



**T.C.**

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**AROMATİK SÜLFONİK ASİT BOYAR MADDELERLE MODİFİYE  
KALEM GRAFİT ELEKTROT HAZIRLANMASI VE AKIŞA  
ENJEKSİYON AMPEROMETRİK BİYOSENSÖR TASARIMI**

**Mehmet GÜNEŞ**

**Kimya Anabilim Dalı**

**ÇANAKKALE**

**T.C.**  
**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**DOKTORA TEZİ**

**AROMATİK SÜLFONİK ASİT BOYAR MADDELERLE MODİFİYE**  
**KALEM GRAFİT ELEKTROT HAZIRLANMASI VE AKIŞA**  
**ENJEKSİYON AMPEROMETRİK BİYOSENSÖR TASARIMI**

**Mehmet GÜNEŞ**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Tezin Sunulduğu Tarih: 26/06/2018**

**Tez Danışmanı:**

**Prof. Dr. Yusuf DİLGİN**

**ÇANAKKALE**

Mehmet GÜNEŞ tarafından Prof. Dr. Yusuf DİLGİN yönetiminde hazırlanan ve 26/06/2018 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Aromatik Sülfonik Asit Boyar Maddelerle Modifiye Kalem Grafit Elektrot Hazırlanması Ve Akışa Enjeksiyon Amperometrik Biyosensör Tasarımı** ” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

### **JÜRİ**

Prof. Dr. Yusuf DİLGİN .....

#### **Başkan**

Prof. Dr. İsmet KAYA .....

#### **Üye**

Doç. Dr. Ayşem ARDA .....

#### **Üye**

Prof. Dr. Osman DAYAN .....

#### **Üye**

Doç. Dr. Ali ÖZCAN .....

#### **Üye**

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: 115Z235

## İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



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

Mehmet GÜNEŞ

## TEŞEKKÜR

Doktora çalışması boyunca benim eğitim ve öğretimimde maddi ve manevi bakımdan devamlı olarak yardımlarını esirgemeyen ve çalışkanlığıyla bizlere örnek olan saygıdeğer ve kıymetli hocam Prof. Dr. Yusuf DİLGİN'e tüm emeklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Yaptığım çalışmalar süresince tecrübelerinden faydalandığım değerli arkadaşım Arş. Gör. Serkan KARAKAYA'ya ve laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen yüksek lisans öğrencilerinden Selen AYZ ve Gamze EMİR'e desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Araştırmalarım boyunca laboratuvar olanaklarından faydalandığım Kimya Bölüm Başkanlığına teşekkür ederim.

Tez araştırmalarım boyunca bilgilerinden ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocalarım Prof. Dr. İsmet KAYA ve Doç. Dr. Ayşem ARDA'ya çok teşekkür ederim. Bu tez çalışması, 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı kapsamında TÜBİTAK (115Z235 numaralı proje) tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a, teşekkür ederim.

Doktora çalışmaları boyunca manevi destek ve yardımlarıyla her zaman bana yardımcı olan değerli eşim ve çocuklarıma teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Mehmet GÜNEŞ  
Çanakkale, Haziran 2018

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Ag	Gümüş
AgCl	Gümüş Klorür
ADH	Alkol Dehidrogenaz
Ar	Argon
Au	Altın
BRT	Britton-Robinson Tamponu
BSA	Sığır Serum Albumin (Bovine Serum Albumine)
CHIT	Kitosan
C	Derişim
CH <sub>3</sub> COOH	Asetik Asit
cm <sup>3</sup>	Santimetreküp
CNT	Karbon Nanotüp (Carbon Nanotube)
CV	Döngüsel Voltammetri (Cyclic Voltammetry)
DMF	Dimetilformamid
DPV	Differansiyel Puls Voltammetrisi
e-	Elektron
ECL	Elektrokemiluminesans
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
Epa	Anodik Pik Potansiyeli
FAD	Flavin Adenin Dinükleotit
FADH <sub>2</sub>	Flavin Adenin Dinükleotit (İndirgenmiş form)
GA	Glutaraldehit
GDI	Glutarik dialdehit
GCE	Camımsı Karbon Elektrot (Glassy Carbon Electrode)
GDH	Glikoz Dehidrogenaz
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sülfirik Asit
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Borik Asit
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Fosforik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
HNO <sub>3</sub>	Nitrik Asit

IS	İmpedans Spektrumları
KCl	Potasyum Klorür
LOD	Belirtme Alt Sınırı (Limit of Detection)
LOQ	Tayin Sınırı (Limit of Quantification)
MA	Molekül Ağırlığı
$\mu\text{A}$	Mikro Amper
M	Molar
mg/g	Miligram/Gram
$\mu\text{g/mL}$	Mikrogram/Mililitre
mM	Mili Molar
$\mu\text{L}$	Mikro Litre
$\mu\text{m}$	Mikro Metre
$\mu\text{M}$	Mikro Molar
mol/L	Mol/Litre
mV	Milivolt
mV/s	Milivolt/saniye
nA	Nano Amper
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotidin indirgenmiş formu
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit
nm	Nanometre
nM	Nano Molar
NP	Nano Parçacıklar
PAMAM	Poliamidoamin Dendrimer Etilendiamin Core Generation 4.0
PEC	Fotoelektrokimya (Photoelectrochemistry)
PGE	Kalem Grafit Elektrot (Pencil Graphide Electrode)
Pt	Platin
QD	Kuantum noktalar (Quantum dots)
RSD	Bağıl Standart Sapma (Relative Standart Deviation)
s	Saniye
Se	Selenyum
SCE	Standart Kalomel Elektrot

Te	Tellür
TH	Thionin
TiO <sub>2</sub>	Titanyum Dioksit
V	Volt
v	Tarama Hızı
AEA	Akışa Enjeksiyon Analiz
ASA	Aromatik Sülfonik Asit
PB	Fosfat Tamponu
ÇP	Çalışma Potansiyelit
AH	Akış Hızı
ÖYH	Örnek Yükleme Hacmi
KU	Kolon Uzunluğu
DE	Destek Elektrolit
PBS	Fosfat tamponu çözeltisi
BRBS	Britton-Robinson Tampon Çözeltisi
MWCNT	Çok Duvarlı Karbon Nanotüp
IR	İnfrared Spektrumu



## ÖZET

# AROMATİK SÜLFONİK ASİT BOYAR MADDELERLE MODİFİYE KALEM GRAFİT ELEKTROT HAZIRLANMASI VE AKIŞA ENJEKSİYON AMPEROMETRİK BİYOSENSÖR TASARIMI

Mehmet GÜNEŞ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Yusuf DİLGİN

26/06/2018, 167

Bu tez çalışmasında aromatik sülfonik asit(ASA) boyar maddeler grubundan olan kalmagit (Clm), pirokatekol violet (Pcv), tropeolin (Trp) ve kromotropik asit (Cta) mediyatörleri ile modifiye kalem grafit elektrot (PGE) hazırlandı ve hazırlanan bu modifiye elektrotlarla NADH'nin ( $\beta$ -nikotin amid dinükleotid in indirgenmiş hali) elektrokatalitik yükseltgenmesi döngüsel voltammetride incelendi. Hazırlanan modifiye elektrotlar arasında, Trp ve Cta modifiye PGE'ler iyi bir elektrokatalitik etkinlik göstermesine karşın, elektropolimerizasyon yoluyla hazırlanan modifiye Clm/PGE ve Pcv/PGE'lerde iyi bir elektrokatalitik sonuç gözlemlendi. Önceki çalışmalarda PGE için tasarlanan fotoelektrokimyasal akış hücresi (FAH) kullanılarak akışa enjeksiyon analiz (AEA) sisteminde NADH'nin iyi sonuç veren modifiye elektrotlardaki elektrokatalitik yükseltgenmesine bağlı amperometrik sensörleri geliştirildi. Bunun yanında Poli-Pcv/PGE yüzeyine glikoz dehidrogenaz (GDH) enzimi immobilize edilerek (GDH/Poli-Pcv/PGE)  $NAD^+/NADH$  redoks çiftine bağlı glikoz biyosensörü tasarlandı ve ilk defa aromatik sülfonik asit boyar madde modifiye PGE, AEA sistemine entegre edilerek AE amperometrik glikoz biyosensörü geliştirildi. Glikoz biyosensörü için tasarlanan modifiye elektrotun (GDH/Poli-Pcv/PGE) doğrusal kalibrasyon aralığı, belirtme alt sınırı ve tayin sınırı değerleri sırasıyla; 5-500  $\mu M$ , ( $R^2= 0,9984$ ), 1,2 ve 4,0  $\mu M$  glikoz olarak gözlemlendi. Tasarlanan biyosensörün uygulanabilirliği ise ticari olarak satılan dekstroz çözeltisindeki glikoz başarılı bir şekilde tayin edilerek test edildi. Ayrıca tasarlanan biyosensöre hangi

maddelerin girişim etkilerinin olup olmadığı da çalışıldı. NADH'nin, elektrokatalitik yükseltgenmesine iyi yanıt veren Clm ve Pcv modifiye elektrotlarla birlikte Yalın PGE hem yüzeysel hem de elektrokimyasal karakterizasyonları gerçekleştirildi. Bu amaçla her bir elektrodun AFM, SEM ve EDX görüntüleri ile Raman ve elektrokimyasal impedans spektrumları alındı.

**Anahtar sözcükler:** Kalem Grafit Elektrot, Akışa Enjeksiyon Analizi, Biyosensör, Glikoz Dehidrogenaz, Elektropolimerizasyon, Modifiye Elektrot.



## ABSTRACT

### CONSTRUCTION OF ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR IN FLOW INJECTION AND PREPARATION OF MODIFIED PENCIL GRAPHITE ELECTRODES USING AROMATIC SULFONIC ACID DYES

Mehmet GÜNEŞ

Çanakkale Onsekiz Mart University

Institute of Science

Department of Chemistry Thesis of Ph.D.

Supervisor: Prof. Dr. Yusuf DİLGİN

26/06/2018, 167

In this thesis, modified pencil graphite electrodes (PGE) were prepared with calmagite (Clm), pyrocatechol violet (Pcv), tropeolin (Trp) and chromotropic acid (Cta) mediators which are aromatic sulphonic acid (ASA) dyes. Electrocatalytic oxidation of NADH (reduced form of  $\beta$ -nicotinic amide dinucleotide) was investigated with these prepared modified electrodes using cyclic voltammetry. Among the prepared modified electrodes, Trp and Cta modified PGEs did not show good electrocatalytic activity. However, a good electrocatalytic result was obtained in the case of modified Clm/PGE and Pcv/PGE prepared by electropolymerization procedure. Amperometric sensor of NADH based on its electrocatalytic oxidation at modified electrodes which give good result has been developed in flow injection analysis system (FIA) using photoelectrochemical flow cell which was constructed for PGE in the previous studies. In addition, glucose biosensor based on  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  redox couple was constructed by immobilization of glucose dehydrogenase onto Poly-Pcv/PGE and FI amperometric glucose biosensor has been developed by integration of FIA with aromatic sulphonic acid dyes modified electrode for the first time. The linear calibration range, LOD, and LOQ values of the modified electrode (GDH / Poly-Pcv/PGE) designed for the glucose biosensor were found to be 5-500  $\mu\text{M}$ , ( $R^2 = 0.9984$ ), 1.2  $\mu\text{M}$  and 4.0  $\mu\text{M}$  glucose, respectively. The applicability of constructed biosensor was tested successfully by determination of glucose in dextrose solution which is commercially purchased. Moreover, the effect of interference of some

substances on the constructed biosensor have also been performed. Both surface and electrochemical characterization of Clm and Pcv modified electrodes which give a good results toward electrocatalytic oxidaiton of NADH together bare PGE have been performed. For this purpose, AFM, SEM an EDX images and Raman and electrochemical impedance spectra of each electrode were recorded.

**Keywords:** Pencil Graphite Electrode, Flow Injection Analysis, Biosensor, Glucose Dehydrogenase, Electropolymerization, Modified Electrode.



# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEZ SINAVI SONUÇ FORMU.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	v
ÖZET .....	viii
ABSTRACT.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xxiii
BÖLÜM 1 .....	1
GİRİŞ .....	1
1.1.Organik Redoks Mediyatörler ve Kimyasal Modifiye Elektrotlar.....	5
1.2. Akışa Enjeksiyon Analiz (AEA) Sistemi .....	9
1.3. NADH'nin Elektrokatalitik Yükseltgenmesi .....	10
1.4. DHG Enzimli ve NAD <sup>+</sup> /NADH'a Bağlı Elektrokimyasal Sensör ve Biyosensörler	13
BÖLÜM 2 .....	19
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	19
2.1. Kalem Grafit Elektrot Kullanımına Dayalı Sensörler ve Biyosensörler .....	19
2.2. NADH'nin Elektrokatalitik Yükseltgenmesi .....	31
2.3. Dehidrogenaz Enzim Esaslı Kimyasal Modifiye Elektrotlarla Elektrokimyasal Biyosensör Çalışmaları .....	40
BÖLÜM 3 .....	49
MATERYAL VE YÖNTEM.....	49
3.1. Kullanılan Kimyasallar .....	49
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	49
3.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler .....	51
3.3.1. Elektrotların Modifiyesinde Kullanılan Çözeltiler.....	51
3.3.2. Modifikasyonu Yapılan Elektrotların İmpedans Spektrumları(IS) ve CV'lerin Alınmasında Kullanılan Redoks Prob Çözeltisi .....	53
3.3.3. NADH'nin Elektrokatalik Davranışının İncelenmesinde Kullanılan Çözeltiler	53
3.3.4. NADH'ın AEA Amperometrik Yöntemle Tayini Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler .....	53
3.3.5. PGE Yüzeyine GDH Enziminin Tutturulması ve GDH Enzim Esaslı Biyosensör Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler .....	54
3.3.6. GDH Enzim Esaslı Glikoz Biyosensörü İçin CV Çalışmalarında Gerekli Olan Destek Elektrolitin Hazırlanması .....	55

3.3.7. GDH Enzim Esaslı Glikoz Biyosensörü İçin AEA Amperometrik Çalışmalarında Gerekli Olan Akış Çözeltilisinin Hazırlanması.....	55
3.4. Modifiye Elektrotların Hazırlanması ve Karakterizasyonu .....	55
3.4.1 Modifiye Kalem Grafit Elektrotların (PGE) Hazırlanması .....	55
3.4.2. Modifiye Elektrotların Karakterizasyonu.....	56
3.4.2.1. Modifiye Elektrotlarla NADH'nin Elektrokatalitik Yükseltgenmesinin İncelenmesi .....	57
3.4.3. AEA Sisteminde ASA Boyar Maddeler ile Modifiye Edilen PGE'lerin NADH'a Karşı Amperometrik Yanıtlarının İncelenmesi .....	57
3.4.4. GDH ve NAD <sup>+</sup> /NADH Redoks Çiftine Dayalı Biyosensör Çalışmaları.....	58
3.4.4.1. Dehidrogenaz Enzim İmmobilizasyonu.....	58
3.4.4.2. Döngüsel Voltammetri Yöntemi Kullanılarak Yapılan Biyosensör Çalışmaları .....	60
3.4.4.3. AE Amperometrik Yöntemin Kullanılmasıyla Yapılan Biyosensör Çalışmaları.....	60
BÖLÜM 4.....	62
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	62
4.1. NADH'nin Elektrokatalitik Yükseltgenmesi .....	62
4.1.1. Clm Modifiye Edilen PGE'lerle Yapılan Çalışmalar .....	62
4.1.1.1 Adsorpsiyon'la Clm Modifiye PGE Hazırlanması ve NADH'ye Elektrokatalitik Yanıtı.....	62
4.1.1.2. Elektropolimerizasyon Yöntemiyle Kalmagit Modifiye PGE Hazırlanması ve NADH'ye Elektrokatalitik Yanıtı .....	65
4.1.1.3. Poli-Clm/PGE'de NADH'nin Elektrokatalitik Yükseltgenme Mekanizması .....	72
4.1.1.4. NADH'nin Poli-Clm/PGE'de Elektrokatalitik Yükseltgenmesine Bağlı AE Amperometrik Tayini .....	73
4.1.2. Tropeolin Modifiye PGE'lerle Yapılan Çalışmalar .....	84
4.1.3. Cta Modifiye Kalem Grafit Elektrotlarla Yapılan Çalışmalar .....	87
4.1.4 Pcv Modifiye PGE'lerle Yapılan Çalışmalar .....	91
4.1.4.1. Adsorpsiyonla Pcv İle Modifiye PGE Hazırlanması ve NADH'ye Elektrokatalitik Yanıtı.....	91
4.1.4.1.1. NADH'nin Pcv/PGE'de Elektrokatalitik Yükseltgenmesine Bağlı AE Amperometrik Tayini.....	95
4.1.4.1.2. Elektropolimerizasyon Yöntemiyle Pcv Modifiye PGE'nin Hazırlanması ve NADH'ye Elektrokatalitik Yanıtı .....	101
4.1.4.2.1. NADH'nin Poli-Pcv/PGE'de Elektrokatalitik Yükseltgenmesine Bağlı AE Amperometrik Tayini .....	104
4.1.4.2.2. Girişim Etkisi Yapabilecek Maddelerin İncelenmesi .....	110

4.2. Modifiye Elektrotlarla Dehidrogenaz ve NAD <sup>+</sup> /NADH Redoks Çiftine Bağlı Biyosensör Tasarımı.....	113
4.2.1. Döngüsel Voltammetrik Yöntemle Biyosensör Çalışmaları.....	114
4.2.2. AE Amperometrik Biyosensör Çalışmaları.....	122
4.2.2.1. Girişim Etkisi Yapabilecek Maddelerin İncelenmesi .....	128
4.2.2.2. Tasarlanan Biyosensörün Gerçek Örneklerle Uygulanması .....	131
4.3. Modifiye Elektrotların Karakterizasyonu .....	133
BÖLÜM 5 .....	141
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	141
KAYNAKLAR .....	148
EKLERİ .....	I
EK 1. Tez çalışmasında PGE'nin modifiyesinde kullanılan C1m'ye ait IR spektrumu ..	II
EK 2. Tez çalışmasında PGE'nin modifiyesinde kullanılan Pcv'ye ait IR spektrumu ..	III
EK 3. 30 Mayıs - 03 Haziran 2016 tarihleri arasında, Isparta Süleyman Demirel Üniversitesinde 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi'nde sunulan "115Z235" numaralı TÜBİTAK projesi ve bu tez çalışmasından üretilen poster bildirisi.....	IV
EK 4. En İyi Poster Bildiri Birincilik Ödülü(Kalmagit modifiye Kalem Grafit Elektrotla NADH'ın Elektrokatalitik Yükseltgenmesi,8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi / Süleyman Demirel Üniversitesi) .....	V
EK 5. 29 Eylül-02 Ekim 2016 tarihleri arasında Çanakkale 18 Mart Üniversitesinde gerçekleştirilen, 10th Aegean Analytical Chemistry Days Kongresi'nde sunulan "115Z235" numaralı TÜBİTAK projesi ve bu tez üretilen poster bildirisi .....	VI
EK 6. 25-28 Ağustos 2017 tarihleri arasında Makedonya/Ohrid'de gerçekleştirilen International Joint Science Congress of Materials and Polymers(ISCMP) Kongresi'nde sunulan "115Z235" numaralı TÜBİTAK projesi ve bu tez üretilen poster bildirisi.....	VII
ÖZGEÇMİŞ .....	VIII

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
Şekil 1.1. Redoks mediyatör ile hazırlanmış KME yüzeyinde elektrokatalitik yükseltgenme mekanizması (Ciucu, 2014) .....	7
Şekil 1.2. NADH'nin yükseltgenme mekanizması (Radoi ve Compagnone, 2009).....	11
Şekil 1.3. NADH'ın elektrokimyasal yükseltgenme tepkimesi (Kumar ve Chen, 2008) ....	12
Şekil 1.4. Elektrot yüzeyinde mediyatör ile NADH'nin tepkimesi .....	13
Şekil 1.5. Mediyatörle modifiye edilen elektrotta genel bir enzimatik biyosensör mekanizması (Ciucu, 2014) .....	16
Şekil 1.6. Poli-BKM modifiye elektrot kullanılarak NADH'ye bağlı geliştirilen etanol biyosensörün şematik gösterimi (Yang ve Liu, 2009) .....	17
Şekil 2.1. A) GOD/CT/CdS–ZnS/PGE'in CV'leri (a) (BRBS, pH 6,0) glikoz yokluğunda (b) ve 0,5 mM glikoz varlığında ve (c) 1,0 mM glikoz, tarama hızı 20mV/s ve B) AEA sisteminde 0,01 mM ile 1 mM glikoz aralığında farklı derişimlerdeki glikozun akım-zaman eğrisi TÇ: 1,0 M KCl ihtiva eden pH=6,0 BRBS; ÇP: 500 mV; AH:1,3 mL/dk ÖYH:100 µL KU: 10cm) (Saglam ve ark., 2016b)...	23
Şekil 2.2. Geliştirilen glikoz biyosensörün yapısı (Dervisevic ve ark., 2015) .....	25
Şekil 2.3. A) GOx-RGO/PGE'un 0,1 mM, PBS pH 7, çözelti ortamında ardışık olarak 0,1 mM glikozun eklenmesiyle -0,6 V uygulanan potansiyele karşı amperometrik akım-zaman ve doğrusal kalibrasyon eğrisi. B) pH=7,0 olan 0,1 M PBS ortamında v: 50 mV/s a) Yalın PGE b) RGO/PGE c)GOx-RGO/PGE'nin CV'leri (Sehat ve ark., 2015) .....	26
Şekil 2.4. Grafit elektrodun (çizgili) ve MdM ile modifiye grafit elektrodun döngüsel voltammogramı (a), 3,1 mM NADPH'nin modifiye elektrottaki (b) ve yalın grafit elektrottaki (c) CV'leri v:50 mV/s, D.E: 0,25 M fosfat tamponu (pH=7,0) (Gorton ve ark., 1984).....	32
Şekil 2.5. Poli-TB/GCE'nin NADH'siz (a, b) ve 2 mM NADH'lı ortamda ( c ve d), ışıksız (a, c) ve ışıklı (b ve d) olarak alınan CV'leri (D.E: 0,1 M KCl'li pH=7,0 fosfat tamponu, v: 50 mV/s) (Dilgin ve ark., 2007).....	34
Şekil 2.6. Pcv modifiye GCE'nin (a ve b) ve yalın GCE'nin (c ve d) 0,1 M fosfat tamponu (pH=7,0) çözeltisinde NADH'siz (a ve c) ve 1,0 mM NADH'li ortamda (b ve d) CV'leri (v: 25 mV/s) (Golabi ve ark., 2002) .....	35
Şekil 2.7. A) pH=7,0 olan 0,1 M PBS ortamında artan NADH derişimine bağlı olarak 300 mV'da Pcv modifiye GCE'de kaydedilen amperometrik akım-zaman ve B) kalibrasyon eğrisi (Golabi ve ark., 2002).....	36
Şekil 2.8. A) MWCNT/CCE (a), Crocin/MWCNT/CCE (b) ve Crocin/CCE'nin (c) 3 mM NADH varlığında ve pH=7,0 olan 0,1 M PBS ortamında alınan CV'leri (v:50 mV/s) B) 0,1 M PBS pH=7,0 ortamında artan NADH derişimine bağlı olarak 220 mV'da kaydedilen akım (Roushani ve ark., 2017) .....	37
Şekil 2.9. Crocin/MWCNT/CCE'de NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenme mekanizması (Roushani ve ark., 2017).....	37
Şekil 2.10. A) PGE/QH <sub>2</sub> 'nin a) NADH'siz b) 0,5 mM NADH ortamında c) yalın PGE'nin 0,5 mM NADH ve pH=7,0 olan 0,1 M PBS ortamında alınan CV'leri (v:50 mV/s) B) 1) PGE/QH <sub>2</sub> 'nin 2) yalın PGE'nin pH=7,0 olan 0,1 M PBS ortamında artan NADH derişimine bağlı olarak 300 mV'da kaydedilen amperometrik akım-zaman eğrileri (Dilgin ve ark., 2013).....	38
Şekil 2.11. A) Yalın PGE (a ve b) ve PGE/HMT'nin (c ve d), NADH'siz (a ve c) ve 0,5 mM NADH'li (b ve d) 0,1 M PBS pH=7,0 ortamında alınan CV'leri (v:50	



	mV/s) B) 1) Yalın PGE 2) PGE/HMT'nin 0,1 M KCl ihtiva eden 0,1 M PBS pH=7,0 ortamında artan NADH derişimine bağlı olarak 200 mV'da kaydedilen amperometrik akım-zaman eğrileri (Dilgin ve ark., 2012b).....	39
Şekil 2.12.	A) GCE/CNT-CHIT film elektrotunun, karıştırlan pH=7,40 PBS'ye eklenen NADH (5,0 µM-1,0 mM) derişimine ve B) GCE/ CNT-CHIT-GDI-GDH film elektrotunun, 0,10 mM NAD <sup>+</sup> ihtiva eden ve karıştırlan pH=7,40 fosfat tampon içerisine eklenen glikoz (10 µM-5,0 mM) derişimine karşılık amperometrik yanıt ve kalibrasyon eğrisi.....	41
Şekil 2.13.	A) Yalın PGE, B) SWCNT/PGE, C) Pcv/PGE ve D) Pcv/SWCNT/PGE'nin N <sub>2</sub> doyurulmuş 0,1 M PBS'de NADH'siz (a) ve 1 mM NADH ortamında kaydedilen CV'leri (v: 2 mV/s) (Zhu ve ark., 2014b).....	44
Şekil 2.14.	A)ADH/Pcv/SWCNT/PGE'nin 5 mM NAD <sup>+</sup> iğereren 0,1 M fosfat tampon çözeltisinde etanol yokken ve 1 mM etanol ortamında 2 mV/s tarama hızında kaydedilen CV'leri B) Etanol sensöründe elde edilen etanol derişimine karşı akım grafiği, C) Önerilen etanol sensörünün 2 mM etanol için seçicilik çalışmaları (Zhu ve ark., 2014b).....	45
Şekil 2.15.	SWCNT/PGE yüzeyinde Pcv ile ADH enziminin immobilizasyon adımları ve NAD <sup>+</sup> /NADH redoks ikilisine bağlı olarak hazırlanan alkol biyosensörünün mekanizması (Zhu ve ark., 2014b) .....	46
Şekil 2.16.	GDH/ZnS–CdS/PGE'nin glikozsuz (a1 ve a2) ve glikoz ortamında (b1 ve b2) (a1) ve (b1): ışıksız (a2) ve (b2): ışıklı olarak kaydedilen CV'leri. (İçteki şekil: GDH/PGE'nin 40 mM glikoz ortamında (a): ışıksız (b): ışıklı olarak kaydedilen CV'leri). DE: 10,0 mM NAD <sup>+</sup> ile 0,1 M KCl ihtiva eden 10 <sup>-1</sup> M PBS pH=7,0, v: 20 mV/s (Ertek ve ark., 2016).....	47
Şekil 3.1.	T model Rotring marka (Almanya) uçlu kalem ile hazırlanmış PGE (Ertek, 2016). .....	50
Şekil 3.2.	PGE ile AE amperometrik çalışmalarda kullanılan elektrokimyasal akış hücrenin şematik gösterimi (L: Fiber optikli ışık kaynağı; T: teflon gövde; P:kolon; G:Kuartz pencere) (Dilgin, 2015; Sağlam ve ark., 2017) .....	51
Şekil 3.3.	Amperometrik çalışmalarında kullanılan AEA sistemine ait düzeneğin şematik gösterimi(Dilgin, 2015; Sağlam ve ark., 2017).....	58
Şekil 3.4.	Poli-Pcv/PGE yüzeyine GDH enzimi immobilizasyon prosedürü için şematik gösterimi .....	59
Şekil 4.1.	Clm/PGE'nin a) NADH'siz ve b) 0,25 mM NADH ortamında alınan CV'leri) 0,25 mM NADH'nin Yalın PGE'de kaydedilen CV'leri (DE: 0,1 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS; v:20 mV/s).....	63
Şekil 4.2.	Clm/K.PGE'nin a) NADH'siz ve b) 0,25 mM NADH ortamında alınan CV'leri c) 0,25 mM NADH'nin Yalın K.PGE'de alınan CV'leri (D.E: 0,1 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS; v:20 mV/s).....	64
Şekil 4.3.	Kalmagitin redoks davranışına ait mekanizma (Chandra vd., 2010; Karaman, 2014) .....	64
Şekil 4.4.	A) 0,1 mM Clm'nin PGE yüzeyinde 5 kez ardışık olarak alınan CV'leri (DE: 0,1 M NaNO <sub>3</sub> 'lı pH=3,0 BRBS; v: 50 mV/s) B) A'dan elde edilen Poli-Clm/PGE'nin a) NADH'siz ve b) 0,25 mM NADH ortamındaki CV'leri (DE: 0,1 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS; v:20 mV/s) .....	67
Şekil 4.5.	Kalmagitin PGE'deki indirgenmesine ait mekanizma. Ürün A: 1-hidroksi-2-amino-4-metil benzen, Ürün B: 4-amino-3-hidroksi-1-naftelensülfonik asit (Karaman, 2014) .....	68

Şekil 4.6. Kalmagitin indirgenmesi sonucu oluşan ürünlerin (A ve B'nin) PGE'deki yükseltgenme mekanizması (Karaman, 2014) .....	69
Şekil 4.7. A) $2 \times 10^{-5}$ mM Clm'nin PGE yüzeyinde 5 kez ardışık olarak alınan CV'leri (DE: 0,1 M NaNO <sub>3</sub> 'lı pH=3,0 BRBS; v: 50 mV/s) B) A'dan elde edilen Poli-Clm/PGE'nin a) NADH'siz ve b) 0,25 mM NADH ortamındaki CV'leri (DE: 0,1 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS; v:20 mV/s) .....	71
Şekil 4.8. A) 0,1 mM Clm'nin PGE yüzeyinde 5 kez ardışık olarak alınan CV'leri (DE: 0,1 M NaNO <sub>3</sub> 'lı pH=3,0 BRBS; v: 50 mV/s) B) A'dan elde edilen Poli-Clm/PGE'nin a) NADH'siz ve b) 0,25 mM NADH ortamındaki CV'leri (DE: 0,1 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS; v:20 mV/s) .....	71
Şekil 4.9. NADH'nin redoks mediyatör modifiye elektrottaki yükseltgenme mekanizmasına ilişkin şematik bir gösterim. ( Med <sub>ind</sub> : mediyatörün indirgenmiş formu; Med <sub>yük</sub> : Mediyatörün yükseltgenmiş formu) .....	72
Şekil 4.10. Yalın PGE kullanılarak farklı çalışma potansiyellerinde $1 \times 10^{-5}$ ve $5 \times 10^{-5}$ M NADH çözeltilerinin enjeksiyonuyla elde edilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (AH:1,5 mL/dk, TÇ:1,0 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS, ÖYH:100 µL, KU :10 cm) .....	74
Şekil 4.11. Yalın PGE'nin AE amperometrik akım-zaman eğrilerinden hesaplanan pik akımı değerlerinin ÇP'li ile değişim grafiği .....	75
Şekil 4.12. Poli-Clm/PGE'nin kullanılmasıyla değişik çalışma potansiyellerinde $1 \times 10^{-5}$ ve $5 \times 10^{-5}$ M NADH çözeltilerinin enjeksiyonu ile edinilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (AH:1,5 mL/dk, TÇ:1,0 M KCl ihtiva eden pH 7,0 PBS, ÖYH:100 µL, KU:10 cm) .....	76
Şekil 4.13. Poli-Clm/PGE'nin kullanılmasıyla AE amperometrik akım-zaman eğrilerinden hesaplanan pik akımlarının çalışma potansiyeli ile değişim grafiği .....	76
Şekil 4.14. Yalın PGE ve Poli-Clm/PGE'nin AE amperometrik akım zaman eğrilerinden hesaplanan pik akımlarının çalışma potansiyeli ile değişim grafiği .....	77
Şekil 4.15. Poli-Clm/PGE'nin kullanılmasıyla çeşitli akış hızı değerlerinde $1 \times 10^{-5}$ ve $5 \times 10^{-5}$ M NADH çözeltilerinin enjeksiyonu ile edinilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (ÇP:+250 mV, TÇ:1,0 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS, ÖYH:100 µL; KU:10 cm) .....	79
Şekil 4.16. Poli-Clm/PGE kullanılarak AE amperometrik akım-zaman eğrilerine göre hesaplanmış akımların akış hızı ile değişim grafiği .....	80
Şekil 4.17. Yalın PGE'de artan NADH derişimine bağlı elde edinilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (TÇ: 1,0 M KCl ihtiva eden 0,1 M pH=7,0 PBBS; ÇP: +250 mV; AH: 1,75 mL/dk, ÖYH: 100 µL; KU: 10 cm) .....	81
Şekil 4.18. Poli-Clm/PGE'de artan NADH derişimine bağlı elde edilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.17'deki optimize edilmiş şartlara göre) .....	81
Şekil 4.19. Yalın PGE'nin kullanılmasıyla optimize edilmiş şartlarda AE amperometrik metotla edinilen, NADH derişimine bağlı pik akımlarının değişim(A) ve kalibrasyon grafiği (B) .....	82
Şekil 4.20. Poli-Clm/PGE'nin kullanılmasıyla optimize edilmiş şartlarda AE amperometrik metotla edinilen, NADH derişimine bağlı pik akımlarının değişim(A) ve kalibrasyon grafiği (B) .....	83
Şekil 4.21. Poli-Clm/PGE'de NADH çözeltilerinin ardışık 10 kez enjeksiyonuyla edinilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.17'deki optimize edilmiş şartlara göre) .....	84
Şekil 4. 22. Tropeolinin kimyasal yapısı (Wang ve ark., 2006) .....	84

Şekil 4.23. A) Yalın PGE ve B)Trp/PGE için (5 dk adsorpsiyonla modifiyesi yapılan) a) NADH'siz ve b) 0,5 mM NADH'li ortamda alınan CV'leri (Şekil 4.8/B'deki optimize edilmiş şartlara göre).....	85
Şekil 4.24. A) K.PGE'nin ve B) Trp/K.PGE'nin (5 dk adsorpsiyonla modifiyesi yapılan) a) NADH'siz ve b) 0,5 mM NADH'li ortamda alınan CV'leri (Şekil 4.8/B'deki optimize edilmiş şartlara göre).....	86
Şekil 4.25 A) 0,1 mM Trp'nin PGE yüzeyinde 5 kez ardışık olarak alınan CV'leri (DE: 0,1 M NaNO <sub>3</sub> 'lı pH=3,0 BRT çözeltisi; TH: 50 mV/s). B) A'dan elde edilen Poli-Trp/PGE'nin a) NADH'siz ve b) 0,5 mM NADH'li ortamda alınan CV'leri (DE: 0,1 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS; v: 20 mV/s).....	87
Şekil 4. 26.Cta'nın kimyasal yapısı (Sleem ve ark., 2013).....	88
Şekil 4.27. A) Yalın PGE'nin ve B) Cta/PGE'nin (5 dk adsorpsiyonla modifiyesi yapılan) a) NADH'siz ve b) 0,5 mM NADH'li ortamda alınan CV'leri (Şekil 4.8/B'deki optimize edilmiş şartlara göre).....	88
Şekil 4.28. A) K.PGE'nin ve B) Cta/K.PGE'nin (5 dk adsorpsiyonla modifiyesi yapılan) a) NADH'siz ve b) 0,5 mM NADH'li ortamda alınan CV'leri (Şekil 4.8/B'deki optimize edilmiş şartlara göre).....	89
Şekil 4.29. A) 0,1 mM Cta'nın PGE yüzeyinde 5 kez ardışık olarak alınan CV'leri (Şekil 4.25.A' optimize edilmiş şartlara göre). B) A'dan elde edilen Poli-Cta/PGE'nin a) NADH'siz ve b) 0,5 mM NADH'li ortamda alınan CV'leri (Şekil 4.8/B'deki optimize edilmiş şartlara göre).....	90
Şekil 4.30. Pcv'nin kimyasal yapısı (Sheng ve ark., 2007) .....	91
Şekil 4.31. Pcv/PGE'nin (10 dk adsorpsiyon yoluyla elde edilmiş) alınan CV'leri (Şekil 4.8/B'deki optimize edilmiş şartlara göre).....	92
Şekil 4.32. 5 dk (A ve B) ve 10 dk (C ve D) sürelerde 10 <sup>-2</sup> M Pcv içerisinde adsorpsiyon yoluyla elde edilmiş Pcv/PGE'nin (A ve C) ve Pcv/K.PGE'nin (B ve D) a) NADH'siz b) 0,25 mM NADH'li ortamda alınan CV'leri (Şekil 4.8/B'deki optimize edilmiş şartlara göre).....	93
Şekil 4.33. A) Farklı adsorpsiyon sürelerinde 10 <sup>-2</sup> M Pcv çözeltisine daldırılarak hazırlanmış Pcv/PGE'lerin 0,25 mM NADH'li ortamda alınan CV'leri (Şekil 4.8/B'deki optimize edilmiş şartlara göre) B) modifiye elektrotların Adsorpsiyon süresi ile NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinden alınan akım değişim grafiği .....	94
Şekil 4.34. Kalem uçlarının farklı Pcv derişimlerine 10 dk süreyle daldırılmasıyla hazırlanmış Pcv/PGE'lerin ve b) 0,5 mM NADH'li ortamda alınan CV'leri (Şekil 4.8/B'deki optimize edilmiş şartlara göre .....	95
Şekil 4.35. Yalın PGE'nin kullanılmasıyla çeşitli çalışma potansiyellerinde 1x10 <sup>-4</sup> M NADH'nin enjeksiyonuyla edinilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (AH:1,5 mL/dk, TÇ:1,0 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS, ÖYH:100 µL, KU:10 cm) .....	96
Şekil 4.36. Pcv/PGE kullanılmasıyla çeşitli çalışma potansiyellerinde 1x10 <sup>-4</sup> M NADH'nin enjeksiyonuyla edinilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.35'de optimize edilmiş şartlara göre).....	96
Şekil 4.37. A) Yalın PGE ve B) Pcv/PGE'nin kullanılmasıyla AE amperometrik akım-zaman eğrilerinden, saptanan pik akımlarının çalışma potansiyeli ile değişim grafiği .....	98

Şekil 4.38. Pcv/PGE'nin kullanılmasıyla çeşitli akış hızlarında $1 \times 10^{-4}$ M NADH'nin enjeksiyonu ile elde edilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (ÇP:+250 mV TÇ:1,0M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS, ÖYH:100 µL) .....	99
Şekil 4.39. Pcv/PGE kullanılmasıyla AE amperometrik akım-zaman eğrilerinden saptanan akımların akış hızıyla değişim grafiği.....	99
Şekil 4.40. Pcv/PGE'de artan NADH derişimine bağlı AE amperometrik akım-zaman eğrileri (TÇ: 1,0 M KCl ihtiva eden 0,1 M pH=7,0 fosfat tamponu; ÇP: +250 mV; AH: 1,18 mL/dk, ÖYH: 100 µL; KU: 10 cm) .....	100
Şekil 4.41. Pcv/PGE'nin kullanılmasıyla optimize edilmiş şartlarda AE amperometrik yöntemle edinilen NADH derişimine bağlı pik akımlarının değişim (A) ve kalibrasyon grafiği (B).....	101
Şekil 4.42. A) 0,1 mM Pcv'nin PGE yüzeyinde 5 kez ardışık olarak alınan (AH:1,5 mL/dk, TÇ:1,0 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS, ÖYH:100 µL, KU:10 cm) CV'leri (Şekil 4.35'teki optimize edilmiş şartlara göre). B) A'dan elde edilen Poli-Pcv/PGE'nin a) NADH yokluğunda ve b) 0,5 mM NADH varlığındaki CV'leri (DE: 0,1 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS; v: 20 mV/s) C) ve D) dōngü sayısının artmasıyla $I_{a1}/I_{a2}$ 'nin değişimi .....	102
Şekil 4. 43. Pcv'nin elektropolimerizasyon mekanizması.....	104
Şekil 4.44. Poli-Pcv/PGE kullanılmasıyla çeşitli çalışma potansiyellerinde $5 \times 10^{-5}$ ve $1 \times 10^{-4}$ M NADH'nin enjeksiyonuyla edinilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (AH:2,0 mL/dk, TÇ:1,0 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS, ÖYH:100 µL KU:10 cm) .....	105
Şekil 4.45. Poli-Pcv/PGE'nin AE amperometrik akım-zaman eğrilerinden, $5 \times 10^{-5}$ ve $1 \times 10^{-4}$ M NADH için saptanan pik akımlarının çalışma potansiyeli ile değişim grafiği .....	106
Şekil 4.46. Poli-Pcv/PGE kullanılarak farklı akış hızlarında $5 \times 10^{-5}$ ve $1 \times 10^{-4}$ M NADH'nin enjeksiyonu ile elde edilen AE amperometrik akım zaman eğrileri (ÇP:200mV , TÇ:1,0 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS, ÖYH:100 µL KU:10 cm).....	106
Şekil 4.47. Poli-Pcv/PGE'nin kullanılarak $5 \times 10^{-5}$ ve $1 \times 10^{-4}$ M NADH için edinilen AE amperometrik akım-zaman eğrilerinden saptanan akımların akış hızıyla değişim grafiği .....	107
Şekil 4.48. Poli-Pcv/PGE'de artan NADH derişimine bağlı AE amperometrik akım-zaman eğrileri (ÇP:200mV, AH: 2,0 mL/dk, TÇ:1,0 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS, ÖYH:100 µL KU:10 cm).....	108
Şekil 4.49. Poli-Pcv/PGE kullanılmasıyla optimize edilmiş şartlarda AE amperometrik yöntemle edinilen NADH derişimine bağlı pik akımlarının değişim (A) ve kalibrasyon grafiği (B).....	109
Şekil 4.50. a ve f $10^{-4}$ M NADH'nin, b, c, d ve e ise sırasıyla $10^{-4}$ M NADH içeren $10^{-4}$ , $2 \times 10^{-4}$ , $5 \times 10^{-4}$ ve $10 \times 10^{-4}$ M glikoz çōzeltilerinin ortamında Poli-Pcv/PGE ile alınmış AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.48'deki optimize edilmiş şartlara göre ).....	111
Şekil 4.51. a ve f $10^{-4}$ M NADH'nin, b, c, d ve e ise sırasıyla $10^{-4}$ M NADH içeren $10^{-4}$ , $2 \times 10^{-4}$ , $5 \times 10^{-4}$ ve $10 \times 10^{-4}$ M L-Glutamik asit çōzeltilerinin ortamında Poli-Pcv/PGE ile alınmış AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.48'deki optimize edilmiş şartlara göre ).....	111
Şekil 4.52. a ve f $10^{-4}$ M NADH'nin, b, c, d ve e ise sırasıyla $10^{-4}$ M NADH içeren $10^{-4}$ , $2 \times 10^{-4}$ , $5 \times 10^{-4}$ ve $10 \times 10^{-4}$ M sitrik asit çōzeltilerinin ortamında Poli-Pcv/PGE	

	ile alınmış AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.48'deki optimize edilmiş şartlara göre ).....	112
Şekil 4.53.	a ve e $10^{-4}$ M NADH'nin, b, c ve d ise sırasıyla $10^{-4}$ M NADH içeren $10^{-4}$ , $2 \times 10^{-4}$ ve $5 \times 10^{-4}$ ürik asit çözeltilerinin ortamında Poli-Pcv/PGE ile alınmış AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.48'deki optimize edilmiş şartlara göre ).....	112
Şekil 4.54.	a ve f $10^{-4}$ M NADH'nin, b, c, d ve e ise sırasıyla $10^{-4}$ M NADH içeren $10^{-4}$ , $2 \times 10^{-4}$ , $5 \times 10^{-4}$ ve $10 \times 10^{-4}$ M Dopamin çözeltilerinin ortamında Poli-Pcv/PGE ile alınmış AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.48'deki optimize edilmiş şartlara göre ).....	113
Şekil 4.55.	a ve f $10^{-4}$ M NADH'nin, b, c, d ve e ise sırasıyla $10^{-4}$ M NADH içeren $10^{-4}$ , $2 \times 10^{-4}$ , $5 \times 10^{-4}$ ve $10 \times 10^{-4}$ M L-Askorbik asit çözeltilerinin ortamında Poli-Pcv/PGE ile alınmış AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.48'deki optimize edilmiş şartlara göre ).....	113
Şekil 4.56.	A) Yalın-PGE'nin ve B) GDH/Yalın-PGE'nin 20 mM glikoz ortamında alınan CV'leri (DE: 0,1 M KCl ve 0,01 M $\text{NAD}^+$ içeren 0,1 M PBS pH=7,0 v:20 mV/s).....	115
Şekil 4.57.	GDH/PAMAM/PGE'nin a) glikoz yokken b) 20 mM glikoz ortamında alınan CV'leri (DE: 0,1 M KCl ve 0,01 M $\text{NAD}^+$ içeren 0,1 M PBS pH=7,0 v:20 mV/s).....	116
Şekil 4.58.	A) 3:3:4 ve B) 5:5:5 GDH: %1'lik BSA:GA oranındaki immobilizasyon çözeltilerine daldırılarak hazırlanmış GDH/Pcv/PGE'lerin a) glikoz yokken b) 20 mM glikoz ortamında alınan CV'leri (DE: 0,1 M KCl ve 0,01 M $\text{NAD}^+$ içeren 0,1 M PBS pH=7,0 v: 20 mV/s).....	117
Şekil 4.59.	A) 3:3:4 ve B) 5:5:5 GDH: %1'lik BSA:GA oranındaki immobilizasyon çözeltilerine daldırılarak hazırlanmış GDH/Pcv/PAMAM/PGE'lerin a) glikoz yokken b) 20 mM glikoz ortamında alınan CV'leri (DE: 0,1 M KCl ve 0,01 M $\text{NAD}^+$ içeren 0,1 M PBS pH =7,0 v: 20 mV/s).....	118
Şekil 4.60.	A) Poli-Pcv/PGE'nin ve B) GDH/Poli-Pcv/PGE'nin a) glikoz yokken b) 25 mM glikoz ortamında alınan CV'leri (DE: 0,1 M KCl ve 0,01 M $\text{NAD}^+$ içeren 0,1 M PBS pH =7,0 v: 20 mV/s).....	119
Şekil 4.61.	A) 5:5:5 ve B) 6:6:4 GDH:%1'lik BSA:GA oranındaki immobilizasyon çözeltilerine daldırılarak hazırlanmış GDH/Poli-Pcv/PGE'lerin glikoz yokken a) glikoz yokken b) 25 mM glikoz ortamında alınan CV'leri (DE: 0,1 M KCl ve 0,01 M $\text{NAD}^+$ içeren 0,1 M PBS pH =7,0 v: 20 mV/s).....	119
Şekil 4.62.	5:5:5 GDH:%1'lik BSA:GA oranındaki immobilizasyon çözeltilerine daldırılarak hazırlanmış a) GDH/Poli-Clm/PGE ve b) GDH/Poli-Pcv/PGE'nin 25 mM glikoz ortamında alınan CV'leri (DE: 0,1 M KCl ve 0,01 M $\text{NAD}^+$ içeren 0,1 M PBS pH=7,0 v: 20 mV/s).....	120
Şekil 4.63.	5:5:5 GDH:%1'lik BSA:GA oranındaki immobilizasyon çözeltilerine daldırılarak hazırlanmış farklı döngü sayıları ile hazırlanmış (a:5, b:10, c:30 d:40 döngü) GDH/Poli-Pcv/PGE'lerin 25 mM glikoz ortamında alınan CV'leri (DE: 0,1 M KCl ve 0,01 M $\text{NAD}^+$ içeren 0,1 M PBS pH =7,0 v: 20 mV/s)...	121
Şekil 4.64.	GDH/Poli-Pcv/PGE ve $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ redoks çiftine bağlı glikoz biyosensör mekanizmasına ait şematik gösterimi .....	122
Şekil 4.65.	A) GDH/Poli-Pcv/PGE kullanılarak farklı çalışma potansiyellerinde 0,01 M $\text{NAD}^+$ ve 1 M KCl içeren 0,1 M PBS de hazırlanmış 0,5 mM glikozun akış sistemine enjeksiyonu ile kaydedilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri	

- (AH:1,18 mL/dk, TÇ:1,0 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS çözeltisi, KU:10 cm, ÖYH:100 µL). B) A'daki akım-zaman eğrilerinden elde edilen çalışma potansiyeline karşı akım grafiği..... 123
- Şekil 4.66. A) GDH/Poli-Pcv/PGE kullanılarak farklı akış hızlarında 0,01 M NAD<sup>+</sup> ve 1,0 M KCl içeren 0,1 M PBS'de hazırlanmış 0,5 mM glikozun akış sistemine enjeksiyonu ile kaydedilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (ÇP;250 mV, TÇ:1,0 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS çözeltisi, KU:10 cm, ÖYH:100 µL) B) A'daki akım zaman eğrilerinden elde edilen akış hızına karşı akım grafiği..... 124
- Şekil 4.67. GDH/Yalın PGE kullanılarak 0,01 M NAD<sup>+</sup> ve 1,0 M KCl içeren 0,1 M PBS'de hazırlanmış artan derişimlerdeki glikoz çözeltilerinin akış sistemine enjeksiyonu ile kaydedilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (ÇP;250 mV, AH: 1,18 mL/dk, TÇ:1,0 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS çözeltisi, KU:10 cm, ÖYH:100 µL)..... 125
- Şekil 4.68. GDH/Yalın PGE için glikoz derişimine karşı enzimatik tepkime sonucu oluşan NADH'nin elektrokatalitik pik akım değişim (A) ve kalibrasyon grafiği (B) 126
- Şekil 4.69. GDH/Poli-Pcv/PGE kullanılarak 0,01 M NAD<sup>+</sup> ve 1,0 M KCl ihtiva eden 0,1 M pH=7,0 PBS'de hazırlanmış artan derişimlerdeki glikoz çözeltilerinin akış sistemine enjeksiyonu ile elde edilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.67'deki optimize edilmiş şartlara göre)..... 127
- Şekil 4.70. GDH/Poli-Pcv/PGE için glikoz derişimine bağlı olarak enzimatik tepkime sonucu oluşan NADH'nin elektrokatalitik pik akımlarının değişim (A) ve kalibrasyon grafiği (B)..... 127
- Şekil 4.71. GDH/Poli-Pcv/PGE kullanılarak 5x10<sup>-4</sup> M glikoz içerecek şekilde 1:1 oranında (eş derişimde) AA, DA ve UA ile 0,01 M NAD<sup>+</sup> ve 1,0 M KCl ihtiva eden 0,1 M PBS'de hazırlanmış çözeltilerinin akış sistemine enjeksiyonu ile kaydedilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.67'deki optimize edilmiş şartlara göre) ..... 129
- Şekil 4.72. GDH/Poli-Pcv/PGE kullanılarak 5x10<sup>-4</sup> M glikoz içerecek şekilde 1:1 ve 1:2 oranında galaktoz ile 0,01 M NAD<sup>+</sup> ve 1,0 M KCl ihtiva eden 0,1 M PBS'de hazırlanmış çözeltilerinin akış sistemine enjeksiyonu ile kaydedilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.67'deki optimize edilmiş şartlara göre) ..... 130
- Şekil 4.73. GDH/Poli-Pcv/PGE kullanılarak 5x10<sup>-4</sup> M glikoz içerecek şekilde 1:1 ve 1:2 oranında glutamik asit (GA) ile 0,01 M NAD<sup>+</sup> ve 1,0 M KCl ihtiva eden 0,1 M PBS'de hazırlanmış çözeltilerinin akış sistemine enjeksiyonu ile kaydedilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.67'deki optimize edilmiş şartlara göre) ..... 130
- Şekil 4.74. GDH/Poli-Pcv/PGE kullanılarak 5x10<sup>-4</sup> M glikoz içerecek şekilde 1:1 ve 1:2 oranında sakkaroz ile 0,01 M NAD<sup>+</sup> ve 1,0 M KCl ihtiva eden 0,1 M PBS'de hazırlanmış çözeltilerinin akış sistemine enjeksiyonu ile kaydedilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.67'deki optimize edilmiş şartlara göre) ..... 131
- Şekil 4.75. A) GDH/Poli-Pcv/PGE kullanılarak 0,01 M NAD<sup>+</sup> ve 1,0 M KCl içeren 0,1 M PBS de hazırlanmış örnek, örnek+25 µM glikoz, örnek+50 µM glikoz ve örnek+75 µM glikoz çözeltilerinin akış sistemine enjeksiyonu ile elde edilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.67'deki optimize edilmiş

şartlara göre) B) GDH/Poli-Pcv/PGE ile dekstroz için alınmış standart katma grafiği .....	132
Şekil 4.76. GDH/Poli-Pcv/PGE’de 0,01 M NAD <sup>+</sup> içeren 1 µM glikoz ile sadece 0,01 M NAD <sup>+</sup> içeren çözeltilerin AEA sistemine enjekte edilmesiyle elde edilen AE amperometrik akım zaman eğrileri .....	133
Şekil 4.77. A) Yalın PGE, B) K.PGE, C) Clm/PGE, D) Poli-Clm/PGE, E) Pcv/PGE ve F) Poli-Pcv/PGE’nin AFM görüntüleri .....	134
Şekil 4.78. A) Yalın PGE, B) K.PGE, C) Clm/PGE ve D) Poli-Clm/PGE’nin SEM görüntüleri.....	135
Şekil 4.79. Yalın PGE’nin A) EDX spektrumu alınan bölgelerin işaretlendiği SEM görüntüsü ve B) EDX spektrumu.....	135
Şekil 4.80. a) Yalın PGE, b) Clm/PGE, c) pH=3,0 BRBS’de hazırlanan Poli-Clm/PGE, d) pH=9,0 BRBS’de hazırlanan Poli-Clm/PGE, e) pH=3,0 BRBS’de hazırlanan Poli-Pcv/PGE, f) Pcv/PGE ve g) pH=9,0 BRBS’de hazırlanan Poli-Pcv/PGE’nin Raman spektrumları .....	138
Şekil 4.81. Elektrokimyasal impedans devre modeli ve impedans eğrisi (Rs: Çözelti direnci, Ret: elektron transfer direnci, C: Sığa, W: Warburg impedansı).....	140
Şekil 4.82. A) Clm/PGE, B) Poli-Clm/PGE, C) Pcv/PGE ve D) Poli-Pcv/PGE’nin Yalın PGE ile birlikte alınan impedans eğrileri.....	140

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
Çizelge 2.1. PGE'nin kullanılmasıyla yapılan çalışmalar .....	28
Çizelge 4.1. ASA modifiye PGE'lerle NADH'nin AE amperometrik tayini için elde edilen analitiksel parametreler .....	110
Çizelge 4.2. GDH/Poli-Pcv/PGE'de FI amperometrik glikoz biyosensörü için edinilen analitiksel parametreler .....	133





## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

$\beta$ -Nikotinamid adenin dinükleotid (NADH), 350'den fazla dehidrogenaz için önemli bir koenzim olup, birçok enzimatik tepkimelerin gerçekleşmesinde görev almaktadır. Canlı hücrelerde, NADH adenzin trifosfat üretiminde rol oynar; ve aynı zamanda bu bileşik hücrelerden enerji salınımını düzenler. Bu sebepten NADH'nin elektrokimyasal yükseltgenmesi biyoelektrokimyasal araştırmalarda geniş uygulamaları olan önemli bir yere sahiptir (Gorton ve Domingues, 2002; Kumar ve Chen, 2008; Lates ve ark., 2011). Yine, 500'den fazla enzimin bir kofaktörü olan NADH, gıda kontrolü, çevre ve klinik analizde yaygın olarak kullanılan önemli bileşiklerden biridir. Bu nedenle, bu biyolojik molekülün tespit ve tayini oldukça önem arz etmektedir (Liu ve ark., 2012).  $\text{NAD}^+$ , NADH'nin yükseltgenmiş halidir.  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  elektrokimyasal tepkimelerde özellikle biyosensör tasarımında kullanılan önemli bir redoks çiftidir. Biyosensörler, temelde biyoalgılayıcı (biyoreseptör) ve dönüştürücüden (transducer) meydana gelmektedir. Biyoorganik moleküller olarak bilinen antikor, enzim, protein, nükleik asit gibi türler biyoalgılayıcı olarak en çok kullanılan bileşiklerdendir. Her geçen gün çeşitli amaçlar için farklı alanlarda biyosensörler geliştirilmektedir. Sensörlere dayalı teknoloji, farmasötik ürünler, sağlık ürünleri, gıda, tarım ve çevre gibi büyük sanayilerde çok geniş kapsamlı bir uygulama alanı bulmaktadır. Geliştirilen bu sensörler, kompleks bir bileşik içerisinde, belirli bir bileşiğe sürekli ve tersinir olarak seçici ve hızlı yanıt verme özelliğinden dolayı sadece kimya alanı ile değil aynı zamanda gıda endüstrisi, biyo-sanayi, tıp ve çevre kontrolü gibi benzeri birçok alanda da faydalı bir şekilde kullanılmaktadır (Gaudin, 2017). NADH, dehidrogenazlar tarafından katalize edilen enzimatik tepkimelerde önemli bir görev almaktadır. Kofaktör NADH'nin yapısında bulunan ve nikotinamid içeren nükleotid, biyolojik sistemlerde elektron transferine aracılık eder. NADH'nin elektrokimyasal olarak belirlenmesi redoks biyolojik sistemlerde de önem arz etmektedir. NADH'nin yalın elektrotlarla doğrudan tayini aşırı potansiyel gerektirdiğinden, bu potansiyelde çeşitli istenmeyen türlerin yükseltgenmesinden ve yükseltgenme ürünlerinin elektrot yüzeyine adsorplanmasıyla elektrot yüzeyinin kirlenmesinden dolayı, NADH'nin elektrokimyasal tayininde bazı problemler ortaya çıkmaktadır (Mutyalı ve Mathiyarasu, 2016). Bu tür problemlere çözüm getirmek için kimyasal modifiye elektrotlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu

aşırı potansiyeli azaltmak ve NADH ile modifiye elektrot arasındaki elektron transfer hızını artırmak için elektrot yüzeyi çeşitli mediyatörler ve nanoparçacıklarla modifiye edilerek bu problemler giderilmiştir. Örneğin fenotiyazin (Lates ve ark., 2011), 1,2-naftokinon (Liu ve ark., 2012), poli-hematoksilin (Dilgin ve ark., 2010), poli tiyonin (Baskar ve ark., 2012), poli 3,4-etilendioksipirrol (You ve Jeon, 2011), pirokatekol violet (Pcv) (Golabi ve ark., 2002; Zhu ve ark., 2014) gibi boyar maddeler modifiye elektrot hazırlanmasında kullanılmıştır.

Gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışmasında mediyatör olarak ASA boyar maddelerinden Cta, Trp, Clm ve Pcv kullanıldı. Cta direkt, reaktif ve azo boyaların sentezi için önemli bir boyar madde olarak (Zhong ve ark., 2014), alüminyumun spektrofolorimetrik olarak tayin edilmesinde (Themelis ve Kika, 2006), kobalt ve nikelin analizinde (Lemos ve ark., 2006) kullanılmıştır. Bir dihidroksi naftalin disülfonik asit olan Cta boya üretiminde, formaldehit analizi için bir kromojen oluşturucu reaktif, analitik reaktifler olarak da azo türevleri için gerekli bir ara madde olarak da kullanılmaktadır. Ayrıca çeşitli azo türevlerinin sentezinde önemli bir reaktif olmasının yanında, sadece boya endüstrisinde değil aynı zamanda çeşitli analitik kimya uygulamalarında da kullanılmaktadır (Sleem ve ark., 2013). Trp de ligand olarak paladyum elementi ile oluşturduğu kompleks bileşiklerinin incelenmesinde kullanılmıştır (Levitskaya ve ark., 2003). Clm, bir sülfonik asitten ve iki hidroksil grubundan oluşan, protonları moleküler yapıdan pH değişimi yoluyla uzaklaştırılan üç protonlu bir asittir (Cisneros-Garcia ve ark., 2015). Suda çözünebilir özelliğine sahip olan Clm bir azo boyar maddedir. Güçlü kompleks oluşturma özelliğinden dolayı çeşitli metallerin analizinde (Hashemi ve ark., 2008; Rasouli ve Ghavami, 2016), sülfürün elektrokatalitik yükseltgenmesinde ve akışa enjeksiyon sisteminde amperometrik tayininde (Emir ve Dilgin, 2018; Mazloun-Ardakani ve ark., 2009) ve dopamin'in elektrokatalitik yükseltgenmesi ve tayininde (Chandra ve ark., 2010) kullanılmıştır. Pcv suda çözünen bir mediyatör olarak, bir mol orto sülfobenzoik asit anhidrid ile iki mol pirokatekolün yoğunlaştırılmasıyla hazırlanan bir sülfon ftalin boyasıdır. Pcv'nin, aromatik halkanın bitişik karbon atomlarına bağlanmış -OH grupları içeren katekol ve gallat ailelerinden gelen materyalleri bulundurma özelliğine sahip olması, çeşitli inorganik materyaller üzerine güçlü bir biçimde adsorbe edildiğini göstermiştir (Zhu ve ark., 2014b). Elektrot yüzeyi, Pcv ile modifiye edilerek ve bizmut film oluşturulduktan sonra kadmiyum ve kurşun tayininde (Chamjangali ve ark., 2015), çok duvarlı karbon nanotüp kompozit film

modifiye elektrotun Pcv ile modifiye edilerek ürik asit, ksantin ve hipoksantin'in aynı anda tayininde (Wang, 2011), hidrazinin elektrokatalitik yükseltgenmesinde ve tayininde (Ayaz ve Dilgin, 2017; Golabi ve ark., 2001), hidrojen peroksit tayininde (Sheng ve ark., 2007) ve NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinde ve tayininde (Zhu ve ark., 2014) kullanılmıştır. Bu özellikleriyle birlikte Pcv aynı zamanda kanserojenik, mutajenite ve teratojenite potansiyeline de sahiptir (Jiang ve ark., 2012).

Literatür araştırmasına bakıldığında yakın zamana kadar, voltammetrik yöntemler elektrokimyasal reaksiyonların incelenmesi için popüler bir araç haline gelmiştir (Jadon ve ark., 2016). Elektroanalitik teknikler, çevre ve canlılar için temel önemi olan birçok organik ve inorganik türlerin analizinde kullanılmaktadır. Döngüsel voltammetri (Cyclic voltammetry, CV), diferansiyel puls voltammetrisi (Differential pulse voltammetry, DPV) ve kare dalga voltammetrisi (Square wave voltammetry, SWV) vb. voltammetrik tekniklerin, farmasötik dozaj formlarında ve biyolojik sıvılarda ilaçlar ve ilgili moleküller de dahil olmak üzere organik moleküllerin saptanması için çok hassas olduğu kanıtlanmıştır (Brycht ve ark., 2016; Nigovic, 2006). Voltammetrik teknikler, mükemmel seçicilik ve hassaslık gösterir, çünkü analit, kendisine özel voltammetrik pik potansiyeli ile kolayca tanımlanabilir (Chillawar ve ark., 2015). Akış kimyası, son on yılda, laboratuvar ölçekte modern sentez yöntemleri ile yoğun bir şekilde gelişmekte olan bir alan olmuştur (Trojanowicz, 2016). AEA sistemi ve amperometrik yöntem, NADH'nin elektrokatalik olarak yükseltgenmesinde ve amperometrik biyosensörlerin incelenmesinde kullanılan yöntemler arasındadır (You ve Jeon, 2011). AEA teknikleri, seçicilik, hassasiyet ve doğruluk göstermelerinden dolayı çeşitli analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kortazar ve ark., 2016). AEA sisteminin, amperometrik dedektör ile birlikte kullanılması ve bağlantının sağlanması oldukça kolaydır. Buna ilaveten AE amperometrik teknikler, voltammetrik tekniklerle karşılaştırıldığında, elektrodun daha yüksek duyarlık ve daha az yüzey kirliliği gibi bazı avantajlar sağlanmasıyla dikkat çekmektedir (dos Santos ve ark., 2011; Lourencao ve ark., 2015). Ayrıca, AEA düşük maliyetli sistem bileşenleri, yüksek analitik frekans ve otomasyon fırsatları gibi diğer avantajları da beraberinde getirmektedir (Lourencao ve ark., 2015). Akış analizi yüksek ölçüde tekrarlanabilir örnek işleme koşulları ve zamanlama, kimyasal denge sağlamadan analitik olarak yararlı reaksiyonların kullanılmasına imkan verme gibi ayırt edici özelliğe sahiptir (Hansen ve Miro, 2007; Rocha ve ark., 2015). AEA, akışa esaslı numune hazırlama işlemi ile analitik kayıpların ve

kirlilik risklerinin en az düzeye indirgenmesi (Golimowski ve Golimowska, 1996; Rocha ve ark., 2015), analizin verimliliğini artırma ve numunenin tüketimini oldukça en aza indirmeye (Zhao ve ark., 2015) gibi önemli avantajlara da sahiptir.

Elektroanalitik yöntemlerde çalışma elektrotunun, tayin edilmesi istenen analit için kullanılması ve yüksek duyarlıkla sonuçların alınması oldukça önemlidir. Son yıllarda kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrotlar (KME'ler), çeşitli analizlerdeki potansiyel uygulamaları, elektrotun yapımı ve yenilenmenin nispeten kolay olmasından dolayı bilim insanlarının dikkatini çekmektedir (Jadon ve ark., 2016; Svancara ve ark., 2001). Yalın elektrotlarla yapılan çalışma analize imkan vermeyebilir veya aşırı potansiyelden dolayı yüksek seçicilikte analite yanıt alınmayabilir. Bunun için yalın elektrotlar çeşitli materyallerle modifiye edilme yoluna gidilmiştir. Modifikasyon; elektron transfer kinetiğini arttırabilir, katalitik bir etkiye neden olur ve dolayısıyla elektroanalitik uygulamalarda ölçüm hassasiyetini belirler (Jadon ve ark., 2016). Bir elektrot yüzeyi modifiye edildiğinde genel olarak; fizikokimyasal özelliklerin elektrota aktarılması söz konusu olur. Böylece daha yüksek duyarlık sağlayan geniş yüzey alanlı materyallerin kullanılmasından dolayı gelişmiş elektrokatalitik etkinlik, immobilize edilmiş fonksiyonel grupların analite karşı seçiciliğin artması, bazı materyallerde hızlı difüzyon kinetiği sağlanması ve elektrot yüzeyinde bir analitin ekstraksiyonu ve biriktirilmesi gibi önemli avantajlar sağlar (Jadon ve ark., 2016; Sajidveark., 2016). Elektrot yüzeyi metal nanopartiküller, karbon nanotüpler ve azo boyar maddeler gibi çeşitli materyallerle modifiye edilebilmektedir. Elektrokimyasal çalışmalarda çalışma elektrotu olarak camımsı karbon elektrot (GCE), karbon pasta elektrot (CPE) ve kalem grafit elektrot (PGE) gibi karbon esaslı elektrotlar yaygın olarak kullanılmaktadır (Chillawar ve ark., 2015). PGE'ler, ucuz maliyet, tek kullanımlık, kolay modifiye etme imkânı sunar. Ayrıca iyi mekaniksel sağlamlık, kimyasal açıdan inert olması, ilginç elektrokimyasal özellikler, düşük zemin akımı, geniş potansiyel penceresi, analitin adsorpsiyonu, GCE ile karşılaştırıldığında uzun yüzey temizleme işlemi gerektirmeyen kolay ve hızlı yenilenebilir yüzey alanı sunması bakımından da daha iyi şartlar sunmaktadır (Akanda ve ark., 2016; Ertek ve Dilgin, 2016; Sağlam ve Dilgin, 2017). PGE'lerin bu üstün özelliklerinden dolayı elektrokimyasal sensör ve biyosensör çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaya devam etmektedir.

Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen ve biyokimyasal tepkimeleri katalizleyen organik moleküllerdir. Enzimlerin etkilediği maddelere substrat denir. NADH,

dehidrogenaz esaslı enzimatik reaksiyonlar sırasında canlı organizmada üretilen önemli bir koenzim olmasıyla birlikte biyolojik sistemlerde bir takım önemli rollere de sahiptir (Karimi-Maleh ve ark., 2014; Zare ve ark., 2006). NADH'nin elektrokimyasal olarak yükseltgenmesi hem dehidrogenaz enzimleri için bir kofaktör olması hem de biyolojik sistemdeki elektron transfer zincirindeki rolü ve ayrıca NAD<sup>+</sup>'ya bağımlı dehidrogenaz substratları için voltammetrik biyosensörlerin gelişimine katkı sağlaması bakımından dikkat çekicidir (Karimi-Maleh ve ark., 2014; Shan ve ark., 2010).

Bu tez çalışmasında; i) tek kullanımlı, ucuz, kolay bir şekilde modifiye olabilen, ticari açıdan bulunması kolay, uzun temizleme basamakları gerektirmeyen bir elektrot türü olan PGE yüzeyine gerek adsorpsiyon gerekse elektropolimerizasyon yoluyla ASA boyar maddelerinden Clm, Pcv, Cta ve Trp molekülleri modifiye edilmiş, ii) modifiye edilen PGE'lerle, biyoelektrokimyasal çalışmalarda önemli bir yeri olan NADH'nin elektrokatalitik olarak yükseltgenme yanıtlarına bakılmış, iii) ASA modifiye PGE yüzeyine dehidrogenaz enziminin immobilizasyonu sağlanarak NAD<sup>+</sup>/NADH redoks çiftine bağlı elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiş, iv) daha önceden PGE için tasarlanan FAH kullanılarak NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine bağlı amperometrik sensörleri AEA sisteminde ilk defa gerçekleştirilmiş, v) dehidrogenaz enzimi tutturulmuş redoks mediyatör modifiye PGE ile glikoz için elektrokimyasal biyosensör çalışmaları yine AEA sisteminde ilk defa gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında kullandığımız organik redoks mediyatörlerden Cta ve Trp molekülleri ile modifiye edilmiş elektrotlardan iyi bir elektrokatalitik etki gözlenmemiştir. Ancak Clm ve Pcv ile modifiye elektrotlardan iyi elektrokatalitik yanıtlar alınmıştır. Bunlarla ilgili deneysel sonuçlar daha sonraki aşamalarda verilecektir. Bir sonraki basamakta ise tez konusuyla ilgili olarak; organik redoks mediyatörlerden, kimyasal modifiye elektrotlar ve kalem grafit elektrotlardan, AEA sisteminden, NAD<sup>+</sup>/NADH redoks çiftinden, dehidrogenaz enzimlerine bağlı biyosensörlerden, kısaca bahsedilecektir.

### **1.1.Organik Redoks Mediyatörler ve Kimyasal Modifiye Elektrotlar**

Voltammetrik teknikler analitin voltammetrik pik potansiyeli ile kolayca tanımlanabilmesine imkân sunduğu için mükemmel seçicilik ve duyarlık gösterirler. Bununla birlikte, bu tekniklerle karşılaşılan en büyük problem, eş zamanlı olarak tayin edilmek istenen analitin yanında, bazı bileşiklerin girişim yapmasıdır. Analit ve girişim

etkisi olan maddelerin pik potansiyelleri aynı yerde çakıştığından dolayı elde edilen voltammetrik yanıtların karmaşık hale geldiği bir sonuç elde edilir. Bütün bu sorunların üstesinden gelmek için çeşitli malzemeler ve teknikler kullanılarak modifiye edilmiş elektrotlar kullanılmaktadır. Voltammetrik tekniklerde GCE, PGE, CPE, altın ve platin gibi farklı elektrotlarda meydana gelen reaksiyonlar incelenir ve elektrokimyasal analizlerde bu elektrotlar sıklıkla kullanılır. Bununla birlikte, bu elektrotların uygulanması sırasında, elektrot yüzeyinin çeşitli istenmeyen ve elektrot tepkimeleri sonucunda ortaya çıkan kimyasal türlerle kirlenmesi olasılığı oldukça fazladır ve bu olaya bağlı olarak da geliştirilen elektrokimyasal yöntemlerin hassasiyeti ve doğruluğu azalır. Bu şekilde yalın halde elektrotların kullanılması bu uygulamaları sınırlı hale getirir (Chillawar ve ark., 2015). İşte tüm bu istenmeyen sonuçların üstesinden gelmek ve elektrotun istenen türe daha duyar ve girişimlerden uzak bir özellik kazandırmak için KME'ler hazırlanır.

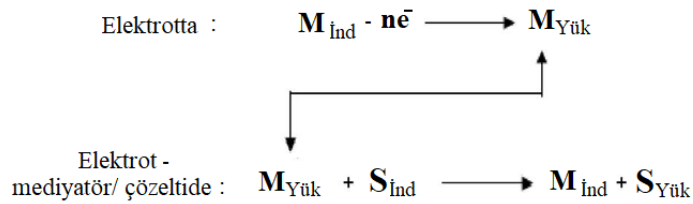
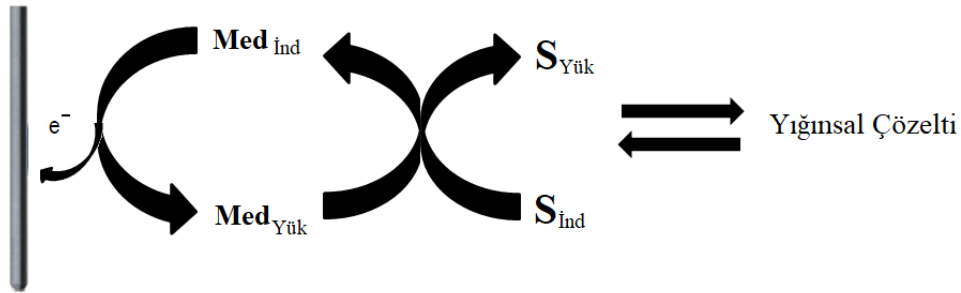
IUPAC'e göre, bir KME "iletken veya yarı iletken malzemeden yapılmış ve kimyasal modifiye edici bir film ile kaplanmış, faradayik reaksiyonları veya ara yüz potansiyel farkları ile bir filmin kimyasal, elektrokimyasal veya optik özelliklerini gösteren bir elektrot" olarak tanımlanmaktadır. KME'ler modifiye edilmemiş elektrotlara göre yüksek aşırı gerilimi azaltır, türlerin yükseltgenme veya indirgenmesini katalize ederek çeşitli avantajlar sunar (Chillawar ve ark., 2015). Elektrokimyasal çalışmalarda seçilen elektrotun türü, tasarlanan bir sensörün ya da biyosensörün; maliyet, duyarlılık, seçicilik ve kararlılık ölçütlerini etkilemesinden dolayı, sensör hazırlanmasında elektrot için gerekli materyal seçimi, önemli bir kriterdir.

KME'ler üzerine yapılan araştırmaların en önemli konularından biri, elektrot yüzeyine modifiye edilen materyalin elektrokatalitik özellik göstermesidir ki bu özellik birçok bileşiğin seçici ve duyar bir şekilde tayin edilmesini sağlamaktadır. Bu amaçla son zamanlarda inorganik nanomateryaller (metal oksitler, metalnanoparçacık, kuantum noktalar, karbon nanotüp, grafen ya da bunların hibrit materyalleri) (Akanda ve ark., 2016; Deng ve ark., 2015; Ertek ve Dilgin, 2016; Karakaya ve Dilgin, 2017; Vu ve ark., 2015b) oldukça sık kullanılmış olsa da, modifiye malzemesi olarak organik redoks moleküller iyi bir elektrokatalitik özellik gösterdiğinden dolayı KME hazırlanmasında redoks mediyatör olarak kullanılması hala devam eden popüler konulardan biridir. Çünkü organik boyar maddeler suda çözünebilmekte (Teymourian ve ark., 2012), ucuz maliyetli olması yanında NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinde elektron transferine aracılık etmektedir ve

bu sebeplerden dolayı çok çeşitli redoks mediyatörleri bu amaç için kullanılmıştır (Sheng ve ark., 2007). Katekol ve türevleri (Nematollahi ve Golabi, 1996), fenazin grubu boyar maddeler (Dilgin ve ark., 2005; Gligor ve ark., 2009a, b; Hoshino ve ark., 2012; Lates ve ark., 2011), hematoksilin (Dilgin ve ark., 2010), ve quercetin gibi kinolik bileşikler (Dilgin ve ark., 2013; Dilgin ve ark., 2012) CIm (Chandra ve ark., 2010; Nigovic, 2006; Rasouli ve Ghavami, 2016) ve Pcv (Golabi ve ark., 2001, 2002; Nateghi ve ark., 1998; Zhu ve ark., 2014b) gibi aromatik sülfonik boyar maddeler NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinde kullanılan redoks mediyatörlerine örnek olarak verilebilir. Daha bunun gibi birçok redoks mediyatörler tutturularak hazırlanmış KME'ler birçok analitin tayini için sensör ve biyosensör tasarımında kullanıldığı literatür bilgilerinden görülmektedir.

