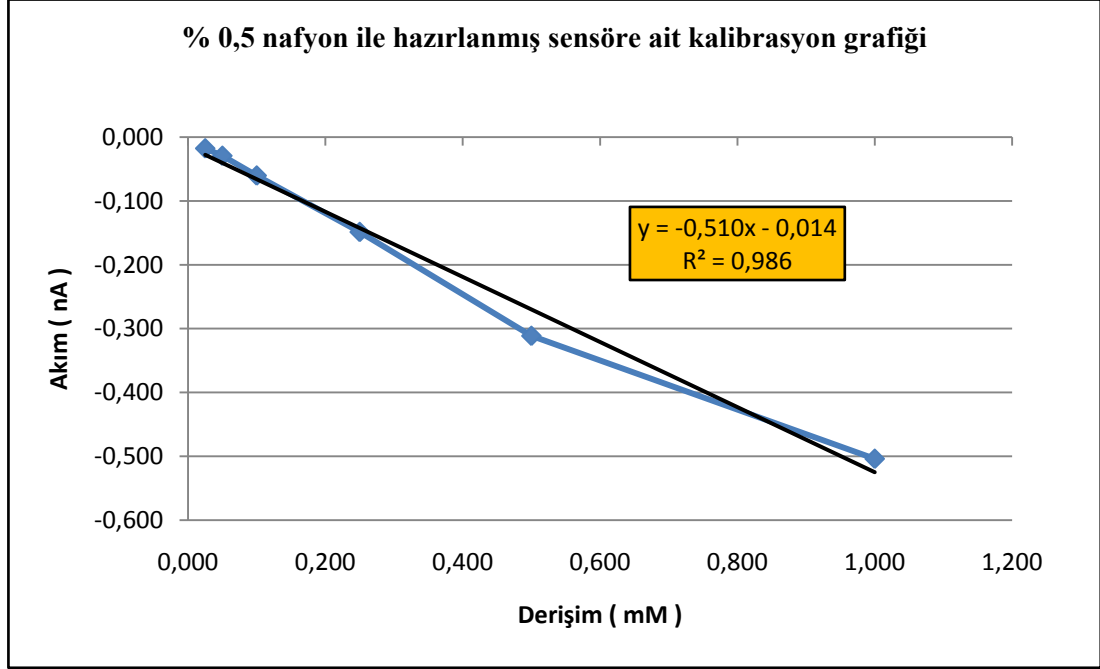
Çizelge 4.5, 0,025–1,000 mM derişim bölgesinde farklı derişimde oksalik asit eklemeleri sonucu oluşan akım basamağı büyüklüklerini göstermektedir.

Çizelge 4.5. 0,025–1,000 mM derişim aralığında % 0,5'lik nafyon ile hazırlanmış sensörün oksalik asit eklemelerine karşı oluşturduğu akım basamağı büyüklükleri

Derişim (mM)	1. Ölçüm (nA)	2. Ölçüm (nA)	3. Ölçüm (nA)	4. Ölçüm (nA)	5. Ölçüm (nA)	Ortalama (nA)	Standart Sapma (nA)
0,025	-0,020	-0,022	-0,018	-0,016	-0,012	-0,018	0,004
0,050	-0,030	-0,032	-0,028	-0,031	-0,025	-0,029	0,003
0,100	-0,060	-0,070	-0,061	-0,056	-0,054	-0,060	0,006
0,250	-0,149	-0,156	-0,164	-0,141	-0,133	-0,149	0,012
0,500	-0,315	-0,321	-0,318	-0,300	-0,303	-0,311	0,009
1,000	-0,500	-0,518	-0,532	-0,516	-0,454	-0,504	0,030

Çizelge 4.5'deki derişimlere karşılık gelen akım basamağı büyüklükleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen kalibrasyon eğrisinden (Şekil 4.63), hazırlanmış olan

enzimatik sensörün 0,025–1,00 mM derişim aralığında yeterince doğrusal yanıtlar verdiği görülmektedir.



Şekil 4.63. Kütlece % 0,5'lik nafyon ile hazırlanmış sensöre ait 0,025–1,000 derişim bölgesindeki kalibrasyon grafiği

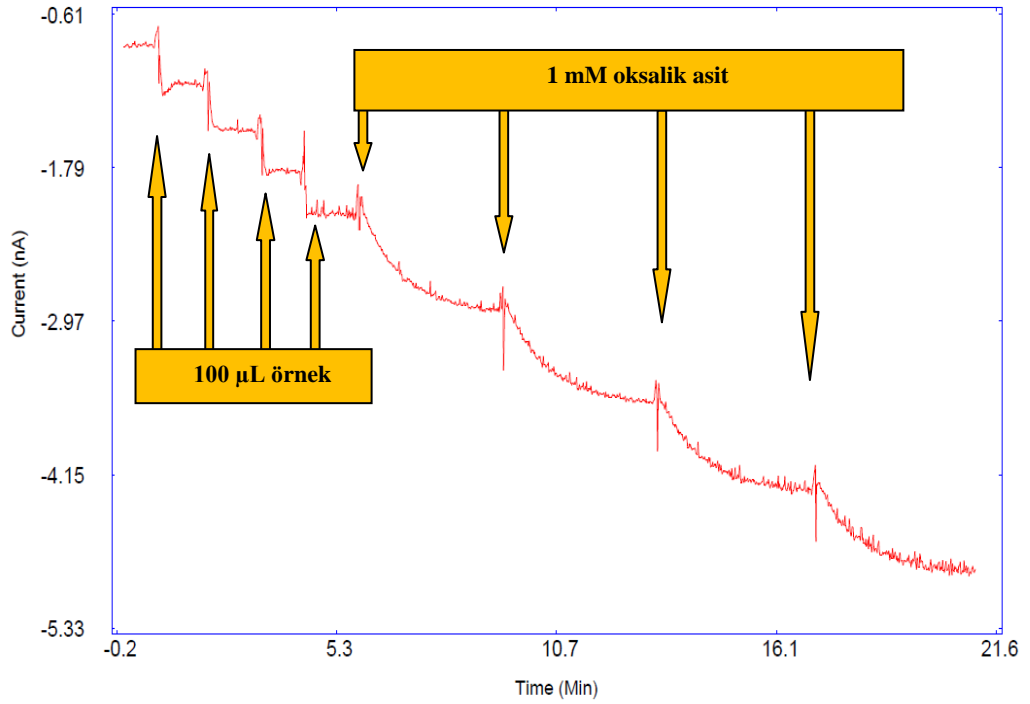
Nafyon ile yapılan çalışmalar sonucunda enzimatik oksalat sensörleri hazırlanabildi ve sensörün doğrusal çalışma aralığı belirlendi. Ayrıca çizilmiş olan kalibrasyon grafiği 14. güne ait olduğundan duyarlılık değışse bile doğrusallığın değışmediği böylece hazırlanmış sensör ile standart ekleme yöntemi kullanılarak gerçek örneklerle de çalışılabileceği belirlendi. Ayrıca farklı nafyon yüzdelinde hazırlanan sensörlerde artan nafyon yüzdesi ile sensör duyarlılığının ve duyarlılığın günden güne değışime miktarının azaldığı belirlenmiştir.

