



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ



**KUANTUM NOKTA MODİFİYE ELEKTROTLAR
KULLANARAK FOTOBİYOSENSÖR TASARIMI ve AKIŞA
ENJEKSİYON SİSTEMİNDE UYGULANMASI**

Bensu ERTEK

Kimya Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

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

KUANTUM NOKTA MODİFİYE ELEKTROTLAR
KULLANARAK FOTOBİYOSENSÖR TASARIMI ve AKIŞA
ENJEKSİYON SİSTEMİNDE UYGULANMASI

Bensu ERTEK

Kimya Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: **02/09/2016**

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Yusuf DİLGİN

ÇANAKKALE

Bensu ERTEK tarafından Prof. Dr. Yusuf DİLGİN yönetiminde hazırlanan ve 02/09/2016 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**KUANTUM NOKTA MODİFİYE ELEKTROTLAR KULLANARAK FOTOBİYOSENSÖR TASARIMI ve AKIŞA ENJEKSİYON SİSTEMİNDE UYGULANMASI**” 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. Cahit AKGÜL

Üye

Prof. Dr. Nuri NAKİBOĞLU

Üye

Doç. Dr. Ayhan ORAL

Üye

Doç. Dr. Süleyman KOÇAK

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

Bu tez çalışması, **TÜBİTAK** tarafından **112T375** numaralı projeden desteklenmiştir.

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.

Bensu ERTEK

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimimde emeği bulunan maddi ve manevi desteklerini her daim hissettirerek yetiŐmeme ve geliŐmeme katkıda bulunan, kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Yusuf DİLGİN'e katkılarından dolayı teşekkürü borç bilirim.

Çalışmalarım süresince tecrübelerinden faydalandığım Dr. Didem Giray DİLGİN'e ve çalışma arkadaşım Yüksek Kimyager Özlem SAĞLAM'a yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Araştırmalarım boyunca manevi destek ve yardımlarıyla yanımda olan, tüm değerli arkadaşlarıma, aileme ve laboratuvar imkanlarından yararlandığım Kimya Bölüm Başkanlığına teşekkür ederim.

Tez araştırmalarım boyunca deneyim ve bilgilerini benimle paylaşan, tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Nuri NAKİBOĞLU'na teşekkür ederim.

Bu doktora tezinin tamamı, 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı kapsamında TÜBİTAK (112T375 numaralı proje) tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a, projenin ekibinde bulunan sayın hocalarım Prof. Dr. Cahit AKGÜL, Doç. Dr. Bayram KIZILKAYA ve Yrd. Doç. Dr. Hüseyin UYSAL'a teşekkür ederim.

Bensu ERTEK
Çanakkale, Eylül 2016

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADP	Adenozin Difosfat
Ag	Gümüş
AgCl	Gümüş Klorür
ALDH	Alkol Dehidrogenaz
Ar	Argon
Au	Altın
BRT	Britton-Robinson Tamponu
BSA	Sığır Serum Albumini
C	Derişim
CB	İletkenlik Bandı (Conduction Band)
CH ₃ COOH	Asetik Asit
cm ³	Santimetreküp
CuO	Bakır (II) Oksit
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
Epc	Katodik Pik Potansiyeli
FAD	Flavin Adenin Dinükleotit
FADH ₂	Flavin Adenin Dinükleotit (İndirgenmiş form)
FIA	Akışa Enjeksiyon Analizi (Flow Injection Analysis)
GA	Glutaraldehit
GCE	Camımsı Karbon Elektrot (Glassy Carbon Electrode)
GDH	Glukoz Dehidrogenaz
H ₂ SO ₄	Sülfirik Asit
H ₃ BO ₃	Borik Asit
H ₃ PO ₄	Fosforik Asit

HCl	Hidroklorik Asit
HNO ₃	Nitrik Asit
I _{pa}	Anodik Pik Akımı
I _{pc}	Katodik Pik Akımı
ITO	İndiyum Kalay Oksit (Indium Tin Oxide)
KCl	Potasyum Klorür
LOD	Belirtme Alt Sınırı (Limit of Detection)
LOQ	Tayin Sınırı (Limit of Quantification)
MAA	Merkapto Asetik Asit
MA	Molekül Ağırlığı
µA	Mikro Amper
M	Molar
mg/g	Miligram/ Gram
µg/mL	Mikrogram/Mililitre
mM	Mili Molar
µL	Mikro Litre
µm	Mikro Metre
µM	Mikro Molar
mol/L	Mol/Litre
mV	Milivolt
mV/s	Milivolt/saniye
nA	Nano Amper
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotidin indirgenmiş formu
NaOH	Sodyum Hidroksit
nm	Nanometre
nM	Nano Molar
NP	Nano Parçacıklar
PAMAM	Poliamidoamin
PEC	Fotoelektrokimya (Photoelectrochemistry)
PGE	Kalem Grafit Elektrot (Pencil Graphide Electrode)
PL	Fotoluminesans
Pt	Platin
QD	Kuantum noktalar (Quantum dots)

RSD	Bağıl Standart Sapma (Relative Standart Deviation)
s	Saniye
Se	Selenyum
Te	Tellür
TH	Thionin
TiO ₂	Titanyum Dioksit
V	Volt
VB	Değerlik Bandı (Valence Band)
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
Zn	Çinko
ZnO	Çinko Oksit
v	Tarama Hızı

ÖZET

KUANTUM NOKTA MODİFİYE ELEKTROTLAR KULLANARAK FOTOBİYOSENSÖR TASARIMI ve AKIŞA ENJEKSİYON SİSTEMİNDE UYGULANMASI

Bensu ERTEK

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Yusuf DİLGİN

02/09/2016, 184

Bu çalışmada yarı iletken kuantum nokta (Quantum dot, QD) nano parçacıklar (CdS/ZnS), çok duvarlı karbon nanotüp/camımsı karbon elektrot (GCE/MWCNT) ve kalem grafit elektrot (PGE) yüzeyine elektrokimyasal olarak biriktirilmiştir. Kuantum nokta modifiye elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonu, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ içeren pH 7,0 fosfat tampon ortamında döngüsel voltammogramları ve impedans eğrileri kaydedilerek gerçekleştirilmiş ve elektrotların yüzey morfolojileri SEM görüntüleri kaydedilerek incelenmiştir. Modifiye elektrotlarla ilk olarak NADH'nin elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik yükseltgenmesi gerçekleştirilmiştir. Ardından glukoz dehidrogenaz (GDH) immobilize edilmiş QD modifiye PGE ve GCE/MWCNT kullanılarak akışa enjeksiyon analiz (Flow injection analysis, FIA) sisteminde glukoz biyosensörü için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Glukoz ile NAD^+ 'nin enzimatik tepkimesi sonucunda oluşan NADH'nin yükseltgenmesine ait akımlar izlenerek amperometrik ve fotoamperometrik glukoz biyosensörü FIA sisteminde geliştirilmiştir.

Glukoz için doğrusal kalibrasyon aralığı, R^2 , LOD /LOQ değerleri QD modifiye PGE ve GCE/MWCNT için sırasıyla 0,2-0,8 mM ($R^2=0,9923$), (LOD /LOQ 0,09 / 0,3 mM) ve 0,01-2,0 mM ($R^2=0,9971$), (LOD /LOQ 0,006/0,02 mM) glukoz olarak bulunmuş ve yüzeyin ışıklandırılmasıyla akımın PGE için 2 kat, GCE/MWCNT için ise 3 kat arttığı tespit edilmiştir. Benzer sonuçlar etanol için alkol dehidrogenaz enzimi kullanılarak da elde edilmiş ve PGE ile GCE/MWCNT için sırasıyla 0,05-0,8 mM, ($R^2=0,9997$), (LOD/LOQ 0,005/0,015 mM) ve 0,05-0,5 mM, ($R^2=0,9985$), (LOD/LOQ 0,003/0,012 mM) etanol olarak hesaplanmıştır. Son olarak, girişim çalışmaları her iki enzim için ve

gerçek 6rneklere uygulama çalışmaları glukoz dehidrogenaz için gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fotoelektrokimyasal Biyosens6r, Kuantum Nokta, Kalem Grafit Elektrot, Akışa Enjeksiyon Analizi, Glukoz Dehidrogenaz, Alkol Dehidrogenaz.



ABSTRACT

CONSTRUCTION OF PHOTOBIOSENSOR USING QUANTUM DOT MODIFIED ELECTRODES AND THEIR APPLICATIONS IN FLOW INJECTION ANALYSIS

Bensu ERTEK

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Science and Engineering

Chair for Chemistry Thesis of Ph.D.

Advisor: Prof. Dr. Yusuf DİLGİN

02/09/2016, 184

In this study, semiconductor quantum dot (QD) nanoparticles (CdS/ZnS), were electrochemically deposited onto the surfaces of multiwalled carbon nanotube/glassy carbon electrode (GCE/MWCNT) and pencil graphite electrode (PGE). Electrochemical characterization of the QD modified electrodes was performed by recording the cyclic voltammograms and impedance spectra in pH 7.0 phosphate buffer solution containing $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ and the surface morphologies of the electrodes were examined by recording SEM images. Initially the electrocatalytic and photoelectrocatalytic oxidation of NADH with the modified electrodes were carried out. Then, optimization studies for glucose biosensor using glucose dehydrogenase immobilized QD modified PGE and GCE/MWCNT were performed in FIA system. The oxidation of NADH which is produced by the enzymatic reaction of glucose and NAD^+ was measured by the constructed amperometric and photoamperometric biosensors, which were developed in the FIA system.

Linear calibration ranges, R^2 , LOD /LOQ results for glucose at modified PGE and GCE/MWCNT were found to be 0.2-0.8 mM ($R^2=0.9923$), (LOD /LOQ 0.09 / 0.3 mM) and 0.01-2.0 mM ($R^2=0.9971$), (LOD /LOQ 0.006/0.02 mM) glucose respectively and the measured current values increased about 2 fold for PGE and 3 fold for GCE/MWCNT by illumination of the electrode surfaces. Similar results were also obtained for ethanol biosensor based on alcohol dehydrogenase 0.05-0.8 mM, ($R^2=0.9997$), (LOD/LOQ 0.005/0.015 mM) and 0.05-0.5 mM, ($R^2=0.9985$), (LOD/LOQ 0.003/0.012 mM) were found for PGE and GCE/MWCNT respectively. Finally, the interference studies were carried out for both enzymes and applications with real samples were carried out for

glucose dehydrogenase.

Key Words: Photoelectrochemical Biosensor, Quantum Dots, Pencil Graphite Electrode, Flow Injection Analysis, Glucose Dehydrogenase, Alcohol Dehydrogenase.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEZ SINAV SONUÇ FORMU	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	viii
ABSTRACT.....	x
İÇİNDEKİLER	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxx
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
1.1. Kuantum Noktalar	4
1.2. NADH ve Canlı Sistemlerdeki Rolü	9
1.3. NADH'nin Elektrokatalitik ve Fotoelektrokatalitik Yükseltgenmesi.....	12
1.4. Dehidrogenaz Enzimi ve NAD ⁺ /NADH Redoks Çiftine Dayalı Elektrokimyasal ve Fotoelektrokimyasal Biyosensörler.....	14
1.5. Fotoelektrokimya	17
1.6. Kalem Grafit Elektrot (Pencil Graphite Electrode, PGE)	20
1.7. Akışa Enjeksiyon Analiz (Flow Injection Analysis, FIA) Sistemi	21
BÖLÜM 2	23
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	23
2.1. NADH'nin Fotoelektrokatalitik Yükseltgenmesi	23
2.2. Dehidrogenaz Enzimine Dayalı Modifiye Elektrotlarla Fotoelektrokimyasal Biyosensör Çalışmaları	31
2.3. Kalem Grafit Elektrot Kullanılarak NADH'nin Elektrokatalitik Yükseltgenmesi ve Biyosensör Çalışmaları	40
2.4. Fotoelektrokimyasal DNA Biyosensörleri	43
BÖLÜM 3	49
MATERYAL VE METOT	49
3.1. Kullanılan Kimyasallar	49
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	49
3.3. Kullanılan Çözeltiler	52
3.3.1. Modifiye Elektrotların Hazırlanması İçin Kullanılan Çözeltiler.....	52

3.3.2. Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal İmpedans Spektrum ve Döngüsel Voltammogramlarının Kaydedilmesinde Kullanılan Redoks Prob Çözeltisi.....	53
3.3.3. NADH'nin elektrokatalik ve fotoelektrokatalitik yükseltgenmesinde kullanılan çözeltiler	54
3.3.4. FIA sisteminde Amperometrik NADH Çalışmaları için kullanılan çözeltiler ...	54
3.3.5. Glukoz dehidrogenaz enzim (GDH) immobilizasyonu ve GDH'a bağlı biyosensör çalışmaları için kullanılan çözeltiler	55
3.3.6. GDH'ya bağlı glukoz biyosensörü için döngüsel voltammetrik çalışmalarda kullanılan destek elektrolit	55
3.3.7. GDH'ya bağlı glukoz biyosensörü için FIA sisteminde amperometrik ve fotoamperometrik çalışmalarda kullanılan taşıyıcı çözelti.....	56
3.3.8. Alkol Dehidrogenaz Enzim (ALDH) İmmobilizasyonu ve ALDH'a bağlı biyosensör çalışmaları için kullanılan çözeltiler	56
3.3.9. ALDH'ya bağlı etanol biyosensörü için döngüsel voltammetrik çalışmalarda kullanılan destek elektrolit	56
3.4. Modifiye Elektrotların Hazırlanması ve Karakterizasyonu	57
3.4.1. Kuantum Nokta (QD) Modifiye Elektrotların Hazırlanması.....	57
3.4.2. Modifiye Elektrotların Karakterizasyonu.....	59
3.5. Kuantum Nokta Modifiye Elektrotlarla NADH'nin Elektrokatalitik ve Fotoelektrokatalitik Yükseltgenmesi	60
3.5.1. NADH'nin Yükseltgenmesine Ait Voltammetrik Çalışmalar.....	60
3.5.2. FIA Sisteminde Kuantum Nokta Modifiye Elektrotlarla NADH'nin Amperometrik ve Fotoamperometrik Yanıtının İncelenmesi.....	60
3.6. QD Modifiye Elektrotlarla Elektrokimyasal ve Fotoelektrokimyasal Biyosensör Çalışmaları	61
3.6.1 Kuantum Nokta Modifiye Elektrotlara Dehidrogenaz Enzim İmmobilizasyonu .	61
3.6.2 GDH Enzimi ve $NAD^+/NADH$ Redoks Çiftine Dayalı Biyosensör Çalışmaları	62
3.6.2.1 Döngüsel Voltammetrik Yöntemle	62
3.6.2.2 FIA Sisteminde Amperometrik ve Fotoamperometrik Yöntemle.....	62
3.7. Fotoelektrokimyasal DNA Biyosensör Çalışmaları.....	65
3.7.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	66
3.7.2. Elektrot Yüzeyine Prob DNA Tutturulması	66
3.7.3. Hedef, Tek Dizisi Değişik ve Hedef Dışı Dizi ile Hibridizasyon	67
3.7.4. Elektrokimyasal Ölçümler.....	68
3.7.4.1. Diferansiyel Puls Voltammetrisi Yöntemi.....	68
3.7.4.2. İmpedimetrik Yöntem	69