Genel olarak katalitik etki gösteren tüm KME'ler, elektrot yüzeyinde redoks merkezinin modifikasyonu üzerine kurulmuştur. Modifiye edilen redoks merkezi, yalın elektrotta yavaş yavaş (veya hiç) yükseltgenip indirgenen substrat türleri için hızlı bir elektron aktarım aracı olarak görev yapar. Elektron transferine aracılık eden organik redoks mediyatörün yüzeye tutturulması ile hazırlanan KME'lerin yükseltgenmeye dayalı elektrokatalitik olay ile ilgili temel ilke Şekil 1'de gösterilmektedir (Ciucu, 2014). Bu şekilde analit, ana çözeltiden elektrot yüzeyine difüzyon ve burada mediyatörün yükseltgenmiş formuyla ( $Med_{yük}$ ) tamamen kimyasal tepkimeyle yükseltgenir.

### Elektrot



Şekil 1.1. Redoks mediyatör ile hazırlanmış KME yüzeyinde elektrokatalitik yükseltgenme mekanizması (Ciucu, 2014)

Bu olay tüm elektrokatalitik yükseltgenme çalışmalarında gerçekleşen bir ECE (Electrode-Chemical-Electrode) mekanizmasıdır. Bu mekanizmanın ilk basamağına göre (Electode reaction 1) önce elektrot yüzeyinde redoks mediyatörün indirgenmiş formu ( $Med_{ind}$ ), elektrota  $e^-$  vererek yükseltgenmiş formuna dönüşür ( $Med_{yük}$ ). Bu sırada analit bulk (ana) çözültiden elektrot yüzeyine difüzenir ve mediyatörün yükseltgenmiş formu ile bir kimyasal tepkimeye girer (Chemical reaction). Bu kimyasal reaksiyon ile  $Med_{yük}$  indirgenirken ( $Med_{ind}$ ) analit ise yükseltgenmiş formuna dönüşür. Son basamakta ise (Electrode reaction 2) elektrotun potansiyeli,  $Med_{yük}$  kararlı halde kalması için yeterli bir pozitif değerde tutulduğundan, analit derişimine bağılı olarak kimyasal reaksiyon sonucu oluşan  $Med_{ind}$  elektroda elektronunu vererek hızlıca tekrar yükseltgenir ( $Med_{yük}$ ). Böylece heterojen elektron transferi, doğrudan elektrot ve analit arasında değil, elektrot ve redoks mediyatör arasında gerçekleşir. Esasında, mediyatör elektrot ve analit arasında elektron alıcı ve verici fonksiyonu olarak işlev görebilir. Bu elektrokatalitik olay sonucunda ya potansiyel daha negatife (yükseltgenme için) veya daha pozitif (indirgenme için) kayar, ya da yalın elektroda göre akımda artış olur veya her iki olay birlikte görülür (Ciucu, 2014). Mediyatörlü elektrokatalizlemenin üç önemli özelliğı vardır. Bir elektrokatalitik KME ile analitin yükseltgenmesi veya indirgenmesi, bir katalizör-substrat ilave maddesi oluşmadığı sürece aracı maddenin katalizör çiftinin redoks potansiyelinde gerçekleşir. İkinci olarak, arabulucu katalizörü ve substrat formal potansiyelleri benzer olmalıdır. Son olarak, substratın başarıyla katalize edilmiş bir reaksiyonu yalın elektrota göre, sırasıyla indirgeme veya yükseltgeme için daha az negatif veya pozitif potansiyelde meydana gelir. KME'lere dayalı elektroanalitik araştırmalar için bir diğer ilgi alanı da enzim immobilize edilmiş KME'lerin yapımı ve karakterizasyonudur. Bu tür elektrotlar elektrokimyasal tayinin avantajları ile bir enzimin doğal substratı için sergilediğı spesifiklik, seçicilik ve enzimin katalitik gücünü birleştirmektedir. Böylece enzim immobilizasyonu ile birlikte redoks mediyatörlerin kullanılmasına bağılı çok duyar ve seçici biyosensörler tasarlanmıştır (Ciucu, 2014). Bu amaç doğrultusunda çevresel, biyolojik ve sağılık açısından önemli birçok bileşimin elektrokimyasal sensör ve biyosensör uygulamalarında çok sayıda ve çeşitli gruplar içeren (katekol ve sülfonik asit gibi) grubu organik redoks boyar maddeler, mediyatör görevi görmesi bakımından modifiye elektrotların hazırlanmasında kullanılmıştır (Dilgin ve ark., 2012c; Gaudin, 2017; Hu ve ark., 1999; Jiang ve ark., 2012; Katakis ve Dominguez, 1997; Pandey ve ark., 2001; Sheng ve ark., 2007; Wang, 2011).



KME yapımında metilen mavisi (Dagci ve Alanyalioglu, 2011; Dilgin ve ark., 2012a; Kertesz ve Van Berkel, 2001; Xiao ve ark., 2011; Zhao ve ark., 2009; Zlamalova ve ark., 2014), metilen yeşili (Kossakowska ve ark., 2010), azure A ve azure B (Khan ve Kumar, 2015; Paul ve ark., 2017; Petzer ve ark., 2012), toluidin mavisi (Dilgin ve ark., 2007), meldola mavisi (Fort ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2011), nil mavisi (Dilgin ve ark., 2005), tiyonin (Baskar ve ark., 2012; Li, Z. ve ark., 2013), brilliant kresil mavisi (de-los-Santos-Alvarez ve ark., 2005; Liu, H. J. ve ark., 2012; Wang ve ark., 1997), neutral kırmızısı (Broncova ve ark., 2016; Lin ve ark., 2012; Mazar ve ark., 2017) gibi azin türü boyar maddeler, hematoksilin (Aghaei ve ark., 2017; Şahin ve Nakiboglu, 2014), kuersetin (Wang ve ark., 2011; Yang ve ark., 2017; Yu ve ark., 2017), klorojenik asit (Ma ve ark., 2016a; Ma ve ark., 2016b), kafeik asit (Simanaviciute ve ark., 2017) gibi birçok katekol grubu içeren organik bileşikler iyi bir elektrokatalitik özellik gösterdiklerinden dolayı çok kullanılan yaygın redoks mediyatör maddeleri arasında yer almıştır. Yukarıdaki literatürlerde geçen boyar maddeler dışında Clm (Chandra ve ark., 2010; Hashemi ve ark., 2008; Rasouli ve Ghavami, 2016), Pcv (Chamjangali ve ark., 2015; Deng ve ark., 2015; Zhu ve ark., 2014b) gibi ASA boyar maddeler grubu ile birlikte katekol grubu içeren indikatörlerde redoks mediyatör olarak kullanılmıştır. Bu organik redoks mediyatörlerle hazırlanan KME'ler çok sayıda molekülün elektrokatalitik yükseltgenmesinde kullanıldığı gibi, bu redoks mediyatörlere enzim immobilize edilerek elektrokimyasal biyosensör çalışmaları da gerçekleştirilmiştir (Zhu ve ark., 2014b).

## **1.2. Akışa Enjeksiyon Analiz (AEA) Sistemi**

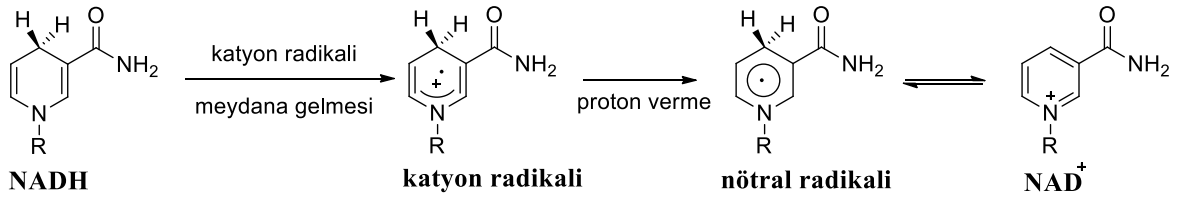
AEA kavramı, ilk kez 1975 yılında piyasaya sürülmesi ile birlikte modern analitik prosedürlerin nasıl uygulanmakta olduğu üzerinde derin bir etkisi olmuştur (Hansen ve Miro, 2007). Rutin analiz ve kalite güvencesi için ideal bir analitik yöntem otomatik, basit, düşük maliyetli, sağlam, hassas ve doğru olmalıdır ve yüksek bir numune analiz frekansına sahip olmalıdır. AE ve sıralı enjeksiyon (sequential injection, SI) analizi, yukarıda belirtilen talepleri yerine getiren iyi kurulmuş analitik tekniklerdir (Themelis ve Kika, 2006). AEA'nın ortaya çıkışı ile yeni analitik yaklaşımların ve uygulamaların gelişimi doğrultusunda elektrokimyasal sensör ve biyosensör tasarımı için kullanılan yeni bir yöntem olarak yerini almıştır (Hansen ve Miro, 2007). Numunelerin verimli veya tekrarlanabilir işlemleri veya analitlerin kimyasal dönüşümü, akış analizinin yaygın olarak kabul gören nitelikleridir. Akış analizinin temel bir uygulaması akış sistemine enjekte

edilen çözeltilerin analit derişimine bağlı olarak yanıtının anlık olarak alınması şeklinde ifade edilebilir (Trojanowicz, 2016). AEA düşük maliyetli sistem bileşenleri, yüksek analitik frekans ve otomasyon fırsatları gibi diğer avantajları da beraberinde getirir (Lourencao ve ark., 2015). AEA , düşük numune tüketimi, geçici sinyal ölçümüne dayalı kısa analiz süresi, bir akış dedektöründe kimyasal dönüşümünün zor işlemleri için analizlerin saptanabilir türlere ayrılması ve online yöntemine sahip olması gibi rutin analitik analizler için önemli avantajlara sahiptir (Hansen ve Miro, 2007; Lourencao ve ark., 2015; Rocha ve ark., 2015; Sağlam ve ark., 2016; Trojanowicz, 2016; Zen ve ark., 2003). AEA'nın bu önemli üstünlükleri dikkate alındığında, kabul edilebilir bir doğrulukta, tekrarlanabilir, kararlı ve hızlı yanıt almak için çeşitli modifiye elektrotlar kullanılarak elektrokimyasal sensör/biyosensör çalışmaları AEA sisteminde de gerçekleştirilmiştir (Chamjangali ve ark., 2015; Dilgin ve ark., 2003; Dilgin ve ark., 2005; Ertek ve ark., 2012; Karakaya ve Dilgin, 2017; Piano ve ark., 2010; Rocha ve ark., 2015; Sağlam ve Dilgin, 2017; Sha ve ark., 2004; Wieck ve ark., 1984; Zen ve ark., 2003; Zhao ve ark., 2015; Zhu ve ark., 2014). Literatür incelemelerine bakıldığında, ASA boyar maddeleriyle modifiye PGE ile AEA sisteminde amperometrik sensör çalışmaları mevcuttur. Fakat NADH'ye dayalı sensör ve biyosensör tasarımına ait bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Dolayısıyla tezimizin konu kapsamı itibarıyla, tek kullanımlı, kolay elde edilebilir ve ucuz bir elektrot olan PGE, iyi bir elektrokatalitik özelliğe sahip ASA boyar maddeleriyle birlikte hızlı, devamlı ve minimum örnek tüketim konusunda üstünlük sağlayan AEA gibi avantajlı üç farklı bileşenin bir arada kullanılması sağlanmış ve ilk defa AEA sisteminde ASA organik redoks mediyatörü modifiye PGE kullanılarak NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine dayalı elektrokimyasal sensör ve NADH-NAD<sup>+</sup> redoks çifti ve dehidrogenaz enzimine dayalı biyosensör çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

### **1.3. NADH'nin Elektrokatalitik Yükseltgenmesi**

Etkin, sağlam, düşük maliyetli modifiye elektrotların geliştirilmesi ve bunların enzimatik biyosensörlerin tasarımında kullanılması ve biyoyakıt hücrelerinin daha iyi bir seviyeye getirilmesinde kuşkusuz çok önemli bir yeri vardır. Özellikle bu modifiye elektrotlar, enzimatik kofaktöre yakın bir potansiyeldeki elektrot yüzeyine enzimlerin aktif bölgelerinden elektron taşımada bir araç olmalıdır. Nikotinamid adenin dinükleotit (NAD) dehidrogenaz enzimlerine dayalı amperometrik biyosensörler ve biyoyakıt hücrelerinde

kullanılmak üzere redoks enzimlerine dayalı çok sayıda araştırmalar yapılmıştır. Dehidrogenazlar geçmişte birçok farklı substratın yükseltgenmesini katalize etmek için kullanılmıştır. Enzimler biyoyakıt hücrelerindeki yakıt çeşitliliğini, metanol, gliserol, laktat ve piruvat gibi alışılmamış enzimatik biyoyakıtları da içerecek şekilde genişletmek için kullanılmıştır. Biyosensörlerde ve biyoyakıt hücrelerinde dehidrogenazların kullanılmasının bir sakıncası, nikotinamid varlığına ihtiyaç duyulmasıdır. Çünkü  $\text{NAD}^+$  olmadan enzim aktivitesini gösteremez.  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  redoks çifti düşük bir redoks potansiyeline (pH=7'de -0.56 V vs SCE'ye) sahip olmasına rağmen, yalın bir karbon elektrottaki yükseltgenmesi yüksek bir potansiyel gerektirir ve elektrot yüzeyini kirleten nikotinamid dimerlerin oluşumuna neden olabilir. Örneğin  $\text{NADH}$ 'nin yalın elektrotlarda (Au, GCE vb.) doğrudan yükseltgenmesi, aşırı yüksek potansiyel ( $> 1\text{V}$ ) gerektirmektedir. Katekolamin, askorbik asit ve ürik asit gibi elektroaktif biyomoleküllerin çoğu neredeyse  $\text{NADH}$ 'nin yükseltendiği potansiyele yakın bir potansiyelde yükseltgenir. Ayrıca, modifiye edilmemiş elektrotlarda  $\text{NADH}$ 'nin doğrudan yükseltgenmesi,  $\text{NADH}$ 'nin yükseltgenmiş ürünlerinin adsorpsiyonu nedeniyle elektrot yüzeyinin kirlenmesi ile sonuçlanır, bu da daha az duyarlılık, zayıf seçicilik ve kararsız analitik sinyallerin elde edilmesine neden olur (Kumar ve Chen, 2008). Örneğin şekil 1.2'de oluşan yan ürünler ve yükseltgenme ürünü gösterilmiştir. Bu yan ve ana ürünlerin adsorpsiyonu, elektrot yüzeyinin kirlenmesine ve kısa ömürlü olmasına neden olmaktadır.

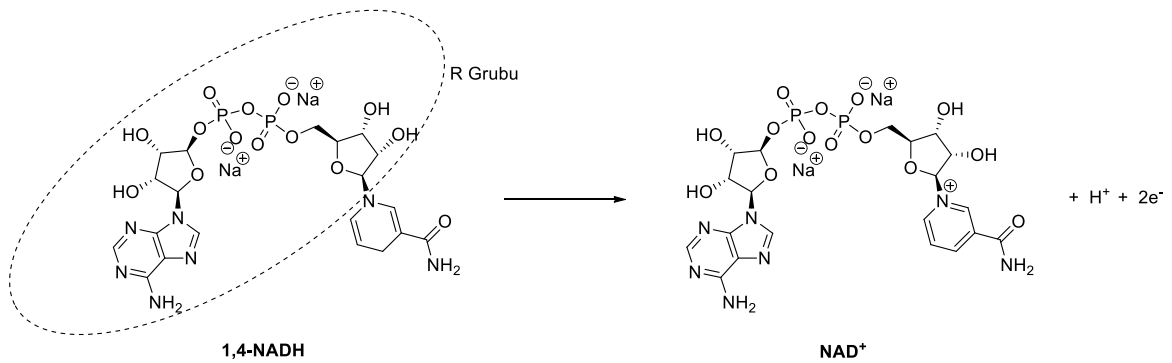


şekil 1.2.  $\text{NADH}$ 'nin yükseltgenme mekanizması (Radoi ve Compagnone, 2009)

$\text{NADH}$ 'nin aşırı potansiyelde yükseltgenmesini azaltarak daha negatif potansiyele kaydırmak ve aynı zamanda girişim yapabilecek maddelerin etkisini azaltmak için çeşitli mediyatörler kullanılmıştır (Meredith ve ark., 2012). Mediyatör kullanılarak  $\text{NADH}$ 'ye duyar bu tür modifiye elektrotların yapımında kullanılan farklı algılama konfigürasyonları vardır. Bunlar elektrot yüzeyinde tutma, basit desorpsiyon veya döküm prosedürleri, elektrograft yöntemi, kimyasal izolasyon etkileşimleri, kimyasal kovalent bağlanma,

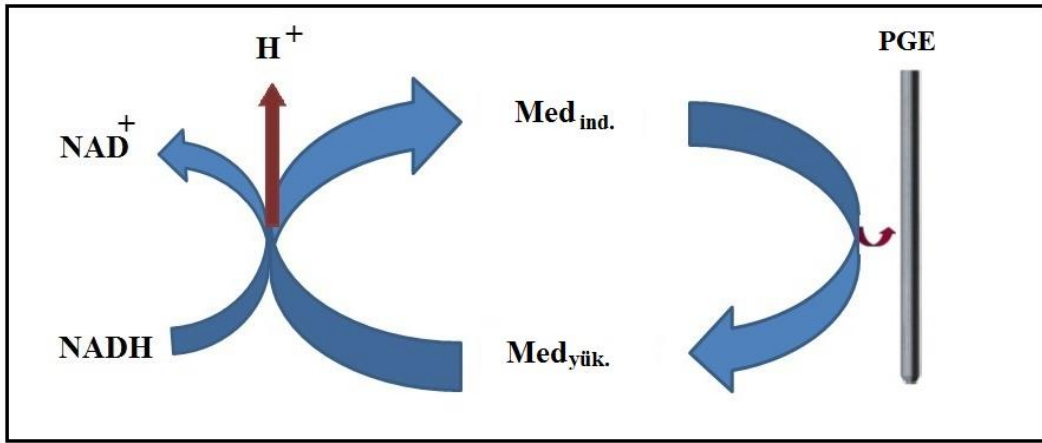
elektrokimyasal aktivasyon adımları, elektropolimerizasyon gibi sayılabilir. Biyolojik moleküllerin elektroanalizi için elektrot yüzeyinde elektrokimyasal olarak ince film oluşturma ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur (Cosnier, 2003, 2005; Kumar ve Chen, 2008; Trojanowicz ve Krawczyk, 1995). İşte tüm bu olumsuz sonuçlardan kaçınmak için daha önceden de vurguladığımız gibi KME'ler geliştirilmiştir. Seçilen deney şartlarında elektrot yüzeyine yakın bölgede elektron transferini hızlandırmak için elektrot yüzeyi özellikle elektrokatalitik özelliğe sahip çeşitli materyallerle modifiye yoluna gidilmiştir. Elektrokimyasal biriktirmeyle polimer film oluşturulması; seçicilik, duyarlık, homojenlik, elektrot yüzeyine güçlü yapışma gibi avantajlar sağlar (Kumar ve Chen, 2008). NADH'nin yükseltgenmesi mekanizması Şekil 1.3'de verilmiştir (Radoi ve Compagnone, 2009).

NADH'nin etkili elektrokatalitik yükseltgenmesi için iyi bir mediyatörün özelliği şöyle sıralanabilir; (i) Elektrokimyasal davranışında aktif özellik göstermeli, (ii) redoks mediyatörün formal potansiyeli NADH'nin yükseltgengendiği potansiyelinden daha düşük olmalı, (iii) elektron transfer hız sabiti (ks) yüksek değere sahip olmalı, (iv) enzimatik olarak aktif NAD<sup>+</sup> oluşturmali, (v) kirletme etkisi olmamalı, (vi) uzun süreli kararlı olmalı, (vii) analitin yüksek aşırı potansiyel değerini daha negatif değerlere kaydırmalıdır. Bununla birlikte modifiye elektrotlar NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesini sağlamanın yanında yüzeyde oluşturulan redoks filminin tamamının katalitik yükseltgenmesine katkıda bulunmasını sağlamak için, immobilize edilmiş redoks bölgeleri arasında kolay yük taşınmasını sağlaması da önemlidir (Kumar ve Chen, 2008). Tez çalışmamızda kullandığımız organik redoks mediyatörlerden sadece Clm ve Pcv modifiye elektrotlar ile NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine olumlu sonuçlar alınabilmiştir.



Şekil 1.3. NADH'nin elektrokimyasal yükseltgenme tepkimesi (Kumar ve Chen, 2008)

NADH yükseltgenmesinde izlenen iki elektron ve bir proton elektrokimyasal-kimyasal-elektrokimyasal (ECE) mekanizması yaygın olarak kabul edilmektedir (Radoi ve Compagnone, 2009). Elektrot yüzeyinde mediyatör ile NADH'nin tepkimesi Şekil 1.4.'de verilmiştir. Bu tepkimeye göre mediyatörün yükseltgenmiş formu NADH ile tepkimeye girerek önce kompleks yapıda bir ara ürün üzerinden NADH,  $\text{NAD}^+$ 'ya yükseltgenirken mediyatör indirgenmiş formuna dönüşür. Ardından redoks mediyatörün indirgenmiş hali elektronlarını elektrota vererek tekrar yükseltgenmiş hale geçer ve bu sırada ilgili analite yani NADH'ye elektrokatalitik etki göstererek NADH derişimine bağlı bir elektrokimyasal sinyal elde edilir.



Şekil 1.4. Elektrot yüzeyinde mediyatör ile NADH'nin tepkimesi

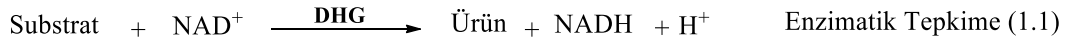
#### 1.4. DHG Enzimli ve $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ 'a Bağlı Elektrokimyasal Sensör ve Biyosensörler

Çevre, gıda alanlarında ve insan sağlığı için önemli yeri olan bileşiklerin doğru ve düşük miktarlarda analizi için yeni yöntemlerin geliştirilmesi önemlidir. Bundan dolayı elektroanalitik yöntemlerin gelişmesiyle geçen süre içerisinde biyosensörler, her alanda çok çeşitli bileşiklerin tanınması ve ayrılması için güçlü araçlar haline gelmeye başlamıştır. İlgili analit ile etkileşime giren bir biyotanımlayıcı elaman ile biyotanımlayıcı elamanı ölçülebilir bir sinyal haline çeviren bir dönüştürücü eleman (transducer) arasındaki yakın etkileşime dayanan biyosensörler geliştirilmiştir. Bu analitik araçlar, yüksek seçicilik ve duyarlılık, düşük cihaz maliyeti, kullanım kolaylığı ve testin hızlı olması nedeniyle klasik analiz tekniklerine göre gayet hızlı bir şekilde ilerleme sağlamıştır (Campas ve ark., 2009).

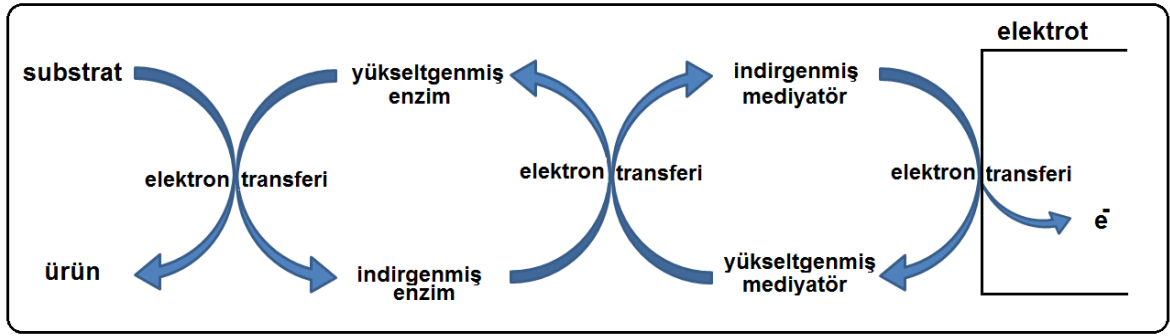
Biyosensörler içerisinde en çok kullanılanı elektrokimyasal biyosensörlerdir. Elektrokimyasal biyosensör, elektronik iletken, yarı iletken veya iyonik iletken malzeme bir biyokimyasal filmle kaplandığından, kimyasal olarak modifiye edilmiş bir elektrot olarak kabul edilmektedir. Tipik bir biyosensör yapısı üç özelliğe sahiptir. Bunlar tanıma elemanı, sinyal dönüştürme yapısı ve bir sinyal katlandırıcı/işleme elemanı. Elektrokimyasal biyosensörlerde en önemli husus biyoalgılayıcı elementin dönüştürücüye oldukça yakın olmasıdır. Biyosensörler genellikle belirli bir analitin veya analitler grubunun konsantrasyonu ile orantılı olan dijital bir elektronik sinyal verir. Birçok elektrokimyasal sensör tipi hem biyotanımlayıcı elemente hem de dönüştürücüye bağlı olarak geliştirilmesine rağmen, en sık kullanılan elektrokimyasal sensör tipi biyoalgılayıcı elementin oksidoredüktaz enzimlerinin (dehidrogenaz ve oksidaz enzimleri) ve dönüştürücünün amperometri olduğu enzimatik amperometrik biyosensörlerdir. Bu enzimler arasında oksijene bağlı oksidaz enzimleri geniş uygulama alanı bulmasına rağmen, elektrokimyasal sensörlerde  $NAD^+$ 'ya bağlı dehidrogenazlar, pirolokinolinkinon (PQQ) bağlı dehidrogenazlar, peroksidazlar ve multi kofaktör enzimlerde kullanılmaktadır (Ciucu, 2014). Farklı biyosensörlerin çeşitleri arasında, elektrokimyasal cihazlar, elektrokimyasal algılamaya özgü yüksek hassasiyete sahip olmaları ve küçültülmüş ve taşınabilir analiz cihazları sağlayan gerekli aletlerin minyatürize edilmesi imkânı nedeniyle ilgi çekici olmuştur. Biyomoleküllerin elektrotlara immobilizasyonu, elektrokimyasal biyosensörlerin geliştirilmesinde önemli bir konudur. Biyomolekülün işlevselliğini korumaktan başka, immobilizasyon yöntemi aktif bölgesinin erişilebilirliğini sağlamalıdır. Biyoalgılama molekülü ve dönüştürücü arasında yakınlık ve etkin bir elektron transferi elde etmek için de arzu edilir. Bu nedenle, biyosensörün duyarlılığı, yanıt süresi, uzun süreli kararlı ve tekrarlanabilirlik immobilizasyon tekniğine büyük ölçüde bağlıdır. Başlıca immobilizasyon yöntemleri adsorpsiyon, kovalent bağlanma, polimerik bir matris içerisine bindirme ve çapraz bağlama gibi sıralanabilir (Campas ve ark., 2009).

Dehidrogenaz enzimine bağlı biyosensörlerde, dehidrogenaz enzimi bir substratın yükseltgenmesine neden olurken, aynı zamanda enzimin ihtiyaç duyduğu kofaktör  $NAD^+$ ,  $NADH$ 'ye indirgenir. Daha sonra oluşan  $NADH$ 'nin elektrokimyasal yükseltgenmesine bağlı akım ya da akım-potansiyel eğrileri izlenerek ya amperometrik ya da voltammetrik biyosensörler geliştirilir. Voltammetrik sensörlere göre daha duyarlı olan ve tercih edilen amperometrik biyosensörlerde,  $NADH$ 'nin yükseltgenmesi sinyal iletiminde önemli rol oynar ve bir redoks mediyatör kullanılarak  $NADH$  tekrar  $NAD^+$ 'ya dönüştürülebilir.  $NAD^+/NADH$

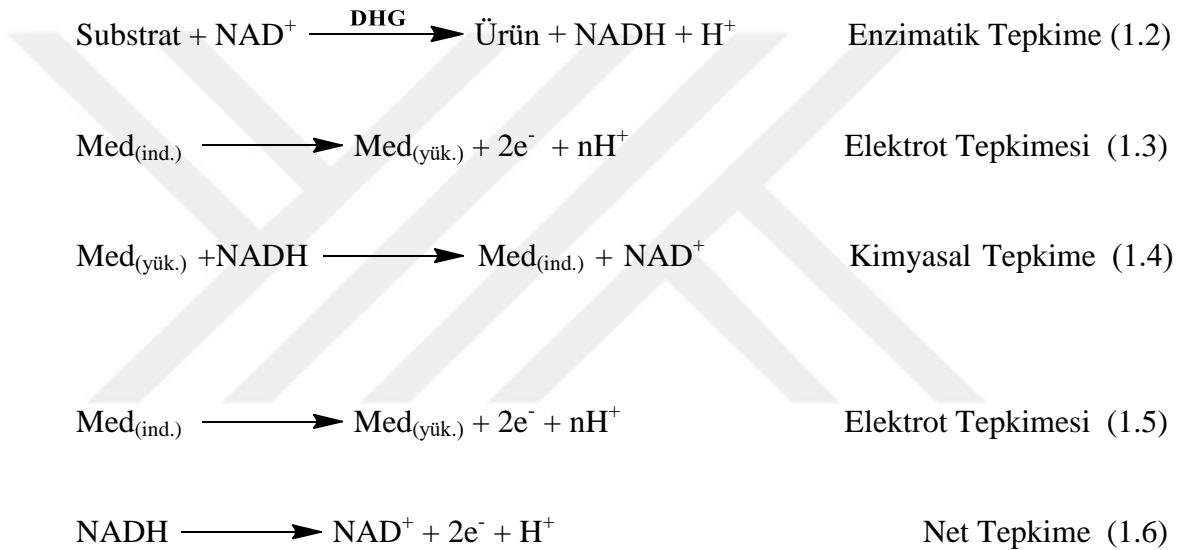
redoks çiftinin potansiyeli, pH'ye ve çözücü türüne bağlı olarak, genellikle pH=7,0'de SCE'ye karşı -0,56 V olduğu kabul edilmektedir (Katakis ve Dominguez, 1997). Son yıllarda modifiye elektrotlar kullanılarak NAD<sup>+</sup>/NADH redoks çifti ve dehidrogenaz enzimine dayalı amperometrik biyosensörler üzerine oldukça fazla çalışma yapılmıştır (Katakis ve Dominguez, 1997; Lobo ve ark., 1997). NADH'ye bağlı ilk biyosensör, DHG enzimleri varlığında substrat ile NAD<sup>+</sup>'nin enzimatik tepkimesi sonucu oluşan NADH'nin temiz yalın elektrot yüzeyinde doğrudan elektrokimyasal yükseltgenmesine dayalı olarak geliştirilmiştir (Tepkime 1.1).



Tepkime 1.1'e göre gerçekleşen sensörler birinci nesil biyosensör olarak tanımlanmaktadır. Bu tür biyosensörün en büyük dezavantajı, daha önce de belirtildiği gibi, NADH'nin yalın elektrotlardaki yükseltgenmesi yüksek aşırı potansiyel, elektrot yüzeyinin kirlenmesi ve düşük tekrarlanabilirlik ve kararsızlık olarak sıralanabilir. Bu istenmeyen sonuçları gidermeye yönelik yapılan çalışmalardan NADH'ye bağlı ikinci nesil biyosensör geliştirilmiştir. Bu tür sensörde, NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinde kullanılan redoks mediyatörle KME'ler hazırlanarak, bu elektrotlarla enzimatik tepkime sonucu meydana gelen NADH'nin ölçümü esas alınmıştır (Christenson ve ark., 2004; Ciucu, 2014; Lobo ve ark., 1997). İkinci nesil biyosensörlere ait genel bir mekanizma Şekil 1.5'te verilmiştir. Mekanizmaya göre enzimatik reaksiyonla analit ürüne dönüşürken enzimin redoks aktif grubu ya da kofaktörü indirgenmiş formuna dönüşür. Örneğin oksidaz enzimlerinde bu işi Flavin adenin grubu üstlenirken (FAD, FADH<sub>2</sub>'ye indirgenerek) dehidrogenaz enzimlerinde kofaktör NAD<sup>+</sup>'nin NADH'ye indirgenmesiyle gerçekleşir. Oluşan indirgenmiş form, redoks mediyatörün yükseltgenmiş formu ile tekrar yükseltgenirken redoks mediyatör, indirgenmiş formuna dönüşür. Son adımda indirgenmiş formdaki redoks mediyatör elektroda elektronlarını vererek tekrar yükseltgenmiş formuna dönüşür ve bu sırada ilgili analitin derişimine bağlı bir elektrokimyasal sinyal elde edilir (Christenson ve ark., 2004; Ciucu, 2014; Lobo ve ark., 1997).



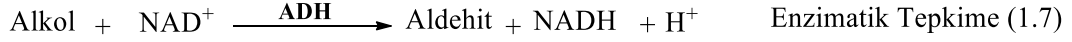
Şekil 1.5. Mediyatörle modifiye edilen elektrotta genel bir enzimatik biyosensör mekanizması (Ciucu, 2014)



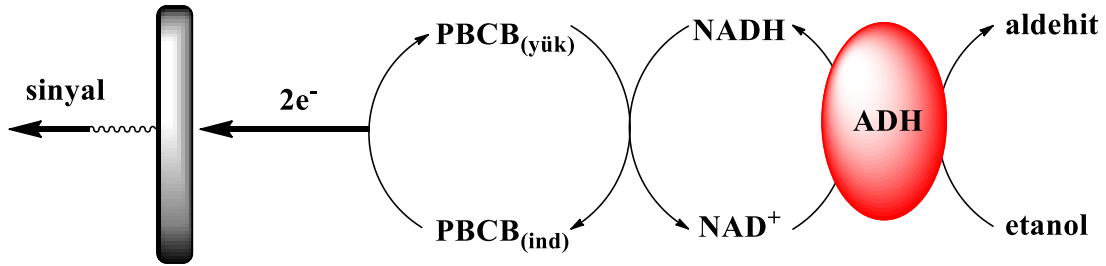
Üçüncü nesil biyosensörler olarak adlandırılan flavoenzimlere bağlı biyosensörlerde ise enzimin aktif merkezi ve elektrot arasında doğrudan bir elektron transferi gerçekleşmektedir. Bu biyosensör türlerinden daha çok ikinci ve üçüncü nesil biyosensör kullanılmıştır (Lobo ve ark., 1997; Wang, 2001). Daha önceden bahsedildiği gibi NADH, 300'den fazla dehidrogenaz esaslı enzimatik reaksiyonlarda görev alan önemli bir kofaktördür (Bai ve ark., 2012). Daha çok, azin türü boyar maddelerle hazırlanan KME'ler kullanılarak alkol, glikoz, laktat ve glutamat biyosensörü geliştirilmiştir (Chakraborty ve Raj, 2007; Du ve ark., 2008; Piano ve ark., 2010; Villamil ve ark., 1997; Yang ve Liu, 2009; X. H. Zhang ve ark., 2011). NADH'ye bağlı örnek bir biyosensör ve bu biyosensöre ait mekanizması Şekil 1.6'da alkol biyosensörü için verilmiştir. Alkol biyosensöründe redoks mediyatörlerle modifiye edilmiş elektrot yüzeyine alkol dehidrogenaz (ADH) veya



alkol oksidaz enzimleri tutturulur ve kofaktör  $\text{NAD}^+$  varlığında alkol bu enzimlerle enzimatik bir tepkimeye girerek aldehit ve  $\text{NAD}^+$ 'nın indirgenmiş formunu ( $\text{NADH}$ ) oluşturur (Yang ve Liu, 2009).



Reaksiyon sonucu oluşan  $\text{NADH}$ , mediyatörün yükseltgenmiş formu ile kimyasal tepkimeye girer  $\text{NADH}$ 'ın kendisi  $\text{NAD}^+$ 'ya yükseltgenirken, mediyatörün yükseltgenmiş formu da, indirgenmiş haline geçer. Son olarak indirgenmiş formdaki mediyatör elektrota elektronlarını vererek yükseltgenmiş hale geçisi sırasında meydana gelen akımın kaydedilmesiyle alkol, dolaylı yoldan tayin edilmiş olur. Bu çalışmada, tek çeperli karbon nanotüp (single walled carbon nanotube, SWCNT) tutturulmuş GCE yüzeyine Brilliant Kresil Mavisi (BKM) elektropolimerizasyon yoluyla modifiye edilmiştir. Hazırlanan bu modifiye elektrot önce  $\text{NADH}$ 'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinde kullanılmış, daha sonra etanol dehidrogenaz enzimi elektrot yüzeyine tutturularak etanol biyosensörü geliştirilmiştir. Alkol dehidrogenaz/karbon nanotüp/poli-BKM modifiye GCE'de etanol tayinine ilişkin akım-zaman eğrilerinden doğrusal yanıt aralığı 0,4-2,4 mM ve belirtme alt sınırı da 0,1 mM olarak bulunmuştur. Geliştirilen biyosensörün mekanizması, aşağıdaki şemayla gösterilmiştir (Yang ve Liu, 2009).



Şekil 1.6. Poli-BKM modifiye elektrot kullanılarak  $\text{NADH}$ 'ye bağlı geliştirilen etanol biyosensörün şematik gösterimi (Yang ve Liu, 2009)

Glikoz, laktöz, vb. karbonhidratların ve glutamat gibi bir amino asit tuzunun biyosensör yapımında farklı redoks mediyatörlerle modifiye elektrotlar kullanılarak benzer mekanizma izlenmiş, ancak enzim olarak ilgili substrata ait enzimler (glikoz dehidrogenaz

(GDH), laktat dehidrogenaz (LDH) ve glutamat dehidrogenaz kullanılmıştır (Du ve ark., 2008; Hughes ve ark., 2016; Jafari ve ark., 2014; Lobo ve ark., 1997; Piano ve ark., 2010; Radoi ve Compagnone, 2009; Saleh ve ark., 2011a; Silber ve ark., 1996; Zhu ve ark., 2014b).



## BÖLÜM 2

### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

#### 2.1. Kalem Grafit Elektrot Kullanımına Dayalı Sensörler ve Biyosensörler

PGE ana bileşen olarak kil, grafit ve bal mumu içeren ve elektrokimyasal çalışmalarda sıkça kullanılan karbon bazlı bir elektrot malzemesidir. Grafit içeriğine göre sertlik ve yumuşaklık gösterir. Farklı türde PGE'ler (2B, HB, 2H gibi) çalışma elektrotu olarak elektrokimyasal çalışmalarda sıklıkla kullanılmıştır (Akanda ve ark., 2016; Kawde ve ark., 2016; Özcan ve İlkbaş, 2015b; Vishnu ve Kumar, 2017). PGE, ilk defa 1997 yılında kadmiyum ve kurşunun sıyırma voltammetrisi ile analizinde kullanılmıştır (Kawde ve ark., 2016; Bond ve ark., 1997). PGE, tek kullanımlı olması, geniş kullanılabilirlik, düşük teknolojisi nedeniyle düşük maliyet, iyi mekaniksel sertlik, kimyasal inertlik, düşük zemin akımı, geniş potansiyel aralık, güçlü adsorpsiyon özelliği, kolay modifikasyon ve minyatürleşme gibi avantajlara sahiptir. Bunların yanında, PGE, GCE dahil katı hal elektrotlarda yaygın olarak uygulanan ve uzun süren parlatma işlemlerinin olmaması ve daha basit ve hızlı bir yenilenebilir yüzey alanı sunması ve çalışılan tüm redoks sistemleri için iyi tanımlanmış ve tekrarlanabilir voltammetrik pikleri sağlayabilmesi gibi özelliklere de sahiptir. Ayrıca PGE, yüksek yüzey alanı, iyi iletkenlik ve kullanım kolaylığı, diğer elektrotlara göre elektron transfer hızının yüksek olması, belirli hedef türlere karşı elektrotun duyarlılığının ve seçiciliğinin iyi olması gibi özelliklere de sahiptir (Akanda ve ark., 2016; Kawde ve ark., 2016). PGE'nin bu avantajlarından dolayı, elektrokimyasal analizlerde son yıllarda elektrot materyali olarak oldukça sık kullanılmış ve halen birçok bilim insanının dikkatini çekmeye devam etmektedir.

PGE'nin kullanılmasıyla yapılan çalışmalardan örnek verecek olursak; Özcan ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, modifiye bir PGE, dopaminin (DOP) kan serumu ve farmasötik örneklerinde seçici ve duyarlı bir şekilde tayin edilmesinde kullanılmıştır. Bu amaçla PGE yüzeyi modifikasyon işleminden geçirilmiş olup, bu işlem iki adımda gerçekleştirilmiştir. Önce aşırı oksidasyon işlemiyle PGE (EOPGE) elde edilmiş daha sonrada elektrokimyasal polimerizasyon ile PGE (EOPGE) yüzeyine pirol-3-karboksilik asit kaplanarak (p(P3CA)/EOPGE) modifiye elektrot hazırlanmıştır. Kullanılan modifikasyon işlemiyle DOP'un elektrokimyasal yükseltgenmesi üzerine sinerjistik bir

etki gösterdiği tespit edilmiştir. Modifiye elektrot (p(P3CA)/EOPGE), yükseltgenme potansiyelini, askorbik asit ve ürik asit gibi ortak girişim etkisi gösteren maddelerden ayırarak, DOP'a karşı yüksek seçicilik sağladığı yapılan çalışmada belirtilmiştir. DOP'un elektrokimyasal yükseltgenmesinde elde edilen doğrusal aralık 0,025  $\mu\text{M}$  ve 7,5  $\mu\text{M}$ , gözlenebilirlik sınırı, sinyal gürültü oranına (S/N:3)'e göre 0,0025 $\mu\text{M}$  olarak bulunmuştur (Özcan ve ark., 2017). Yine benzer bir şekilde poli (pirol-3-karboksilik asit) modifiye kalem grafit elektrodu (p (P3CA)/PGE) kullanılarak kan serumu ve idrar örneklerinde serotonin (SER) tayini de gerçekleştirilmiştir. Doğrusal aralık 0.01  $\mu\text{M}$  ile 1.0  $\mu\text{M}$  arasında, gözlenebilirlik sınırı (S/N=3) 'e göre 2,5 nM ve tekrarlanabilirlik (N:10 için) RSD: %3,8 olarak belirlenmiştir (Özcan ve İlkbas, 2015a).

Yine Özcan ve arkadaşlarının PGE ile yaptığı başka bir çalışmada, vücut sıvılarında ürik asit varlığında parasetamolün (PC) basit ve hızlı elektrokimyasal tayini, gerçekleştirilmiştir. Bunun için elektrokimyasal olarak işlem görmüş kalem grafit (ETPG) elektrotları 0,1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  çözeltisi içinde -0,3 V ile +2,0 V potansiyel aralığında döngüsel voltammogramların kaydedilmesiyle hazırlanmış daha sonra ETPG elektrotu üzerinde oluşturulan N-asetil-p-benzokinonimin elektrokimyasal indirgenmesine bağlı olarak PC'nin voltammetrik tayini gerçekleştirilmiştir. ETPG elektrotunun elektrokimyasal yanıtı, adsorptif transfer sıyırma diferansiyel puls voltammetri (ATSDPV) ile değerlendirilmiş. PC'nin voltammetrik tayininde doğrusal aralık 0,05-2,5 $\mu\text{M}$  gözlenebilirlik sınırı 2,5 nM (S/N=3) olarak bulunmuştur. Önerilen yöntemle, ürik asitin girişimi olmadan ve doğrudan kan serum örneklerinde PC'nin belirlenmesine imkân sağladığı belirtilmiştir (Özcan ve Şahin, 2011).

Sürücü ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise yeni sentezlenmiş bir azo boyası olan etanon (E) -1- (4 - ((4 (fenilamino) fenil) diazenil) fenil ile indirgenmiş grafen oksit karışımı, PGE'nin yüzeyine elektrokimyasal olarak modifiye edilmiştir. Daha sonra elde edilen modifiye elektrotla, elektrokimyasal teknikler kullanarak bir organofosfor pestisiti olarak bilinen fenitrothion'un elektrokimyasal tayini gerçekleştirilmiştir (Surucu ve ark., 2017). Bolat ve arkadaşları Setiltrimetilamonyum bromür (CTAB) ve MWCNT(çok duvarlı karbon nanotüp)'yi elektropolimerizasyon yoluyla birleştirerek, PGE yüzeyi poli(CTAB)-MWCNTs ile modifiye etmişler ve bu modifiye elektrodu bisfenol A'nın (BPA) tayininde kullanmışlardır (Bolat ve ark., 2018).

PGE'yi kullanarak Ayaz ve Dilgin'in (2017) yaptığı bir çalışmada, Pcv ile modifiye PGE hazırlanarak hidrazinin elektrokatalitik yükseltgenmesi incelenmiştir. Bu amaçla ilk önce 0,01M olarak hazırlanmış Pcv çözeltisine 10 dakika süreyle daldırılarak adsorpsiyon yoluyla modifiye PGE hazırlanmıştır (Pcv/PGE). Kaydedilen döngüsel voltammogramlara göre, hidrazin yalın elektrotta 0,6V'ta yükseltgenirken, modifiye PGE'de hidrazinin 0,10V'ta yükseltgendiği rapor edilmiştir. Ayrıca kullanılan kalem uçlarının iletkenliğe etkisi de araştırılmıştır. Bu amaçla kil ve karbon oranı farklı olan beş çeşit kalem ucu (2B, B, HB, H ve 2H) kullanılmıştır. Hidrazinin elektrokatalitik yükseltgenmesine ait pik akımlarının yanıtlarına ait elde edilen döngüsel voltammogramları ve hem de elektrokimyasal impedans spektrumları incelenmiş ve sonuç itibarıyla PGE'nin iletkenliğinin, grafit oranının artmasıyla arttığı yapılan çalışmayla görülmüştür. Daha sonra AEA sisteminde hidrazinin Pcv/PGE'de elektrokatalitik yükseltgenmesine bağlı amperometrik tayini gerçekleştirilmiştir. Hidrazin için doğrusal aralık 0,25 ile 500  $\mu\text{M}$  gözlenebilir sınıra ise 0,08  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuştur (Ayaz ve Dilgin, 2017).

Emir ve Dilgin'nin PGE'yi kullanarak yaptığı diğer bir çalışmada ise azo boyar maddelerden olan Clm elektropolimerizasyon yöntemiyle PGE yüzeyine modifiye edilmiş ve sülfür tayininde kullanılmıştır. Modifiye elektrot 0,10 mM monomer derişimindeki Clm içerecek şekilde, 0,10 M  $\text{NaNO}_3$  ihtiva eden pH=2,0 Britton-Robinson tamponu çözeltisinde beş ardışık döngüsel voltammogramı alınarak elektropolimerizasyonla hazırlanmıştır. Modifiye maddesi olarak kullanılan Clm'nin sülfüre olan elektrokatalitik etkisinin döngüsel voltammogramlarından alınan sonuçlarına bakıldığında, sülfürün yalın elektrotta göre yükseltgenme potansiyelini 420 mV'tan 250 mV'a kaymasına neden olduğu 180 mV'luk bir potansiyel değişimi ile olumlu bir sonuç elde edilmiştir. Daha sonra AEA sisteminde sülfürün Poli-Clm/PGE'de elektrokatalitik yükseltgenmesine bağlı amperometrik tayini gerçekleştirilmiştir. AE amperometrik sonuçlardan, sülfür için doğrusal aralık 0,10–500,0  $\mu\text{M}$  gözlenebilir sınıra ise 0,03  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuştur (Emir ve Dilgin, 2018).

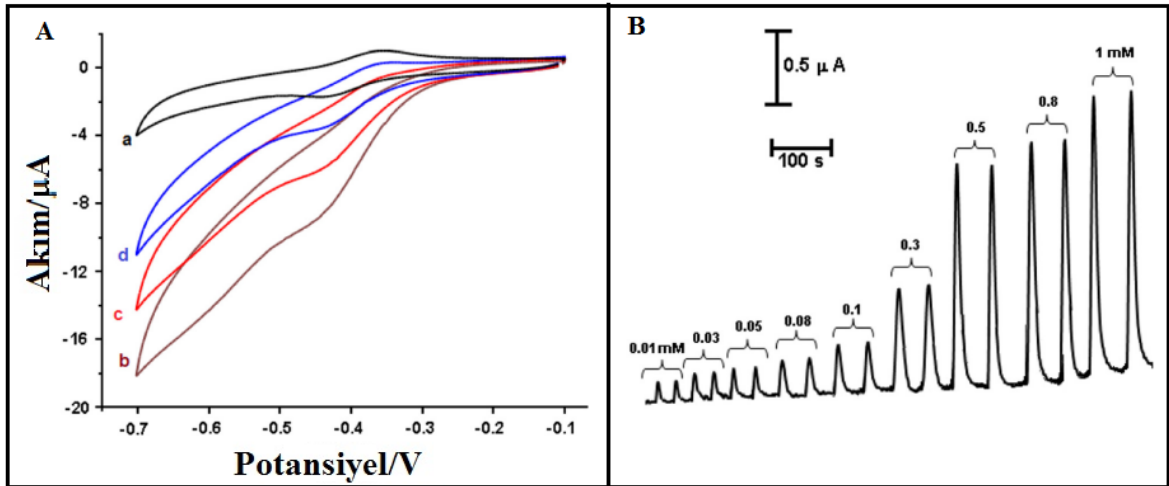
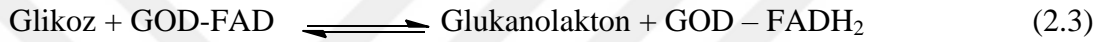
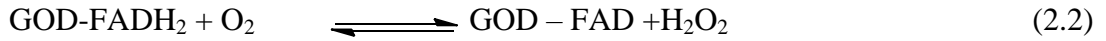
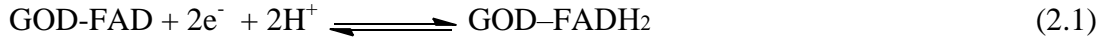
PGE ile ilgili başka bir çalışma Zheng ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada PGE yüzeyi CdS nanoçubuklar kullanılarak modifiye edilmiştir. Bir sonraki adımda, geliştirilmiş elektrot, potasyum persülfatın ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) birlikte reaksiyona giren bir elektrokemilüminesans (ECL) tekniği kullanarak klorojenik asiti (CA) saptamak için kullanılmıştır. Olası ECL mekanizması, alınan sinyal yanıtları üzerine pH ve döngüsel

voltammetrik tarama hızı etkisi araştırılmıştır. ECL yoğunluğu, hedef molekülün konsantrasyonuyla ilişkili olarak kantitatif olarak azaldığı tespit edilmiştir. Optimize edilmiş şartlar altında, söndürülmüş ECL yoğunluğu ve CA konsantrasyonunun logaritması arasındaki doğrusal ilişki  $2 \times 10^{-9}$  ila  $8 \times 10^{-7}$  mol/L aralığında ve gözlenebilir sınıırı ise  $1 \times 10^{-9}$  mol/L olarak tespit edilmiştir. PGE, parlatma işlemlerinden daha basit ve daha hızlı yenilenebilir bir yüzey sunduğu ve PGE'lerin ayrıca katı elektrotlar üzerindeki tek tek yüzeyler için iyi bir tekrarlanabilirlik gösterdiği rapor edilmiştir. PGE'nin bu mükemmel özelliklerinden dolayı, niklosamid, NADH, vitamin B12, luteolin ve antikanser gibi ilaçlarının tayininde daha fazla analitik uygulamalarda kullanılmasıyla önemini korumaktadır (Zheng ve ark., 2017).

Diğer bir çalışmada ise PGE kullanılarak birçok mineralde bulunan Bor'un voltammetrik tayini yapılmıştır (Liv ve Nakiboglu, 2018). Yalın PGE, 180 saniye boyunca +2,0 V'da 0,1 M pH=7,0 PBS'de aktive edilmiş, bu şekilde okside edilmiş kalem grafit elektrotu, 0,1M pH=10,0 PB ve  $10^{-4}$  M ksilenol turuncusu çözeltisi içinde, döngüsel voltammetri kullanarak ve -0,4 ile 2,0 V arasında 150 mV/s tarama hızında 7 döngüyle PGE poli ksilenol turuncusu ile modifikasyonu yapılmıştır (Liv ve Nakiboglu, 2018).

PGE'lerle birlikte dehidrogenaz ve oksidaz enzimleri kullanılarak enzimatik biyosensörlerin geliştirildiği çalışmalarda mevcuttur. Dehidrogenaz enzimine dayalı çalışmalar konu bütünlüğü açısından bundan sonraki dehidrogenaza dayalı biyosensörler kısmında bahsedilecektir. Oksidaz enziminin kullanıldığı biyosensör çalışmasına örnek verecek olursak, Sağlam ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, PGE yüzeyine elektrokimyasal olarak kuantum noktalarla (ZnS–CdS) biriktirme yapıldıktan sonra (ZnS–CdS/PGE) çapraz bağlayıcı olarak kitosanın kullanılmasıyla glikoz oksidaz enzimi (GOD) bu elektrot yüzeyine immobilize edilerek elektrokimyasal biyosensör (GOD/CT/ZnS–CdS/PGE) hazırlanmıştır (Sağlam ve ark., 2016b). GOD/CT/ZnS–CdS/PGE enzim elektrotunun glukoz verdiğı yanıt ve AEA sisteminde elde edilen amperometrik yanıtlar Şekil 2.1'de verilmiştir. Şekil 2.1A'da görüldüğü gibi öncelikle enzim modifiye elektrodun döngüsel voltammogramında enzimin FAD/FADH<sub>2</sub> grubuna ait bir redoks çifti gözlenmiştir (Şekil 2.1A/a). Daha sonra ortam O<sub>2</sub> ile doyurulduğunda anodik pik azalırken katodik pikte büyük bir artış olmuştur (Şekil 2.1A/b). Ortama glikoz ilave edildiğinde ise enzimatik tepkime sonucu glikoz glikanolaktona yükseltgenirken O<sub>2</sub>'nide tükettiğinden glikoz derişimine bağılı olarak katodik pikte azalma gözlenmiştir

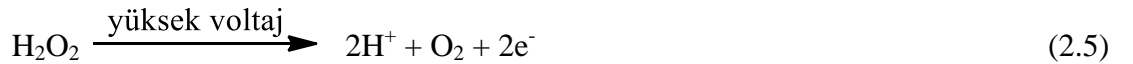
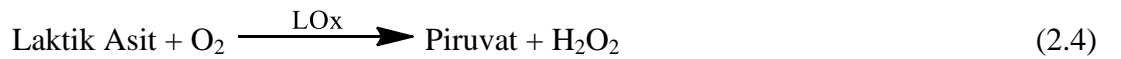
(Şekil 2.1A/c ve d). Tüm bu döngüsel voltammogramlara ilişkin gerçekleşen reaksiyonlar aşağıda verilmiştir. Bu azalma glikoz derişimi ile orantılı olup AEA sisteminde amperometrik glikoz biyosensörü GOD/CT/ZnS–CdS/PGE ve ilk kez PGE için tasarlanan fotoelektrokimyasal akış hücresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. AE amperometrik çalışmalardan, doğrusal aralık 0,01-1,0 mM glikoz, doğru denklemi  $I(\mu A) = 1,830 C(mM) + 0,146$  olup, gözlenebilme sınırı ise 3,0  $\mu M$  glikoz olarak bulunmuştur. Glikoz aşağıdaki tepkimeler de gösterildiği gibi elektrokimyasal olarak ölçülebilmektedir:



Şekil 2.1. A) GOD/CT/CdS–ZnS/PGE’in CV’leri (a) (BRBS, pH 6,0) glikoz yokluğunda (b) ve 0,5 mM glikoz varlığında ve (c)1,0 mM glikoz, tarama hızı 20mV/s ve B) AEA sisteminde 0,01 mM ile 1 mM glikoz aralığında farklı derişimlerdeki glikozun akım-zaman eğrisi TÇ: 1,0 M KCl ihtiva eden pH=6,0 BRBS; ÇP: 500 mV; AH:1,3 mL/dk ÖYH:100  $\mu L$  KU: 10cm) (Saglam ve ark., 2016b)

Başka bir çalışma da ise laktat oksidaz enzimi kullanılmıştır. Elektrot materyali olarak daha büyük bir aktif elektrot yüzey alanına sahip olması ve bu yüzden analitin düşük konsantrasyonlarını ve/veya hacimlerini algılayabiliyor olması açısından PGE

seçilmiştir. PGE'nin seçilmesinin öneminin analit miktarının az olması halinde daha da arttığı vurgulanmıştır (Dagar ve Pundir, 2017). Dagar ve Pundir tarafından PGE'nin kullanıldığı en güncel çalışmalardan birinde PGE yüzeyi alüminyum bulamaçla temizlenmiş ve sonra 400 µL anilin 25,0 ml 1 M KCl ihtiva eden çözelti içerisine ilave edilerek elektropolimerizasyon için -0,2 ile +0,6V potansiyel aralığında ardışık 20 döngüyle döngüsel voltammetride PGE yüzeyine biriktirilmiştir (PANI/PGE). Daha sonra 400 µL bakır nanopartikül (CuNPs) ve 1,0 mL karboksilat çok duvarlı karbon nanotüpleri (cMWCNTS) süspansiyonu 25,0 ml 1 M KCl ihtiva eden çözeltiye ilave edilerek karışması sağlanmıştır. Bu karışıma PANI/PGE daldırılarak yine 0,2 ile +0,6V potansiyel aralığında ardışık 20 döngüyle elektrokimyasal olarak polimerizasyonu sağlanarak cMWCNT/CuNPs/PANI/PGE modifiye elektrot elde edilmektedir. Daha sonra elektrot, 2 mL çözünmüş Laktat oksidaz (LOx) (1 mg/ml 0,1 M sodyum fosfat (pH=7,0) içine cMWCNT/CuNPs/PANI/PGE elektrotu daldırılarak immobilizasyonu sağlanmış ve oda sıcaklığında gece boyunca muhafaza edilmiştir. Elde edilen elektrot LOx/cMWCNT/CuNPs/PANI/PGE 0,1 M pH=7,0 PBS ile 3-4 kez yıkandıktan sonra, bir çalışma elektrotu olarak kullanıma hazır hale getirilmiştir (Dagar ve Pundir, 2017). Çeşitli biyolojik materyallerde laktat seviyesinin tespitinde bu elektrot biyosensör olarak kullanılmıştır. Doğrusal aralık 1-2500 µM, gözlenebilme sınırı ise 0,25 µM olarak bulunmuştur. LOx tabanlı biyosensörler, laktik asitin piruvat ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye oksijenle yükseltgenmesini içeren, basit reaksiyonu ve kolay biyolojik sensör tasarımı nedeniyle tercih edilmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aşağıdaki gibi doğrudan elektrokimyasal olarak ölçülebilmektedir:

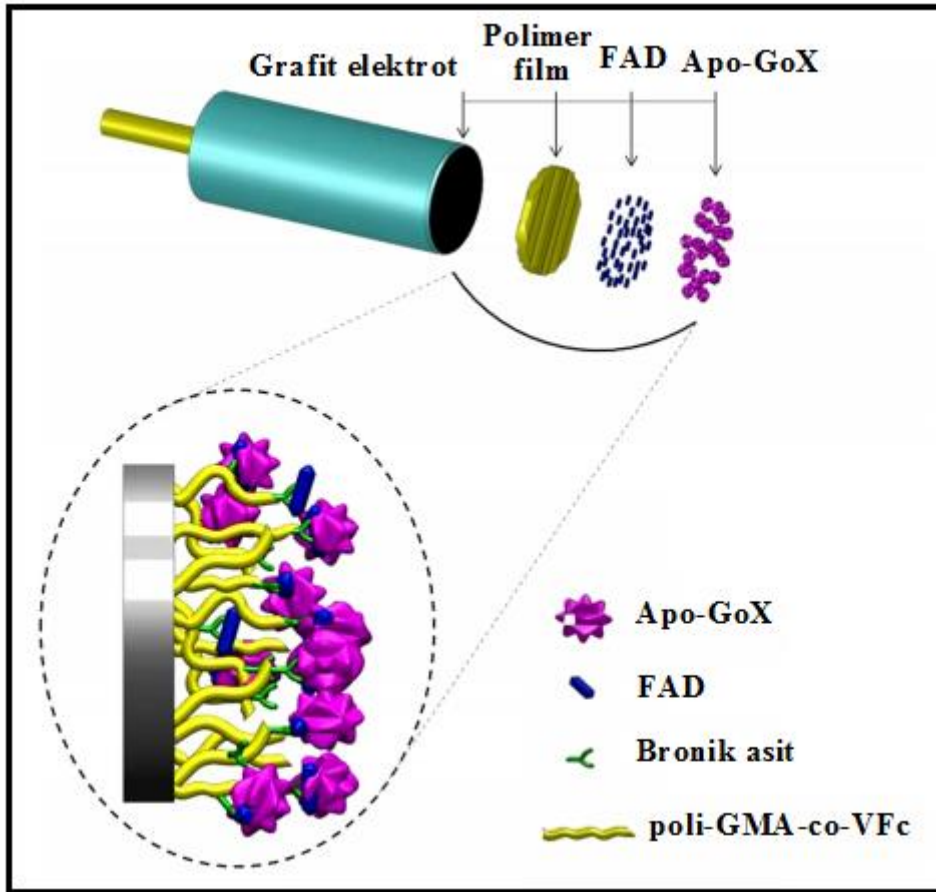


Elde edilen laktat biyosensörün µA cinsinden ölçülen maksimum yanıtı, 0,28 V uygulanan potansiyelde 5 saniye içinde elde edilmiş ve bu nedenle daha sonraki çalışmalarda bu potansiyel kullanılmıştır. Böylece modifiye elektrottan daha yüksek akım elde edilmiş ve cMWCNT/CuNPs/PANI/PG kompozit filmin büyük etkili yüzey alanına meydana getirdiği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle, elektron aktarım aracı olarak görev yapan c-MWCNT/CuNPs/PANI, biyosensör yanıtının arttırılmasına yardımcı olduğu ve



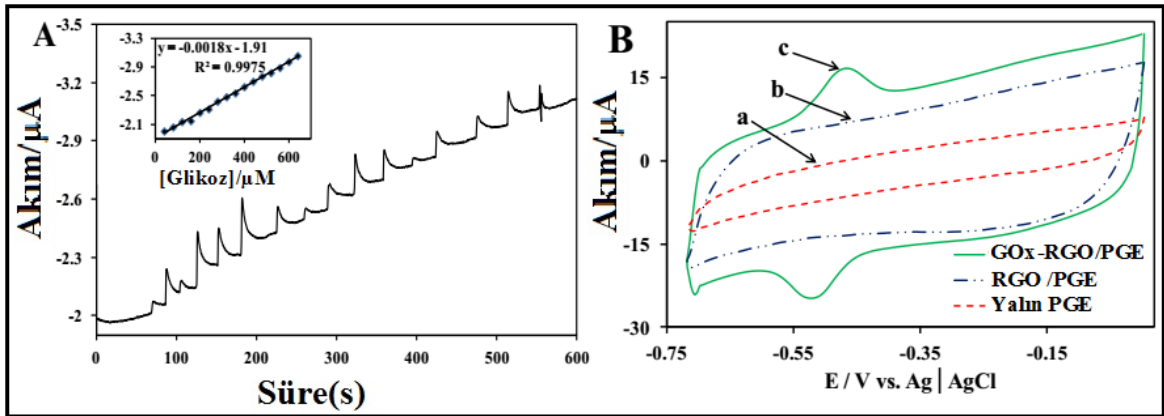
böylece duyarlılığını da artırmıştır. LOx'in modifiye elektrot üzerine immobilizasyondan sonra LOx reaksiyonundan üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin elektrokimyasal olarak parçalanması nedeniyle, akım yanıtı artmıştır (Dagar ve Pundir, 2017).

PGE'nin kullanıldığı bir diğer biyosensör çalışmasında PGE yüzeyine poli glisidil metakrilat-ko-vinilferrosen (GMA-co-VFc) damlatılıp ve kurumaya bırakılmış ve daha sonra elektrot, poli (GMA-ko-VFc) ile FAD arasında bir bağ oluşturmak üzere, 3 saat süreyle 0,1 M 3-aminofenilboronik asit içerisinde daldırılmıştır. Daha sonra, modifiye edilmiş elektrot 0,1 M FAD'ye (flavin adenin dinükleotit) daldırılıp, yavaş bir şekilde 3 saat karıştırılmıştır. Son olarak, elektrot, FAD üzerinde tek tabakalı etkili bir şekilde yeniden oluşturulmasına sağlamak için apo glikoz oksidaz enzimine (Apo-GoX) 24 saat toplam süreyle yerleştirilmiştir (Şekil 2.2). Yapıdaki ferrosenin elektrokimyasal davranışı baz alınarak amperometrik glikoz biyosensörü geliştirilmiştir. Geliştirilen biyosensörün kalibrasyon eğrisi 1-16 mM arasında doğrusal bulunmuş ve gözlenebilme sınırı 2,7 µM olarak tespit edilmiştir (Dervisevic ve ark., 2015).



Şekil 2.2. Geliştirilen glikoz biyosensörünün yapısı (Dervisevic ve ark., 2015)

Başka bir çalışmada ise grafen oksit(GO) PGE yüzeyine modifiye edilmiş ve daha sonra GOD (Glikoz Oksidaz) enzimi immobilize edilmiştir. Tasarlanan biyosensörün elektrokimyasal özellikleri CV ve kronoamperometri ile incelenmiştir. Bu elektrotun döngüsel voltammetrideki davranışı incelendiğinde -0,521 V'luk bir formal potansiyele ve 35 mV'luk pik ayrılmasına sahip olmasıyla iyi tanımlanmış bu çift pik, GOD ve elektrot arasındaki direkt elektron transferini belirtir. Elde edilen elektrot glikoz ortamında O<sub>2</sub>'nin elektrokatalitik indirgenmesine ait piklerdeki azalışına bağlı olarak biyosensör geliştirilmiştir. Doğrusal aralık 40-600 µM glikoz, doğru denklemi  $I(\mu A) = -0,0018 C(\mu M) - 1,91$  olup, gözlenebilir sınıırı ise 0,61 µM glikoz olarak bulunmuştur (Sehat ve ark., 2015).



Şekil 2.3. A) GOx-RGO/PGE'un 0,1 mM, PBS pH 7, çözelti ortamında ardışık olarak 0,1 mM glikozun eklenmesiyle -0,6 V uygulanan potansiyele karşı amperometrik akım-zaman ve doğrusal kalibrasyon eğrisi. B) pH=7,0 olan 0,1 M PBS ortamında v: 50 mV/s a) Yalnız PGE b) RGO/PGE c)GOx-RGO/PGE'nin CV'leri (Sehat ve ark., 2015)

PGE'nin kullanılmasıyla ilgili yapılan bazı çalışmalar çizelge 2.1'de verilmiştir. Literatür çalışmalarına bakıldığında PGE'nin hematoksinle modifiye edilerek NADH (Dilgin ve ark., 2012b), PGE ile niklosamid (Dede ve ark., 2014), PGE polipirol ile modifiye edilerek klorpirifos (Uygun ve Dilgin, 2013), PGE ile tannik asit tayini (Vu ve ark., 2015a) PGE ile Bor'un voltammetrik tayini (Liv ve Nakiboglu, 2018), PGE ile poli (pirol-3-karboksilik asit) modifiye edilerek dopamin tayini (Özcan ve ark., 2017), gibi birçok çalışmalarda kullanıldığı ve halen güncelliğini korumaya devam ettiği literatür bilgilerinden anlaşılmaktadır. Bundan dolayı tez konumuzu oluşturan aromatik sülfonik

asit boyar maddelerinden olan Pcv, Clm, Cta ve Trp ile PGE yüzeyi modifiye edilerek NADH'nin elektrokatalitik yanıtlarının incelenmesi voltammetrik yöntemlerle gerçekleştirilmiştir.



Çizelge 2.1. PGE'nin kullanılmasıyla yapılan çalışmalar

Modifiye Elektrot	Modifiye Yöntemi	Analit	Elektrokimyasal Teknik	Doğrusal Aralık	Gözlenebilir Sınırı	Kaynak
p(P3CA)/EOPGE	Polimerizasyon	serotonin	AdDPSV	0,01-1,0 µM	2,5nM	(Ozcan ve Ilkbas, 2015)
PGE/QH2	Adsorpsiyon	NADH	Amperometri	0,5-100 µM	0,15 µM	(Dilgin ve ark., 2013)
poli(CTAB) MWCNTs /PGE	Elektropolimerizasyon	Bisfenol A	SWV	2-808 nM	134 pM	(Bolat ve ark., 2018)
RGO/DPA/PGE	Elektropolimerizasyon	Fenitrothion	SWV	0.10-1.91 µM	3.48 nM	(Surucu ve ark., 2017)
KT/PGE	Elektropolimerizasyon	Bor	DPV	-	28 µg/L	(Liv ve Nakiboglu, 2018)
HMT/PGE	Adsorpsiyon	NADH	Amperometri	0,5-10 µM	0,2 µM	(Dilgin ve ark., 2012)
Pcv/PGE	Adsorpsiyon	Hidrazin	Amperometri	2,5x10 <sup>-4</sup> -0,50 mM	0,08 µM	(Ayaz ve Dilgin, 2017)
CdS/PGE	Adsorpsiyon	CA	ECL	2x10 <sup>-9</sup> -8x10 <sup>-7</sup> M	1x10 <sup>-9</sup> M	(Zheng ve ark., 2017)

p(P3CA) : Poli(piro1-3karboksilik asit EOPGE: Elektrokimyasal işlem görmüş kalem grafit elektrot AdDPSV: Adsorptif diferansiyel puls sıyrma voltammetri QH2:Kuersetin CTAB: Setil-trimetil-amonyum bromit MWCNTs: Çok duvarlı karbon nanotüpler RGO: İndirgenmiş grafit oksit KT: Ksilanol turuncu DPA: Etanon SWV: Kare dalga voltammetrisi DPV: Diferansiyel puls voltammetrisi HMT: Hematoksilin CA: Klorojenik asit ECL: Elektrokemilüminesans GDH: Glikoz dehidrogenaz GOD: Glikoz oksidaz CT: Kitosan poly(GMA-co-VFc: Poli glisidil metakrilat-ko-vinilferrocen AuNP-GPE: Katodik altın nanopartikül-modifiye grafit kalem elektrot QGD: Grafen kuantum nokta BiPPGE: Bizmut modifiye ön işlemlili kalem grafit elektrot LSV: Doğrusal taramalı voltammetri TKO:4- (4-Metilfenil aminoisonitrosoasetil) bifeniil EIS: Elektrokemilüminesans empedans spektroskopisi GNS: Altın nanostars DA: Dopamin

Çizelge 2.1.'in devamı

Kalmagit/PGE	Elektropolimerizasyon	Sülfür	Amperometri	0,10–500,0 µM	0,03 µM	(Emir ve Dilgin, 2018)
GDH/ZnS–CdS/PGE	Elektrokimyasal biriktirme	Glikoz	Amperometrik ve Fotoamperometrik	0,2 and 8,0 mM	0,09mM 0,05mM	(Ertek ve ark., 2016)
GOD/CT/ZnS–CdS/PGE	Elektrokimyasal biriktirme	Glikoz	Amperometrik	0,01–1,0 mM	3,0 µM	(Saglam ve ark., 2016)
GOx-poly(GMA-co-VFc)-PGE	Adsorpsiyon	Glikoz	Amperometrik	1,0-16mM	2,7 µM	(Dervisevic ve ark., 2015)
PtNPs/p.PGE	Elektrokimyasal biriktirme	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Amperometrik	2,7 -750 µM	0,73 µM	(Karakaya ve Dilgin, 2017)
AuNP-GPE	Adsorpsiyon	Glikoz	CV	0,05-5,0mM	12,0 µM	(Kawde ve ark., 2017)
PGE/PAni-Chi/Au	Elektrokimyasal biriktirme	H <sub>2</sub>	CV			(Kayan ve ark., 2017)
GQD/PGE	Adsorpsiyon	Cu <sup>2+</sup>	ASV	50 pM – 4,0 nM	12pM	(Abour ve Taheri, 2018)
MnO <sub>2</sub> /PGE	Elektrokimyasal biriktirme	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Amperometrik	0,5-138ppm	0,28ppm	(Chaisuksant ve ark., 2016)
BiPPGE	Elektrokimyasal biriktirme	diazepam	DPV	1,4-16,7 µM	1,1 µM	(Dehghanzade ve Alipour, 2016)

Çizelge 2.1.'in devamı

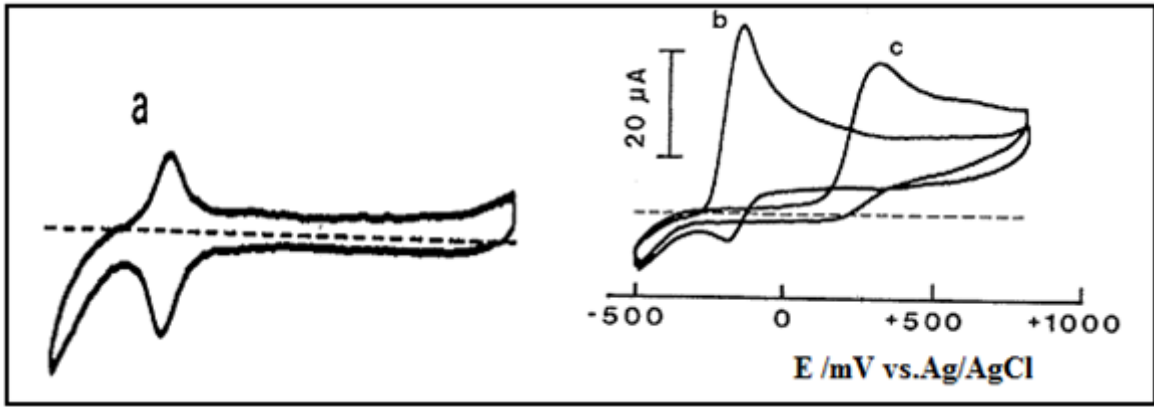
PGE	Ön koşullandırma	Asiklovirin	DPV	1,0-100 µM	0,3µM	(D. G. Dilgin ve Karakaya, 2016)
CuNS- MWCNT/PGE	Elektrokimyasal biriktirme	Hidrazin	Amperometrik	0,1-800 µM	70nM	(Heydari ve ark., 2016)
Cu(NP)-PGE	Adsorpsiyon	Glikoz	Amperometrik	1,0-100 µM	0,44 µM	(Pourbeyram ve Mehdizadeh, 2016)
CuNPs/PeGE	Adsorpsiyon	Adenin	LSV	1,0-100 µM	200nM	(Sharma ve Trnkova, 2016)
TKO/PGE	Elektrokimyasal biriktirme	Hg <sup>2+</sup>	DPV	10-1000 µM	0,585 µM	(Ozkorucuklu ve ark., 2017)
PGE/GNS/DA	Adsorpsiyon	Dopamin	EIS	1,0-100ng/mL	0,29 ng/mL	(Talemi ve ark., 2017)

## 2.2. NADH'nin Elektrokatalitik Yükseltgenmesi

Dehidrogenaz enzimlere bağımlı amperometrik biyosensörlerde yer alan NADH'nin katalitik yükseltgenmesi ile ilgili çalışmalar uzun bir süreden beri bilim insanlarının dikkatini çektiği önemli çalışma alanlarından birisi haline gelmiştir (Du ve ark., 2008; Ertek ve ark., 2016; Gorton ve Domí, 2002; Hedenmo ve ark., 1996; Katakis ve Dominguez, 1997; Lobo ve ark., 1997; Muguruma ve ark., 2008; Pandey ve ark., 2001; Piano ve ark., 2010; Tsai ve ark., 2007; M. G. Zhang ve ark., 2004). NADH, insan hücreleri tarafından enerji üretimi esnasında görevli olan aktif bir koenzimdir. Ayrıca 300'den fazla DHG için enzim tepkimelerde gerekli bir biyolojik molekül ve elektron transferinde aracılık etmesi NADH'nin önemini daha da artırmaktadır (Gorton ve Domínguez, 2002; Simon ve Bartlett, 2002). NADH'nin bu öneminden ve doğrudan yükseltgenmesini daha negatife çekerek elektrokatalitik etki sağlaması açısından KME tasarımında redoks mediyatör özelliği gösteren organik moleküller (Lates ve ark., 2011; Liu, ve ark., 2012; Meredith ve ark., 2012; Saleh ve ark., 2011b; Yang ve Liu, 2009; You ve Jeon, 2011; Zhu ve ark., 2014a) ile nanomateryaller, karbon nanotüpler, grafen, metal nanoparçacık veya bunların karışımı (Ali ve ark., 2014; Karimi-Maleh ve ark., 2014; Li, L. ve ark., 2013; Li, Z. ve ark., 2013; Mutyalı ve Mathiyarasu, 2016) oldukça sık kullanılmıştır. Ancak literatürde NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinin gerçekleştirildiği çok sayıda çalışmalar arasından tez konusu ile alakalı olan organik redoks mediyatörlere dayalı modifiye elektrotlardan bahsedilecektir.