4.3.4. Gerçek örnek ile oksalat tayini çalışması

Hazırlanan tüm enzimatik sensörler içinden oksalata karşı en iyi duyarlılığın elde edildiği kütlece % 0,5'lik nafyonla hazırlanmış sensör ile ıspanak örneğinde gerçek örnek çalışması yapıldı.

Önceden yıkanarak kök ve gövde kısımları ayrılmış, sadece yaprak kısımları etüvde 105 °C’de kurutulup ardından plastik havan içerisinde dövülerek toz haline getirilmiş ve bu sırada 5/6 oranında kütle kaybına uğramış toz ıspanak örneği temin edildi. Örnekten 1 g tartıldı ve 50 mL saf su içerisinde 40 °C sıcaklıkta 30 dk boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Ardından 0,45 µm gözenekli teflon membran (millipore type HA) ile süzüldü ve 100 mL’ye tamamlandı.

Yapılan Time–Base çalışması ile standart ekleme metodu kullanılarak gerçek örnekteki oksalat miktarı belirlendi. Dört tekrarlı ve toplam hacim 10 mL olacak şekilde yapılan çalışmada, 100 µL örnek ölçüm çözeltilisine (pH 6,5 BRT) eklendi ve eklenen örneğin akım basamağı oluşturduğu gözlemlendi. Ardından derişimi bilinen oksalik asit çözeltilisinden ölçüm çözeltilisine, çözelti içerisinde 1 mM oksalik asit olacak şekilde eklemeler yapıldı ve çalışma tamamlandı. Şekil 4.64, yapılan Time–Base çalışmasında örnek ve derişimi bilinen oksalik asitin oluşturduğu akım basamaklarını göstermektedir.



Şekil 4.64. Standart ekleme metodu kullanılarak yapılan gerçek örnek çalışmasına ait Time–Base grafiği

Çizelge 4.6. Örnek ve derişimi bilinen oksalik asit eklemelerine karşı elde edilen akım basamağı büyüklükleri

	Ölçüm 1 (nA)	Ölçüm 2 (nA)	Ölçüm 3 (nA)	Ölçüm 4 (nA)	Ortalama (nA)	S.Sapma (nA)
Örnek	-0,310	-0,330	-0,306	-0,297	-0,311	0,014
Oksalat (1 mM)	-0,749	-0,721	-0,730	-0,667	-0,717	0,035

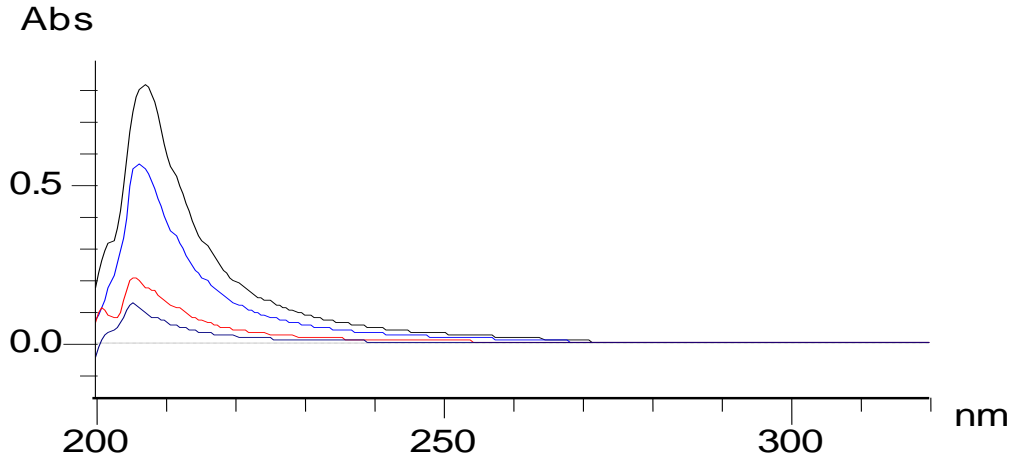
Çizelge 4.6, örnek ve derişimi bilinen oksalik asit eklemelerine karşı elde edilen akım basamağı büyüklüklerini göstermektedir. Çizelge 4.6'dan elde edilen veriler vasıtasıyla, gerekli hesaplamalar yapıldığında, 100 mL'lik örneğe ait derişim ve miktar değerleri Çizelge 4.7'den görülmektedir. Enzimatik sensör ile yapılan gerçek örnek çalışmasında 100 mL'deki oksalat miktarı; $0,382 \pm 0,017$ g olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.7. 100 mL'lik örneğe ait hesaplanan derişim ve miktar değerleri