BÖLÜM 4	70
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	70
4.1. Kuantum Nokta (QD) Modifiye Elektrotların Hazırlanması ve Karakterizasyonu .	70
4.1.1. Hazırlanan QD Modifiye PAMAM-GCE'lerin Karakterizasyonu ve NADH'nin Yükseltgenmesine Yanıtı.....	71
4.1.2. Hazırlanan QD Modifiye PAMAM-PGE'lerin Karakterizasyonu ve NADH'nin Yükseltgenmesine Yanıtı.....	76
4.1.3. QD Modifiye GCE'lerin Karakterizasyonu.....	80
4.1.4. QD Modifiye GCE'nin NADH'nin Yükseltgenmesine Yanıtı.....	84
4.1.5. PAMAM'sız QD Modifiye GCE/MWCNT'nin Karakterizasyonu	87
4.1.6. QD Modifiye GCE/MWCNT'nin NADH'nin Yükseltgenmesine Yanıtı	90
4.1.7. PAMAM'sız QD Modifiye PGE'nin Karakterizasyonu	92
4.1.8. QD Modifiye PGE'nin NADH'nin Yükseltgenmesine Yanıtı	98
4.2. QD Modifiye Elektrotlarla FIA Sisteminde NADH'nin Amperometrik ve Fotoamperometrik Yükseltgenmesi	102
4.2.1. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf İle İlgili Çalışmalar	103
4.2.2. K.PGE/CdS-ZnS-MAA-Nf ile İlgili Çalışmalar	108
4.3. Dehidrogenaz Enzimine Dayalı Biyosensör Çalışmaları	113
4.3.1. GDH ve NAD ⁺ /NADH Redoks Çiftine Dayalı Biyosensör Çalışmaları.....	113
4.3.1.1. QD Modifiye K.PGE İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	113
4.3.1.1.1. Döngüsel Voltammetrik Yöntemle Elde Edilen Sonuçlar	113
4.3.1.1.2. FIA Sisteminde Amperometrik Yöntemle Elde Edilen Sonuçlar ...	115
4.3.1.2. QD Modifiye GCE/MWCNT İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	120
4.3.1.2.1. Döngüsel Voltammetrik Yöntemle Elde Edilen Sonuçlar	120
4.3.1.2.2. FIA Sisteminde Amperometrik Yöntemle Elde Edilen Sonuçlar ...	122
4.3.1.3. Girişim Etkisi Yapabilecek Maddelerin İncelenmesi	127
4.3.1.4. Tasarlanan Biyosensörün Gerçek Örneklerle Uygulanması	129
4.3.2. ALDH ve NAD ⁺ /NADH Redoks Çiftine Dayalı Biyosensör Çalışmaları	136
4.3.2.1. K.PGE Kullanımına Ait Biyosensör Çalışmaları.....	136
4.3.2.1.1. Döngüsel Voltammetrik Yöntemle Elde Edilen Sonuçlar	136
4.3.2.1.2. FIA Sisteminde Amperometrik Yöntemle Elde Edilen Sonuçlar ...	139
4.3.2.2. MWCNT/GCE Kullanımına Ait Biyosensör Çalışmaları.....	145
4.3.2.2.1. Döngüsel Voltammetrik Yöntemle Elde Edilen Sonuçlar	145
4.3.2.2.2. FIA Sisteminde Amperometrik Yöntemle Elde Edilen Sonuçlar ...	148

4.3.2.3. Girişim Etkisi Yapabilecek Maddelerin İncelenmesi	153
4.4. Fotoelektrokimyasal DNA Biyosensör Çalışmaları.....	155
4.4.1. HPV'nin Fotoelektrokimyasal Yoldan Saptanmasında İncelenen Parametreler	155
4.4.1.1. Hibridizasyonun Saptandığı En Uygun Koşullar.....	155
4.4.1.1.1. Hibridizasyon İçin En Uygun Prob Derişiminin Belirlenmesi.....	156
4.4.1.1.2. Hibridizasyon İçin En Uygun Hedef Dizi Derişiminin Belirlenmesi	157
4.4.2. İmpedimetrik Yöntem ile HPV'nin Tanısına Ait Bulgular	159
BÖLÜM 5	161
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	161
KAYNAKLAR	168
ÖZGEÇMİŞ	XXIX

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Bir kuantum noktanın yapısı.....	6
Şekil 1.2. Anorganik yarı iletken modifiye elektrotlarda fotoakım oluşum mekanizması a) Anodik fotoakım b) Katodik fotoakım (DB: Değerlik bandı İB:İletkenlik bandı, h^+ : hole (boşluk)).....	7
Şekil 1.3. NAD^+ ve $NADP^+$ nın yapısı.....	9
Şekil 1.4. NAD^+ 'nin redoks tepkimesi	10
Şekil 1.5. Malik asitin enzimatik tepkimesi.....	10
Şekil 1.6. NAD^+ ve $NADH$ 'nin UV absorpsiyon spektrumu	11
Şekil 1.7. $NADH$ 'nin yükseltgenme mekanizması.....	12
Şekil 1.8. Bir redoks mediyatörle $NADH$ 'nin yükseltgenme mekanizması	14
Şekil 1.9. Alkol dehidrogenaz enzimine dayalı amperometrik etanol biyosensörüne ait reaksiyon şeması	16
Şekil 1.10. Fotoelektrokimyasal (PEC), Elektrokemilüminesans (ECL) ve Fotolüminesans (PL) olaylarına dayalı analiz sistemlerinin prensip olarak karşılaştırılması	19
Şekil 1.11. Normal bir FIA düzeneğinin şematik diyagramı. P: pompa C ve R: sırasıyla taşıyıcı ve reaktif hatları, S: örnek enjeksiyonu, MC: karışımın gerçekleştiği kolon, D: dedektör ve W: atık hattı.	22
Şekil 2.1. (a ve b) 0,40 mM $NADH$ yokluğunda, (c ve d) 0,40 $NADH$ varlığında, (a ve c) ışıksız, (b ve d) ışıklı ortamda poli-MB/GCE (pH 5,0 fosfat çözeltisinde hazırlanmış) ile alınmış döngüsel voltammogramlar (tarama hızı: 50 mVs^{-1} , destek elektrolit: 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu)	24
Şekil 2.2. (a ve b) 0,20 mM $NADH$ yokluğunda, (c ve d) 0,40 $NADH$ varlığında, (a ve c) ışıksız, (b ve d) ışıklı ortamda poly-TM/GCE ile alınmış döngüsel voltammogramlar. Uygulama potansiyeli: A) -100 mV, B) +100 mV (destek elektrolit: 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu)	25
Şekil 2.3. A) Dopamin- TiO_2 modifiye ITO elektrotta $NADH$ 'nin fotoelektrokimyasal sensörüne ilişkin şematik gösterim, B) Değişen $NADH$ derişimlerine karşı alınan fotoelektrokimyasal sinyaller	27
Şekil 2.4. Poly(4,4'diaminodifenil sülfon)/nano TiO_2 (PDDS/ TiO_2) kompozit modifiye ITO elektrot yüzeyinde $NADH$ 'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenme mekanizması	28
Şekil 2.5. a) 0,005 μM $NADH$ varlığında PDDS/ TiO_2 kompozit film ile 5 dakika ışık verilmeden önce ve b) sonraki döngüsel voltammogramlar; c) ve d) aynı koşullar	

- altında 0,12 μM NADH varlığında; e) yalın ITO ile 5 dakika ışıklandırmanın sonunda 0,12 μM NADH varlığında alınmış döngüsel voltammogramlar. Tarama hızı: 50 mVs^{-1} ; destek elektrolit: 0,1 M H_2SO_4 . İç Şekil: NADH'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenme pik akımlarına karşı NADH derişim grafiği (5 dakika ışık/ışıksız ortamda) NADH aralığı: 0,005-0,12 μM 28
- Şekil 2.6. G-TiO₂ nanohibritler kullanılarak GCE'nin modifikasyonu ve ışıkla etkileşimine ait mekanizma 29
- Şekil 2.7. A)Yalın GCE, B) grafen, C) TiO₂, D) G-TiO₂ modifiye GCE ile 1×10^{-3} M NADH varlığında 0,1 M pH 7,0 PBS ortamında ışıklı (düz çizgi) ışıksız (kesikli çizgi) olacak şekilde elde edilen döngüsel voltammogramlar. Tarama hızı: 20 mVs^{-1} 30
- Şekil 2.8. a) G-TiO₂/GCE, b) TiO₂/GCE, c) grafen/GCE'nin 1×10^{-3} M NADH varlığında 0,1 M pH 7,0 PBS ortamında 0,45 V ile ışıklandırıldığında elde edilen fotoakım 30
- Şekil 2.9. A) G-TiO₂/GCE 1×10^{-5} M NADH varlığında, ışıksız ve 0,45 V ile ışıklandırıldığında elde edilen fotoakım, B) G-TiO₂/GCE'nin farklı NADH konsantrasyonlarında 0,1 M pH 7,0 PBS ortamında alınmış fotoakım yanıtı. İç Şekil: NADH tayini için kalibrasyon grafiği..... 31
- Şekil 2.10. A) TH/MWCNT/AuNP/GDH/ITO elektrot için tasarlanan biyosensörde elektrot modifikasyon şeması, B) Fotoelektrokimyasal biyosensörde gerçekleşen reaksiyonlar için önerilen mekanizma..... 32
- Şekil 2.11. 0,1 M NaNO_3 içeren pH 7,0 fosfat tamponu destek elektrolitlerinde 0,3 mM HT'nin, ardışık olarak alınan döngüsel voltammogramları (tarama hızı: 100 mV/s). B) Poli-HT/GCE'nin a) ışıksız ve b) ışıklı ortamdaki döngüsel voltammogramı; 0,8 mM NADH'nin Poli-HT/GCE kullanılarak c1 ve c2) ışıksız ve d1 ve d2) ışıklı ortamdaki döngüsel voltammogramı. Tarama hızı: 50 mV/s , destek elektrolit: 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, C) FIA sisteminde poli-HT/GCE kullanılarak a) 10, b) 40, c)100, d) 400, e) 1000 mM NADH için elde edilen akım-zaman eğrileri (Taşıyıcı elektrolit: 0,1 M KCl içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu; Uygulama potansiyeli: +300 mV; akış hızı: 1,3 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 mL; kolon uzunluğu: 10 cm) 33
- Şekil 2.12. A) Poli-HT/GDH enzimine bağlı tasarlanan biyosensörde elektrot modifikasyon şeması B) Fotoelektrokimyasal biyosensörde gerçekleşen reaksiyonlar için önerilen mekanizma..... 35

- Şekil 2.13. A)MWCNT-TiO₂/LDH/NAD⁺/ITO nanokompozit elektroduna bağlı fotoelektrokimyasal laktat biyosensör mekanizması B) Elektrodun artan sodyum laktat derişimine bağlı (a → h, 0 → 100 µM) fotoakım-zaman eğrileri. Uygulama potansiyeli: 0,2 V.....37
- Şekil 2.14. CdSe/ZnS Modifiye Au elektrotta NAD⁺/NADH redoks çiftine dayalı enzimatik glukoz fotobiyosensörü38
- Şekil 2.15. Grafen/CdS QD/IL/CPZ-SO nanokompozit modifiye elektrotta yük ayrılması ve fotoelektrokimyasal alkol biyosensörü mekanizması. Etanol için elde edilen elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal akım-zaman eğrileri. İç kısım: Işıklı ve ışıksız ortamda elde edilen fotoakım-zaman eğrileri39
- Şekil 2.16. A) GC/rGO-CdS QDs/PBA/P-NB/GDH modifiye elektrodunun hazırlanmasına ilişkin şematik gösterim ve B) Enzim modifiye elektrotta glukozun fotoelektrokimyasal biyosensör mekanizması ve ışıklı ve ışıksız ortamda elde edilen fotoakım-zaman eğrileri40
- Şekil 2.17. A) Kuersetin modifiye PGE'nin a) NADH yokluğunda b) 0,5 mM NADH varlığında c) yalın PGE'nin 0,5 mM NADH varlığında 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 50 mV/s tarama hızında elde edilen döngüsel voltammogramlar B) 1) Kuersetin modifiye PGE'nin 2) yalın PGE'nin +300 mV'da artan NADH derişimine bağlı amperometrik akım-zaman eğrileri41
- Şekil 2.18. A) Yalın PGE'nin a) NADH yokluğunda b) 0,5 mM NADH varlığında ve yalın Hematoksilin modifiye PGE'nin c) NADH yokluğunda ve d) 0,5 mM NADH varlığında 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 50 mV/s tarama hızında elde edilen döngüsel voltammogramlar B) 1) Hematoksilin modifiye PGE'nin ve 2) yalın PGE'nin +200 mV'da artan NADH derişimine bağlı amperometrik akım-zaman eğrileri42
- Şekil 2.19. Tek duvarlı karbon nanotüp modifiye kalem grafit elektrot yüzeyinde pirokatekol violet ile birlikte enzim immobilizasyon prosedürleri ve NAD⁺/NADH redoks çiftine bağlı geliştirilen biyosensörün mekanizması.....43
- Şekil 2.20. a) DNA1-AuNP modifiye TiO₂/FTO elektrodun hedef DNA için hazırlanması b) Fotoelektrokimyasal DNA biyosensör mekanizması.....44
- Şekil 2.21. A)TiO₂/FTO elektrodun a) prob yokken b) AuNPs-DNA1 prob modifiye edildiğinde c) b + hedef cDNA ile hibridizasyonundan sonra elde edilen fotoakım spektrumları İç kısım: AuNPs yokken TiO₂ için elde edilen fotoakım spektrumlar B) Fotoakım değişiminin hedef DNA derişimi ile değişim grafiği ve

bu grafiğe ait fotoakım spektrumları	45
Şekil 2.22. Heparin DNA fotoelektrokimyasal sensörü için kullanılan modifiye elektrodun hazırlanma prosedürü	45
Şekil 2.23. A) Hedef DNA derişimi ile elde edilen fotoakım grafiği B) Derişim –akım değişim grafiği C) Modifiye elektrodun a) Hedef DNA b) Tek baz değişimi DNA c ve d) Tamamlayıcı olmayan DNA ortamındaki fotoakım değişimleri ...	46
Şekil 2.24. PG elektrotun modifikasyon şeması	47
Şekil 2.25. Yalın pirolitik grafit elektrot ile alınmış DPV sonuçları. Yalın elektroda ssDNA-1 immobilize edilmiş ve ssDNA-2 ve trombinle inkübe edilmiştir	48
Şekil 3.1. PGE'nin tasarımına ait şematik gösterim	51
Şekil 3.2. PGE için FIA amperometrik ve fotoamperometrik çalışmalarda kullanılan akış hücresinin şematik gösterimi (T: teflon gövde; L: Fiber optikli Işık kaynağı; P:kolon; G:Kuartz pencere).....	52
Şekil 3.3. GCE ve GCE/MWCNT için FIA amperometrik ve fotoamperometrik çalışmalarda kullanılan akış hücresinin şematik gösterimi (T: teflon gövde; L: Fiber optikli ışık kaynağı; P: kolon; G: kuartz pencere)	52
Şekil 3.4. GCE/MWCNT/CdS-ZnS'ün hazırlanma prosedürlerine ait şematik bir gösterim	59
Şekil 3.5. Akışa Enjeksiyon Sistemi düzeneğinin şematik diyagramı Ar= Ar gazı; T=taşıyıcı çözelti; P= Peristaltik pompa; E.V.=Enjeksiyon vanası; I.K.=Işık kaynağı; A=atık; A.H.= Akış hücresi; Ç.E.=Çalışma elektrodu; K.E.=Karşılaştırma elektrodu.....	63
Şekil 3.6. K.PGE/CdS-ZnS-MAA yüzeyine GDH immobilizasyonuna ilişkin şematik gösterim.....	64
Şekil 3.7. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA yüzeyine GDH immobilizasyonuna ilişkin şematik gösterim	64
Şekil 3.8. K.PGE/ZnS-MAA-ALDH yüzeyine ALDH immobilizasyonuna ilişkin şematik gösterim.....	65
Şekil 3.9. GCE/MWCNT/ZnS-MAA-PAMAM yüzeyine ALDH immobilizasyonuna ilişkin şematik gösterim	65
Şekil 3.10. QD Modifiye PGE yüzeyine prob-DNA tutturulması ve hibridizasyona ait deneysel prosedürü.....	68
Şekil 4.1. Elektrokimyasal impedans devre modeli ve impedans eğrisinin gösterimi. Rs: Çözelti direnci, R _{ct} : elektron transfer direnci, C: Sığa, W:Warburg impedansı..	72