Giriş bölümünde de belirtildiği gibi azin türü boyar maddeler, katekol grubu boyar maddeler ve daha pek çok organik moleküller çeşitli elektrotların yüzeylerine modifiyesi yapılmış ve bu elektrotlar NADH'ye ait elektrokatalitik yanıtların incelenmesinde kullanılmıştır (Du ve ark., 2008; Lates ve ark., 2011; Meredith ve ark., 2012; Nematollahi ve Golabi, 1996; Wang, 2011; Zhu ve ark., 2014). Bunlarla ilgili örnek birkaç çalışma verecek olursak, NADH'nin modifiye elektrotlarla elektrokatalitik yükseltgenme çalışmalarının başlatıcısı olan ve bu yönde çok sayıda çalışmaları olan Gorton ve arkadaşlarının bu alanda ilk çalışma niteliği taşıyan çalışmasında, fenoksazin grubu boyar maddelerden Meldola mavisini (Mdm) grafit elektrot yüzeyine adsorplayarak KME hazırlamış ve NADPH'nin (Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) elektrokatalitik yükseltgenmesini gerçekleştirmişlerdir (Gorton ve ark., 1984). Bu çalışmada elde edilen döngüsel voltammogramlar(CV) Şekil 2.4'te verildi. Şekil 2.4'te grafit elektrodun (çizgili)

ve MdM modifiye grafit elektrodun (koyu renkli) 0,25 M fosfat tamponundaki döngüsel voltammogramı verilmiş ve modifiye elektrotta MdM'ye ilişkin tersinir bir redoks çifti elde edilmiştir. Şekil 2.4c'de görüldüğü gibi yalın grafit elektrotta NADPH +400 mV gibi yüksek bir potansiyel değerinde tersinmez olarak yükseltgenirken, MdM modifiye elektrotta bu yükseltgenme piki -160 mV'a kaymıştır (Şekil 2.4b). Şekilde görüldüğü gibi, NADPH varlığında MdM'ye ait anodik pik artarken, katodik pikte herhangi bir artış gözlenmemiştir. Bu sonuç MdM'nin NADPH'ye çok iyi bir elektrokatalitik etki yaptığını göstermektedir. Gerçekleşen elektrokatalitik yükseltgenme daha önce belirtilen bir ECE mekanizmasıyla açıklanmış ve döner disk elektrot sistemi kullanılarak katalitik hız sabitleri tayin edilmiştir (Gorton ve ark., 1984).

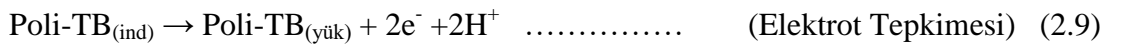
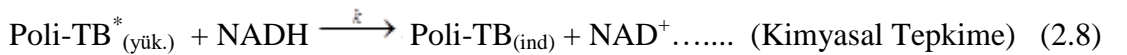
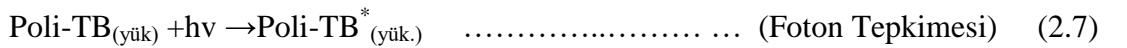
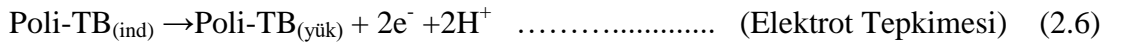


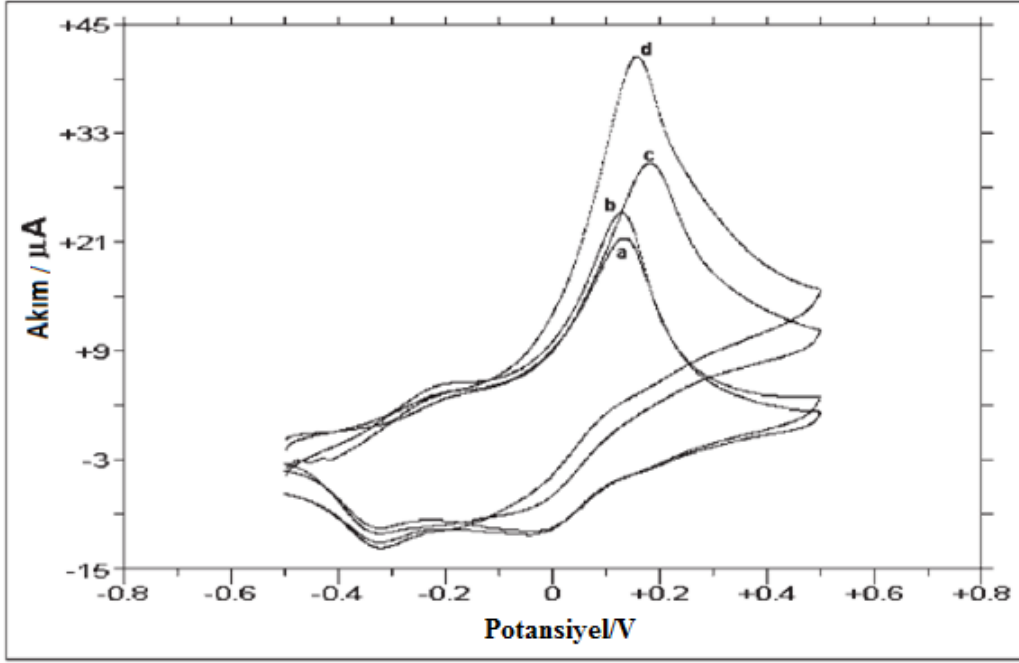
Şekil 2.4. Grafit elektrodun (çizgili) ve MdM ile modifiye grafit elektrodun döngüsel voltammogramı (a), 3,1 mM NADPH'nin modifiye elektrottaki (b) ve yalın grafit elektrottaki (c) CV'leri v:50 mV/s, D.E: 0,25 M fosfat tamponu (pH=7,0) (Gorton ve ark., 1984)

Dilgin ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise Gorton ve arkadaşlarının başlattığı çalışmalar baz alınarak organik redoks mediyatörler modifiye elektrotlarla ilk defa NADH'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenme çalışmaları gerçekleştirilmiş ve daha duyar sonuçlar elde edilmiştir (Dilgin ve ark., 2007). Bu amaçla, bir fenotiyazin grubu boyar madde olan Toluidin mavisi (Toluidine blue, TB) GCE yüzeyinde elektropolimerize edilerek modifiye elektrot hazırlanmış ve elde edilen poli-TB/GCE yüzeyi ışıklandırılarak NADH'nin döngüsel voltammogramları kaydedilmiştir (Şekil 2.5). Şekilde a ile gösterilen voltammogram ışıksız ortamda b de gösterilen ise NADH yokluğunda elektrot yüzeyi ışıklandırılarak kaydedilmiş voltammogramı



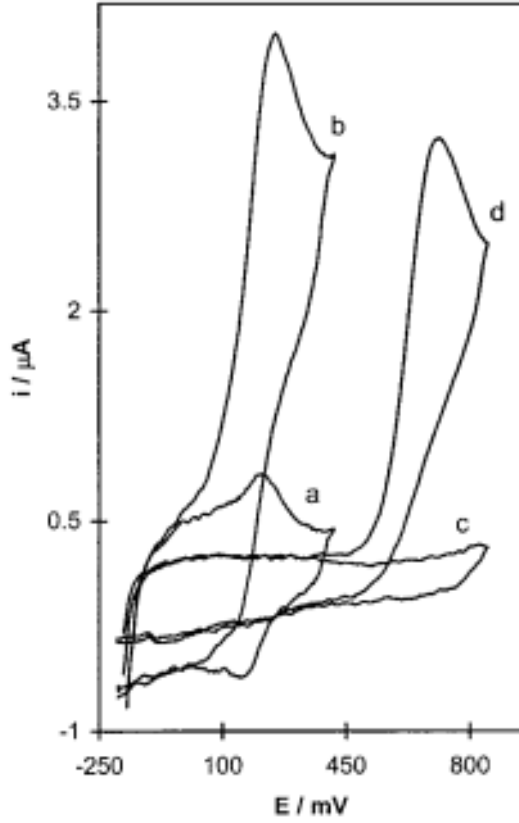
göstermektedir. Işığın poli-TB'nin redoks piklerine çok fazla etki etmediği gözlenmiştir. Ortama NADH ilave edildiğinde normalde yalın GCE'de yaklaşık 600 mV'da yükseltgenen (voltammogram şekilde gösterilmemiştir) NADH, poli-TB/GCE'de 180 mV'da yükseltgenmiş ve potansiyelde yaklaşık 420 mV'luk bir kayma gözlenmiştir (Şekil 2.5c). Ancak NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenme akımının elektrot yüzeyinin ışıklandırılmasıyla (Şekil 2.5d) arttığı tespit edilmiştir. Poli-TB/GCE kullanılarak NADH'nin amperometrik tayininde fotoelektrokatalitik yöntemin elektrokatalitik yöntemden daha duyar olduğu sonucuna varılmıştır (Dilgin ve ark., 2007). Fotoelektrokatalitik yükseltgenme mekanizması Compton ve arkadaşlarının önerdiği (Cooper ve ark., 1998 ve 1999) şekilde Foto-ECE (Electrode-Chemical-Electrode) mekanizmasıyla açıklanmıştır (Tepkime 1-4). Bu redoks mediyatör dışında hematoksinin (Dilgin ve ark., 2010), metilen mavisi (Dilgin, ve ark., 2011), neutral kırmızısı (Dilgin ve ark., 2011) gibi redoks mediyatörleri ile modifiye GCE'ler de kullanılarak da NADH'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaların bir kısmında GCE için ilk defa bir fotoelektrokimyasal akış hücresi tasarlanarak teflondan yaptırılmış ve AEA sisteminde NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine bağlı amperometrik tayini ve NAD<sup>+</sup>/NADH ile dehidrogenaz enzimine bağlı fotoelektrokimyasal biyosensör çalışmaları da AEA sisteminde ilk defa gerçekleştirilmiştir (Dilgin ve ark., 2010; Dilgin ve Gokcel, 2015; Dilgin ve ark., 2011).





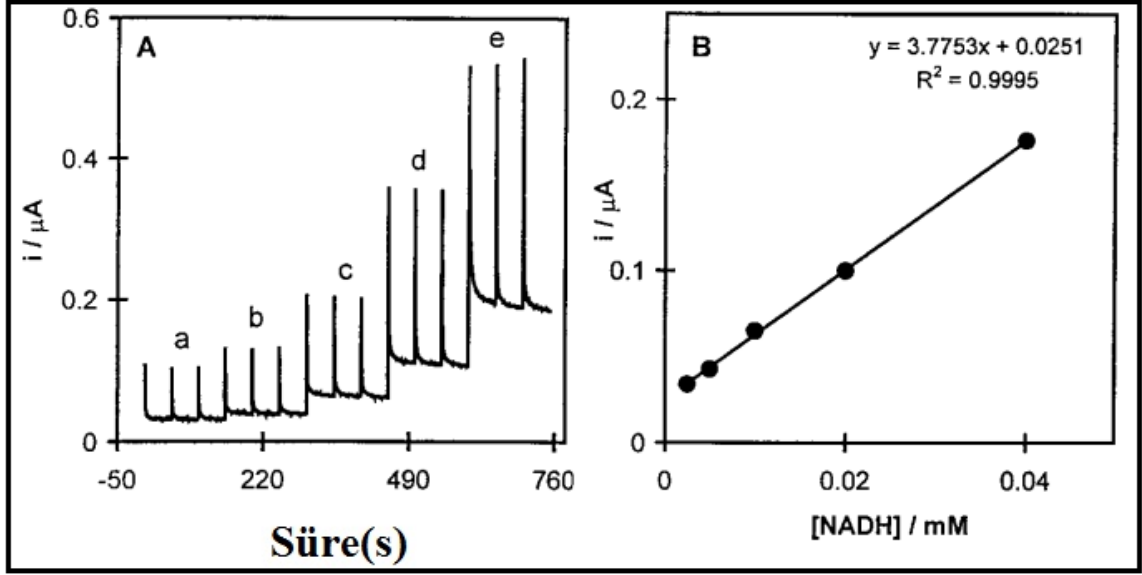
Şekil 2.5. Poli-TB/GCE'nin NADH'siz (a, b) ve 2 mM NADH'lı ortamda ( c ve d), ışksız (a, c) ve ışıklı (b ve d) olarak alınan CV'leri (D.E: 0,1 M KCl'li pH=7,0 fosfat tamponu, v: 50 mV/s) (Dilgin ve ark., 2007)

Tezde kullanılan organik redoks mediyatörlere baktığımızda ise Pcv modifiye elektrotlarla NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiş ancak Clm ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Pcv, PGE yüzeyine modifiye edilerek hem NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi, hem de dehidrogenaz enzimine bağlı alkol biyosensörü geliştirilmiştir. Diğer bir çalışmada ise Golabi ve arkadaşları, Pcv'yi GCE yüzeyine elektropolimerizasyon ile ince bir film halinde biriktirerek modifiye etmişlerdir. Daha sonra bu modifiye elektrot ile NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi çalışılmıştır. Pcv modifiye GCE, yalın elektrot ile karşılaştırıldığında yaklaşık 447 mV daha düşük bir potansiyel ile NADH'nin yükseltgenmesine karşı mükemmel bir elektrokatalitik etkinlik gösterdiği belirtilmiştir. Şekil 2.6'te görüldüğü gibi katalitik pik potansiyeli yaklaşık 243 mV bulunurken, katalitik etkili olmayan pik potansiyeli yaklaşık 690 mV'da gözlenmiştir. Dolayısıyla, modifiye elektrotun kullanılmasıyla yaklaşık 447 mV'luk daha düşük bir potansiyel ile birlikte pik akımında da bir artış elde edilmiştir (Golabi ve ark., 2002).



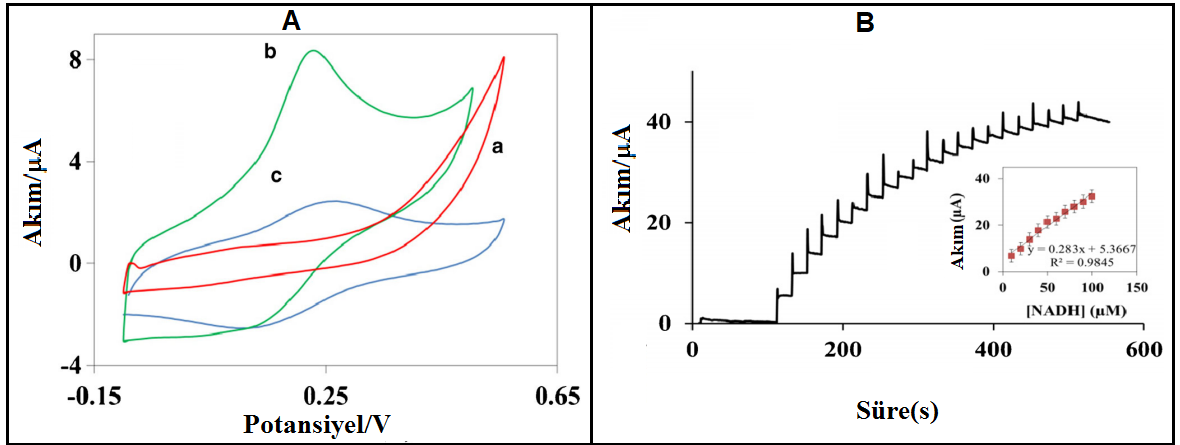
Şekil 2.6. Pcv modifiye GCE'nin (a ve b) ve yalın GCE'nin (c ve d) 0,1 M fosfat tamponu (pH=7,0) çözeltisinde NADH'siz (a ve c) ve 1,0 mM NADH'li ortamda (b ve d) CV'leri (v: 25 mV/s) (Golabi ve ark., 2002)

Şekil 2.7A'da ise bu çalışmadan elde edilen ve 300 mV sabit potansiyelde artan NADH derişimine karşı amperometrik akım-zaman eğrileri ve Şekil 2.4B'de ise kalibrasyon eğrisi verilmiştir. Doğrusal aralık 2,5-40  $\mu$ M NADH olup gözlenebilme sınırı 1,03  $\mu$ M olarak bulunmuştur. GCE üzerinde Pcv'nin yükseltgenmesi, kararlı redoks-aktif elektropolimerizasyon ile ince filmlerin oluşumunu sağlamış ve bu filmler, NADH'nin yükseltgenmesine karşı güçlü ve kalıcı elektrokatalitik davranış göstermiştir (Golabi ve ark., 2002).

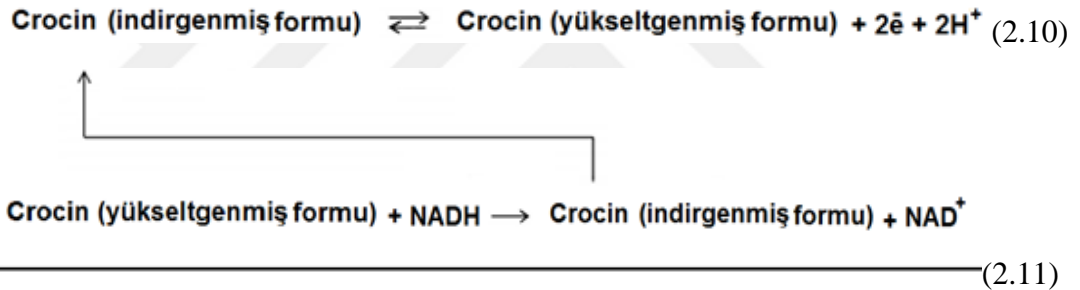


Şekil 2.7. A) pH=7,0 olan 0,1 M PBS ortamında artan NADH derişimine bağlı olarak 300 mV'da Pcv modifiye GCE'de kaydedilen amperometrik akım-zaman ve B) kalibrasyon eğrisi (Golabi ve ark., 2002)

Son yıllarda yapılan başka bir çalışmada ise doğal karetenoid crocin, MWCNT tutturulmuş Karbon seramik elektrot (carbon ceramic electrode, CCE) yüzeyine elektropolimerizasyon yoluyla modifiye edilmiş ve elde edilen modifiye elektrot NADH'nin yükseltgenmesine elektrokatalitik etkinin incelenmesi amacıyla uygulanmış ve iyi sonuçlar alınmıştır (Roushani ve ark., 2017). Elde edilen CV'ler ve amperometrik akım zaman eğrileri sırasıyla Şekil 2.8A ve B'de verilmiştir. Şekil 2.8A'da a, b ve c ile gösterilen döngüsel voltammogramlar sırasıyla MWCNT/CCE, Crocin/MWCNT/CCE ve Crocin/CCE ile 3 mM NADH ortamında kaydedilmiştir. Şekilden de grldği gibi NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine karşı en iyi yanıt, Crocin/MWCNT/CCE kullanıldığında elde edilmiştir. Şekil 2.8B'de ise 220 mV sabit potansiyelde artan NADH derişimine karşı amperometrik akım zaman eğrileri verilmiştir. Doğrusal aralık 0,5-100  $\mu$ M NADH olup gözlenebilme sınırı 0,1 M olarak bulunmuştur. Crocin modifiye elektrotta NADH'nin yükseltgenme mekanizması yine bir ECE mekanizmasıyla açıklanmış ve Şekil 2.9'da verilmiştir. Bu alışma organik redoks moleküllerle modifiye elektrotların hala elektrokatalitik yükseltgenme çalışmalarında kullanıldığını ve güncel olduğunu yansıtmaktadır (Roushani ve ark., 2017).



Şekil 2.8. A) MWCNT/CCE (a), Crocin/MWCNT/CCE (b) ve Crocin/CCE'nin (c) 3 mM NADH varlığında ve pH=7,0 olan 0,1 M PBS ortamında alınan CV'leri (v:50 mV/s) B) 0,1 M PBS pH=7,0 ortamında artan NADH derişimine bağlı olarak 220 mV'da kaydedilen akım (Roushani ve ark., 2017)

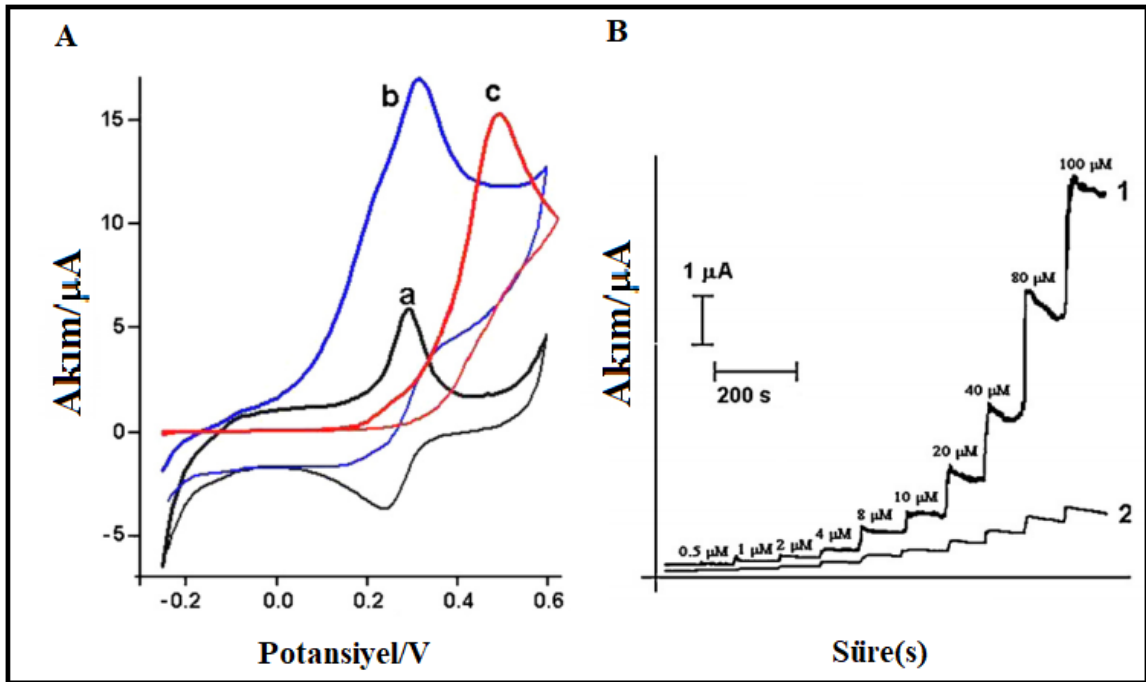


Şekil 2.9. Crocin/MWCNT/CCE'de NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenme mekanizması (Roushani ve ark., 2017)

PGE ile birlikte organik redoks mediyatörlerin NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinde kullanıldığı çalışmalar son yıllarda popüler olan konulardan biridir. Bu çalışmalarda PGE'nin avantajları ile organik redoks mediyatörlerin elektrokatalitik etkinliği birleştirilmiş ve NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine dayalı amperometrik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

PGE ile NADH üzerine yapılan bir çalışma Dilgin ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada PGE yüzeyinin modifikasyonunda kuersetin (QH<sub>2</sub>) kullanılmıştır. PGE'nin modifikasyonu iki adımda gerçekleştirilmiş olup ilk önce PGE 1,40 V'da Ag|AgCl|KCl (der.) ile 60 saniye boyunca 0,1 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS içinde ön işleme tabi tutulmuş daha sonra PGE 1,0 mM QH<sub>2</sub> çözeltisine (etanol içinde) 60

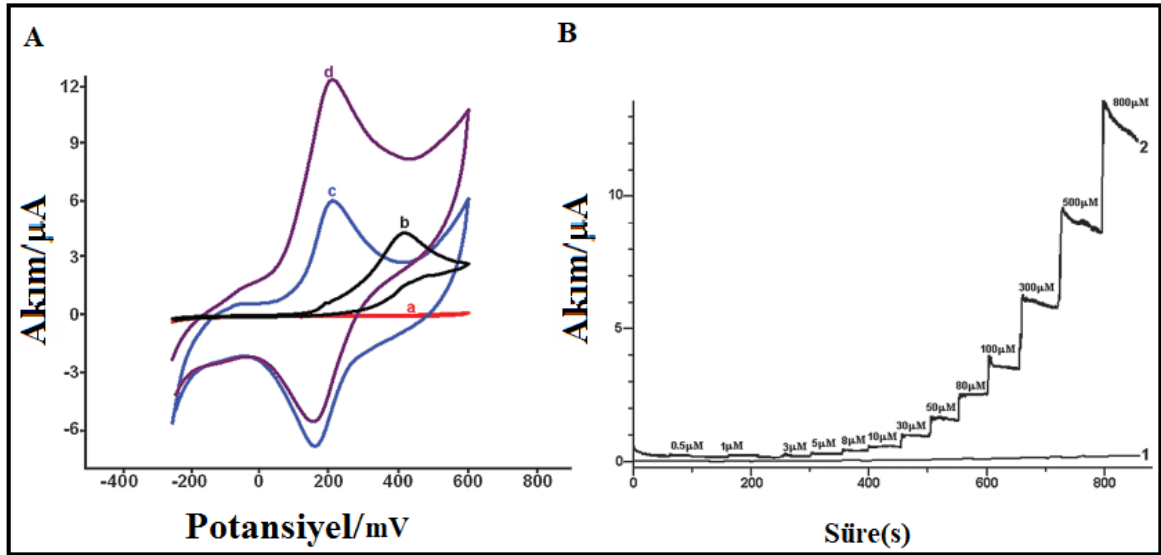
saniye daldırılması yoluyla PGE yüzeyinde QH<sub>2</sub>'nin adsorpsiyonu sağlanarak modifiye elektrot (PGE/QH<sub>2</sub>) hazırlanmıştır. Döngüsel voltammetri ile yapılan çalışma sonucunda yalın elektrotta (PGE) 500 mV'ta gözlenen NADH'nin yükseltgenme piki, PGE/QH<sub>2</sub>'de 300 mV'a kaydığı tespit edilmiştir. Daha sonra NADH'nin PGE/QH<sub>2</sub>'de elektrokatalitik yükseltgenmesine bağlı amperometrik tayini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, doğrusal aralık 0,5-100 µM NADH olup gözlenebilme sınırı 0,15 µM olarak bulunmuştur (Dilgin ve ark., 2013). Elde edilen CV'ler ve amperometrik akıma karşı zaman eğrileri sırasıyla Şekil 2.10A ve B'de verilmiştir.



Şekil 2.10. A) PGE/QH<sub>2</sub>'nin a) NADH'siz b) 0,5 mM NADH ortamında c) yalın PGE 'nin 0,5 mM NADH ve pH=7,0 olan 0,1 M PBS ortamında alınan CV'leri (v:50 mV/s) B) 1) PGE/QH<sub>2</sub>'nin 2) yalın PGE'nin pH=7,0 olan 0,1 M PBS ortamında artan NADH derişimine bağlı olarak 300 mV'da kaydedilen amperometrik akım-zaman eğrileri (Dilgin ve ark., 2013)

Dilgin ve arkadaşlarının PGE ile NADH üzerine yaptığı başka bir çalışma ise hematoksinin (HMT) ile ilgilidir (Dilgin ve ark., 2012b). Bu çalışmada, NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi HMT ile modifiye edilmiş elektrot (PGE/HMT) kullanılarak araştırılmıştır. Modifiye elektrot, oda sıcaklığında 60 saniye yalın PGE'nin 1,0

mM HMT çözeltisine (metanol içinde) daldırılması yoluyla HMT'nin PGE üzerinde adsorbe edilmesine bağlı olarak hazırlanmıştır. Döngüsel voltammetrik çalışmalardan alınan yanıtlara göre NADH'nin yükseltgenme potansiyeli yalın PGE'de +450 mV iken, modifiye elektrotun (PGE/HMT) kullanılmasıyla +200 mV'a kaymıştır. Bu sonuca göre potansiyelde 250 mV'luk bir kayma olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla PGE'nin HMT ile modifiye edilmesi NADH'ye karşı iyi bir elektrokatalitik etki gösterdiğini ifade etmektedir. Amperometrik ölçümlerden elde edilen elektrokatalitik akımlar + 200 mV'da (Ag/AgCl/ KCl<sub>(der.)</sub>), pH=7,0 olan 0,1 M KCl ihtiva eden 0,1 M PBS ortamında hazırlanmış NADH derişimi ile doğrusal olarak değişmektedir. Kalibrasyon grafiğinde, iki doğrusal aralık 0,5-10  $\mu$ M ve 10-300  $\mu$ M NADH olarak elde edilmiş olup, gözlenebilir sınıırı 0,2  $\mu$ M olarak bulunmuştur. Elde edilen CV'ler ve amperometrik akıma karşı zaman eğrileri sırasıyla Şekil 2.8A ve B'de verilmiştir (Dilgin ve ark., 2012b).



Şekil 2.11. A) Yalın PGE (a ve b) ve PGE/HMT'nin (c ve d), NADH'siz (a ve c) ve 0,5 mM NADH'li (b ve d) 0,1 M PBS pH=7,0 ortamında alınan CV'leri (v:50 mV/s) B) 1) Yalın PGE 2) PGE/HMT'nin 0,1 M KCl ihtiva eden 0,1 M PBS pH=7,0 ortamında artan NADH derişimine bağlı olarak 200 mV'da kaydedilen amperometrik akım-zaman eğrileri (Dilgin ve ark., 2012b)

ASA boyar maddelerin redoks mediyatörü olarak PGE ile birlikte kullanıldığı çalışmalara bakıldığında, tez kapsamında ele alınan maddelerden Pcv, daha önceden

bahsedildiği gibi hem hidrazinin hem de NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinde kullanılmıştır (Ayaz ve Dilgin, 2018; Zhu ve ark., 2014a). NADH ile ilgili yapılan çalışmada, Pcv son zamanlarda sıkça kullanılan ve birçok avantajları olan PGE yüzeyine elektropolimerizasyon yoluyla modifiye edilmiş ve NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi ile birlikte dehidrogenaz enzimine dayalı alkol biyosensörü tasarımı gerçekleştirilmiştir (Zhu ve ark., 2014b). Bu çalışmanın biyosensör ile ilgili kısmı daha sonraki biyosensörlerle ilgili çalışmalar kısmında (2.3) detaylı bir şekilde bahsedilecektir. Bir diğer redoks mediyatörü olarak kullandığımız Clm, modifiye GCE ve PGE kullanılmış ancak NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi ve  $NAD^+/NADH$ 'ye bağlı biyosensör çalışmalarında ilk defa bu tez kapsamında çalışılmıştır. Clm modifiye GCE ile yapılan bir çalışmada, dopamin ürik asit ve askorbik asitin eş zamanlı tayini başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Chandra ve ark., 2010). Bunun dışında yine Clm modifiye PGE ile sülfürün AEA sisteminde elektrokatalitik tayini (Emir ve Dilgin, 2018) gerçekleştirilmiş ve sülfürün su örneklerinde bu yöntemle tayin edilebileceği belirtilmiştir. Ancak etkili bir redoks mediyatörü olarak kullanılan Clm modifiye PGE ile NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine dayalı herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Cta ve Trp ise NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinde iyi bir mediyatör görevi göstermemişlerdir. Bunlarla ilgili detaylı bilgi materyal ve metot bölümünde verilecektir.

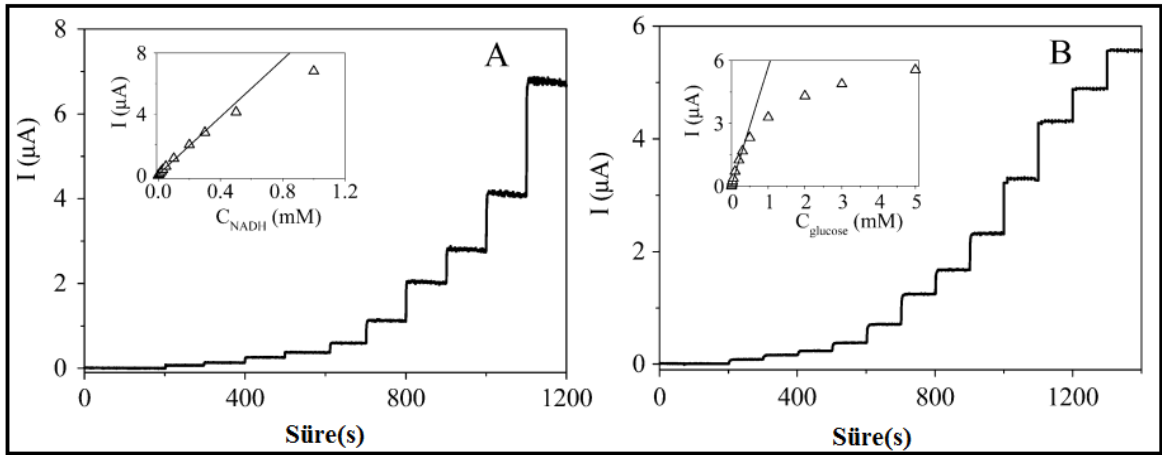
### **2.3. Dehidrogenaz Enzim Esaslı Kimyasal Modifiye Elektrotlarla Elektrokimyasal Biyosensör Çalışmaları**

NADH ve  $NAD^+$  ikilisi önemli bir redoks çiftidir.  $NAD^+$  doğal olarak oluşan birçok enzimatik reaksiyonlarda bir kofaktör olarak çok önemli role sahiptir. Bu redoks çifti ile birlikte dehidrogenaz enzimi üzerine kurulu elektrokimyasal sensör ve biyosensörler geçmişte olduğu gibi günümüzde de üzerine çalışılan ve ilgi çekmeye devam eden önemli konulardandır (Lu Bai ve ark., 2012; Baskar ve ark., 2012; Katakis ve Dominguez, 1997; Kumar ve Chen, 2008; Radoi ve Compagnone, 2009; Roushani ve ark., 2017; Silber ve ark., 1996; Yang ve Liu, 2009; Zhu ve ark., 2014). Dehidrogenaz enzim esaslı birçok kimyasal modifiye elektrotlarla amperometrik glikoz biyosensörü (Dilgin ve Gokcel, 2015; Du ve ark., 2008; Ertek ve ark., 2016; Hedenmo ve ark., 1996; Hoshino ve ark., 2012; Jafari ve ark., 2014; Lobo ve ark., 1997; Muguruma ve ark., 2008) farklı elektrotlar ve çeşitli modifiye edici maddeler kullanılarak tasarlanmıştır. Bunun haricinde yine organik



redoks boyar maddeler ve metal nanopartikül gibi farklı modifiye maddelerle elektrotlar hazırlanarak etanol ve laktat biyosensörü, hazırlanmıştır (Dagar ve Pundir, 2017; Aydogdu ve ark., 2013; Yang ve Liu, 2009; Zhu ve ark., 2014b).

Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, GCE yüzeyi Çok duvarlı karbon nanotüpleri (MWCNT) ve kitosan (CHIT) kullanılarak modifiye elektrot hazırlanmış ve sensör/ biyosensör tasarımında kullanılmıştır. Bu şekilde hazırlanan modifiye elektrot yalın GCE'ye göre 0,3V daha az aşırı potansiyel sağlamıştır. Glikoz dehidrogenaz'ın (GDH) CNT-CHIT film üzerine immobilizasyonu için glutarik dialdehit (GDI) çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. GCE/CNT-CHIT-GDI-GDH biyosensörünün kararlılığı ve duyarlılığı, fizyolojik matriste (idrar) girişim etkisi olmadan glikozun tayini yapılmış ve pH=7,40 fosfat tamponu çözeltisinde, doğrusal aralık 5-300  $\mu\text{M}$  glikoz olup, gözlenebilir sınıırı ise 3  $\mu\text{M}$  glikoz olarak bulunmuştur (Zhang ve ark., 2004). Şekil 2.12'de 400 mV sabit potansiyelde artan NADH ve glikoz derişimine karşı amperometrik akım-zaman eğrileri ve kalibrasyon eğrisi verilmiştir.



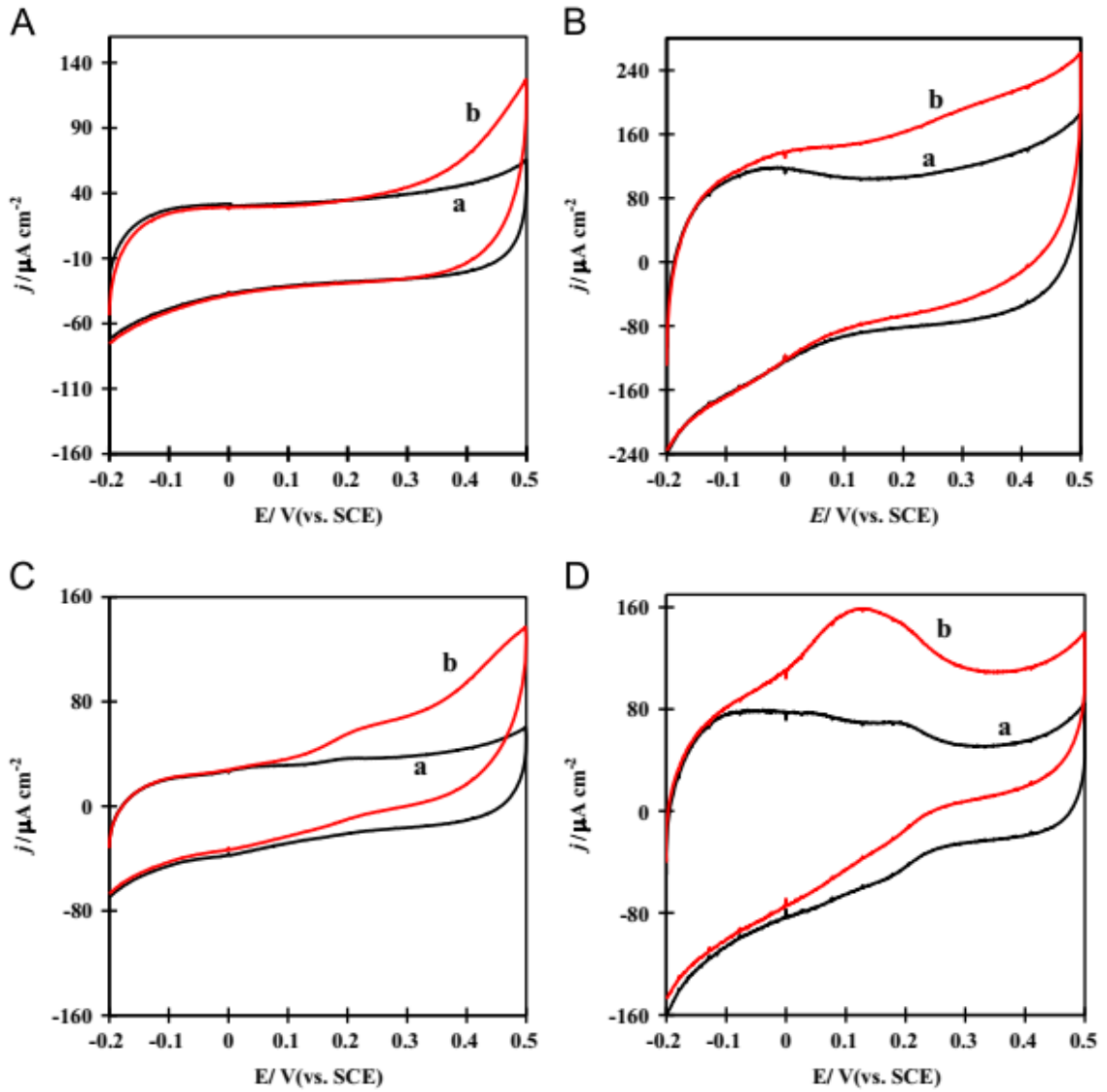
Şekil 2.12. A) GCE/CNT-CHIT film elektrotunun, karıştırılan pH=7,40 PBS'ye eklenen NADH (5,0  $\mu\text{M}$ -1,0 mM) derişimine ve B) GCE/ CNT-CHIT-GDI-GDH film elektrotunun, 0,10 mM  $\text{NAD}^+$  ihtiva eden ve karıştırılan pH=7,40 fosfat tampon içerisinde eklenen glikoz (10  $\mu\text{M}$ -5,0 mM) derişimine karşılık amperometrik yanıt ve kalibrasyon eğrisi.

Yine Piano ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada perde baskılı elektrot yüzeyi meldola mavisi ile modifiye edilmiş, daha sonra glikoz dehidrogenaz enzimi immobilize edilerek serumdaki glikoz tayini için bir biyosensör hazırlanmıştır. Bunun için

biyosensör, Ag/AgCl'ye karşı +0,05 V potansiyelinde, ticari olarak temin edilmiş, ince katmanlı, amperometrik bir akış hücresine yerleştirilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda akış çözeltisi olarak 0,1M KCl ihtiva eden pH=7,0 fosfat tamponu kullanılmış ve 0,8 mL/dk akış hızında çalışılmıştır. Biyosensör için doğrusal aralık 0,075-30 mM glikoz olup, gözlenebilme sınırı ise 0,075 mM glikoz olarak bulunmuştur. Bu biyosensör sistemi AEA sisteminde amperometrik olarak gerçekleştirilmiş ve ön işlem gerektirmeksizin serumdaki glikozun doğrudan ölçümüne uygulanabileceği belirtilmiştir (Piano ve ark., 2010).

Tez kapsamında çalıştığımız aromatik sülfonik asit boyar maddelerden biri olan Pcv redoks mediyatörü ile modifiye elektrot hazırlanmasına ve biyosensör tasarımında ait bir çalışma Zhu ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, önce tek duvarlı karbon nanotüp (Single walled carbon nanotube, SWCNT) PGE yüzeyine tutturulmuş ve daha sonra Pcv bu elektrot yüzeyinde elektropolimerize edilerek modifiye elektrot hazırlanmış ve bu elektrot (Pcv/SWCNT/PGE) kullanılarak NADH'ye karşı verdikleri elektrokatalitik pik akımlarının yükseltgenme yanıtları incelenmiş, ayrıca alkol tayini için ADH enziminin elektrot yüzeyine immobilizasyonu sağlanarak NAD<sup>+</sup>/NADH redoks çiftine bağlı alkol biyosensörü hazırlanmıştır (Zhu ve ark., 2014b). Bu çalışma tez konumuzla alakalı olduğu için detaylı bir şekilde incelenmeye değer görülmüştür. Çünkü bu çalışmada aromatik sülfonik asitlerden Pcv redoks mediyatör olarak, PGE ise elektrot materyali olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada öncelikle PGE yüzeyine 0,1 mg/mL'lik SWCNT süspansiyonundan elektrot yüzeyine damlatılıp kurutularak, SWCNT/PGE hazırlanmıştır. Daha sonra hem yalın PGE hem de SWCNT modifiye PGE'nin, 0,1 M KCl ve 1 mM Pcv içeren 0,1 M PBS (pH= 7,0), -200 ile +500 mV potansiyel aralığı kullanılarak, 20 mV/s tarama hızında 20 döngülü döngüsel voltammogramları alınarak Pcv, bu elektrot yüzeylerine modifiye edilmiştir. Alkol dehidrogenaz enzimi ise bu iki elektroda çapraz bağlama için glutaraldehit kullanılarak modifiye edilmiş ve bu şekilde alkol biyosensörü için modifiye elektrot kullanıma hazır hale getirilmiştir. Enzim immobilize edilmemiş Pcv/SWCNT/PGE'nin NADH'ye iyi bir elektrokatalitik etkinlik sergilediği belirlenmiştir. Yalın PGE, SWCNT/PGE, Pcv/PGE ve Pcv/SWCNT/PGE'nin NADH'siz ve NADH ortamında alınan döngüsel voltammogramları Şekil 2.13'de verilmiştir. Şekildeki CV'lere bakıldığında NADH'nin yükseltgenme potansiyeli yalın elektrotta (PGE) 500 mV'da (Şekil 2.13A) ve yayvan bir şekilde gözlenmiş,

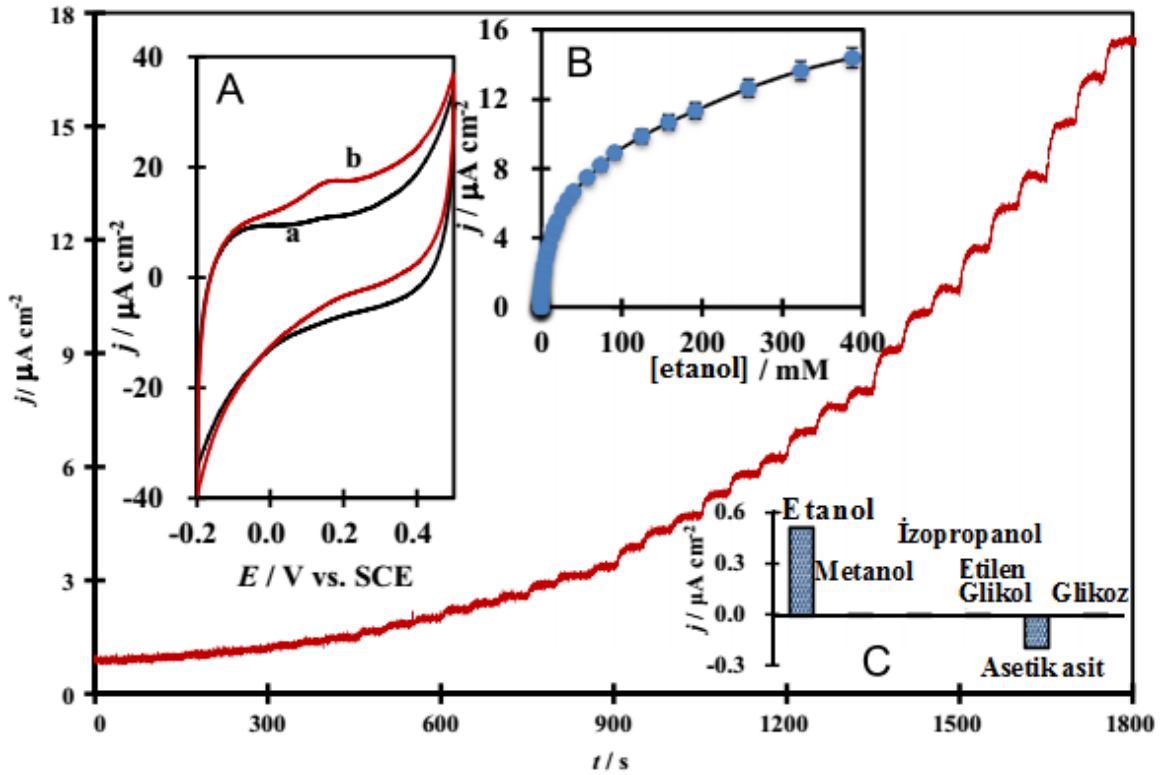
SWCNT/PGE'de (Şekil 2.13B) ise NADH'nin yükseltgenmesi daha da kolaylaşmış ve yükseltgenme potansiyeli bir miktar negatife kaydığı gözlenmiştir. SWCNT'siz Pcv/PGE'de (Şekil 2.13C) ise NADH'nin yükseltgenme pikinin 0,03 V'da başladığı (onset potential) ve 210 mV'da oldukça küçük akımların elde edildiği rapor edilmiştir. Pcv/SWCNT/PGE'de (Şekil 2.13D) ise NADH'nin yükseltgenmeye başlama piki -130 mV'larda başlamış ve diğer elektrotlara göre (yaln PGE, Pcv/PGE ve SWCNT/PGE) daha büyük akımla daha negatif potansiyelde (+150 mV) gözlenmiştir. Sonuç olarak, Pcv modifiye edilmemiş SWCNT/PGE'de, her ne kadar SWCNT'lerin elektrot yüzeyindeki NADH yükseltgenmesinin aşırı potansiyelini düşürebileceği ve NADH'nin elektrokimyasal yükseltgenmesini kolaylaştırabileceği ve NADH'nin yükseltgenme pikinin daha negatife kaydığı rapor edilmişse de Pcv/SWCNT/PGE'ye göre daha düşük akımlar elde edilmiştir. Böylece Pcv/SWCNT/PGE'nin NADH'nin yükseltgenmesine iyi bir elektrokatalitik etkinlik sağladığını göstermektedir. Mediyatör ve elektrot arasındaki mekanizma ise daha önce Şekil 1.7'de verilen mekanizma ile açıklanabilir.



Şekil 2.13. A) Yalın PGE, B) SWCNT/PGE, C) Pcv/PGE ve D) Pcv/SWCNT/PGE'nin  $N_2$  doyurulmuş 0,1 M PBS'de NADH'siz (a) ve 1 mM NADH ortamında kaydedilen CV'leri ( $v$ : 2 mV/s) (Zhu ve ark., 2014b)

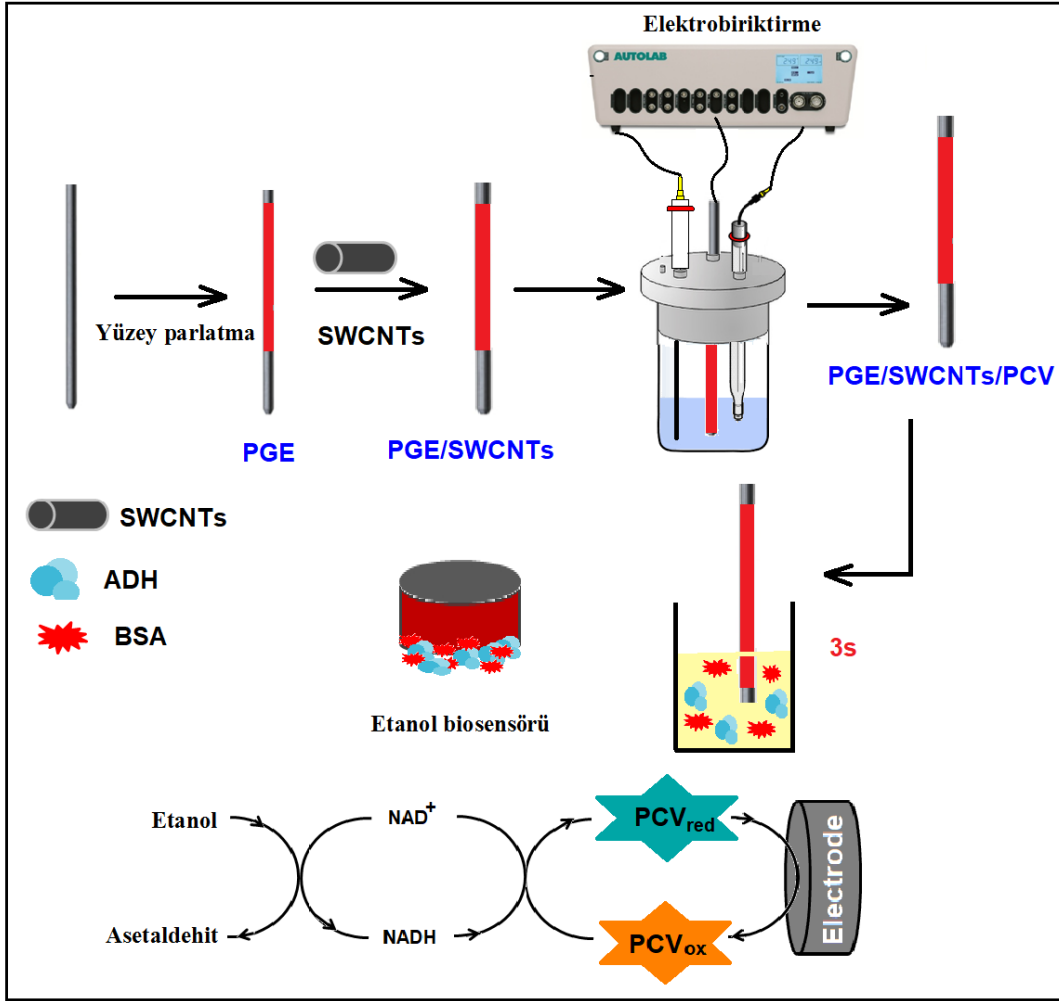
Daha sonra alkol dehidrogenaz enzimi elektrot yüzeyine immobilize edilerek ADH/Pcv/SWCNT/PGE modifiye elektrotu elde edilmiş ve bu modifiye elektrot ile etanol için biyosensör çalışmaları amperometrik yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle ADH/Pcv/SWCNT/PGE'nin 5 mM  $NAD^+$  ve etanol ortamında döngüsel voltammogramları kaydedilmiş ve Şekil 2.14A'da verilmiştir. ADH/Pcv/SWCNT/PGE'nin etanol yokken sadece 5 mM  $NAD^+$ 'da, 0,1 M fosfat tamponunda (pH=7,5) kaydedilmiş döngüsel voltammogramında (Şekil 2.14A/a) sadece Pcv'nin yükseltgenme ve indirgenmesine ait çok küçük pikler gözlenmiştir. Ortama etanol ilave edildiğinde ise

(Şekil 2.14A/a), enzimatik tepkime sonucu meydana gelen etanol derişimi ile orantılı oluşan NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine ait bir pik 200 mV'da daha belirgin bir şekilde gözlenmiştir. Dolayısıyla +200 mV uygulama potansiyelinde artan etanol derişimine bağılı amperometrik akım zaman eğrileri 0,1 M fosfat tamponu ortamında (pH= 7,5) kaydedilerek, etanol derişimine karşılık akım grafiğı (Şekil 2.14B) elde edilmiştir. Önerilen elektrodun etanole seçimli olup olmadığını kanıtlamak için 2 mM etanol ile birlikte aynı derişimde metanol, izopropanol, glikoz, etilen glikol ve asetik asitin 200 mV'da akım zaman eğrileri kaydedilerek, seçicilik çalışmaları gerçekleştirilmiş ve yöntemin etanol için seçimli yanıt verdiği tespit edilmiştir (Şekil 2.14C). Yöntemin gözlenebilirme sınırı 1,3  $\mu\text{M}$  tespit edilmiştir. Doğrusal aralık 1,3-280  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuş ve metanol, etilen glikol, izopropanol, glikoz ve asetik asit ortamında alkol tayini için başarıyla uygulanmıştır (Zhu ve ark., 2014b).



Şekil 2.14. A)ADH/Pcv/SWCNT/PGE'nin 5 mM  $\text{NAD}^+$  içeren 0,1 M fosfat tampon çözeltisinde etanol yokken ve 1 mM etanol ortamında 2 mV/s tarama hızında kaydedilen CV'leri B) Etanol sensöründe elde edilen etanol derişimine karşı akım grafiğı, C) Önerilen etanol sensörünün 2 mM etanol için seçicilik çalışmaları (Zhu ve ark., 2014b)

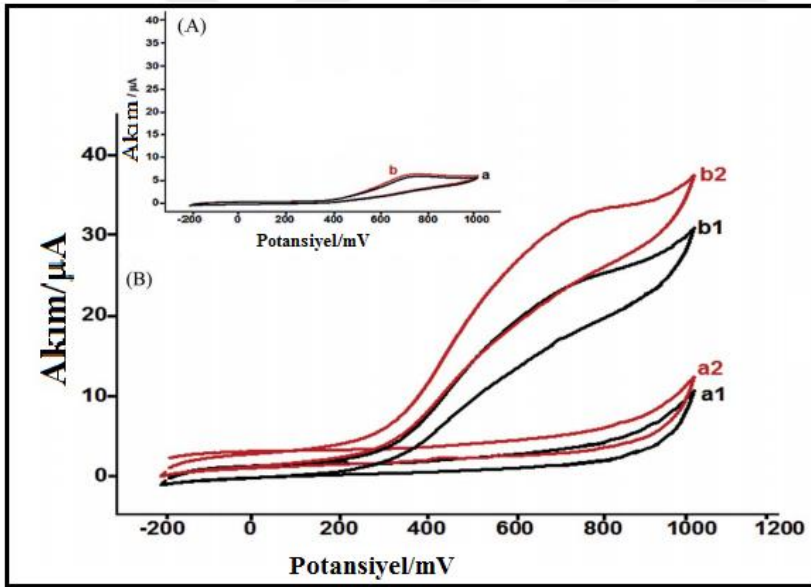
Hazırlanan biyosensör mekanizması ise daha önce  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  redoks çifti ve dehidrogenaz enzimine dayalı biyosensör mekanizmasına benzer olarak açıklanmış ve Şekil 2.15’de verilmiştir.



Şekil 2.15. SWCNT/PGE yüzeyinde Pcv ile ADH enziminin immobilizasyon adımları ve  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  redoks ikilisine bağlı olarak hazırlanan alkol biyosensörünün mekanizması (Zhu ve ark., 2014b)

Ertek ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise PGE yüzeyine hibrit kuantum noktalar ( $\text{ZnS}-\text{CdS}$ ) elektrobiriktirme ile modifiye edildikten sonra ( $\text{ZnS}-\text{CdS}/\text{PGE}$ ), yüzeye glikoz dehidrogenaz (GDH) enzimi immobilize edilerek ( $\text{GDH}/\text{ZnS}-\text{CdS}/\text{PGE}$ ), AEA sisteminde glikoz tayini fotoelektrokimyasal olarak yapılmıştır (Ertek ve ark., 2016). Enzim immobilize edilmiş modifiye elektrodun ( $\text{GDH}/\text{ZnS}-\text{CdS}/\text{PGE}$ ) yüzeyi bir fiber optik kablo (250 W halojen lamba) bulunan bir ışık kaynağı ile aydınlatılmıştır.

Elektrot yüzeyinde yarı iletken malzemenin elektron boşluk (electron, hole) oluşturması sonucunda NADH'yi içeren fotoelektrokatalitik aktivite sinyali döngüsel voltammetrik ve AE amperometrik tekniklerle incelenmiştir. Şekil 2.16'da GDH/ZnS–CdS/PGE için glikoz yokluğunda ve 40 mM glikoz varlığında elde edilen döngüsel voltammogramı göstermektedir. NADH'nin yalın elektrottaki yükseltgenmesi 520 mV iken ZnS–CdS/PGE'de 500 mV'ta gerçekleşmiştir. Elektrot yüzeyine ışık kaynağı ile ışık düşürüldüğünde yalın PGE için 16  $\mu$ A ve ZnS–CdS/PGE için ise 58  $\mu$ A olarak bulunmuş. Bu durum ZnS–CdS/PGE'nin NADH'nin yükseltgenmesine fotoelektrokatalitik etki gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır. Fotoamperometrik olarak enzimatik tepkime ile meydana gelen NADH'ye ait akımların glikoz konsantrasyonu ile doğrusal ilişkisi tespit edilmiştir. AEA sisteminde glikoz konsantrasyonu için elde edilen doğrusal aralık 0,2 ile 8 mM, gözlenebilme sınırı ise amperometrik ve fotoamperometrik metotlar için sırasıyla 0,09 ve 0,05 mM olarak bulunmuştur (Ertek ve ark., 2016).



Şekil 2.16. GDH/ZnS–CdS/PGE'nin glikozsuz (a1ve a2) ve glikoz ortamında (b1veb2) (a1) ve (b1): ışısız (a2) ve (b2): ışıklı olarak kaydedilen CV'leri. (İçteki şekil: GDH/PGE'nin 40 mM glikoz ortamında (a): ışısız (b): ışıklı olarak kaydedilen CV'leri). DE: 10,0 mM NAD<sup>+</sup> ile 0,1 M KCl ihtiva eden 10<sup>-1</sup> M PBS pH=7,0, v: 20 mV/s (Ertek ve ark., 2016)

Sonuç itibarıyla PGE'nin redoks mediyatörü görevi üstlenen boyar maddelerle modifiye edilip NADH'nin, elektrokatalitik yükseltgenmesinde (Dilgin ve ark., 2012b),  $NAD^+/NADH$  redoks ikilisi ile birlikte dehidrogenaz (Ertek ve ark., 2016; Zhu ve ark., 2014b) ve oksidaz enzimlerine duyarlı biyosensör tasarımı (Saglam ve ark., 2016b) sınırlı sayıda çalışmaya rastlanılmıştır. Ancak her ne kadar kuantum nokta modifiye PGE ile AEA sisteminde elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal glikoz biyosensörü geliştirilmiş olsa da (Ertek ve Dilgin, 2016; Saglam ve ark., 2016b), aromatik sülfonik asit organik redoks mediyatörleriyle modifiye PGE'lerle AEA sisteminde herhangi bir elektrokimyasal sensör ve biyosensör tasarlanmamıştır. Dolayısıyla PGE gibi pratik, geniş yüzey alanı sağlayan ve tek kullanımlı bir elektrotla AEA sistemini biraraya getirerek AEA sisteminde organik redoks mediyatör modifiye elektrotlarla elektrokimyasal sensör ve biyosensör tasarımı bu çalışmanın özgün olduğunu göstermektedir.



## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE YÖNTEM

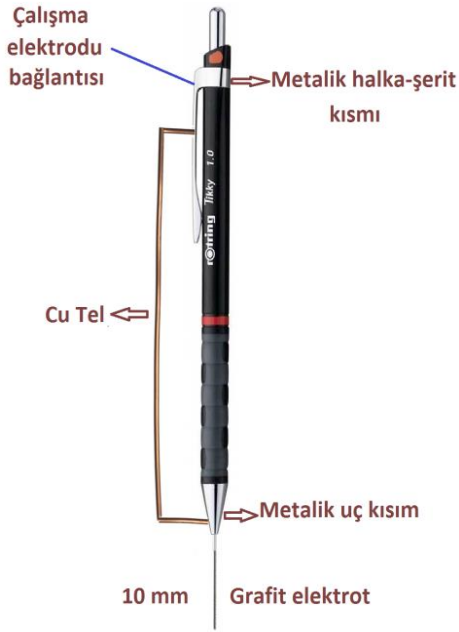
#### 3.1. Kullanılan Kimyasallar

KCl Carlo Erba Reagents firmasından; NaNO<sub>3</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, NaOH, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%85, d:1,88 g/mL), CH<sub>3</sub>COOH (%96, d:1,05 g/mL), HCl (% 37, d: 1,19 g/mL), K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>·3H<sub>2</sub>O ve K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> Merck firmasından; Kalmagit (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S, MA:358,37 g/mol), Kromotropik asit disodyum tuzu dihidrat (C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, MA:400,29 g/mol), Tropeolin O sodyum tuzu (C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>SNa, MA:316,27 g/mol), Pirokatekol violet (C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>S, MA:386,38 g/mol), β- Nikotinamid adenin dinükleotid sodyum tuzu (from saccharomyces cerevisiae, NaNAD<sup>+</sup>, C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>7</sub>NaO<sub>14</sub>P<sub>2</sub>, MA: 685,41 g/mol), Glutaraldehit (GA, d: 1,061 g mL<sup>-1</sup>, 25% w/w in water), Glikoz dehidrogenaz, (Glucose dehydrogenase, from Pseudomonas sp., 340 U/mg protein), Sığır serum albumini (Albumin, from Bovine serum, BSA), D-(+)-glikoz (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), PAMAM (Metanolde %10, PAMAM dendirmer, ethylene daimine core, generation 4,0 solution) [NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>]:(G=4);dendrimer PAMAM(NH<sub>2</sub>)<sub>64</sub> MA:14214,17 g/mol) Sigma-Aldrich firmasından; Nikotinamid adenin dinükleotidin indirgenmiş disodyum tuzu trihidrat (NADH-Na<sub>2</sub>, C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>O<sub>14</sub>N<sub>7</sub>P<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O) Amresco firmasından, temin edildi. Ayrıca PGE'lerin modifiyesinde kullanılan ve NADH'ye oldukça iyi bir elektrokatalitik yanıt veren Clm ve Pcv mediyatörlerinin IR spektrumları alındı ve bu spektrumlar EK 1 ve EK 2 bölümünde verildi.

#### 3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Tüm elektrokimyasal çalışmalarda olduğu gibi geleneksel üçlü elektrot sistemi voltammogramların, elektrokimyasal impedans eğrilerinin ve akışa enjeksiyon analiz sisteminde amperometrik verilerin kaydedilmesinde kullanıldı ve yapılan tüm çalışmalar oda sıcaklığı şartlarında gerçekleştirildi. Geleneksel üçlü elektrot sisteminde Pt tel (BASi MW-1032, 7,5 cm uzunluğunda ve 0,5 mm çapında) yardımcı elektrot, Ag/AgCl/(doygun KCl) elektrot (BASi RE-5B, 7,5 cm uzunluğunda ve 6 mm iç çapında) referans elektrot ve PGE ise çalışma elektrotu olarak kullanıldı. Deneysel çalışmalarda kullanılan kurşun kalem uçları 2B olup 0,5 mm çapında ve 60 mm uzunluğunda (Ultra-Polymer, 2B, TOMBOW Japonya) olup, kırtasiye malzemesi satan bir marketten temin edildi. Deneysel

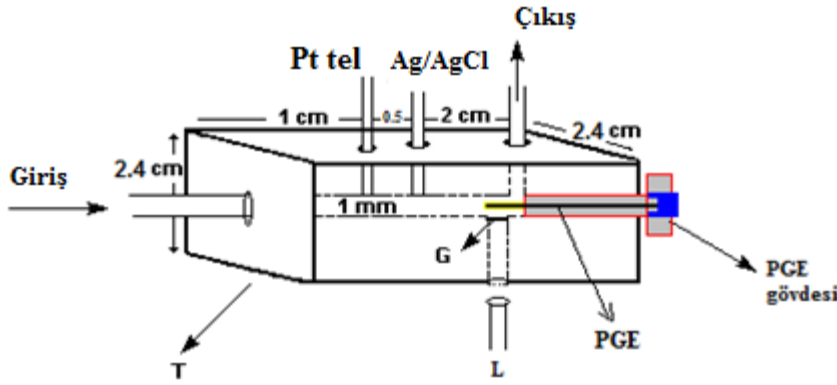
çalışmalarda, çalışma elektrotu olarak kullanılacak PGE'yi sabitlemek ve elektriksel bağlantının sağlanabilmesi için Şekil 3.1'de gösterildiği gibi 0,5 uçlu kalem, iletkenliğin sağlanması amacıyla bakır bir telle lehimlenerek çalışma elektrotu için hazır hale getirildi. PGE için bu sistem hazırlandıktan sonra kullanılacak kurşun kalem uçları 10 mm'lik kısmı (PGE için hesaplanan alan:15,90 mm<sup>2</sup>) destek çözeltisinde kalması sağlanarak elektrokimyasal çalışmalar için gerekli ortam hazırlandı. Bu şekilde hazırlanan üçlü elektrot sistemi elde edilen voltammogramların, elektrokimyasal impedans eğrilerinin ve AEA sisteminde amperometrik verilerin kaydedilmesinde kullanıldı.



Şekil 3.1. T model Rotring marka (Almanya) uçlu kalem ile hazırlanmış PGE (Ertek, 2016).

Tüm elektrokimyasal çalışmalar için gerekli ölçümlerin alınmasında Iviumstat ve Compactstat Electrochemical Interface (Ivium Technologies, Eindhoven, the Netherlands) ve Autolab PGSTAT 128N Potentiostat/Galvanostat cihazların kullanılmasıyla gerçekleştirildi. Deneysel çalışmalarda kullanılan çözeltilerin pH'sının ayarlanmasında kombine cam elektrodu olan Hanna HI 221 pH metre kullanıldı. Hazırlanan standart NADH çözeltilerinin, 340 nm dalga boyunda absorbanlarını ölçmek için

Spektrofotometre (Perkin Elmer Lambda 35 UV-Vis Spectrometer) cihazı kullanıldı. AEA sisteminde deneylerin gerçekleştirilmesinde Watson Marlow marka peristaltik pompa, 0,8 mm çapında silikon tubing, örneklerin enjekte edilmesi için Rhedoyne marka enjeksiyon vanası (Rhedoyne 7725 sample injection valve) kullanıldı. Elektrokimyasal akış hücresinin sisteme monte edilmesiyle AEA düzeneği kuruldu. Akış hücresine ait şema Şekil 3.2’de verildi. Bu akış hücresi daha önceki çalışmalarda kullanılan ve 112T375 nolu proje ile TUBİTAK’ın katkısı ve desteğiyle PGE için ilk defa tasarımı yapılmış olup, teflon malzemesinden hazırlanmıştır (Dilgin, 2015; Sağlam ve ark., 2017). Deneylerde kullanılacak çözeltilerin hazırlanması için gerekli ultra saf suyun temin edilmesi amacıyla Elga Option Q7B (18,2 MΩ cm) cihazı kullanıldı. Denatüre olmaması için glikoz dehidrogenaz enzimi, NADH, NAD<sup>+</sup> ve bazı kimyasalların korunması amacıyla -20 °C ve +4°C sıcaklık şartlarını sağlayacak derin soğutucu ve buzdolabı kullanıldı. Yine bütün deneysel çalışmalarda oksijen gazını ortamdan uzaklaştırılması maksadıyla argon gazı kullanıldı.



Şekil 3.2. PGE ile AE amperometrik çalışmalarda kullanılan elektrokimyasal akış hücresinin şematik gösterimi (L: Fiber optikli Işık kaynağı; T: teflon gövde; P: kolon; G: Kuartz pencere) (Dilgin, 2015; Sağlam ve ark., 2017)

### 3.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

#### 3.3.1. Elektrotların Modifiyesinde Kullanılan Çözeltiler

10<sup>-2</sup> M Kalmagıt çözeltisi: 18 mg kalmagıt tartılarak bir beherde az miktarda ultra saf su ile çözüldükten sonra 5 mL’lik balon jodye aktarıldı ve balon jodedeki işaretli çizgiye kadar ultra saf su ile tamamlandı.

10<sup>-2</sup> M Tropeolin çözeltisi: Benzer şekilde 15,8 mg tropeolin tartılarak ultra saf ile 5 mL'ye tamamlandı.

10<sup>-2</sup> M Kromotropik Asit çözeltisi: Benzer şekilde 20 mg kromotropik asit tartılarak ultra saf ile 5 mL'ye tamamlandı.

10<sup>-2</sup> M Pirokatekol violet çözeltisi: Benzer şekilde 19 mg pirokatekol violet tartılarak ultra saf ile 5 mL'ye tamamlandı.

10<sup>-1</sup> M NaNO<sub>3</sub> İçecek Şekilde Farklı pH'larda BRT Çözeltilerinin Hazırlanması: BRT çözeltisinden pH=2'den pH=10'a kadar olan çözeltilerinin hazırlanması için ilk önce aşağıda verilen iki çözelti hazırlandı. Daha sonra pH metre yardımıyla bu iki çözeltiden (çözelti 1 ve çözelti 2) yeterli hacimlerde karıştırılmasıyla istenen farklı pH'larda BRT çözeltileri, hazır hale getirildi. Çalışma elektrotu olarak modifikasyonu yapılacak PGE'nin elektropolimerizasyonla hazırlanmasında ve döngüsel voltammogramların alınmasında bu çözeltiler kullanıldı.

Çözelti 1: 10<sup>-1</sup> M NaNO<sub>3</sub> İçecek Şekilde 4x10<sup>-2</sup> M 1000 mL BRT Çözeltisinin Hazırlanması:

10<sup>-1</sup> M 1000 mL NaNO<sub>3</sub> için; 8,499 g hassas terazide tartıldı,

4x10<sup>-2</sup> M 1000 mL H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> için; 2,4732 g hassas terazide tartıldı,

4x10<sup>-2</sup> M 1000 mL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> için; kütlece % 85 oranında ve özkütlesi 1,7 g/mL olan H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisinden, otomatik pipet yardımıyla 2713 µL alındı,

4x10<sup>-2</sup> M 1000 mL CH<sub>3</sub>COOH için kütlece % 96 oranında ve özkütlesi 1,05 g/mL olan CH<sub>3</sub>COOH çözeltisinden, otomatik pipet yardımıyla 2380 µL alındı, daha sonra bu dört kimyasal sırasıyla NaNO<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1000 mL'lik balon jøjeye ilave edildi az bir miktarda ultra saf suda çözümleri sağlandı. Ardından hesaplan hacimlerde alınan CH<sub>3</sub>COOH ve H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>'de aynı balon jøjeye ilavesi yapılarak ve ultra saf su kullanılarak işaretli çizgiye kadar tamamlanmasıyla çözelti hazırlandı.

Çözelti 2: 10<sup>-1</sup> M NaNO<sub>3</sub> İçecek Şekilde 2,0x10<sup>-1</sup> M 500 mL NaOH Çözeltisinin Hazırlanması:

10<sup>-1</sup> M 500 mL NaNO<sub>3</sub> için; 4,2495 g hassas terazide tartıldı,

2,0x10<sup>-1</sup> M 500 mL NaOH için; 4,0 g hassas terazide tartıldı, az bir miktarda ultra saf suda çözümleri sağlandı. Aynı balon jøjeye ilavesi yapıldı ve ultra saf su kullanılarak işaretli çizgiye kadar tamamlanmasıyla hazırlandı.

### **3.3.2. Modifikasyonu Yapılan Elektrotların İmpedans Spektrumları(IS) ve CV'lerin Alınmasında Kullanılan Redoks Prob Çözeltisi**

10<sup>-1</sup> M KCl İçerecek Şekilde 10<sup>-1</sup> M K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> ve 10<sup>-1</sup> M K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> Çözeltisinin Hazırlanması: 0,422 g K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 3H<sub>2</sub>O, 0,329 g K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, ve 0,746 g KCl ayrı ayrı hassas terazide tartıldı ve az bir miktarda ultra saf suda çözünmeleri sağlandı. Ardından balon joje ultra saf su kullanılarak işaretli çizgiye kadar tamamlanmasıyla çözelti hazırlandı. Çalışma elektrotu olarak modifikasyonu yapılan PGE'nin elektrot karakterizasyonunda IS ve CV'lerin alınmasında destek elektrolit amacıyla bu çözeltiler kullanıldı.

### **3.3.3. NADH'nin Elektrokatalik Davranışının İncelenmesinde Kullanılan Çözeltiler**

10<sup>-1</sup> M KCl İçerecek Şekilde 1000 mL pH=7 PBS'nin Hazırlanması: 7,455 g KCl, 15,602 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O ve 17,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O ayrı ayrı hassas terazide tartıldı ve az bir miktarda ultra saf suda çözünmeleri sağlandı. Ardından balon joje ultra saf su kullanılarak işaretli çizgiye kadar tamamlanmasıyla çözelti hazırlandı. Daha sonra 10<sup>-1</sup> M KCl içerecek şekilde hazırlanan 10<sup>-1</sup> M NaOH çözeltisi kullanılarak pH metre yardımıyla bu iki çözeltiden yeterli hacimlerde karıştırılmasıyla istenen pH=7,0 PBS, hazır hale getirildi. Yalın ve modifikasyonu yapılmış elektrotların NADH'ye verdikleri elektrokatalitik yanıtlarının incelenmesinde kullanıldı.

5x10<sup>-2</sup> M NADH Stok Çözeltinin Hazırlanması: NADH-Na<sub>2</sub>'den 0,038 g hassas terazide tartıldı 10<sup>-1</sup> M KCl ihtiva eden ve Ar gazı geçirilmiş pH 7,0 PBS çözeltisi ile 1,0 mL'lik hacme tamamlandı. Hazırlanan standart NADH çözeltilerinin, 340 nm dalga boyunda absorbansları spektrofotometre cihazı ile ölçülüp uygulanacak düzeltme faktörü belirlendikten sonra +4°C sıcaklık şartlarında buzdolabında daha sonra kullanılmak üzere saklandı.

### **3.3.4. NADH'ın AEA Amperometrik Yöntemle Tayini Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler**

1,0 M KCl İçerecek Şekilde 1000 mL pH=7,0 PB(Fosfat Tamponu) Çözeltisinin Hazırlanması: CV çalışmalarında 10<sup>-1</sup> M KCl içerecek şekilde pH=7,0 PBS kullanıldı. Fakat akışa enjeksiyon sistemine geçildiğinde amperometrik NADH'ın tayini ile ilgili

çalışmalarda Ag/AgCl tel doğrudan kullanıldığı için, akış sisteminde 1,0 M KCl içerecek şekilde hazırlanan pH=7,0 PB çözeltisi kullanıldı. Bunun için 74,55 g KCl, 15,602 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O ve 17,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O ayrı ayrı hassas terazide tartıldı ve az bir miktarda ultra saf suda çözünmeleri sağlandı. Ardından balon joje ultra saf su kullanılarak işaretli çizgiye kadar tamamlanmasıyla çözelti hazırlandı. Daha sonra 1,0 M KCl içerecek şekilde hazırlanan 10<sup>-1</sup> M NaOH çözeltisi kullanılarak pH metre yardımıyla bu iki çözeltiden yeterli hacimlerde karıştırılmasıyla istenen pH=7,0 PB çözeltisi, hazır hale getirildi.

Kullanılan Standart NADH Çözeltileri: 5x10<sup>-2</sup> M NADH olarak hazırlanan stok çözeltiden istenilen derişimde çözelti hazırlamak için, gerekli miktarda hacimler alındı ve 1,0 M KCl içerecek şekilde pH=7,0 PB çözeltisinin ilavesiyle hazır hale getirildi.

### **3.3.5. PGE Yüzeyine GDH Enziminin Tutturulması ve GDH Enzim Esaslı Biyosensör Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler**

Stok 1,0 M Glikoz Çözeltisi: 1,0 M Glikoz çözeltisi için, gerekli D(+) glikoz miktarı hassas terazide tartılıp 1,0 M KCl içerecek şekilde pH=7,0 PBS çözeltisinin ilavesiyle hazır hale getirildi. Çözeltiler her gün için yeniden hazırlandı.

Glikoz Dehidrogenaz Enzim Çözeltisi: PGE yüzeyine enzimin tutturulması için, enzim derişiminin 80 mg/mL olacak şekilde literatürde belirtilen işlem basamağına göre (Dilgin, 2015) 10<sup>-1</sup> M pH 7,0 PB çözeltisi ile 1 mL'lik ependorf tüp içerisinde her gün için yeniden hazırlandı +4°C sıcaklık şartlarında buzdolabında daha sonra kullanılmak üzere saklandı.