	Ölçüm 1	Ölçüm 2	Ölçüm 3	Ölçüm 4	Ortalama	Std. Sapma
Derişim (mM)	43, 236	46,025	42,680	41, 423	44,353	2,365
Miktar (g)	0,380	0,405	0,376	0,365	0,382	0,017

Literatürde oksalat sensörleri ile gerçek örneklerde oksalat tayini için yapılan çalışmalar, UV–VIS spektrofotometrik çalışmalar ile doğrulanabilmekte ve kesinlikleri kıyaslanabilmektedir.

Bu amaçla, öncelikle pH 6,5 BRT'de oksalik asitin maksimum soğurum yaptığı 207 nm dalga boyunda 0,1–0,75 mM derişim aralığında doğrusal çalışmalar yapılabileceğini göstermek için bir kalibrasyon grafiği çalışması gerçekleştirildi. Yapılan çalışma toplam hacim 3 mL olacak şekilde kuvarz küvetler içerisinde ve dört tekrarlı olarak yapıldı. Şekil 4.65, yapılan kalibrasyon grafiği çalışmasında derişimlere karşı elde edilen absorbans eğrilerini, Çizelge 4.8 ise derişimlere karşı elde edilen absorbans değerlerini göstermektedir.



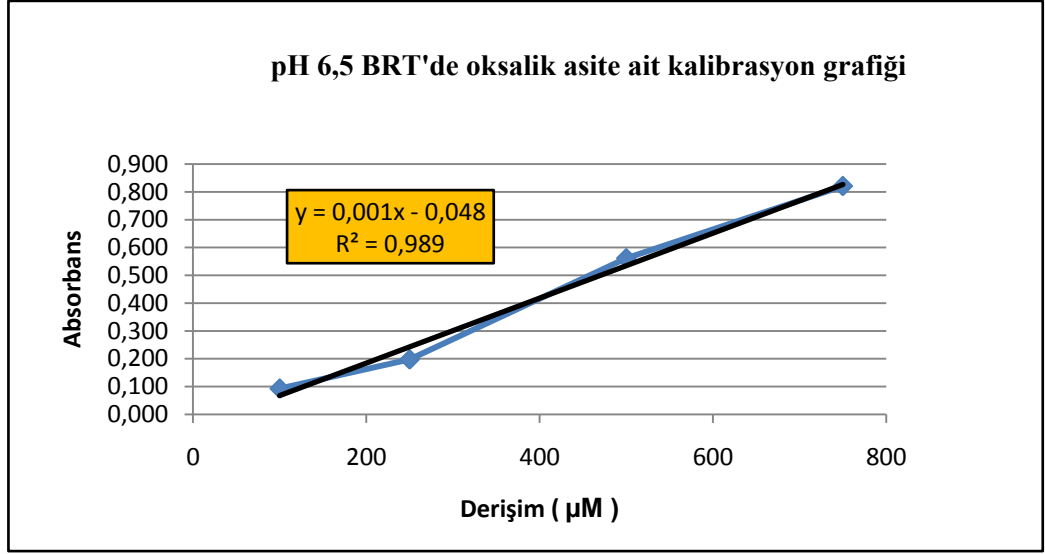
Şekil 4.65. pH 6,5 BRT’de 207 nm dalga boyunda farklı derişimlerdeki oksalik asite ait soğurum eğrileri, **0,10 mM**, **0,25 mM**, **0,50 mM**, **0,75 mM** oksalik asite ait soğurum eğrileri

Şekil 4.65 incelendiğinde, pH 6,5 BRT’de oksalik asitin 207 nm dalga boyunda soğurum yaptığı ve artan derişimle piklerin düzenli bir şekilde büyüdüğü görülmektedir.

Çizelge 4.8. 0,1–0,75 mM derişim aralığında oksalik asite karşı elde edilen soğurum değerleri

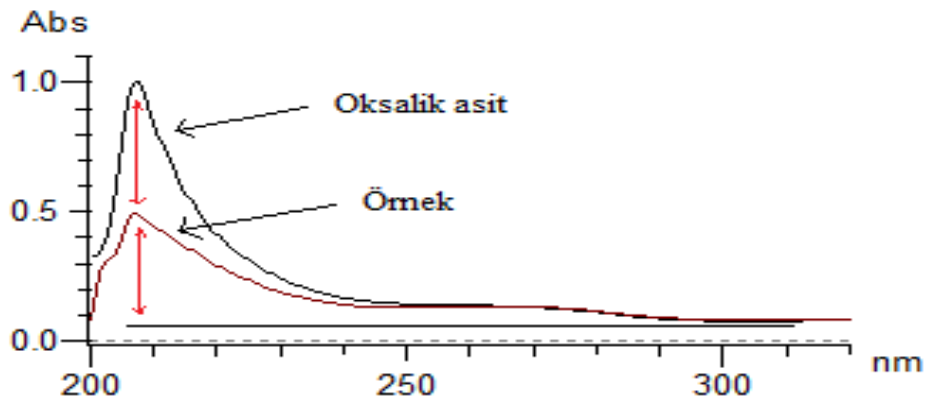
Derişim (mM)	Ölçüm 1 (A)	Ölçüm 2 (A)	Ölçüm 3 (A)	Ölçüm 4 (A)	Ort (A)	S.Sapma (A)
0,10	0,080	0,089	0,080	0,122	0,093	0,0200
0,25	0,206	0,189	0,204	0,191	0,198	0,0087
0,50	0,562	0,565	0,566	0,552	0,561	0,0064
0,75	0,812	0,820	0,820	0,832	0,821	0,0082