- Şekil 4.2. A) Yalın GCE B) CdS/GCE C) CdS-PAMAM/GCE D) CdS-ZnS/GCE E) CdS-ZnS-PAMAM/GCE'nin 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamındaki impedans eğrileri 73
- Şekil 4.3. A) Yalın GCE B) CdS/GCE C) CdS-PAMAM/GCE D) CdS-ZnS/GCE E) CdS-ZnS-PAMAM/GCE nin 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamında kaydedilen döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 50 mV/s 75
- Şekil 4.4. 0,40 mM NADH'nin 0,10 M KCl içeren pH 7,0 fosfat tamponu ortamında A) Yalın GCE B) CdS/GCE C) CdS-PAMAM/GCE D) CdS-ZnS/GCE E) CdS-ZnS-PAMAM/GCE de elde edilen döngüsel voltammogramı 1:İşıksız 2:ışıklı. Tarama hızı: 20 mV/s 76
- Şekil 4.5. A) Yalın PGE B) CdS/PGE C) CdS-PAMAM/PGE D) CdS-ZnS/PGE E) CdS-ZnS-PAMAM/PGE'nin 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamındaki impedans eğrileri 77
- Şekil 4.6. A) Yalın PGE B) CdS/PGE C) CdS-PAMAM/PGE D) CdS-ZnS/PGE E) CdS-ZnS-PAMAM/PGE'nin 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamında kaydedilen döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 50 mV/s 78
- Şekil 4.7. 0,40 mM NADH'nin M KCl içeren pH 7,0 fosfat tamponu ortamında A) Yalın PGE B) CdS/PGE C) CdS-PAMAM/PGE D) CdS-ZnS/PGE E) CdS-ZnS-PAMAM/PGE de elde edilen döngüsel voltammogramı 1:İşıksız 2:ışıklı. Tarama hızı: 20 mV/s 79
- Şekil 4.8. A) Yalın GCE, B) GCE/CdS, C) GCE/CdS-MAA'nın 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamındaki impedans eğrileri..... 82
- Şekil 4.9. A) Yalın GCE B) GCE-CdS C) GCE-CdS-MAA'nın 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamında kaydedilen döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 50 mV/s 83
- Şekil 4.10. A) Yalın GCE, B) GCE-CdS ve C) GCE-CdS-MAA'nın SEM görüntüleri..... 83
- Şekil 4.11. A) Yalın GCE, B) GCE/CdS, C) GCE/CdS-MAA'nın fotoğrafları..... 84
- Şekil 4.12. A) Yalın GCE'nin destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH'nin yalın GCE'deki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışısız 2) ışıklı 86
- Şekil 4.13. A) GCE/CdS'nin destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH'nin GCE/CdS'deki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M

	KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışiksiz 2) ışıklı	86
Şekil 4.14.	A) GCE/CdS-MAA'nin destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH'nin GCE/CdS-MAA'daki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışiksiz 2) ışıklı	87
Şekil 4.15.	A) GCE/MWCNT, B) GCE/MWCNT/CdS, C) GCE/MWCNT/CdS-MAA'nın 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamında kaydedilen impedans eğrileri	88
Şekil 4.16.	A) Yalın GCE, B) GCE/MWCNT, C) GCE/MWCNT/CdS, D) GCE/MWCNT/CdS-MAA'nın 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamında kaydedilen döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 50 mV/s	89
Şekil 4.17.	A) Yalın GCE, B) GCE/MWCNT C) GCE/MWCNT/CdS-MAA'nın SEM görüntüleri	89
Şekil 4.18.	A) GCE/MWCNT'nin destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH'nin GCE/MWCNT'deki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışiksiz 2) ışıklı	91
Şekil 4.19.	A) GCE/MWCNT/CdS'nin destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH'nin GCE/MWCNT/CdS'deki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışiksiz 2) ışıklı	91
Şekil 4.20.	A) GCE/MWCNT/CdS-MAA'nın destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH'nin GCE/MWCNT/CdS-MAA'deki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışiksiz 2) ışıklı	92
Şekil 4.21.	A) Yalın PGE, B) PGE-CdS, C) PGE-CdS-MAA'nın 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamındaki impedans eğrileri.....	93
Şekil 4.22.	A) Yalın PGE, B) PGE-CdS, C) PGE-CdS-MAA'nın 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamında kaydedilen döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 50 mV/s	94
Şekil 4.23.	A) K.PGE, B) K.PGE/CdS, C) K.PGE/CdS-MAA'nın 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamındaki impedans eğrileri.....	95
Şekil 4.24.	A) K.PGE, B) K.PGE-CdS, C) K.PGE-CdS-MAA'nın 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamında kaydedilen döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 50 mV/s	96
Şekil 4.25.	A) Yalın PGE, B) PGE/CdS, C) PGE/CdS-MAA, D) PGE/CdS-ZnS-MAA'nın	

SEM görüntüleri.....	97
Şekil 4.26. A) Yalın K.PGE, B) K.PGE/CdS C) K.PGE/CdS-MAA D) K.PGE/CdS-ZnS-MAA'nın SEM görüntüleri	98
Şekil 4.27. A) Yalın PGE'nin destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH'nin yalın PGE'deki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışısız 2) ışıklı	99
Şekil 4.28. A) PGE/CdS'nin destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH'nin PGE/CdS'deki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışısız 2) ışıklı	100
Şekil 4.29. A) PGE/CdS-MAA'nin destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH'nin PGE/CdS-MAA'daki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışısız 2) ışıklı	100
Şekil 4.30. A) K.PGE'nin destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH'nin K.PGE'deki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışısız 2) ışıklı	101
Şekil 4.31. A) K.PGE-CdS'nin destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH'nin K.PGE/CdS'deki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışısız 2) ışıklı	101
Şekil 4.32. A) K.PGE/CdS-MAA'nın destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH'nin K.PGE/CdS-MAA'daki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışısız 2) ışıklı	102
Şekil 4.33. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak farklı uygulama potansiyellerinde 0,10 mM NADH için elde edilen fiagramlar. (akış hızı: 1,3 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL ve kolon uzunluğu: 10 cm, taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS)	103
Şekil 4.34. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak elde edilen fiagramlardan, 0,10 mM NADH için hesaplanan amperometrik (siyah çizgi) ve fotoamperometrik (kırmızı çizgi) pik akımlarının uygulama potansiyeli ile değişimi	104
Şekil 4.35. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak farklı akış hızlarında 0,10 mM NADH için elde edilen fiagramlar (uygulama potansiyeli: +150 mV, örnek yükleme hacmi: 100 µL ve kolon uzunluğu: 10 cm, taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS).....	105
Şekil 4.36. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak 0,10 mM NADH için elde edilen fiagramlardan hesaplanan a) amperometrik ve b) fotoamperometrik	

	akımların akış hızıyla değişim grafiği	105
Şekil 4.37.	FIA sisteminde GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak farklı derişimlerde NADH için elde edilen akım-zaman eğrileri (Taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS; Uygulama potansiyeli: +150 mV; akış hızı: 1,0 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm)	106
Şekil 4.38.	FIA sisteminde GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak optimum koşullarda a) amperometrik, b) fotoamperometrik yöntemle elde edilen pik akımlarının NADH derişimine karşı değişimi	107
Şekil 4.39.	K.PGE/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak farklı uygulama potansiyellerinde 0,10 mM NADH için elde edilen fiagramlar (akış hızı: 1,3 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL ve kolon uzunluğu: 10 cm, taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS).....	108
Şekil 4.40.	K.PGE/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak elde edilen fiagramlardan, 0,10 mM NADH için hesaplanan amperometrik (siyah çizgi) ve fotoamperometrik (kırmızı çizgi) pik akımlarının uygulama potansiyeli ile değişimi	109
Şekil 4.41.	K.PGE/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak farklı akış hızlarında 0,10 mM NADH için elde edilen fiagramlar (uygulama potansiyeli: +600 mV, örnek yükleme hacmi: 100 µL ve kolon uzunluğu: 10 cm, taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS).....	110
Şekil 4.42.	K.PGE-CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak 0,10 mM NADH için elde edilen fiagramlardan hesaplanan a) amperometrik ve b) fotoamperometrik akımların akış hızıyla değişim grafiği	110
Şekil 4.43.	FIA sisteminde K.PGE/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak farklı derişimlerde NADH için elde edilen akım-zaman eğrileri (Taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS; Uygulama potansiyeli: +600 mV; akış hızı: 1,75 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 L; kolon uzunluğu: 10 cm)	111
Şekil 4.44.	FIA sisteminde K.PGE-CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak optimum koşullarda a) amperometrik, b) fotoamperometrik yöntemle elde edilen pik akımlarının NADH derişimine karşı değişimi	112
Şekil 4.45.	K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH'nin destek elektrolitteki (a1 ve a2) ve 40,0 mM glukoz ortamındaki (b1 ve b2) döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl ve 10,0 mM NAD ⁺ içeren pH 7,0 PBS; a1 ve b1: ışısız; a2 ve b2: ışıklı. İç Şekil: K.PGE/GDH'nin 40,0 mM glukoz ortamındaki ışısız (a) ve ışıklı (b) döngüsel voltammogramlar	114

- Şekil 4.46. K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak farklı uygulama potansiyellerinde 0,50 mM glukoz için elde edilen fiagramlar (akış hızı: 1,3 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL ve kolon uzunluğu: 10 cm, taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS)..... 115
- Şekil 4.47. K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak elde edilen fiagramlardan, 0,50 mM glukoz için hesaplanan a) amperometrik ve b) fotoamperometrik pik akımlarının uygulama potansiyeli ile değişimi..... 116
- Şekil 4.48. K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak farklı akış hızlarında 0,50 mM glukoz için elde edilen fiagramlar (uygulama potansiyeli: +800 mV, örnek yükleme hacmi: 100 µL ve kolon uzunluğu: 10 cm, taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS)..... 117
- Şekil 4.49. K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak 0,50 mM glukoz için elde edilen fiagramlardan hesaplanan a) amperometrik ve b) fotoamperometrik akımların akış hızıyla değişim grafiği 117
- Şekil 4.50. FIA sisteminde K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak farklı derişimlerde glukoz için elde edilen akım-zaman eğrileri (Taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS; Uygulama potansiyeli: +800 mV; akış hızı: 0,6 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm) 118
- Şekil 4.51. FIA sisteminde K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak optimum koşullarda a) amperometrik, b) fotoamperometrik yöntemle elde edilen pik akımlarının glukoz derişimine karşı değişimi..... 119
- Şekil 4.52. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH'nin destek elektrolitteki (a1 ve a2) ve 20,0 mM glukoz ortamındaki (b1 ve b2) döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl ve 10,0 mM NAD⁺ içeren pH 7,0 PBS; a1 ve b1: ışiksiz; a2 ve b2: ışıklı 121
- Şekil 4.53. QD modifiye GCE/MWCNT kullanımına ve GDH ve NAD⁺/NADH redoks çiftine bağlı fotoelektrokimyasal glukoz biyosensör mekanizmasına ait şematik gösterim..... 122
- Şekil 4.54. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak farklı uygulama potansiyellerinde 0,50 mM glukoz için elde edilen fiagramlar (akış hızı: 0,8 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL ve kolon uzunluğu: 10 cm, taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS) 123
- Şekil 4.55. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak elde edilen fiagramlardan, 0,50 mM glukoz için hesaplanan a) amperometrik ve b) fotoamperometrik pik

akımlarının uygulama potansiyeli ile değişimi	123
Şekil 4.56. GCE/MWCNT-CdS-ZnS-MAA-GDH kullanılarak farklı akış hızlarında 0,50 mM glukoz için elde edilen fiagramlar (uygulama potansiyeli: +400 mV, örnek yükleme hacmi: 100 µL ve kolon uzunluğu: 10 cm, taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS).....	124
Şekil 4.57. GCE/MWCNT-CdS-ZnS-MAA-GDH kullanılarak 0,50 mM glukoz için elde edilen fiagramlardan hesaplanan a) amperometrik ve b) fotoamperometrik akımların akış hızıyla değişim grafiği	125
Şekil 4.58. FIA sisteminde GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak farklı derişimlerde glukoz için elde edilen akım-zaman eğrileri (Taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS; Uygulama potansiyeli: +400 mV; akış hızı: 0,6 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm)	126
Şekil 4.59. FIA sisteminde GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak optimum koşullarda a) amperometrik, b) fotoamperometrik yöntemle elde edilen pik akımlarının glukoz derişimine karşı değişimi	127
Şekil 4.60. 5×10^{-4} M glukozun (a), 5×10^{-4} M glutamik asit (b), galaktoz (c), sakkaroz (d), L-Cys (e); 5×10^{-2} M glutamik asit (f), galaktoz (g), sakkaroz (h), L-Cys (i) ve 5×10^{-4} M UA, AA, DA varlığında K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH elektrot ile alınmış fiagramları. (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 fosfat tampon çözeltisi, Uygulama potansiyeli: +800 mV; akış hızı: 0,6 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm)	128
Şekil 4.61. 5×10^{-4} M glukozun (a), 5×10^{-4} M glutamik asit (b), galaktoz (c), sakkaroz (d), L-Cys (e); 5×10^{-2} M glutamik asit (f), galaktoz (g), sakkaroz (h), L-Cys (i) ve 5×10^{-4} M DA, AA, UA varlığında GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH elektrot ile alınmış fiagramları. (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 fosfat tampon çözeltisi, Uygulama potansiyeli: +400 mV; akış hızı: 0,6 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm)	129
Şekil 4.62. K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH ile alınmış amperometrik (siyah çizgili) ve fotoamperometrik (kırmızı çizgili) standart katma fiagramları, a) örnek, b) örnek+0,25 mM glukoz, c) örnek+0,50 mM glukoz, d) örnek+0,75 mM glukoz. (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS, Uygulama potansiyeli: +800 mV; akış hızı: 0,6 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm).....	130
Şekil 4.63. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH ile alınmış amperometrik (siyah çizgili)	