%1'lik BSA çözeltisi: 10 mg/100 µL BSA olacak şekilde hassas terazide tartılıp 10<sup>-1</sup> M KCl içerecek şekilde 10<sup>-1</sup> M pH=7,0 PB çözeltisi ile 1 mL'lik ependorf tüp içerisinde her gün için yeniden hazırlandı, +4°C sıcaklık şartlarında buzdolabında daha sonra kullanılmak üzere saklandı.

10<sup>-1</sup> M GA stok çözeltisi: %25 w/v oranında ve özkütlesi 1,061 g/cm<sup>3</sup> olan GA çözeltisinden, 2 mL 10<sup>-1</sup> M GA çözeltisi 10<sup>-1</sup> M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS kullanılarak hazırlandı.

0,020 M 2mL GA çözeltisi: 10<sup>-1</sup> M GA çözeltisinden 400 µL alınarak, 10<sup>-1</sup> M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS ilave edilmesiyle hazırlandı.

### 3.3.6. GDH Enzim Esaslı Glikoz Biyosensörü İçin CV Çalışmalarında Gerekli Olan Destek Elektrolitin Hazırlanması

Modifiye PGE'nin glikoza verdiği yanıtının, döngüsel voltammetride incelenmesi için  $10^{-1}$  M KCl ile birlikte 10 mM  $\text{NAD}^+$  içerecek şekilde  $10^{-1}$  M pH=7,0 PBS (KCl,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , ve  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'nin yeterli miktarları alınarak ve daha sonra  $10^{-1}$  M KCl ihtiva eden NaOH çözeltisiyle pH=7,0'a ayarlandıktan sonra elde edilen çözelti) kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için 1,71g  $\text{NaNAD}^+$  hassas terazide tartıldıktan sonra 25 mL'lik balon jodge çizgiye kadar  $10^{-1}$  M pH=7,0 PB çözeltisiyle tamamlanarak hazırlandı.

### 3.3.7. GDH Enzim Esaslı Glikoz Biyosensörü İçin AEA Amperometrik Çalışmalarında Gerekli Olan Akış Çözeltisinin Hazırlanması

Modifiye PGE'nin glikoza verdiği yanıtın, AE Amperometrik olarak incelenmesi için 1,0 M KCl içerecek şekilde hazırlanan pH=7,0 PBS, akış çözeltisi olarak kullanıldı. Bunun için 74,55 g KCl, 15,602 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ve 17,8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ayrı ayrı hassas terazide tartıldı ve az bir miktarda ultra saf suda çözümleri sağlandı. Ardından balon joje ultra saf su kullanılarak işaretli çizgiye kadar tamamlanmasıyla çözelti hazırlandı. Daha sonra 1,0 M KCl içerecek şekilde hazırlanan  $10^{-1}$  M NaOH çözeltisi kullanılarak pH metre yardımıyla bu iki çözeltiden yeterli hacimlerde karıştırılmasıyla istenen 1,0 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS, hazır hale getirildi.

#### AE Amperometrik Çalışmada Kullanılan Standart Glikoz Çözeltileri:

Stok  $10 \text{ mL } 10^{-2}$  M glikoz çözeltisi için 0,018g D(+) glikoz hassas terazide tartıldıktan sonra 10,0 mM  $\text{NaNAD}^+$  (1,0 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS ile hazırlanan) çözeltisinden ilave edilmesiyle hazır hale getirildi. Çözeltiler her gün için yeniden hazırlandı.

### 3.4. Modifiye Elektrotların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

#### 3.4.1 Modifiye Kalem Grafit Elektrotların (PGE) Hazırlanması

Bütün elektrokimyasal çalışmaları üçlü elektrot sisteminde gerçekleştirildi (**Çalışma elektrotu:** PGE, **Karşılaştırma elektrotu:** CV ve elektrokimyasal impedans spektrumlarının alınmasında  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{(\text{doygun})}$ , AEA sisteminde amperometrik eğrilerin kaydedilmesinde  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{(1,0 \text{ M})}$ ; **Yardımcı elektrot:** Pt tel ). PGE'ler herhangi bir işlem yapılmaksızın veya elektrokimyasal ön koşullandırma yapılarak iki şekilde

kullanıldı. Modifiye elektrot hazırlamak için kullanılacak PGE'lerin yüzeyinde istenmeyen bazı safsızlıkların uzaklaştırılması ve yüzeyin daha aktif hale getirilmesi amacıyla, pH=7,0 PBS ortamında +1,45 V'da 60 s kronoamperogramları kaydedilerek koşullandırıldı. Clm, Trp, Cta ve Pcv mediyatörlerinin elektrot yüzeyine modifikasyonunda, hem yalın PGE hem de koşullandırılmış PGE'ler (K.PGE) ayrı bir şekilde kullanıldı. Bu amaçla hem adsorpsiyon hem de elektropolimerizasyon yöntemleri modifikasyon için kullanıldı.

Adsorpsiyonla modifiye elektrot hazırlamak için Clm, Trp, Cta ve Pcv mediyatörlerinin her biri için farklı derişimlerde çözeltileri hazırlandı. PGE'ler farklı sürelerde bu çözeltilerde bekletilerek adsorpsiyon yoluyla hazırlanan modifiye elektrotlar elde edildi. Yukarıdaki dört ASA boyar maddelerinin her biri için elektropolimerizasyon yoluyla da modifiye PGE'ler hazırlandı. Bu amaçla öncelikle 0,1 M NaNO<sub>3</sub> ihtiva eden farklı pH'lardaki BRBS destek elektrolitinden 4,5 mL hücreye ilave edilerek 2 döngülü destek alındıktan sonra Clm, Trp, Cta ve Pcv mediyatörlerin her biri için hazırlanan ara stok (10<sup>-3</sup> M) çözeltilisinden 500 µL ilave edilerek -0,7 V ile 1,3 V potansiyel aralığı kullanılarak tarama hızı 50 mV/s olacak şekilde ve 5 döngülü CV'leri alınmasıyla elektropolimerizasyon yoluyla modifiye elektrotlar hazırlandı.

NADH'ye karşı en iyi elektrokatalitik yanıtın alındığı modifiye elektrotu tespit etmek için, seçilen redoks mediyatörlerle PGE yüzeyinin elektropolimerizasyonla modifikasyonu aşamasında; destek elektrolit, monomer derişimi, döngü sayısı ve potansiyel çalışma aralığı gibi parametrelerin etkisi incelendi. Bu amaçla döngü sayısı, monomer derişimi, değişen pH'larda destek elektrolit ve potansiyel aralık değiştirilerek redoks mediyatör olarak seçilen ASA boyar maddelerle modifiye edilen PGE'lerin CV'leri alındı ve NADH'ye verdikleri yanıtları izlenerek optimum parametreler belirlendi.

### **3.4.2. Modifiye Elektrotların Karakterizasyonu**

Hazırlanan elektrotlar saf suyla yıkandıktan sonra elektrotların bir kısmının Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde (ÇOBİLTUM) hizmet alımıyla SEM ve EDX (**JEOL SEM-7100-EDX**), AFM görüntüleri ve Raman (**WITEC ALPHA 3100R**) spektrumları alınarak her bir elektrotun yüzey morfolojisi incelendi. Deneysel çalışmalarda redoks mediyatörler kullanılarak elde edilen modifiye elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonu için 0,1M KCl ihtiva eden 10<sup>-2</sup> M K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> ile 10<sup>-2</sup> M K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> çözeltileri kullanıldı. Daha sonra



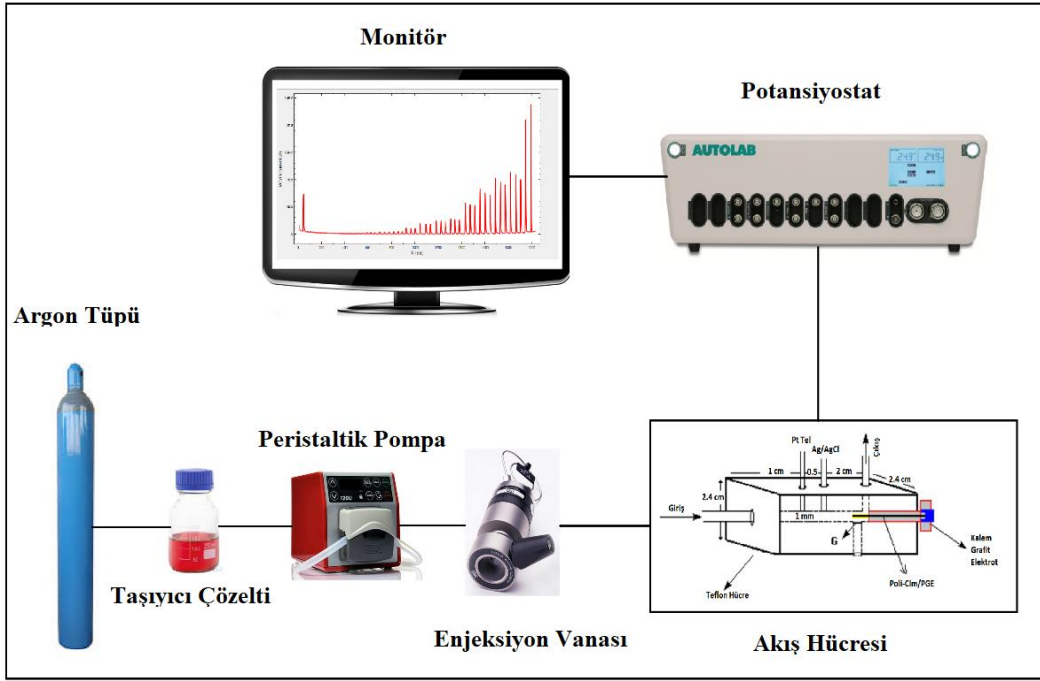
bu çözelti ortamında her bir modifiye elektrotun hem elektrokimyasal impedans spektrumları hem de döngüsel voltammogramları kaydedildi.

#### **3.4.2.1. Modifiye Elektrotlarla NADH'nin Elektrokatalitik Yükseltgenmesinin İncelenmesi**

Modifiye elektrotların NADH'nin yükseltgenmesine elektrokatalitik etki gösterip göstermediğini belirlemek için her bir modifiye elektrodun NADH yokluğunda ve belirli derişimde NADH varlığında döngüsel voltammogramları kaydedildi. Bu amaçla öncelikle modifikasyonu yapılan elektrotlar, 0,1 M KCl ihtiva eden 0,1 M pH=7,0 PBS'de döngüsel voltammogramları alındıktan sonra destek elektrolit ortamına 0,25 ya da 0,5 mM NADH ilave edilerek voltammogramlar tekrar kaydedildi.

#### **3.4.3. AEA Sisteminde ASA Boyar Maddeler ile Modifiye Edilen PGE'lerin NADH'a Karşı Amperometrik Yanıtlarının İncelenmesi**

AEA sisteminde NADH'nin, elektrokatalitik yükseltgenme yanıtlarına yönelik çalışmaları gerçekleştirmek için, Dilgin ve çalışma grubu tarafından daha önceki çalışmalarda (Dilgin, 2015; Sağlam ve ark., 2017) kullanılan ve ilk defa PGE için tasarlanıp Teflondan yaptırılan fotoelektrokimyasal bir akış hücresi kullanıldı. AEA sistemi için hazırlanan deney düzeneği şematik olarak Şekil 3.3'te gösterilmiştir. Fotoelektrokimyasal bir akış hücresi üzerinde 1,0 mm çapında AgCl ile kaplanmış Ag tel ve Pt tel bulundurmaktadır. Akış hücresi Şekil 3.3'de görüldüğü gibi sisteme bağlanarak kullanıma hazır hale getirildi.



Şekil 3.3. Amperometrik çalışmalarında kullanılan AEA sistemine ait düzeneğin şematik gösterimi(Dilgin, 2015; Sağlam ve ark., 2017)

AE amperometrik çalışmalarda, NADH için 1,0 M KCl’li 0,10 M pH=7,0 PB çözeltisi, akış çözeltisi olarak kullanıldı. NADH çözeltileri, kendi taşıyıcı elektrolitini içeren akış sistemine, enjeksiyonu yapılarak akıma karşı çalışma potansiyeli, akış hızı, kolon boyu ve örnek yükleme hacmi gibi parametreler optimize edildi.

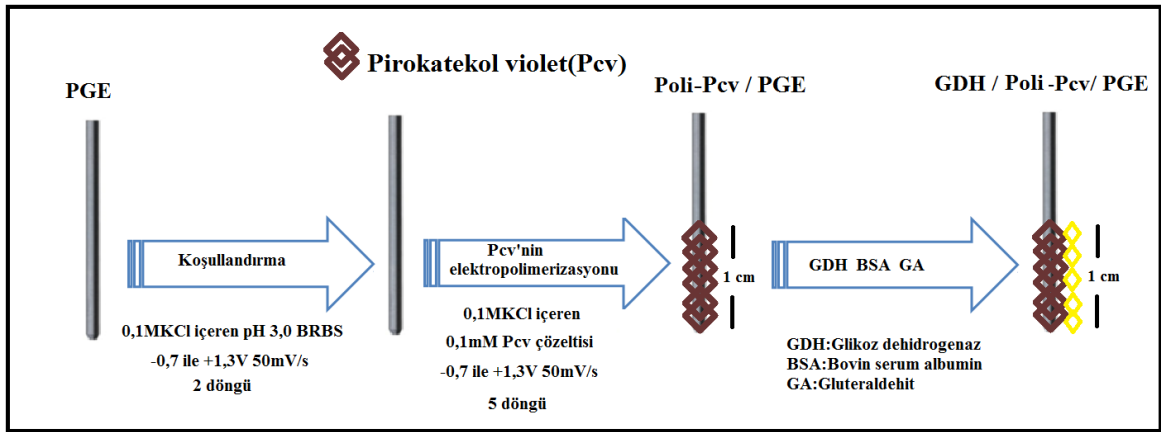
Her bir modifiye elektrotun (Pcv ve Clm ile modifiye PGE) optimize edilen koşullar altında (taşıyıcı çözelti, çalışma potansiyeli, akış hızı, örnek yükleme hacmi ve kolon boyu) AEA sisteminde akım-zaman eğrisi kaydedildi. Sabit ve düzenli hal akımı elde edilmesinden sonra farklı derişimlerde NADH içerecek şekilde hazırlanmış çözeltiler, akış hücresine en az 3 defa 10 mL’lik bir enjektörle, 100 µL örnek yükleme hacmini dolduracak şekilde, enjeksiyonu yapıldı. Daha sonra elde edilen amperometrik pik akımlarının derişime karşı yanıtları incelendi. Her çalışmadan sonra akış hücresi ve enjeksiyon vanası, saf sudan geçirilerek daha sonraki çalışmalar için hazır hale getirildi.

### 3.4.4. GDH ve NAD<sup>+</sup>/NADH Redoks Çiftine Dayalı Biyosensör Çalışmaları

#### 3.4.4.1. Dehidrogenaz Enzim İmmobilizasyonu

PGE yüzeyine enzim immobilize edilmesi için öncelikle elektrotlar % 5’lik PAMAM çözeltisinde bekletilerek PGE yüzeyine PAMAM’ın adsorbe edilmesi sağlandı. Böylelikle,

hem enzimin daha etkin immobilizasyonunu hem de boyar maddelerin elektropolimerizasyonunda daha büyük yüzey alanı sağlanmış oldu. PAMAM adsorplanmış PGE yüzeyinde seçilen ASA madde (CIm, ve Pcv) elektropolimerize edildi. Elektropolimerizasyon aşamasından sonra her bir PGE'nin yüzeyine GDH enzimi tutturmak için immobilizasyon adımına geçildi. Bunun için ilk önce GDH enzim derişimi 80 mg/mL olacak şekilde %1 BSA çözeltisi ile 1:1 oranına göre karıştırılması sağlandı (5 µL). Daha sonra bu karışıma çapraz bağlayıcı olarak 20 mM GA çözeltisinden 4 µL eklendi. Ardından mediyatörle modifiye edilmiş elektrot, GDH, %1 BSA ve GA karışımından oluşan bu çözeltiliye 1 saat süreyle daldırıldı ve bu süre zarfında +4 °C buzdolabında saklandı. Daha sonra bu çözeltiden çıkarılarak yine buzdolabında 10 dk kuruması için bekletildi ve deneysel çalışmada kullanılacak hale getirildi. PAMAM ile ilgili sonuçlar olumlu olmadığından gerek adsorpsiyon ve gerekse elektropolimerizasyon yoluyla hem CIm hem de Pcv modifiye elektrotlar hazırlanmış ve bu elektrot yüzeylerine PAMAM kullanılmaksızın enzim immobilizasyonu yukarıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Döngüsel voltammetride glikoza en iyi yanıt veren enzim immobilize elektrodu elde etmek için Enzim: BSA: GA oranları değiştirilerek PGE yüzeyine enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. En iyi yanıtı veren Poli-Pcv/PGE için enzim immobilizasyon prosedürüne ve modifiye elektrot üzerinde gerçekleşen kimyasal reaksiyona ilişkin şematik bir gösterim Şekil 3.4'de verildi.



Şekil 3.4. Poli-Pcv/PGE yüzeyine GDH enzimi immobilizasyon prosedürü için şematik gösterimi

#### **3.4.4.2. Döngüsel Voltammetri Yöntemi Kullanılarak Yapılan Biyosensör Çalışmaları**

ASA boyar maddeleriyle modifikasyonu yapılmış ve yüzeyine enzim tutturularak hazırlanmış çalışma elektrotu olan PGE, referans elektrot olarak Ag/AgCl ve Pt yardımcı elektrotu ile bir araya getirilerek elektrokimyasal hücredeki üçlü elektrot sistemi oluşturuldu. Daha sonra modifiye PGE'nin glikoza verdiği yanıt, döngüsel voltammogramların kaydedilmesiyle incelendi. Bunun için  $10^{-1}$  M KCl ile birlikte 0,01 M  $\text{NAD}^+$  içerecek şekilde hazırlanmış  $10^{-1}$  M pH=7,0 PBS destek elektrolit çözeltisi kullanıldı. Çalışılan potansiyel aralığın -0,4 ile +1,0 V ve potansiyel arasında tarama hızının 20 mV/s olduğu şartlarda glikoz ilave edilmeden önce ve 25 mM glikoz ilavesinden sonra voltammogramların kaydedilmesi ile gerçekleştirildi. Ayrıca birbiriyle karşılaştırılması için enzim tutturulmuş yalın PGE içinde aynı şartlarda deneysel çalışmalar yapıldı.

#### **3.4.4.3. AE Amperometrik Yöntemin Kullanılmasıyla Yapılan Biyosensör Çalışmaları**

Tasarımı yapılan elektrokimyasal glikoz biyosensörü için daha önce Şekil 3.2'de bahsedilen fotoelektrokimyasal akış hücresi kullanıldı. Akış sisteminde amperometri yöntemiyle yapılan çalışmalarda akış çözeltisi için 1,0 M KCl içerecek şekilde hazırlanan  $10^{-1}$  M pH=7,0 PBS kullanıldı. Akış hücresi üzerine 1,0 mm çapında AgCl kaplı Ag tel ile Pt tel çözeltiyle teması olacak şekilde doğrudan bağlantısı sağlandı. Amperometrik AEA sistemine ait şematik bir gösterim Şekil 3.3'te verilmiştir. Enzim tutturulmuş ve mediyatörle modifiye edilmiş elektrot (GDH/Poli-Pcv/PGE) akış hücresine takıldı. Ardından bağlantısı hazırlanmış AEA sistemine 1,0 M KCl içerecek şekilde hazırlanan  $10^{-1}$  M pH=7,0 PB akış çözeltisi olarak kullanıldı. 10,0 mM  $\text{NAD}^+$  ile 1,0 M KCl içerecek şekilde,  $10^{-1}$  M pH=7,0 PB destek elektrolit çözeltisi ile hazırlanmış glikoz çözeltilerinin enjeksiyonu yapıldı. Sisteme yüklenen glikoz çözeltisine karşı alınan pik akımlarından çalışma potansiyeli, akış hızı, kolon boyu ve örnek yükleme hacmi gibi analitiksel parametreler için en uygun şartlar belirlendi. Modifikasyonu yapılmış elektrot için çalışma potansiyelinin + 250 mV , akış hızının 1,18 mL/dk, örnek yükleme hacmi 100  $\mu\text{L}$  ve kolon uzunluğu (0,8 mm çapında silikon tubing) 10 cm olduğu optimize edilen parametreler kullanıldı. Ardından sabit, düzenli ve kararlı hal akımı elde edildikten sonra çeşitli

derişimlerde hazırlanmış olan glikoz çözeltileri akış sistemine en az 3 defa uygun bir enjektörle enjeksiyonu yapılarak, pik akımlarının derişimlerle değişimleri incelendi. Her deneysel çalışmanın sonunda akış hücresi ve enjeksiyon vanası saf su ile temizlenmesi sağlandı. Ayrıca birbiriyle karşılaştırılması için enzim tutturulmuş yalın PGE içinde aynı şartlarda deneysel çalışmalar yapıldı.



## BÖLÜM 4

### ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

#### 4.1. NADH'nin Elektrokatalitik Yükseltgenmesi

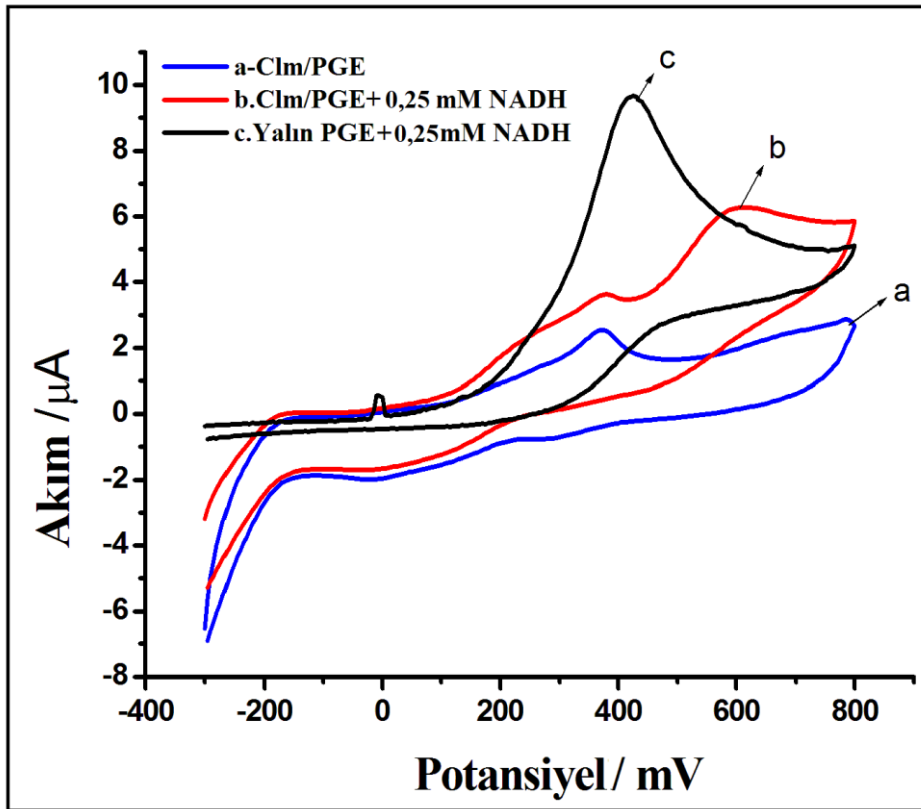
NADH/NAD<sup>+</sup> redoks ikilisi ve DHG enzimine bağlı biyosensör çalışmalarına geçmeden önce ASA boyar maddelerle modifiye PGE'ler kullanılarak NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi çalışmaları hem döngüsel voltametri hem de AEA sisteminde NADH'nin bu elektrotlardaki elektrokatalitik yükseltgenmesine bağlı olarak amperometrik tayini gerçekleştirildi. AEA amperometrik çalışmalarda, daha önceki çalışmalarda ilk defa PGE için tasarlanan ve başarılı bir şekilde kullanılan yeni akış hücresi (Dilgin, 2015; Sağlam ve ark., 2017) bu tez çalışmasında da kullanıldı. ASA boyar maddeleriyle (Clm, Trp, Cta ve Pcv) modifiye PGE'ler adsorpsiyon ve elektropolimerizasyon olmak üzere iki farklı prosedür kullanılarak hazırlandı. Her bir ASA boyar maddeleriyle elde edilen sonuçlar bundan sonraki kısımlarda ayrı ayrı verildi.

#### 4.1.1. Clm Modifiye Edilen PGE'lerle Yapılan Çalışmalar

##### 4.1.1.1 Adsorpsiyon'la Clm Modifiye PGE Hazırlanması ve NADH'ye Elektrokatalitik Yanıtı

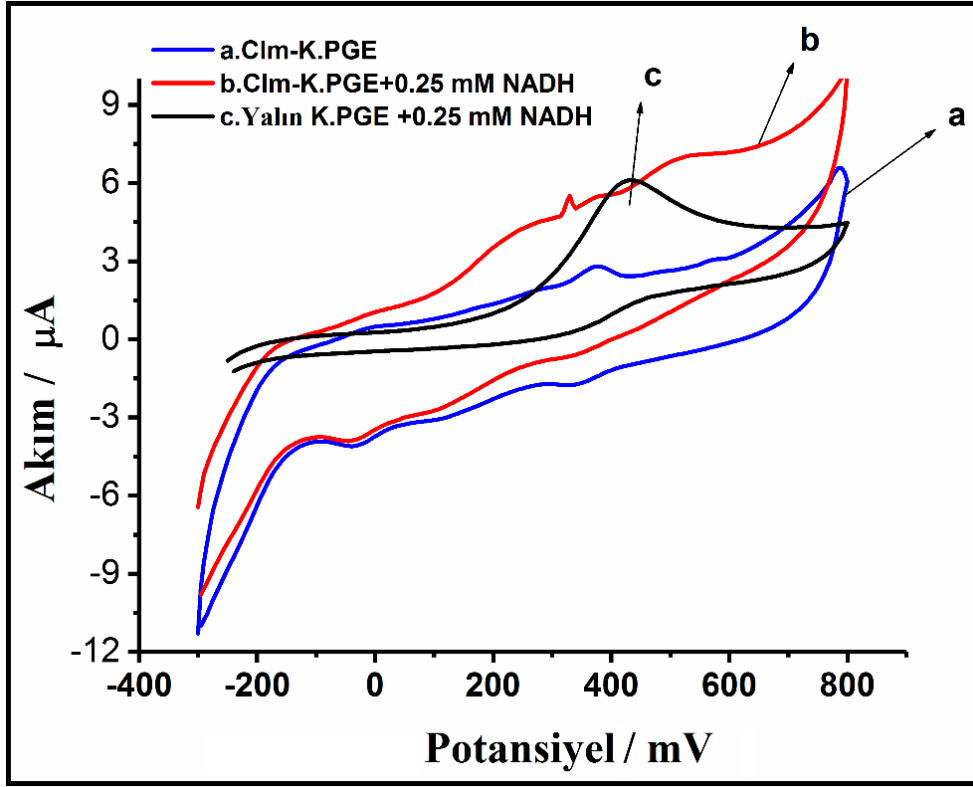
Deneysel prosedürde de bahsedildiği gibi Clm modifiye elektrotlar hazırlanırken PGE'ler koşulsuz ve koşullandırılmak üzere iki farklı şekilde kullanıldı. Hem koşulsuz (PGE) hem de elektrokimyasal olarak koşullandırılmış (K.PGE) kalem uçları 10<sup>-3</sup> M Clm çözeltisinde 30 dk bekletildi. Elde edilen uçlar Deneysel Kesimde Şekil 3.1'de şekli verilen Rotring kalem gövdesine monte edildi ve üçlü elektrot sistemi içeren elektrokimyasal hücreye yerleştirildi. Clm modifiye PGE'nin (Clm/PGE) ve koşullandırılmış PGE'nin (Clm/K.PGE) 0,1 M KCl içerecek şekilde hazırlanan pH=7,0 PBS destek elektrolitinde NADH'siz ve 0,25 mM NADH ortamında 20 mV/s tarama hızı kullanılarak alınan CV'ları kaydedildi ve elde edilen voltammogramlar sırasıyla Şekil 4.1 ve 4.2'de verildi. Şekil 4.1/a'da görüldüğü gibi Clm/PGE'nin döngüsel voltammogramında +370 mV'da bir anodik pik ve +290 mV'da katodik bir pik gözlemlendi. Bu piklerinde, literatürde verildiği gibi (Chandra ve ark., 2010; Karaman, 2014) Clm'deki fenolik grupların kinolik gruplara 2e<sup>-</sup> ve 2H<sup>+</sup> ile yarı tersinir bir şekilde yükseltgenmesine bağlanmıştır (Şekil 4.3). Ancak ortama NADH ilave edildiğinde NADH'nin Yalın PGE'de

yaklaşık +420 mV'da gözlenen yükseltgenme pikinin tamamının yaklaşık +300 mV'lara kayması beklenirken, Clm/PGE'de (Şekil 4.1/b) NADH'nin bir kısmı +300 mV civarında yükseltgenirken bir kısmı da +550 mV'da yükseltgenmiş ve bu durumda adsorpsiyon yöntemi kullanılarak modifiyesi yapılan Clm'nin, NADH'ın elektrokatalitik yükseltgenmesine herhangi bir katkısının olmadığı sonucuna varıldı. Bunun nedeni ise yüzeye adsorbe olan Clm'nin etkili bir şekilde adsorbe olmamasına ve yüzeyden kolayca desorbe olmasına bağlanabilir. Elde edilen modifiye elektrotun 10 döngülü CV'lerden gözlenen piklerin zamanla azalması da yüzeyden adsorbe olan Clm'nin desorbe olduğunu desteklemektedir.

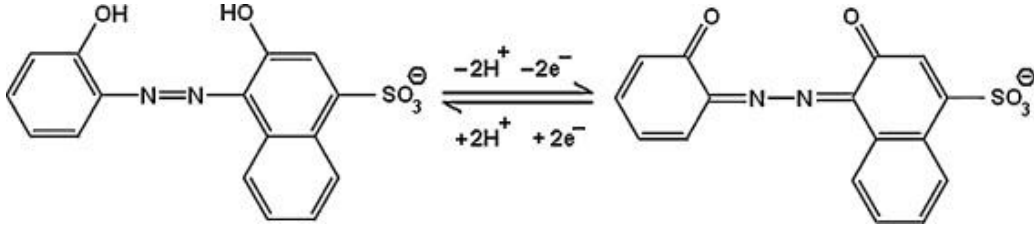


Şekil 4.1. Clm/PGE'nin a) NADH'siz ve b) 0,25 mM NADH ortamında alınan CV'leri) 0,25 mM NADH'nin Yalnız PGE'de kaydedilen CV'leri (DE: 0,1 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS; v:20 mV/s)

Benzer sonuçlar Clm modifiye K.PGE (Clm/K.PGE) içinde elde edildi, kararlı ve tekrarlanabilir sonuçlar alınamadı. Elde edilen voltammogramlar benzer şekilde kaydedildi ve Şekil 4.2'de verildi.



Şekil 4.2. Clm/K.PGE'nin a) NADH'siz ve b) 0,25 mM NADH ortamında alınan CV'leri c) 0,25 mM NADH'nin Yalın K.PGE'de alınan CV'leri (D.E: 0,1 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS; v:20 mV/s)



Şekil 4.3. Kalmagitin redoks davranışına ait mekanizma (Chandra vd., 2010; Karaman, 2014)

Sonuç olarak, adsorpsiyon yöntemi kullanılarak hazırlanan Clm ile modifiye edilen PGE'ler, NADH'a karşı iyi bir elektrokatalitik yanıtın, yani potansiyelin daha negatif bölgeye kaydırılmasında herhangi bir olumlu sonuç gözlenemediğinden dolayı elektropolimerizasyon yöntemiyle modifiye PGE hazırlanmasına karar verildi.



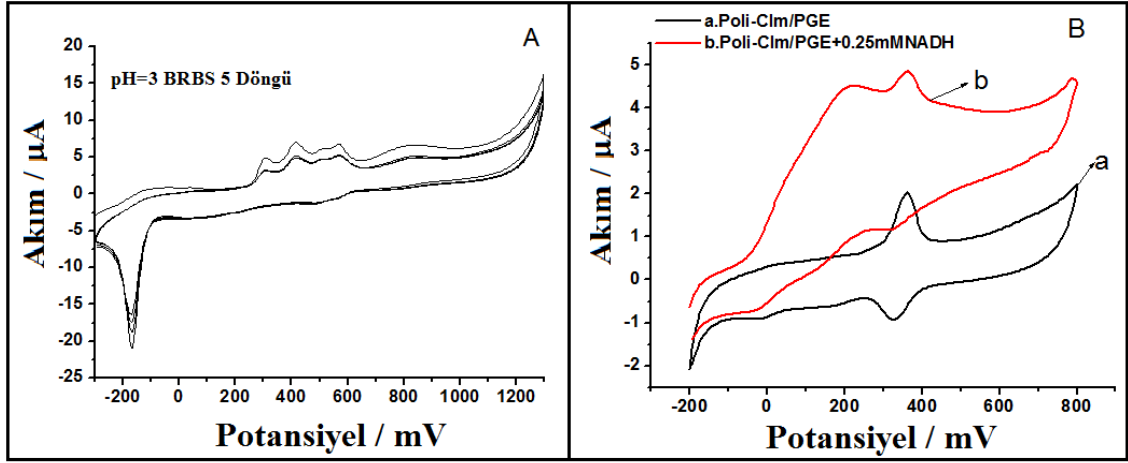
#### 4.1.1.2. Elektropolimerizasyon Yöntemiyle Kalmagit Modifiye PGE Hazırlanması ve NADH'ye Elektrokatalitik Yanıtı

Modifiye elektrotların hazırlanmasında NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine verdiği en iyi yanıt dikkate alınarak en uygun koşullar belirlendi. Bu amaçla, öncelikle sırasıyla destek elektrolit pH'ı, monomer derişimi, döngü sayısı ve potansiyel çalışma aralıklarında (özellikle anodik potansiyel sınırı değiştirilerek) Clm'nin PGE yüzeyinde elektropolimerizasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra elde edilen modifiye elektrotların NADH'nin yükseltgenmesine verdiği elektrokatalitik yanıt incelendi.

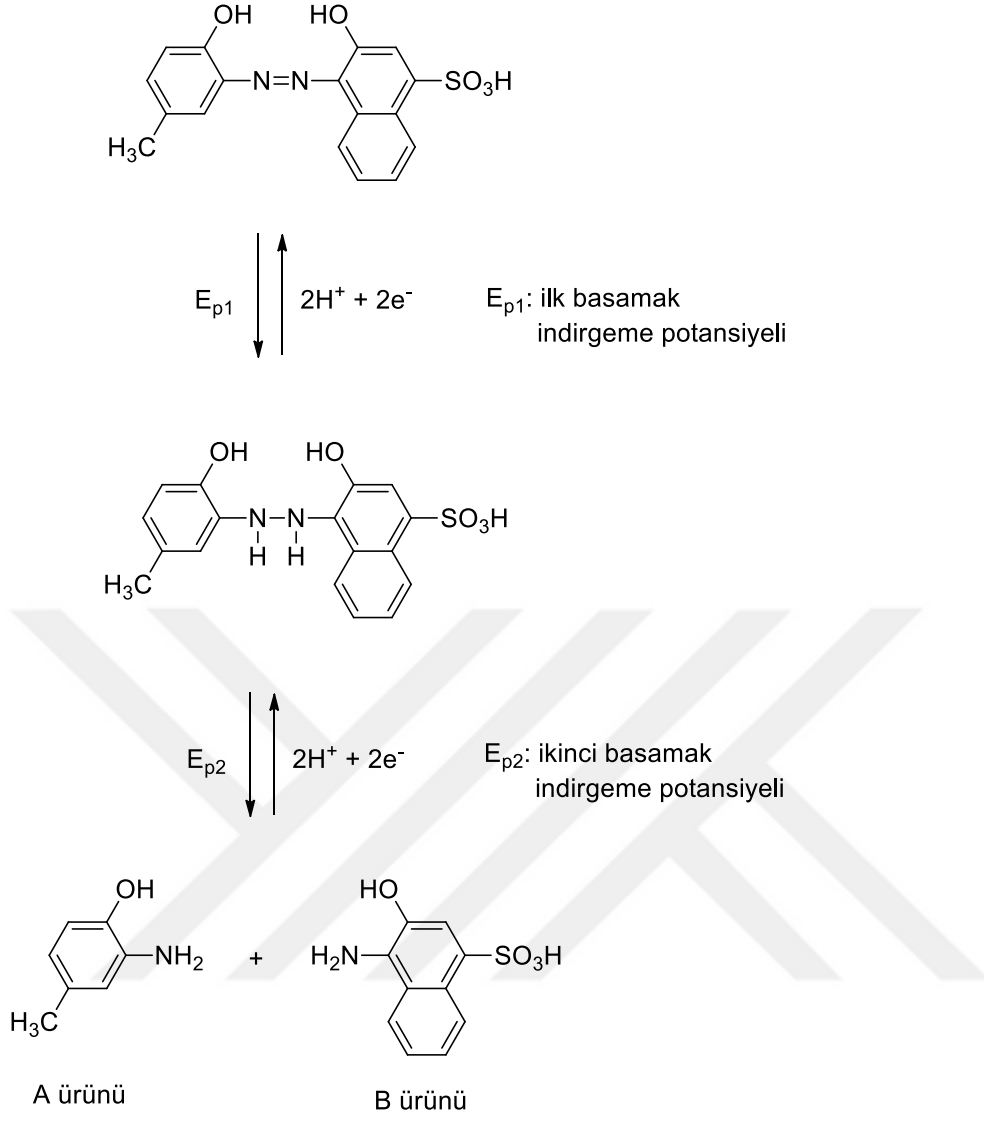
Poli-Clm/PGE'nin hazırlanması esnasındaki destek elektrolitin, NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine etkisini belirlemek için, 0,1 M NaNO<sub>3</sub> içerecek şekilde ve pH'ı 2-10 arasında değişen Britton Robinson tampon çözeltisi (Britton Robinson Buffer Solution, BRBS) destek elektrolitleri kullanıldı. Tarama hızının 50 mV/s, döngü sayısının 5, potansiyel çalışma aralığının (pH'a göre değişecek şekilde)-0,3 ile + 1,3 V, monomer derişiminin 0,1 mM Clm olduğu koşullarda, döngüsel voltammogramların alınmasıyla modifiye elektrotlar hazırlandı. Daha sonra farklı pH'lı destek elektrolitleri kullanılarak, modifiye (Poli-Clm/PGE) elektrotlar hazırlandı. Karakterizasyon için 0,1 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS ortamında 0,25 mM NADH'nin döngüsel voltammogramı alındı ve NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenme yanıtı incelendi. pH=2,0 ile pH=10,0 arasında değişen pH ortamlarında elektropolimerizasyona ait döngüsel voltammogramlar ve bu modifiye edilen PGE'lerin NADH'ye elektrokatalitik yükseltgenmesine ilişkin döngüsel voltammogramlar kaydedildi. NADH'ye en iyi elektrokatalitik yükseltgenme yanıtı ve pH=3,0 BRBS destek elektrolitinde elde edilen modifiye elektroda ait elektropolimerizasyon, Şekil 4.4'te verildi. Şekil 4.4/A 0,1 M NaNO<sub>3</sub>'lü ve pH=3,0 BRBS ortamındaki Clm'nin elektrolizi esnasında gerçekleşen polimer filminin oluşumuna ilişkin döngüsel voltammogramları göstermektedir. Elektropolimerizasyon işlemine NO<sub>3</sub><sup>-</sup> anyonunun katalitik etkisinden dolayı tüm elektropolimerizasyon işlemlerinde destek elektrolitlere derişimi 0,1 M olacak şekilde NaNO<sub>3</sub> ilave edildi (Karyakin ve ark., 1999a; Karyakin ve ark., 1999b). İlk döngüde, bir tersinir redoks çifti (+630 mV'da anodik pik ve +640 mV'da ise bir katodik pik) ve tersinmez üç adet (+380 mV, +470 mV ve +870 mV'da ) yükseltgenme piki gözlemlendi. Bunun dışında -180 mV'da ise belirgin bir tersinmez indirgenme piki gözlemlendi (Şekil 4.4/A). Bu tersinmez indirgenme pikinin literatürde verildiği gibi (Karaman, 2014) yapıdaki azo grubunun (-N=N-) iki basamaklı bir şekilde

$2e^-$  ve  $2H^+$  ile önce amino grubuna (-NH-NH-) indirgenmesine ve daha sonra ortadaki bağın kopmasıyla iki farklı ürünün oluşumuna bağlanmıştır (Şekil 4.5). Oluşan bir adet tersinir pikin bu mekanizmaya göre yürümeyen yani asıl iskelet yapıdaki (Şekil 4.3'deki gibi) katekol gruplarından birinin tersinir olarak kinon grubuna yükseltgenirken (+630 mV'da anodik pik ve +640 mV'da ise bir katodik pik) diğeri ise tersinmez olarak yükseltgenmesi şeklinde yorumlanabilir. Bunun dışında farklı potansiyellerde oluşan diğeri iki tersinmez pikin ise yine literatürde verildiği gibi (Karaman, 2014) oluşan iki farklı katekolik grubun kinolik gruba yükseltgenmesine bağlanabilir (Şekil 4.6). Döngü sayısı arttıkça katodik yöndeki piklerin azaldığı ve bunun sonucunda polimerizasyonun oluştuğu sonucu çıkarılabilir. Emir ve Dilgin'nin Poli-Clm/PGE ile sülfür tayini çalışmasında belirttiği Clm'nin elektropolimerizasyon mekanizması (Clm'nin yükseltgenmesi sonucu fenoksi radikalının oluşumu üzerinden) bu çalışma için de önerilebilir (Emir ve Dilgin, 2018). Bu mekanizmaya göre, öncelikle Clm'deki hidrokinon grupları  $1e^-$  ve  $1H^+$  vermesiyle fenoksi radikallerine yükseltgenir, oluşan radikal halkaya delokalize olur ve son adımda iki radikalın birleşmesiyle de (C-C birleşmesi ya da C-O birleşmesi) dimerleşme ve döngü sayısının artmasıyla da polimerleşme gerçekleşir (Emir ve Dilgin, 2018).

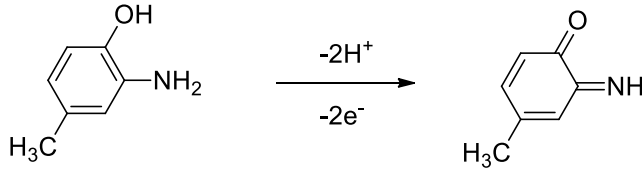
Şekil 4.4B'de ise pH=3,0 BRBS'de hazırlanan Poli-Clm/PGE'nin 0,1 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS ortamında NADH'siz ve 0,25 mM NADH ortamında kaydedilen döngüsel voltammogramları göstermektedir. CV'den Clm'nin tersinir redoks çiftine ait piklerin (+370 mV da anodik pik ve +340 mV'da katodik pik) belirgin bir şekilde görüldüğü (Şekil 4.4B.a), yine 0 mV'da küçük bir anodik pik ve -40 mV'da küçük bir katodik pik gözlemlendi. Bu pikler, elektrot yüzeyine Clm'nin modifiye olduğunu ispatlamaktadır. Destek elektrolit ortamına NADH ilave edildiğinde (Şekil 4.4B.b) ise Yalın PGE'de +420 mV'da gözlenen NADH'nin yükseltgenme piki (daha önce Şekil 4.1.c'de verilmişti) yaklaşık 0 mV'da başlamış (Onset potential) ve +200 mV'da maksimum düzeye ulaşmıştır (Şekil 4.4B.b). Bu durumda +370/+340 mV'daki redoks çiftinin NADH'nin yükseltgenmesini katalizlemediği, diğeri redoks çiftinin katalizlediği (0/-40 mV) sonucuna varılmıştır. Poli-Clm/PGE'nin, adsorpsiyon yöntemiyle elde edilen Clm/PGE'ye göre iyi bir elektrokatalitik katkısının olduğu alınan yanıtlardan gözlemlendi.



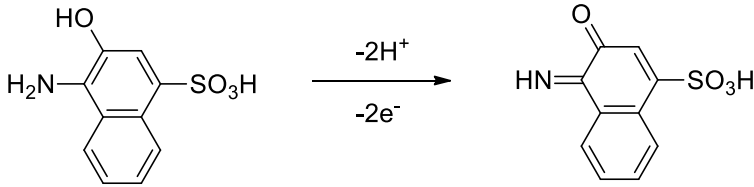
Şekil 4.4. A) 0,1 mM Clm'nin PGE yüzeyinde 5 kez ardışık olarak alınan CV'leri (DE: 0,1 M NaNO<sub>3</sub>'lı pH=3,0 BRBS; v: 50 mV/s) B) A'dan elde edilen Poli-Clm/PGE'nin a) NADH'siz ve b) 0,25 mM NADH ortamındaki CV'leri (DE: 0,1 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS; v:20 mV/s)



Şekil 4.5. Kalmagitin PGE'deki indirgenmesine ait mekanizma. Ürün A: 1-hidroksi-2-amino-4-metil benzen, Ürün B: 4-amino-3-hidroksi-1-naftelensülfonik asit (Karaman, 2014)



A ürünü



B ürünü

Şekil 4.6. Kalmagitin indirgenmesi sonucu oluşan ürünlerin (A ve B'nin) PGE'deki yükseltgenme mekanizması (Karaman, 2014)

Elektropolimerizasyon işlemi sadece pH=3,0 BRBS ortamında gerçekleştirilmemiş, pH=2,0-12,0 arasında değişen BRBS ortamlarında poli-Clm modifiye elektrotlar hazırlanmıştır. Elde edilen her bir modifiye elektrotun NADH'ye elektrokatalitik yanıtı izlenmiş ve optimum pH elde edilen bu yanıtlara göre belirlenmiştir. Tüm pH ortamlarında alınan döngüsel voltammogramlar birbiriyle karşılaştırıldığında asidik ortamda hazırlanan modifiye elektrotların NADH'ye daha iyi bir elektrokatalitik etkinlik gösterdiği ve pH=3,0-5,0 arasında elde edilen modifiye elektrotların NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine benzer yanıtlar verdiği ancak en iyi sonucun pH=3,0 BRBS'de elde edilen modifiye elektrot olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle Clm modifiye PGE'lerin elektropolimerizasyon yoluyla hazırlanmasında pH=3,0 BRBS en uygun destek elektrolit olarak seçilmiştir.

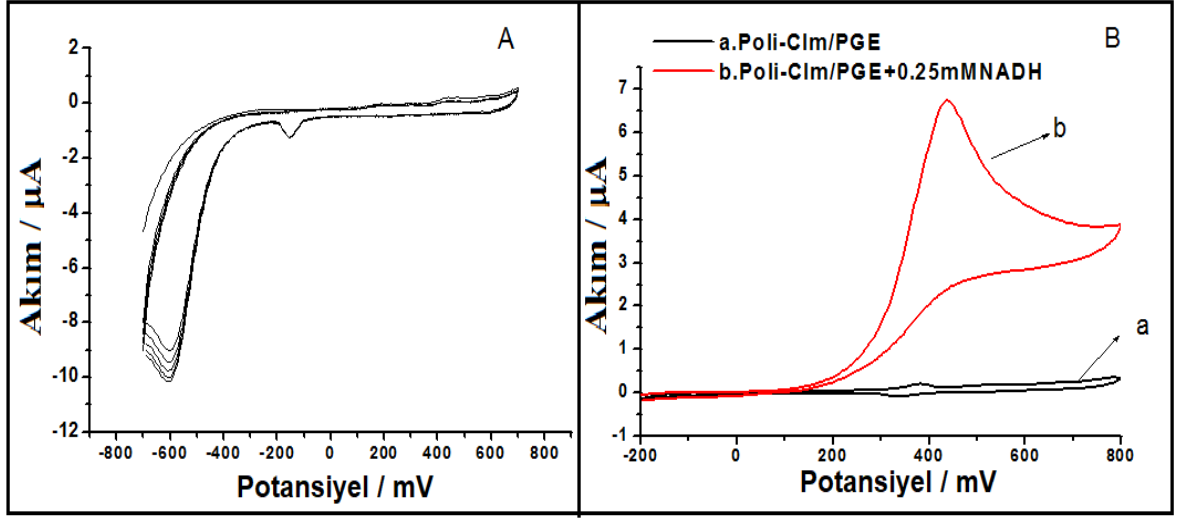
pH=3,0 BRBS optimum destek elektrolit olarak belirlendikten sonra elektropolimerizasyon adımında potansiyel aralığı da optimize edildi. Bu amaçla öncelikle anodik potansiyel değeri +1,3 V olarak sabit tutulup katodik potansiyel aralığı 0 ile -0,7 V arasında değiştirilerek 0,1 mM Clm'nin pH=3,0 BRBS'de 50 mV/s tarama hızında 5 döngülü döngüsel voltammogramı alındı. Elektropolimerizasyon adımında katodik potansiyel değerinin -0,5 V ve daha negatif potansiyel değerleri alındığında elde edilen Poli-Clm/PGE'lerin NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenme yanıtının daha belirgin olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla elektropolimerizasyon adımında -160 mV'da gözlenen

indirgenme pikinin önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Dolayısıyla bu pikin gözleneceği potansiyel değerinden daha negatif potansiyellerde katodik potansiyel değerinin seçilmesi uygun bulundu. Bu nedenle -0,7 V en uygun katodik potansiyel değer olarak seçildi.

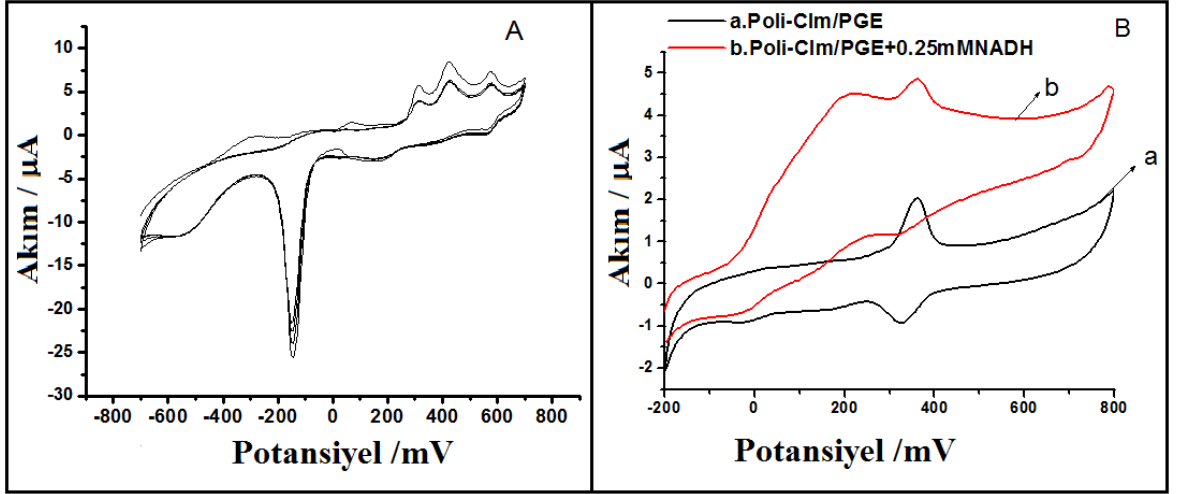
-0,7 V optimum katodik potansiyel değeri olarak belirlendikten sonra, anodik potansiyel değeri optimize edildi. Bu amaçla öncelikle -0,7 V katodik potansiyel değeri sabit tutuldu ve anodik potansiyel aralığı 0 ile 1,3 V arasında değiştirilerek 0,1 mM Clm'nin pH=3,0 BRBS'de 50 mV/s tarama hızında 5 kez ardışık olarak döngüsel voltammogramı alındı. Elektropolimerizasyon adımı anodik potansiyel değerinin 0,7 ve 1,3 V olduğu durumlarda elde edilen Poli-Clm/PGE'lerin NADH'ye yanıtlarının en uygun olduğu tespit edildi. Bu nedenle +0,7 ve +1,3 V iki farklı anodik potansiyel değer olarak seçildi.

-0,7 ve +1,3 V ile -0,7 ile +0,7 V olacak şekilde iki farklı potansiyel aralığı kullanılarak farklı döngü sayılarında elektropolimerizasyon işlemleri gerçekleştirilmiş ve elektropolimerizasyonla hazırlanan Poli-Clm/PGE'lerin NADH'ye karşı elektrokatalitik yükseltgenme yanıtları izlenerek, döngü sayısı optimize edildi. Aynı şekilde potansiyel aralığı -0,7 ile +0,7 V olacak şekilde benzer işlemler tekrarlanmış ancak döngü sayısı 1 ile 10 arasında seçilmiştir. Potansiyel Aralığı -0,7 ile +0,7 V arasında daha kararlı sonuçlar alınmış ve döngü sayısının da 5 döngü olmasına karar verildi.

Döngü sayısı optimize edildikten sonra Clm derişimi optimize edildi. -0,7 ile +0,7 V potansiyel aralığı kullanılarak farklı Clm derişimlerinde 5 kez ardışık olarak alınan döngüsel voltammogramlar kaydedildi ve bu şekilde elektropolimerizasyon işlemleri gerçekleştirildi. Elde edilen Poli-Clm/PGE'lerin NADH'nin yükseltgenmesine verdikleri yanıtları izlenerek Clm için optimum monomer derişimi belirlendi. Bu amaçla  $2 \times 10^{-3}$  ile 0,2 mM arasında değişen Clm'nin pH 3,0 BRBS'de 50 mV/s tarama hızında 5 döngülü döngüsel voltammogramı alındı. Örnek olarak en düşük derişim olan  $2 \times 10^{-3}$  mM ve optimum değerde (0,1 mM) Clm derişiminde elde edilen döngüsel voltammogramlar Şekil 4.7 ve 4.8'de verilmiştir. Düşük Clm derişimlerinde elde edilen modifiye PGE'lerin NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine yanıtının olmadığı ve 0,1 mM'dan sonra elektrokatalitik yanıtın daha kararlı olduğu gözlenmiş ve elektropolimerizasyon esnasında optimum monomer derişimi 0,1 mM Clm olarak belirlendi.



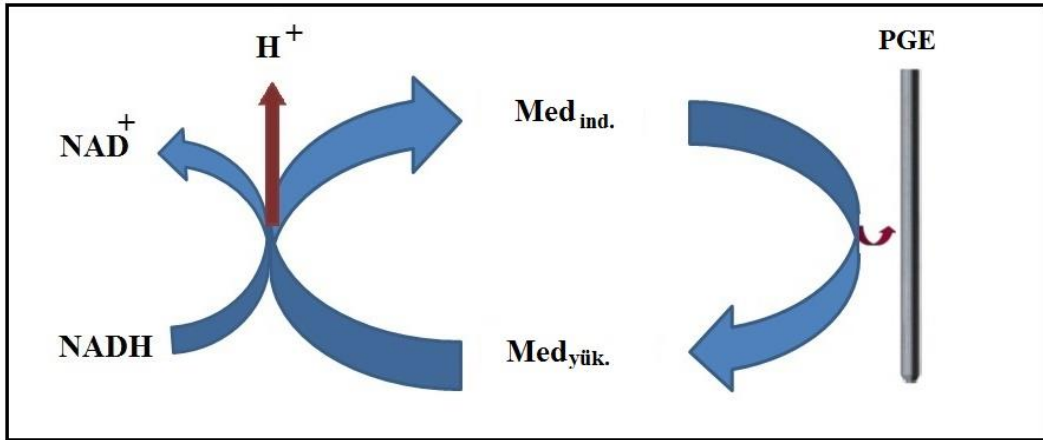
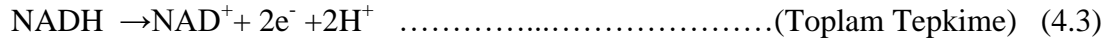
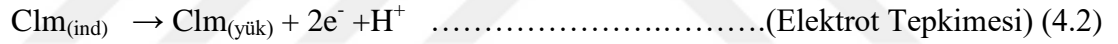
Şekil 4.7. A)  $2 \times 10^{-3}$  mM Clm'nin PGE yüzeyinde 5 kez ardışık olarak alınan CV'leri (DE: 0,1 M  $\text{NaNO}_3$ 'lı pH=3,0 BRBS; v: 50 mV/s) B) A'dan elde edilen Poli-Clm/PGE'nin a) NADH'siz ve b) 0,25 mM NADH ortamındaki CV'leri (DE: 0,1 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS; v:20 mV/s)



Şekil 4.8. A) 0,1 mM Clm'nin PGE yüzeyinde 5 kez ardışık olarak alınan CV'leri (DE: 0,1 M  $\text{NaNO}_3$ 'lı pH=3,0 BRBS; v: 50 mV/s) B) A'dan elde edilen Poli-Clm/PGE'nin a) NADH'siz ve b) 0,25 mM NADH ortamındaki CV'leri (DE: 0,1 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS; v:20 mV/s)

#### 4.1.1.3. Poli-Clm/PGE'de NADH'nin Elektrokatalitik Yükseltgenme Mekanizması

NADH'nin, Clm ile modifiye edilen PGE'deki elektrokatalitik yükseltgenmesine ait mekanizma, daha önce Dilgin ve arkadaşlarının çalışmalarında NADH için önerdiği ve giriş kısmında da belirtilen (Şekil 1.1) benzer bir mekanizmayla açıklanabilir (Dilgin ve ark., 2010; Dilgin, D. ve ark., 2011; Dilgin ve ark., 2011; Dilgin ve ark., 2012b; Dilgin ve ark., 2007; Dilgin ve ark., 2013). Önerilen mekanizmaya göre, elektrot yüzeyindeki mediyatörün (Clm) yükseltgenmiş formu ile NADH hızlıca tepkimeye girer ve mediyatör indirgenmiş formuna dönüşürken NADH ise  $\text{NAD}^+$ 'ya yükseltgenir. Daha sonra mediyatörün indirgenmiş formu elektrot yüzeyinde tekrar yükseltgenirken elektrokatalitik akım oluşur. NADH'nin Clm modifiye PGE'deki elektrokatalitik yükseltgenmesi de buna benzer bir şekilde ECE mekanizmasıyla açıklanabilir. Önerilen mekanizmaya ilişkin bir şematik gösterim Şekil 4.9'da verildi. Gerçekleşen tepkimeler ise sırasıyla tepkime 4.1, 4.2 ve 4.3'de ifade edildi.

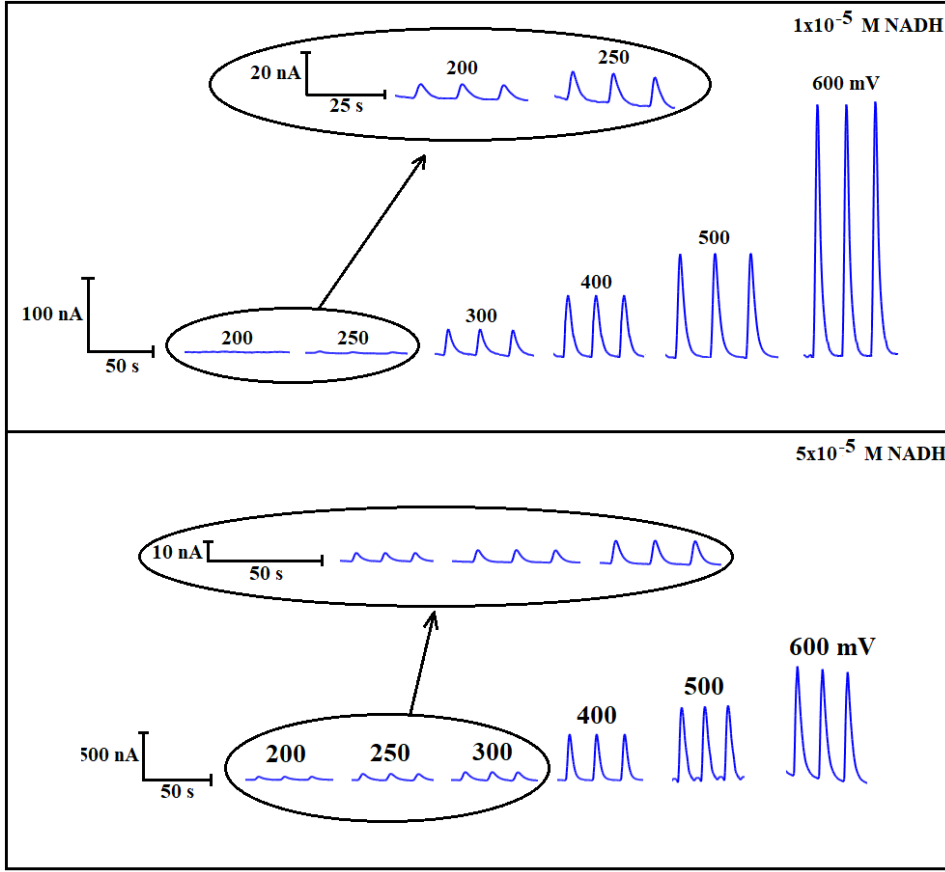


Şekil 4.9. NADH'nin redoks mediyatör modifiye elektrottaki yükseltgenme mekanizmasına ilişkin şematik bir gösterim. (  $\text{Med}_{\text{ind}}$ : mediyatörün indirgenmiş formu;  $\text{Med}_{\text{yük}}$ : Mediyatörün yükseltgenmiş formu)

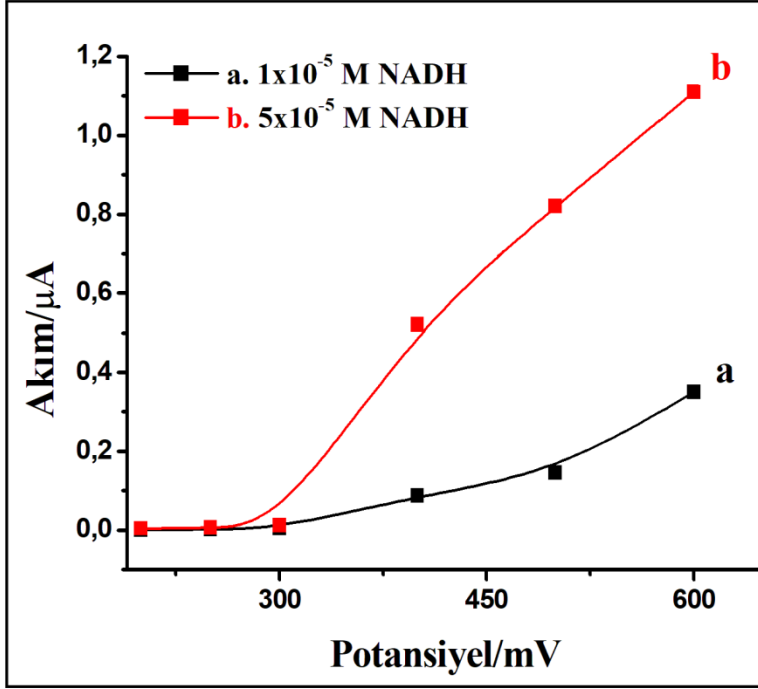


#### 4.1.1.4. NADH'nin Poli-Clm/PGE'de Elektrokatalitik Yükseltgenmesine Bağlı AE Amperometrik Tayini

AE amperometrik çalışmalarda NADH'nin Poli-Clm/PGE'de elektrokatalitik yükseltgenmesine ait en yüksek pik akımını elde etmek için hem çalışma potansiyeli hem de akış hızı optimize edildi. Bu amaçla sabit akış hızı, örnek yükleme hacmi ve kolon uzunluğu (1,5 mL/dk, 100 µL ve 10 cm) değerlerinde, iki farklı derişimde ( $1 \times 10^{-5}$  ve  $5 \times 10^{-5}$  M) hazırlanan NADH çözeltileri AEA sistemine enjekte edilerek değişen çalışma potansiyellerinde akım-zaman eğrileri hem yalın PGE hem de modifiye PGE için kaydedildi. Yalın PGE kullanılarak +200 ile +600 mV arasında değişen çalışma potansiyellerinde  $1 \times 10^{-5}$  ve  $5 \times 10^{-5}$  M NADH derişimlerinde AE amperometrik sistemde bulunan akım-zaman eğrileri Şekil 4.10'da gösterildi. Bu akım-zaman eğrilerinde çalışılan potansiyeller, hesaplanan akım değerlerine karşı grafiğe geçirildi ve Şekil 4.11'de verildi. Bu şekilden, Yalın PGE'nin NADH'ye yanıtına bakıldığında, minimum +200 mV potansiyele kadar pik akımları gözlenebilirken, en yüksek pik akımı değerleri yaklaşık +400 mV'dan sonra elde edildi. Bu sonucun, NADH'nin Yalın PGE'de elde edilen döngüsel voltammogramındaki yükseltgenme piki (Şekil 4.1.c yaklaşık +420 mV) ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

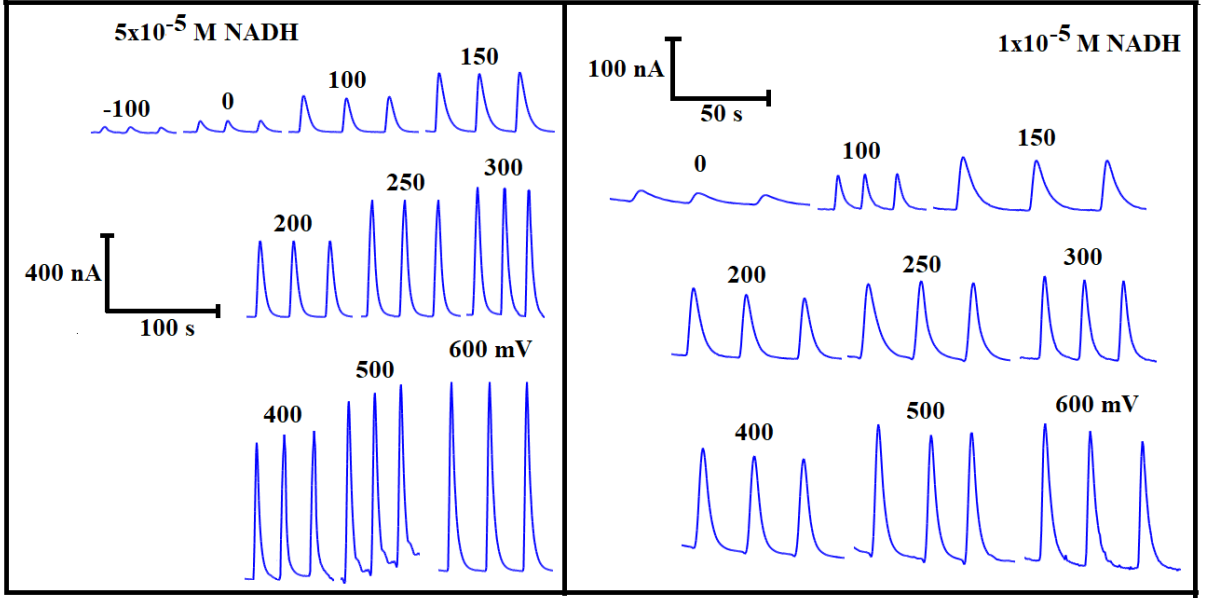


Şekil 4.10. Yalın PGE kullanılarak farklı çalışma potansiyellerinde  $1 \times 10^{-5}$  ve  $5 \times 10^{-5}$  M NADH çözeltilerinin enjeksiyonuyla elde edilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (AH:1,5 mL/dk, TÇ:1,0 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS, ÖYH:100  $\mu$ L, KU :10 cm)

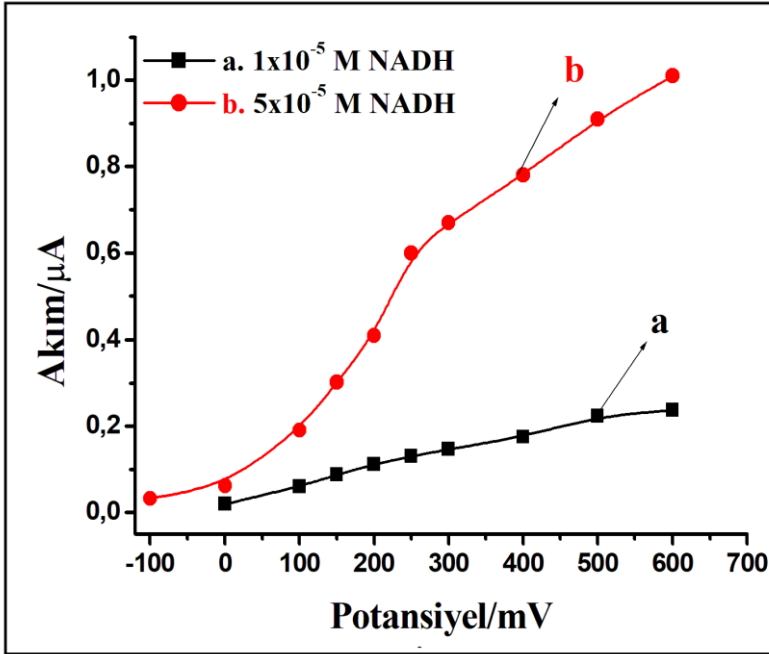


Şekil 4.11. Yalın PGE'nin AE amperometrik akım-zaman eğrilerinden hesaplanan pik akımı değerlerinin ÇP'li ile değişim grafiği

Şekil 4.12 ise Clm ile modifikasyonu yapılarak hazırlanan Poli-Clm/PGE'nin -100 ile +600 mV arasında değişen çalışma potansiyellerinde  $1 \times 10^{-5}$  ve  $5 \times 10^{-5}$  M NADH için elde edilen akım-zaman eğrilerini göstermektedir. Şekil 4.12'de Poli-Clm/PGE ile 0 V'da  $1 \times 10^{-5}$  M NADH için pik akımı gözlenirken,  $5 \times 10^{-5}$  M NADH için -100 mV gibi oldukça düşük bir potansiyelde bile sinyal gözlemlendi. Şekil 4.12'de verilen akım-zaman eğrilerinde akım değerleri, her iki derişim için hesaplandı ve çalışma potansiyeline karşı grafiğe geçirildi ve ve ortaya bu eğri Şekil 4.13'te verildi. Poli-Clm/PGE kullanıldığı zaman NADH'nin yükseltgenmesinin -100 mV gibi oldukça düşük potansiyellerde çok az da olsa görüldüğü, potansiyel 250 mV'a kadar arttıkça piklerin doğrusal olarak arttığı ve 250 mV'dan sonra ise artışın az da olsa devam ettiği Şekil 4.13'te görülmektedir. Böylece Poli-Clm/PGE'nin NADH'ye iyi bir elektrokatalitik etki gösterdiği sonucu bulundu.

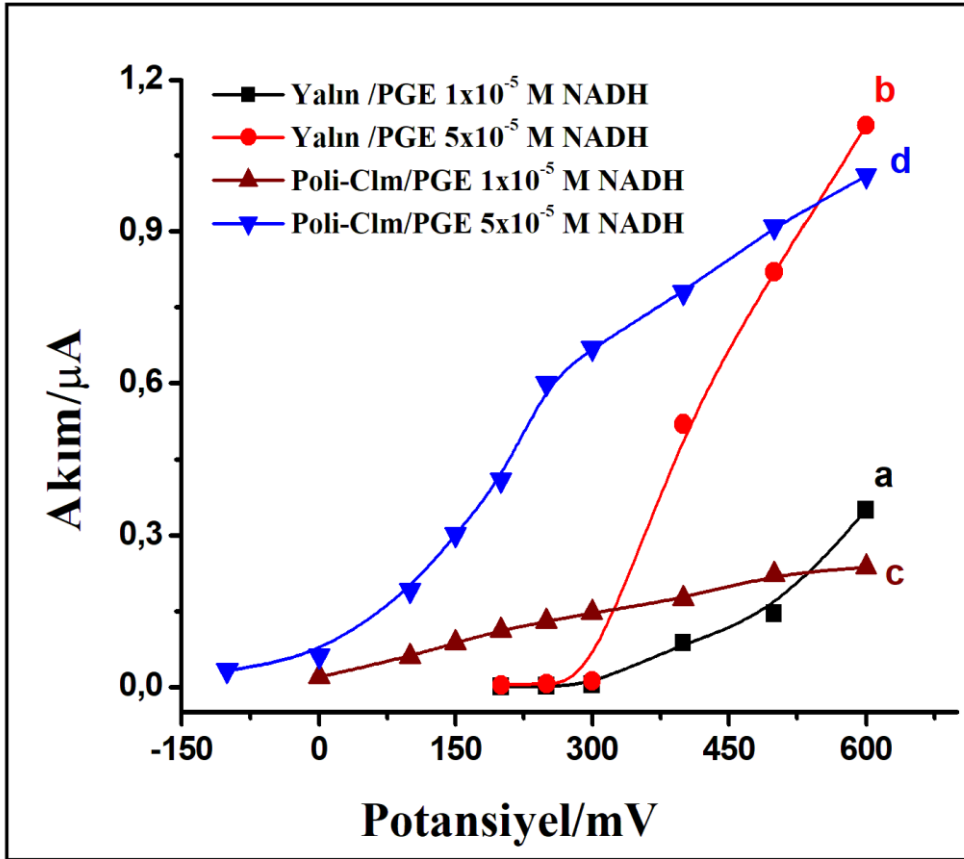


Şekil 4.12. Poli-Clm/PGE'nin kullanılmasıyla değişik çalışma potansiyellerinde  $1 \times 10^{-5}$  ve  $5 \times 10^{-5}$  M NADH çözeltilerinin enjeksiyonu ile edinilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (AH:1,5 mL/dk, TÇ:1,0 M KCl ihtiva eden pH 7,0 PBS, ÖYH:100  $\mu$ L, KU:10 cm)



Şekil 4.13. Poli-Clm/PGE'nin kullanılmasıyla AE amperometrik akım-zaman eğrilerinden hesaplanan pik akımlarının çalışma potansiyeli ile değişim grafiği

Karşılaştırma yapmak amacıyla hem Poli-Clm/PGE hem de Yalın PGE kullanılmasıyla edinilen akım-zaman eğrilerinden,  $1 \times 10^{-5}$  ve  $5 \times 10^{-5}$  M NADH derişimleri için hesaplanan amperometrik pik akım değerlerinin çalışma potansiyeli ile değişim grafiği Şekil 4.14'te verildi. Poli-Clm/PGE kullanıldığında ise, NADH'nin yükseltgenmesine ait potansiyelin daha negatife doğru gittiği görüldü.