Çizelge 4.8’deki derişimlere karşı gelen absorbans değerleri grafiğe geçirildiğinde 0,10–0,75 mM değerleri arasında oldukça iyi bir doğrusal çalışma aralığı elde edildiği Şekil 4.66’daki kalibrasyon grafiğinden görülmektedir. Elde edilen eğrinin korelasyon katsayısı, R^2 : 0,989 olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.66. pH 6,5 BRT ve 207 nm’de oksalik asite ait kalibrasyon grafiği

pH 6,5 BRT koşullarında 0,10–0,75 mM derişim aralığında doğrusal çalışmalar yapılabileceği belirlendikten sonra standart ekleme metodu ile gerçek örnekle çalışmalar yapıldı. Dört tekrarlı ve toplam hacim 3 mL olacak şekilde yapılan çalışmada, 25 µL rnek ölüm zeltisine (pH 6,5 BRT) eklendi. Ardından derişimi bilinen oksalik asit zeltisinden ölüm zeltisine, zelti içerisinde 0,5 mM oksalik asit olacak şekilde ekleme yapılarak çalışma tamamlandı. Şekil 4.67, pH 6,5 BRT’de örnek ve derişimi belli oksalik asite ait soğurum eğrilerini göstermektedir.



Şekil 4.67. 207 nm’de örnek ve derişimi bilinen oksalik asite ait soğurum pikleri

Şekil 4.67'deki soğurum eğrileri incelendiğinde, örnek eklemeleri sonucu elde edilen soğurum pikinin oksalik asite ait soğurum piki ile aynı dalga boyunda olduğu dolayısıyla elde edilen pikin oksalata ait olduğu görülmektedir. Yapılan çalışma sonucu elde edilen soğurum değerleri Çizelge 4.9'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.9. Örnek ve derişimi bilinen oksalik asite ait soğurum değerleri

	Ölçüm 1 (A)	Ölçüm 2 (A)	Ölçüm 3 (A)	Ölçüm 4 (A)	Ort (A)	S.Sapma (A)
Örnek	0,394	0,398	0,409	0,415	0,404	0,010
Oksalat (0,50 mM)	0,514	0,519	0,506	0,509	0,512	0,006

Çizelge 4.9'den elde edilen veriler vasıtasıyla, gerekli hesaplamalar yapıldığında 100 mL'lik örneğe ait derişim ve miktar değerleri Çizelge 4.10'da görülmektedir. Spektrofotometrik yöntem ile yapılan gerçek örnek çalışmasında 100 mL'deki oksalat miktarı; $0,417 \pm 0,010$ g olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.10. 100 mL'lik örneğe ait hesaplanan derişim ve miktar değerleri

	Ölçüm 1	Ölçüm 2	Ölçüm 3	Ölçüm 4	Ortalama	Std. Sapma
Derişim (mM)	46,172	46,641	47,930	48,633	47,344	1,136
Miktar (g)	0,406	0,410	0,422	0,428	0,417	0,010

İki yöntemle de bulunan sonuçların ortalaması kıyaslandığında, enzimatik sensör ile elde edilen miktar, spektrofotometrik yöntemle elde edilen miktarın % 93,765 kadarı olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak yapılan enzimatik sensör ile gerçek örnekle de kıyaslamalı olarak çalışmalar yapılabileceği gösterilmiş ve oksalat ölçümü için H_2O_2 'nin yükseltgenmesine dayanan bu yeni yöntemin uygulanabilirliği belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Oksalat enzimatik sensörlerinin hazırlanması ile ilgili literatürde pek çok çalışma bulunmaktadır. Ancak yapılan araştırmalar sonucunda amperometrik ölçüm ilkesine (H_2O_2 'nin indirgenmesi veya yükseltgenmesi ilkesi) dayanan oksalat sensörü hazırlanması çalışmalarında bazı eksik noktalar görülmüş ve bu eksikler üzerine gidilerek yeni bir oksalat sensörü geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Literatürde var olan çalışmalarda genellikle H_2O_2 'nin indirgenmesi ölçüm ilkesine dayanan sensörler hazırlanmıştır. Ancak katodik potansiyellerde çalışma elektrotu olarak platin elektrotlar kullanıldığında, platin elektrot yüzeyinde çözülmüş O_2 gazının da H_2O_2 'nin indirgenmesi potansiyellerde indirgenmesi nedeniyle tekrarlanmazlıklar olabilmektedir. Tekrarlanmazlıklardan gelecek hataları engellemek amacıyla çözülmüş oksijen giderme işlemi yapılabilen ancak bu durumda da uçucu H_2O_2 bileşiğinin çözelti içerisinde eksilmesi söz konusu olabilmektedir. Bu tür hatalardan kaçınmak için katodik potansiyellerde H_2O_2 için daha az duyarlılık gösteren GC, karbon pasta, grafit gibi elektrotlar ile çalışmalar yapılmıştır. Duyarlılığı arttırmak için ise daha büyük yüzeyli elektrotlar kullanılmış ve genellikle elektrot yüzeyleri modifiye edilmiştir. Modifiye edilen elektrot yüzeyleri ile hem H_2O_2 'nin indirgenmesine karşı daha iyi duyarlılık elde edilmiş hem de çözülmüş O_2 'den gelebilecek hatalar engellenmiştir. Bazı çalışmalarda doğrusal çalışma aralığının üst sınırları 10^{-2} M mertebesine ulaşabilmektedir. Ancak çözelti ortamında oksalik asit derişiminin yüksek olduğu durumlarda (mM mertebesinde) ortam pH'sinde değişmeler olduğundan H_2O_2 'ye ait pik potansiyelinin dolayısıyla H_2O_2 'nin duyarlılığında değişmelere neden olabilmekte ve literatürdeki çalışmalarda bu etki göz ardı edilmektedir.