ve fotoamperometrik (kırmızı çizgili) standart katma fiagramları a) örnek, b) örnek+0,25 mM glukoz, c) örnek+0,50 mM glukoz, d) örnek+0,75 mM glukoz, e) örnek+1,0 mM glukoz (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS, Uygulama potansiyeli: +400 mV; akış hızı: 0,6 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm).....	130
Şekil 4.64. K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH ile yapay serum için alınmış elektrokatalitik (A) ve fotoelektrokatalitik (B) standart katma grafiği	131
Şekil 4.65. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH ile yapay serum için alınmış elektrokatalitik (A) ve fotoelektrokatalitik (B) standart katma grafiği	131
Şekil 4.66. K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH ile alınmış amperometrik (siyah çizgili) ve fotoamperometrik (kırmızı çizgili) standart katma fiagramları a) örnek, b) örnek+0,25 mM glukoz, c) örnek+0,50 mM glukoz, d) örnek+0,75 mM glukoz (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS, Uygulama potansiyeli: +800 mV; akış hızı: 0,6 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm).....	133
Şekil 4.67. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH ile alınmış amperometrik (siyah çizgili) ve fotoamperometrik (kırmızı çizgili) standart katma fiagramları a) örnek, b) örnek+0,25 mM glukoz, c) örnek+0,50 mM glukoz, d) örnek+0,75 mM glukoz, e) örnek+1,0 M glukoz. (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS, Uygulama potansiyeli: +400 mV; akış hızı: 0,6 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm).....	133
Şekil 4.68. K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH ile dekstroz için alınmış elektrokatalitik (A) ve fotoelektrokatalitik (B) standart katma grafiği.....	134
Şekil 4.69. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH ile dekstroz için alınmış elektrokatalitik (A) ve fotoelektrokatalitik (B) standart katma grafiği	134
Şekil 4.70. K.PGE/CdS-ZnS-MAA/ALDH'nin destek elektrolitteki (a1 ve a2) ve 500,0 mM etanol ortamındaki (b1 ve b2) döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl ve 10,0 mM NAD ⁺ içeren pH 7,0 PBS; a1 ve b1: ışiksiz; a2 ve b2: ışıklı	137
Şekil 4.71. A) K.PGE/CdS-MAA/ALDH B) K.PGE/ZnS-MAA/ALDH'nin destek elektrolitteki (a1 ve a2) ve 500,0 mM etanol ortamındaki (b1 ve b2) döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl ve 10,0 mM NAD ⁺ içeren pH 7,0 PBS; a1 ve b1: ışiksiz; a2 ve b2: ışıklı.....	138
Şekil 4.72. K.PGE/ALDH'nin destek elektrolitteki (a1 ve a2) ve 500,0 mM etanol	

- ortamındaki (b1 ve b2) döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl ve 10,0 mM NAD⁺ içeren pH 7,0 PBS; a1 ve b1: ışıksız; a2 ve b2: ışıklı..... 139
- Şekil 4.73. K.PGE/ZnS-MAA/ALDH kullanılarak farklı uygulama potansiyellerinde 0,50 mM etanol için elde edilen fiagramlar (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS, akış hızı: 1,3 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm)..... 140
- Şekil 4.74. K.PGE/ZnS-MAA/ALDH kullanılarak elde edilen fiagramlardan, 0,50 mM etanol için hesaplanan a) amperometrik ve b) fotoamperometrik pik akımlarının uygulama potansiyeli ile değişimi..... 140
- Şekil 4.75. K.PGE/CdS-MAA/ALDH kullanılarak farklı akış hızlarında 0,50 mM etanol için elde edilen fiagramlar (uygulama potansiyeli: +900 mV, örnek yükleme hacmi: 100 µL ve kolon uzunluğu: 10 cm, taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS)..... 141
- Şekil 4.76. K.PGE/CdS-MAA/ALDH kullanılarak 0,50 mM etanol için elde edilen fiagramlardan hesaplanan a) amperometrik ve b) fotoamperometrik akımların akış hızıyla değişim grafiği 142
- Şekil 4.77. FIA sisteminde K.PGE/CdS-MAA/ALDH kullanılarak farklı derişimlerde etanol için elde edilen akım-zaman eğrileri (Taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS; Uygulama potansiyeli: +900 mV; akış hızı: 1,5 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm) 143
- Şekil 4.78. FIA sisteminde K.PGE/CdS-MAA/ALDH kullanılarak optimum koşullarda a) amperometrik, b) fotoamperometrik yöntemle elde edilen pik akımlarının etanol derişimine karşı değişimi 144
- Şekil 4.79. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/ALDH'nin destek elektrolitteki (a1 ve a2) ve 500,0 mM etanol ortamındaki (b1 ve b2) döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl ve 10,0 mM NAD⁺ içeren pH 7,0 PBS; a1 ve b1: ışıksız; a2 ve b2: ışıklı 146
- Şekil 4.80. A) GCE/MWCNT/CdS-MAA/ALDH, B) GCE/MWCNT/ZnS-MAA/ALDH, C) GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH, D) GCE/MWCNT/ALDH destek elektrolitteki (a1 ve a2) ve 500,0 mM etanol ortamındaki (b1 ve b2) döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl ve 10,0 mM NAD⁺ içeren pH 7,0 PBS; a1 ve b1: ışıksız; a2 ve b2: ışıklı 147
- Şekil 4.81. GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH kullanılarak farklı uygulama

	potansiyellerinde 0,50 mM etanol için elde edilen fiagramlar (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS, akış hızı: 1,5 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm).....	148
Şekil 4.82.	GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH kullanılarak elde edilen fiagramlardan, 0,50 mM etanol için hesaplanan a) amperometrik ve b) fotoamperometrik pik akımlarının uygulama potansiyeli ile değişimi	149
Şekil 4.83.	GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH kullanılarak farklı akış hızlarında 0,50 mM etanol için elde edilen fiagramlar (uygulama potansiyeli: +700 mV, örnek yükleme hacmi: 100 µL ve kolon uzunluğu: 10 cm, taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS).....	150
Şekil 4.84.	GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH kullanılarak farklı akış hızlarında 0,50 mM etanol için elde edilen fiagramlar (uygulama potansiyeli: +700 mV, örnek yükleme hacmi: 100 µL ve kolon uzunluğu: 10 cm, taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS).....	150
Şekil 4.85.	FIA sisteminde GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH kullanılarak farklı derişimlerde etanol için elde edilen akım-zaman eğrileri (Taşıyıcı elektrolit: 1.0 M KCl içeren pH 7,0 PBS; Uygulama potansiyeli: +700 mV; akış hızı: 1,5 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm)	151
Şekil 4.86.	FIA sisteminde GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH kullanılarak optimum koşullarda a) amperometrik, b) fotoamperometrik yöntemle elde edilen pik akımlarının etanol derişimine karşı değişimi	152
Şekil 4.87.	5×10^{-4} M etanolün (a), 5×10^{-4} M metanol (b), glukoz (c), izopropanol (d); 5×10^{-2} M metanol (e), glukoz (f), izopropanol (g) ve 5×10^{-4} M UA (h), AA (j), DA (k) varlığında K.PGE/ZnS-MAA/ALDH elektrot ile alınmış fiagramları. (Taşıyıcı çözelti: 1.0 M KCl içeren pH 7,0 fosfat tampon çözeltisi, Uygulama potansiyeli: +900 mV; akış hızı: 1,5 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm).....	154
Şekil 4.88.	5×10^{-4} M etanolün (a), 5×10^{-4} M metanol (b), glukoz (c), izopropanol (d); 5×10^{-2} M metanol (e), glukoz (f), izopropanol (g) ve 5×10^{-4} M UA (h), AA (j), DA (k) varlığında GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH elektrot ile alınmış fiagramları. (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 fosfat tampon çözeltisi, Uygulama potansiyeli: +700 mV; akış hızı: 1,5 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm).....	154
Şekil 4.89.	Sabit derişimdeki (15 ppm) hedef dizisi (5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT	

- AC-3') ile artan derişimdeki prob (5, 10, 15, 20 ppm) (5'-GTA TCT ACC ACA GTA ACA AA-3') arasında gerçekleştirilen hibridizasyon sonrasında K.PGE/CdS-ZnS-MAA ile elde edilen guanin sinyalleri için alınmış histogramlar..... 156
- şekil 4.90. Artan hedef dizi konsantrasyonlarında a) 2,5 ppm, b) 5 ppm, c) 7,5 ppm, d)10 ppm, e) 12,5 ppm, f) 15 ppm ve 15 ppm prob dizileri ile K.PGE/CdS-ZnS-MAA kullanılarak, elektrot yüzeyi ışıklandırılarak ve ışıklandırılmaksızın alınan guanin sinyalleri için histogramlar 157
- şekil 4.91. K.PGE/CdS-ZnS yüzeyi ışıklandırılarak ve ışıklandırılmaksızın a) yüzeyde sadece prob varken, b) prob-hedef hibridizasyonu sonrasında, c) tek dizisi değişik DNA ve d) hedef dışı dizi arasındaki hibridizasyondan sonra elde edilen guanine ait histogramlar 158
- şekil 4.92. Prob tutturulmuş K.PGE/CdS-ZnS-MAA ile hibridizasyon öncesinde ve sonrasında elde edilen; a) yüzeyde sadece prob varken ışıksız, b) prob DNA ile hedef dizi DNA hibridizasyonundan sonra ışıksız, a1 ve b1 ışıklı ortamda 0,02 M NaCl içeren; 0,50 M asetat tamponu içerisinde (pH 4,8), guanine ait differansiyel puls voltammogramları (puls genliği 50 mV, puls zamanı 0,2. tarama hızı: 16 mV/s)..... 159
- şekil 4.93. K.PGE/CdS-ZnS-MAA'ya ait hibridizasyon öncesi ve sonrasında alınmış a) yalın K.PGE, b) K.PGE/CdS-ZnS-MAA, c) prob ve hedef dizi ile hibridizasyondan sonra, d) prob ve hedef dışı dizi ile hibridizasyondan sonra, e) sadece proba ait 0,1 M KCl içeren 2,5 mM $K_4Fe(CN)_6^{3-} / K_3Fe(CN)_6^{4-}$ içerisinde alınmış impedans eğrileri ve bu eğriye uygulanan impedans denklik devresi. . 160

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 4.1. Yalın ve QD modifiye elektrotların impedans ve döngüsel voltammogramlarından elde edilen değerler (n=5).....	81
Çizelge 4.2. 2,0 mM NADH'nin döngüsel voltammogramlarından elde edilen yükseltgenme pik potansiyelleri ve akımı (n=3).....	85
Çizelge 4.3. QD modifiye elektrotlarla NADH'a dayalı biyosensör için elde edilen analitiksel parametreler	112
Çizelge 4.4. QD modifiye elektrotlarla GDH enzimine dayalı biyosensör için elde edilen analitiksel parametreler	120
Çizelge 4.5. K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH ve GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH elektrotları ile elde edilen test sonuçları.....	132
Çizelge 4.6. K.PGE-CdS-ZnS-MAA-GDH ve MWCNT/GCE-CdS-ZnS-MAA-GDH elektrotları ile dekstroz çözeltisi için elde edilen test sonuçları.....	136
Çizelge 4.7. QD modifiye elektrotlarla ALDH enzimine dayalı biyosensör için elde edilen analitiksel parametreler	145

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Biyosensörler, biyolojik yanıtları elektriksel sinyallere çeviren aygıtlardır. Elektrokimyasal sensörlerin yapısına enzim, doku, hücre gibi biyolojik maddeler ilave edilerek biyosensörler elde edilmektedir (Turner, 1987). Son yıllarda nanoteknolojinin gelişmesiyle beraber birçok yeni özellikte nanomateryaller keşfedilmiş ve biyosensörlere uygulamaları çalışılmaya başlanmıştır. Malzeme bilimi, moleküler mühendislik, kimya ve biyoteknolojinin birleşimi ile geliştirilen bu biyosensörler, biyomolekül tayininde duyarlık ve seçiciliği arttırmakla beraber, biyomoleküler tanımlama, patolojik tanı ve çevre düzenlenmesi gibi uygulamalarda yüksek kullanım alanına sahiptir. Altın nanopartiküller (Pan ve ark., 2007a), karbon nanotüpler (carbon nanotubes, CNT) (Cui ve ark., 2007), magnetik nanopartiküller (Pan ve ark., 2007b) ve kuantum noktalar (quantum dots, QD) (You ve ark., 2007) gibi çeşitli nanomateryaller sahip oldukları fiziksel, kimyasal, mekanik, magnetik ve optik özellikleri ile duyarlık ve seçiciliği arttırdığından biyosensörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. İmmobilize edilen biyomoleküllerin miktarı, nanomateryallerin sağladıkları geniş yüzey alanıyla artmakta ve böylece tasarlanan biyosensörün duyarlığı arttırılmaktadır. Nanomateryaller aynı zamanda enzimin aktivitesini koruma adına uygun mikroortamı hazırlarken enzimatik reaksiyon sonunda meydana gelen ürün sinyalinin güçlenmesini sağlamakta, elektrot ile enzimin redoks merkezi arasındaki direk elektron transferini kolaylaştırmaktadır (Zhang ve ark., 2009). Nanomateryallerden CNT'ler nanoelektronik, biyomedikal mühendislik ve biyoanaliz uygulamalarında geniş yer bulmaktadır (Cui ve ark., 2004; Pan ve ark., 2006). CNT'ler yüksek elektrik iletkenlikleri ve mekanik özellikleri sayesinde ultraduyarlı elektrokimyasal biyosensör tasarımında sıkça kullanılmaktadır. Yüksek seçiciliğe sahip, duyarlı ve floresan özellikte biyosensörler ile tayin metodu geliştirebilmek adına zaman zaman CNT ve QD'lar bir arada kullanılabilir (Cui ve ark., 2008).

QD'lar elektro-optik özellik göstermeleri, floresan boyalara göre daha parlak ve fotokimyasal değişimlere karşı daha kararlı olmaları sebebiyle biyoanalizler, biyoprob ve biyosensörlerin tasarımında ve iyon, nükleik asit, protein, enzim gibi küçük moleküllerin seçimli tayinlerinde son zamanlarda sıkça kullanılmaktadır (Algar ve ark., 2010). QD'lar enzim immobilizasyonu için etkin yüzey alanı oluşturmakta ve sahip oldukları elektrokatalitik aktiviteleri ile elektron transfer reaksiyonlarını katalizleyerek kolaylaştırmakta, bu da ilgilenilen analitin tayininde duyarlığı arttırmaktadır. Enzim

moleküllerinin birçok kısımdan nanomalzemeye tutunması proteinin ayrılmasını zorlaştırmakta, böylece bağlanan enzimin kararlılığı artmaktadır (Zhang ve ark., 2009).