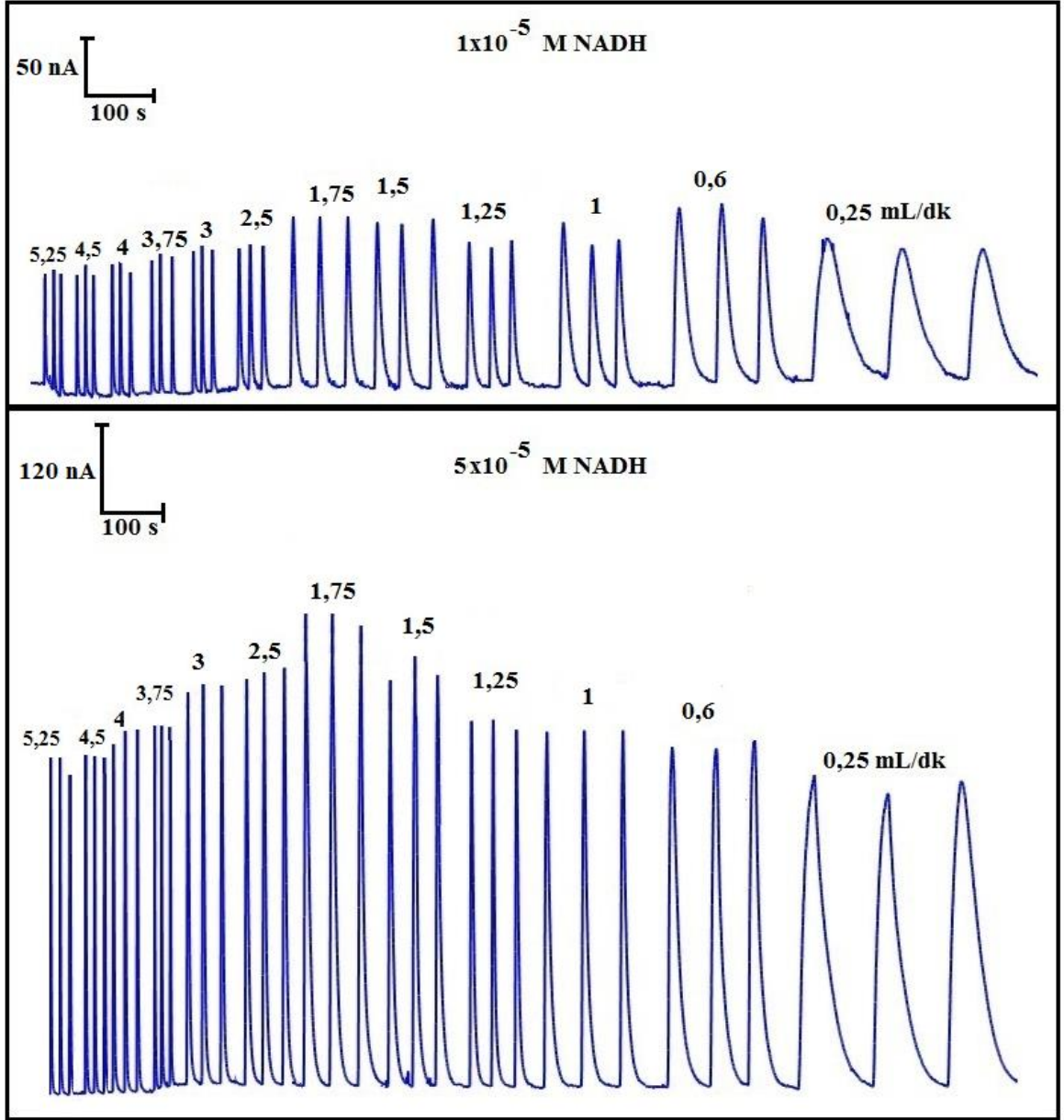


Şekil 4.14. Yalın PGE ve Poli-Clm/PGE'nin AE amperometrik akım zaman eğrilerinden hesaplanan pik akımlarının çalışma potansiyeli ile değişim grafiği

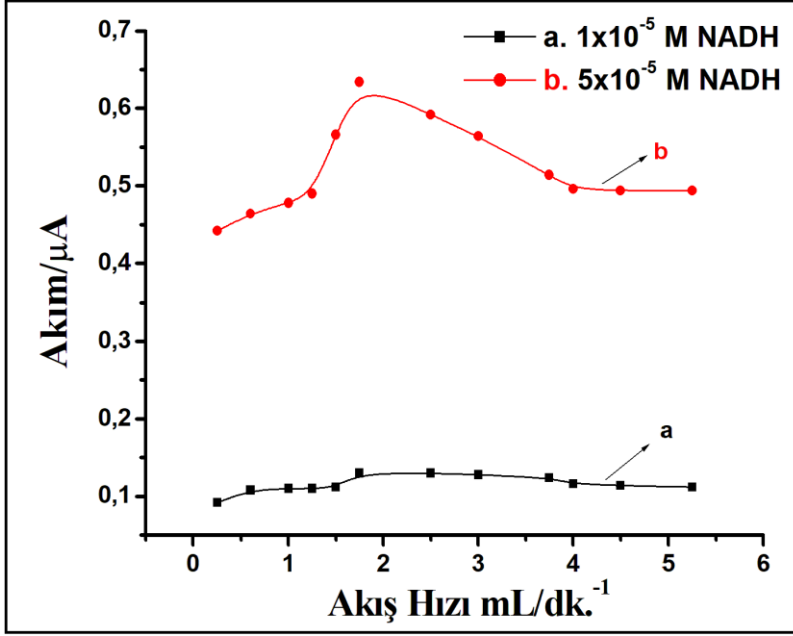
Bu tezden amaç, normal yalın elektrotta NADH'nin 400-450 mV gibi pozitif değerde görülen yükseltgenme potansiyelini, modifiye elektrotlar kullanarak daha negatif bir değerdeki potansiyele kaydırmaktır. Dolayısıyla Poli-Clm/PGE'nin kullanılmasıyla NADH'ye ait edinilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri, bu olayın başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Şekil 4.14'te de görüldüğü gibi Poli-Clm/PGE'de NADH'nin yükseltgenmesine ait en yüksek pik akımı 500 - 600 mV'da elde edilmiş olsa da, +250 mV'a kadar belirgin bir artış olmuş ve bu değerden sonra artış derecesi

azalmıştır. +500 mV gibi oldukça pozitif bir potansiyel değerinde çalışmaktansa daha negatif potansiyel olan +250 mV değerinde de etkili bir elektrokatalitik yükseltgenme gözlemlendiğinden ve istenilen pik akımı elde edildiğinden dolayı bu aşamayı izleyen sonraki çalışmalarda +250 mV potansiyel değerinin kullanılmasına karar verildi.

İkinci optimizasyon adımında ise diğer parametreler sabit olmak koşuluyla (ÖYH: 100 µL ve KU:10 cm ) +250 mV çalışma potansiyeli değerinde  $1 \times 10^{-5}$  ve  $5 \times 10^{-5}$  M NADH çözeltilerinin AEA sistemine farklı akış hızlarında enjeksiyonu gerçekleştirilerek akış hızı optimize edildi. Farklı akış hızlarında kaydedilen ve Şekil 4.15'te gösterilen akım-zaman eğrilerinden akım değerleri hesaplandı ve akış hızına karşı akım grafiği Şekil 4.16'da verildi. Şekil 4.16'da görüldüğü gibi her iki NADH derişimi için pik akımının 1,75 mL/dk'ya kadar arttığı ve bundan sonraki artan akış hızı değerlerinde ise azaldığı gözlemlendi. Akımın azalma sebebi, yüksek akış hızının kullanılmasıyla, modifiye elektrot yüzeyinde bulunan mediyatör ile NADH'nin elektrokatalitik tepkimesi için gereken zamanın verilmemesine ve yüksek akış hızı değerlerinde modifiye elektrotun yüzeyindeki polimer filminin bozunmasına bağlanabilir.



Şekil 4.15. Poli-Clm/PGE'nin kullanılmasıyla çeşitli akış hızı değerlerinde  $1 \times 10^{-5}$  ve  $5 \times 10^{-5}$  M NADH çözeltilerinin enjeksiyonu ile edinilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (ÇP:+250 mV, TÇ:1,0 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS, ÖYH:100  $\mu$ L; KU:10 cm)

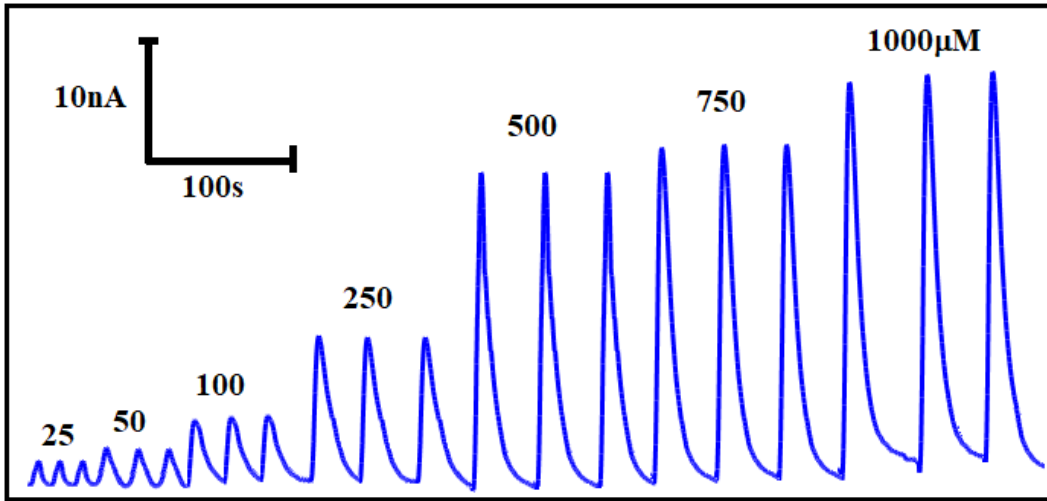


Şekil 4.16. Poli-Clm/PGE kullanılarak AE amperometrik akım-zaman eğrilerine göre hesaplanmış akımların akış hızı ile değişim grafiği

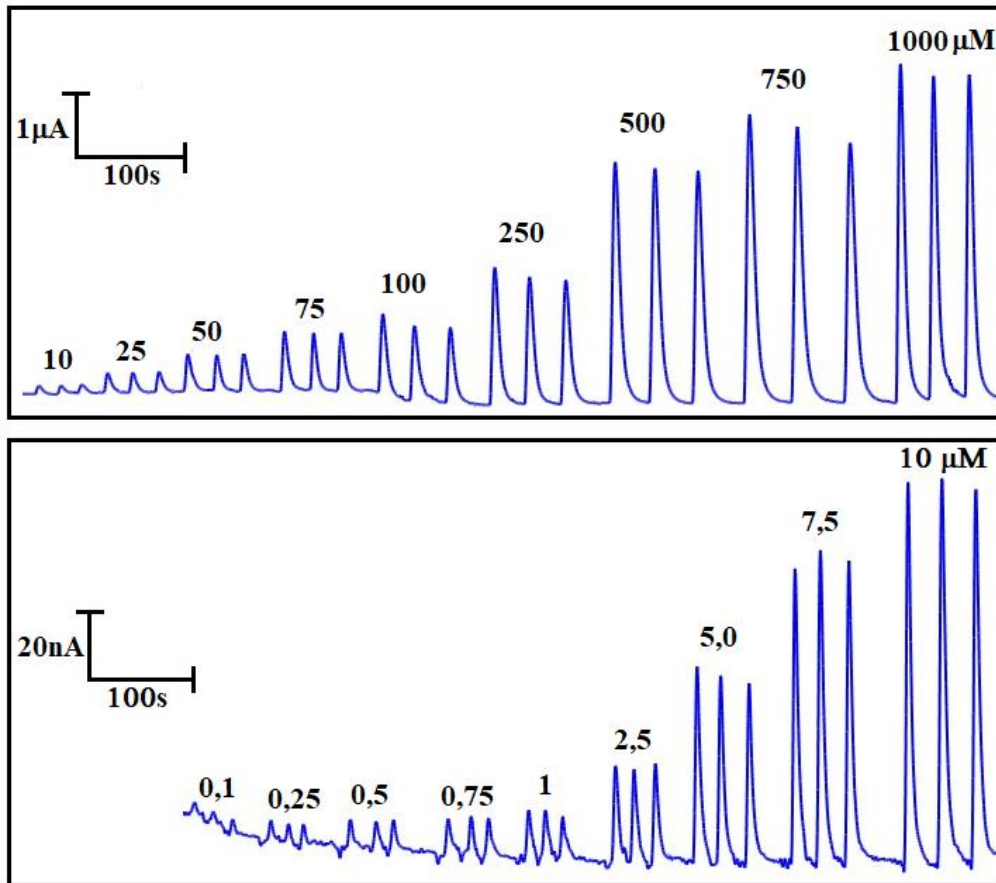
Sonuç itibarıyla, kolon uzunluğu ve örnek yükleme hacmi sabit tutularak farklı iki derişimdeki NADH çözeltilerinin enjeksiyonuyla kaydedilen AE amperometrik akım-zaman eğrilerinden sırasıyla +250 mV ve 1,75 mL/dk değerleri en uygun çalışma potansiyeli ve akış hızı olarak belirlendi. Bir sonraki adımda ise optimize edilen bu parametreler kullanarak hem Yalın PGE hem de Poli-Clm/PGE için artan NADH derişimine karşı AE amperometrik akım-zaman eğrileri kaydedilerek derişim-akım ilişkisi incelendi.

Optimize edilen koşullarda (Çalışma potansiyeli:+250 mV, akış hızı:1,75 mL/dk) modifiye edilmeyen PGE'de NADH derişimi 25 ile 1000 µM sınırları arasında, Poli/Clm/PGE için ise 0,1 ile 1000 µM aralığında artan NADH derişimine bağlı değişimi gösteren AE amperometrik akım-zaman eğrileri sırasıyla Şekil 4.17 ve 4.18'de verildi. Şekillerden görüldüğü gibi NADH derişimi arttıkça NADH'nin yükseltgenme pik akımının da arttığı gözlemlendi. Ancak her iki elektrot kıyaslandığında aynı potansiyel değerinde aynı derişim için pik akım artışının modifiye elektrotta çok daha fazla olduğu görüldü. Örneğin, Yalın PGE'de 100 µM NADH için 5,5 nA'lık bir akım elde edilirken Poli-Clm/PGE'de yaklaşık 1,23 µA akım elde edildi. Modifiye elektrottaki bu belirgin farkın, modifiye PGE'nin NADH'nin yükseltgenmesine iyi bir katalitik etkinlik sağladığını göstermektedir.



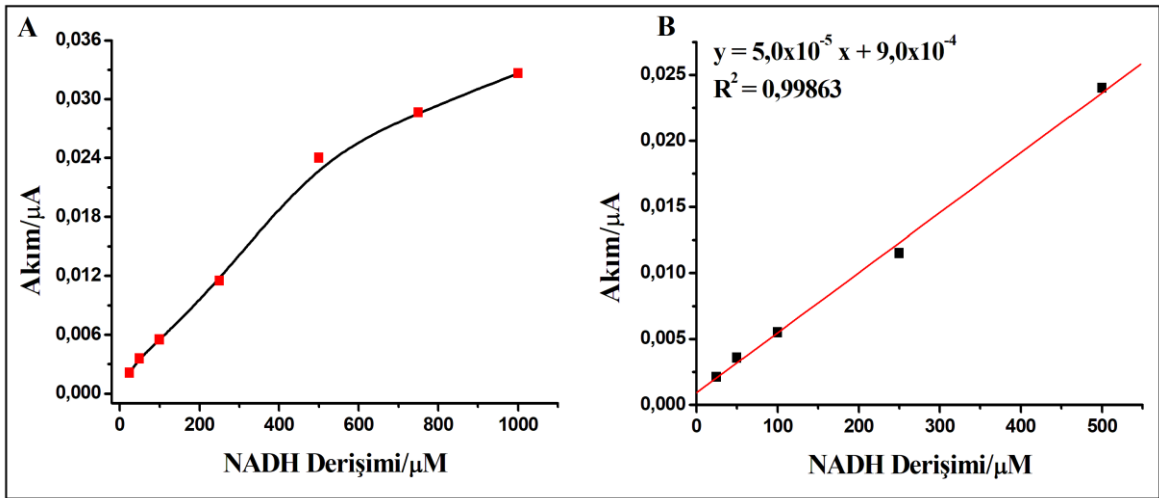


Şekil 4.17. Yalın PGE’de artan NADH derişimine bağlı elde edinilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (TÇ: 1,0 M KCl ihtiva eden 0,1 M pH=7,0 PBBS; ÇP: +250 mV; AH: 1,75 mL/dk, ÖYH: 100  $\mu$ L; KU: 10 cm)

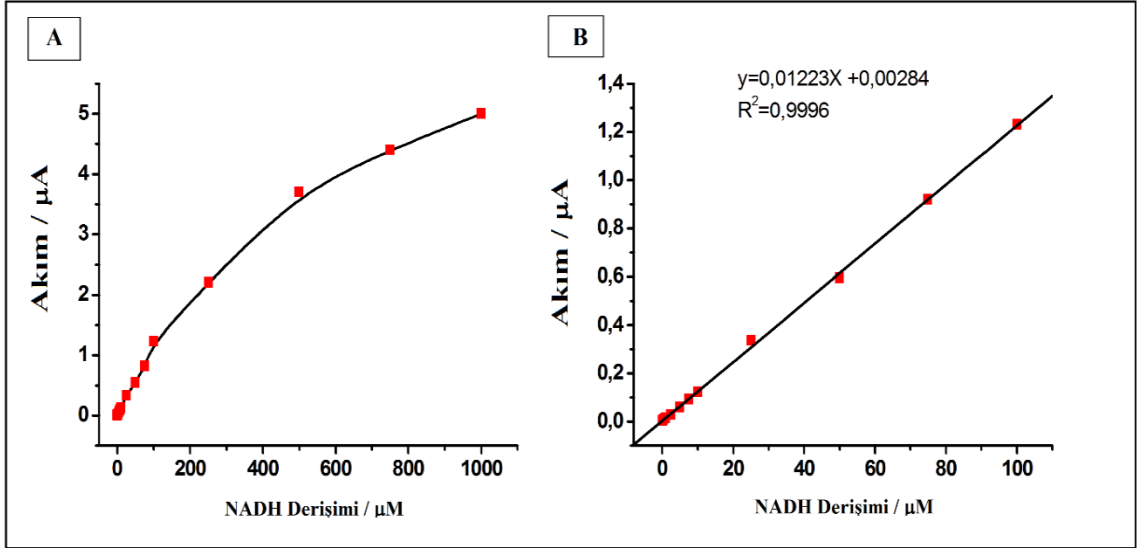


Şekil 4.18. Poli-Clm/PGE’de artan NADH derişimine bağlı elde edilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.17’deki optimize edilmiş şartlara göre)

Yalın PGE için NADH derişimine karşı pik akım değişim grafiği ve kalibrasyon grafiği Şekil 4.19’da verildi. Bu kalibrasyon grafiğinden NADH için doğrusal olarak elde edilen derişim aralığı  $2,5 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-4}$  M’dir. NADH derişimine bağlı olarak Poli-Clm/PGE’ye ait pik akım değişimi ve kalibrasyon grafiği ise Şekil 4.20’de verildi ve doğrusal olarak ölçülen kalibrasyon aralığınının  $1,0 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-4}$  M NADH olduğu saptandı. kalibrasyon grafiklerinden Bu iki elektrot için elde edilen doğrusal değerler Yalın PGE için  $I(\mu A) = 5,0 \times 10^{-5} C(\mu M) + 9,0 \times 10^{-4}$   $R^2 = 0,99863$  ve Poli-Clm/PGE için  $I(\mu A) = 0,012 C(\mu M) + 0,0028$   $R^2 = 0,9996$  denklemleriyle belirtildi. Bu denklemde C NADH’nin derişimini, I ise pik akımını göstermektedir. Bu denklemlerdeki eğimler kıyaslandığında Poli-Clm/PGE’ye ait saptanan doğrunun eğiminin (0,0122), Yalın PGE’de saptanan doğrunun eğiminden ( $5,0 \times 10^{-5}$ ) yaklaşık 240 kat daha büyük olduğu görüldü ve duyarlık elektrot yüzeyinin Poli-Clm ile modifiye edilmesi sonucu arttığı gözlemlendi.

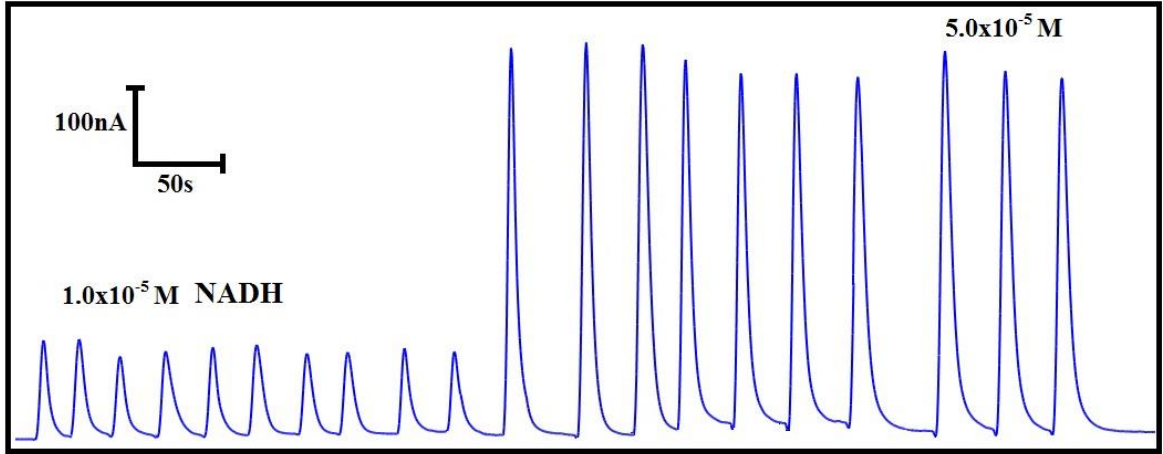


Şekil 4.19. Yalın PGE’nin kullanılmasıyla optimize edilmiş şartlarda AE amperometrik metotla edinilen, NADH derişimine bağlı pik akımlarının değişim(A) ve kalibrasyon grafiği (B)



Şekil 4.20. Poli-Clm/PGE'nin kullanılmasıyla optimize edilmiş şartlarda AE amperometrik metotla edinilen, NADH derişimine bağılık akımlarının değişim(A) ve kalibrasyon grafiği (B)

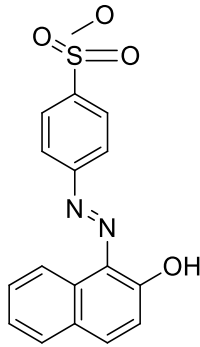
Poli-Clm/PGE'nin tekrarlanabilirliğini test etmek için optimize edilen koşullar altında  $1,0 \times 10^{-5}$  ve  $5,0 \times 10^{-5}$  M NADH özeltilerinin AE amperometrik eğrileri kaydedildi. Her iki derişim için sisteme 10 kez ardışık enjeksiyonuyla elde edilen akım zaman eğrilerinden (Şekil 4.21) akım değerleri hesaplandı ve bu akım değerlerinden  $1,0 \times 10^{-5}$  ve  $5,0 \times 10^{-5}$  M NADH için bağılık standart sapma (RSD) değerleri sırasıyla % 5,5 ve % 3,5 olarak, bulundu. Elde edilen bu RSD değerleri, Poli-Clm/PGE'nin NADH'nin AE amperometrik tayini için çok iyi tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.21. Poli-Clm/PGE’de NADH çözeltilerinin ardışık 10 kez enjeksiyonuyla edinilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.17’deki optimize edilmiş şartlara göre)

#### 4.1.2. Tropeolin Modifiye PGE’lerle Yapılan Çalışmalar

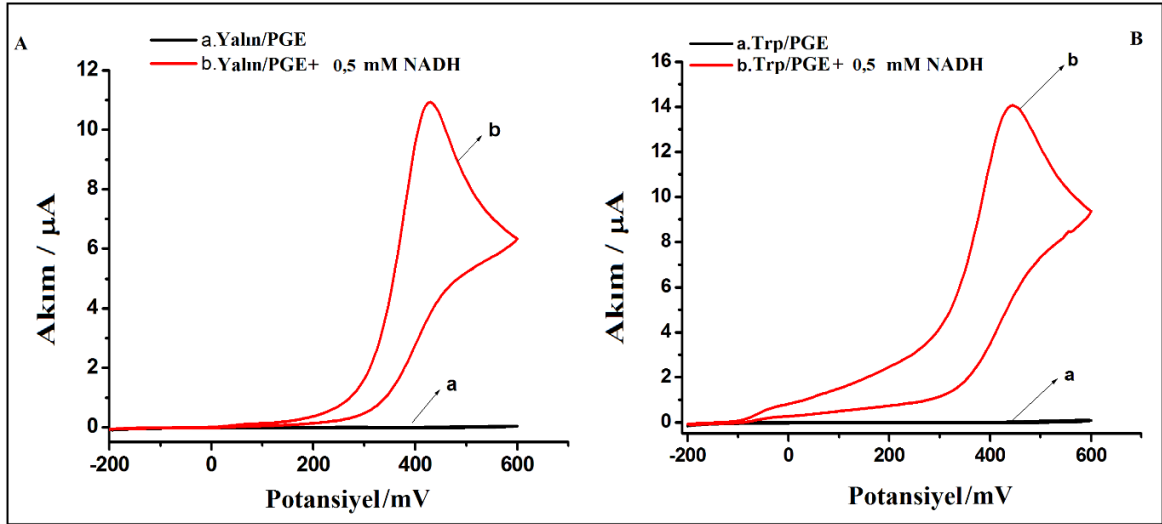
Tropeolin (Turuncu II olarak adlandırılır), renklendirme özellikleri ve termal, fiziksel ve kimyasal kararlılığı nedeniyle tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılan bir moleküldür (Şekil 4.22) (Roy ve ark., 2003). Ayrıca asit-baz indikatörü özelliği gösterdiği ve metallerle iyi kompleks oluşturduğundan dolayı kullanılan bir azo boyar maddedir (Wang ve ark., 2006).



Şekil 4. 22. Tropeolinin kimyasal yapısı (Wang ve ark., 2006)

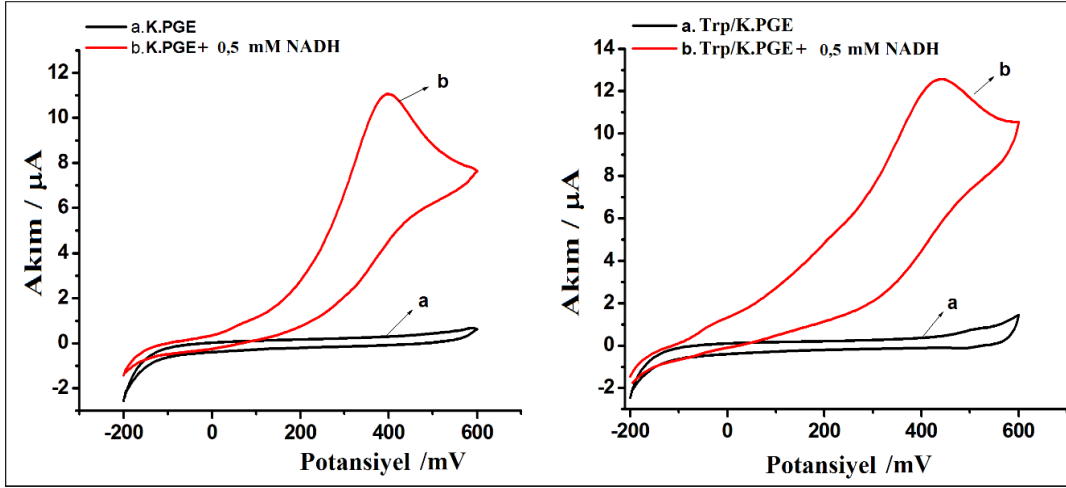
Trp modifiye elektrotlar hazırlanırken de PGE’ler koşulsuz ve koşullandırılmak üzere yine iki farklı şekilde kullanıldı. Hem PGE hem de K.PGE kalem uçları  $10^{-3}$  M Trp çözeltisinde 5, 10, 20, 30 ve 60 dk süreyle adsorpsiyon için bekletildi. Elde edilen uçlar saf su ile yıkandıktan sonra Rotring kalem gövdesine monte edildi ve üçlü elektrot sistemi

içeren elektrokimyasal hücreye yerleştirildi. Trp modifiye PGE'nin (Trp-PGE) ve koşullu PGE'nin (Trp-K.PGE) döngüsel voltammogramları 0,1 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS destek elektrolitinde -0,2 ile +0,6 V potansiyeli arasında iki döngülü voltammogramları NADH'siz ve 0,5 mM NADH'li ortamda 20 mV/s tarama hızı kullanarak alındı. PGE ve 5 dakika  $10^{-3}$  M Trp çözeltisinde adsorpsiyon yoluyla elde edilmiş PGE'nin voltammogramları Şekil 4.23'te verildi.



Şekil 4.23. A) Yalın PGE ve B)Trp/PGE için (5 dk adsorpsiyonla modifiyesi yapılan) a) NADH'siz ve b) 0,5 mM NADH'li ortamda alınan CV'leri (Şekil 4.8/B'deki optimize edilmiş şartlara göre)

Yalın koşulsuz PGE'de NADH'nin yükseltgenmesi, +400 mV'ta gözlenirken, modifiye PGE'de (Trp/PGE) NADH'nin yükseltgenmesi yaklaşık -100 mV'larda başlayıp -50 mV'da küçük bir omuz şeklinde görünse de, NADH'nin büyük bir kısmı +400 mV civarında yükseltgenmiştir. Yani PGE yüzeyinin Trp ile modifiye edilmesi NADH için bir elektrokatalitik etki göstermediğini ifade etmektedir. Şekil 4.24'de ise K.PGE ve 5 dakika  $10^{-3}$  M Trp çözeltisinde adsorpsiyon yoluyla elde edilmiş Trp/K.PGE'nin döngüsel voltammogramları verildi.

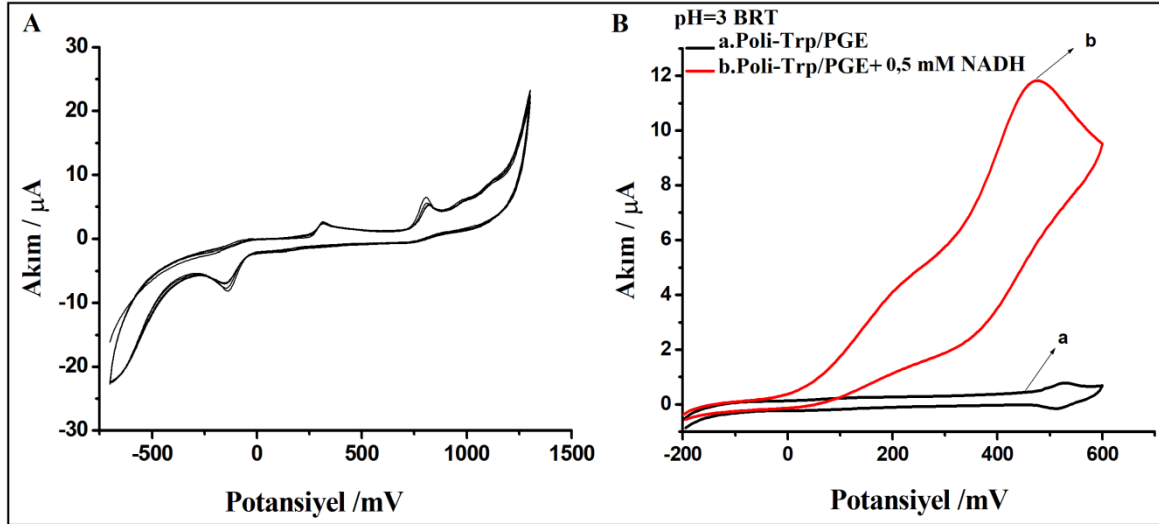


Şekil 4.24. A) K.PGE'nin ve B) Trp/K.PGE'nin (5 dk adsorpsiyonla modifiyesi yapılan) a) NADH'siz ve b) 0,5 mM NADH'li ortamda alınan CV'leri (Şekil 4.8/B'deki optimize edilmiş şartlara göre)

Şekil 4.24'te alınan voltammogramlardan, Trp'nin adsorpsiyonla modifiye edilerek hazırlanan K.PGE'lerin, NADH'nin yükseltgenmesine elektrokatalitik etkisi yani, yalnız elektrota göre NADH'nin yükseltgenme pik potansiyelini daha negatif yöne doğru kaydırmada herhangi bir katkısının olmadığı görüldü.

Adsorpsiyon yoluyla elde edilen modifiye PGE'lerin NADH'ye elektrokatalitik etkisinin olmadığı tespit edilince alternatif olarak modifiye Trp PGE'lerin, elektropolimerizasyon yöntemiyle hazırlanmasına karar verildi. Bu amaçla çeşitli pH aralıklarında (pH=2'den pH=9'a kadar) 0,1M NaNO<sub>3</sub> ihtiva eden BRT çözeltileri kullanıldı. Başlangıçta belirli bir hacimdeki BRT çözeltisinden elektrokimyasal hücreye alındı ve üçlü elektrot sisteminde 2 döngülü destek alındı. Daha sonra, 10<sup>-2</sup> M Trp çözeltisi kullanılarak, destek elektrolitin 10<sup>-3</sup> M Trp, potansiyel aralığın -0,7 ile +1,3 V tarama hızınının 50 mV/s olduğu ardışık 5 döngüsel voltammogramı alındı. Elektropolimerizasyonla modifiye edilen PGE'nin (Poli-Trp/PGE) 0,1 M KCl ihtiva eden 0,1M pH=7,0 PBS destek çözeltisinde NADH'ye yanıtı döngüsel voltammetride incelendi. pH=3'teki BRBS'de 0,1 mM Trp elektropolimerizasyon yoluyla elde edilen modifiye elektrotun 0,5 mM NADH'ye karşı verdiği yanıtın alınan döngüsel voltammogram Şekil 4.25'de verildi. Değişik pH'taki BRT çözeltilerinde 0,1 mM Trp çözeltisi kullanılarak elektropolimerizasyonla modifiye edilen elektrotların döngüsel voltammogramları alındı.

Modifiyesiz PGE ile Poli-Trp/PGE'nin voltammogramları karşılaştırıldığında, modifiye elektrotun NADH'nin yükseltgenme potansiyeline herhangi bir elektrokatalitik katkısının olmadığı ve Yalın PGE ile aynı potansiyel değerinde yanıt verdiği gözlemlendi. Bundan dolayı diğer voltammogramlar burada verilmedi.

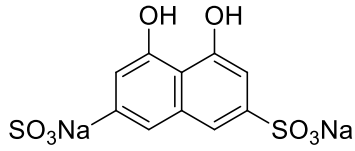


Şekil 4.25 A) 0,1 mM Trp'nin PGE yüzeyinde 5 kez ardışık olarak alınan CV'leri (DE: 0,1 M NaNO<sub>3</sub>'lı pH=3,0 BRT çözeltisi; TH: 50 mV/s). B) A'dan elde edilen Poli-Trp/PGE'nin a) NADH'siz ve b) 0,5 mM NADH'li ortamda alınan CV'leri (DE: 0,1 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS; v: 20 mV/s)

Sonuç itibarıyla Trp kullanılarak hem adsorpsiyon hem de elektropolimerizasyonla modifiye PGE'ler hazırlandı. Ancak her iki yöntemle de hazırlanan modifiye PGE'ler, NADH'nin yükseltgenme potansiyeline iyi bir elektrokatalitik etki göstermediği yani, yalın elektrota göre NADH'nin yükseltgenme pik potansiyelini daha negatif yöne doğru kaydırmada herhangi bir katkısının olmadığı sonucuna varıldı. Bundan dolayı Trp modifiye PGE ile AEA sisteminde NADH'nin amperometrik olarak incelenmesi çalışmaları gerçekleştirilmedi.

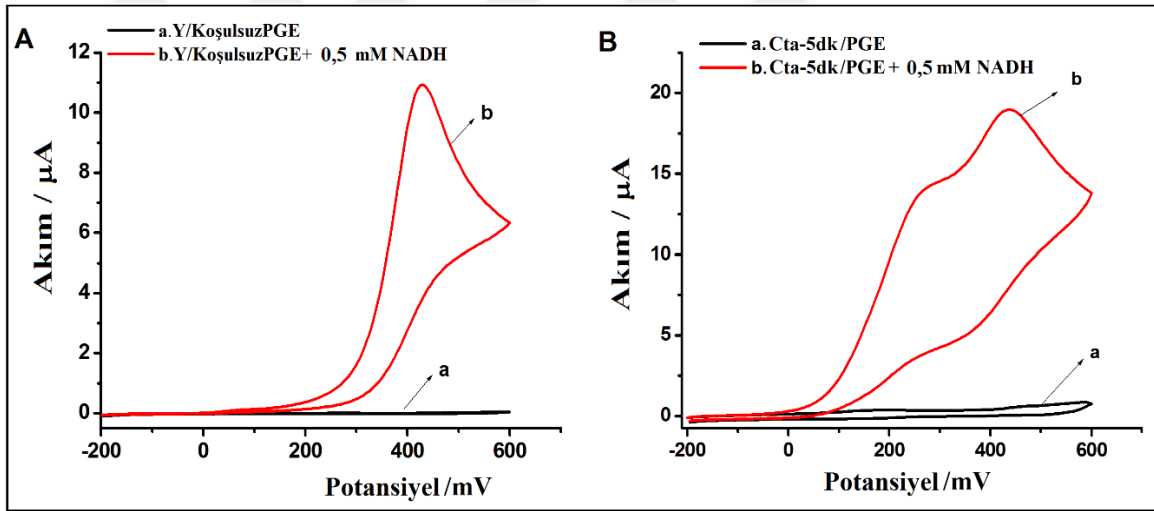
#### 4.1.3. Cta Modifiye Kalem Grafit Elektrotlarla Yapılan Çalışmalar

Bir dihidroksi naftalin disülfonik asit olan Cta, boya üretiminde, formaldehit analizinde bir kromojen oluşturucu ve analitik reaktifler olarak azo türevleri için bir ara madde ve çeşitli analitik kimya uygulamalarında da kullanılan bir reaktiftir (Şekil 4.26) (Sleem ve ark., 2013).



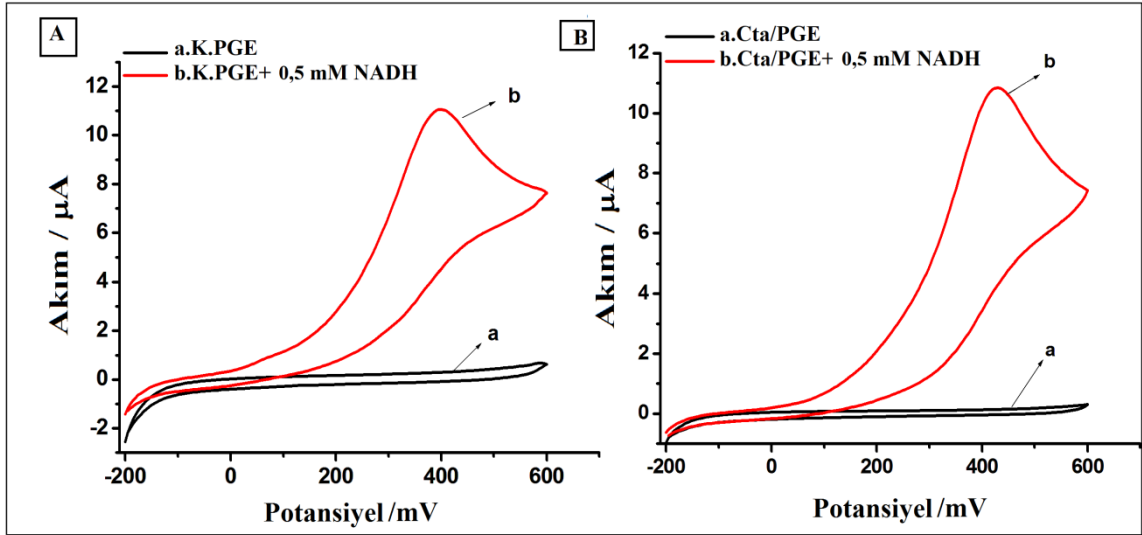
Şekil 4. 26.Cta'nın kimyasal yapısı (Sleem ve ark., 2013)

Cta'da Trp gibi hem PGE hem de K.PGE yüzeylerine adsorpsiyon yoluyla modifiye edildi. Bundan başka ikinci bir alternatif olarak Cta elektropolimerizasyonla PGE yüzeyine modifiye edildi. Trp ile modifiye edilen elektrotların hazırlanmasında uygulanan deneysel adımlar Cta'nın modifikasyonunda da kullanıldı.  $10^{-3}$  M Cta çözeltisinin 5 dakika PGE ve K.PGE yüzeyine adsorpsiyonuyla elde edilmiş modifiye elektrotların (Cta/PGE ve Cta/K.PGE) alınan döngüsel voltammogramları sırasıyla Şekil 4.27 ve 4.28'de verildi.



Şekil 4.27. A) Yalın PGE'nin ve B) Cta/PGE'nin (5 dk adsorpsiyonla modifiyesi yapılan) a) NADH'siz ve b) 0,5 mM NADH'li ortamda alınan CV'leri (Şekil 4.8/B'deki optimize edilmiş şartlara göre)



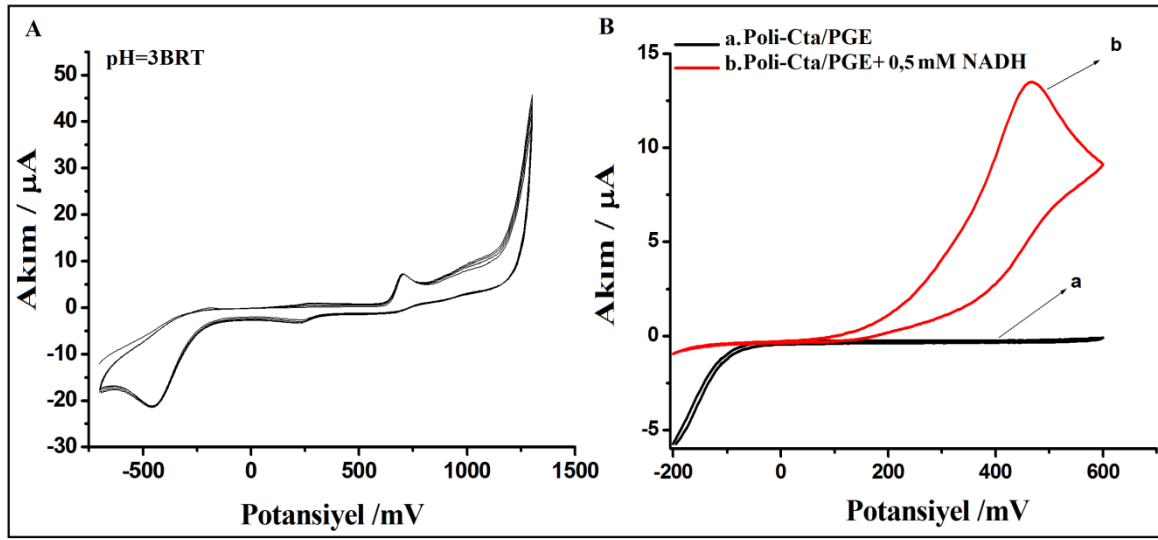


Şekil 4.28. A) K.PGE'nin ve B) Cta/K.PGE'nin (5 dk adsorpsiyonla modifiyesi yapılan) a) NADH'siz ve b) 0,5 mM NADH'li ortamda alınan CV'leri (Şekil 4.8/B'deki optimize edilmiş şartlara göre)

Elde edilen voltammogramlardan da görüldüğü gibi Cta modifiye PGE'de NADH'nin yükseltgenmesinin yaklaşık 0 mV'da başladığı ve Yalın PGE'de +420 mV'da gözlenen yükseltgenme pikinin büyük bir kısmının +250 mV'a kadar kaydığı (Şekil 4.27/B'de büyük bir omuz şeklindeki pikle gözlenmektedir) ancak NADH'nin bir kısmının ise yine Yalın PGE'de olduğu gibi 420-450 mV'da yükseltgendiği tespit edilmiştir. Her ne kadar Trp'ye göre adsorpsiyonla hazırlanan Cta modifiye PGE'ler NADH'nin yükseltgenmesine daha iyi bir elektrokatalitik etki gösterse de, NADH'nin tamamının +250 mV'da yükseltgenmeyip bir kısmının 420-450 mV'da yükseltgendiği gözlemlendi. Bu durumda Cta'nın da NADH'ye çok iyi bir elektrokatalitik etkinlik sağlamadığını göstermektedir. Cta modifiye K.PGE'de ise bir elektrokatalitik yanıtın elde edilmediği gözlemlendi (Şekil 4.28).

Adsorpsiyon yoluyla elde edilen modifiye PGE'lerin NADH'ye elektrokatalitik etkisinin olmadığı tespit edilince başka bir alternatif olarak modifiye PGE'lerin, Cta'nın elektropolimerizasyonu yoluyla hazırlanmasına karar verildi. Cta'nın NADH'ye karşı elektrokatalitik yükseltgenmesi üzerine bir etkisinin olup olmadığını incelemek amacıyla elektropolimerizasyon yoluyla da Cta modifiye PGE'ler hazırlanmıştır. Bu amaçla  $10^{-3}$  M Cta'nın değişik pH'larda hazırlanan ve 0,1 M  $\text{NaNO}_3$  ihtiva eden BRT destek elektrolitlerinde, -0,7 ile +1,3 V potansiyel aralığında 50 mV/s tarama hızıyla 5 döngülü

voltammogramı alınarak PGE yüzeyinde elektropolimerizasyonu gerçekleştirildi. Elektropolimerizasyon yoluyla elde edilen modifiye PGE'nin (Poli-Cta/PGE) 0,1 M KCl ihtiva eden 0,1 M pH=7,0 PBS destek elektrolitinde NADH'ye yanıtı incelendi. 0,1 mM Cta'nın pH=3,0 BRBS'de elektropolimerizasyon yoluyla elde edilen modifiye elektrotun, 0,5 mM NADH'ye karşı verdiği yanıtın alınan döngüsel voltammogram Şekil 4.29'da verildi. Yalnız PGE ve Poli-Cta/PGE'ler ile ilgili voltammogramlar kıyaslandığında modifiye elektrotun NADH'nin yükseltgenmesine iyi bir elektrokatalitik etki sağlamadığı ve yalnız elektrotla aynı potansiyelde yanıt verdiği gözlemlendi.



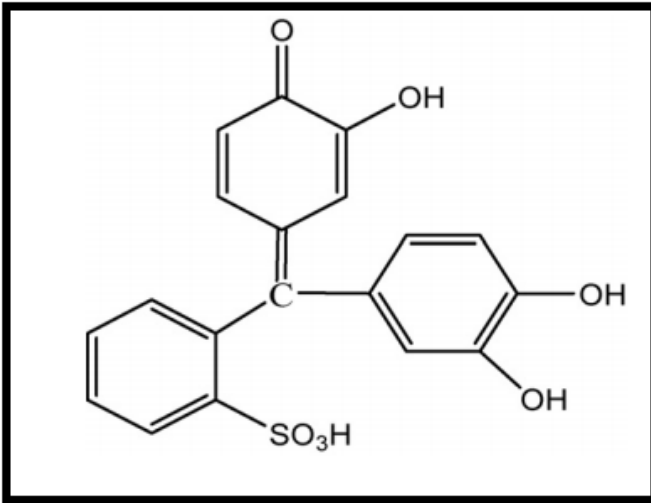
Şekil 4.29. A) 0,1 mM Cta'nın PGE yüzeyinde 5 kez ardışık olarak alınan CV'leri (Şekil 4.25.A' optimize edilmiş şartlara göre). B) A'dan elde edilen Poli-Cta/PGE'nin a) NADH'siz ve b) 0,5 mM NADH'li ortamda alınan CV'leri (Şekil 4.8/B'deki optimize edilmiş şartlara göre)

Sonuç itibarıyla her ne kadar adsorpsiyon yoluyla hazırlanmış Cta modifiye PGE, NADH'nin yükseltgenme potansiyeline kısmen bir elektrokatalitik etki gösterse de, NADH'nin beklenen potansiyelde (250 mV) yükseltgenmesinin tamamı gözlenmediği için modifiye PGE ile AEA sisteminde NADH'ye amperometrik yanıtının incelenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmedi.

#### 4.1.4 Pcv Modifiye PGE'lerle Yapılan Çalışmalar

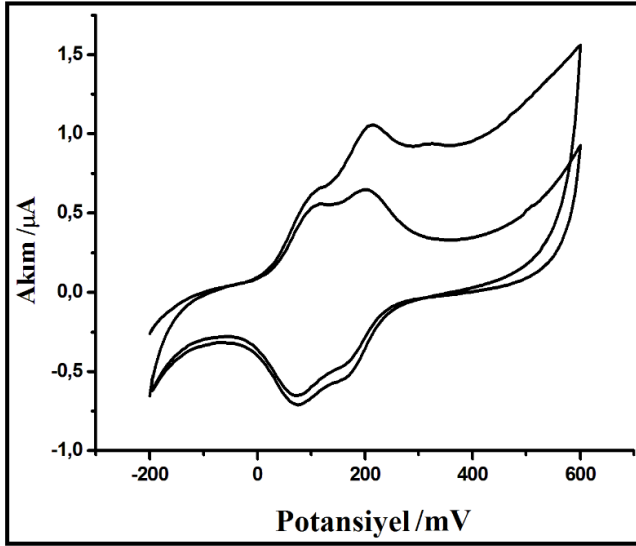
##### 4.1.4.1. Adsorpsiyonla Pcv İle Modifiye PGE Hazırlanması ve NADH'ye Elektrokatalitik Yanıtı

Kimyasal yapısı Şekil 4.30'de verilen Pcv, iki mol pirokatekol ile bir mol o-sülfobenzoik asit anhidritin yoğunlaştırılmasıyla hazırlanan sülfonaftalin boyar bir maddedir. Pcv çeşitli inorganik materyaller üzerine güçlü adsorplayıcı özelliği, aromatik halkanın bitişik karbon atomuna bağlı olarak hidroksil grubu ihtiva eden, katekol ve gallat (galik asit tuzu) grubu materyali olma özelliği göstermektedir. Bu tür bağların inorganik ve organik maddeler arasındaki yük transferini geliştirilmesinde önemli katkıları vardır (Zhu ve ark., 2014b).



Şekil 4.30. Pcv'nin kimyasal yapısı (Sheng ve ark., 2007)

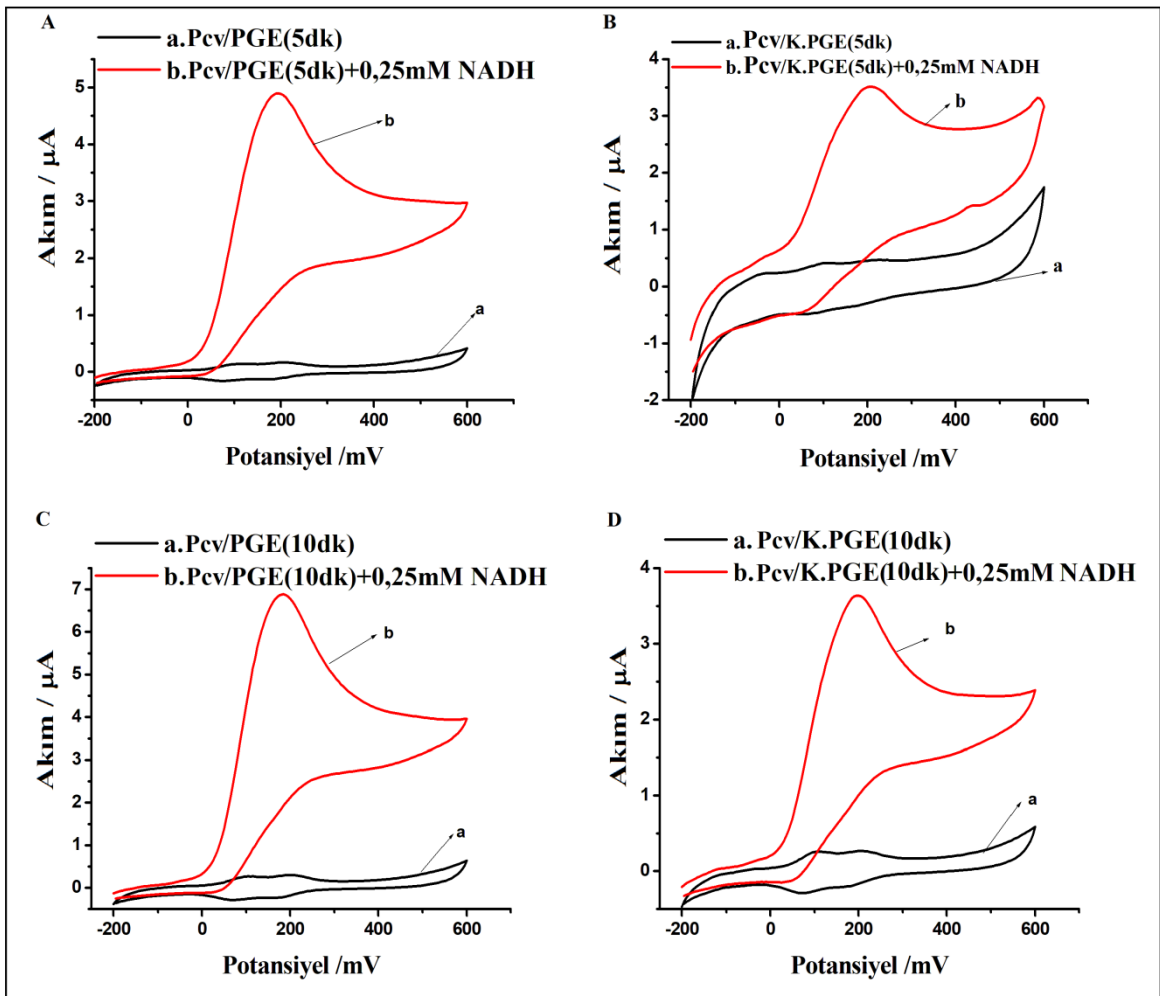
Şekil 4.31'de  $10^{-2}$  M Pcv derişiminde 10 dk. adsorpsiyon yoluyla elde edilen modifiye koşulsuz PGE'nin voltammogramı verilmiştir. Bu voltammogramın anodik yöndeki birinci taramada 110, 215 ve 325 mV'larda pikler gözlenirken, katodik yönde ise 170 ve 75 mV'da pikler görülmektedir. Bu görünen piklerin Pcv'nin PGE yüzeyine iyi bir şekilde adsorbe olduğunu göstermektedir.



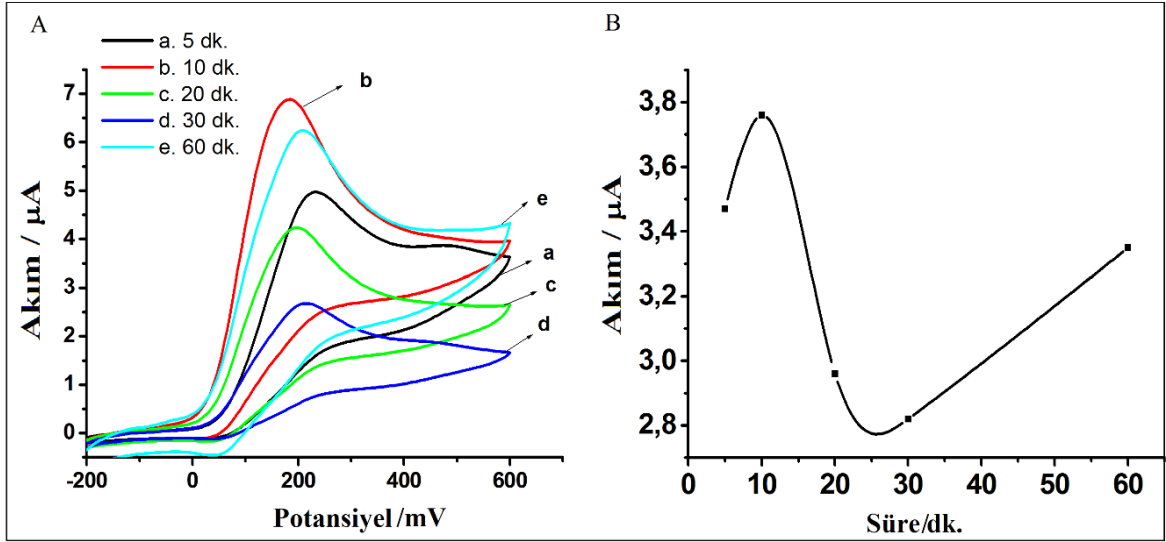
Şekil 4.31. Pcv/PGE'nin (10 dk adsorpsiyon yoluyla elde edilmiş) alınan CV'leri (Şekil 4.8/B'deki optimize edilmiş şartlara göre)

Diğer ASA boyar maddelerinin PGE yüzeyine adsorpsiyonu ile hazırlanan modifiye elektrotların, NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine yanıtları çok iyi olmadığından optimizasyon çalışmalarından bahsedilmemişti. Ancak Pcv/PGE'nin NADH'nin yükseltgenmesine iyi bir elektrokatalitik etki gösterdiği için bu modifiye elektrot için adsorpsiyon süresi ve Pcv derişimi optimizasyonlarına yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Adsorpsiyon yoluyla hem koşullu (Pcv/K.PGE) hem de koşulsuz modifiye PGE'ler (Pcv/PGE) hazırlanırken önce Pcv'nin  $10^{-2}$  M'lık sabit derişiminde en uygun sürenin optimize çalışması yapıldı. Farklı sürelerde hem PGE hem de K.PGE sabit derişimli ( $10^{-2}$  M) Pcv çözeltisinde bekletilerek, modifiye PGE'ler elde edildi. Elde edilen Pcv/PGE ve Pcv/K.PGE'lerin NADH'siz ve 0,25 mM NADH'li ortamda elde edilen döngüsel voltammogramlardan bir kısmı Şekil 4.32 ve 4.33'te verildi. Daha önce Clm modifiye PGE'lerde bahsedildiği gibi Yalın PGE'de yaklaşık 400-450 mV'larda görülen NADH'nin yükseltgenme piki Pcv/PGE'de yaklaşık 180-200 mV'lara kaymış (Şekil 4.31) ve Pcv'nin NADH'nin yükseltgenmesine iyi bir elektrokatalitik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun dışında Pcv/PGE ile Pcv/K.PGE karşılaştırıldığında PGE ile elde edilen modifiye elektrotların K.PGE'ye göre daha iyi sonuç verdiği gözlenmiştir. Bu durum yüzeyin koşullandırılmasıyla elde edilen aktif uçların Pcv'nin adsorpsiyonuna olumsuz bir etki yaptığını göstermektedir. Farklı adsorpsiyon sürelerinde hazırlanan modifiye elektrotların NADH'nin yükseltgenmesine verdiği yanıt kaydedilen döngüsel

voltammogramlardan görülmektedir (Şekil 4.33/A). Modifiye elektrot hazırlanması esnasındaki adsorpsiyon süresine karşılık, elde edilen modifiye elektrotlardan elde edilen NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenme akımına karşı grafiği ise Şekil 4.33/B'de verildi. Bu voltammograma göre 5 dk gibi düşük adsorpsiyon süresinde modifiye elektrotun NADH'ye olan yanıtındaki akımın 10 dk'ya göre daha az olduğu ve 10 dk'dan sonra adsorpsiyon süresinin artmasıyla NADH'nin yükseltgenmesine ait pik akımının azaldığı ve 10 dk adsorpsiyon yoluyla elde edilen modifiye elektrotun en iyi yanıt verdiği tespit edildi. Bundan dolayı bundan sonraki adımlarda  $10^{-2}$  M Pcv derişiminde modifiye PGE'lerin hazırlanmasında en uygun adsorpsiyon süresi 10 dk olarak belirlendi.

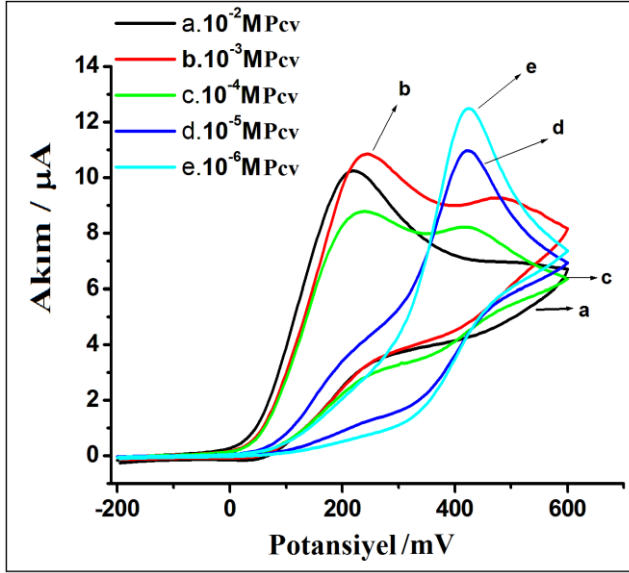


Şekil 4.32. 5 dk (A ve B) ve 10 dk (C ve D) sürelerde  $10^{-2}$  M Pcv içerisinde adsorpsiyon yoluyla elde edilmiş Pcv/PGE'nin (A ve C) ve Pcv/K.PGE'nin (B ve D) a) NADH'siz b) 0,25 mM NADH'li ortamda alınan CV'leri (Şekil 4.8/B'deki optimize edilmiş şartlara göre)



Şekil 4.33. A) Farklı adsorpsiyon sürelerinde  $10^{-2}$  M Pcv çözeltisine daldırılarak hazırlanmış Pcv/PGE'lerin 0,25 mM NADH'li ortamda alınan CV'leri (Şekil 4.8/B'deki optimize edilmiş şartlara göre) B) modifiye elektrotların Adsorpsiyon süresi ile NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinden alınan akım değişim grafiği

Pcv/PGE için en uygun sürenin belirlenmesinden sonra sabit sürede (10 dk.) Pcv'nin derişim optimizasyonu çalışması yapıldı. Farklı derişimlerde modifiye Pcv/PGE'lerden elde edilen döngüsel voltammogramlar Şekil 4.34'da verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi  $10^{-4}$  -  $10^{-6}$  M Pcv çözeltilerinde hazırlanan modifiye elektrotların NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine yanıtının çok iyi olmadığı ve en iyi yanıtın  $10^{-2}$  M Pcv çözeltisi kullanıldığında yüksek pik akımların alındığı gözlemlendi.

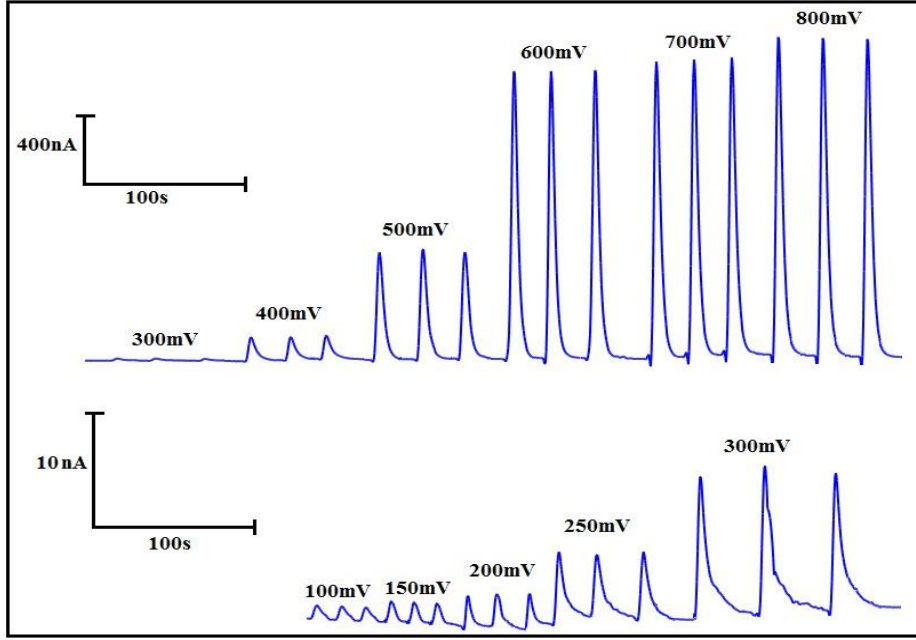


Şekil 4.34. Kalem uçlarının farklı Pcv derişimlerine 10 dk süreyle daldırılmasıyla hazırlanmış Pcv/PGE'lerin ve b) 0,5 mM NADH'li ortamda alınan CV'leri (Şekil 4.8/B'deki optimize edilmiş şartlara göre)

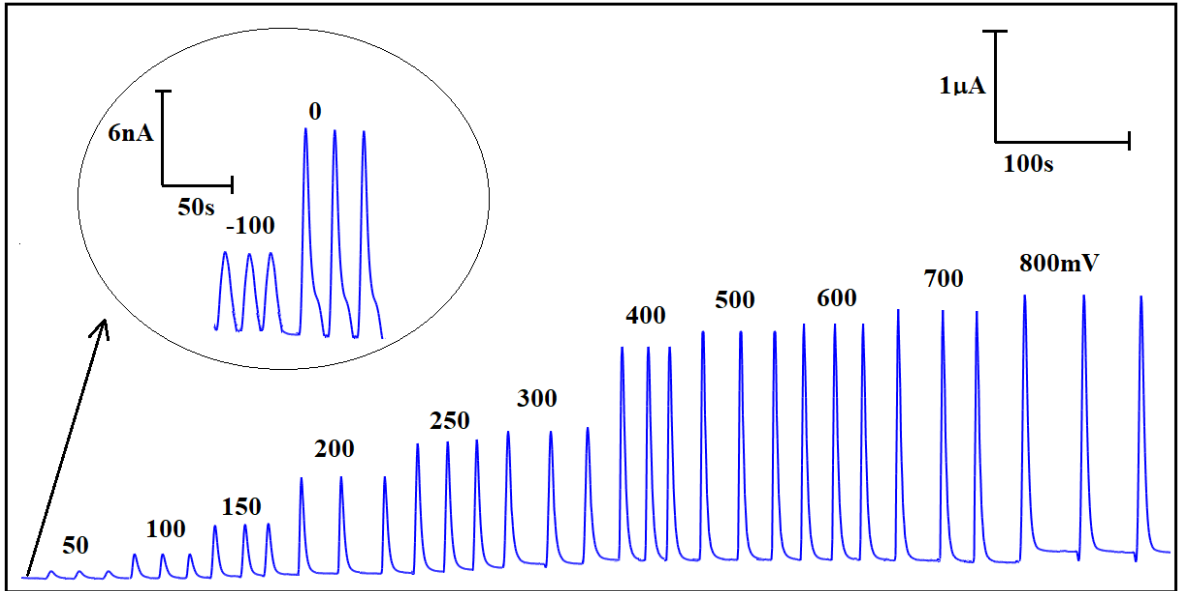
Sonuç itibarıyla bir sonraki adım olan NADH'nin Pcv/PGE'de AE amperometrik tayini çalışmalarında koşullandırılmamış kalem uçlarının  $10^{-2}$  M Pcv çözeltisine 10 dk süreyle daldırılması yoluyla modifiye elektrotların hazırlanmasına karar verildi.

#### 4.1.4.1.1. NADH'nin Pcv/PGE'de Elektrokatalitik Yükseltgenmesine Bağlı AE Amperometrik Tayini

Poli-Clm/PGE'de olduğu gibi Pcv/PGE ile de NADH'nin AEA sisteminde amperometrik çalışmalarına geçmeden önce çalışma potansiyeli ve akış hızı optimize edildi. Örnek yükleme hacmi ve kolon uzunluğu (100  $\mu$ L ve 10 cm) aynı kalmak koşuluyla, 1,5 mL/dk akış hızında  $1 \times 10^{-4}$  M NADH çözeltisinin AEA sistemine enjeksiyonuyla farklı çalışma potansiyel değerlerinde hem Yalın PGE hem de Pcv/PGE için amperometrik akım-zaman eğrileri kaydedildi. Yalın PGE ve Pcv/PGE için edinilen AEamperometrik akım-zaman eğrileri sırasıyla Şekil 4.35 ve Şekil 4.36'da verildi.



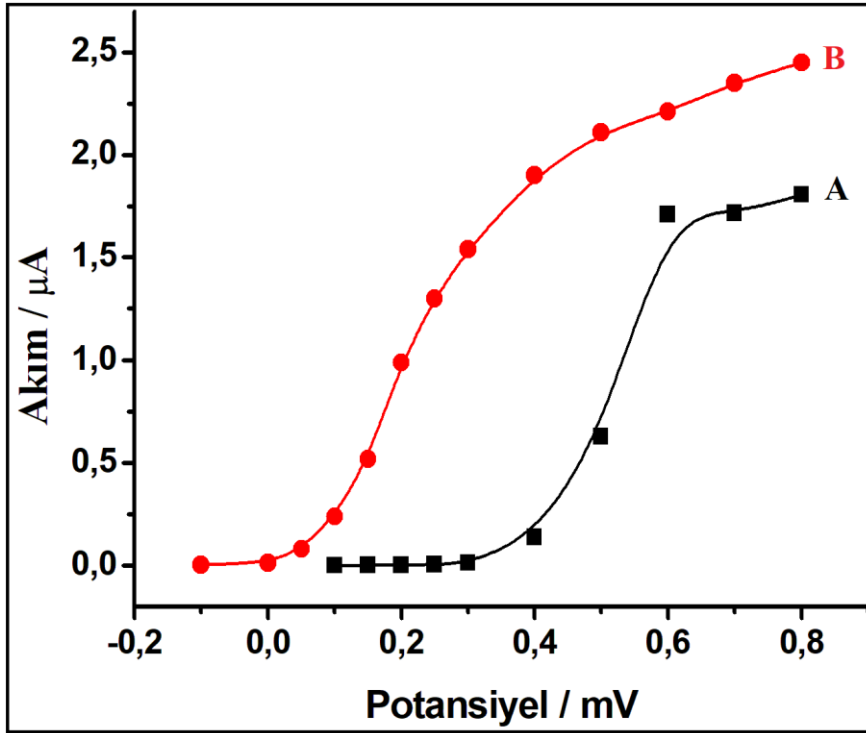
Şekil 4.35. Yalın PGE'nin kullanılmasıyla çeşitli çalışma potansiyellerinde  $1 \times 10^{-4}$  M NADH'nin enjeksiyonuyla edinilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (AH:1,5 mL/dk, TÇ:1,0 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS, ÖYH:100  $\mu$ L, KU:10 cm)



Şekil 4.36. Pcv/PGE kullanılmasıyla çeşitli çalışma potansiyellerinde  $1 \times 10^{-4}$  M NADH'nin enjeksiyonuyla edinilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.35'de optimize edilmiş şartlara göre)

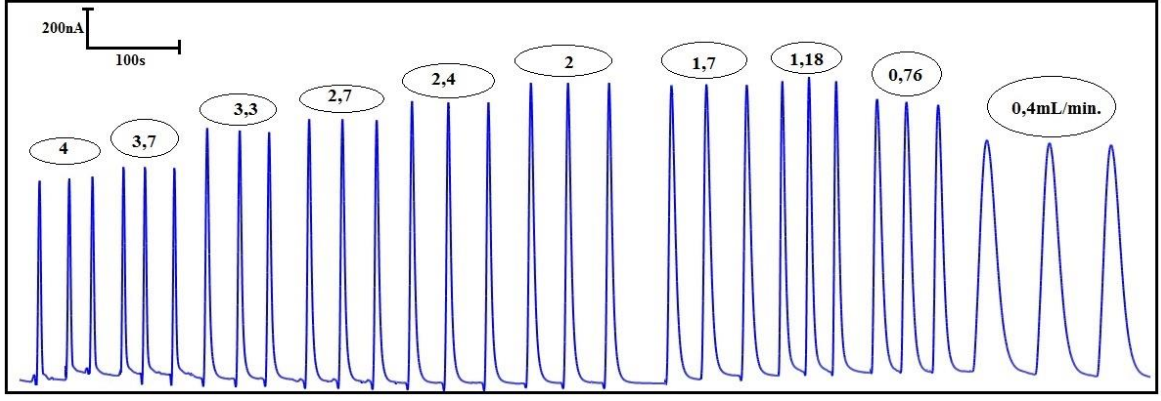


Çalışma potansiyeline karşı, Şekil 4.35 ve Şekil 4.36'daki akım zaman eğrilerinden elde edilen akım değerleri grafiğe geçirildi ve sırasıyla Şekil 4.37 A ve B'de verildi. Şekil 4.37 A'da görüldüğü gibi Yalın PGE'de NADH'nin yükseltgenmesi için elde edilen pik akımı +100 mV'a kadar gözlenebilirken en yüksek akım değeri, yaklaşık +600 mV'dan sonra elde edildi. Pcv/PGE'de ise NADH'nin yükseltgenmesinin modifiye edilmeyen elektrota göre (Yalın PGE'ye) -100 mV gibi oldukça düşük potansiyellere kaydığı ve potansiyel +250 mV'a kadar arttıkça piklerin doğrusal olarak arttığı ve +250 mV'dan sonra ise artışın devam ettiği ve maksimum akımın 500-600 mV civarında olduğu Şekil 4.37B'den görüldü. 500-600 mV değeri NADH'nin yükseltgenmesi çalışmaları açısından oldukça pozitif bir değerdir. Dolayısıyla daha negatif potansiyel değerlerde çalışmak gerektiğinden, +250 mV değeri en uygun çalışma potansiyeli olarak değerlendirildi. Çünkü bu potansiyel değerine kadar artışın doğrusal olarak arttığı ve bu değerden sonra artışın çok az da olsa devam ettiği Şekil 4.37B'den görülmektedir. Bunun dışında Yalın PGE'nin +250 mV'daki akım değeri ile karşılaştırıldığında Pcv/PGE'nin Yalın PGE'ye göre oldukça büyük bir akım değerine sahip olduğu da görülmektedir. Sonuç olarak bir sonraki adım olan akış hızı optimizasyonunda +250 mV çalışma potansiyel değerinin kullanılmasına karar verildi.

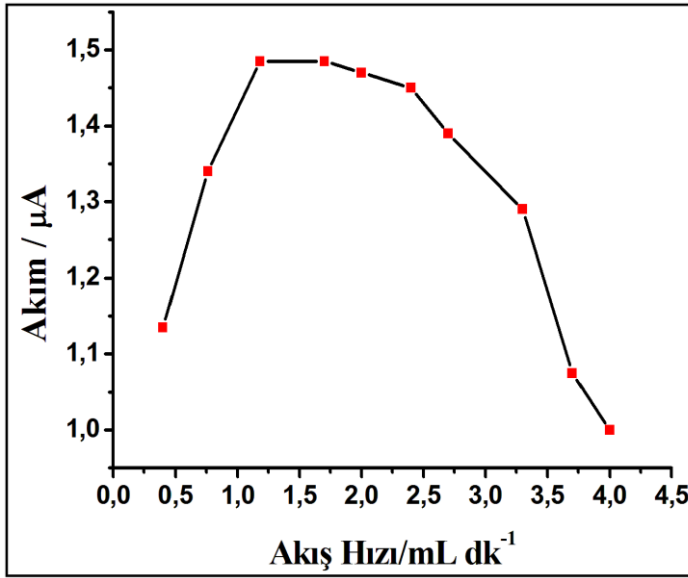


Şekil 4.37. A) Yalın PGE ve B) Pcv/PGE'nin kullanılmasıyla AE amperometrik akım-zaman eğrilerinden, saptanan pik akımlarının çalışma potansiyeli ile değişim grafiği

Benzer şekilde +250 mV'da farklı akış hızlarında  $1 \times 10^{-4}$  M NADH çözeltisinin AEA sistemine enjeksiyonuyla Pcv/PGE için amperometrik akıma karşı zaman eğrileri kaydedildi (Şekil 4.38). Akış hızına karşı NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenme akım grafiği Şekil 4.39'da verildi. Her iki şekilden görüldüğü gibi 1,18 mL/dk akış hızından önceki akış hızlarında yayvan ve daha düşük pik akımları elde edilmiş, 1,18 ile 2 mL/dk arası çok fazla değişim olmamış ve 2 mL/dk'dan sonra ise pik akımında azalma gözlenmiştir. Bu azalmanın nedeni daha önce Poli-Clm/PGE'de bahsedildiği gibi yüksek akış hızının kullanılmasıyla, modifiye elektrot yüzeyinde bulunan mediyatör ile NADH'nin elektrokatalitik tepkimesi için gereken zamanın verilmemesine ve yüksek akış hızı değerlerinde modifiye elektrotun yüzeyindeki polimer filminin bozunmasına bağlanabilir.