Yapılan araştırmada literatürde H_2O_2 'nin yükseltgenmesi ölçüm ilkesine dayanan bir oksalat sensörü hazırlanması çalışılmasına rastlanmamıştır. Bu durumun olası nedeni; oksalat oksidaz enzimin yüksek aktivite gösterdiği çalışma koşullarında (pH 2–4), oksalik asitin enzimatik süreçte oluşan H_2O_2 ile girişim yapıyor ve oksalik asit ile H_2O_2 'nin anodik bölgedeki analiz koşullarının çok iyi bilinmiyor oluşudur.

Bu tez çalışmasında, çalışma elektrotu yüzeyinde herhangi bir modifiye işlemi yapılmadan sadece pH ayarlaması yapılarak anodik potansiyellerde H_2O_2 ölçümüne dayalı bir enzimatik oksalat sensörü hazırlanması amaçlanmıştır. Bu kapsamda yapılan çalışmalar sonucunda ise H_2O_2 ve oksalik asitin elektrokimyasal davranışlarının pH, elektrolit bileşimi ve çalışma elektrotuna olan bağımlılığı incelenmiş ve farklı immobilizasyon yöntemleri ile anodik potansiyellerde H_2O_2 ölçüm ilkesine dayalı birkaç enzimatik sensör hazırlanmıştır. Yapılan çalışmada elde edilen sonuçlardan vurgulanmak istenilenler aşağıda belirtilmiştir.

- Önlem alınmaması halinde H_2O_2 ve $H_2C_2O_4$ bileşenlerinin aynı potansiyellerde yükseltgenme piki vererek birbirinin analizini etkilediği, oksalik asidin anodik ve katodik bölgelerdeki elektro aktifliklerinin çalışma elektrotu, tampon çözelti bileşimi ve pH'sine olan bağımlılıkları belirlendi.
- Katodik bölgede yapılan çalışmalarda anodik bölgedekilere nazaran daha iyi duyarlılık elde edilmesine rağmen, çözünmüş oksijenden kaynaklanan tekrarlanmazlıklar yüzünden katodik bölge potansiyellerinde çalışan bir sensör hazırlanmasının bazı olumsuzluklar taşıyacağı belirlendi.
- Ölçüm ortamına ardı ardına oksalik asit eklemeleri ile gerçekleştirilen voltametrik analiz çalışmalarında, eklenen oksalik asitin ölçüm ortamının pH'si üzerinde etkili olduğu, ölçüm ortamının tamponlama kapasitesi yüksek olsa bile pH'nin önemli ölçüde değişimine yol açtığı ve bunun sonucu olarak da, yükseltgenme pikinin potansiyelinin kaydığı, pik akımı gözlemlerinde düzensizliklerin ortaya çıkabildiği belirlendi. Ardı ardına eklemelerde kullanılacak oksalik asit çözeltisinin önceden tamponlanmış şekilde hazırlanması halinde söz konusu pH değişimlerinden kaçınılabileceği belirlendi.
- $pH \leq 4$ olan pH bölgesinde oksalik asit ile H_2O_2 'nin yükseltgenme piklerinin tamamen girişim yaptığı ve bu iki maddenin yükseltgenme piklerinin birbirinden ayrılabilirdiği minimum pH'nin pH 6,5 olduğu belirlendi.

- Optimize edilen koşullarda (pH 6,5 BRT ve + 530 mV potansiyelde) H₂O₂ analizinin gerçekleştirilebileceği çizilen kalibrasyon grafiği ile gösterildi.
- Optimize edilen koşullarda iki farklı immobilizasyon yöntemleri ile de oksalata duyarlı enzimatik sensörler hazırlandı.
- Hazırlanan sensörlerden kütlece % 2,5'lik glutaraldehit ile hazırlanan sensörün duyarlılığının hazırlanan diğer sensörlere göre daha uzun süre stabil kaldığı, en iyi duyarlılığı kütlece % 0,5'lik nafyon ile hazırlanan sensörün gösterdiği, nafyon ile hazırlanan sensörlerde, nafyon yüzdesinin artmasıyla sensör duyarlılığının azaldığı, ancak buna bağlı olarak da duyarlılığın günden güne değişiminin daha stabil kaldığı belirlendi.
- Hazırlanan sensörlerin duyarlılıklarının günden güne değişmesine rağmen doğrusalıklarının değişmediği, böylece standart ekleme metodu kullanılarak gerçek örnekler ile çalışılabileceği belirlendi. Toz haline getirilmiş ıspanak örneklerinde oksalat analizi başarı ile gerçekleştirilmiş, çalışmada 1 g ıspanak tozunda 382 ±17 mg oksalat bulunmuş, literatürdeki değerler ile kıyaslandığında (Perez ve ark. 2001, 100 g ıspanakta 798 ± 42 mg oksalat) miktarın oldukça fazla olduğu görülmüştür. Bu durum çalışılan ıspanak tozu numunesinin oksalatın en bol olarak bulunduğu yaprak kısmından elde edilmiş ve kurutma işleminde kütlede 5/6 oranında kayıp olmuş olması ile açıklanabilmektedir.
- Ayrıca idrar gibi biyolojik örneklerde de hazırlanan sensörlerin aktifliklerini korudukları, sistematik incelemelerde kullanılabileceği belirlendi.
- Gerçek örneklerle de çalışmalar yapılmış ve elde edilen sonuçlar spektrofotometrik yöntemle de kıyaslanmıştır. Enzimatik elektrot ile elde edilen miktarın spektrofotometrik yöntemle elde edilen miktarın % 93,765 olduğu belirlenmiştir.