Fotoelektrokimyasal teknikler, geleneksel elektrokimyasal ve optik yöntemlere göre potansiyel olarak daha yüksek hassasiyete sahiptir. Bu nedenle fotoelektrokimyasal sensör ve biyosensör tasarımında kullanılmak üzere yeni fotoduyar materyaller araştırılmaktadır. Son zamanlarda, fotoelektrokimyasal özellik gösteren nanopartiküllere dayanan fotoelektrokimyasal sensörler üzerine yapılan çalışmalar oldukça artmıştır. Bütün bu çalışmalarda fotoelektrokimya, elektrokimyasal sensör ve biyosensörlerde yüksek duyarlılıkla kullanılmıştır. Bu anlamda QD'lar, geniş uyarma spektrumu, iyi bir fotokararlılık ve ayarlanabilir emisyon spektrumları gibi önemli özelliklere sahip olup, bu özellikler optik ve fotoelektrokimyasal biyosensörlerin tasarımında kullanılan fotoaktif materyaller arasında QD'ları önemli bir konuma getirmiştir (Liu ve ark., 2006; Wang ve ark., 2009b; Fan ve ark., 2010; Yin ve ark., 2010; Galloway ve ark., 2012; Petryayeva ve Krull, 2012; Ruan ve ark., 2012; Tan ve ark., 2012; Wang ve ark., 2012b; Zhang ve ark., 2012).

Enzime dayalı biyosensör geliştirme çalışmalarında daha çok oksidaz ve dehidrogenaz enzimleri kullanılmaktadır ve burada kullanılan enzimlerin kararlılığı çok önemlidir. Bu tez araştırmasında dehidrogenaz enzime dayalı biyosensör tasarımlarında $NAD^+/NADH$ redoks çifti kullanılarak enzimatik tepkime sonucu oluşan $NADH$ 'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenmesine bağlı fotoakım izlenmiştir (Eftekhari, 2001; Tsai ve ark., 2007; Agüi ve ark., 2009; Schubert ve ark., 2010; Salimi ve ark., 2012; Jafari ve ark., 2014a, b; Dilgin ve Gökçel, 2015; Liu ve ark., 2015). Biyosensörler ve enzimatik analiz alanında NAD^+ 'a dayalı uygulamalar geniş yer kaplamaktadır. Dehidrogenazlar (300'den daha fazla), gıda, çevre, klinik kimya ve biyoproses uygulamaları için oldukça seçicilik gösteren enzimlerdir (Katakis ve Dominguez, 1997). NAD^+ ve dehidrogenaz enzimlere dayanan biyolojik tayinler, uygulama alanları (klinik, gıda kimyası), immobilizasyon matrisi tipi (sol-jel matrisleri, perde baskılı elektrotlar) veya analizin gerçekleştirildiği cihazın tipine göre çeşitli çalışmalarla birçok derlemede yer almaktadır (Katakis ve Dominguez, 1997; Lobo ve ark., 1997). Konu hakkındaki çalışma sayısı kriter olarak alındığında ve bazılarının ticari uygulamalarına bakıldığında en önemli örneklerin akışa enjeksiyon analiz (Flow Injection Analysis, FIA) sisteminde gerçekleştirilen NAD^+ -dehidrogenaz biyoanalizleri olduğu görülmektedir (Pappas ve ark., 2002).

Elektrokimyasal sensör ve biyosensör tasarımında kullanılan tekniklerden FIA, giderek daha fazla ilgi görmektedir (Wang ve ark., 1991; Hansen, 1996; Mayer ve

Ruzicka, 1996; Staden ve Van Staden, 2012). FIA, akış koşullarında çalışma, küçük dar bir kolonla, mikro hacimlerde örneklerle çalışılabilme ve yüzey gerilimi tarafından etkilenmeme gibi önemli avantajlar sağlamaktadır. Akış koşullarında çalışma ile analiz ortamını ve süreyi kontrol etmek oldukça kolaydır, çünkü kapalı bir ortamda çalışılmakta böylece sıvıların buharlaşması önlenmektedir. Ayrıca çözeltilerin yenilenebilir bir yol izlemesini sağlamaktadır. Akış koşullarında çalışma ile birçok dedektör ve sensör klasik analizlerde olduğundan farklı bir şekilde, daha fazla tekrarlanabilir sonuç sağlamaktadır (Ruzicka ve Hansen, 1988). Bu sebeple akış koşullarında analiz, analitik uygulamalar, kimyasal proseslerin incelenmesi, sensörlerin test edilerek geliştirilmesi ve çeşitli enstrümanların performanslarının artırılması gibi uygulamalarda geniş yer bularak gittikçe artan bir ilgi görmektedir. Modifiye elektrotlar kullanılarak NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine ve $NAD^+/NADH$ redoks çifti - dehidrogenaz enzimine dayalı biyosensör tasarımına dayalı çalışmalar FIA sisteminde gerçekleştirilmiştir (Lobo ve ark., 1996; Florou ve ark., 1998; Jaraba ve ark., 1998; De Lucca ve ark., 2002; Gao ve ark., 2003; Ramirez Molina ve ark., 2003; Chen ve ark., 2004; Sha ve ark., 2004; Prieto-Simon ve ark., 2007; Piano ve ark., 2010; Dilgin ve ark., 2011; Hasebe ve ark., 2011; Baskar ve ark., 2012).

Biyosensör çalışmalarında kullanılan elektrot türü, biyosensörün duyarlılık, maliyet, seçicilik ve kararlılığını doğrudan ilgilendirdiğinden, elektrot materyalinin seçimi büyük önem arz etmektedir. Birçok elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal sensör, biyosensör tasarımında camımsı karbon elektrot, altın elektrot, karbon pasta elektrot, ITO elektrot gibi farklı elektrotlar yalın halde ya da farklı nanopartiküllerle veya organik redoks mediyatörlerle modifiye edilerek kullanılmaktadır. Son yıllarda yüksek seçicilik, kararlılık, tekrarlanabilirlik, düşük maliyet ve tek kullanımlık özelliği gibi birçok avantaja sahip kalem grafit elektrotların (pencil graphite electrode, PGE) kullanımına artan bir ilgi görülmektedir (Wang ve ark., 2001; Karadeniz ve ark., 2003). PGE'ler diğer elektrotların kullanımında gerçekleştirilmesi zorunlu olan uzun temizleme prosedürlerine gerek duyulmadan kolayca modifiye edilebilme özellikleriyle dikkat çekmektedir. Böylece daha hızlı yenilenebilir yüzey sağlamaktadırlar. Bu özelliklerinden dolayı PGE'ler biyosensör ve sensör çalışmalarında son zamanlarda oldukça sık kullanılmıştır (Wang ve ark., 2000; Wang ve ark., 2001; Keskin ve ark., 2010; Ozcan ve Sahin, 2010; Dogan Topal ve Ozkan, 2011; Ozcan ve Sahin, 2011; Dilgin ve ark., 2012b, c, d; Devi ve ark., 2013; Dilgin ve ark., 2013; Uygun ve Dilgin, 2013; Yardım ve Senturk, 2013; Congur ve ark., 2014; Dede ve ark., 2014; Elahi ve ark., 2014; Erdem ve ark., 2014; Kuralay ve ark., 2014; Mese ve ark.,

2014; Pala ve ark., 2014; Zhu ve ark., 2014; Dervisevic ve ark., 2015; Sehat ve ark., 2015).

Bu tezde sırasıyla; i) tek kullanımlı, kolay elde edilebilir, kolay modifikasyon, ticari olarak kolay elde edilebilen, ucuz, uzun temizleme prosedürleri içermeyen bir elektrot olan PGE yüzeyine CdS-ZnS QD elektrokimyasal çöktürme yoluyla biriktirilmesi, ii) hazırlanan bu modifiye elektrotla biyoelektrokimyasal çalışmalarda oldukça önemli olan NADH'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenmesi ii) CdS-ZnS modifiye elektrot yüzeyine dehidrogenaz enzimi immobilize ederek $NAD^+/NADH$ redoks çiftine dayalı elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal biyosensör geliştirilmesi iv) PGE için yeni bir fotoelektrokimyasal akış hücresi tasarlanarak dehidrogenaz enzimine dayalı elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal sensör çalışmalarının FIA sisteminde ilk defa gerçekleştirilmesi, vi) ve son olarak QD modifiye PGE ile fotoelektrokimyasal DNA biyosensörünün tasarımı amaçlanmıştır. Bunun dışında literatürde sık kullanılan ve QD'ların da modifiye edildiği çok duvarlı karbon nanotüp (Multi Walled Carbon Nanotube, MWCNT) modifiye GCE kullanılarak da benzer çalışmaların gerçekleştirilmesi tezin diğer amaçlarından. Bu amaç doğrultusunda, bundan sonraki kısımlarda Kuantum noktalar, NADH, NADH ve dehidrogenaz enzimlerine dayalı biyosensörler, fotoelektrokimya, Akışa Enjeksiyon Analiz Sistemi ve Kalem Grafit Elektrottan bahsedilecektir.

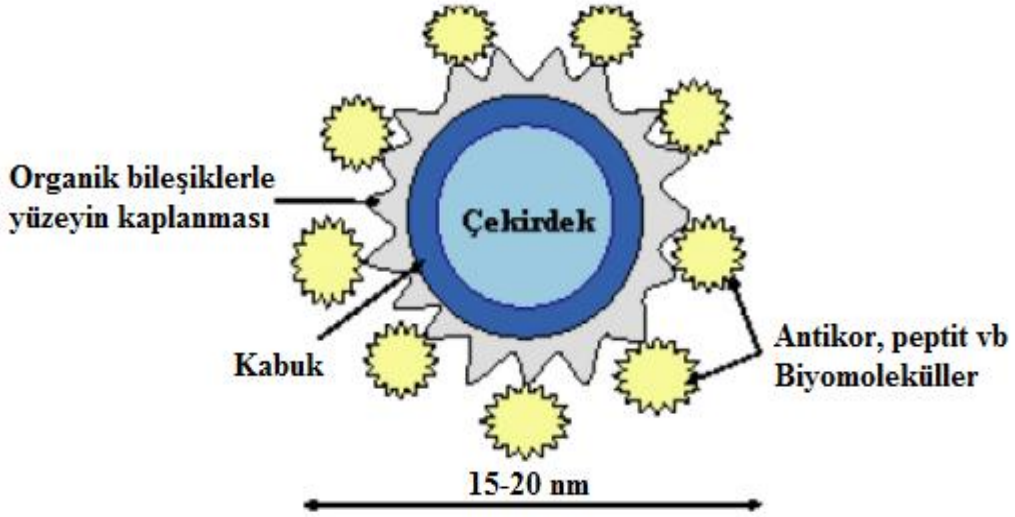
1.1. Kuantum Noktalar

Kuantum noktalar genellikle 2-6 nm aralığında boyutlara sahip, 200-10.000 atom içeren ve periyodik cetvelin III-V, II-VI ya da IV-VI grup elementlerinin oluşturduğu yarıiletken nanokristallerdir. Bu nanokristaller, birçok nanomateryal arasında biyolojik, kimyasal ve fiziksel araştırma alanlarında oldukça önemli bir yere sahiptir. QD'ların elektro-optik özellikleri materyal ve boyutluluk kavramlarının birleşiminden gelmektedir. Lüminesans özelliklerini arttırarak daha kararlı bir yapı oluşturmaları için nanokristal çekirdek etrafı ZnS tabakası ile kaplanarak core-shell (çekirdek-kabuk) yapı oluşturulmaktadır. QD'ların etrafı makromoleküller ve organik moleküllerle kaplanarak ligand-bazlı veya polimer bazlı, nötr veya yüklü hale getirilerek sudaki çözünürlükleri arttırılabilmekte ve biyokonjügasyon sağlanabilmektedir. Bu şekilde enzimlerin, antikorların, oligonükleotidlerin QD'lara bağlanması daha kolay hale gelmektedir (Algar ve ark., 2010).

Kuantum noktalar potansiyel uygulamaları ve eşsiz fotolüminesans özellikleri sayesinde yoğun araştırmalara konu olmuşlardır. Şimdiye kadar, biyolojik çalışmalarda

kullanmak için suda çözünebilen QD'ların sentezinde çok çeşitli metotlar geliştirilmiştir. Örneğin QD'lar başarılı bir şekilde hücre görüntüleme (Kaul ve ark., 2003), DNA hibridizasyonu (Medintz ve ark., 2005), biyosensörler (Hoshino ve ark., 2005) ve optik barkodlamada (Han ve ark., 2001) kullanılmaktadır. Bu sentezlenmiş QD'ların daha iyi kararlılık göstermesi, güçlü floresans yoğunlukları ve noktaların boyutuna bağlı olarak değişen renkleri sayesinde bilinen floresans boyalara karşı avantajlara sahiptir (Zhang ve ark., 2009). CdS QD'lar diğer yarıiletken materyallere kıyasla dar bant boşluğu ve görünür bölgede fotoelektrokimyasal aktiviteye sahip olması gibi avantajlara sahip olması sebebiyle geniş çapta kullanılmaktadır (Qian ve ark., 2010).

Şekil 1.1'de bir kuantum noktanın genel şeması verilmiştir. Buradan da görüldüğü gibi CdTe ya da CdSe vb. yarı iletken materyallerden oluşmuş bir anorganik çekirdek ve ZnS gibi farklı bant genişliğine sahip yarı iletkenlerden oluşan bir kabuktan meydana gelmektedir. Daha sonra bu yapıya bir organik grup bağlanarak biyomoleküllerin bağlanması sağlanabilir. Kabuk olmadan kuantum nokta sadece çekirdekten de elde edilebilir. Fakat yalın nanokristal çekirdeğin oldukça reaktif ve toksik olması, kuantum noktaya fotokimyasal bozunmaya meyleden çok kararsız bir yapı kazandırmaktadır. Bunun yanında kristalin çekirdek yapısı yanıp sönmeye gibi emisyon düzensizliklerine sebep olan yüzeylere sahiptir. Dolayısıyla ZnS gibi yüksek bant genişliğine sahip bir yarıiletken materyalle çekirdeğin kaplanması, sadece kararlılığı ve kuantum verimini arttırmakla kalmaz, aynı zamanda reaktif Cd^{2+} ve Te^{2-} iyonlarının perdelenmesini sağlayarak çekirdeğin toksikliğini pasifize etmektedir (Rizvi ve ark., 2010). Ancak biyolojik çözeltilerde çekirdeği kararlı yapmak için bir ZnS kabuk kaplama tek başına yeterli değildir, bu yüzden biyolojik ortamda çözünürlüğü sağlamak için sulu ortamda bir kaplama da gereklidir. Böylece kuantum noktalar, koşullandırılmış silika, fosfolipit miseller ya da merkaptasetik asit, merkaptoundekanoik asit, dihidrolipoik asit gibi bağlayıcılarla ya da modifiye edilmiş poliakrilik asit gibi amfifilik polimerlerle kaplanarak sulu ortamda çözünür hale getirilmektedir. Daha sonra antikor, peptit, nükleik asit vb. gibi ilgilenecek değişik türden biyomoleküller bu kaplamalara etiketlenerek, farklı biyokonjügasyon metotları geliştirilmektedir.