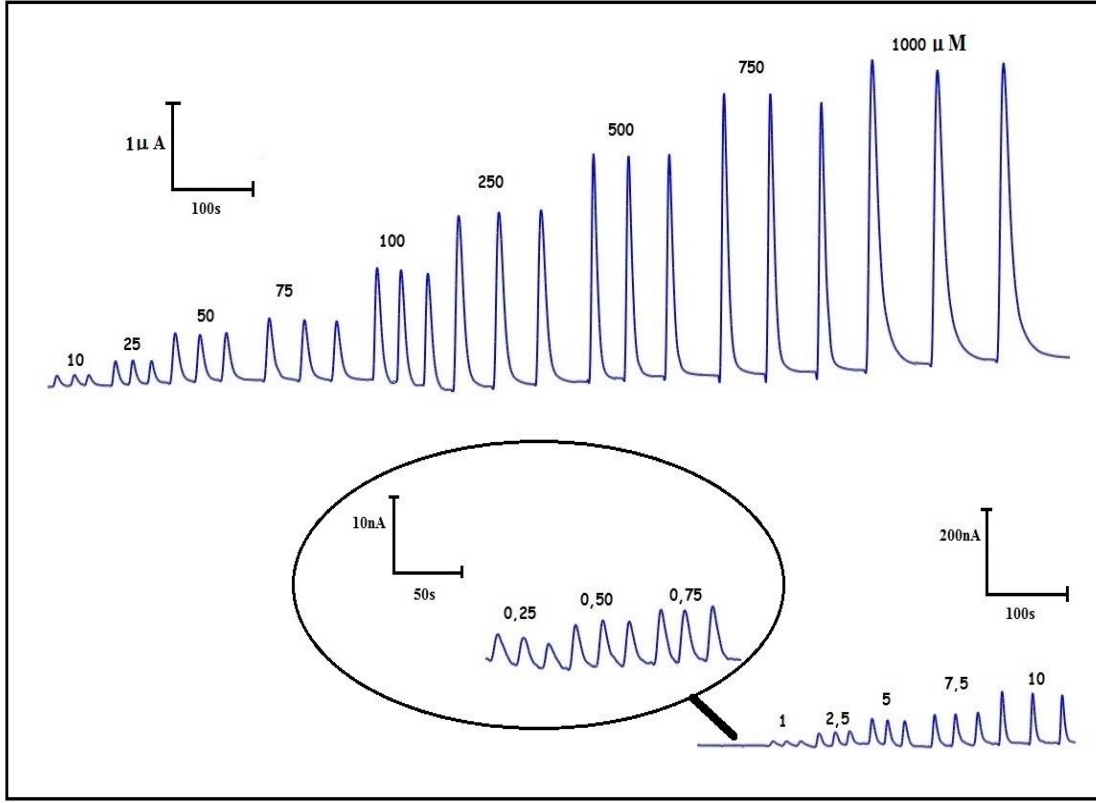


Şekil 4.38. Pcv/PGE'nin kullanılmasıyla çeşitli akış hızlarında  $1 \times 10^{-4}$  M NADH'nin enjeksiyonu ile elde edilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (ÇP:+250 mV TÇ:1,0M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS, ÖYH:100  $\mu$ L)



Şekil 4.39. Pcv/PGE kullanılmasıyla AE amperometrik akım-zaman eğrilerinden saptanan akımların akış hızıyla değişim grafiği

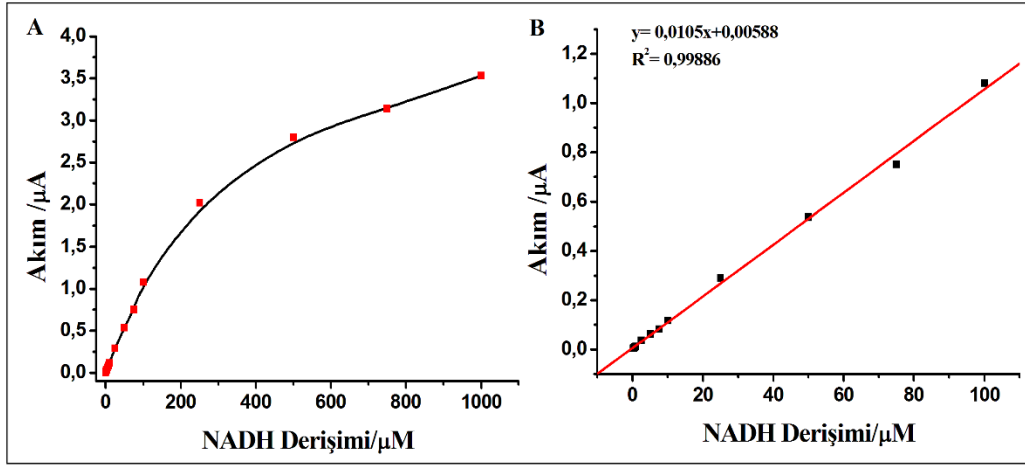
Sonuç itibarıyla bir sonraki adım olan artan NADH'nin derişimine bağlı AE amperometrik akım-zaman eğrilerinin kaydedilmesinde, diğer parametreler sabit kalmak şartıyla (örnek yükleme hacmi:100  $\mu$ L ve kolon uzunluğu: 10 cm) +250 mV ve 1,18 mL/dk'nın en uygun değerler olarak kullanılmasına karar verildi. yalnız PGE için NADH'nin artan derişimine karşı elde edilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri daha önceki voltammogramlardan Şekil 4.17 ile gösterildi. Pcv/PGE için elde edilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri ise Şekil 4.40'de verildi.



Şekil 4.40. Pcv/PGE’de artan NADH derişimine bağlı AE amperometrik akım-zaman eğrileri (TÇ: 1,0 M KCl ihtiva eden 0,1 M pH=7,0 fosfat tamponu; ÇP: +250 mV; AH: 1,18 mL/dk, ÖYH: 100 µL; KU: 10 cm)

Şekil 4.19’da Yalın PGE’den elde edilen ve artan NADH derişimine karşı pik akım değişim grafiği ile birlikte kalibrasyon grafiği verilmişti. Bu kalibrasyon grafiğinden görüldüğü gibi Yalın PGE’nin doğrusal aralığı  $2,5 \times 10^{-5}$ – $5,0 \times 10^{-4}$  M NADH derişimi olarak elde edildi. Pcv/PGE için ise artan NADH derişimine bağlı pik akım değişimi ve kalibrasyon grafiği Şekil 4.41’de verildi. Kalibrasyon grafiğinden görüldüğü gibi doğrusal kalibrasyon aralığınının  $2,5 \times 10^{-7}$ – $1 \times 10^{-4}$  M NADH arasında olduğu tespit edildi. Bu iki elektrot için kalibrasyon grafiklerinden elde edilen doğrusallıkları sırasıyla Yalın PGE ve Pcv/PGE için  $I(\mu A) = 5,0 \times 10^{-5} C(M) + 9,0 \times 10^{-4}$   $R^2 = 0,99863$   $I(\mu A) = 0,0105 C(M) + 0,0059$ ,  $R^2 = 0,9989$  denklemleriyle ifade edildi. Denklemden I pik akımı, C ise NADH’nin derişimidir. Bu denklemlerdeki eğimler kıyaslandığında Pcv/PGE’ye ait saptanan doğrunun eğiminin ( $1,05 \times 10^{-2}$ ), Yalın PGE’de saptanan doğrunun eğiminden ( $5,0 \times 10^{-5}$ )

yaklaşık 210 kat daha büyük olduğu görüldü ve duyarlık elektrot yüzeyinin Pcv ile modifiye edilmesi sonucu arttığı gözlemlendi.



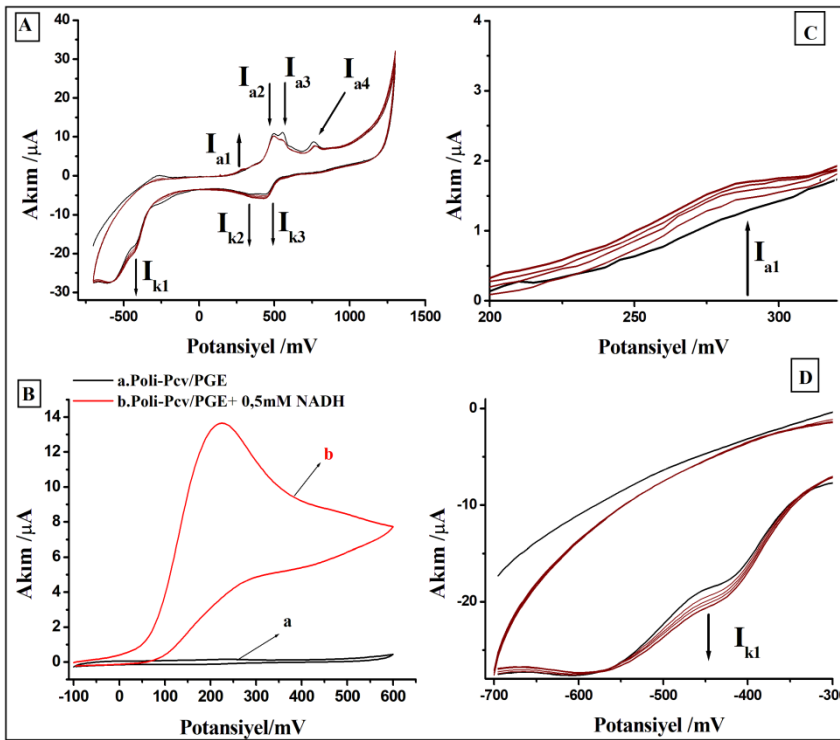
Şekil 4.41. Pcv/PGE'nin kullanılmasıyla optimize edilmiş şartlarda AE amperometrik yöntemle edinilen NADH derişimine bağılı pik akımlarının değişim (A) ve kalibrasyon grafiği (B)

Bu alışmada Pcv/PGE kullanarak NADH'ye elektrokatalitik tayini AEA sisteminde ilk defa gerçekleştirildi. Daha önceden belirtildiği gibi doğrusal kalibrasyon aralığı 0,25 µM ile 100 µM NADH ve gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) sırasıyla 0,085 µM ve 0,285 µM olarak hesaplandı. LOD ve LOQ hesaplanırken taşıyıcı zeltinin kendisinden sisteme en az 10 kez enjekte edilerek kr sinyalleri elde edildi ve bu kr sinyallerin standart sapması(s) hesaplandıktan sonra  $3s_{kr}/m$ 'den LOD ve  $10s_{kr}/m$ 'den de LOQ değerleri hesaplandı.

#### 4.1.4.1.2. Elektropolimerizasyon Yöntemiyle Pcv Modifiye PGE'nin Hazırlanması ve NADH'ye Elektrokatalitik Yanıtı

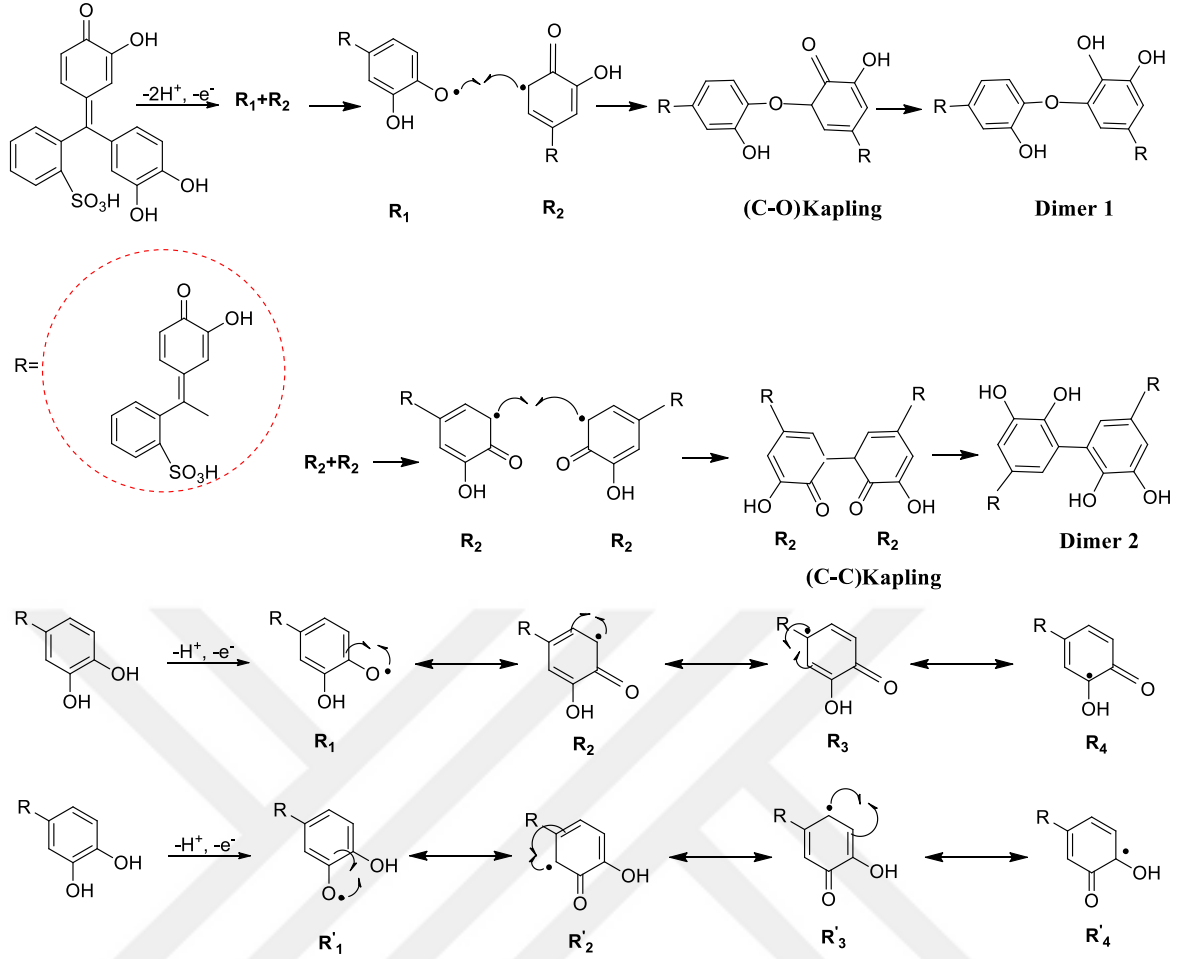
Adsorpsiyon yoluyla elde edilen modifiye elektrotların NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine iyi yanıt verdi. Ancak karşılaştırma yapmak amacıyla Pcv modifiye PGE'ler aynı zamanda elektropolimerizasyon yoluyla da elde edilip NADH'nin yükseltgenmesine yanıtı döngüsel voltammogramlar kaydedilerek incelendi. Bu amaçla, PGE'de 0,1 M KCl ihtiva eden farklı pH'larda BRT zeltileri destek elektrolitlerinde 0,1 mM Pcv'nin, kez ardışık olarak 5 döngü sayılı döngüsel voltammogramlarının alınmasıyla Poli-Pcv/PGE modifiye elektrot hazırlandı. Hazırlanan Poli-Pcv/PGE'lerin NADH'nin

yükseltgenmesine verdikleri elektrokatalitik yanıt hem NADH yokken ve hem de NADH varlığında döngüsel voltammogramları alınarak incelendi ve en iyi yanıtın alındığı döngüsel voltammogramlar Şekil 4.42’de verildi. pH=3,0 BRT çözeltisinin destek elektrolitinde 0,1 mM Pcv’nin PGE yüzeyinde ardışık 5 döngülü döngüsel voltammogramı Şekil 4.42 A ile gösterildi. Poli-Pcv/PGE’nin NADH’sız ve 0,5 mM NADH ortamındaki döngüsel voltammogramları ise Şekil 4.42 B gösterildi. Şekilden görüldüğü gibi Yalnız PGE’de yaklaşık 400-450 mV’larda gözlenen NADH yükseltgenme piki Poli-Pcv/PGE ile keskin bir pik şeklinde 200 mV’a kaymıştır. Bu da polimerik Pcv’nin de NADH’nin yükseltgenmesine iyi bir elektrokatalitik etkinlik gösterdiğini yansıtmaktadır.



Şekil 4.42. A) 0,1 mM Pcv’nin PGE yüzeyinde 5 kez ardışık olarak alınan (AH:1,5 mL/dk, TÇ:1,0 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS, ÖYH:100  $\mu$ L, KU:10 cm) CV’leri (Şekil 4.35’teki optimize edilmiş şartlara göre). B) A’dan elde edilen Poli-Pcv/PGE’nin a) NADH yokluğunda ve b) 0,5 mM NADH varlığındaki CV’leri (DE: 0,1 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS; v: 20 mV/s) C) ve D) döngü sayısının artmasıyla  $I_{a1}/I_{a2}$ ’nin değişimi

Şekil 4.42/A'da ki voltammograma göre anodik yönde yapılan ilk taramada 495 mV'da, 555 mV'ta tersinir iki pik ve 760 mV'da tersinmez bir pik, katodik yönde ise 450 mV'da, 330 mV'ta ve -415 mV'da üç pik gözlenmiştir. 495 ve 555 mV'ta görülen iki yükseltgenme pikleri Pcv monomerinin oluşumuna ve Pcv halkasındaki hidrokinonun kinona yükseltgenmesiyle ilgilidir. Yine ilk döngüde katodik yönde 450 mV'da ve 330 mV'da görülen indirgenme piklerinin ise kinonun tekrar indirgenmesine ait olabilir. İkinci döngüde ise 760 mV'da gözlenen ve giderek azalan anodik pikin monomere ait katyonik radikal oluşumuna bağlı olduğu yorumlanabilir. Yine ikinci döngüde giderek artan 275 mV'da anodik yeni bir pikin oluştuğu -415 mV'daki katodik pikin ise -430 mV'a kaydığı gözlenmektedir. Bu durum PGE yüzeyinin Pcv'nin elektropolimerizasyonu ile modifiye olduğunu göstermektedir. Ayrıca PGE'nin Pcv ile modifiye edilmesi elektrot ile analit arasında elektron transfer hızını artırarak NADH'a karşı elektrokatalitik etki sağladığı sonucuna varılabilir. Şekil 4.43'te verilen elektropolimerizasyon mekanizmasına göre; Pcv'deki orto-hidrokinon konumundaki hidroksil grupları  $1H^+$  ve  $1e^-$  vermesiyle kinon radikallerine dönüşmektedir. Oluşan radikal  $\pi$ -bağları aracılığı ile halkaya delokalize olarak kararlı kılınmaktadır. Oluşan iki radikalın birleşmesiyle ya C-O etkileşimi (dimerizasyon-1) ya da C=C (dimerizasyon-2) üzerinden bağlanarak dimerleşme ve döngü sayısının artmasıyla da polimerleşme gerçekleşmektedir. Bunun dışında " $R_1+R_2$ ,  $R_2+R_2$ ,  $R_1'+R_2'$  ve  $R_2'+R_2'$ " radikallerinin de birbirleriyle birleşmeleri söz konusu olabilir.



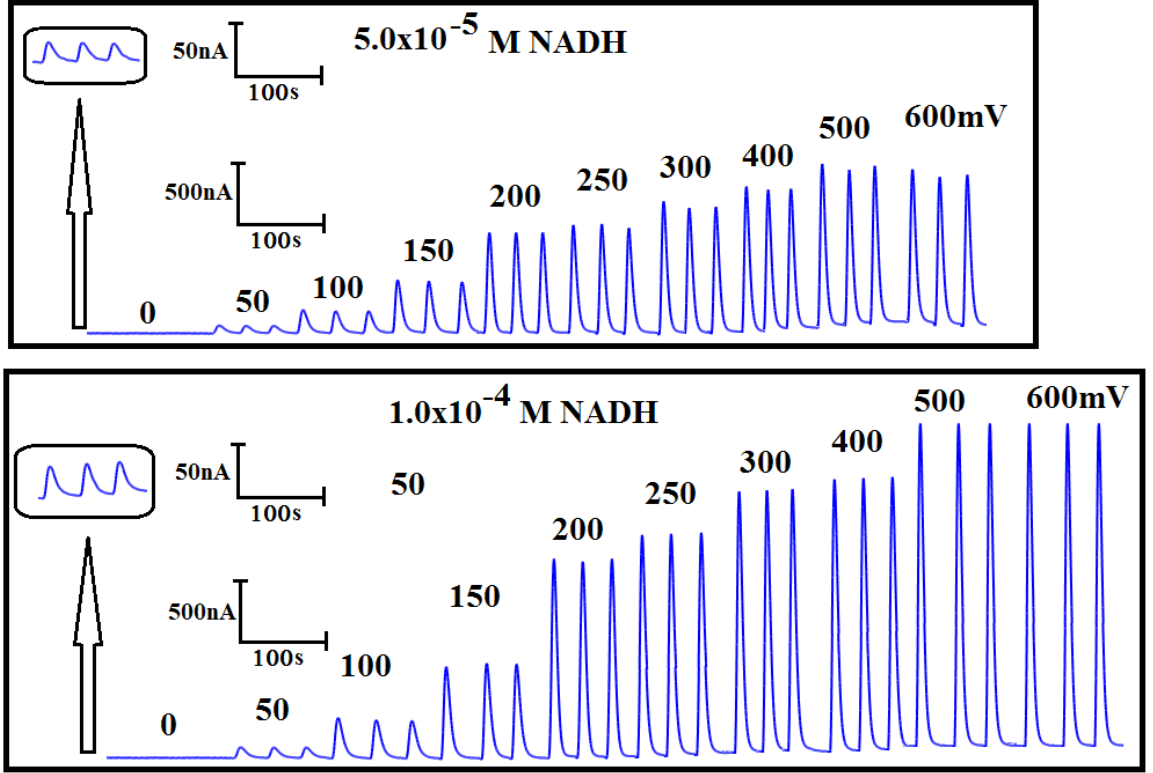
Şekil 4. 43. Pcv'nin elektropolimerizasyon mekanizması

#### 4.1.4.2.1. NADH'nin Poli-Pcv/PGE'de Elektrokatalitik Yükseltgenmesine Bağlı AE Amperometrik Tayini

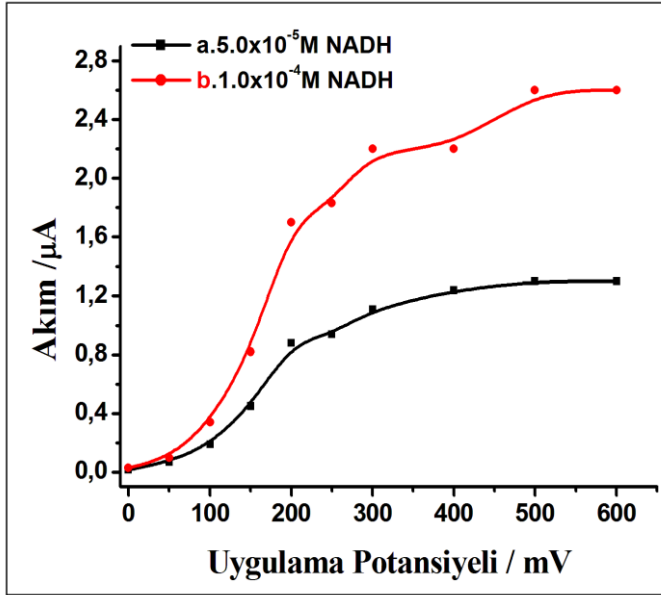
Daha önce Poli-Clm/PGE'de yapılan çalışmalara benzer şekilde, 100 µL örnek hacmi, 10 cm kolon uzunluğu ve 1,5 mL/dk akış hızı sabit kalmak koşuluyla  $5 \times 10^{-5}$  M ve  $1 \times 10^{-4}$  NADH'nin AEA sistemine enjeksiyonuyla Poli-Pcv/PGE'nin farklı çalışma potansiyellerinde amperometrik akım-zaman eğrileri kaydedildi (Şekil 4.44). Şekilde görüldüğü gibi her iki derişim için oldukça düşük bir potansiyelde (0 mV) sinyalin elde edildiği gözlemlendi. Şekil 4.44'te elde edilen akım zaman eğrilerinden akım değerleri her iki derişim için hesaplanmış ve çalışma potansiyeline karşı elde edilen eğri Şekil 4.45'de verilmiştir. Poli-Pcv/PGE kullanıldığında NADH'nin yükseltgenmesinin 0 mV gibi oldukça düşük potansiyellerde çok azda olsa görüldüğü potansiyel 200 mV'a kadar arttıkça piklerin doğrusal olarak arttığı ve 200 mV'dan sonra ise artışın azda olsa devam ettiği



Şekil 4.45'den görülmektedir. Böylece Poli-Pcv/PGE'nin NADH'ye iyi bir elektrokatalitik etki gösterdiği sonucuna varıldı.

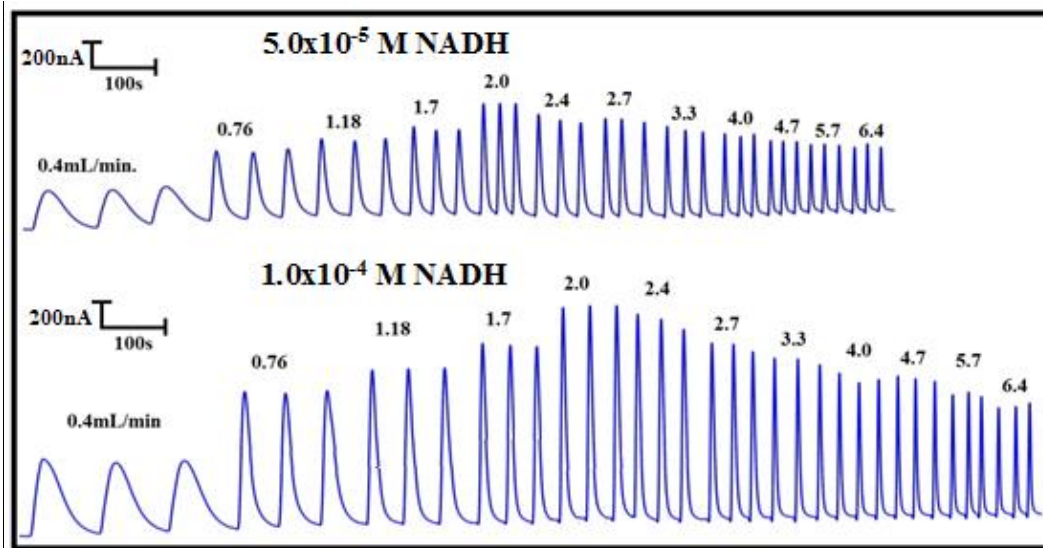


Şekil 4.44. Poli-Pcv/PGE kullanılmasıyla çeşitli çalışma potansiyellerinde  $5 \times 10^{-5}$  ve  $1 \times 10^{-4}$  M NADH'nin enjeksiyonuyla edinilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (AH:2,0 mL/dk, TÇ:1,0 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS, ÖYH:100  $\mu$ L KU:10 cm)



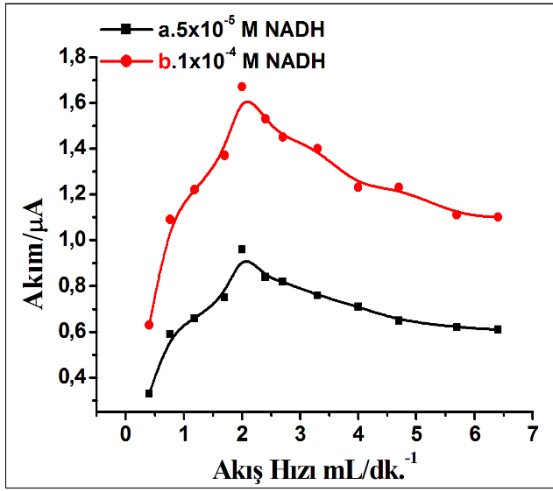
Şekil 4.45. Poli-Pcv/PGE'nin AE amperometrik akım-zaman eğrilerinden,  $5 \times 10^{-5}$  ve  $1 \times 10^{-4}$  M NADH için saptanan pik akımlarının çalışma potansiyeli ile değişim grafiği

Akış hızı da benzer şekilde,  $5 \times 10^{-5}$  ve  $1 \times 10^{-4}$  M NADH çözeltilerinin AEA sistemine enjeksiyonuyla Poli-Pcv/PGE'nin +200 mV'da farklı akış hızlarında akım-zaman eğrilerinin kaydedilmesiyle (Şekil 4.46) optimize edildi.



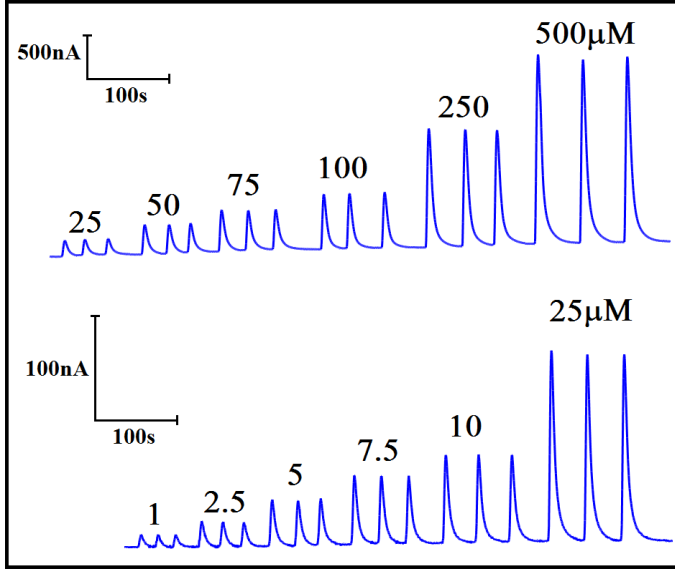
Şekil 4.46. Poli-Pcv/PGE kullanılarak farklı akış hızlarında  $5 \times 10^{-5}$  ve  $1 \times 10^{-4}$  M NADH'nin enjeksiyonu ile elde edilen AE amperometrik akım zaman eğrileri (ÇP:200mV , TÇ:1,0 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS, ÖYH:100 μL KU:10 cm)

Poli-Pcv/PGE kullanarak  $5 \times 10^{-5}$  ve  $1 \times 10^{-4}$  M NADH için elde edilen AE amperometrik akım-zaman eğrilerinden hesaplanan amperometrik akımların akış hızıyla değişim grafiği Şekil 4.47’de gösterildi. Her iki derişimde de maksimum pik akımları 2,0 mL/dk olduğu görülmektedir ve dolayısıyla bu akış hızı değeri Poli-Pcv/PGE için en uygun değer olarak seçildi.



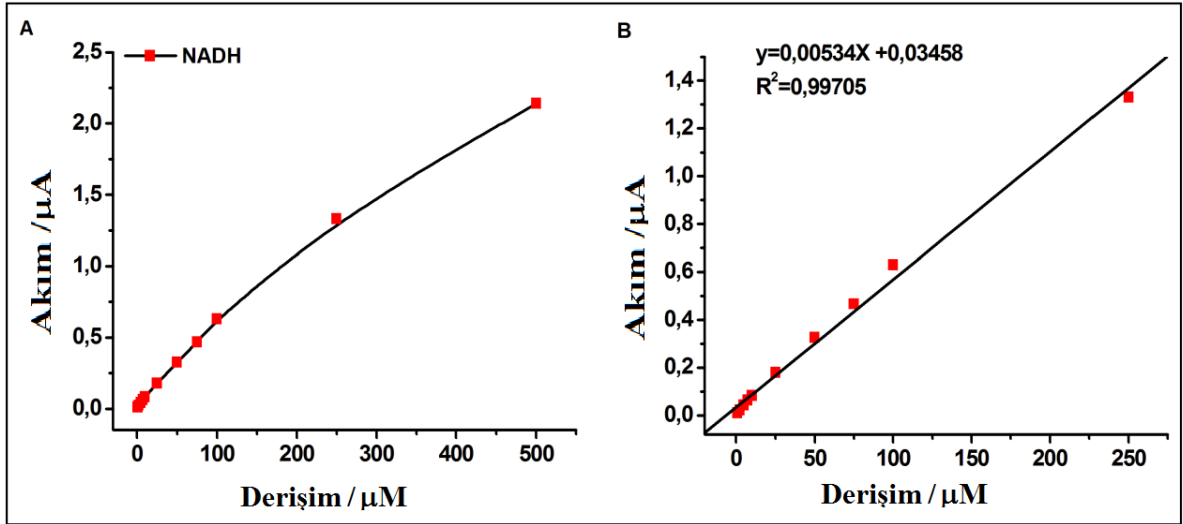
Şekil 4.47. Poli-Pcv/PGE'nin kullanılarak  $5 \times 10^{-5}$  ve  $1 \times 10^{-4}$  M NADH için edinilen AE amperometrik akım-zaman eğrilerinden saptanan akımların akış hızıyla değişim grafiği

Kolon uzunluğu ve örnek yükleme hacmi aynı olmak kaydıyla, optimize edilen koşullar altında (+200 mV ve 2 mL/dk) Poli-Pcv/PGE'de artan NADH derişimine bağlı AE amperometrik akım-zaman eğrileri kaydedildi ve Şekil 4.48 ile gösterildi.



Şekil 4.48. Poli-Pcv/PGE’de artan NADH derişimine bağlı AE amperometrik akım-zaman eğrileri (ÇP:200mV, AH: 2,0 mL/dk, TÇ:1,0 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS, ÖYH:100 μL KU:10 cm)

Poli-Pcv/PGE için artan NADH derişimine bağlı pik akım değişimi ve kalibrasyon grafiği Şekil 4.49’da verildi ve doğrusal kalibrasyon aralığı  $1,0 \times 10^{-6} - 2,5 \times 10^{-4}$  M NADH olarak elde edildi. Daha önce yalın PGE için verilen kalibrasyon eğrisinin doğrusallığı 25 ile 500 μM arasında belirlenmiş olup doğru denklemi ise  $I(\mu A) = 5,0 \times 10^{-5} C(\mu M) + 9,0 \times 10^{-4}$   $R^2 = 0,99863$  olarak ifade edilmişti (Şekil 4.19). Poli-Pcv/PGE için ise  $I(\mu A) = 0,0053 C(\mu M) + 0,035$ ,  $R^2=0,9971$  doğrusal denklemi elde edildi. Denklemden I pik akımı, C ise NADH’nin derişimidir. Yalın PGE’den elde edilen eğimle kıyaslandığında Poli-Pcv/PGE için elde edilen doğrunun eğimi ( $5,34 \times 10^{-3}$ ), Yalın PGE’de elde edilen doğrunun eğiminden ( $5,0 \times 10^{-5}$ ) yaklaşık 106,8 kat daha büyük olduğu saptandı ve duyarlık elektrot yüzeyinin Poli-Pcv ile modifiye edilmesi sonucu arttığı gözlemlendi.



Şekil 4.49. Poli-Pcv/PGE kullanılmasıyla optimize edilmiş şartlarda AE amperometrik yöntemle edinilen NADH derişimine bağı pik akımlarının değişim (A) ve kalibrasyon grafiği (B)

AE amperometrik çalışmalarda NADH için Poli-Clm/PGE, Pcv/PGE ve Poli-Pcv/PGE; kullanılarak en uygun koşullar belirlendi, her bir elektrotta NADH'nin derişimine bağı AE amperometrik akım-zaman eğrileri elde edildi ve elde edilen analitiksel parametreler izelge 4.1'de verildi. Tablolardan grldği gibi modifiye edilen PGE'lerden elde edilen kalibrasyon eğrilerinin eğimi, Yalın PGE ile elde edilen doğrusal denklemin eğiminden önemli derecede büyük olduğu tespit edildi. Yani PGE elektrotların aromatik sülfonik boyar maddelerle modifiye edilmesinden sonra duyarlığın arttığı gözlendi.

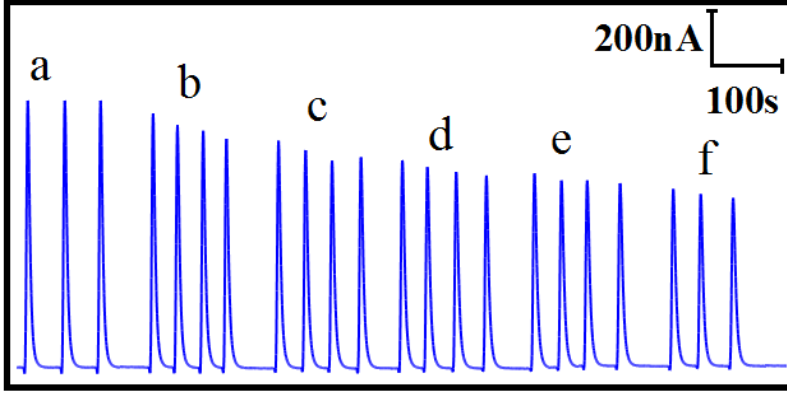
Çizelge 4.1. ASA modifiye PGE'lerle NADH'nin AE amperometrik tayini için elde edilen analitiksel parametreler

Elektrot	ÇP	DA / µM	LOD/LOQ (µM)	Doğru denklemi
Yalın PGE	+250 mV	25-500	-	$I(\mu A) = 5,0 \times 10^{-5} C(\mu M) + 9,0 \times 10^{-4}$ $R^2 = 0,99863$
Poli-Clm/PGE	+250 mV	0,1-100	0,03/0,086	$I(\mu A) = 0,012 C(\mu M) + 0,0028$ $R^2 = 0,9996$
Pcv/PGE	+250 mV	0,25-100	0,085	$I(\mu A) = 0,0105 C(\mu M) + 0,0059$ $R^2 = 0,99789$
Poli-Pcv/PGE	+200 mV	1-250	0,32/1,08	$I(\mu A) = 0,0053 C(\mu M) + 0,0035$ $R^2 = 0,9971$

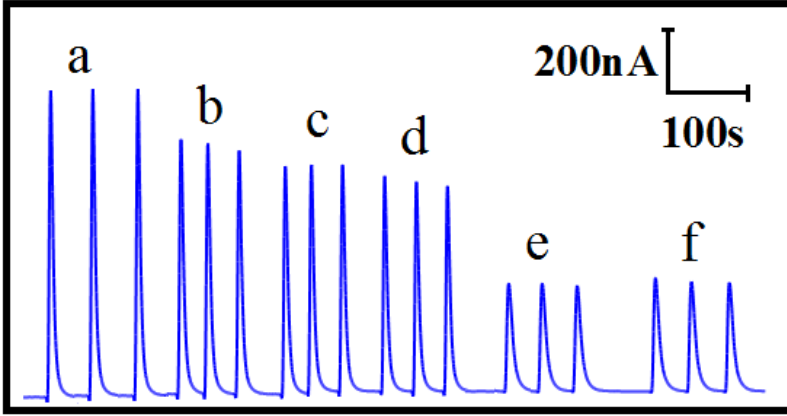
ÇP: Çalışma Potansiyeli; DA: Doğrusal aralık; LOD: Gözlenebilme sınırı LOQ: Tayin sınırı

#### 4.1.4.2.2. Girişim Etkisi Yapabilecek Maddelerin İncelenmesi

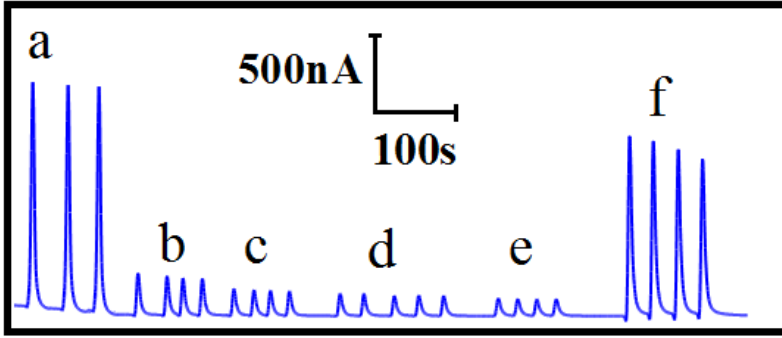
Bir sonraki adım olan biyosensör çalışmalarında görüleceği gibi biyosensöre en kararlı yanıt veren Poli-Pcv/PGE olduğundan, girişim çalışmaları sadece Poli-Pcv/PGE için denendi. Bu amaçla,  $10^{-4}$  M NADH içeren Glikoz, L-glutamik asit, sitrik asit, salisilik asit, ürik asit (UA) dopamin (DA), sisteamin ve L-askorbik asidin (AA) farklı derişim oranlarında (1:1, 1:2, 1:5 ve 1:10) çözeltileri hazırlanarak optimize edilen koşullar altında bu çözeltilerin AEA sistemine enjeksiyonuyla Poli-Pcv/PGE'de girişim çalışmalarına ait FI amperometrik akım zaman eğrileri kaydedilmiş ve bu eğriler Şekil 4.50'den Şekil 4.55'e kadar verilmiştir. Bu AE amperomogramlara göre sitrik asit, UA negatif yönde yani NADH'nin pik akımını azaltma yönünde girişim yaparken, DA ve AA pozitif girişim yani NADH'nin pik akımını artırma yönünde girişim yapmaktadır. Glikoz ve glutamik asit ile bir girişim yapmadığını yorumlayabiliriz.



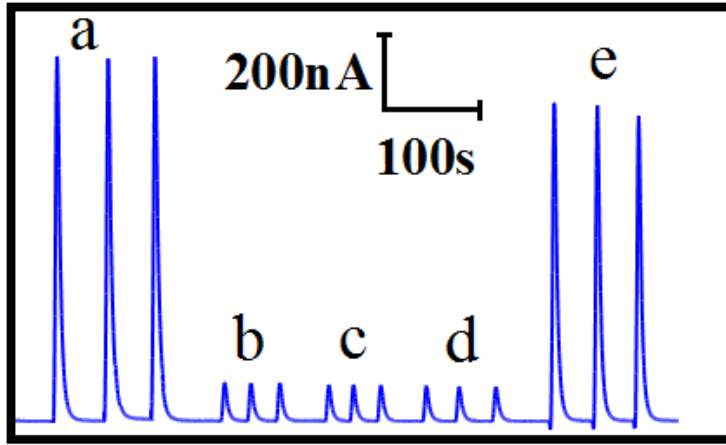
Şekil 4.50. a ve f  $10^{-4}$  M NADH'nin, b, c, d ve e ise sırasıyla  $10^{-4}$  M NADH içeren  $10^{-4}$ ,  $2 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-4}$  ve  $10 \times 10^{-4}$  M glikoz çözeltilerinin ortamında Poli-Pcv/PGE ile alınmış AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.48'deki optimize edilmiş şartlara göre )



Şekil 4.51. a ve f  $10^{-4}$  M NADH'nin, b, c, d ve e ise sırasıyla  $10^{-4}$  M NADH içeren  $10^{-4}$ ,  $2 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-4}$  ve  $10 \times 10^{-4}$  M L-Glutamik asit çözeltilerinin ortamında Poli-Pcv/PGE ile alınmış AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.48'deki optimize edilmiş şartlara göre )

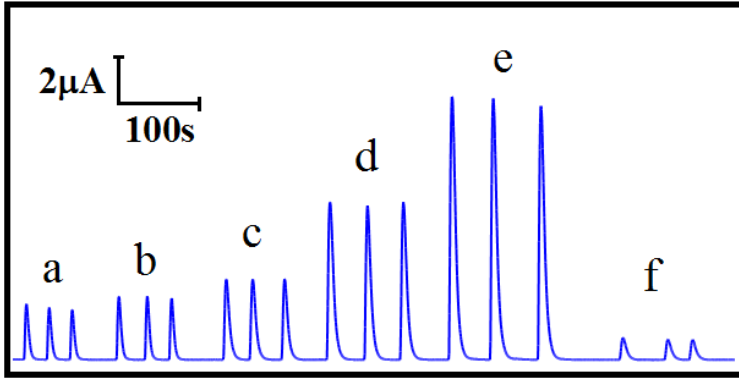


Şekil 4.52. a ve f  $10^{-4}$  M NADH'nin, b, c, d ve e ise sırasıyla  $10^{-4}$  M NADH içeren  $10^{-4}$ ,  $2 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-4}$  ve  $10 \times 10^{-4}$  M sitrik asit çözeltilerinin ortamında Poli-Pcv/PGE ile alınmış AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.48'deki optimize edilmiş şartlara göre )

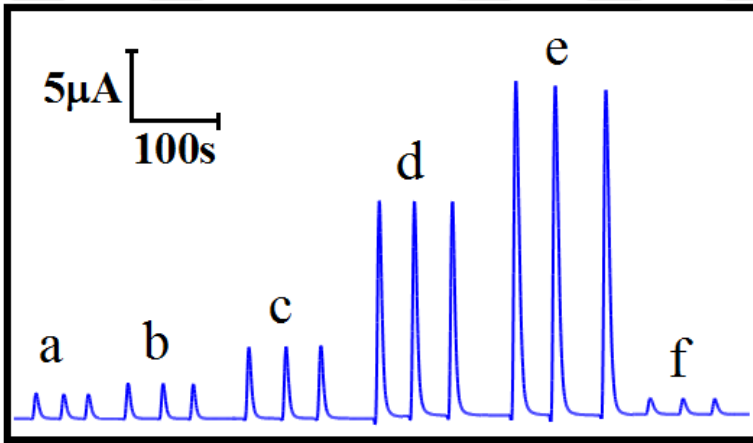


Şekil 4.53. a ve e  $10^{-4}$  M NADH'nin, b, c ve d ise sırasıyla  $10^{-4}$  M NADH içeren  $10^{-4}$ ,  $2 \times 10^{-4}$  ve  $5 \times 10^{-4}$  ürik asit çözeltilerinin ortamında Poli-Pcv/PGE ile alınmış AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.48'deki optimize edilmiş şartlara göre )





Şekil 4.54. a ve f  $10^{-4}$  M NADH'nin, b, c, d ve e ise sırasıyla  $10^{-4}$  M NADH içeren  $10^{-4}$ ,  $2 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-4}$  ve  $10 \times 10^{-4}$  M Dopamin çözeltilerinin ortamında Poli-Pcv/PGE ile alınmış AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.48'deki optimize edilmiş şartlara göre )



Şekil 4.55. a ve f  $10^{-4}$  M NADH'nin, b, c, d ve e ise sırasıyla  $10^{-4}$  M NADH içeren  $10^{-4}$ ,  $2 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-4}$  ve  $10 \times 10^{-4}$  M L-Askorbik asit çözeltilerinin ortamında Poli-Pcv/PGE ile alınmış AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.48'deki optimize edilmiş şartlara göre )

Bir sonraki aşamada bu girişimciler glikoz biyosensörü içinde denenmiş ve girişim gidermek için bazı deneysel çalışmalar gerçekleştirildi.

#### 4.2. Modifiye Elektrotlarla Dehidrogenaz ve $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ Redoks Çiftine Bağlı Biyosensör Tasarımı

Biyosensör çalışmalarında glikoz dehidrogenaz (GDH) enzimi, NADH'ye en iyi yanıt veren Clm ve Pcv modifiye PGE yüzeylerine immobilize edilmiş, model olarak glikoz biyosensör tasarımı gerçekleştirildi.

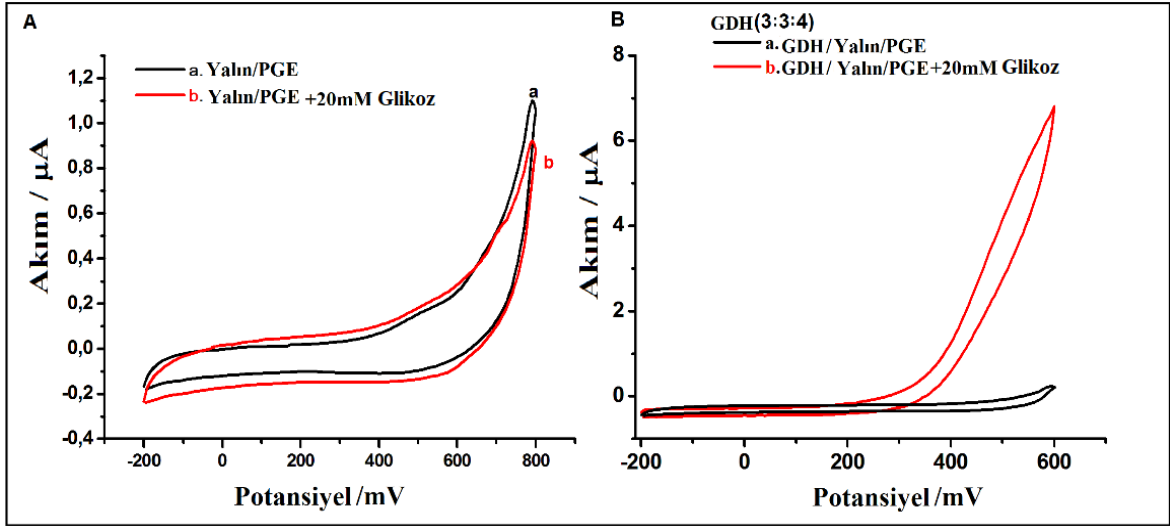
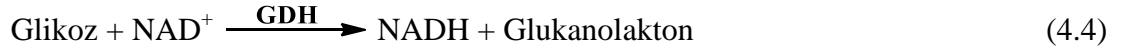
#### 4.2.1. Döngüsel Voltammetrik Yöntemle Biyosensör Çalışmaları

Glikoz biyosensör çalışmalarında öncelikle adsorpsiyon yoluyla hem Clm hem de Pcv modifiye PGE'ler hazırlanmış ve bu elektrotlar yüzeyine GDH immobilize edildikten sonra bu elektrotların glikoza olan yanıtları döngüsel voltammetrik yöntemle incelenmiştir. Ancak bu çalışmalardan olumlu yanıtlar alınamamıştır. Bunun nedeni çapraz bağlama yoluyla elektrot immobilizasyonu esnasında yüzeye adsorplanan boyar maddelerin desorpsiyonuna ve mediyatörün immobilize edilen enzim tabakasının altında kalarak etkinliğini yitirmesine bağlanabilir. İkinci aşamada ise her iki ASA boyar maddesi için elektropolimerizasyon yöntemiyle elektrotlar hazırlanmış ve bu elektrot yüzeylerine enzim immobilize edilerek glikoza yanıtı yine döngüsel voltammetrik yöntemle incelenmiştir. Bu iki elektrottan GDH/Poli-Clm/PGE çok azda olsa enzimatik tepkime sonucu oluşan NADH'nin yükseltgenme potansiyelini negatife kaydırmıştır. Ancak en iyi yanıt GDH/Poli-Pcv/PGE'den alınmıştır. Bu aşamadan sonra daha çok Poli-Pcv/PGE ile ilgili çalışmalardan bahsedilecektir.

GDH/Poli-Pcv/PGE yüzeyinde glikoz ile  $\text{NAD}^+$ 'nin GDH ortamında enzimatik tepkimesi sonucu meydana NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi alınan döngüsel voltammogramların kaydedilmesiyle incelendi. Bu amaç doğrultusunda öncelikle kıyaslama yapmak amacıyla, Pcv mediyatörü ile modifiyesi yapılmayan Yalın-PGE yüzeyine GDH enzimi (GDH/Yalın-PGE) deneysel prosedürdeki işlemler gibi tutturulmuş ve GDH/Yalın-PGE'de glikoz ilavesinden sonra verdiği elektrokimyasal yanıtını izlemek için alınan döngüsel voltammogramları kaydedildi.

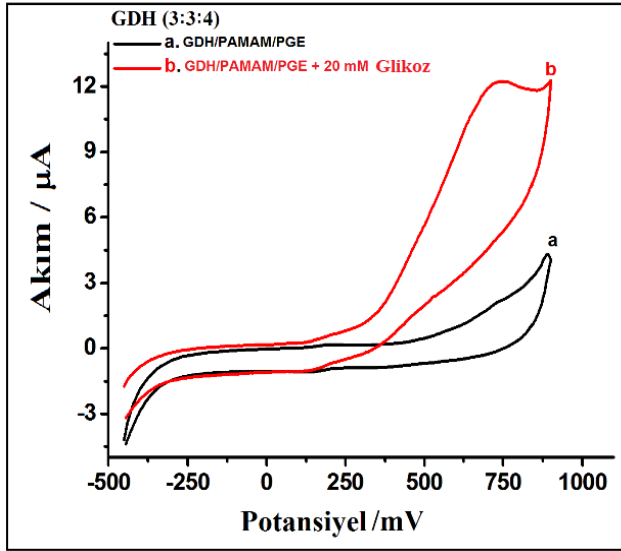
Enzim immobilizasyonu esnasında GDH:%1'lik BSA:GA oranları 3:3:4, 4:4:4, 5:5:5 ve 6:6:4 şeklinde değiştirilerek hazırlanmış enzim çözeltisinde bekletilen Poli-Pcv/PGE'lerin glikoza verdiği yanıtları döngüsel voltammogramlarla izlendi. Öncelikle enzim ve redoks mediyatör olmadan Yalın-PGE'de glikozun döngüsel voltammogramı kaydedildi. Şekil 4.56A'da görüldüğü gibi Yalın-PGE yüzeyinde Pcv ve GDH olmadan glikoza (substrat) ilişkin herhangi bir pik görülmemektedir. Şekil 4.56B, 3:3:4 oranında enzim çözeltisi kullanılarak elde edilmiş GDH/Yalın-PGE'nin 0,01 M  $\text{NAD}^+$  ile 0,1 M KCl içeren 0,1 M PBS (pH =7,0) destek elektrolitinde, glikoz ilavesiyle enzimatik tepkime sonucu oluşan NADH'nin yükseltgenme pikine ait alınan döngüsel voltammogramlarını göstermektedir. Bu voltammogramda yaklaşık 650 mV'da tersinmez bir pik gözlemlendi ve bu pikin nedeni aşağıda verildiği gibi kofaktör  $\text{NAD}^+$  enzimatik

tepkime sonucu meydana gelen NADH'nin tersinmez olarak NAD<sup>+</sup>'ye yükseltgenmesine bağlandı (Tepkime 4.4 ve 4.5).



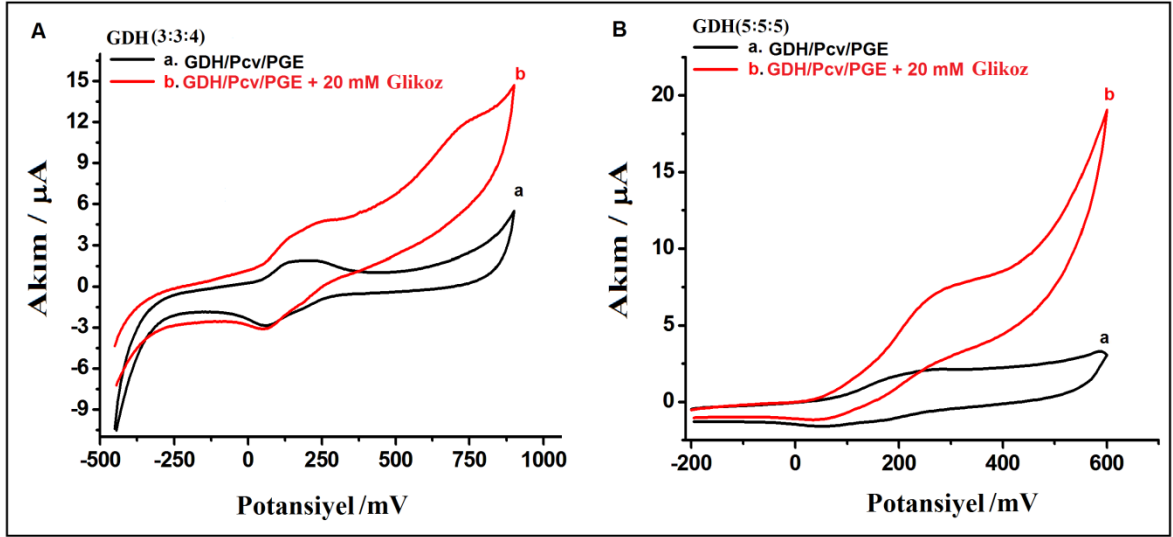
Şekil 4.56. A) Yalın-PGE'nin ve B) GDH/Yalın-PGE'nin 20 mM glikoz ortamında alınan CV'leri (DE: 0,1 M KCl ve 0,01 M NAD<sup>+</sup> içeren 0,1 M PBS pH=7,0 v:20 mV/s)

Daha sonra enzimin PGE yüzeyine daha iyi immobilize olması için PGE yüzeyine PAMAM adsorpsiyon yoluyla tutturuldu. Bu amaçla PGE, PAMAM çözeltisi içerisinde 5 dakika bekletildi. Daha sonra saf su ile yıkanarak enzim çözeltisi içerisinde 1 saat immobilizasyon için bekletildi ve bu işlem iki defa tekrarlandı. adsorpsiyon yoluyla elde edilen GDH/PAMAM/PGE'nin 0,1 M KCl ve 0,01 M NAD<sup>+</sup> içeren 0,1 M PBS (pH=7,0) destek elektrolitindeki döngüsel voltammogramları Şekil 4.57 ile gösterildi. Şekilden de görüldüğü gibi PAMAM'ın enzim immobilizasyonunda kullanılmasıyla elde edilen elektrotun glikoza yanıtı yine 700 mV civarında tersinmez bir pik olacak şekilde gözlemlendi.



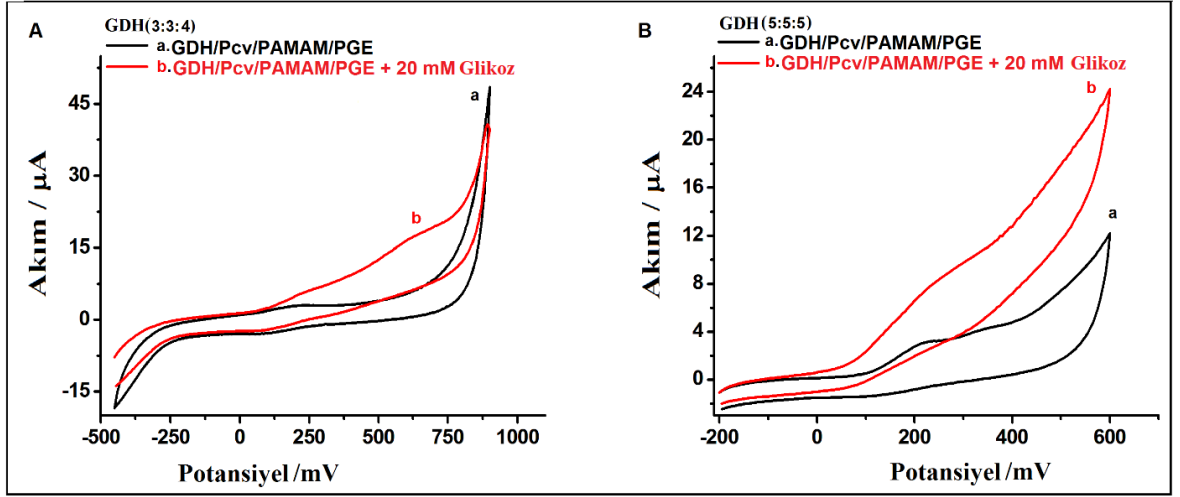
Şekil 4.57. GDH/PAMAM/PGE'nin a) glikoz yokken b) 20 mM glikoz ortamında alınan CV'leri (DE: 0,1 M KCl ve 0,01 M NAD<sup>+</sup> içeren 0,1 M PBS pH=7,0 v:20 mV/s)

Yalın-PGE ve PAMAM/PGE ile yapılan çalışmalardan sonra öncelikle Pcv'nin adsorpsiyon yoluyla elde edilmiş modifiye PGE yüzeylerinde hem PAMAM'siz hem de PAMAM'li enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi ve glikoza olan yanıtları döngüsel voltammetrik yöntemle gerçekleştirildi. Bu amaçla PGE'ler 10<sup>-2</sup> M Pcv içinde 10 dk adsorpsiyon yoluyla modifiye edildikten sonra 2 farklı enzim çözeltisinde (3:3:4 ve 5:5:5 GDH: %1'lik BSA:GA oranlarında) bekletilerek bu elektrot yüzeylerine GDH enzimi immobilize edildi. Ardından bu iki farklı elektrotun glikoz ortamında döngüsel voltammogramları kaydedildi. Şekil 4.58'de verilen voltammogramlarda görüldüğü gibi iki farklı enzim çözeltisinde hazırlanan GDH/Pcv/PGE'ler, glikozun enzimatik tepkimesi sonucu oluşan NADH'nin, GDH/Yalın-PGE'deki yükseltgenme potansiyelini (550 mV) daha negatife kaydırıştır (yaklaşık 200-250 mV civarı). Ancak 5:5:5 oranında hazırlanan elektrotun daha iyi yanıt verdiği tespit edildi.



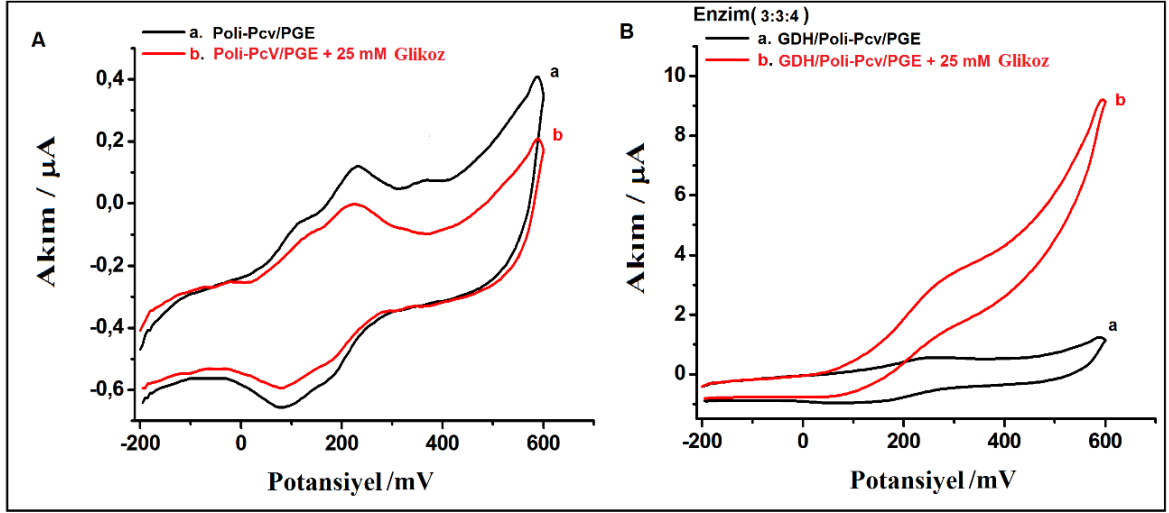
Şekil 4.58. A) 3:3:4 ve B) 5:5:5 GDH: %1'lik BSA:GA oranındaki immobilizasyon çözeltilerine daldırılarak hazırlanmış GDH/Pcv/PGE'lerin a) glikoz yokken b) 20 mM glikoz ortamında alınan CV'leri (DE: 0,1 M KCl ve 0,01 M NAD<sup>+</sup> içeren 0,1 M PBS pH=7,0 v: 20 mV/s)

Benzer şekilde PAMAM ile adsorpsiyondan sonra hazırlanmış enzim immobilize elektrotların (GDH/Pcv/PAMAM/PGE'ler) döngüsel voltammogramları alındı ve Şekil 4.59'da verildi. Şekilde verildiği gibi iki farklı oranda hazırlanmış elektrotların glikoza karşı verdiği yanıt, potansiyeli negatife kaydırması olsa da pik akımında çok az miktarda artış oldu. Sonuç olarak PAMAM'nin immobilizasyon esnasında kullanılması tasarlanan biyosensör de glikozun yanıtına beklenen önemli bir iyileştirme görülemedi. Dolayısıyla bundan sonraki aşamalarda PAMAM kullanılmamaya karar verildi.



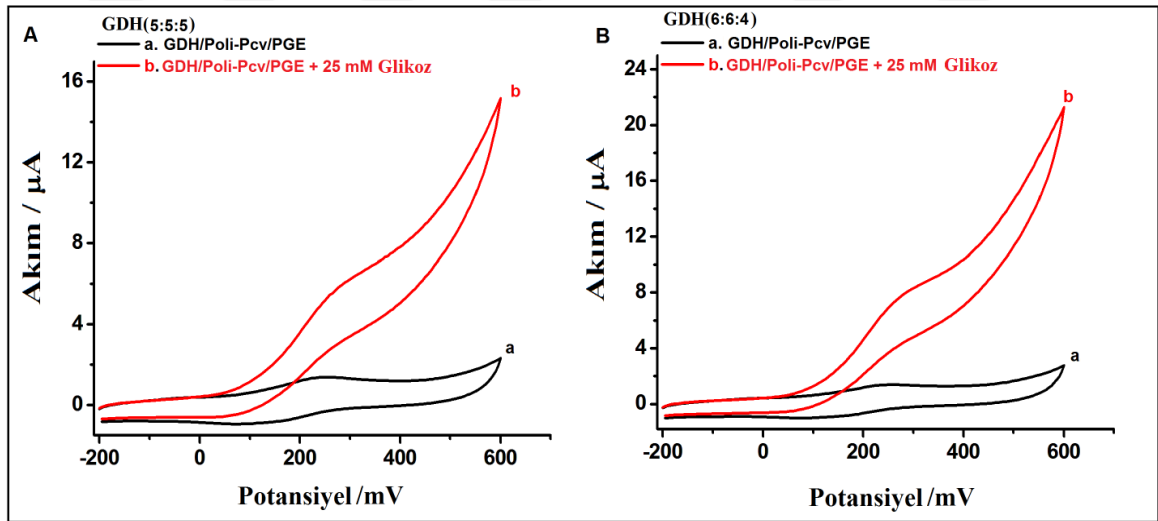
Şekil 4.59. A) 3:3:4 ve B) 5:5:5 GDH: %1'lik BSA:GA oranındaki immobilizasyon çözeltilerine daldırılarak hazırlanmış GDH/Pcv/PAMAM/PGE'lerin a) glikoz yokken b) 20 mM glikoz ortamında alınan CV'leri (DE: 0,1 M KCl ve 0,01 M NAD<sup>+</sup> içeren 0,1 M PBS pH =7,0 v: 20 mV/s)

Daha sonra elektropolimerizasyon yoluyla modifiye PGE'ler hazırlanmış ve enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla 5 döngülü döngüsel voltammogramla elektropolimerizasyon yoluyla ince film oluşturularak elde edilen elektrotlar, yine farklı oranlarda hazırlanmış enzim çözeltisine daldırılarak enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Karşılaştırma yapmak için enzim immobilize edilmemiş Poli-Pcv/PGE ile birlikte 3:3:4 GDH:%1'lik BSA:GA oranındaki immobilizasyon çözeltilerine daldırılarak hazırlanmış GDH/Poli-Pcv/PGE'de aynı koşullar altında glikoza ait döngüsel voltammogramları kaydedildi ve Şekil 4.60'da verildi. Şekil 4.60A'dan görüldüğü gibi enzim immobilize edilmemiş elektrot kullanıldığında glikoz ile Pcv'ye ait gözlenen pik akımlarında herhangi bir değişme gözlenmedi. GDH/Poli-Pcv/PGE'nin glikoz ortamındaki döngüsel voltammogramı ise Şekil 4.60B'de verildi. Bu şekillerden görüldüğü gibi, glikoz ilavesiyle enzimatik tepkime sonucu oluşan NADH'nin pik potansiyeli GDH/Yalın-PGE'ye (Şekil 4.56) göre daha negatif potansiyel değerlerine yani yaklaşık 200-250 mV civarına kaydığı gözlemlendi.



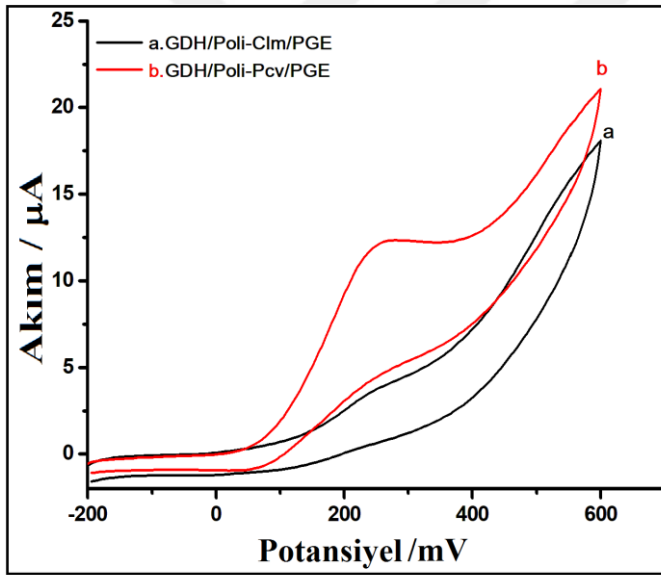
Şekil 4.60. A) Poli-Pcv/PGE'nin ve B) GDH/Poli-Pcv/PGE'nin a) glikoz yokken b) 25 mM glikoz ortamında alınan CV'leri (DE: 0,1 M KCl ve 0,01 M NAD<sup>+</sup> içeren 0,1 M PBS pH =7,0 v: 20 mV/s)

Farklı oranlarda (5:5:5 ve 6:6:4) hazırlanan enzim modifiye elektrotların yanıtı ise Şekil 4.61'de verildi. Bu sonuçlara göre en iyi yanıtların 5:5:5 ve 6:6:4 oranında hazırlanan modifiye elektrotlarla elde edildiği sonucuna varıldı.



Şekil 4.61. A) 5:5:5 ve B) 6:6:4 GDH:%1'lik BSA:GA oranındaki immobilizasyon çözeltilerine daldırılarak hazırlanmış GDH/Poli-Pcv/PGE'lerin glikoz yokken a) glikoz yokken b) 25 mM glikoz ortamında alınan CV'leri (DE: 0,1 M KCl ve 0,01 M NAD<sup>+</sup> içeren 0,1 M PBS pH =7,0 v: 20 mV/s)

GDH/Poli-Pcv/PGE ile karşılaştırma yapmak amacıyla aynı koşullarda GDH/Poli-Clm/PGE'de 5:5:5 oranındaki enzim immobilizasyon çözeltisine daldırılarak hazırlandı ve glikozsuz ve glikozlu ortamda döngüsel voltammogramları kaydedildi. GDH/Poli-Pcv/PGE ve GDH/Poli-Clm/PGE'nin döngüsel voltammogramları Şekil 4.62'de verildi. Şekilden görüldüğü gibi aynı koşullarda alınan döngüsel voltammogramlar, GDH/Poli-Pcv/PGE'nin (Şekil 4.62/b) aynı derişimdeki glikoz derişimine bağılı oluşan NADH'nin yaklaşık 200 mV'daki pik akımının GDH/Poli-Clm/PGE'ye (Şekil 4.62/a) göre daha belirgin olduğunu yansıtmaktadır. Bunun dışında GDH/Poli-Pcv/PGE, adsorpsiyon yoluyla elde edilen GDH/Pcv/PGE ile de karşılaştırılmış ve Şekil 4.58'de GDH/Pcv/PGE için verilen döngüsel voltammogramlarına göre de GDH/Poli-Pcv/PGE'nin voltammogramlarının (Şekil 4.61) glikoza daha iyi yanıt verdiği tespit edildi. Bu durumda bundan sonraki kısımlarda GDH/Poli-Pcv/PGE ile biyosensör tasarımı çalışmalarına devam edildi.

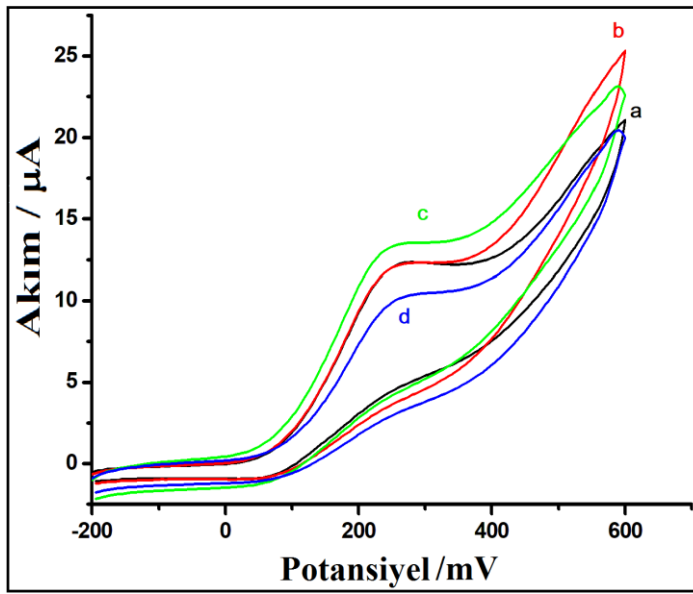


Şekil 4.62. 5:5:5 GDH:%1'lik BSA:GA oranındaki immobilizasyon çözeltilerine daldırılarak hazırlanmış a) GDH/Poli-Clm/PGE ve b) GDH/Poli-Pcv/PGE'nin 25 mM glikoz ortamında alınan CV'leri (DE: 0,1 M KCl ve 0,01 M NAD<sup>+</sup> içeren 0,1 M PBS pH=7,0 v: 20 mV/s)

Glikoz için tasarlanan biyosensörün, glikoza en iyi yanıtı verecek elektrotu hazırlamak için daha önce yapılan GDH:%1'lik BSA:GA oranı optimizasyonu yanında Pcv'nin elektropolimerizasyonu esnasındaki döngü sayısı da çalışılmış ve elde edilen



elektrotlara enzim immobilize edildikten sonra glikoza yanıtları her bir elektrotun dögüsel voltammogramları kaydedilerek incelendi. Elektropolimerizasyonun gerçekleştirilmesinde farklı dögü sayıları kullanarak elde edilmiş ve en uygun olarak değeriendirilen 5:5:5 GDH:%1'lik BSA:GA oranındaki immobilizasyon çözeltilerine daldırılarak hazırlanan GDH/Poli-Pcv/PGE'lerin glikoz ortamındaki dögüsel voltammogramları Şekil 4.63'te verildi. Şekilden görüldüğü gibi 5-30 dögü arasında elde edilen elektrotta, enzimatik tepkime sonucu oluşan NADH'nin pik akımında önemli bir değışikliğin olmadığı ve 40 dögü ile elde edilen modifiye elektrotta azaldığı tespit edilmiştir. Bu azalışın nedeni ise dögü sayısıyla film kalınlığının artması ve elektron transferinin zorlaşmasına bağlanabilir.

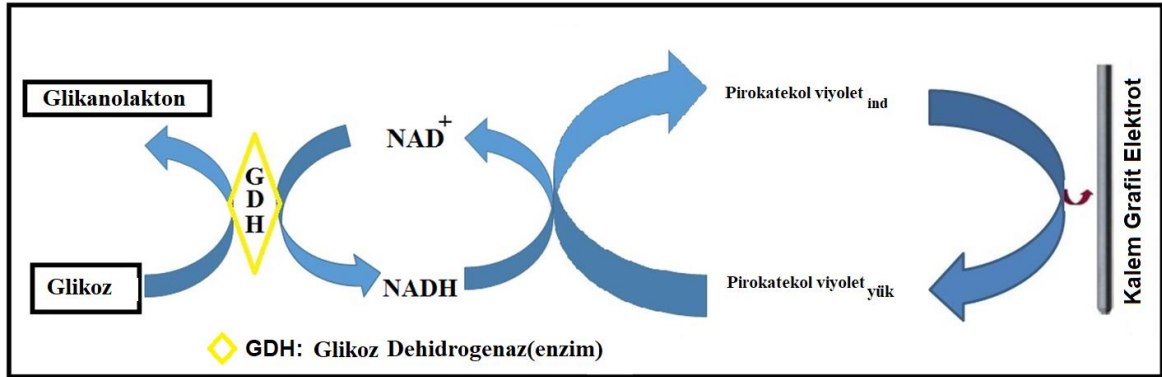


Şekil 4.63. 5:5:5 GDH:%1'lik BSA:GA oranındaki immobilizasyon çözeltilerine daldırılarak hazırlanmış farklı dögü sayıları ile hazırlanmış (a:5, b:10, c:30 d:40 dögü) GDH/Poli-Pcv/PGE'lerin 25 mM glikoz ortamında alınan CV'leri (DE: 0,1 M KCl ve 0,01 M NAD<sup>+</sup> içeren 0,1 M PBS pH =7,0 v: 20 mV/s)

Sonuç olarak, biyosensör çalışmalarında Clm ile hazırlanan modifiye PGE'nin Pcv ile hazırlanan elektrota kıyasla iyi yanıt vermediği, Pcv ile hazırlanan elektrotlarda ise elektropolimerizasyonla elde edilen elektrodun adsorpsiyon yoluyla hazırlanan elektrota göre daha iyi yanıt verdiği belirlendi. Bunun yanında elektropolimerizasyonla Poli-Pcv/PGE hazırlarken 5 dögüsel voltammogramın biyosensöre yanıtının iyi olduğu tespit edildi ve elde edilen elektrodun da enzim immobilize edilirken de 5:5:5 GDH:%1'lik

BSA:GA oranındaki immobilizasyon çözeltilerine daldırılarak hazırlanması optimum koşul olarak belirlendi.

Tasarlanan biyosensör mekanizması ise daha önce literatür kısmında da verilen mekanizmayla açıklanmış ve Şekil 4.64’de şekilsel olarak gösterilmiştir. Bu mekanizmaya göre öncelikle substrat glikoz ile kofaktör  $NAD^+$ , PGE yüzeyindeki GDH varlığında enzimatik bir tepkimeye uğrar ve glikoz glikanolaktone yükseltgenirken  $NAD^+$ ’da  $NADH$ ’ye indirgenir. Elektrot yüzeyinde daha önceden bir elektrot tepkimesiyle (Elektrot tepkimesi 1, E) yükseltgenmiş formda hazır bulunan redoks mediyatör  $Pcv_{yük}$  glikoz derişimine bağılı olarak oluşan  $NADH$  ile kimyasal tepkimeye girerek kendisi tekrar indirgenmiş formuna ( $Pcv_{ind}$ ) dönerken  $NADH$ ’de  $NAD^+$ ’ya yükseltgenir (Kimyasal tepkime, C). Son olarak  $Pcv_{ind}$  elektrota elektronlarını transfer ederek (Elektrot tepkimesi 2, E) yeniden  $Pcv_{yük}$  oluşur ve glikoz derişimine bağılı bir elektrokatalitik akım sinyali oluşur. Enzimatik ECE mekanizması oluşan  $NAD^+$  ve  $Pcv_{yük}$  ile tekrar devam eder.