- Literatürdeki diğer oksalat sensörü çalışmalarına göre, olanakların yeterli olmamasından dolayı daha az miktarda enzim kullanılmasına, oksalat oksidaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değerlerinde çalışmalar yapılamamasına ve oksalat oksidaz enziminin aktivitesini arttıran bovin serum albumin (BSA) kullanılmamasına rağmen yine de oldukça geniş bir çalışma aralığında çalışma yapma imkanı yakalanmıştır.
- Çalışma elektrotunun yüzeyinde herhangi bir modifiye işlemi yapılmadan sadece pH optimizasyonu yapılarak, H₂O₂'nin anodik pik akımlarının ölçüm ilkesine dayalı bir enzimatik sensör geliştirilmiştir.
- Ayrıca, UV-VIS spektrofotometrik çalışmalar ile oksalik asit analizi yapılabileceği çizilen kalibrasyon grafiği ile gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- Arvinte, A., Rotariu, L., Bala C. 2006.** Development a pesticides biosensor using carbon based electrode systems. *Chemicals as Intentional and Accidental Global Environmental Threats*, 337 – 343.
- Atasağungil, M. 1965.** Enzimler. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 140 s.
- Aykut, U., Temiz, H. 2006.** Biyosensörler ve gıdalarda kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3: 51 – 59.
- Bard, A.J., Faulkner, L.R. 2001.** Electrochemical methods, John Wiley and Sons Inc., New York, USA, 833 pp.
- Bradley, C.R., Rechnitz, G.A. 1986.** Comparison of oxalate oxidase enzyme electrodes for urinary oxalate determinations. *Analytical Letters*, 19 (1 & 2): 151 – 162.
- Bunde, R.L., Jarvi, E.J., Rosentreter, J.J. 1998.** Piezoelectric quartz crystal biosensors. *Talanta*, 46: 1223 – 1236.
- Capra, R.H., Strumia, M., Vadgama, P.M., Baruzzi, A.M. 2005.** Musin / carbopol matrix to immobilize oxalate oxidase in a urine oxalate amperometric biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 530: 49 – 54.
- Chamjangali, M.A., Sharif – Razavian, L., Yousefi, M., Amin, A.H. 2009.** Determination of trace amounts of oxalate in vegetable and water samples using a new kinetic – catalytic reaction system. *Spectrochimica Acta Part A*, 73: 112 – 116.
- Çınar, M. 2006.** Pt biriktirilmiş polivinil ferrosen modifiye Pt elektrotunu temel alan yeni bir kolin biyosensörünün geliştirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Konya.
- Dimeski, G., Badrick, T., John, A. 2010.** Ion selective electrodes (ISEs) and interferences. *Clinica Chimica Acta*, 411: 309 – 317.
- Dinçkaya, E., Telefoncu, A. 1994.** Development of a biosensor by covalent oxalate oxidase coupling on cellulose acetate membranes for oxalate determination. *Tr. J. of Chemistry*, 18: 1 – 8.
- Eggins, B.R. 2002.** Chemical Sensors and Biosensors, John Wiley and Sons Ltd, West Sussex, England, 273 pp.
- Ekinci, E., Özden, M., Karagözler, A.A., Türkdemir, M.H., Karagözler, A.E. 1995.** Preperation and optimization of conducting polymer (polypyrrole) as a glucose sensor. *Tr. J. of Chemistry*, 19: 170 – 178.

Ercole, C., Gallo, M.D., Mosiello, L., Baccella, S., Lepidi, A. 2003. Escherichia coli detection in vegetable food by a potentiometric biosensor. *Sensors and Actuators B*, 91: 163 – 168.

Fiorito, P.A., Torresi, S.C. 2004. Optimized multilayer oxalate biosensor. *Talanta*, 62: 649 – 654.

Gerard, M., Chaubey, A., Malhotra, B.D. 2002. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensor and Bioelectronics*, 17: 345 – 359.

Gonçálvez, D., Prazeres, D.M.F., Chu, V., Conde J.P. 2008. Detection of DNA and proteins using amorphous silicon ion- sensitive thin - film field effect transistors. *Biosensors and Bioelectronics*, 24: 545 – 551.

Gülce, H., Ataman, İ., Gülce, A., Yıldız, A. 2002. A new amperometric enzyme electrode for galactose determination. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 41 – 44.

Gülce, H., Gülce, A., Kavanoz, M., Coşkun, H., Yıldız, A. 2002. A new amperometric enzyme electrode for alcohol determination. *Biosensors and Bioelectronics*, 17: 517 – 521.

Hong, F., Nilvebrant, N.O., Jönsson, L.J. 2003. Rapid and convenient determination of oxalic acid employing a novel oxalate biosensor based on oxalate oxidase and SIRE technology. *Biosensors and Bioelectronics*, 18: 1173 – 1181.

İnal, M.E. 1996. Biyokimya: 9. Ünite, Anadolu Üniversitesi Yayınları No: 489, Eskişehir, s 91 – 104.

Jiang, X., Zhu, L., Yang, D., Mao, X., Wu, Y. 2009. Amperometric ethanol biosensor based on integration of alcohol dehydrogenase with methyl orange / ordered mesoporous carbon electrode. *Electroanalysis*, 21 (14): 1617 – 1623.

Kafi, A.K.M., Chen, A. 2009. A novel amperometric biosensor for the detection of nitrophenol. *Talanta*, 79: 97 – 102.