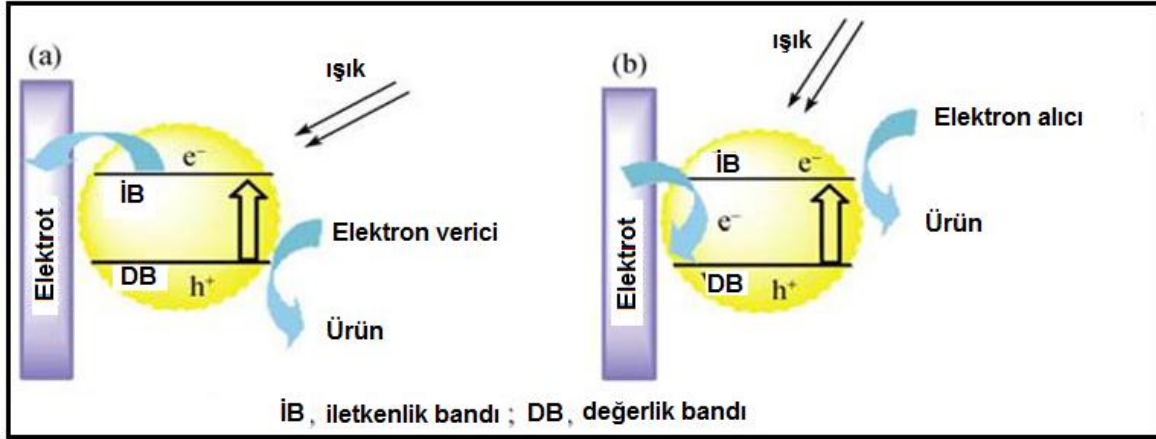


Şekil 1.1. Bir kuantum noktanın yapısı (Rizvi ve ark., 2010)

Kuantum noktalar, diğer nonoparçacıklar (Au nanopartiküller, karbon nanotüpler vb) ile karşılaştırıldığında, kuantum noktaların mükemmel bir optiksel özellik gösterdiği ve fotoelektrokimyasal çalışmalarda etkin bir rol oynadığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Fotoelektrokimyasal çalışmalarda TiO_2 , CdS, CdTe, ZnS, CdSe, ZnO, CuO gibi yarı iletkenlerle hazırlanmış modifiye elektrotlar kullanıldığı gibi, bu nanoparçacıkların kendi aralarındaki hibriti (CdS-ZnS gibi) ya da karbon nanotüp, altın nanoparçacık, grafen, fullerene gibi materyallerle de hibriti (AuNP-CdS, TiO_2 -CNT gibi) şeklinde hazırlanan kompozit elektrotlar da oldukça sık kullanılmaktadır (Peng ve ark., 1997; Xu ve ark., 2007; Butwong ve ark., 2014).

Yarı iletken nanomateryallerde elde edilen fotoakım mekanizması incelendiğinde; bir anorganik yarı iletken materyal onun band boşluğuna karşılık gelen enerjiden daha büyük bir enerjili bir fotonla ışıklandırıldığında, bu materyaller bu ışığı absorplayarak elektronlar dolu değerlik bandından (valence band, VB) boş iletkenlik bandına (conduction band, CB) uyarılırlar ve elektron-boşluk (electron-hole, e^-h^+) çifti oluşur. Proses olur olmaz, ya e^-h^+ çifti yeniden birleşecek ya da yükler aktarılacaktır. Eğer bir anodik fotoakım oluşacaksa, iletkenlik bandındaki (CB) elektronlar elektroda ve çözelti içindeki bir elektron vericisi (electron donor) de elektronlarını değerlik bandındaki (VB) boşluğa eşzamanlı olarak transfer edecektir (Şekil 1.2a). Buna karşın bir katodik akım oluşacaksa, iletkenlik bandındaki elektronlar çözeltideki bir elektron alıcısına (electron acceptor) transfer olurken, değerlik bandındaki boşluğu nötralize etmek için aynı anda elektrottan değerlik bandına elektron transferi olacaktır (Şekil 1.2b). Eğer analit bir yarı iletkenin elektron

alıcısı ya da vericisi olarak davranırsa veya analit elektron alıcısı ya da vericisi ile reaksiyona girerse, anodik ya da katodik fotoakım değişecektir. Bu fotoakım değişimine bağlı olarak analitler doğrudan ya da dolaylı olarak tayin edilebilir (Wang ve ark., 2009a; Zhang ve Zhao, 2013).

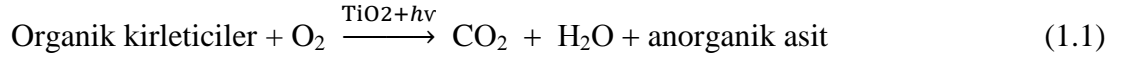


Şekil 1.2. Anorganik yarı iletken modifiye elektrotlarda fotoakım oluşum mekanizması a) Anodik fotoakım b) Katodik fotoakım (DB: Değerlik bandı İB:İletkenlik bandı, h⁺: hole (boşluk)) (Wang ve ark., 2009a; Zhang ve Zhao, 2013)'den modifiye edilmiştir

Kuantum boyut etkisinden dolayı, bulk materyallerle karşılaştırıldığında, nanomateryallerin bant boşluğu, yarıiletken nanoparçacıkların iletkenlik bandının pozitif ve değerlik bandının da negatife kayması sebebiyle artar. Sonuç olarak, yarı iletken foto boşluklar kuvvetli yükseltgeme gücüne ve foto elektronlarda kuvvetli indirgeme gücüne sahiptirler. Bununla birlikte, yarıiletken nanoparçacıkların boyutu yük taşıyıcıların serbest yolundan daha küçüktür ki bu da e^-h^+ birleşimini indirgeyebilir. Böylece yarıiletken nanoparçacıklar üstün bir foto-akım dönüştürme verimine sahip olur. Yarıiletken nanoparçacıkların diğer önemli bir özelliği de oldukça reaktif bir yüzey özelliğine sahip olmalarıdır.

Fotoelektrokimyasal analizlerde anorganik yarıiletken modifiye elektrot olarak en çok TiO₂ kullanılmıştır. TiO₂ nanoparçacıklar kendisinin band boşluğuna denk gelen enerjiden daha büyük enerjili fotonlarla uyarıldığında, yüksek yükseltgeme gücüne sahip foto h⁺lar oluşur ki, bu h⁺lar su ile reaksiyona girerek oldukça güçlü bir yükseltgen olan OH[•] oluşturur. Bu radikal küçük moleküllü organik kirletici maddeleri yükseltgeyerek onların fotokatalitik olarak bozunmasını sağlarlar. Organik kirleticiler ile TiO₂ nanoparçacıkların arayüzeyinde yük transferi gerçekleşebilir ve TiO₂ nanoparçacıklar,

iletken maddelerle yüzeyinde kararlı hale geldikten sonra fotoakım oluşturabilir. Bu fotoakımın ölçülmesiyle, kimyasal oksijen ihtiyacı da tayin edilebilmektedir.



1988 yılında Fox ve arkadaşları (Fox ve Tien, 1988) TiO₂ ile oluşturulmuş foto h⁺lar ile bazı organik maddelerin reaksiyonunu izlemişler ve değişik maddelerle TiO₂'in fotoakımının arttığını bulmuşlardır. Bu buluş fotoakımdaki değişime göre organik maddelerin kolayca tayinine olanak sağlamıştır. Bu çalışmadan sonra, fotoelektrokimyasal sensörlerin uygulamaları başlamıştır. Brown ve arkadaşları, bahsedilen mekanizmayı kullanarak bir seri organik madde tayin etmişlerdir (Brown ve ark., 1992). Aminler, aromatik alkoller, hidrokinonlar, aldehytler ve furanlar gibi TiO₂'in değerlik bandından daha az pozitif redoks potansiyelli organik bileşikler için elektrotta yanıt alınırken, şekerler, alifatik ketonlar ve alifatik esterler TiO₂'in foto h⁺ları tarafından kolayca yükseltgenemediğinden bu bileşikler duyarlı olarak tayin edilememişlerdir (Brown ve ark., 1992).

İlk çalışma niteliği taşımakta olan bu çalışmanın ardından gerek TiO₂ gerek kuantum noktalar ve gerekse kompozit materyallerin kullanımına ait fotoelektrokimyasal sensörler gittikçe artmaya başladı. En önemli çalışmalar,

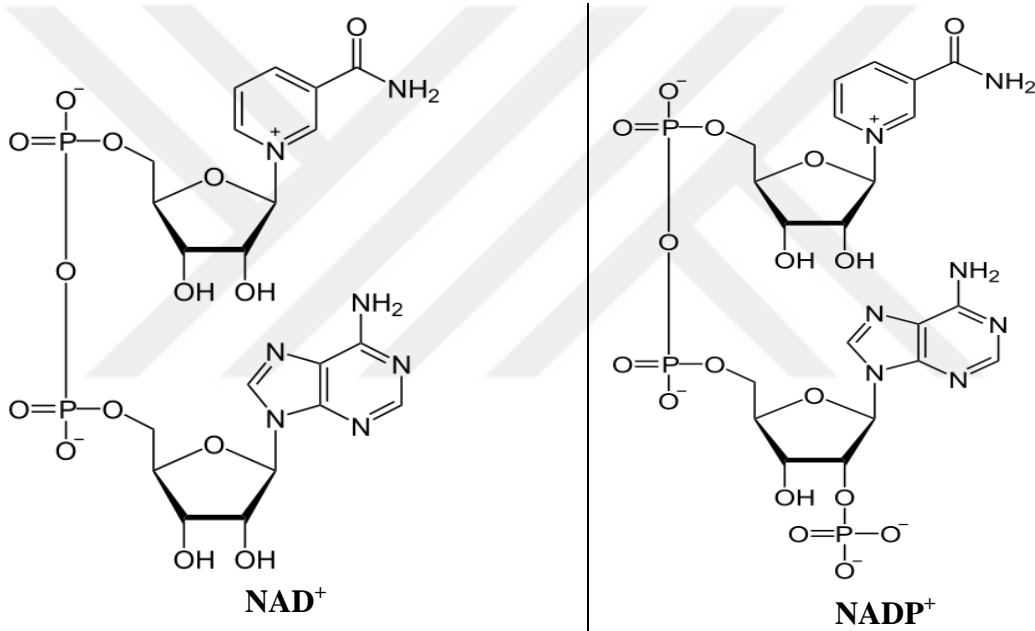
- 1- Pestisit analizleri (2,4-dichloropehoxyacetic acid (2,4-D), chlorpyrifos, dichlofention, parathion-methy)
- 2- Fotoelektrokimyasal biyomarker ve immunesorler
- 3- Oksidaz enzimine dayalı fotoelektrokimyasal biyosensörler
- 4- NADH'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenmesi ve dehidrogenaz enzimi ve NAD⁺/NADH redoks çiftine dayalı fotoelektrokimyasal biyosensörler
- 5- Fotoelektrokimyasal nükleik asit biyosensörleri

şeklinde sırlanabilir. Son ikisi tez konusuyla alakalı olduğundan ilerleyen bölümlerde örnekler verilerek açıklanacaktır.

Sonuç olarak kuantum noktalar tüm bu özellikleri sayesinde elektrokimyasal biyosensör, DNA biyosensörü, sensör, farmasötik moleküllerin, çevre bakımından önemli bileşiklerin tayininde oldukça sık kullanılmaya başlanmıştır. Bu nanokristaller daha duyar, seçici analizler gerçekleştirebilmek için, fotoelektrokimyasal sensörlerin geliştirilmesinde son yıllarda oldukça fazla çalışmada kullanılmıştır (Wang ve Hu, 2009; Rizvi ve ark, 2010; Ma ve Su, 2011).

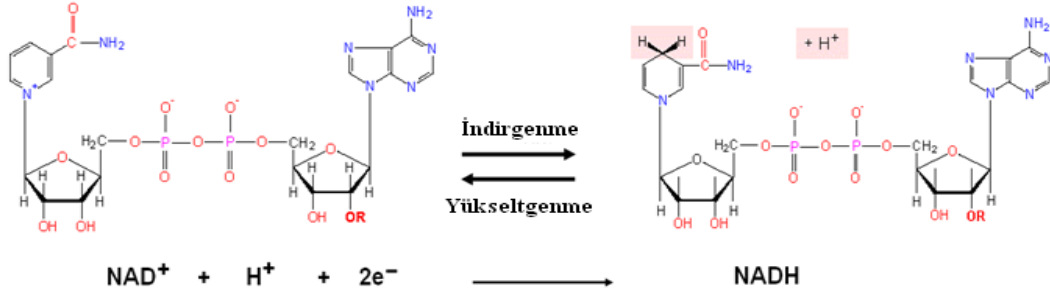
1.2. NADH ve Canlı Sistemlerdeki Rolü

NADH (β -nikotin amid adenin dinükleotid'in indirgenmiş hali), insan hücrelerinin enerji üretiminde önemli rol oynayan aktif bir koenzimdir. Dehidrogenaz olarak ifade edilen 250'den fazla enzimlerin tepkimelerinde gerekli olduğu için canlı organizmada hayati bir öneme sahip alan NADH biyolojik elektron transferlerinde anahtar rol oynar (Gorton ve Dominguez, 2002; Simon ve Bartlett, 2003). NADH, NAD^{+} 'nin indirgenmiş şeklidir, NAD^{+} ise NADH'nin yükseltgenmiş (okside olmuş) halidir. NAD^{+} molekülünün bir ucuna riboz şekeri, riboz şekerine ise bir nikotinamid halkası bağlıdır (Gözükara, 2001) (Şekil 1.3). Yapıda bulunan riboz halkalarından birinin ilk karbon atomuna (1' pozisyonu) adenin nükleotid diğerindeki karbon atomuna da nikotinamid nükleotidi bağlıdır.



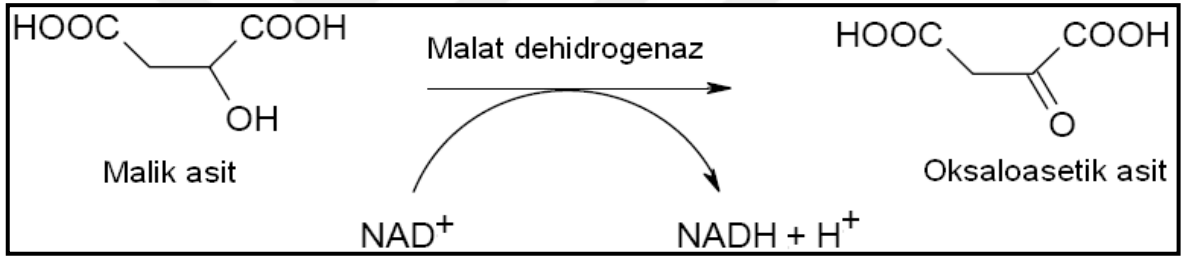
Şekil 1.3. NAD^{+} ve NADP^{+} nın yapısı (Gözükara, 2001)

NAD^{+} ve NADH redoks tepkimesi Şekil 1.4'de gösterilmiştir. Bu tepkimede de görüldüğü gibi NAD^{+} 'nin nikotinamid halkasının pozitif yüklü azotuna bir elektron transfer olurken, bir elektron ve hidrojen atomu bu azotun karşısındaki C₄ karbon atomuna transfer olmaktadır.



Şekil 1.4. NAD⁺'nin redoks tepkimesi

NAD⁺'nin koenzim olarak girdiği tepkimelerden birinde, malat dehidrogenaz enziminin yardımıyla malik asit oksaloasetik asite dönüşmektedir. Tepkime Şekil 1.5'de görüldüğü gibi malik asidin 2 nolu karbonundan 2 elektron ve bir hidrojen atomu NADH molekülüne transfer edilmiş ve bir hidrojen ise ortamda serbest kalmıştır (Gözükara, 2001).