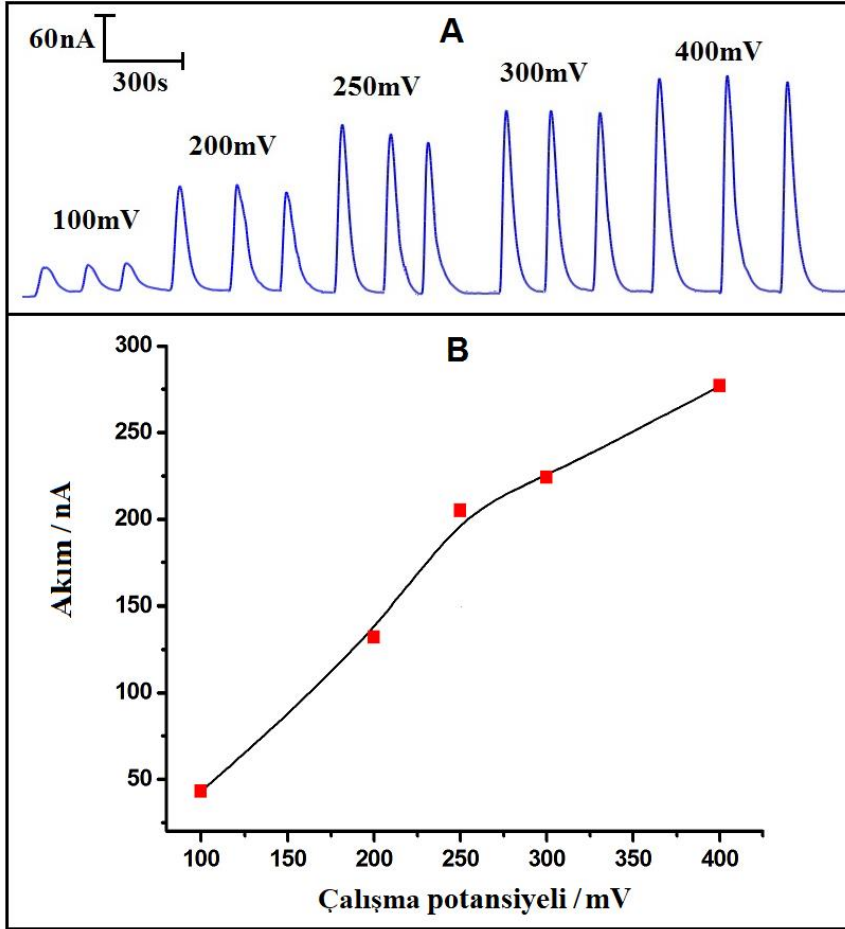


Şekil 4.64. GDH/Poli-Pcv/PGE ve  $NAD^+$ / $NADH$  redoks çiftine bağılı glikoz biyosensör mekanizmasına ait şematik gösterimi

#### 4.2.2. AE Amperometrik Biyosensör Çalışmaları

$NADH$ 'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinin AEA sisteminde amperometrik yanıtının incelenmesinde olduğu gibi, GDH/Poli-Pcv/PGE ile AEA sisteminde glikoz biyosensörü çalışmalarına çalışma potansiyeli ve akış hızı parametrelerinin optimizasyonu ile başlanmıştır. AEA sisteminde 1,18 mL/dk akış hızında 1,0 M KCl içeren 0,1 M pH=7,0 PBS taşıyıcı elektrolitine 1,0 M KCl ile birlikte 0,01M  $NAD^+$  içeren 0,1 M pH=7,0 PBS’de hazırlanan 0,5 mM glikoz, en az 3 defa AEA sistemine enjekte edilerek çeşitli potansiyelerde AE amperometrik akım-zaman eğrileri GDH/Poli-Pcv/PGE için kaydedildi

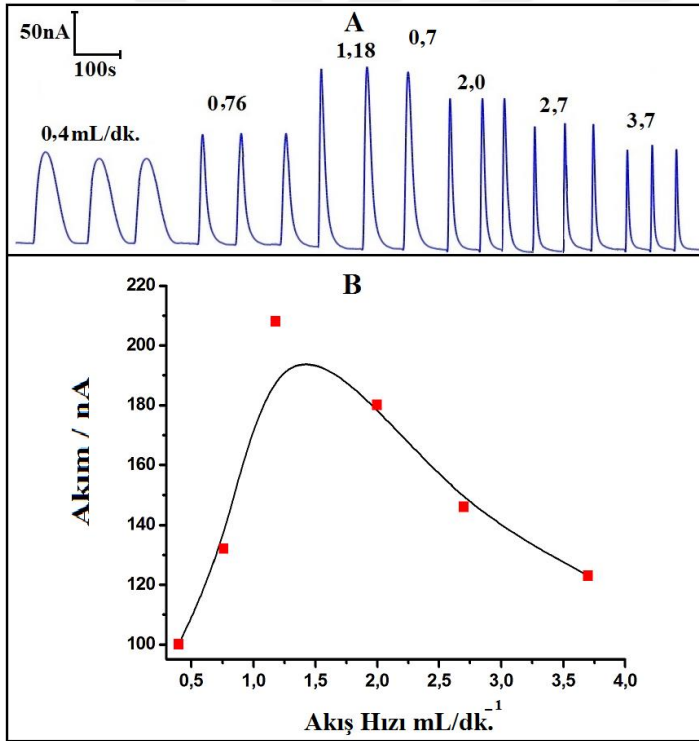
ve Şekil 4.65A’da verildi. glikoz derişimine bağlı oluşan NADH’nin elektrokatalitik akıma karşı çalışma potansiyelinin grafiği ise Şekil 4.65B’de verildi. Bu şekillerden görüldüğü gibi pik akımı, çalışma potansiyelinin artmasıyla arttığı ve en uygun potansiyelin de +250 mV olduğu gözlendi. Bundan sonraki izleyen AE amperometrik çalışmalarda optimum çalışma potansiyeli +250 mV olarak belirlendi.



Şekil 4.65. A) GDH/Poli-Pcv/PGE kullanılarak farklı çalışma potansiyellerinde 0,01 M NAD<sup>+</sup> ve 1 M KCl içeren 0,1 M PBS de hazırlanmış 0,5 mM glikozun akış sistemine enjeksiyonu ile kaydedilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (AH:1,18 mL/dk, T:1,0 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS zeltisi, KU:10 cm, YH:100  $\mu$ L). B) A’daki akım-zaman eğrilerinden elde edilen çalışma potansiyeline karşı akım grafiği

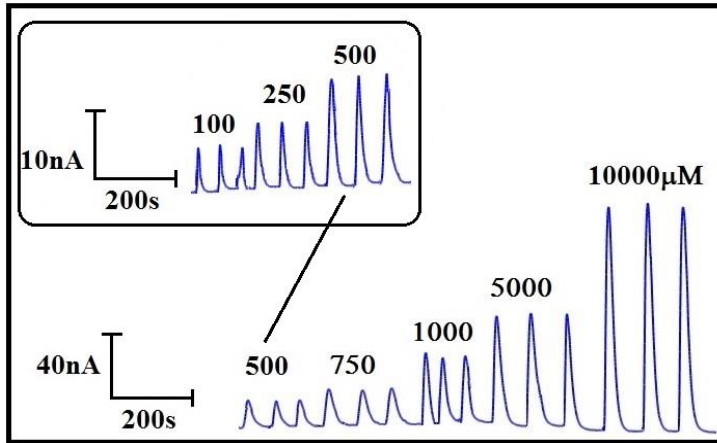
İkinci optimizasyon çalışmasında ise akış hızına karşı pik akım değişimi incelendi. Bu amaçla bir önceki aşamada optimize edilen +250 mV çalışma potansiyeli ve taşıyıcı elektrolit olarak 1,0 M KCl ihtiva eden 0,1 M pH=7,0 PBS kullanıldı. 0,5 mM glikoz 1,0

M KCl ve 0,01 M NAD<sup>+</sup> içeren 0,1 M pH 7,0 PBS’de hazırlandı ve çözelti akış sistemine en az 3 defa enjekte edildi. Farklı akış hızlarında kaydedilmiş akım-zaman eğrileri ise Şekil 4.66A’da verildi. Kaydedilen akım zaman eğrilerinden glikoz derişimine bağlı olarak oluşan NADH’nin elektrokatalitik pik akımı hesaplanarak akış hızına karşı-pik akım grafiği elde edildi ve Şekil 4.66B’de gösterildi. Akım değerlerinin 0,4 mL/dk’dan 1,18 mL/dk’ya gidildiğinde arttığı, ancak bundan sonraki daha büyük akış hızlarında ise akımın azaldığı gözlemlendi. Akımın azalma sebebi, yüksek akış hızının kullanılmasıyla, modifiye elektrot yüzeyinde bulunan mediyatör ile NADH’nin elektrokatalitik tepkimesi için gereken zamanın verilmemesine ve yüksek akış hızı değerlerinde modifiye elektrotun yüzeyindeki polimer filminin bozunmasına bağlanabilir. Sonuç olarak bu aşamadan sonra geręekleřtirilecek amperometrik biyosensör çalışmalarında 1,18 mL/dk akış hızı optimum parametre olarak belirlendi.

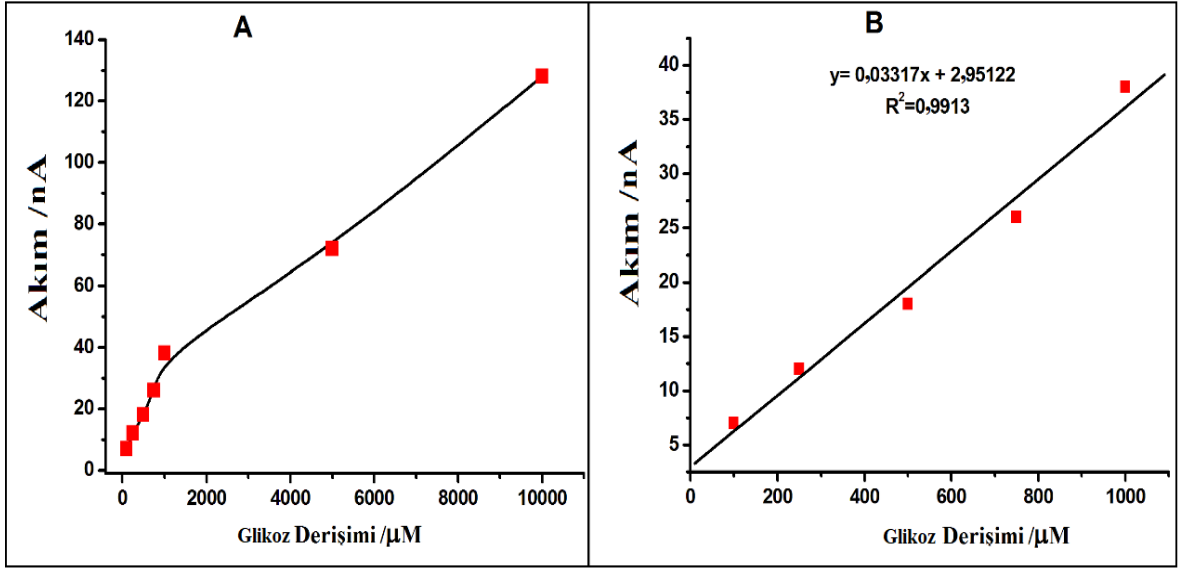


Şekil 4.66. A) GDH/Poli-Pcv/PGE kullanılarak farklı akış hızlarında 0,01 M NAD<sup>+</sup> ve 1,0 M KCl içeren 0,1 M PBS’de hazırlanmış 0,5 mM glikozun akış sistemine enjeksiyonu ile kaydedilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (ÇP;250 mV, TÇ:1,0 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS çözeltisi, KU:10 cm, ÖYH:100 µL) B) A’daki akım zaman eğrilerinden elde edilen akış hızına karşı akım grafiği

Bundan sonraki kısımda biyosensör çalışmalarına, karşılaştırma yapmak amacıyla GDH/Poli-Pcv/PGE ile birlikte GDH/Yalın PGE kullanılarak optimize edilen koşullar altında artan glikoz derişimine bağlı olarak AE amperometrik akım zaman eğrileri kaydedilerek devam edildi. GDH/Yalın PGE için modifiye elektrot için optimize edilen koşullarda artan glikoz derişimine bağlı olarak kaydedilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri Şekil 4.67’de verildi. Şekil 4.68’de ise GDH/Yalın PGE için kaydedilen akım-zaman eğrilerinden elde edilen glikoz derişimine bağlı pik akımlarının değişim grafiği Şekil 4.68A’da ve kalibrasyon grafiği ise Şekil 4.68B verildi. Şekillerden görüldüğü gibi GDH/Yalın PGE’nin de +250 mV’da glikoza çok azda olsa yanıt verdiği ve bu potansiyel değerinde 100 ile 1000  $\mu\text{M}$  glikoz derişim aralığında doğrusal değiştiği ve doğru denkleminin  $I(\text{nA}) = 0,033C_{\text{glukoz}} (\mu\text{M}) + 2,95$  ( $R^2=0,9913$ ) olduğu tespit edildi.

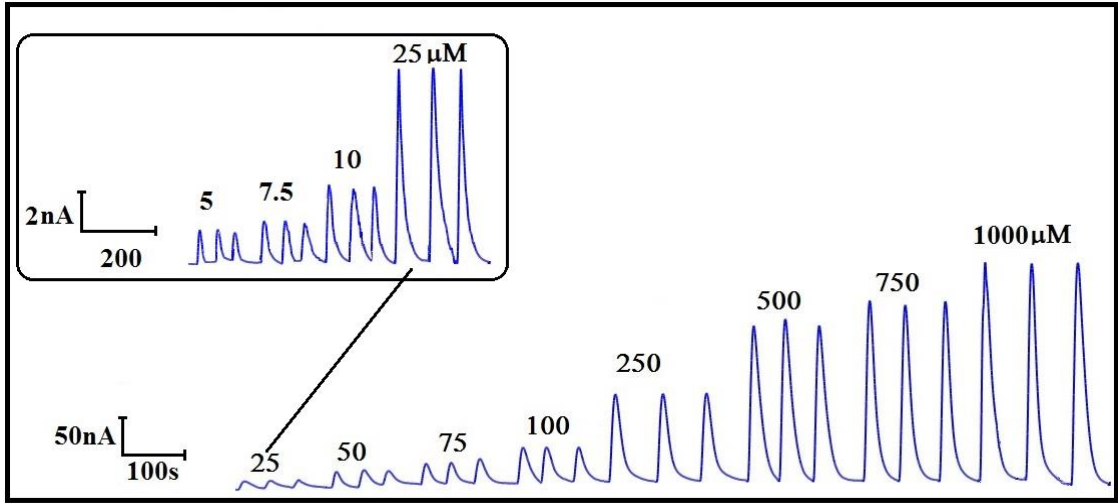


Şekil 4.67. GDH/Yalın PGE kullanılarak 0,01 M  $\text{NAD}^+$  ve 1,0 M KCl içeren 0,1 M PBS’de hazırlanmış artan derişimlerdeki glikoz çözeltilerinin akış sistemine enjeksiyonu ile kaydedilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (ÇP;250 mV, AH: 1,18 mL/dk, TÇ:1,0 M KCl ihtiva eden pH=7,0 PBS çözeltilisi, KU:10 cm, ÖYH:100  $\mu\text{L}$ )

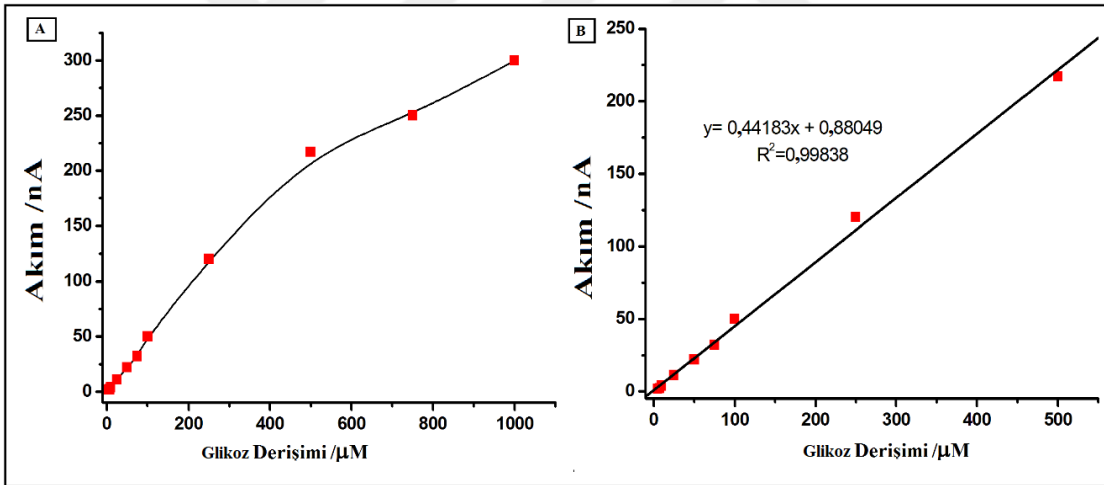


Şekil 4.68. GDH/Yalın PGE için glikoz derişimine karşı enzimatik tepkime sonucu oluşan NADH'nin elektrokatalitik pik akım değişim (A) ve kalibrasyon grafiği (B)

GDH/Poli-Pcv/PGE için farklı derişimlerdeki glikozla bağlı olarak elde edilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri Şekil 4.69'da verildi. Glikoz derişimine karşı bu elektrotla elde edilen akım zaman eğrilerinden enzimatik tepkime sonucu oluşan NADH'nin elektrokatalitik akımları grafiğe geçirildi ve kalibrasyon grafiği ile birlikte Şekil 4.70'de verildi. Glikoz derişimi arttıkça enzimatik tepkime sonucu oluşan NADH'nin elektrokatalitik pik akımının arttığı ve doğrusal kalibrasyon aralığının ise 5-500 µM glikoz olduğu Şekil 4.70'ten gözlemlendi. Doğrusal doğru denklemi ise  $I(\text{nA}) = 0.44C_{\text{glikoz}} (\mu\text{M}) + 0,88$  ( $R^2=0,9984$ ) olarak bulundu. Modifiye elektrot için elde edilen bu doğrusal denklemin eğimi, aynı koşullarda GDH/yalın PGE için elde edilen doğru denkleminin eğimine (0,033) oranlandığında, GDH/Poli-Pcv/PGE'nin yaklaşık 13 kat daha büyük olduğu saptandı. Dolayısıyla elektrot yüzeyinin redoks mediyatörle modifiye edilmesiyle daha geniş bir glikoz derişim aralığıyla birlikte duyarlılığın arttığı tespit edildi.



Şekil 4.69. GDH/Poli-Pcv/PGE kullanılarak 0,01 M  $\text{NAD}^+$  ve 1,0 M KCl ihtiva eden 0,1 M pH=7,0 PBS’de hazırlanmış artan derişimlerdeki glikoz çözeltilerinin akış sistemine enjeksiyonu ile elde edilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.67’deki optimize edilmiş şartlara göre)



Şekil 4.70. GDH/Poli-Pcv/PGE için glikoz derişimine bağı olarak enzimatik tepkime sonucu oluşan  $\text{NADH}$ ’nin elektrokatalitik pik akımlarının değışim (A) ve kalibrasyon grafiğı (B)

Her ne kadar daha önce Poli-Pcv/PGE yüzeyine alkol dehidrogenaz enzimi immobilize edilerek amperometrik etanol biyosensörü (Zhu ve ark., 2014b) ve Dilgin ve çalışma grubu tarafından da kuantum nokta modifiye PGE yüzeyine GDH immobilize edilerek AEA sisteminde fotoelektrokimyasal glikoz biyosensörü (Ertek ve ark., 2016) gerçekleştirilmiş olsa da, AEA sisteminde ASA organik redoks mediyatörleriyle modifiye

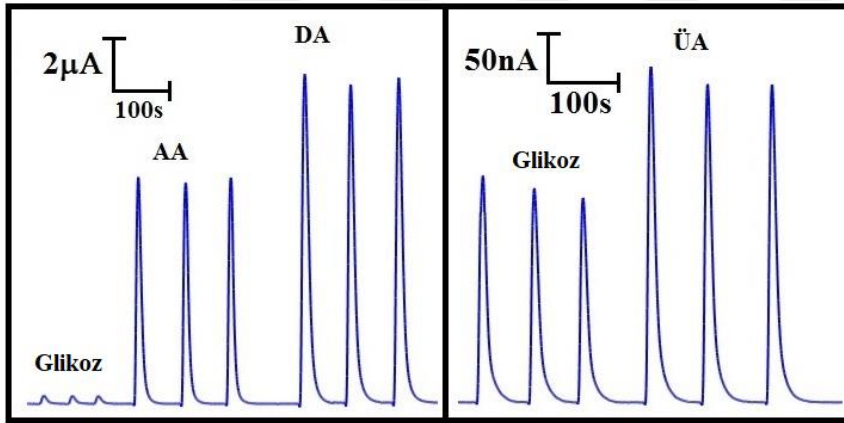
PGE ile ilgili bir biyosensör çalışmasına rastlanılmadı. Bu çalışmada GDH/Poli-Pcv/PGE ile  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  redoks çiftine bağlı elektrokimyasal biyosensör tasarımı AEA sisteminde ilk defa gerçekleştirildi. Doğrusal kalibrasyon aralığı daha önceden de belirtildiği gibi 5-500  $\mu\text{M}$  glikoz şeklinde elde edildi ve gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) sırasıyla 1,2  $\mu\text{M}$  ve 4,0  $\mu\text{M}$  olarak bulundu. LOD ve LOQ hesaplanırken 0,01 M  $\text{NAD}^+$  içeren taşıyıcı çözeltinin (1,0 M KCl içeren 0,1 M pH 7,0 PBS) kendisinden sisteme en az 10 kez enjekte edilerek kör sinyalleri elde edilmiş ve kör sinyallerin standart sapması(s) hesaplandıktan sonra  $3s_{\text{kör}}/m$ 'den LOD ve  $10s_{\text{kör}}/m$ 'den de LOQ değerleri hesaplandı.

#### 4.2.2.1. Girişim Etkisi Yapabilecek Maddelerin İncelenmesi

Tasarlanan biyosensörün seçimliliğini test etmek amacıyla, 0,5 mM glikoz içeren L-glutamik asit, galaktoz, sakkaroz, ürik asit (UA), dopamin (DA) ve L-askorbik asidin (AA) glikoza göre farklı orandaki (1:1, 1:2) çözeltileri 1,0 M KCl ve 0,01 M  $\text{NAD}^+$  ihtiva eden 0,1 M pH=7,0 PBS'de hazırlanarak akış sisteminde GDH/Poli-Pcv/PGE kullanılarak optimize edilen koşullar altında AE amperometrik akım-zaman eğrileri kaydedildi. Her bir bileşik için girişim çalışmalarına ait elde edilen akım-zaman eğrileri Şekil 4.71'den Şekil 4.74'e kadar verildi. Bu AE amperometrik akım-zaman eğrilerine göre DA ve AA'nın 1:1 oranında önemli derecede pozitif girişim yaptığı, yani glikoz derişimine bağlı olarak enzimatik tepkime sonucu oluşan NADH'nin pik akımını arttırma yönünde girişim yaptığı belirlendi (Şekil 4.71). Bunun sebebi bu moleküllerin de bu potansiyel değerinde yükseltgenmesine bağlanmaktadır. Bunun yanında UA'da 1:1 oranında, AA ve DA kadar çok büyük girişim vermese de glikoza bağlı oluşan NADH'nin pik akımını bir miktar arttırmış ve pozitif etki göstermiştir. Bu bileşiklerin sebep olduğu pozitif girişim kimi yöntemlerle giderilebilmektedir. Yapılan bir çalışmada, 3,4 dihidroksi benzaldehit türevleri GCE yüzeyine elektrobiriktirilmiş ve NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinde kullanılmıştır (Pariante ve ark., 1997). Bu çalışmada da AA'nın, NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine büyük bir girişim yaptığı belirlenmiş ve askorbat oksidaz kullanılarak AA önceden yükseltgenerek bu girişim etkisi giderilmiştir. Kim ve arkadaşlarının (2013) yaptıkları bir çalışmada ise redoks mediyatör olarak 5-[2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il]-1,10-fenantrolin demir(III) klorür kullanılmış, Perde baskılı karbon elektrot (Screen printed carbon electrode, SCPE) yüzeyine bu mediyatör modifiye edilmiş ve GDH ile  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  redoks çiftine bağlı enzimatik glikoz biyosensörü

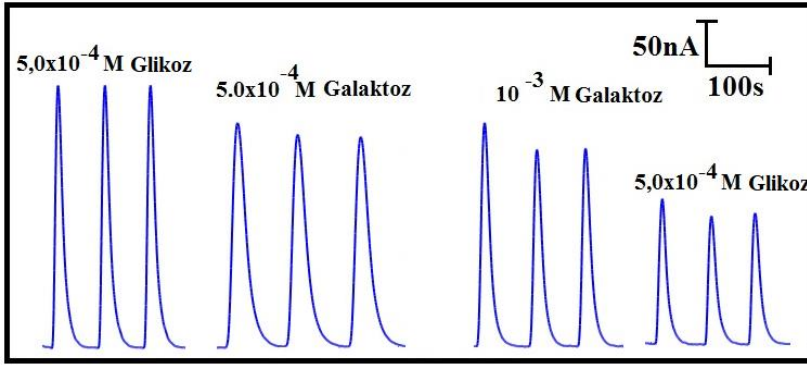


tasarlanmıştır. Bu çalışmada da AA, DA, UA ve asetaminofen'nin (AP)'nin önemli derecede girişim yaptığı tespit edilmiş ve bu girişimlerin giderilmesi için elektrot yüzeyine Nafyon kaplanmıştır. Nafyon negatif yüklü bir moleküldür. Sulu ortamda nötr pH civarında çalışıldığından AA' da negatif yüklü olup elektrostatik itme kuvvetinden dolayı AA gibi organik moleküller membran tarafından uzaklaştırabilmektedir. Böylece Nafyon kaplı modifiye elektrotla AA'nın girişimi önemli derecede engellenmiştir. Bununla birlikte sulu ortamda pozitif yüklü ya da nötr formda bulunan DA ve UA moleküllerin girişimini Nafyon membran engelleyememektedir. Dolayısıyla, bu moleküllerin girişimini engellemek için Kim ve arkadaşları (2013) Nafyon membrana az miktarda kurşun (IV) asetatı ön yükseltgen ajan olarak tutturmuş ve elektrot yüzeyine modifiye etmişlerdir. Böylece girişime sebep olan DA, UA ve AP elektrot yüzeyine ulaşmadan önce Pb(IV) asetat ile yükseltgenmişler ve bu moleküllerin girişimleri de önemli derecede giderilmiştir (Kim ve ark., 2013). Bu çalışmamızda da AA'nın girişimi askorbat oksidaz kullanılarak giderilmeye çalışılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır.

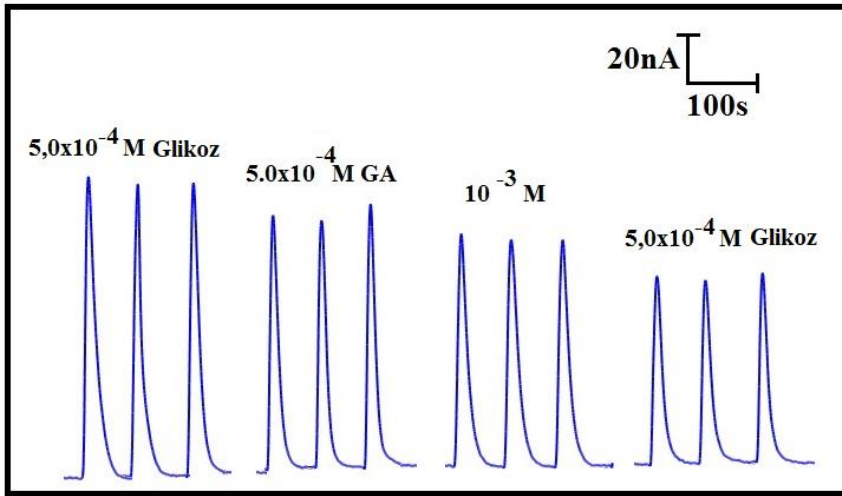


Şekil 4.71. GDH/Poli-Pcv/PGE kullanılarak  $5 \times 10^{-4}$  M glikoz içerecek şekilde 1:1 oranında (eş derişimde) AA, DA ve UA ile 0,01 M  $\text{NAD}^+$  ve 1,0 M KCl ihtiva eden 0,1 M PBS'de hazırlanmış çözeltilerinin akış sistemine enjeksiyonu ile kaydedilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.67'deki optimize edilmiş şartlara göre)

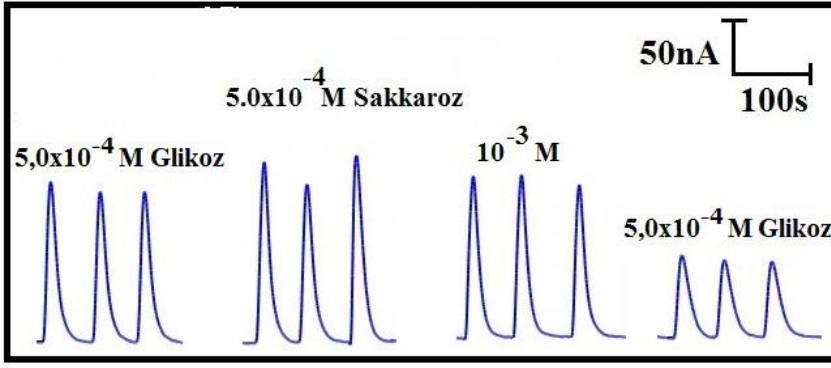
Bu üç bileşikten başka glikozun yanında L-glutamik asit, diğer karbon hidratlardan galaktoz ve sakarozun da girişim çalışmaları gerçekleştirilmiş ve bu bileşiklerin tasarlanan biyosensöre önemli derecede bir girişim etkisi göstermediği sonucuna varıldı. Elde edilen şekiller Şekil 4.72, 4.73 ve 4.74'de gösterildi.



Şekil 4.72. GDH/Poli-Pcv/PGE kullanılarak  $5 \times 10^{-4}$  M glikoz içerecek şekilde 1:1 ve 1:2 oranında galaktoz ile 0,01 M  $\text{NAD}^+$  ve 1,0 M KCl ihtiva eden 0,1 M PBS'de hazırlanmış çözeltilerinin akış sistemine enjeksiyonu ile kaydedilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.67'deki optimize edilmiş şartlara göre)



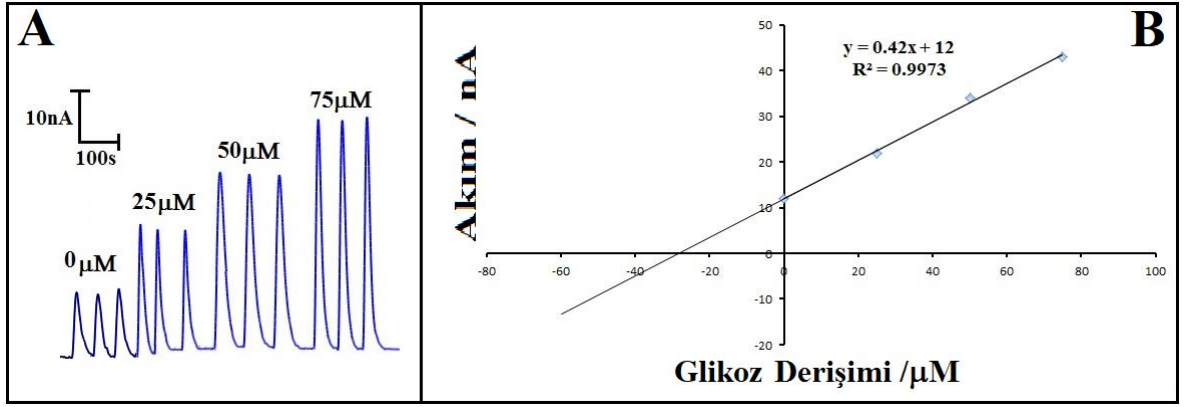
Şekil 4.73. GDH/Poli-Pcv/PGE kullanılarak  $5 \times 10^{-4}$  M glikoz içerecek şekilde 1:1 ve 1:2 oranında glutamik asit (GA) ile 0,01 M  $\text{NAD}^+$  ve 1,0 M KCl ihtiva eden 0,1 M PBS'de hazırlanmış çözeltilerinin akış sistemine enjeksiyonu ile kaydedilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.67'deki optimize edilmiş şartlara göre)



Şekil 4.74. GDH/Poli-Pcv/PGE kullanılarak  $5 \times 10^{-4}$  M glikoz içerecek şekilde 1:1 ve 1:2 oranında sakkaroz ile  $0,01$  M  $\text{NAD}^+$  ve  $1,0$  M KCl ihtiva eden  $0,1$  M PBS’de hazırlanmış çözeltilerinin akış sistemine enjeksiyonu ile kaydedilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.67’deki optimize edilmiş şartlara göre)

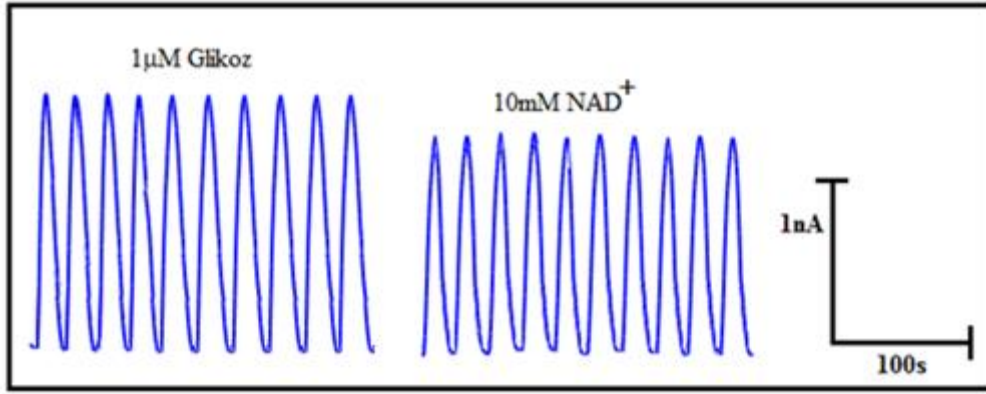
#### 4.2.2.2. Tasarlanan Biyosensörün Gerçek Örneklere Uygulanması

Tasarlanan biyosensörün uygulanabilirliğini test etmek amacıyla, ticari olarak satın alınan %5’lik dekstroz için GDH/Poli-Pcv/PGE kullanılarak optimum koşullarda standart katma grafiği için AE amperometrik akım zaman eğrileri kaydedildi. Piyasan ticari olarak satın alınan dekstroz çözeltisi ( $5\%$  glikoz içeren yaklaşık  $275,5$  mM),  $1,0$  M KCl ve  $0,01$  mM  $\text{NAD}^+$  içeren  $\text{pH}=7,0$  PBS ile seyreltilerek yaklaşık  $500$   $\mu\text{M}$  glikoz içerecek şekilde hazırlandı. Bu çözeltilerden yaklaşık olarak  $10$   $\mu\text{M}$  içerecek şekilde örnek çözeltisi hazırlanmış ve bu örnekler  $0, 25, 50$  ve  $75$   $\mu\text{M}$  glikoz içerecek şekilde standart glikoz çözeltisi ilave edilerek uygun hacme  $0,01$  M  $\text{NAD}^+$  ve  $1,0$  M KCl içeren  $0,1$  M  $\text{pH}=7,0$  PBS ile seyreltilmiştir. Her bir çözeltinin GDH/Poli-Pcv/PGE’de optimum koşullar altındaki AE amperometrik akım zaman eğrileri kaydedildi (Şekil 4.75.A). Elde edilen akım-zaman eğrilerinden akım değerleri hesaplanarak standart katma grafiği çizildi (Şekil 4.75.B) ve bu grafikten örnekteki glikoz derişimi hesaplandı. Önerilen biyosensörle bulunan değer yaklaşık  $285 \pm 1,41$  ( $n=5$ ) olup, etikette belirtilen değere ( $277,5$  mM) oldukça yakın bulundu. Sonuç olarak askorbik asit, dopamin, ürik asit gibi glikoz biyosensörüne girişim yapan girişimcilerin olmadığı ortamlarda, tasarlanan biyosensörün iyi yanıt verdiği belirlendi. Bunun yanında tasarlanan bu biyosensör, olası girişimci maddelerin kimi yöntemlerle giderilmesiyle de kan idrar gibi kompleks biyolojik örnekler de uygulanabileceği sonucuna varıldı.



Şekil 4.75. A) GDH/Poli-Pcv/PGE kullanılarak 0,01 M  $\text{NAD}^+$  ve 1,0 M KCl içeren 0,1 M PBS de hazırlanmış örnek, örnek+25  $\mu\text{M}$  glikoz, örnek+50  $\mu\text{M}$  glikoz ve örnek+75  $\mu\text{M}$  glikoz çözeltilerinin akış sistemine enjeksiyonu ile elde edilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri (Şekil 4.67'deki optimize edilmiş şartlara göre) B) GDH/Poli-Pcv/PGE ile dekstroz için alınmış standart katma grafiği

GDH/Poli-Pcv/PGE kullanılarak, 1,0 M KCl ihtiva eden 0,1 M pH=7,0 PBS de hazırlanmış 1  $\mu\text{M}$  glikoz ve sadece 0,01 M  $\text{NAD}^+$  içeren iki çözeltilinin akış sistemine ayrı ayrı enjeksiyonu ile kaydedilen AE amperometrik akım-zaman eğrileri Şekil 4.76'da verildi. Bu çalışma sonucunda GDH/Poli-Pcv/PGE ile  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  redoks çiftine bağlı elektrokimyasal biyosensör tasarımı AEA sisteminde ilk defa gerçekleştirildi. Doğrusal kalibrasyon aralığı 5 ile 500  $\mu\text{M}$  glikoz şeklinde elde edilmiş olup, gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) sırasıyla 1,2  $\mu\text{M}$  ve 4,0  $\mu\text{M}$  olarak hesaplandı. LOD ve LOQ hesaplanırken 0,01 M  $\text{NAD}^+$  içeren taşıyıcı çözeltilinin (1,0 M KCl içeren 0,1 M pH=7,0 PBS) kendisinden sisteme en az 10 kez enjekte edilerek (Şekil 4.76) kör sinyalleri elde edildi. Kör sinyallerin standart sapması(s) hesaplandıktan sonra  $3s_{\text{kör}}/m$ 'den LOD ve  $10s_{\text{kör}}/m$ 'den de LOQ değerleri hesaplandı.



Şekil 4.76. GDH/Poli-Pcv/PGE’de 0,01 M NAD<sup>+</sup> içeren 1 μM glikoz ile sadece 0,01 M NAD<sup>+</sup> içeren çözeltilerin AEA sistemine enjekte edilmesiyle elde edilen AE amperometrik akım zaman eğrileri

GDH/Poli-Pcv/PGE’de NAD<sup>+</sup> içeren glikoz çözeltilerinin AEA sistemine enjekte edilmesiyle glikoza ait AE amperometrik akım-zaman eğrileri optimize edilen koşullar altında kaydedildi ve elde edilen analitiksel parametreler Çizelge 4.2 ile gösterildi.

Çizelge 4.2. GDH/Poli-Pcv/PGE’de FI amperometrik glikoz biyosensörü için edinilen analitiksel parametreler

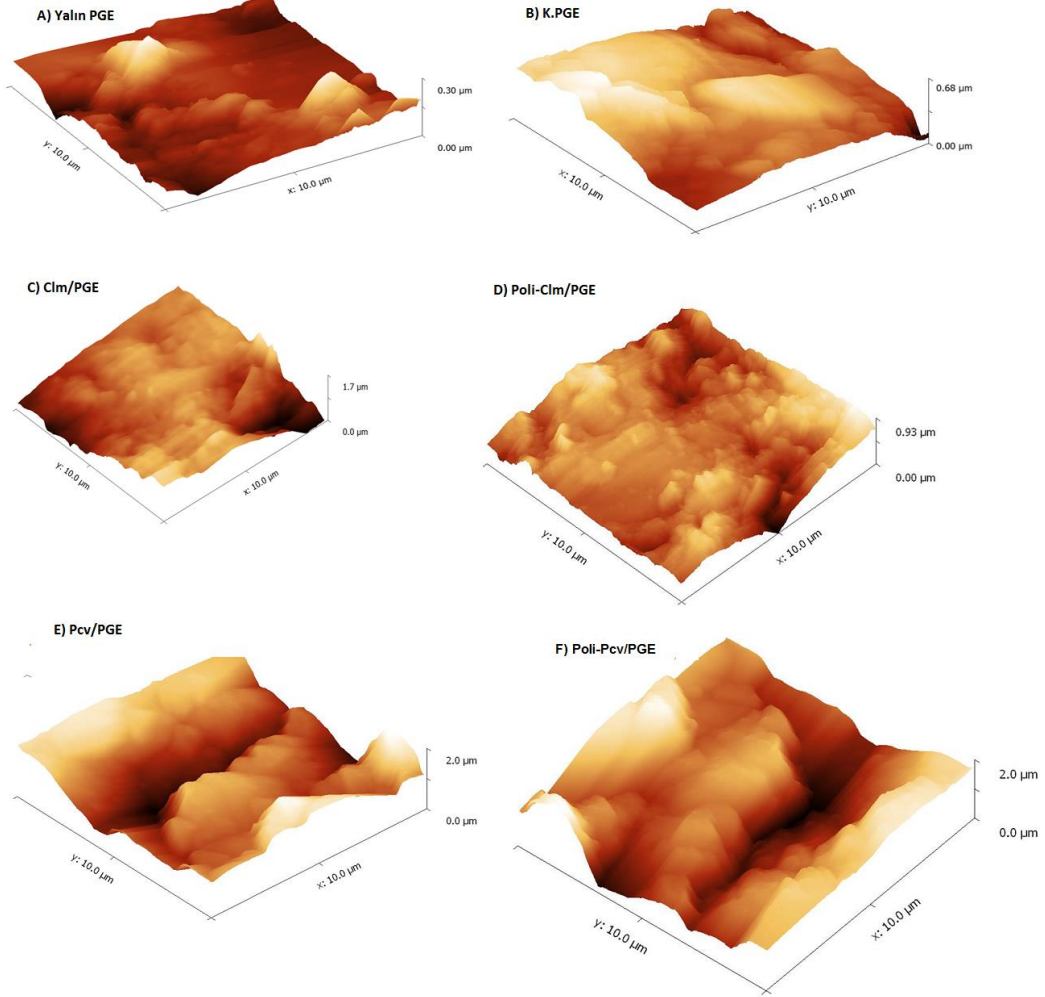
Elektrot Türü	ÇP ve Ortam	DA/ μM	LOD/LOQ μM	Doğru denklemi
GDH/Yalın/PGE	+250 mV, 1,0M KCl içeren pH 7,0	100-1000		$I(nA)=0,033C_{Glikoz}(\mu M)+ 2,95$ $R^2 = 0,9913$
GDH/Poli Pcv/PGE	PBS	5-500	1,2/4,0	$I(nA)= 0,44C_{Glikoz}(\mu M) + 0,88$ $R^2 = 0,9984$

ÇP: Potansiyeli; DA: Doğrusal aralık; LOD: Gözlenebilme sınırı LOQ: Tayin sınırı

### 4.3. Modifiye Elektrotların Karakterizasyonu

Modifiye elektrotların karakterizasyonu için NADH’nin, elektrokatalitik yükseltgenmesine iyi yanıt veren Clm ve Pcv modifiye elektrotlarla birlikte Yalın PGE ve K.PGE’nin hem yüzeysel hem de elektrokimyasal karakterizasyonları gerçekleştirildi. Bu amaçla öncelikle her bir elektrodun AFM görüntüleri alındı ve elde edilen görüntüler Şekil 4.77’de verildi. Yalın PGE (Şekil 4.77.A) ile K.PGE’nin (Şekil 4.77.B) AFM görüntüleri karşılaştırıldığında yüzey morfolojisinin bir miktar değiştiği ve bunun nedenin koşullandırma ile yüzeyin aktive edildiğini yansıtmaktadır. Yüzeyle adsorpsiyon yoluyla

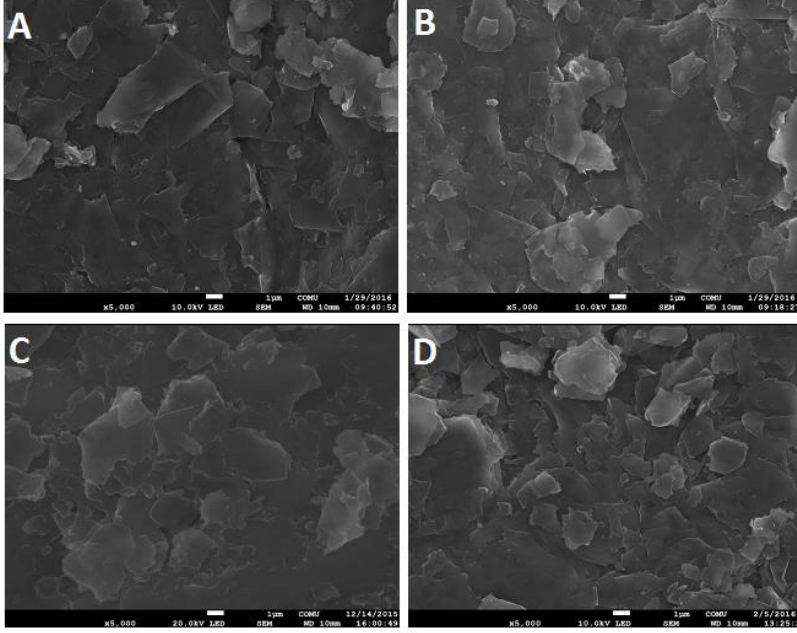
Clm (Şekil 4.77.C) ve Pcv (Şekil 4.77.E) modifiye edildiğinde bir film tabakasının oluştuğu ve yüzeye bu moleküllerin gerek adsorpsiyon ve gerekse elektropolimerizasyon yoluyla tutunduğu sonucuna varıldı. Benzer durum, Clm ve Pcv'nin PGE yüzeyine elektropolimerize edildiğinde de gözlemlendi (Şekil 77.D).



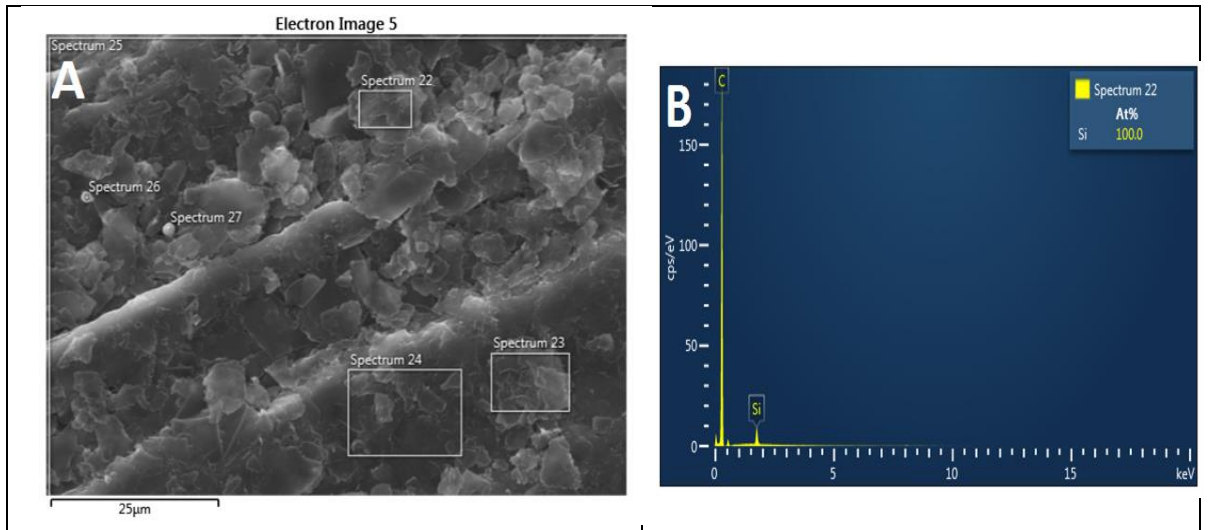
Şekil 4.77. A) Yalın PGE, B) K.PGE, C) Clm/PGE, D) Poli-Clm/PGE, E) Pcv/PGE ve F) Poli-Pcv/PGE'nin AFM görüntüleri

Benzer şekilde elektrotların SEM görüntüleri alındı ve Şekil 4.78'de verildi. Şekilde görüldüğü gibi Yalın PGE (Şekil 4.78.A) ile K.PGE (Şekil 4.78.B), Clm/PGE (Şekil 4.78.C) ve Poli-Clm/PGE'nin (Şekil 4.78.D) SEM görüntüleri arasında çok anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir. Tümünde PGE'nin katmanlı yapıda olduğu gözlenmiş, ama bu katmanlı yapılar gerek adsorpsiyon yoluyla gerekse elektropolimerizasyon yoluyla modifiye Clm'ye ilişkin herhangi bir film gözlenmemiştir. Bunun yanında her elektrodun

EDX görüntüleri de alınmış ve yine anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Alınan EDX görüntülerinden sadece Yalın PGE ait bir spektrum Şekil 4.79’da verildi. Şekilden görüldüğü gibi C ve Si oranının yüksek çıktığı, bunun nedeni ise kalem grafit elektrodun grafit ve kilden oluştuğundan kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.78. A) Yalın PGE, B) K.PGE, C) Clm/PGE ve D) Poli-Clm/PGE’nin SEM görüntüleri



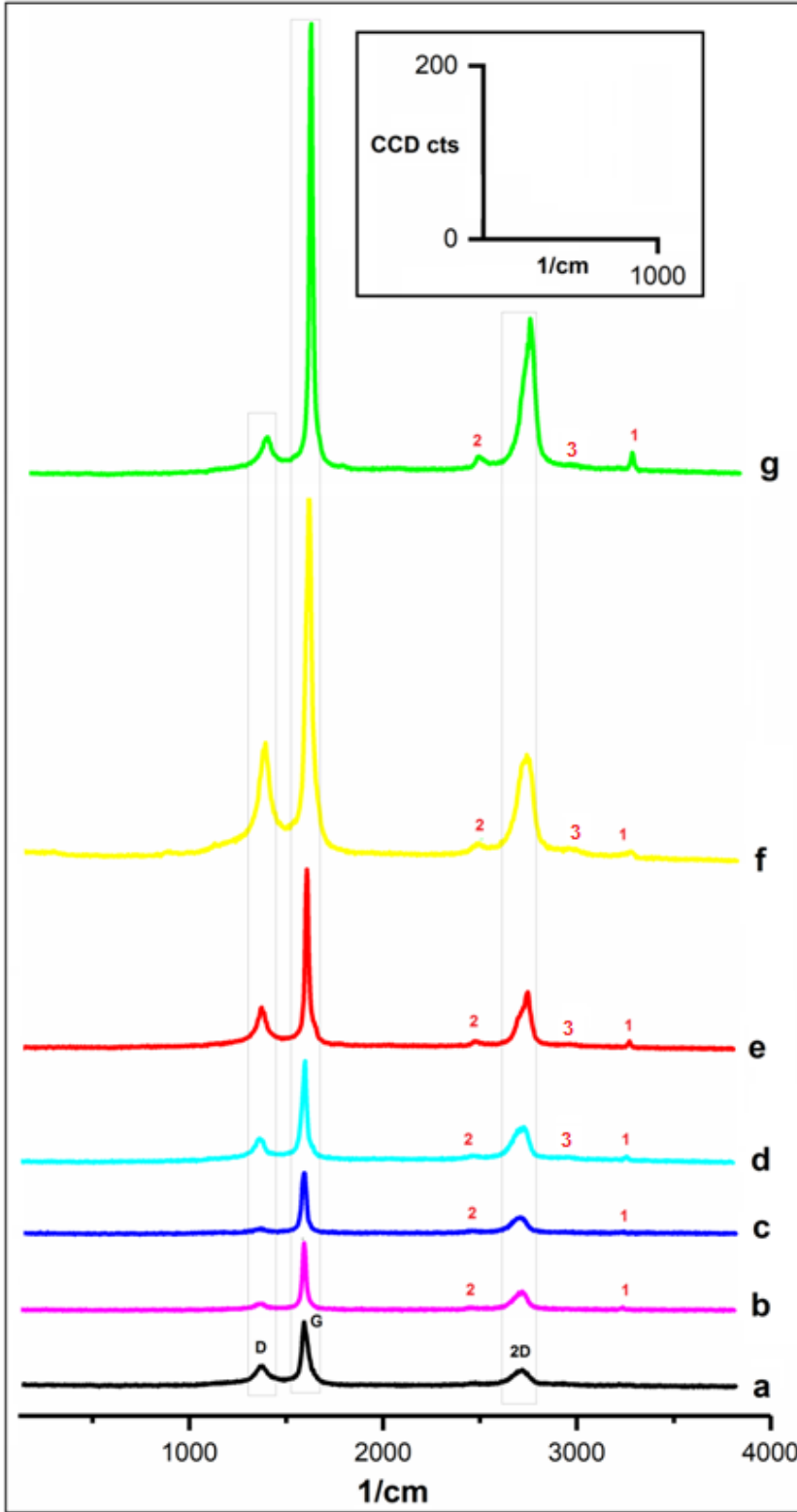
Şekil 4.79. Yalın PGE’nin A) EDX spektrumu alınan bölgelerin işaretlendiği SEM görüntüsü ve B) EDX spektrumu

SEM ve AFM görüntüleri dışında her bir elektrodun Raman spektrumları alındı ve modifiye elektrotlar ile yalın PGE arasındaki farklılıklar ve kaymalar belirlendi. 532 nm laser ile uyarılma sonucu elde edilen tüm spektrumlar Şekil 4.80'de verildi. Yalın PGE'nin Raman spektrumunda (Şekil 4.80/a)  $1565\text{ cm}^{-1}$  güçlü bir G bandı,  $1352\text{ cm}^{-1}$ 'de oldukça zayıf bir D bandı ve  $2690\text{ cm}^{-1}$ 'de ise orta düzeyde bir 2D bandı görülmüştür. G bandı,  $E_{2g}$  modunun birinci dereceden saçılmasına izin veren ve simetri sonucunda oluşan düzgün biçimde düzenlenmiş grafit yapının ( $sp^3$  hibridize karbon atomlarının) olduğunu yansıtmaktadır. Benzer sonuçlar hem PGE için hem de grafitik yapılar için elde edilmiş ve bu şekilde yorumlanmıştır (Akhavan ve ark., 2014; Baig ve Kawde, 2015; Dilgin ve Karakaya, 2016; Kim ve ark., 2013; Pariente ve ark., 1997; Pokpas ve ark., 2014). Yüzeyle Clm ve Pcv gerek adsorpsiyonla gerekse elektropolimerizasyon yoluyla modifiye edildiğinde, Raman spektrumunda Yalın PGE'ye göre modifiye elektrotlarda Clm ve Pcv'ye ait yeni piklerin oluşumu beklenmektedir. Ancak yüzeyle adsorplanan ya da elektropolimerize olan aromatik sülfonik asit boyar maddelerin miktarı oldukça az olduğundan yeni pikler çok zayıfda olsa yaklaşık  $3238\text{ cm}^{-1}$  (1 nolu pik),  $2450\text{ cm}^{-1}$  (2 nolu pik) ve  $3000\text{-}3015\text{ cm}^{-1}$  'de (3 nolu pik) gözlenmiştir. 1 nolu pikin yapıdaki -OH gruplarına, 3 nolu pikin ise aromatik COC bantlarına ait olabileceği düşünülmektedir. Örneğin Poli-Pcv/PGE'nin ve Pcv/PGE'nin (adsorpsiyon yoluyla hazırlanan modifiye elektrot) Raman spektrumları sırasıyla Şekil 4.80g/e ve Şekil 4.80f'de verildi ve bahsedilen yeni pikler Poli-Clm/PGE (Şekil 4.80c/d) ve Clm/PGE'nin (Şekil 4.80/b) Raman spektrumlarından daha net gözlemlendi. Bu durum PGE yüzeyine Pcv'nin hem daha iyi polimerize olduğu hem de adsorbe olduğunu yansıtmaktadır. Nitekim elektrokatalitik yanıtlara Pcv'nin daha iyi yanıt vermesi bu sonuçları desteklemektedir. Bunun dışında yüzeyin bu redoks boyar maddeleriyle modifiye edilmesi sonucu, Yalın PGE'nin Raman spektrumunda görünen G, D ve 2D (özellikle 2D) piklerinde hafif pozitif yönde kaymaya neden olmuştur. Örneğin Yalın PGE'de yaklaşık  $2690\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik pH=9,0 BRBS'de elde edilen Poli-Pcv/PGE'de (Şekil 4.80/g) yaklaşık  $2715\text{ cm}^{-1}$ 'e, pH=3,0 BRBS de elde edilen Poli-Pcv/PGE'de (Şekil 4.80/e) yaklaşık  $2724\text{ cm}^{-1}$ , adsorpsiyon yoluyla elde edilen Pcv/PGE'de (Şekil 4.80/f) ise yaklaşık  $2700\text{ cm}^{-1}$ 'e kaymıştır. Bunun dışında pik pH=9,0 BRBS'de elde edilen Poli-Clm/PGE'de (Şekil 4.80/d) yaklaşık  $2715\text{ cm}^{-1}$ 'e, pH=3,0 BRBS'de elde edilen Poli-Clm/PGE'de (Şekil 4.80/c) yaklaşık  $2680\text{ cm}^{-1}$ , adsorpsiyon yoluyla elde edilen Clm/PGE'de (Şekil 4.80/b) ise yaklaşık  $2701\text{ cm}^{-1}$ 'e kaymıştır.



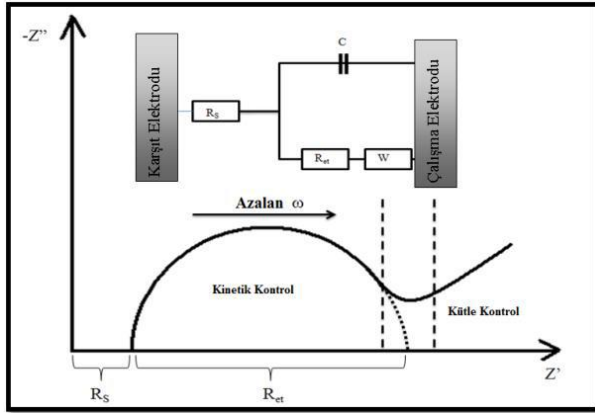
Verilerden görüldüğü gibi kaymalar özellikle polimerik modifiye elektrotlarda daha belirgindir. Bu kaymalar yüzeye organik yapıların gerek adsorpsiyon ve gerekse polimerik yolla fiziksel olarak bağlandığını kanıtlamaktadır.



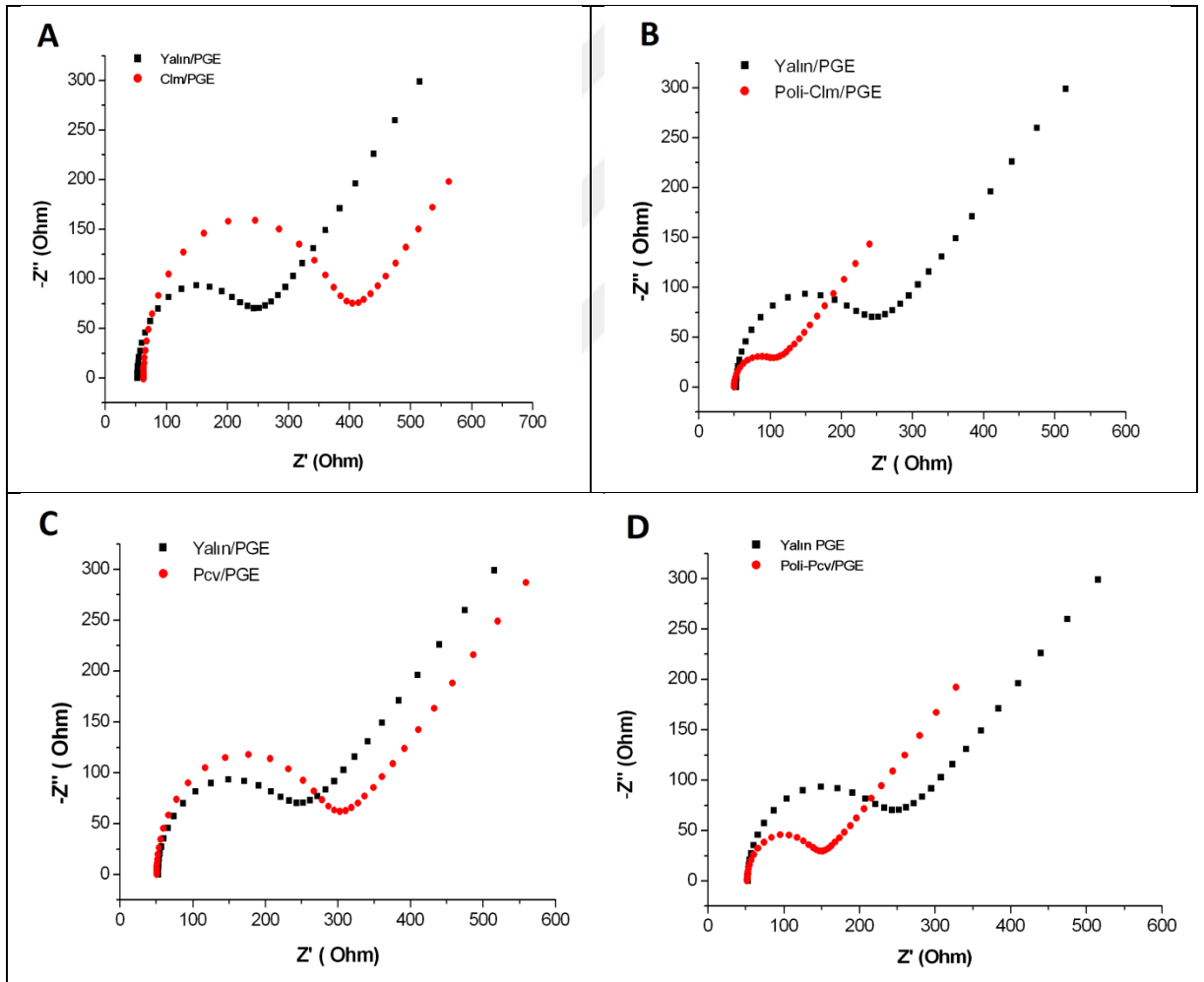


Şekil 4.80. a) Yalın PGE, b) Clm/PGE, c) pH=3,0 BRBS’de hazırlanan Poli-Clm/PGE, d) pH=9,0 BRBS’de hazırlanan Poli-Clm/PGE, e) pH=3,0 BRBS’de hazırlanan Poli-Pcv/PGE, f) Pcv/PGE ve g) pH=9,0 BRBS’de hazırlanan Poli-Pcv/PGE’nin Raman spektrumları

Son olarak elektrotların 0,01 M  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$  redoks probu ortamında 0,1-100.000 Hz frekans aralığında 0,170 V potansiyelinde impedans eğrileri Şekil 4.81’de gösterilen devre modeline göre alındı ve elde edilen elektrokimyasal impedans eğrileri Şekil 4.82’de verildi. Yalın PGE’nin impedans eğrilerinden 250 ohm’luk bir direnç gözlemlendiği adsorpsiyon yoluyla elde edilen modifiye elektrotlardan hem Clm/PGE hem de Pcv/PGE’nin dirençlerinin çok az miktarda (Clm/PGE için Şekil 4.82A’da yaklaşık 400 ohm ve Pcv/PGE için Şekil 4.82C ise 300 ohm) arttığı Şekil 4.82’de gözlemlendi. Bu artışın sebebi, elektrot yüzeyinde adsorplanan aromatik sülfonik asit boyar maddelerin zayıf asit özelliği göstermesi ve bu özelliğinden dolayı da redoks probu ortamında protonunu vererek PGE yüzeyinde negatif yüklü sülfonat grubu oluşturmasına bağlanabilir. Bu elektrostatik itme, elektron transferi için bir bariyer olarak davranır ve elektron transferini Yalın PGE’ye göre zorlaştırır. Sonuçta, direnç negatif yüklü elektrot yüzeyi ile redoks probu arasındaki elektrostatik itme kuvvetinden dolayı artar. Dolayısıyla modifiye elektrotlarda direncin artması, molekül olarak aromatik sülfonik asit grubu boyar maddelerin yüzeye adsorplanmasından dolayı iletkenliğin çok azda olsa azaldığı (direnç arttığı) anlamına gelmektedir ve yüzeyin bu moleküllerle modifiye edildiğini göstermektedir. Ancak elektropolimerizasyon yoluyla elde edilen modifiye elektrotlarda ise tam tersi bir impedans eğrisiyle karşılaşmıştır. Hem Poli-Clm/PGE’nin (Şekil 4.82B) hem de Poli-Pcv/PGE’nin (Şekil 4.82D) direnç değerleri (Poli-Clm/PGE için 120 ohm ve de Poli-Pcv/PGE için 150 ohm) Yalın PGE’nin direnç değerine (250 ohm) göre çok az da olsa azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durumda yüzeye polimerize olan ASA grubu boyar maddelerinin iletken bir polimer film oluşturduğu, dirençlerin azalmasıyla da iletkenliğin arttığı ve dolayısıyla da yüzeyin böyle bir film ile kaplandığı sonucuna varılmıştır. Her ne kadar yüzeyde elektropolimerize olan aromatik sülfonik asit gruplarının da asidik özelliğinden dolayı elektrot yüzeyi negatif yüklenmiş olsa da elektropolimerizasyonla konjugasyon daha etken olmaktadır. Dolayısıyla da bu konjugasyona bağlı olarak da iletkenlik artmakta ve şekillerden de görüldüğü gibi direnç değeri düşmektedir. Tüm bu sonuçlar yüzeye ASA boyar maddelerinin elektropolimerizasyon yoluyla modifiye edildiğini yansıtmaktadır.



Şekil 4.81. Elektrokimyasal impedans devre modeli ve impedans eğrisi ( $R_s$ : Çözelti direnci,  $R_{et}$ : elektron transfer direnci,  $C$ : Sığa,  $W$ : Warburg impedansı)



Şekil 4.82. A) Clm/PGE, B) Poli-Clm/PGE, C) Pcv/PGE ve D) Poli-Pcv/PGE'nin Yalın PGE ile birlikte alınan impedans eğrileri

## BÖLÜM 5

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasının amacı, tek kullanımlı, ucuz ve kolayca temin edilebilen, modifikasyon işleminin kolayca yapılması, diğer karbon bazlı elektrotlara göre uzun süreli temizleme işlemleri gerektirmeme gibi avantajlara sahip olan PGE yüzeyine organik redoks mediyatörü olarak ASA boyar maddelerinden olan Clm, Trp, Cta ve Pcv ile modifiye etmek ve elde edilen modifiye elektrotlarla AEA sisteminde elektrokimyasal sensör ve biyosensör tasarlamaktır. Bu hedefler doğrultusunda aşağıdaki çalışmalar yapılmıştır.

i) PGE ve K.PGE çalışma elektrotlarının, aromatik sülfonik asit boyar maddeleri ile adsorpsiyon ve elektropolimerizasyon olmak üzere iki farklı şekilde modifiye edilmesi ve elde edilen modifiye elektrotların karakterizasyonunun sağlanması,

ii) Modifiye edilmiş bu elektrotlarla, biyosensör çalışmalarında önemli bir yeri olan NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinin incelenmesi,

iii) ASA boyar maddeleriyle modifiye edilmiş PGE elektrotu yüzeyine GDH enzimi immobilizasyonu sağlanarak  $NAD^+/NADH$  redoks ikilisine bağlı elektrokimyasal ve biyosensör geliştirilmesi,

iv) Daha önceki AE amperometrik çalışmalarda PGE'ye göre tasarlanıp ve başarıyla uygulanan bir fotoelektrokimyasal akış hücresinin (Dilgin, 2015; Sağlam ve ark., 2017), elde edilen ASA boyar maddeleriyle modifiye PGE'ler için kullanılması ve amperometrik sensör/biyosensörün AEA sistemine uygulanması,

v) ASA modifiye PGE yüzeyine enzim immobilize edilerek, GDH ve  $NAD^+/NADH$  redoks çiftine dayalı amperometrik glikoz biyosensörünün tasarlanması ve AEA sisteminde amperometrik glukoz biyosensörünün gerçekleştirilmesi

Buna göre bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.

- ✓ Çalışma Elektrodu Olan PGE'nin ASA Boyar Maddeleriyle Modifiye Edilmesi ve Elde Edilen Elektrotların Karakterizasyonu:

Materyal ve Yöntem Bölümünde anlatıldığı gibi birinci modifikasyon yönteminde; ASA boyar maddelerin PGE ve koşullandırılmış PGE (K.PGE) yüzeylerine adsorplanması amacıyla, bu mediyatörlerden hazırlanmış çözeltilere kalem uçları belirli bir süreyle daldırılmıştır. Bu şekilde adsorpsiyon yoluyla modifiye PGE'ler elde edilmiştir. İkinci modifikasyon yönteminde ise belirli bir potansiyel aralığında, farklı pH'lerde hazırlanan

BRBS destek elektrolitlerinde ve farklı döngü sayısında belirli bir derişimdeki ASA boyar maddelerinin döngüsel voltammogramları kaydedilmiştir. Bu işlemler sonucunda elektropolimerizasyon yoluyla ASA boyar maddelerinin PGE yüzeyinde ince bir polimerik film oluşturulmuş ve böylece hedeflenen modifiye çalışma elektrotu hazırlanmıştır.

Modifiye çalışma elektrotu hazırlandıktan sonra, bu elektrotların yüzeyinin, saf su ile yıkanmasının ardından, elektrokimyasal ölçümlerde optimize edilmiş koşullar altında NADH'nin elektrokatalitik yanıtlarına bakılmak üzere döngüsel voltammogramları alınmıştır. Hazırlanan modifiye elektrotlar için alınan döngüsel voltammogramlarda gözlenen pikler, PGE'nin modifikasyonunda kullanılan ASA boyar maddelerin, PGE yüzeyine başarılı bir şekilde modifiye edildiğini göstermektedir. Bunun dışında, ASA redoks mediyatörleri ile modifikasyonu yapılan PGE'lerin NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine karşı verdikleri yanıtlar incelendiğinde, Clm ve Pcv modifiye PGE'lerden daha iyi sonuçlar alınmıştır. Beklenen elektrokatalitik etkiyi gösteren bu modifiye PGE'lerin, impedans eğrilerinin alınması amacıyla  $10^{-1}$  M KCl içerecek şekilde  $10^{-2}$  M  $K_4[Fe(CN)_6]$  ,  $10^{-2}$  M  $K_3[Fe(CN)_6]$  çözeltileri hazırlandı. Ardından bu çözelti ortamında impedans ölçümleri yapılarak modifiye elektrotlar için gerekli elektrokimyasal karakterizasyon çalışması yapıldı. İmpedans eğrilerinden görüleceği gibi, adsorpsiyon yoluyla hazırlanan modifiye PGE ile yalın PGE karşılaştırıldığında, modifiye PGE'nin yük transfer direnci yalın PGE'ye göre arttığı, elektropolimerizasyonla hazırlanan modifiye PGE'lerde ise yük transfer direncinin azaldığı gözlenmiştir. Yalın PGE'nin yük transfer direnci esas alınarak impedans eğrilerinden alınan bu sonuçlar değerlendirildiğinde; modifiye elektrotların yük transfer direnci değerlerinin farklı olması, PGE'nin modifikasyon işlemi, PGE yüzeyinin organik redoks mediyatör amacıyla kullanılan bu ASA boyar maddeler ile başarılı bir şekilde modifiye edildiğini göstermektedir. Elektrotların impedans ölçümleri dışında, en iyi sonuçların alındığı yalın ve modifiye elektrotların SEM ve AFM görüntüleri ile Raman spektrumları da alınarak elektrotların yüzey karakterizasyon çalışmaları da yapılmıştır. SEM görüntülerinden Yalın PGE'nin katmanlı yapısına ait görüntüler elde edilmiş fakat PGE yüzeyinin hem adsorpsiyon hem de polimerizasyonla modifikasyonunda kullanılan ASA boyar maddelere ait önemli bir yüzey farklılığı tespit edilememiştir. Bu karakterizasyon çalışmaları dışında bir de elektrotların Raman spektrumları alındı. Modifiye elektrotların Raman spektrumlarındaki pikler ile Yalın PGE'nin Raman spektrumundaki pikler karşılaştırıldığında birbirine çok

yakın olduğu gözlemlendi. Ancak çok az da olsa 3 yeni pikin meydana geldiği görüldü. Bu Raman piklerinin yalnız PGE'nin modifiye edilmesiyle çok az miktarda pozitif kaydı tespit edilmiştir. Alınan bütün bu sonuçlara göre, PGE yüzeyinin bu ASA boyar maddeleriyle modifiye olduğunu göstermektedir.

✓ Modifiye PGE'lerde NADH'nin Elektrokatalitik Yükseltgenmesinin İncelenmesi:

Kalem grafit elektrotların modifiye edilmesinde iki yöntem uygulanmıştır. Bunlardan birincisi adsorpsiyon, ikincisi ise elektropolimerizasyondur. Clm, Trp, Pcv ve Cta mediyatörleri ile hazırlanan modifiye PGE'ler için en uygun destek elektroliti olarak optimize edilmiş (0,1 M KCl içeren pH=7,0 PBS) destek elektrolitinde NADH'ye karşı verdikleri elektrokatalitik yanıtların incelenmesi amacıyla ilk önce döngüsel voltammogramları kaydedildi. Daha sonra bu boyar maddelerle modifiye elektrotların NADH'nin yükseltgenmesi sırasında herhangi bir elektrokatalitik etki sağlayıp sağlamadığı araştırılmıştır. Döngüsel voltammogramların incelenmesi sonucunda, PGE'lerin modifiye edilmesinde hem adsorpsiyon hem de elektropolimerizasyon yoluyla hazırlanmasında kullanılan bu mediyatörlerden Trp ve Cta modifiye PGE'lerin, NADH'nin yükseltgenmesine iyi bir elektrokatalitik etkisinin olmadığı ve yalnız PGE'ye yakın sonuçlar verdikleri anlaşılmıştır. Adsorpsiyon yoluyla elde edilen Pcv/PGE, Poli-Pcv/PGE ve Poli-Clm/PGE'lerin ise NADH'nin yükseltgenmesinde elektrokatalitik yanıtının iyi olduğu yine bu voltammogramlardan belirlenmiştir. Bu voltammogramlara göre yalnız PGE'de yaklaşık 400-500 mV'da yayvan bir şekilde yükseltgenme piki veren NADH, modifiye elektrotların kullanılmasıyla NADH'nin yükseltgenme potansiyelinde 100 ile 200 mV civarında daha negatif yöne doğru bir kayma meydana getirmiş ve bunun da pik akımlarının artmasında önemli bir katkısı olmuştur. Buna ilaveten, adsorpsiyon yoluyla elde edilen Clm'nin (Clm/PGE) ise iyi bir elektrokatalitik katkı sağlamadığı tespit edilmiştir. Elektropolimerizasyon yoluyla hazırlanan Poli-Pcv modifiye PGE'lerinde NADH'ye elektrokatalitik yanıtının iyi olduğu tespit edilmiştir. Adsorpsiyon yoluyla elde edilen modifiye Pcv/PGE'lerin de benzer şekilde NADH'ye karşı iyi bir elektrokatalitik katkı sağladığı voltammogramlardan görülmüştür. Aromatik sülfonik asit boyar maddelerin kullanılmasıyla hazırlanan modifiye PGE'lerde NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi Giriş Bölümünde verilen Şekil 1.1'deki ECE mekanizmasına benzer şekilde açıklanmıştır. Bu mekanizmaya göre önce elektrot yüzeyinde yükseltgenmiş formda bulunan redoks mediyatörü (Clm, Pcv, Trp ve Cta ), NADH ile bir kimyasal

tepkimeye girer ve mediyatörün kendisi indirgenirken hedef analit olan NADH yükseltgenir. Redoks mediyatörün İndirgenmiş formu, elektronlarını elektroda vererek tekrar yükseltgenir ve NADH derişimine bağlı olarak bir elektrokatalitik akım meydana gelir.

✓ Modifiye PGE'ler Kullanılarak AEA Sisteminde NADH'nin Amperometrik Olarak Tayininin Yapılması: Dilgin ve arkadaşlarının daha önce 1001 TÜBİTAK projesinden ilk defa PGE için tasarlayıp ve başarıyla kullandığı fotoelektrokimyasal akış hücresi (Şekil 3.2) bu tez çalışmasında, AEA sisteminde modifiye elektrotların NADH'ye verdikleri amperometrik yanıtlarının tespitinde de kullanılmıştır (Dilgin, 2015; Sağlam ve ark., 2017). AE amperometrik çalışmalarında NADH'nin tayini için Poli-Clm/PGE, Pcv/PGE ve Poli-Pcv/PGE modifiye elektrotları kullanılmıştır. Hazırlanan modifiye elektrotlar için tespit edilmiş en uygun şartlarda, her bir elektrotta NADH'nin derişimine bağlı olarak kaydedilmiş AE amperometrik akım zaman eğrileri değerlendirilmiştir. Elde edilen analitiksel parametreler doğrultusunda (Çizelge 4.1'de verilen) Yalın PGE ile karşılaştırıldığında, modifiye elektrotlarla NADH için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin eğiminin, Yalın PGE'ye göre daha büyük olduğu doğru denklemden tespit edilmiştir.

Poli-Clm/PGE kullanılarak belirlenmiş şartlar altında AE amperometrik çalışmalarda girişim etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, Askorbik asit (AA), dopamin (DA) ve ürik asitin (UA), NADH'nin amperometrik akımlarının artması üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Benzer girişim çalışmaları yine Poli-Pcv/PGE için de kullanılarak AEA sisteminde belirlenmiş şartlar altında akım-zaman eğrileri kaydedilerek gerçekleştirildi. ASA boyar maddeleriyle modifiye PGE'de NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine DA, AA ve UA'nın önemli derecede pozitif girişim yaptığı ve NADH'nin yükseltgenme pikini çok büyük oranda artırdığı tespit edildi. Bu girişimcilerin literatürde askorbat oksidaz ve Nafyon membran kullanılarak giderilebileceği belirtilmekle birlikte (Kim ve ark., 2013; Pariente ve ark., 1997) bu maddeleri içermeyen örneklerde bu tür maddelerin kolaylıkla analiz edilebileceği sonucuna varıldı.