Keusgen, M., Kloock, J.P., Knobbe, D.T., Jünger, M., Krest, I., Goldbach, M., Klein, W., Schöning, M.J. 2004. Direct determination of cyanides by potentiometric biosensors. *Sensors and Actuators B*, 103: 380 – 385.

Kharitonov, A.B., Zayats, M., Alfonta, L., Katz, E., Willner, I. 2001. A novel ISFET – based NAD^+ - dependent enzyme sensor for lactate. *Sensors and Actuators B*, 76: 203 – 210.

Kim, H., Yoon, S.H., Choi, H.N., Lyu, Y., Lee, W. 2006. Amperometric glucose biosensor based on sol – gel – derived zirconia / nafion composite film as encapsulation matrix. *Bull Korean Chem. Soc.*, 27 (1): 65 – 70.

Koncki, R. 2007. Recent development in potentiometric biosensors for biomedical analysis. *Analytica Chimica Acta*, 599: 7 – 15.

Kumar, S., Chauhan, V.S., Nahar, P. 2008. Preparation of biomolecule – ligated polystyrene cuvetts and their applications in diagnostics. *Microchemical Journal*, 89: 148 – 152.

Lee, N.Y., Jung, Y.K., Park, H.G. 2006. On – chip colorimetric biosensor based on polydiacetylene embedded in photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogel. *Biochemical Engineering Journal*, 29: 103 – 108.

Masar, M., Zuborova, M., Kaniansky, D., Stanislavski, B. 2003. Determination of oxalate in beer by zone electrophoresis on a chip with conductivity detection. *J. Sep. Sci.*, 26: 647 – 652.

Milardovic, S., Kerekovic, I., Nodilo, M. 2008. A novel biamperometric biosensor for urinary oxalate determination using flow – injection analysis. *Talanta*, 77: 222 – 228.

Milardovic, S., Grabaric, Z., Rumenjak, V., Jukic, M. 2000. Rapid determination of oxalate by amperometric oxalate oxidase – based electrode. *Electroanalysis*, 12 (13): 1051 – 1058.

Milardovic, S., Grabaric, Z., Grabaric, B.S. 2000. Sensitive amperometric oxalate biosensor for food analysis. *Food Technol. Biotechnol.*, 38 (3): 203 – 210.

Mishra, R., Yadav, H., Pundir, C.S. 2010. An amperometric oxalate biosensor based on sorghum leaf oxalate oxidase immobilized on carbon paste electrode. *Analytical Letters*, 43: 151 – 160.

Mulchandani, P., Mulchandani, A., Kaneva, I., Chen, W. 1999. Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents . 1. Potentiometric enzyme electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 14: 77 – 85.

Özata, A., Kutlu, M. 2000. Enzimoloji Ders Notları, Anadolu Üniversitesi Yayınları; No. 1254, Eskişehir, 117 s.

Perez, E.F., Neto, G.O., Kubota, L.T. 2001. Bi – enzymatic amperometric biosensor for oxalate. *Sensors and Actuators B*, 72: 80 – 85.

Prodromidis, M.I., Karayannis, M.I. 2002. Enzyme based amperometric biosensors for food analysis. *Electroanalysis*, 14 (4): 241 – 261.

Pundir, C.S., Bhambi, M., Chauhan, N.S. 2009. Chemical activation of egg shell membrane for covalent immobilization of enzymes and its evaluation as inert support in urinary oxalate determination. *Talanta*, 77: 1688 – 1693.

Pundir, C.S., Sharma, M. 2010. Oxalate biosensor: a review. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 69: 489 – 494.

- Reddy, S.M., Higson, S.P., Vadgama, P.M. 1997.** Amperometric enzyme electrode for the determination of urine oxalate. *Analytica Chimica Acta*, 343: 59 – 68.
- Reddy, R.R.K., Chadha, A., Bhattacharya, E. 2001.** Porous silicon based potentiometric triglyceride biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 16: 313 – 317.
- Rodriguez, B.B., Bolbot, J.A., Tothill, I.E. 2004.** Urease – glutamic dehydrogenase biosensor for screening heavy metals in water and soil samples. *Anal Bioanal Chem*, 380 : 284 – 292.
- Romero, M.R., Ahumada, F., Garay, F., Baruzzi, A.M. 2010.** Amperometric biosensor for direct blood lactate detection. *Anal. Chem.*, 82: 5568 – 5572.
- Salimi, A., Hallaj, R., Soltanian, S. 2009.** Fabrication of a sensitive cholesterol biosensor based on cobalt – oxide nanostructures electrodeposited onto glassy carbon electrode. *Electroanalysis*, 21 (24): 2693 – 2700.
- Santini, A.O., Lemos, S.C., Pezza, H.R., Carloni – Filho, J., Pezza, L. 2008.** Development of a potentiometric sensor for the determination of saccharin in instant tea powders, diet soft drinks and strawberry dietetic jam. *Microchemical Journal*, 90: 124 – 128.
- Santos, A.S., Pereira, A.C., Sotomayor, M.D.P.T., Tarley, C.R.T., Duran, N., Kubota, L.T. 2007.** Determination of phenolic compounds based on co – immobilization of methylene blue and HRP on multi – wall carbon nanotubes. *Electroanalysis*, 19 (5): 549 – 554
- Sarkar, P., Tothill, I.E., Setford, S.J., Turner, A.P.F. 1999.** Screen – printed amperometric biosensors for the rapid measurement of L and D – amino acids. *The Analyst*, 124: 865 – 870.
- Serra, B., Gamella, M., Reviejo, A.J., Pingarron, J.M. 2008.** Lectin – modified piezoelectric biosensors for bacteria recognition and qualification. *Anal Bioanal Chem*, 391: 1853 – 1860.
- Sezgintürk, M.K., Dinçkaya, E. 2003.** A novel amperometric biosensor based on spinach tissue homogenate for urinary oxalate determination. *Talanta*, 59: 545 – 551.
- Sheldon, R.A. 2007.** Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv. Synth. Catal.*, 349: 1289 – 1307.
- Shin, J.H., Yoon, S.Y., Yoon, I.J., Choi, S.H., Lee, S.D., Nam, H., Cha, S.G. 1998.** Potentiometric biosensors using immobilized enzyme layers mixed with hydrophilic polyurethane. *Sensors and Actuators B*, 50: 19 – 26.