Şekil 1.5. Malik asitin enzimatik tepkimesi (Gözükara, 2001)

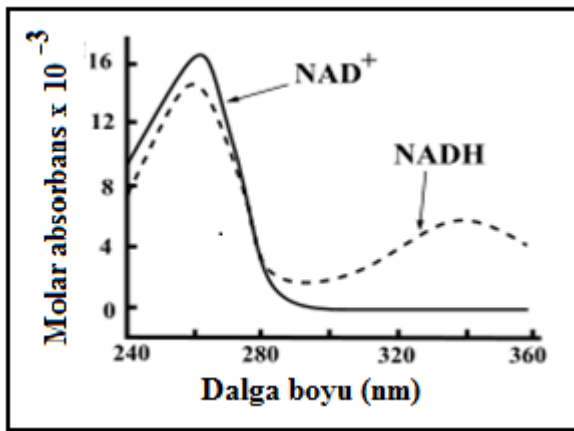
Enzimlerin birçoğu canlı hücrelerde çok kısa sürede 10.000'den fazla tepkimenin gerçekleşmesini sağlayan oldukça güçlü katalizörlerdir. Enzimler, atomların substrata taşınmasını, indirgenme yükseltgenme tepkimelerini katalizlemektedirler. İndirgenme yükseltgenme tepkimelerini katalizleyen redoks enzimlerinden bazıları aktivite gösterebilmek için koenzimlere ihtiyaç duymaktadırlar. Substratın yükseltgenme ve indirgenmesinde yürütücü bir güç olan koenzimler, atomlar veya elektronlara karşı bir alıcı veya verici olarak görev yapmaktadırlar (Simon ve Bartlett, 2003). Bununla birlikte, biyolojik öneme sahip birçok molekülün dehidrogenaz enzimine dayalı elektrokimyasal biyosensörünün yapımında ve geliştirilmesinde NAD⁺/NADH redoks çifti dönüşümü oldukça sık kullanılmıştır (Silber ve ark., 1996; Katakis ve Dominguez, 1997; Yan ve ark., 2007; Meng ve ark., 2009; Yang ve Liu, 2009). NAD⁺/NADH redoks çifti ucuz yakıtlı biyoyakıt hücrelerinin geliştirilmesinde de oldukça yararlı olmuştur. Dehidrogenaza dayalı NAD⁺ biyoyakıt hücreleri karbonhidrat ve alkol gibi çeşitli yakıtların kullanımına olanak

sağlamıştır (Yan ve ark., 2007). NADH'nin bu önemli fonksiyonlarından dolayı, birçok araştırmacı NADH'nin elektrokimyasal yükseltgenmesi çalışmalarına büyük ilgi göstermiştir.

NAD⁺ ve NADP⁺ yükseltgenme ve indirgenme tepkimelerini katalizleyen, enzim tepkimelerinin gerçekleşmesini sağlayan, diğer koenzimlere göre daha çok enzimatik tepkimeden sorumlu olan koenzimlerdir. (Gorton ve Dominguez, 2002). NAD⁺ redoks tepkimelerinde elektronları bir tepkimeden diğerine taşımaktadır, özellikle de dehidrogenaz enzimlerinin tepkimelerinde elektron alıcısı olarak görev almaktadır.

NADH, mitokondride Adenozin difosfatın (ADP)'nin ATP'ye dönüşümünde etkilidir. Bunun dışında; NADH antioksidan özellik gösterme, DNA onarma, nörotaşıyıcı özellik gösterme, adrenalin ve dopamini uyarma gibi fonksiyonlara sahiptir.

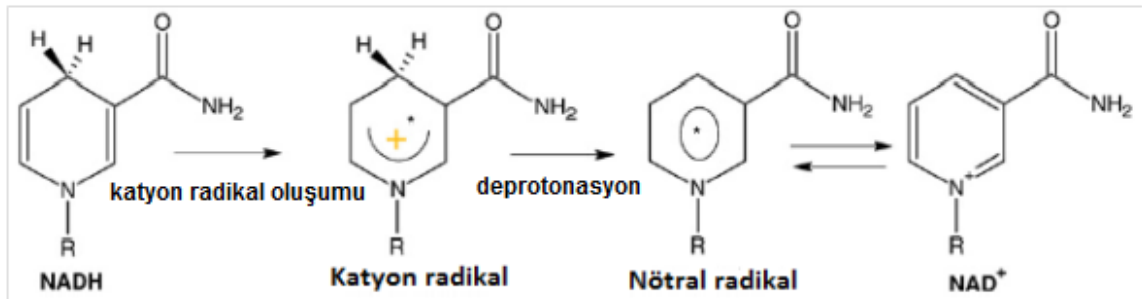
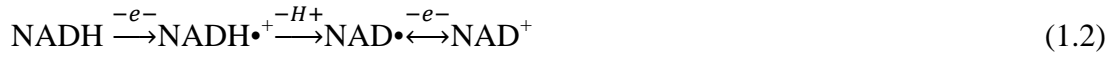
Hem NAD⁺ hem de NADH yapısındaki adenin bazından dolayı mor ötesi bölgedeki ışınları kuvvetli bir şekilde absorblarlar. NAD⁺ ve NADH türleri 259 nm'de molar soğurma katsayısı 16900 L/mol.cm olan maksimum absorpsiyon yaparken, NADH ayrıca 339 nm'de molar soğurma katsayısı 6222 L/mol.cm olan ikinci bir absorpsiyon daha oluşturmaktadır (Şekil 1.6). Yüksek dalga boyundaki koenzimin indirgenmiş ve yükseltgenmiş formlarının UV absorpsiyon spektrumları arasındaki fark, enzim analizlerinin kolay ve basit bir şekilde gerçekleştirilmesine olanak sağlar. Bu tür analizler, bir spektrofotometre yardımıyla 340 nm'de birinin diğerine dönüşümü ölçülerek gerçekleştirilir.



Şekil 1.6. NAD⁺ ve NADH'nin UV absorpsiyon spektrumu

1.3. NADH'nin Elektrokatalitik ve Fotoelektrokatalitik Yükseltgenmesi

NADH'nin döngüsel voltammogramlarında NAD^+ ara türe ($\text{NAD}\cdot$) indirgendiğinden dolayı NADH'nin yükseltgenmesine ait bir tek pik gözlenmektedir. (Gorton ve Dominguez, 2002). Elektrot olayı esnasında oluşan NAD^+ ve $\text{NADH}\cdot^+$ ile $\text{NAD}\cdot$ gibi radikaller elektrot yüzeyine adsorplandığından elektrodun kirlenmesine ve sensörlerin tekrarlanabilirliğinin azalmasına sebep olmaktadır (Gorton ve Dominguez, 2002; Simon ve Bartlett, 2003). Normal yalın elektrotta NADH'nin yükseltgenmesi, bir ECE mekanizması (Elektrokimyasal-Kimyasal-Elektrokimyasal) önerilerek açıklanmıştır. Bu mekanizmaya göre; ilk olarak NADH'nin bir elektrot tepkimesiyle bir elektron vererek $\text{NADH}\cdot^+$ radikaline yükseltgendiği; ikinci olarak oluşan bu radikalın da bir kimyasal tepkimeyle 1 H^+ vererek $\text{NAD}\cdot$ 'ye dönüştüğü; son olarak da yine bir elektrot tepkimesiyle $\text{NAD}\cdot$ 'nin 1 elektron vererek NAD^+ 'ya yükseltgendiği rapor edilmiştir. (Tepkime 1.2 ve Şekil 1.7) NADH'nin sulu ortamdaki döngüsel voltammogramlarında NADH'nin yükseltgenmesine ilişkin sadece tek bir pik gözlenmesi yani geri dönüşümde herhangi bir pikin gözlenmemesi oluşan NAD^+ 'nin aratüre ($\text{NAD}\cdot$) indirgenmesinden kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak oldukça tersinmez 2 elektron ve 1 H^+ 'lu yükseltgenme tepkimesi gerçekleşmiştir (Tepkime 1.2) (Gorton ve Dominguez, 2002).

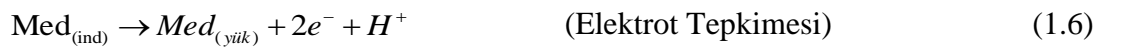
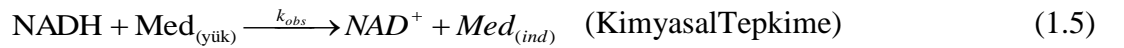
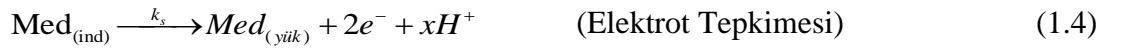


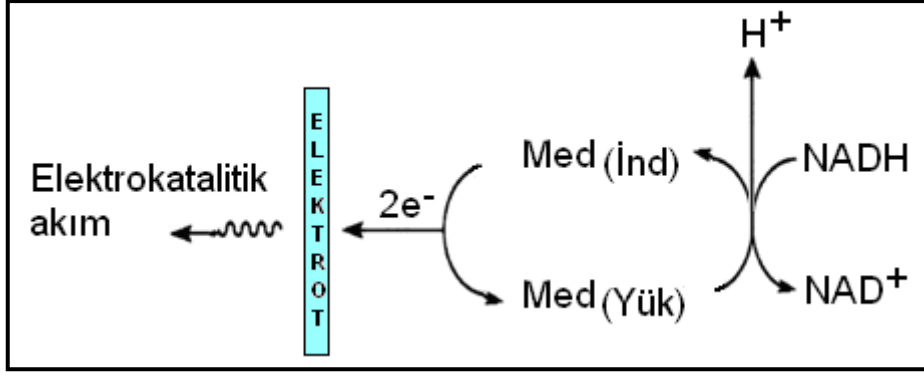
Şekil 1.7. NADH'nin yükseltgenme mekanizması (Radoi ve Compagnone, 2009)

Bu problemlerin birçoğu elektrot yüzeyine redoks mediyatörlerinin, nano materyallerin tutturulmasıyla hazırlanan modifiye elektrotlar kullanılarak çözülmüştür. (Gorton ve Dominguez, 2002; Simon ve Bartlett, 2003). Bu sebeple, son zamanlarda yüzey kirlenmesini minimuma indirmek ve NADH'nin yükseltgendiği yüksek potansiyeli daha negatife çekmek için yeni elektrot materyalleri üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Bu

durumun üstesinden gelebilmek ve elektron transfer hızını arttırabilmek için elektrot yüzeyine redoks boyar maddeleri (Maroneze ve ark., 2008; Zhu ve ark., 2009), kinonlar (Salimi ve ark., 2005; Ghanem ve ark., 2009), ferrosen türevleri (Serban ve Murr, 2004; Zheng ve ark., 2009) ve birçok redoks polimer (Al-Jawadi ve ark., 2012), mediyatör olarak tutturulmaktadır. Son zamanlarda ise nano materyaller modifiye elektrot tasarımında kullanılmaya başlanmıştır (Manso ve ark., 2008; Qiu ve ark., 2009; Tang ve ark., 2009; Meredith ve ark., 2012; Prasannakumar ve ark., 2012; Teymourian ve ark., 2012). Böylece bu materyaller elektrot yüzeyine elektrodepozisyon ile tutturulmakta ve $NAD^+/NADH$ çifti için elektrokatalizör görevi görmekle beraber elektrot yüzeyinin yüksek potansiyelde kirlenmesini engellemektedir (Jimenez ve ark., 2014).

$NADH$ 'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinin ilk basamağında mediyatörün yükseltgenmiş formu, $NAD(P)H$ ile hızlıca bir kimyasal tepkimeye girip $NAD(P)^+$ 'yi oluştururken kendisi indirgenmiş formuna dönüşür, ikinci basamakta ise elektrot tepkimesi aracılığıyla mediyatörün indirgenmiş formu $NADH$ 'nin doğrudan yükseltgendiği potansiyelden daha düşük bir potansiyelde tekrar yükseltgenir (Şekil 1.8). Oluşan $NADH$ tekrar mediyatörle tepkimeye girerek benzer olaylar devam eder. Gerçekleşen elektrokatalitik yükseltgenme ECE mekanizmasıyla açıklanmış ve aşağıdaki tepkimelerle ifade edilmiştir. Sonuçta mediyatörün indirgenmiş formunun tekrar yükseltgenmesiyle $NADH$ 'ye ilişkin elektrokatalitik akım oluşmaktadır (Gorton ve Dominguez, 2002; Simon ve Bartlett, 2003).





Şekil 1.8. Bir redoks mediyatörle NADH'nin yükseltgenme mekanizması

Biyolojik önemi olan, dehidrogenaz enzimlerine dayalı biyosensör tasarımında kullanılan önemli bir koenzim NADH'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenmesi, anorganik nanomateryal yada kompozit materyal modifiye elektrotların kullanıldığı diğer önemli bir uygulamadır (Wang ve ark., 2009a; Schubert ve ark., 2010; Ho ve ark., 2011; Wang ve ark., 2012a; Jafari ve ark., 2014b; Liu ve ark., 2015).

Fotoelektrokimya, ölçülebilir fotoakım sinyali üretebilmek için fotoelektrokimyasal-aktif tür ile elektrot arasındaki elektron transferini uyaran ve bunun için ışığı kullanan analitik tekniktir (Wang ve ark., 2012b). Yarıiletken, modifiye ve kompozit elektrotlar, fotoelektrokimyanın analizlere uygulanmasında sıkça kullanılmaktadır.

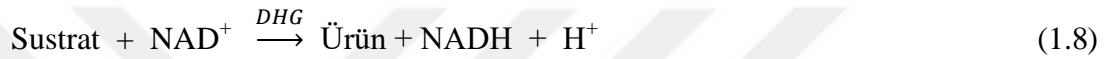
Fotoelektrokimyasal teknikler, geleneksel elektrokimyasal ve optik yöntemlere göre potansiyel olarak daha yüksek hassasiyete sahiptir. Bu nedenle fotoelektrokimyasal biyoanalizlerde kullanılmak üzere yeni fotoduyar materyaller araştırılmaktadır. Bu anlamda QD'lar, geniş uyarma spektrumu, iyi fotokararlılık ve ayarlanabilir emisyon spektrumları ile optik ve fotoelektrokimyasal biyosensörlerin tasarımında kullanılacak mükemmel adaylardır (Wang ve ark., 2012b).

1.4. Dehidrogenaz Enzimi ve NAD⁺/NADH Redoks Çiftine Dayalı Elektrokimyasal ve Fotoelektrokimyasal Biyosensörler

Kimyasal sensörler, kimyasal bilgiyi, belirli bir örnek bileşeninin konsantrasyonunu analitik olarak ölçülebilir sinyale dönüştüren aletlerdir. Kimyasal sensörler basit olarak, kimyasal bir tanıma sistemi (moleküler) ve fizikokimyasal bir dönüştürücüden oluşmaktadır. Biyosensörler, biyokimyasal mekanizmaları aydınlatan kimyasal sensörlerdir.

Biyolojik tanıma sistemleri, genellikle bir analit konsantrasyonunu büyük bir duyarlılıkla kimyasal veya fiziksel sinyale dönüştürmektedir. Burada tanıma sisteminin asıl amacı, ölçümü yapılacak analiti büyük bir seçicilikle tayin edebilmektir. Sensörlerin dönüştürücü kısımları aynı zamanda dedektör, sensör veya elektrot olarak da bilinmektedir. Amperometrik biyosensörler üzerine yapılan çalışmalardan bazıları NAD^+/NADH redoks çiftine dayalı olarak gerçekleştirilmektedir (Katakis ve Dominguez, 1997).