✓ Modifiye PGE İle Glikoz Dehidrogenaz Enzimi Kullanılarak NAD<sup>+</sup>/NADH Redoks Çiftine Bağlı Amperometrik Glikoz Biyosensör Tasarımı: Dehidrogenaz esaslı biyosensör çalışmasında GDH enzimi kullanılarak hazırlanan modifiye elektrotlar hem döngüsel voltammetride hem de AEA sisteminde amperometrik glikoz biyosensör çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Poli-Clm/PGE ve Poli-Pcv/PGE'lerin yüzeylerine enzimin



tutturulması, belirlenmiş şartlar altında gerçekleştirilmiştir. Modifiye elektrotların döngüsel voltammogramları, kofaktör  $\text{NAD}^+$  içeren  $\text{pH}=7,0$  PBS destek elektrolitinde glikoz ortamında kaydedilmiştir. Döngüsel voltammogramlar,  $\text{NAD}^+$  varlığında enzimatik tepkime sonucu glikozun derişimine bağılı olarak elde edilen  $\text{NADH}$ 'nin  $200-250$  mV civarında yükseltgendini (GDH tutturulmuş Yalın PGE'de ise yaklaşık  $400-500$  mV civarında yükseltgenirken) göstermiştir. Bu voltammogramlardan GDH enzim esaslı ve  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  redoks çiftine bağılı biyosensörün, ASA boyar madde ile modifiye PGE'ler kullanılarak hazırlanabileceğı sonucuna varılmıştır. Fakat GDH/Poli-Pcv/PGE'den elde edilen elektrokatalitik akım, GDH/Poli-Clm/PGE'den daha kararlı ve yüksek olduğu için AEA sisteminde amperometrik glikoz biyosensörüne ait çalışmalarında sadece GDH/Poli-Pcv/PGE modifiye elektrodunun kullanılmasına karar verilmiştir.

GDH/Poli-Pcv/PGE'de  $\text{NAD}^+$  içeren glikoz çözeltilerinin AEA sistemine enjekte edilmesi sonucunda glikoza ait AE amperometrik akım-zaman eğrileri, optimize edilmiş şartlar altında kaydedilmiştir. Elde edilen analitiksel parametrelere (Çizelge 4.2'de verilen) göre modifiye elektrodun yanıtının GDH/Yalın PGE'ye göre kıyaslandığında, oldukça daha duyar sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Literatür çalışmalarına bakıldığında, daha önce Poli-Pcv modifiye PGE kullanarak alkol dehidrogenaz enzim esaslı amperometrik etanol biyosensörü benzer mekanizmayla tasarlanmış (Zhu ve ark., 2014b) ve Dilgin ve çalışma grubu tarafından da kuantum nokta modifiye PGE'ler ile GDH enzim esaslı glikoz biyosensörü AEA sisteminde amperometrik ve fotoamperometrik olarak incelenmiştir (Ertek ve ark., 2016). Ancak ASA boyar maddelerinden birisi olan Pcv ile modifiye PGE'nin kullanımına ait AEA sisteminde herhangi bir biyosensör çalışmasına rastlanmamıştır. Dolayısıyla bu tez çalışmasında organik redoks mediyatörlerinden birisi olan Pcv, PGE'nin modifikasyonunda kullanılarak dehidrogenaz enzimi tutturulmuş ve  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  redoks çiftine bağılı ekonomik, hızlı duyar bir glikoz biyosensörü hazırlanmıştır.

Tasarlanan glikoz biyosensörüne AA, DA, UA, galaktoz, sakkaroz, glutamik asit gibi bileşiklerin girişim etkisinin olup olmadığı incelenmiş, bunlardan AA, UA ve DA'nin ciddi girişime neden olduğu tespit edilmiş ve bu girişimcilerin bulunduğu bir ortamda kesinlikle bunların giderilmesi gerektiğı, sonucuna varıldı. Bu girişimciler, literatürde bahsedildiğı gibi AA girişimi, askorbat oksidaz veya elektrot yüzeyine Nafyon membran modifiye edilerek (Kim ve ark., 2013; Pariente ve ark., 1997) DA ve UA ise  $\text{Pb(IV)}$  asetat

tutturulmuş Nafyon membran elektrot yüzeyine modifiye edilerek (Kim ve ark., 2013) giderilebilmektedir. Askorbat oksidazla yaptığımız çalışmada girişim gidermeye yönelik olumlu sonuçlar alınmıştır. Dolayısıyla, bu girişimcileri içermeyen örneklerde glikozun kolaylıkla analiz edilebileceği, aksi halde ise kesinlikle girişimlerin engellenmesi gerektiği sonucu çıkarılmıştır. Bu girişim maddelerini içermeyen ticari olarak satın alınmış %5'lik dekstroz çözeltisinde, standart katma yöntemi kullanılarak Poli-Pcv/PGE elektrot için glikoz tayini AEA sisteminde amperometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bu sonucun etikette verilen değere oldukça yakın olduğu tespit edilmiştir. Böylece AA, DA ve UA gibi önemli girişimcilerin bulunduğu bir ortamda glikozun, başarılı bir şekilde tasarlanan biyosensör ile tayin edilebileceği sonucuna varıldı.

Sonuç itibarıyla, tez çalışması kapsamında elektrokatalitik etki sağlayan ASA boyar maddeler (CIm, Pcv, Cta ve Trp) ile modifiye elektrotlar hazırlanması ve hazırlanan modifiye elektrotlarla NADH gibi bir çok analitin elektrokatalitik yanıtının incelenmesine ilişkin amperometrik sensör ve dehidrogenaz enzime bağlı biyosensör çalışmalarının literatürdeki yerini koruduğu görülmektedir. Ayrıca ilerleyen süreç içerisinde, bu tür çalışmaların sayısının hızlı bir şekilde arttığı yine literatür bilgilerinden anlaşılmaktadır. Gerçekleştirilen bu tez çalışmasının literatürlerden farkı, i) ekonomik açıdan ucuz, kolay ve tek kullanımlı PGE'nin ASA boyar maddelerinden CIm, Trp, Cta ve Pcv ile modifikasyonunun yapılması, ii) elde edilen modifiye elektrotlardan bir kısmının NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinde ilk olarak kullanılması, iii) organik redoks mediyatörler kullanılarak modifiye elektrotların hazırlanması ve ilk defa AEA sisteminde NADH'nin amperometrik sensörünün geliştirilmesi iv) modifiye elektrotlara dehidrogenaz enzimi tutturularak  $NAD^+/NADH$  redoks çiftine bağlı ilk defa AEA sisteminde amperometrik glikoz biyosensörünün tasarlanması v) ilk defa PGE için hazırlanan fotoelektrokimyasal akış hücresinin (Dilgin, 2015; Sağlam ve ark., 2017), bu tez çalışmasında da başarıyla kullanılmış olmasıdır.

Bu tez çalışması kapsamında;

i) elektrokimyasal sensör çalışmalarında birçok üstünlükleri içeren PGE gibi tek kullanımlı ve ucuz bir elektrotun,

ii) elektrokatalitik yükseltgenme çalışmalarında iyi bir redoks mediyatör özelliğine sahip olan ASA boyar maddelerinin,

iii) elektrokimyasal sensörlerle ilgili çalışmalarda devamlı ve hızlı bir şekilde analizlerden yanıtların alındığı, az örnek tüketimi gibi bir çok üstünlükleri barındıran, AEA'nın bir arada kullanımına fırsat veren etkili bir AE amperometrik sensör ve dehidrogenaz enzim esaslı ve  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  redoks çiftine bağlı AE amperometrik biyosensör tasarımı gerçekleştirilmiştir.



## KAYNAKLAR

- Aghaei F., Seifati S. M., Nasirizadeh N., 2017. Development of a DNA Biosensor for the Detection of Phenylketonuria Based on a Screen-Printed Gold Electrode and Hematoxylin. *Analytical Methods*, 9 (6): 966-973.
- Ahour F., Taheri M., 2018. Anodic Stripping Voltammetric Determination of Copper (II) Ions at a Graphene Quantum Dot-Modified Pencil Graphite Electrode. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 15 (2): 343-350.
- Akanda M. R., Sohail M., Aziz M. A., Kawde A. N., 2016. Recent Advances in Nanomaterial-Modified Pencil Graphite Electrodes for Electroanalysis. *Electroanalysis*, 28 (3): 408-424.
- Akhavan O., Ghaderi E., Rahighi R., Abdollah M., 2014. Spongy Graphene Electrode in Electrochemical Detection of Leukemia at Single-Cell Levels. *Carbon*, 79: 654-663.
- Ali I., Khan T., Omanovic S., 2014. Direct Electrochemical Regeneration of the Cofactor NADH on Bare Ti, Ni, Co and Cd Electrodes: The Influence of Electrode Potential and Electrode Material. *Journal of Molecular Catalysis A-Chemical*, 387: 86-91.
- Ayaz S., Dilgin Y., 2017. Flow Injection Amperometric Determination of Hydrazine Based on Its Electrocatalytic Oxidation at Pyrocatechol Violet Modified Pencil Graphite Electrode. *Electrochimica Acta*, 258: 1086-1095.
- Aydogdu G., Zeybek D. K., Zeybek B., Pekyardimci S., 2013. Electrochemical Sensing of NADH on NiO Nanoparticles-Modified Carbon Paste Electrode and Fabrication of Ethanol Dehydrogenase-Based Biosensor. *Journal of Applied Electrochemistry*, 43 (5): 523-531.
- Bai L., Wen D., Yin J., Deng L., Zhu C., Dong S., 2012. Carbon Nanotubes-Ionic Liquid Nanocomposites Sensing Platform for NADH Oxidation and Oxygen, Glucose Detection in Blood. *Talanta*, 91: 110-115.
- Baig N., Kawde A. N., 2015. A Novel, Fast and Cost Effective Graphene-Modified Graphite Pencil Electrode for Trace Quantification of L-Tyrosine. *Analytical Methods*, 7 (22): 9535-9541.

- Baskar S., Chang J. L., Zen J. M., 2012. Simultaneous Detection of NADH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Using Flow Injection Analysis Based on a Bifunctional Poly(Thionine)-Modified Electrode. *Biosensors & Bioelectronics*, 33 (1): 95-99.
- Bi S. P., Chen G., Liu J., Zou G. W., Gan N., 2000. Differential-Pulse Voltammetric Determination of Aluminum in Water by a Pyrocatechol Violet Modified Electrode. *Acta Chimica Sinica*, 58 (5): 494-499.
- Bolat G., Yaman Y. T., Abaci S., 2018. Highly Sensitive Electrochemical Assay for Bisphenol A detection Based on Poly (CTAB)/MWCNTs Modified Pencil Graphite Electrodes. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 255: 140-148.
- Bond Alan M., Mahona Peter J., Schiewe J., V Victoria ., 1997. An Inexpensive and Renewable Pencil Electrode for Use in Field-Based Stripping Voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, 345: 67-74.
- Broncova G., Shishkanova T. V., Matejka P., Kubac D., Kral V., 2016. Poly(Neutral Red) in Multilayer Electrode Systems. *Chemicke Listy*, 110 (11): 800-807.
- Brycht M., Burnat B., Skrzypek S., 2016. Square-wave Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of Pesticide Chlornitrofen, and its Corrosion Properties on Stainless Steels Used to Produce Agricultural Tools. *XXXVI Moderni Elektrochemicke Metody*: 23-27.
- Chaisuksant R., Chomsook T., Manthong N., Kalcher K., 2016. Low Cost Hydrogen Peroxide Sensor from Manganese Oxides Modified Pencil Graphite Electrode. *11th Asian Conference on Chemical Sensors*, 20: 81-84.
- Chakraborty S., Raj C. R., 2007. Amperometric Biosensing of Glutamate Using Carbon Nanotube Based Electrode. *Electrochemistry Communications*, 9 (6): 1323-1330.
- Campas M., Prieto-Simon B., Marty J. L., 2009. A review of the Use of Genetically Engineered Enzymes in Electrochemical Biosensors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20 (1): 3-9.
- Chamjangali M. A., Kouhestani H., Masdarolomoor F., Daneshinejad H., 2015. A Voltammetric Sensor Based on the Glassy Carbon Electrode Modified With Multi-Walled Carbon Nanotube/Poly(Pyrocatechol Violet)/Bismuth Film for Determination

- of Cadmium and Lead as Environmental Pollutants. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 216: 384-393.
- Chandra U., Swamy B. E. K., Gilbert O., Sherigara B. S., 2010. Voltammetric Resolution of Dopamine in the Presence of Ascorbic Acid and Uric acid at Poly (Calmagite) Film Coated Carbon Paste Electrode. *Electrochimica Acta*, 55 (24): 7166-7174.
- Chillawar R. R., Tadi K. K., Motghare R. V., 2015. Voltammetric Techniques at Chemically Modified Electrodes. *Journal of Analytical Chemistry*, 70 (4): 399-418.
- Christenson A., Dimcheva N., Ferapontova E. E., Gorton L., Ruzgas T., Stoica L., Shleev S., Yaropolov A. L., Haltrich D., Thorneley R. N. F., Aust S. D., 2004. Direct Electron Transfer Between Ligninolytic Redox Enzymes and Electrodes. *Electroanalysis*, 16 (13-14): 1074-1092.
- Cisneros-Garcia Z. N., Nieto-Delgado P. G., Rodriguez-Zavala J. G., 2015. Conformational Analysis on Protonation and Deprotonation of Calmagite in Protic Solvents and Its Reactivity Through Fukui Function. *Dyes and Pigments*, 121: 188-198.
- Ciucu A. A., 2014. Chemically Modified Electrodes in Biosensing. *Journal of Biosensors & Bioelectronics*, 5 (3): 1.
- Cooper J. A., Woodhouse K. E., Chippindale A. M., Compton R. G., 1999. Photoelectrochemical Determination of Ascorbic Acid Using Methylene Blue Immobilized in Alpha-zirconium Phosphate. *Electroanalysis*, 11 (17): 1259-1265.
- Cooper J. A., Wu M., Compton R. G., 1998. Photoelectrochemical Analysis of Ascorbic Acid. *Analytical Chemistry*, 70 (14): 2922-2927.
- Cosnier S., 2003. Biosensors Based on Electropolymerized Films: New trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377 (3): 507-520.
- Cosnier S., 2005. Affinity Biosensors Based on Electropolymerized Films. *Electroanalysis*, 17 (19): 1701-1715.

- Dagar K., Pundir C. S., 2017. An Improved Amperometric L-Lactate Biosensor Based on Covalent Immobilization of Microbial Lactate Oxidase Onto Carboxylated Multiwalled Carbon Nanotubes/Copper Nanoparticles/Polyaniline Modified Pencil Graphite Electrode. *Enzyme and Microbial Technology*, 96: 177-186.
- Dagci K., Alanyalioglu M., 2011. Surface-Confined Electropolymerization of Methylene Blue on Gold Electrodes. *Electroanalysis*, 23 (3): 777-783.
- de-los-Santos-Alvarez P., Lobo-Castanon M. J., Miranda-Ordieres A. J., Tunon-Blanco P., 2005. Electrocatalytic Oxidation of NADH by Brilliant Cresyl Blue-DNA Intercalation Adduct. *Electrochimica Acta*, 50 (5): 1107-1112.
- Dede E., Sağlam Ö., Dilgin Y., 2014. Sensitive Voltammetric Determination of Niclosamide at a Disposable Pencil Graphite Electrode. *Electrochimica Acta*, 127: 20-26.
- Dehghanzade M., Alipour E., 2016. Voltammetric Determination of Diazepam Using a Bismuth Modified Pencil Graphite Electrode. *Analytical Methods*, 8 (9): 1995-2004.
- Deng S.Y., Zhang G.-Y., Shan D., Liu Y.-H., Wang K., Zhang X.-J., 2015. Pyrocatechol Violet-Assisted in Situ Growth of Copper Nanoparticles on Carbon Nanotubes: The Synergic Effect for Electrochemical Sensing of Hydrogen Peroxide. *Electrochimica Acta*, 155: 78-84.
- Dervisevic M., Cevik E., Şenel M., 2015. Development of Glucose Biosensor Based on Reconstitution of Glucose Oxidase Onto Polymeric Redox Mediator Coated Pencil Graphite Electrodes. *Enzyme and Microbial Technology*, 68: 69-76.
- Dilgin D. G., Gligor D., Gokcel H. I., Dursun Z., Dilgin Y., 2010. Photoelectrocatalytic Oxidation of NADH in a Flow Injection Analysis System Using a Poly-Hematoxylin Modified Glassy Carbon Electrode. *Biosensors & Bioelectronics*, 26 (2): 411-417.
- Dilgin D. G., Gligor D., Gokcel H. I., Dursun Z., Dilgin Y., 2011. Glassy Carbon Electrode Modified With Poly-Neutral Red for Photoelectrocatalytic Oxidation of NADH. *Microchimica Acta*, 173 (3-4): 469-476.

- Dilgin D. G., Gokcel H. I., 2015. Photoelectrochemical Glucose Biosensor in Flow Injection Analysis System Based on Glucose Dehydrogenase Immobilized on Poly-Hematoxylin Modified Glassy Carbon Electrode. *Analytical Methods*, 7 (3): 990-999.
- Dilgin D. G., Karakaya S., 2016. Differential Pulse Voltammetric Determination of Acyclovir in Pharmaceutical Preparations Using a Pencil Graphite Electrode. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 63: 570-576.
- Dilgin Y., Canarslan S., Ayyildiz O., Ertek B., Nisli G., 2012a. Flow Injection Analysis of Sulphide Based on Its Photoelectrocatalytic Oxidation at Poly-Methylene Blue Modified Glassy Carbon Electrode. *Electrochimica Acta*, 66: 173-179.
- Dilgin Y., Dilgin D. G., Dursun Z., Gokcel H. I., Gligor D., Bayrak B., Ertek B., 2011. Photoelectrocatalytic Determination of NADH in a Flow Injection System with Electropolymerized Methylene Blue. *Electrochimica Acta*, 56 (3): 1138-1143.
- Dilgin Y., Dursun Z., Nisli G., 2003. Flow injection amperometric determination of ascorbic acid using a photoelectrochemical reaction after immobilization of methylene blue on muscovite. *Turkish Journal of Chemistry*, 27 (2): 167-180.
- Dilgin Y., Dursun Z., Nisli G., Gorton L., 2005. Photoelectrochemical Investigation of Methylene Blue Immobilised on Zirconium Phosphate Modified Carbon Paste Electrode in Flow Injection System. *Analytica Chimica Acta*, 542 (2): 162-168.
- Dilgin Y., Ertek B., Kizilkaya B., Dilgin D. G., Gokcel H. I., 2012b. Electrocatalytic Oxidation of NADH Using a Pencil Graphite Electrode Modified with Hematoxylin. *Science of Advanced Materials*, 4 (9): 920-927.
- Dilgin Y., Gorton L., Nisli G., 2007. Photoelectrocatalytic Oxidation of NADH with Electropolymerized Toluidine Blue O. *Electroanalysis*, 19 (2-3): 286-293.
- Dilgin Y., Kizilkaya B., Dilgin D. G., Gokcel H. I., Gorton L., 2013. Electrocatalytic Oxidation of NADH Using a Pencil Graphite Electrode Modified with Quercetin. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 102: 816-821.



- Dilgin Y., Kizilkaya B., Ertek B., Isik F., Dilgin D. G., 2012c. Electrocatalytic Oxidation of Sulphide Using a Pencil Graphite Electrode Modified with Hematoxylin. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 171: 223-229.
- Dilgin Y., Kizilkaya B., Ertek B., Erena N., Dilgin D. G., 2012. Amperometric Determination of Sulfide Based on Its Electrocatalytic Oxidation at a Pencil Graphite Electrode Modified with Quercetin. *Talanta*, 89: 490-495.
- Dilgin, Y. 2015. "Kuantum Noktalarla Modifiye Edilmiş Elektrotlar Kullanarak Akışa Enjeksiyon Analiz Sisteminde Fotoelektrokimyasal Sensör Tasarımı", 1001 TÜBİTAK Projesi (Proje No:112T375).
- Dos Santos W. T. P., Gimenes D. T., Richter E. M., Angnes L., 2011. Flow Injection Analysis with Multiple Pulse Amperometric Detection: Potentialities and Applications. *Quimica Nova*, 34 (10): 1753-1761.
- Du P., Wu P., Cai C., 2008. A Glucose Biosensor Based on Electrocatalytic Oxidation of NADPH at Single-Walled Carbon Nanotubes Functionalized with Poly(Nile Blue A). *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 624 (1-2): 21-26.
- Emir G., Dilgin Y., 2018. Flow Injection Analysis of Sulfide at a Calmagite-Modified Pencil Graphite Electrode. *Analytical Letters*, 51 (1-2): 133-150.
- Ertek B., Akgul C., Dilgin Y., 2016. Photoelectrochemical Glucose Biosensor Based on a Dehydrogenase Enzyme and NAD(+)/NADH Redox Couple Using a Quantum Dot Modified Pencil Graphite Electrode. *RSC Advances*, 6 (24): 20058-20066.
- Ertek B., Dilgin Y., 2016. Photoamperometric flow injection analysis of Glucose Biosensor Based on Dehydrogenase Modified Quantum Dots-Carbon Nanotube Nanocomposite Electrode. *Bioelectrochemistry*, 112: 138-144.
- Ertek B., Vu D. L., Cervenka L., Dilgin Y., 2012. Flow Injection Amperometric Detection of Sulfide Using a Prussian Blue Modified Glassy Carbon Electrode. *Analytical Sciences*, 28 (11): 1075-1080.
- Ertek B., 2016. Kuantum Nokta Modifiye Elektrotlar Kullanılarak Fotobiyosensör Tasarımı Ve Akışa Enjeksiyon Sisteminde Uygulanması. Doktora Tezi Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Sayfa:51.

- Fort C. I., Cotet L. C., Turdean G. L., Danciu V., 2015. Meldola Blue Immobilised on Mesoporous Carbon Aerogel - New Electrode Material for NADH Electrocatalytic Oxidation. *Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia*, 60 (3): 215-224.
- Gaudin V., 2017. Advances in Biosensor Development for the Screening of Antibiotic Residues in Food Products of Animal Origin - A Comprehensive Review. *Biosensors & Bioelectronics*, 90: 363-377.
- Gligor D., Dilgin Y., Popescu I. C., Gorton L., 2009a. Photoelectrocatalytic Oxidation of NADH at a Graphite Electrode Modified with a New Polymeric Phenothiazine. *Electroanalysis*, 21 (3-5): 360-367.
- Gligor D., Dilgin Y., Popescu I. C., Gorton L., 2009b. Poly-Phenothiazine Derivative-Modified Glassy Carbon Electrode for NADH Electrocatalytic Oxidation. *Electrochimica Acta*, 54 (11): 3124-3128.
- Golabi S. M., Zare H. R., Hamzehloo M., 2001. Electrocatalytic Oxidation of Hydrazine at a Pyrocatechol Violet (PCV) Chemically Modified Electrode. *Microchemical Journal*, 69 (2): 111-121.
- Golabi S. M., Zare H. R., Hamzehloo M., 2002. Electrochemistry and Electrocatalytic Activity of Pyrocatechol Violet (PCV) Film on a Glassy Carbon Electrode Towards the Oxidation of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide(NADH). *Electroanalysis*, 14 (9): 611-618.
- Golimowski J., Golimowska K., 1996. UV-Photooxidation as Pretreatment Step in Inorganic Analysis of Environmental Samples. *Analytica Chimica Acta*, 325 (3): 111-133.
- Gorton L., Domí E., 2002. Electrocatalytic Oxidation of NAD(P) H at Mediator-Modified Electrodes. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 82 (4): 371-392.
- Gorton L., Torstensson A., Jaegfeldt H., Johansson G., 1984. Electrocatalytic Oxidation of Reduced Nicotinamide Coenzymes by Graphite-Electrodes Modified with an Adsorbed Phenoxazinium Salt, Meldola Blue. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 161 (1): 103-120.

- Hansen E. H., Miro M., 2007. How Flow-Injection Analysis (FIA) Over the Past 25 years Has Changed Our Way of Performing Chemical Analyses. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 26 (1): 18-26.
- Hashemi P., Abolghasemi M. M., Alizadeh K., Zarjani R. A., 2008. A Calmagite Immobilized Agarose Membrane Optical Sensor for Selective Monitoring of Cu(2+). *Sensors and Actuators B-Chemical*, 129 (1): 332-338.
- Hedenmo M., Narvaez A., Dominguez E., Katakis I., 1996. Reagentless Amperometric Glucose Dehydrogenase Biosensor Based on Electrocatalytic Oxidation of NADH by Osmium Phenanthroline-dione Mediator. *Analyst*, 121 (12): 1891-1895.
- Heydari H., Gholivand M. B., Abdolmaleki A., 2016. Cyclic Voltammetry Deposition of Copper Nanostructure on MWCNTs Modified Pencil Graphite Electrode: An Ultra-Sensitive Hydrazine Sensor. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 66: 16-24.
- Hoshino T., Sekiguchi S.-i., Muguruma H., 2012. Amperometric Biosensor Based on Multilayer Containing Carbon Nanotube, Plasma-Polymerized Film, Electron Transfer Mediator Phenothiazine, and Glucose Dehydrogenase. *Bioelectrochemistry*, 84: 1-5.
- Hu S. S., Luo J., Cui D., 1999. An Enzyme-Chemically Modified Carbon Paste Electrode as a Glucose Sensor Based on Glucose Oxidase Immobilized in a Polyaniline Film. *Analytical Sciences*, 15 (6): 585-588.
- Hughes G., Pemberton R. M., Fielden P. R., Hart J. P., 2016. The Design, Development and Application of Electrochemical Glutamate Biosensors. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 79: 106-113.
- Jadon N., Jain R., Sharma S., Singh K., 2016. Recent Trends in Electrochemical Sensors for Multianalyte Detection - A review. *Talanta*, 161: 894-916.
- Jafari F., Salimi A., Navaee A., 2014. Electrochemical and Photoelectrochemical Sensing of Dihyronicotinamide Adenine Dinucleotide and Glucose Based on Noncovalently Functionalized Reduced Graphene Oxide-Cadmium Sulfide Quantum Dots/Poly-Nile Blue Nanocomposite. *Electroanalysis*, 26 (8): 1782-1793.

- Jiang Y. Y., Yuan Y., Wang K., Li H. H., Xu C. Z., Yang X. D., 2012. Spectroscopic and Electrochemical Studies on the Binding of Pyrocatechol Violet with Telomere DNA and Its Application. *International Journal of Electrochemical Science*, 7 (11): 10933-10951.
- Karakaya S., Dilgin Y., 2017. Flow Injection Amperometric Analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at Platinum Nanoparticles Modified Pencil Graphite Electrode. *Electroanalysis*, 29 (6): 1626-1634.
- Karaman Y., 2014. Investigation of Electrochemical Behavior of Calmagite at a Glassy Carbon Electrode. *Dyes and Pigments*, 106: 39-44.
- Karimi-Maleh H., Sanati A. L., Gupta V. K., Yoosefian M., Asif M., Bahari A., 2014. A Voltammetric Biosensor Based on Ionic Liquid/NiO Nanoparticle Modified Carbon Paste Electrode for the Determination of Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH). *Sensors and Actuators B-Chemical*, 204: 647-654.
- Karyakin A. A., Karyakina E. E., Schmidt H. L., 1999a. Electropolymerized Azines: A New Group of Electroactive Polymers. *Electroanalysis*, 11 (3): 149-155.
- Karyakin A. A., Karyakina E. E., Schuhmann W., Schmidt H. L., 1999b. Electropolymerized Azines: Part II. In a Search of the Best Electrocatalyst of NADH Oxidation. *Electroanalysis*, 11 (8): 553-557.
- Katakis I., Dominguez E., 1997. Catalytic Electrooxidation of NADH for Dehydrogenase Amperometric Biosensors. *Mikrochimica Acta*, 126 (1-2): 11-32.
- Kawde A. N., Baig N., Sajid M., 2016. Graphite Pencil Electrodes as Electrochemical Sensors for Environmental Analysis: a Review of Features, Developments, and Applications. *RSC Advances*, 6 (94): 91325-91340.
- Kawde A. N., Aziz M. A., El-Zohri M., Baig N., Odewunmi N., 2017. Cathodized Gold Nanoparticle-Modified Graphite Pencil Electrode for Non-Enzymatic Sensitive Voltammetric Detection of Glucose. *Electroanalysis*, 29 (5): 1214-1221.
- Kayan D. B., Kocak D., Ilhan M., Koca A., 2017. Electrocatalytic Hydrogen Production on a Modified Pencil Graphite Electrode. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42 (4): 2457-2463.

- Kertesz V., Van Berkel G. J., 2001. Electropolymerization of Methylene Blue Investigated Using on-Line Electrochemistry/Electrospray Mass Spectrometry. *Electroanalysis*, 13 (17): 1425-1430.
- Khan A. Y., Kumar G. S., 2015. A thermodynamic Investigation on the Binding of Phenothiazinium Dyes Azure A and Azure B to Double Stranded RNA Polynucleotides. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 91: 225-233.
- Kim D. M., Kim M. Y., Reddy S. S., Cho J., Cho C. H., Jung S., Shim Y. B., 2013. Electron-Transfer Mediator for a NAD-Glucose Dehydrogenase-Based Glucose Sensor. *Analytical Chemistry*, 85 (23): 11643-11649.
- Kortazar L., Alberdi S., Tynan E., Fernandez L. A., 2016. An Adapted Flow Injection Analysis Method of Phosphate for Estuarine Samples Avoiding Matrix Effects. *Microchemical Journal*, 124: 416-421.
- Kossakowska A., Pijanowska D. G., Kruk J., Torbicz W., 2010. Electropolymerization of Methylene Green on Gold and Platinum Electrodes for Quantitative Ascorbic Acid Determination. *Sensor Letters*, 8 (5): 713-719.
- Kumar S. A., Chen S. M., 2008. Electroanalysis of NADH Using Conducting and Redox Active Polymer/Carbon Nanotubes Modified Electrodes - A Review. *Sensors*, 8 (2): 739-766.
- Lates V., Gligor D., Muresan L. M., Popescu I. C., 2011. Comparative Investigation of NADH Electrooxidation at Graphite Electrodes Modified with Two New Phenothiazine Derivatives. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 661 (1): 192-197.
- Liv L., Nakiboglu N., 2018. Voltammetric Determination of Boron using Poly Xylenol Orange-Modified Pencil Graphite Electrode. *Analytical Letters*, 51 (1-2): 170-185.
- Lemos V. A., Santos L. N., Alves A. P. O., David G. T., 2006. Chromotropic Acid-Functionalized Polyurethane Foam: A New Sorbent for on-Line Preconcentration and Determination of Cobalt and Nickel in Lettuce Samples. *Journal of Separation Science*, 29 (9): 1197-1204.

- Levitskaya G. D., Timoshuk S. V., Gritsai V. M., 2003. Oscillopolarography of Palladium(II)-Tropeolin 0 Complexes. *Journal of Analytical Chemistry*, 58 (11): 1065-1068.
- Li L., Lu H., Deng L., 2013. A sensitive NADH and Ethanol Biosensor Based on Graphene–Au Nanorods Nanocomposites. *Talanta*, 113: 1-6.
- Li Z., Huang Y., Chen L., Qin X. L., Huang Z., Zhou Y. P., Meng Y., Li J., Huang S. Y., Liu Y., Wang W., Xie Q. J., Yao S. Z., 2013. Amperometric Biosensor for NADH and Ethanol Based on Electroreduced Graphene Oxide-Polythionine Nanocomposite Film. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 181: 280-287.
- Lin K. C., Lin Y. C., Chen S. M., 2012. Electrocatalytic Reaction of Hydrogen Peroxide and NADH Based on Poly (Neutral Red) and FAD Hybrid Film. *Analyst*, 137 (1): 186-194.
- Liu H. J., Yang D. W., Liu H. H., 2012. A Hydrogen Peroxide Sensor Based on the Nanocomposites of Poly(Brilliant Cresyl Blue) and Single Walled-Carbon Nanotubes. *Analytical Methods*, 4 (5): 1421-1426.
- Liu S. Q., Dai G. P., Yuan L., Zhao Y. P., 2012. A NADH Sensor Based on 1,2-Naphthoquinone Electropolymerized on Multi-walled Carbon Nanotubes Modified Glassy Carbon Electrode. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 59 (11): 1409-1414.
- Lobo M. J., Miranda A. J., Tunon P., 1997. Amperometric Biosensors Based on NAD(P)-Dependent Dehydrogenase Enzymes. *Electroanalysis*, 9 (3): 191-202.
- Lourencao B. C., Medeiros R. A., Fatibello O., 2015. Simultaneous Determination of Antihypertensive Drugs by Flow Injection Analysis Using Multiple Pulse Amperometric Detection with a Cathodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 754: 154-159.
- Ma X. Y., Chen M. F., Wu Y. C., Li X., Zhang S. M., 2016a. Studies on the Electrochemical Behavior of Chlorogenic Acid and Its Interaction with DNA at a Graphene Modified Electrode. *International Journal of Electrochemical Science*, 11 (10): 8499-8511.

- Ma X. Y., Yang H. Q., Xiong H. B., Li X. F., Gao J. T., Gao Y. T., 2016b. Electrochemical Behavior and Determination of Chlorogenic Acid Based on Multi-Walled Carbon Nanotubes Modified Screen-Printed Electrode. *Sensors*, 16 (11).
- Mazar F. M., Alijanianzadeh M., Molaeirad A., Heydari P., 2017. Development of Novel Glucose Oxidase Immobilization on Graphene/Gold nanoparticles/Poly Neutral red Modified Electrode. *Process Biochemistry*, 56: 71-80.
- Mazloun-Ardakani M., Sadeghiane A., Moosavizadeh S., Karimi M. A., Mashhadizadeh M. H., 2009. Electrocatalytic Determination of Hydrazine Using Glassy Carbon Electrode with Calmagates. *Analytical Bioanalytical Electrochemistry*, 1 (3): 224-338.
- Meredith M. T., Giroud F., Minter S. D., 2012. Azine/Hydrogel/Nanotube Composite-Modified Electrodes for NADH Catalysis and Enzyme Immobilization. *Electrochimica Acta*, 72: 207-214.
- Muguruma H., Yoshida S., Urata M., Fujisawa K., Matsui Y., 2008. An amperometric Biosensor for Glucose Based on a Composite Electrode of Glucose Dehydrogenase, Carbon Nanotubes, and Plasma-Polymerized Thin Films. *Electrochemistry*, 76 (8): 545-548.
- Mutyala S., Mathiyarasu J., 2016. A highly sensitive NADH Biosensor Using Nitrogen Doped Graphene Modified Electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 775: 329-336.
- Nateghi M. R., Bagheri A., Massoumi A., Kazemeini M. H., 1998. Pyrocatechol Violet Loaded Polypyrrole Modified Glassy Carbon Electrode for the Determination of Copper Species by Anodic Stripping Differential Pulse Voltammetry. Investigation of Effects of Film Morphology and Counter Ions on Modified Mlectrode Characteristics. *Synthetic Metals*, 96 (3): 209-212.
- Nematollahi D., Golabi S. M., 1996. Electrochemical Study of Catechol and 4-Methylcatechol in Methanol. Application to the Electro-Organic Synthesis of 4,5-Dimethoxy- and 4-Methoxy-5-Methyl-o-Benzoquinone. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 405 (1-2): 133-140.

- Nigovic B., 2006. Electrochemical Properties and Square-Wave Voltammetric Determination of Pravastatin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384 (2): 431-437.
- Özkorucuklu S. P., Yildirim G., Koseoglu T. S., Karipcin F., Kir E., 2017. Voltammetric Determination of Mercury(II) Using a Modified Pencil Graphite Electrode with 4-(4-Methylphenyl Aminoisonitrosoacetyl)Biphenyl. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 14 (8): 1651-1657.
- Özcan A., Ilkbas S., 2015a. Poly(Pyrrrole-3-Carboxylic acid)-Modified Pencil Graphite Electrode for the Determination of Serotonin in Biological Samples by Adsorptive Stripping Voltammetry. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 215: 518-524.
- Özcan A., Ilkbas S., 2015b. Preparation of Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene) Nanofibers Modified Pencil Graphite Electrode and Investigation of Over-Oxidation Conditions for the Selective and Sensitive Determination of Uric Acid in Body Fluids. *Analytica Chimica Acta*, 891: 312-320.
- Özcan A., Ilkbas S., Ozcan A. A., 2017. Development of a Disposable and Low-Cost Electrochemical Sensor for Dopamine Detection Based on Poly(Pyrrrole-3-Carboxylic Acid)-Modified Electrochemically Over-Oxidized Pencil Graphite Electrode. *Talanta*, 165: 489-495.
- Özcan A., Şahin Y., 2011. A Novel Approach for the Determination of Paracetamol Based on the Reduction of N-Acetyl-p-Benzoquinoneimine Formed on the Electrochemically Treated Pencil Graphite Electrode. *Analytica Chimica Acta*, 685 (1): 9-14.
- Pandey P. C., Upadhyay S., Tiwari I., Tripathi V. S., 2001. A Novel Ormosil Based Electro Catalytic Biosensor for Glucose/Ethanol Based on Dehydrogenase Modified Electrode. *Electroanalysis*, 13 (10): 820-825.
- Pariente F., Tobalina F., Moreno G., Hernandez L., Lorenzo E., Abruna H. D., 1997. Mechanistic Studies of the Electrocatalytic Oxidation of NADH and Ascorbate at Glassy Carbon Electrodes Modified with Electrodeposited Films Derived From 3,4-Dihydroxybenzaldehyde. *Analytical Chemistry*, 69 (19): 4065-4075.



- Paul P., Mati S. S., Bhattacharya S. C., Kumar G. S., 2017. Exploring the Interaction of Phenothiazinium Dyes Methylene Blue, New Methylene Blue, Azure A and azure B with tRNA(Phe): Spectroscopic, Thermodynamic, Voltammetric and Molecular Modeling Approach. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19 (9): 6636-6653.
- Petzer A., Harvey B. H., Wegener G., Petzer J. P., 2012. Azure B, a Metabolite of Methylene Blue, is a High-Potency, Reversible Inhibitor of Monoamine Oxidase. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258 (3): 403-409.
- Piano M., Serban S., Biddle N., Pittson R., Drago G. A., Hart J. P., 2010. A Flow Injection System, Comprising a Biosensor Based on a Screen-Printed Carbon Electrode Containing Meldola's Blue-Reinecke Salt Coated with Glucose Dehydrogenase, for the Measurement of Glucose. *Analytical Biochemistry*, 396 (2): 269-274.
- Pokpas K., Zbeda S., Jahed N., Mohamed N., Baker P. G., Iwuoha E. I., 2014. Electrochemically Reduced Graphene Oxide Pencil-Graphite in Situ Plated Bismuth-Film Electrode for the Determination of Trace Metals by Anodic Stripping Voltammetry. *International Journal of Electrochemical Science*, 9 (2): 736-759.
- Pourbeyram S., Mehdizadeh K., 2016. Nonenzymatic Glucose Sensor based on Disposable Pencil Graphite Electrode Modified by Copper Nanoparticles. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24 (4): 894-902.
- Radoi A., Compagnone D., 2009. Recent Advances in NADH Electrochemical Sensing Design. *Bioelectrochemistry*, 76 (1-2): 126-134.
- Rasouli Z., Ghavami R., 2016. Simultaneously Detection of Calcium and Magnesium in Various Samples by Calmagite and Chemometrics Data Processing. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 169: 72-81.
- Ribeiro G. H., Vilarinho L. M., Ramos T. d. S., Bogado A. L., Dinelli L. R., 2015. Electrochemical Behavior of Hydroquinone and Catechol at Glassy Carbon Electrode Modified by Electropolymerization of Tetraruthenated Oxovanadium Porphyrin. *Electrochimica Acta*, 176: 394-401.
- Rocha D. L., Kamogawa M. Y., Rocha F. R. P., 2015. A critical Review on Photochemical Conversions in Flow Analysis. *Analytica Chimica Acta*, 896: 11-33.

- Roushani M., Karami M., Dizajdizi B. Z., 2017. Amperometric NADH Sensor Based on a Carbon Ceramic Electrode Modified with the Natural Carotenoid Crocin and Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Microchimica Acta*, 184 (2): 473-481.
- Saglam Ö., Dilgin D. G., Ertek B., Dilgin Y., 2016a. Differential Pulse Voltammetric Determination of Eugenol at a Pencil Graphite Electrode. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 60: 156-162.
- Saglam Ö., Dilgin Y., 2017. Fabrication of Photoelectrochemical Glucose Biosensor in Flow Injection Analysis System Using ZnS/CdS-Carbon Nanotube Nanocomposite Electrode. *Electroanalysis*, 29 (5): 1368-1376.
- Sağlam Ö., Kizilkaya B., Uysal H., Dilgin Y., 2016b. Biosensing of Glucose in Flow Injection Analysis System Based on Glucose Oxidase-Quantum Dot Modified Pencil Graphite Electrode. *Talanta*, 147: 315-321.
- Şahin I., Nakiboglu N., 2014. Adsorptive Cathodic Stripping Voltammetric Determination of Antimony in the Presence of Copper and Bismuth by Using Hematoxylin. *Fresenius Environmental Bulletin*, 23 (9a): 2218-2223.
- Sajid M., Nazal M. K., Mansha M., Alsharaa A., Jillani S. M. S., Basheer C., 2016. Chemically Modified Electrodes for Electrochemical Detection of Dopamine in the Presence of Uric Acid and Ascorbic Acid: A review. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 76: 15-29.
- Saleh F. S., Mao L. Q., Ohsaka T., 2011a. Development of a Dehydrogenase-Based Glucose Anode Using a Molecular Assembly Composed of Nile Blue and Functionalized SWCNTs and Its Applications to a Glucose Sensor and Glucose/O<sub>2</sub> Biofuel Cell. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 152 (1): 130-135.
- Saleh F. S., Rahman M. R., Okajima T., Mao L. Q., Ohsaka T., 2011b. Determination of Formal Potential of NADH/NAD(+) Redox Couple and Catalytic Oxidation of NADH Using Poly(Phenosafranin)-Modified Carbon Electrodes. *Bioelectrochemistry*, 80 (2): 121-127.

- Sehat A. A., Khodadadi A. A., Shemirani F., Mortazavi Y., 2015. Fast Immobilization of Glucose Oxidase on Graphene Oxide for Highly Sensitive Glucose Biosensor Fabrication. *International Journal of Electrochemical Science*, 10 (1): 272-286.
- Sha Y. F., Gao Q., Qi B., Yang X. R., 2004. Electropolymerization of Azure B on a Screen-Printed Carbon Electrode and Its Application to the Determination of NADH in a Flow Injection Analysis System. *Microchimica Acta*, 148 (3-4): 335-341.
- Shan C. S., Yang H. F., Han D. X., Zhang Q. X., Ivaska A., Niu L., 2010. Electrochemical Determination of NADH and Ethanol Based on Ionic Liquid-Functionalized Graphene. *Biosensors & Bioelectronics*, 25 (6): 1504-1508.
- Sharma V. K., Trnkova L., 2016. Copper Nanoparticle Modified Pencil Graphite Electrode for Electroanalysis of Adenine. *Electroanalysis*, 28 (11): 2834-2840.
- Sheng Q., Yu H., Zheng J., 2007. Hydrogen Peroxide Determination by Carbon Ceramic Electrodes Modified with Pyrocatechol Violet. *Electrochimica Acta*, 52 (25): 7300-7306.
- Silber A., Brauchle C., Hampp N., 1995. Electrocatalytic Oxidation of Reduced Nicotinamide Adenine-Dinucleotide (Nadh) at Thick-Film Gold Electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 390 (1-2): 83-89.
- Silber A., Hampp N., Schuhmann W., 1996. Poly(Methylene Blue)-Modified Thick-Film Gold Electrodes for the Electrocatalytic Oxidation of NADH and Their Application in Glucose Biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*, 11 (3): 215-223.
- Simanaviciute D., Klimaviciute R., Rutkaite R., 2017. Equilibrium Adsorption of Caffeic, Chlorogenic and Rosmarinic Acids on Cationic Cross-Linked Starch with Quaternary Ammonium Groups. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95: 788-795.
- Simon E., Bartlett P. (2002). *Biomolecular Films, Design, Function and Applications*. In: Marcel Dekker, New York.

- Sürücü O., Bolat G., Abaci S., 2017. Electrochemical Behavior and Voltammetric Detection of Fenitrothion Based on a Pencil Graphite Electrode Modified with Reduced Graphene Oxide(RGO)/Poly(E)-1-(4(4-(Phenylamino) Phenyl) Diazenyl) Phenyl) Ethanone (DPA) Composite Film. *Talanta*, 168: 113-120.
- Sleem H. F., Dawe L. N., Georghiou P. E., 2013. Synthesis of Macrocyclic Chromotropic Acid-Based Sulfonamides; Their Complexation Properties and an Unexpected Photochemical Reaction. *Tetrahedron Letters*, 54 (26): 3444-3448.
- Svancara I., Vytras K., Barek J., Zima J., 2001. Carbon Paste Electrodes in Modern Electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31 (4): 311-345.
- Talemi R. P., Mousavi S. M., Afruzi H., 2017. Using Gold Nanostars Modified Pencil Graphite Electrode as a Novel Substrate for Design a Sensitive and Selective Dopamine Aptasensor. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 73: 700-708.
- Teymourian H., Salimi A., Hallaj R., 2012. Electrocatalytic Oxidation of NADH at Electrogenerated NAD<sup>+</sup> Oxidation Product Immobilized Onto Multiwalled Carbon Nanotubes/Ionic Liquid Nanocomposite: Application to Ethanol Biosensing. *Talanta*, 90: 91-98.
- Themelis D. G., Kika F. S., 2006. Flow and Sequential Injection Methods for the Spectrofluorimetric Determination of Aluminium in Pharmaceutical Products Using Chromotropic acid as Chromogenic Reagent. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41 (4): 1179-1185.
- Trojanowicz M., 2016. Flow Chemistry vs. Flow Analysis. *Talanta*, 146: 621-640.
- Trojanowicz M., Krawczyk T. K. V., 1995. Electrochemical Biosensors Based on Enzymes Immobilized in Electropolymerized Films. *Microchimica Acta*, 121 (1-4): 167-181.
- Tsai Y. C., Chen S. Y., Liaw H. W., 2007. Immobilization of Lactate Dehydrogenase Within Multiwalled Carbon Nanotube-Chitosan Nanocomposite Site for Application to Lactate Biosensors. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 125 (2): 474-481.

- Uygun Z. O., Dilgin Y., 2013. A Novel Impedimetric Sensor Based on Molecularly Imprinted Polypyrrole Modified Pencil Graphite Electrode for Trace Level Determination of Chlorpyrifos. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 188: 78-84.
- Villamil M. J. F., Ordieres A. J. M., Blanco P. T., 1997. Immobilized Enzyme Electrode for the Determination of L-lactate in Food Samples. *Analytica Chimica Acta*, 345 (1-3): 37-43.
- Vishnu N., Kumar A. S., 2017. Development of Prussian Blue and Fe(bpy)<sub>3</sub>(<sup>2+</sup>) Hybrid Modified Pencil Graphite Electrodes Utilizing Its Intrinsic Iron for Electroanalytical Applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 786: 145-153.
- Vu D. L., Ertek B., Dilgin Y., Cervenka L., 2015a. Voltammetric Determination of Tannic Acid in Beverages Using Pencil Graphite Electrode. *Czech Journal of Food Sciences*, 33 (1): 72-76.
- Vu D. L., Zabcikova S., Cervenka L., Ertek B., Dilgin Y., 2015b. Sensitive Voltammetric Determination of Natural Flavonoid Quercetin on a Disposable Graphite Lead. *Food Technology and Biotechnology*, 53 (4): 379-384.
- Wang J., 2001. Glucose biosensors: 40 years of Advances and Challenges. *Electroanalysis*, 13 (12): 983-988.
- Wang Y., 2011. Simultaneous Determination of Uric Acid, Xanthine and Hypoxanthine at Poly(Pyrocatechol Violet)/Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes Composite Film Modified Electrode. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88 (2): 614-621.
- Wang Y., Zhou D. M., Chen H. Y., 1997. The Electrochemical Polymerization of Brilliant Cresyl Blue and Its Electrocatalytic Oxidation for NADH. *Chemical Research in Chinese Universities*, 13 (3): 276-282.
- Wang Z. H., Xia J. F., Zhu L. Y., Chen X. Y., Zhang F. F., Yao S. Y., Li Y. H.,
- Xia Y. Z., 2011. A Selective Voltammetric Method for Detecting Dopamine at Quercetin Modified Electrode Incorporating Graphene. *Electroanalysis*, 23 (10): 2463-2471.

- Wieck H. J., Heider G. H., Yacynych A. M., 1984. Chemically Modified Reticulated Vitreous Carbon Electrode with Immobilized Enzyme as a Detector in Flow-Injection Determination of Glucose. *Analytica Chimica Acta*, 158 (1): 137-141.
- Xiao X. L., Zhou B., Tan L., Tang H., Zhang Y. Y., Xie Q. J., Yao S. Z., 2011. Poly(Methylene Blue) Doped Silica Nanocomposites with Crosslinked Cage Structure: Electropolymerization, Characterization and Catalytic Activity for Reduction of Dissolved Oxygen. *Electrochimica Acta*, 56 (27): 10055-10063.
- Yang D. W., Liu H. H., 2009. Poly(Brilliant Cresyl Blue)-Carbonnanotube Modified Electrodes for Determination of NADH and Fabrication of Ethanol Dehydrogenase-Based Biosensor. *Biosensors & Bioelectronics*, 25 (4): 733-738.
- Yang L. T., Xu B. J., Ye H. L., Zhao F. Q., Zeng B. Z., 2017. A novel Quercetin Electrochemical Sensor Based on Molecularly Imprinted Poly(Para-Aminobenzoic Acid) on 3D Pd Nanoparticles-Porous Graphene-Carbon Nanotubes Composite. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 251: 601-608.
- You J. M., Jeon S., 2011. Electrocatalytic Oxidation of NADH on a Glassy Carbon Electrode Modified with MWCNT-Pd Nanoparticles and Poly 3,4-Ethylenedioxy pyrrole. *Electrochimica Acta*, 56 (27): 10077-10082.
- Yu J. B., Jin H., Gui R. J., Lv W., Wang Z. H., 2017. A Facile Strategy for Ratiometric Electrochemical Sensing of Quercetin in Electrolyte Solution Directly Using Bare Glassy Carbon Electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 795: 97-102.
- Zare H. R., Nasirizadeh N., Mazloum-Ardakani M., Namazian M., 2006. Electrochemical Properties and Electrocatalytic Activity of Hematoxylin Modified Carbon Paste Electrode Toward the Oxidation of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH). *Sensors and Actuators B-Chemical*, 120 (1): 288-294.
- Zen J. M., Kumar A. S., Tsai D. M., 2003. Recent Updates of Chemically Modified Electrodes in Analytical Chemistry. *Electroanalysis*, 15 (13): 1073-1087.
- Zhang M. G., Smith A., Gorski W., 2004. Carbon Nanotube-Chitosan System for Electrochemical Sensing Based on Dehydrogenase Enzymes. *Analytical Chemistry*, 76 (17): 5045-5050.

- Zhang X. H., Chen L. B., Wei Z. H., 2011. Synthesis and Application Gold Nanoparticles/Meldola's Blue Colloids as NADH Biosensors. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 39 (12): 1934-1935.
- Zhao R. J., Jiang Q., Sun W., Jiao K., 2009. Electropolymerization of Methylene Blue on Carbon Ionic Liquid Electrode and Its Electrocatalysis to 3,4-Dihydroxybenzoic Acid. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 56 (1): 158-163.
- Zhao Z. X., Zhang C. X., Li N., Zhang X. S., 2015. Determination of Trace Nickel in Natural Water by Flow Injection Analysis with Cetrimonium Bromide as Sensitizer. *Journal of Applied Spectroscopy*, 82 (5): 882-887.
- Zheng R. J., Zhong J. H., Zhao C. H., Lang X. L., Hu Z. B., Luo J. S., 2017. An Ultrasensitive Electrochemiluminescent Sensor Based on a Pencil Graphite Electrode Modified with CdS Nanorods for Detection of Chlorogenic Acid in Honeysuckle. *Luminescence*, 32 (5): 806-811.
- Zhong C. Y., Xu A. H., Chen L., Yang X. H., Yang B. K., Hong W. T., Mao K. W., Wang B. Y., Zhou J. G., 2014. Production of a Biofloculant From Chromotropic Acid Waste Water and Its Application in Steroid Estrogen Removal. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 122: 729-737.
- Zhu J., Chauhan D. S., Shan D., Wu X. Y., Zhang G. Y., Zhang X. J., 2014a. Ultrasensitive Determination of Hydrazine Using a Glassy Carbon Electrode Modified with Pyrocatechol Violet Electrodeposited on Single Walled Carbon Nanotubes. *Microchimica Acta*, 181 (7-8): 813-820.
- Zhu J., Wu X.-Y., Shan D., Yuan P.-X., Zhang X.-J., 2014b. Sensitive Electrochemical Detection of NADH and Ethanol at Low Potential Based on Pyrocatechol Violet Electrodeposited on Single Walled Carbon Nanotubes-Modified Pencil Graphite Electrode. *Talanta*, 130: 96-102.
- Zlamalova M., Janda P., Nesmerak K., 2014. Electropolymerization of Methylene Blue on Highly Oriented Pyrolytic Graphite and Characterization of Deposited Film. XXXIV. *Moderni Elektrochemicke Metody*: 246-249.

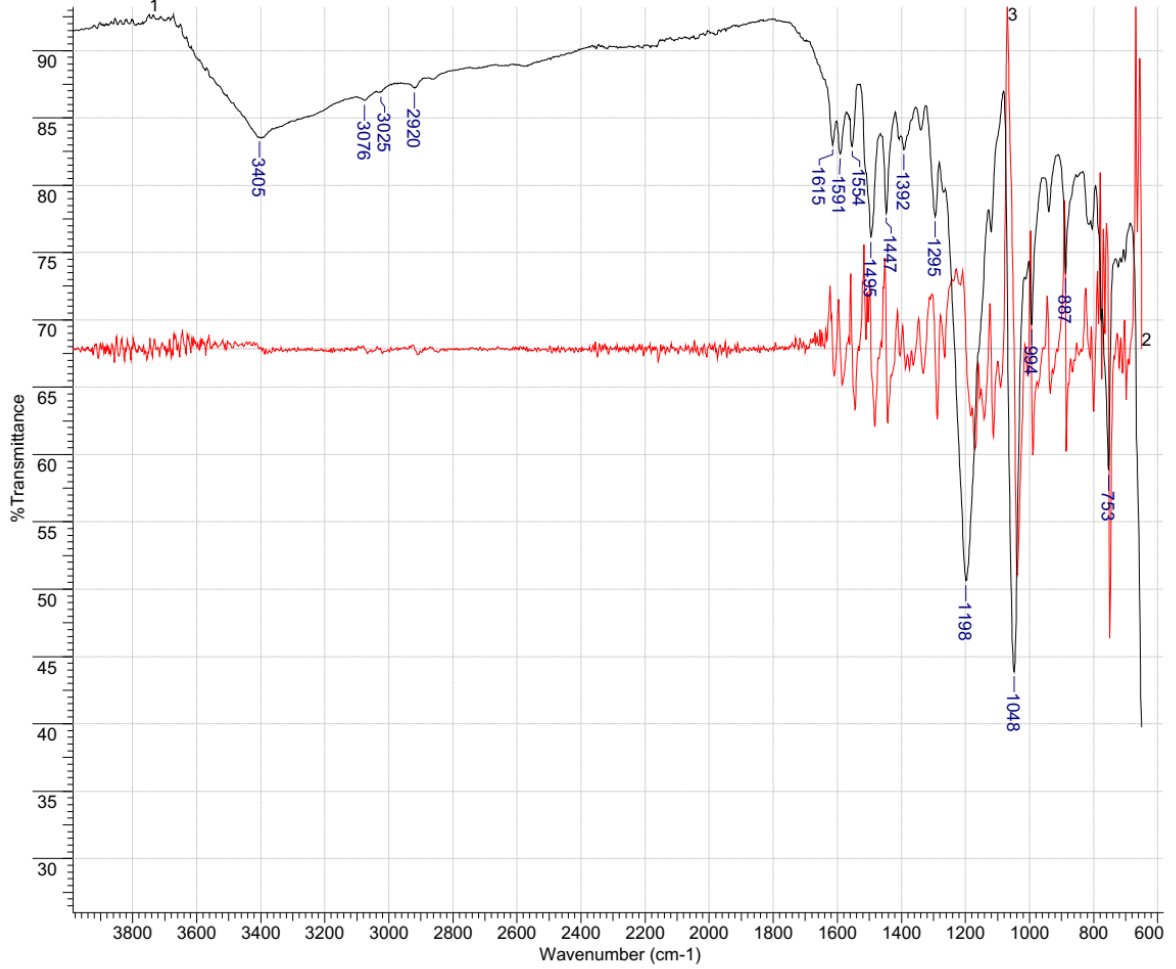




# EK 1. Tez çalışmasında PGE'nin modifiyesinde kullanılan Clm'ye ait IR spektrumu

6 Jul 2018

<b>Title</b>	dard Time (GMT+3:00)	<b>Origin</b>	dard Time (GMT+3:00)
<b>File Name</b>	C:\USERS\YUSUFDILGIN\DESKTOP\MEHMET GUNES IR\CLM.SP		
<b>Date Stamp</b>	fri aug 04 01:10:56 2017 GTB Standard Time (GMT+3:00)		
<b>Date</b>	fri aug 04 01:10:56 2017 GTB Standard Time (GMT+3:00)		
<b>Technique</b>	Infrared	<b>Instrument</b>	Spectrum 100
<b>Spectral Region</b>	IR	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)
<b>Y Axis</b>	%Transmittance	<b>Spectrum Range</b>	650.0000 - 4000.0000
<b>Points Count</b>	3351	<b>Data Spacing</b>	1.0000



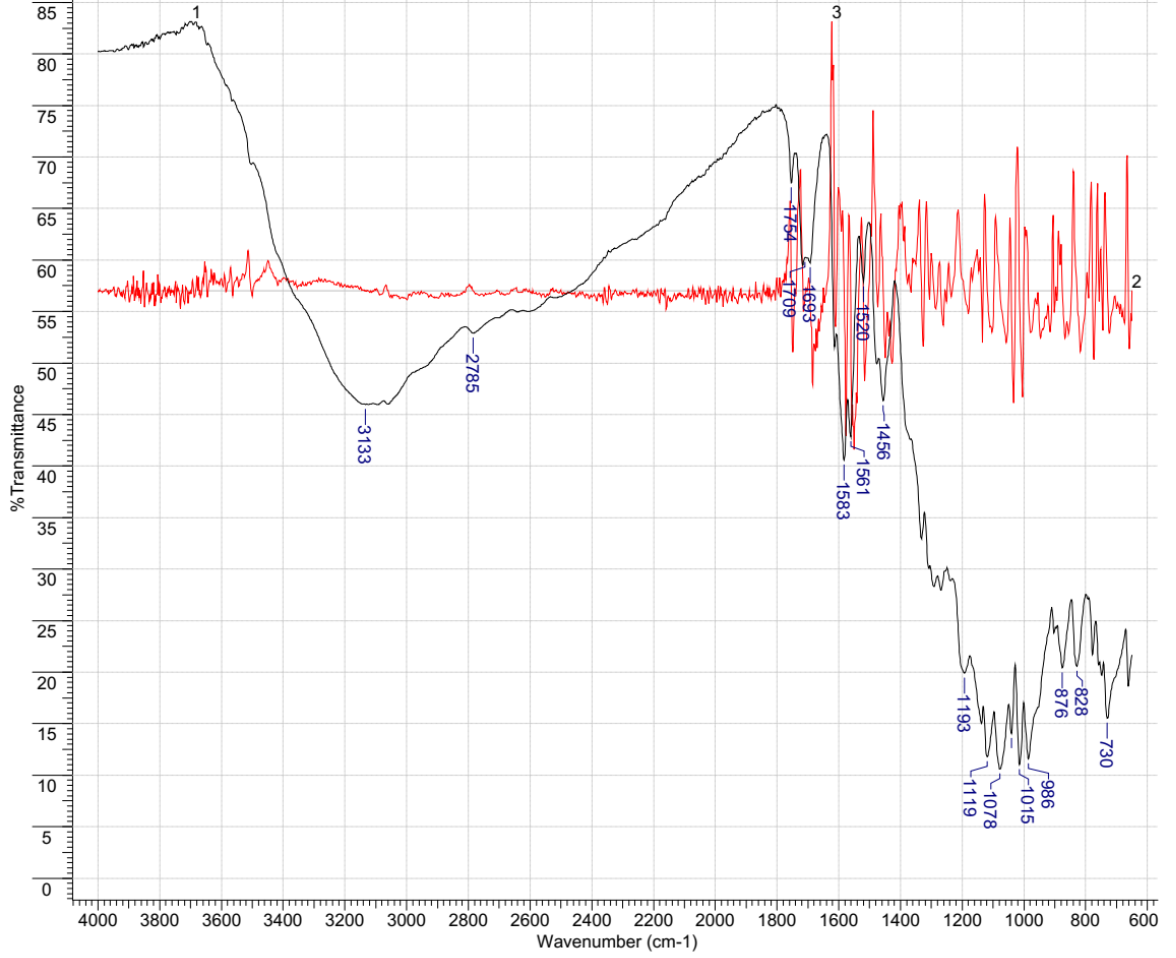
No	cm-1	%T	Intensity
1	753.00	58.821	S
2	887.00	73.436	M
3	994.00	69.645	M
4	1048.00	43.869	VS
5	1198.00	50.649	S
6	1295.00	77.659	W
7	1392.00	82.639	W
8	1447.00	77.935	W
9	1495.00	76.127	M
10	1554.00	82.856	W
11	1591.00	82.315	W
12	1615.00	83.002	W
13	2920.00	87.221	W
14	3025.00	86.910	W
15	3076.00	86.300	W
16	3405.00	83.564	W

C:\USERS\YUSUFDILGIN\DESKTOP\MEHMET GUNES IR\CLM.SP

## EK 2. Tez çalışmasında PGE'nin modifiyesinde kullanılan Pcv'ye ait IR spektrumu

6 Jul 2018

<b>Title</b>	dard Time (GMT+3:00)	<b>Origin</b>	dard Time (GMT+3:00)
<b>File Name</b>	C:\USERS\YUSUFDILGIN\DESKTOP\MEHMET GUNES IR\PCV.SP		
<b>Date Stamp</b>	fri aug 04 01:13:58 2017 GTB Standard Time (GMT+3:00)		
<b>Date</b>	fri aug 04 01:13:58 2017 GTB Standard Time (GMT+3:00)		
<b>Technique</b>	Infrared	<b>Instrument</b>	Spectrum 100
<b>Spectral Region</b>	IR	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)
<b>Y Axis</b>	%Transmittance	<b>Spectrum Range</b>	650.0000 - 4000.0000
<b>Points Count</b>	3351	<b>Data Spacing</b>	1.0000



No	cm-1	%T	Intensity	No	cm-1	%T	Intensity
1	730.00	15.509	VS	10	1456.00	46.316	M
2	828.00	20.548	S	11	1520.00	57.879	M
3	876.00	20.387	S	12	1561.00	42.826	M
4	986.00	11.576	VS	13	1583.00	40.558	M
5	1015.00	11.029	VS	14	1693.00	59.757	M
6	1041.00	14.025	VS	15	1709.00	60.259	M
7	1078.00	10.588	VS	16	1754.00	67.466	W
8	1119.00	11.773	VS	17	2785.00	52.914	M
9	1193.00	19.917	S	18	3133.00	45.994	M

EK 3. 30 Mayıs - 03 Haziran 2016 tarihleri arasında, Isparta Süleyman Demirel Üniversitesinde 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi'nde sunulan "115Z235" numaralı TÜBİTAK projesi ve bu tez çalışmasından üretilen poster bildirisi

*8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi / Süleyman Demirel Üniversitesi*

## **KALMAGİT MODİFİYE KALEM GRAFİT ELEKTROTLA NADH'İN ELEKTROKATALİTİK YÜKSELTGENMESİ**

**GÜNEŞ, M.<sup>1,2</sup>, DİLGİN, Y.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Çanakkale, Turkey

<sup>2</sup>Kanuni Anadolu İmam Hatip Lisesi, Kimya Öğretmeni, Aksaray, Turkey

NADH( $\beta$ -Nikotin Amid Adenin dinükleotid'in indirgenmiş hali) insan hücrelerinin enerji üretiminde rol oynayan önemli bir koenzimdir.<sup>1</sup> Biyo yakıt hücrelerinde elektriksel enerji yani kimyasal enerji dönüşümünde de çok sık kullanılmaktadır. Birçok önemli biyosentetik tepkimeye ve özellikle de 250'den fazla dehidrogenazın enzimatik katalizine katıldığı bilinmektedir. NAD<sup>+</sup>'ye bağlı biyokatalizör kullanılarak Biyosensörler geliştirilmiştir.<sup>2</sup> NADH'nin bu önemli özelliklerinden dolayı, NADH'nin elektrokimyasal yükseltgenmesine yönelik çalışmalar büyük bir ilgi görmüştür. Son zamanlarda NADH'nin elektrokimyasal yükseltgenmesi üzerine birçok çalışma yapılmıştır.<sup>3,4</sup> Bu çalışmada elektropolimerizasyon yoluyla Calmagite modifiye kalem grafit elektrot(poli-Calm/PGE) kullanılarak NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi hem döngüsel voltammetri hem de ilk defa PGE için tasarlanmış bir akış hücresi FIA sisteminde amperometrik yöntemle incelenmiştir. Taşıyıcı elektrolit olarak 1M KCl içeren 0,1M pH 7.0 fosfat tamponu ve optimize edilen parametreler kullanılarak (akış hızı, uygulama potansiyeli, örnek yükleme hacmi, kolon uzunluğu) NADH derişimine karşı akım-zaman eğrileri FIA sisteminde incelenmiş ve NADH için elde edilen kalibrasyon eğrisinden Yalın PGE için doğrusal kalibrasyon aralığı  $500,0 \times 10^{-6} - 2,5 \times 10^{-5}$  M, Poli-Calm/PGE için ise doğrusal kalibrasyon aralığı  $1,0 \times 10^{-7} - 7,5 \times 10^{-5}$  M 'dır. Bu iki elektrot için kalibrasyon grafiklerinden elde edilen doğrusallıkları sırasıyla Yalın PGE için  $I (\mu A) = 5,0 \times 10^{-5} C_{NADH}(\mu M) + 9,0 \times 10^{-4}$ ,  $R^2 = 0,99863$  ve Poli-Calm/PGE için  $I (\mu A) = 0,012 C_{NADH}(\mu M) + 0,003$ ,  $R^2 = 0,9997$  denklemleriyle ifade edilmiştir. Denklemlerde I pik akımı, C ise NADH'nin derişimidir. Bu denklemlerdeki eğimler karşılaştırıldığında Poli-Calm/PGE için elde edilen doğrunun eğimi(0,012), Yalın PGE' de elde edilen doğrunun eğiminden ( $5,0 \times 10^{-5}$ ) yaklaşık 240 kat daha büyük olduğu saptanmış ve dolayısıyla, duyarlık elektrot yüzeyinin Poli-Calm ile modifiye edilmesiyle artmıştır.

**Bu çalışma TÜBİTAK (115Z235 Nolu proje) tarafından desteklenmiştir.**

[m.gunes@outlook.com](mailto:m.gunes@outlook.com)

EK 4. En İyi Poster Bildiri Birincilik Ödülü(Kalmagit modifiye Kalem Grafit Elektrotla NADH'ın Elektrokatalitik Yükseltgenmesi,8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi / Süleyman Demirel Üniversitesi)



## EN İYİ POSTER BİLDİRİ BİRİNCİLİK ÖDÜLÜ

*Mehmet Güneş*

**Kalmagit Modifiye Kalem Grafit Elektrotla NADH'ın Elektrokatalitik Yükseltgenmesi**  
isimli çalışmamız Süleyman Demirel Üniversitesi'nin 30 Mayıs - 3 Haziran 2016 tarihlerinde düzenlenen 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi'nde **En İyi Poster Bildiri Birincilik Ödülü'**ne değer bulunmuştur.

Derecenizi kutlar, başarılarınızın devamını dileriz.

**Prof. Dr. Güleren Alsancak**  
Kongre Başkanı

**Doç. Dr. Ebru Çubuk Demiralay**  
Kongre Başkanı

EK 5. 29 Eylül-02 Ekim 2016 tarihleri arasında Çanakkale 18 Mart Üniversitesinde gerçekleştirilen, 10th Aegean Analytical Chemistry Days Kongresi'nde sunulan "115Z235" numaralı TÜBİTAK projesi ve bu tez üretilen poster bildirisi

P2-75

### Electrocatalytic Determination of NADH in Flow Injection Analysis System at Pyrocatechol Violet (PCV) Modified Pencil Graphite Electrode

Mehmet Günes<sup>A, B,\*</sup>, Yusuf Dilgin<sup>C</sup>

<sup>A</sup> *Canakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Science and Arts, Department of Chemistry, Analytical Research Laboratory*

<sup>B</sup> *Kanuni Anadolu Imamhatip High School, Chemistry Teacher, Aksaray, Turkey*

<sup>C</sup> *Canakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Science and Arts, Department of Chemistry*

\*E-mail: [m.gunes@outlook.com](mailto:m.gunes@outlook.com)

NADH (induced form of  $\beta$ - Nicotinamide adenine dinucleotide) is an important coenzyme for production of energy in human cells [1]. NADH plays roles in many biosynthetic reactions. It is also known that it catalysis more than 250 enzymes [2] and has been used for the construction of electrochemical biosensors. The electrochemical oxidation of NADH has received considerable attention due to these important functions. Chemically modified electrodes (CMEs) have been widely used for electrocatalytic oxidation of NADH [1-3] due to its highly irreversible oxidation with a great overpotential at a bare electrode. For this aim many redox mediators have been used for electrocatalytic oxidation of NADH. Among them, Pyrocatechol violet (PCV), which is a sort of sulfone phthalein dye obtains from pyrocatechol and *o*-sulphobenzoic acid anhydride, has also been used as a an effective redox mediator [4]. However, our literature search showed that PVC modified Pencil graphite electrode (PGE) has not been used for the electrocatalytic determination of NADH in Flow Injection Analysis (FIA) system.

In this work, electrocatalytic determination of NADH has been described in FIA using PCV modified PGE for the first time. Modified PGE was prepared through immersion of PGE into  $10^{-2}$  M PVC solution in water for 10 min. Cyclic voltammograms of bare PGE and modified PGE were recorded in the absence and presence of NADH in Phosphate Buffer solution (PBS at pH 7.0) at scan rate of 20 mV/s. Cyclic voltammetric studies show that the peak potential of NADH oxidation shifts from +450 mV at bare PGE to +200 mV vs. Ag/AgCl /KCl (sat) at PVC/PGE. This result showed that PVC modified PGE exhibit a good electrocatalytic activity towards oxidation of NADH. Then, electrocatalytic determination of NADH was performed in FIA system under optimized conditions using a new homemade electrochemical flow cell which was constructed for PGE for the first time. The electrocatalytic currents obtained from amperometric measurements in FIA at +200 mV vs. Ag/AgCl /KCl (1.0 M) and at pH 7.0 PBS containing 1.0 M KCl were linearly related to the concentration of NADH. As a result, it can be concluded that this study shows the first study on the amperometric FIA determination of NADH using PVC modified PGE.

**Keywords:** NADH, Pyrocatechol Violet, Pencil Graphite Electrode, Flow Injection Analysis

**The authors are grateful to TÜBİTAK (Project Number: 115Z235) for financial support.**

#### References:

1. L. Gorton, E. Dominguez Encyclopedia of Electrochemistry, Bioelectrochemistry (Ed:G.S.Wilson) Wiley-VCH, Weinheim (2002) 9 67-143.
2. E. Simon, P. N. Barlett Biomolecular Films, Design, Function and Applications (Ed:J. F. Rushling), Marcel Dekker, New York, (2003) 499-544.
3. Kumar, Jun Zhu, Xiao-Yan Wu, Dan Shan , Pei-Xin Yuan, Xue-Ji Zhang, Talanta (2014) 155 78–84.

EK 6. 25-28 Ağustos 2017 tarihleri arasında Makedonya/Ohrid'de gerçekleştirilen International Joint Science Congress of Materials and Polymers(ISCMP) Kongresi'nde sunulan "115Z235" numaralı TÜBİTAK projesi ve bu tez üretilen poster bildirisi

**Register No:**

**318C89**



## **Glucose Biosensing in Flow Injection Analysis System using Poly- Pyrocatechol violet modified Pencil Graphite Electrode**

**Mehmet Güneş \***

*Chemistry  
Canakkale Onsekiz mart University,  
TURKEY*

**Yusuf Dilgin**

*Chemistry  
Canakkale Onsekiz Mart University,  
TUTKEY*

Electrochemical biosensors based on biospecific enzyme reaction have found great attention for last three decades and are still a very active research area. For this purpose, amperometric biosensors based on the NAD<sup>+</sup>/NADH redox couple and dehydrogenase enzyme have been developed and applied for the determination of various biologically important molecules [1-2]. In this work, Pyrocatechol violet (Pcv) was electropolymerized onto pencil graphite electrode (PGE) surface for the electrocatalytic oxidation of NADH. Cyclic voltammograms show that oxidation potential of NADH at Poly-Pcv/PGE shifted to the negative direction about 200 mV compared with bare PGE. These results indicate that Poly-Pcv/PGE exhibits a good electrocatalytic activity toward NADH oxidation. Then, a glucose biosensor study was performed based on the determination of enzymatically generated NADH by glucose dehydrogenase (GDH) which immobilized onto Poly-Pcv/PGE using glutaraldehyde crosslinking procedure. The biosensing of glucose in Flow Injection Analysis (FIA) system was performed at GDH/Poly-Pcv/PGE for the first time. The electrocatalytic oxidation currents of enzymatically produced NADH obtained from FI amperometric current-time curves recorded at +250 mV and in phosphate buffer solution at pH 7.0 containing 1.0 M KCl were linearly related to the concentration of glucose. Linear calibration plots are obtained in the concentration range from 5 to 500  $\mu$ M. A fast, sensitive, low-cost and disposable glucose biosensor was constructed in FIA system using GDH/Poly-Pcv/PGE, therefore, it might provide a new perspective for the fabrication of biosensor of other compounds such as glutamate, lactate, alcohol etc. Acknowledgements: This study was financially supported by TÜBİTAK (Project No: 115Z235).

**Keywords:** Flow Injection Analysis, Biosensors, Pyrocatechol violet, Pencil Graphite Electrode

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Mehmet GÜNEŞ

Doğum Yeri: Bozova

Doğum Tarihi: 01.08.1972

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Fırat Üniversitesi, Fen –Edb. Fak. Kimya Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: Fırat Üniversitesi, Analitik Kimya

Doktora Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Analitik Kimya

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI -Diğer

b) **Bildiriler -Uluslararası -Ulusal**

1. Güneş M., Dilgin Y., Kalmagit Modifiye Kalem Grafit Elektrotla NADH'ın Elektrokatalitik Yükseltgenmesi 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 30 Mayıs-3 Haziran 2016, Isparta (Poster). ( **115Z235 nolu proje ve bu tez çalışmasından**)
2. Güneş M., Dilgin Y., Electrocatalytic Determination of NADH in Flow Injection Analysis System at Pyrocatechol Violet (PCV) Modified Pencil Graphite Electrode, 10th Aegean Analytical Chemistry Days, 29 September - 2October 2016, Chios-Çanakkale,Turkey (Poster) ( **115Z235 nolu proje ve bu tez çalışmasından**)
3. Güneş M., Dilgin Y., Glucose Biosensing in Flow Injection Analysis System using Poly- Pyrocatechol violet modified Pencil Graphite Electrode, Joint Science Congress of Materials and Polymers 25-28 August 2017,Macedonia (Poster) ( **115Z235 nolu proje ve bu tez çalışmasından**)

c) **Katıldığı Projeler**

1. Tübitak 1001- Bilimsel ve Teknoloji Araştırma Projeleri Destekleme Programı, “Aromatik Sülfonik Asit Boyar Maddeleriyle Modifiye Elektrot Kullanılarak Akışa Enjeksiyon Analiz Sisteminde Elektrokimyasal Sensör ve Biyosensör Tasarımı” (Bursiyer, Kasım 2015 – Kasım 2017) Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Yusuf DİLGİN, Proje No: **115Z235**)

## **İŞ DENEYİMİ**

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: Aksaray Kanuni Anadolu İmam Hatip Lisesinde Kimya öğretmeni olarak çalışmaktadır.

## **İLETİŞİM**

E-posta Adresi: m.gunes@outlook.com