Sikora, P., Beck, B., Zajaczkowska, M., Hoppe, B. 2009. Plasma oxalate level in pediatric calcium stone formers with or without secondary hyperoxaluria. *Urol Res*, 37: 101 – 105.

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. 1996. Analitik Kimya Temelleri, Saunders College Publishing, Orlando, USA, 496 pp.

Sljukic, B., Baron, R., Compton, R.G. 2007. Electrochemical determination of oxalate at pyrolytic graphite electrodes. *Electroanalysis*, 19 (9): 918 – 922.

Söylemez, Z., Fadiloğlu, S. 1996. Laboratory Manuel Enzyme Purification and Immobilization: Experiment 10, Gaziantep University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, pp 47 – 54.

Pizzariello, A., Stredansky, M., Stredanska, S., Miertus, S. 2000. Amperometric pH-sensing biosensors for urea penicilin and oxalacetate. *Analytica Chimica Acta*, 415: 151 – 157.

Suzuki, H., Nagata, M., Ohzono, S., Fujimoto, C. 2005. Determination of oxalate in human serum in the nM range by on – column sample preconcentration – capillary zone electrophoresis with direct absorbance detection. *Chromatographia*, 61: 333 – 337.

Şenol, Ş., Sarıhan, A., Türkdemir, M.H. 2009. Preparation a leakproof voltammetric Ag/AgCl reference electrode for aqueous HF solutions. 8.th International Electrochemistry Meeting, 8 – 11 October 2009, Side, Turkey

Şenol, Ş., Sarıhan, A., Türkdemir, M.H. 2010. Oksalik asitin voltametric davranışının incelenmesi. 5. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 21 – 25 Haziran 2010, Erzurum.

Telefoncu, A. 1997. Enzimoloji, Lisansüstü Yaz Okulu Ders Notları, Kuşadası, 446 pp.

Telefoncu, A. 1999. Biyosensörler, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Ders Notları, Kuşadası, 280 s.

Teles, F.R.R., Fonseca, L.P. 2008. Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors. *Materials Science and Engineering C*, 28: 1530 – 1543.

Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, S.G. 2001. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Analytical Letters*, 34 (5): 635 – 659.

Tombelli, S., Mascini, M., Sacco, C., Turner A.P.F. 2000. A DNA Piezoelectric biosensor assay coupled with a polymerase chain reaction for bacterial toxicity determination in environmental samples. *Analytica Chimica Acta*, 418: 1 – 9.

Türkdemir, M.H. 2008. Enstrümantal Analiz – II, Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Ders Notları, Bursa, 138 pp.

Yablotskii, K.V., Shekhovtsova, T.N. 2010. Enzymatic determinations of anions. *Journal of Analytical Chemistry*, 65 (7): 660 – 673.

Yamazaki, S., Fujiwara, N. Yasuda, K. 2010. A catalyst that uses a rhodium phtalocyanin for oxalic acid oxidation and its application to an oxalic acid sensor. *Electrochimica Acta*, 55: 753 – 758.

Yang, M., Yang, Y., Yang, Y., Shen, G., Yu, R. 2005. Microbiosensor for acetylcholine and choline based on electropolymerization / sol – gel derived composite membrane. *Analytica Chimica Acta*, 530: 205 – 211.

Wan, K., Chovelon, J.M., Jaffrezic – Renault, N. 2000. Enzyme – octadecylamine Langmuir – Blodgett membrans for ENFET biosensors. *Talanta*, 52: 663 – 670.

Wang, J. 1995. Electroanalysis and biosensors. *Anal. Chem.*, 67 (12): 487 – 492.

Wang, B., Zhang, J., Cheng, G., Dong, S. 2000. Amperometric enzyme electrode for the determination of hydrojen peroxide based on sol – gel / hydrogel composite film. *Analytica Chimica Acta*, 407: 111 – 118.

Wang, J. 2006. Analitical Electrochemistry, John Wiley and Sons Inc., New Jersey, USA, 250 pp.

Wang, Y., Xu, H., Zhang, J., Li, G. 2008. Electrochemical sensors for clinic anaysis. *Sensors*, 8: 2043 – 2081.

Zhang, S., Wright, G., Yang, Y. 2000. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosensors and Bioelectronics*, 15: 273 – 282

Zheng, Y., Yang, C., Pu, W., Zhang, J. 2009. Determination of oxalic acid in spinach with carbon nanotubes – modified electrode. *Food Chemistry*, 114: 1523 – 1528.

Zhu, J., Zhu, Z., Lai, Z., Wang, R., Guo, X., Wu, X., Zhang, G., Zhang, Z., Wang, Y., Chen,Z. 2002. Planar amperometric glucose sensor based on glucose oxidase immobilized by chitosan film on prussian blue layer. *Sensors*, 2: 127 – 136

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Şener ŞENOL
Doğum Yeri ve Tarihi : Malkara/23.11.1985

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Malkara Süper Lisesi (Y.D.A.L.)
Lisans : U.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Yüksek Lisans : U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl :

İletişim (e – posta) : ssenersenol@hotmail.com

Yayınları :