NADH 'ye dayalı geliştirilen ilk biyosensörde, elektrot yüzeyinde substrat ve NAD^+ arasında dehidrogenaz enzimi varlığında meydana gelen enzimatik reaksiyon sonucunda ortaya çıkan NADH 'nin direk yükseltgenmesinden yararlanılmıştır (Tepkime 1.8).

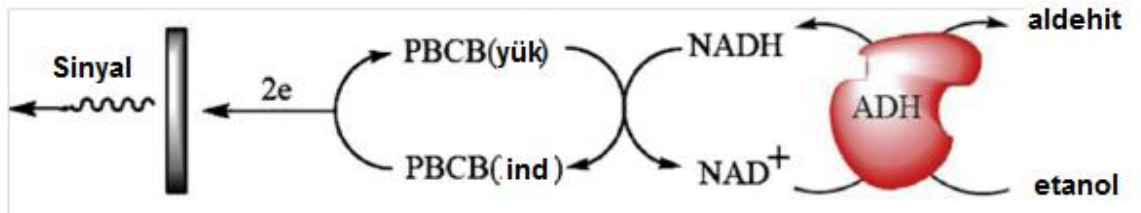
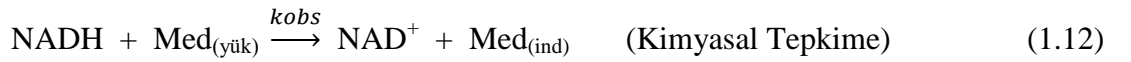
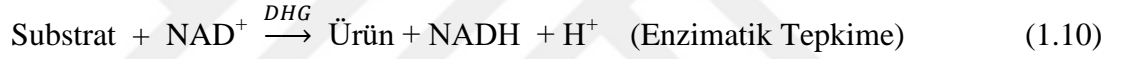


Bu sensörler, enzimatik reaksiyon sonucunda meydana gelen NADH konsantrasyonunun elektrot ile ölçümüne dayanan birinci nesil biyosensörler olarak bilinmektedir. Bu biyosensörler NADH 'nin direk elektrokimyasal yükseltgenmesinin ölçümünün sahip olduğu dezavantajlara sahiptir. İndirgenmiş koenzimlerin elektrokimyasal yükseltgenmelerinde ihtiyaç duyulan aşırı yüksek potansiyel, ve elektrot olayı sırasında oluşan, ve daha önce Şekil 1.7'de gösterilen yükseltgenme ürünü NAD^+ ve ara ürünler elektrot yüzeyine adsorplanarak, elektrodun kirlenmesine ve dolaylı olarak da NADH 'nin direk elektrokimyasal yükseltgenmesine bağlı sensörlerin tekrarlanabilirliğinin azalmasına neden olmaktadır. Bu dezavantajların üstesinden gelebilmek için NADH 'ye dayalı ikinci nesil biyosensörler geliştirilmiştir. Bu biyosensör çeşitinde, NADH 'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi NAD^+ 'ya dayalı dehidrogenaz enzimleri varlığında mediyatörler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu biyosensöre örnek olarak basit bir şema Şekil 1.9'da alkol biyosensörü için verilmiştir (Yang ve Liu, 2009). Bütün redoks enzimleri redoks aktif bileşimi olarak bir kofaktöre dayanmaktadır. Flavoenzimlerde (flavin adenin dinükleotid (FAD) ve flavin mononükleotid (FMN) merkezli enzimler) kofaktör enzim yapısına güçlü bir şekilde bağlıdır. Flavoenzimlere dayalı bu biyosensörler üçüncü jenerasyon biyosensörlerdir, bu biyosensörlerde enzimin aktif merkeziyle elektrot arasında direk elektron transferi gerçekleşmektedir (Lobo ve ark., 1997). Bütün bu biyosensör çeşitlerinin arasında en fazla ikinci nesil biyosensörler kullanılmaktadır. Yang ve Liu (2009) tarafından NADH 'ye dayalı olarak geliştirilen alkol biyosensör mekanizması

bu çeşit biyosensörler için iyi bir örnektir. İlk olarak elektrot yüzeyine immobilize edilmiş alkol dehidrogenaz varlığında alkol ve kofaktör (NAD⁺) arasında meydana gelen enzimatik reaksiyon sonucunda aldehit ve NAD⁺'nın indirgenmiş formu NADH oluşmaktadır (Tepkime 1.9)



Ardından oluşan NADH mediyatörle kimyasal tepkimeye girerek kendisi NAD⁺'ya yükseltgenirken, mediyatör indirgenmiş haline döner. Son olarak indirgenmiş formdaki mediyatörün elektrot yüzeyinde yükseltgenmiş formuna dönüşmesi sırasında oluşan akım kaydedilerek alkol dolaylı yoldan tayin edilmiş olur. Gerçekleşen tepkimeler ise aşağıdaki gibi özetlenmiştir (Tepkime 1.10-1.14). Benzer biyosensörler glukoz, laktöz ve glutamat için de glukoz dehidrogenaz, laktat dehidrogenaz ve glutamat dehidrogenaz enzimleri kullanılarak geliştirilmektedir.



Şekil 1.9. Alkol dehidrogenaz enzimine dayalı amperometrik etanol biyosensörüne ait reaksiyon şeması (Yang ve Liu, 2009)

NAD⁺/NADH redoks çiftine dayalı fotoelektrokimyasal biyosensör çalışmalarında bugüne kadar yapılan çalışmalarda substrat, koenzimin (NADH) indirgenmiş formu spektrofotometrik ve spektrofotometrik uygulamalarla 340 nm'de absorbans artışı

izleyerek ve NADH'nin yükseltgenmesiyle meydana gelen akım sabit potansiyelde amperometrik olarak ölçülerek tayin edilmektedir (Pappas ve ark., 2002). Tayin H_2O_2 'ye dayalı olarak gerçekleştirildiğinde H_2O_2 'nin yükseltgenmesi yüksek potansiyelerde gerçekleştiğinden diğer elektroaktif bileşiklerin girişim yapma durumu ortaya çıkmaktadır. Ancak NAD^+ 'ya dayalı olarak geliştirilen amperometrik biyosensörlerde bu sorun olmaktan çıkmaktadır (Monosik ve ark., 2012).

NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinin dehidrogenaza dayalı amperometrik biyosensör çalışmalarındaki önemi, yüzlerce enzimatik reaksiyonun kofaktör olarak NAD^+ 'ya ihtiyaç duymasından gelmektedir. Sonuç olarak medikal, kimyasal veya etanol, laktik asit gibi biyolojik öneme sahip birçok substrat, NAD^+ 'ya dayalı biyokatalizörler ile belirlenebilmektedir (Jimenez ve ark., 2014).

1.5. Fotoelektrokimya

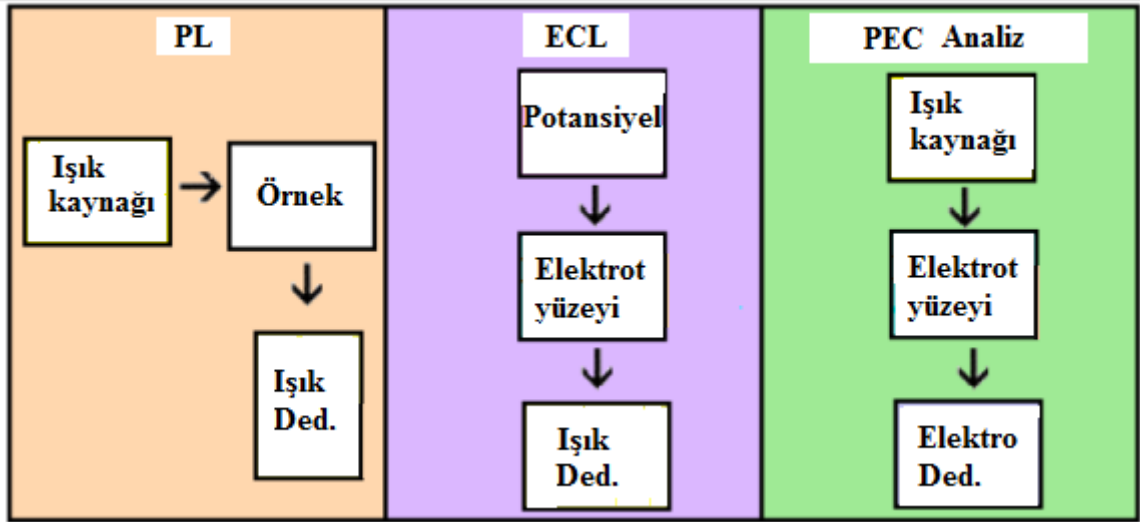
Fotoelektrokimya, fotoakım spektroskopisi olarak bilinen, bir elektrot yüzeyinin veya bir elektrolitteki metalin ışıklandırılmasıyla oluşan elektriksel akımın ölçüldüğü bilim dalıdır. Işıkla elektrot ve elektrodun yakınında bulunan elektrolit fotolitik olarak etkilenmektedir. Burada fotoakımı oluşturan elektrot ile elektrolit tarafından absorplanan ışıktır. Elektrot potansiyeli ve elektrolitin bileşimi fotoakım ışığın dalga boyunu değiştirmekte bu da fotoetkileşim sürecinin doğası, enerji düzeyleri ve kinetiği hakkında bilgi vermektedir. Fotoelektrokimya son zamanlarda elektrokimyasal analiz ve sensör tasarımında oldukça sık kullanılmaya başlanmıştır (Huang ve ark.; 2005; Liu ve ark., 2007; Sun ve ark., 2009; Wang ve ark., 2009a; Schubert ve ark., 2010; Gu ve ark., 2011; Ho ve ark., 2011; Tanne ve ark., 2011; Wang ve ark., 2011; Zheng ve ark., 2011; Du ve ark., 2012; Qian ve ark., 2012; Wang ve ark., 2012b; Du ve ark., 2013; Huang ve ark., 2013; Razmi ve Razei, 2013; Riedel ve ark., 2013; Salimi ve ark., 2013; Yue ve ark., 2013; Jafari ve ark., 2014a; Sun ve Ai, 2014; Zhao ve ark., 2014; Liu ve ark., 2015).

Fotonların absorplanmasının ardından elektronların uyarılması ve sonrasında bir materyalin yük transferi ile son bulan foto-akım dönüşümü fotoelektrokimyasal proses olarak ifade edilmektedir. Moleküller, iyonlar veya iletken materyallerin ışığı absorplamasıyla elektronlar uyarılmakta böylece yük transferi ile beraber ışık enerjisinin elektriksel enerjiye transferi gerçekleşir. Fotoelektrokimyasal olay esnasında, uyarılmış fotoelektrik materyal birtakım maddelerle elektron değiştirmekte buna bağlı olarak fotoakım değişimi meydana gelmektedir. Buna bağlı olarak fotoelektrokimyasal sensörler geliştirilmiştir. Burada meydana gelen olay kısaca özetlenecek olursa; ilk olarak bir ışık

kaynağı tarafından ışıklandırılan fotoelektrokimyasal aktiflik gösteren moleküllerin dış yörüngesindeki elektronlar temel halden uyarılmış hale geçmektedir. Ardından bu moleküller iletkenlik bandına veya doğrudan ya da dolaylı şekilde diğer elektrotlara transfer olurlar (Wang ve ark., 2009b; Zhang ve Zhao., 2013). Meydana gelen fotoakım iki mekanizma ile açıklanmaktadır. İlki ortamda indirgen bir madde olduğunda uyarılmış olan türlerin indirgenerek temel hale dönmesinin ardından tekrar fotoelektrokimyasal olayın başlaması ve bu olayın sürekli fotoakımla sonuçlanmasıdır. Diğer mekanizmaya göre; elektron transfer reaksiyonları, ortamda elektron alıcı veya verici bir molekül bulunduğunda uyarılmış ve söndürücü moleküller arasında meydana gelmektedir. Molekül elektrot yüzeyinden elektron almasıyla indirgenmiş verdiğinde ise yükseltgenmiş hale dönmekte böylece bir fotoakım oluşmaktadır. Reaksiyonun ilerleyen aşamalarında fotoelektrokimyasal olarak aktif olan materyal temel haline geri dönmektedir.

Fotoelektrokimyada oluşan fotoakım ölçülürken elektrokemilüminesans analizlerinde potansiyelle beraber oluşan ışık şiddeti, fotolüminesans ile ise ışıklı uyarılan moleküllerin temel hale dönerken yayımladıkları ışık ölçülmektedir. Fotoelektrokimyasal metotlar diğerlerine göre düşük maliyet, minyatürize olma, basit ekipman gibi avantajlara sahiptir, bu sebeple son zamanlarda fotoelektrokimyasal sensör ve biyosensör çalışmalarında sıkça kullanılmaya başlanmıştır (Wang ve ark., 2009b; Zhang ve Zhao, 2013).

Fotoakımın büyüklüğü uyarıcı ışığın dalga boyu ve şiddetine, elektrot tipi ve biçimine, fotoelektrik materyalin özelliğine, elektrodun bileşimine bağlı olarak değişir. Temelde fotoelektrokimya (Photoelectrochemistry, PEC), elektrokemilüminesans (Electrochemiluminescence, ECL) prosesinin tersi olarak kabul edilebilir. Elektrokemilüminesans analizde uygulanan potansiyelle birlikte oluşan ışık şiddeti ölçülürken, fotoelektrokimyasal analizde doğrudan ya da dolaylı yoldan oluşan fotoakım ölçülür. Fotolüminesans (Photoluminescence, PL) ile karşılaştırıldığında ise fotolüminesansla ışıkla uyarılan moleküller ya da atomlar tekrar temel hale dönerken yayımladıkları ışın ölçülür. Her üç metotta uyarma ve tespit etme eş zamanlı gerçekleşir. Bu üç fotokimyasal analiz metodunun temel prensibine ilişkin şematik bir gösterim Şekil 1.10'da verilmiştir (Wang ve ark., 2009b; Zhang ve Zhao, 2013).



Şekil 1.10. Fotoelektrokimyasal (PEC), Elektrokemilüminesans (ECL) ve Fotolüminesans (PL) olaylarına dayalı analiz sistemlerinin prensip olarak karşılaştırılması (Wang ve ark., 2009b; Zhang ve Zhao, 2013)'den modifiye edilmiştir

Diğer optiksel metotlarla karşılaştırıldığında, fotoelektrokimyasal metot, basit ekipman, düşük fiyat, kolay minyatürize olma ve birleştime gibi avantajlara sahiptir. Katalitik prosesin de içine girdiği fotoelektrokatalitik sistemlerle fotoakım oluşumu, elektrokimyasal metotlarla karşılaştırıldığında zemin daha düşük olup, fotoelektrokimyasal analizlerin duyarlılığı genellikle, elektrokimyasal metotlardan daha büyüktür (Wang ve ark., 2009b; Zhang ve Zhao, 2013).

Ölçüm parametreleri açısından fotoelektrokimyasal sensörler potansiyometrik mod ve akım modu olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Fotoelektrokimyasal sensörlerin deteksiyon mekanizması, analit ile fotoelektrokimyasal materyal arasındaki fiziksel/kimyasal etkileşimlerle ortaya çıkan fotoakım/fotopotansiyel değişimine bağlıdır (Wang ve ark., 2009b). Bu avantajlarından dolayı son yıllarda fotoelektrokimyasal analizler ve sensörler hızlıca gelişmekte ve birçok bileşiğin analizine uygulanmaktadır (Cooper ve ark., 1998; Cooper ve ark., 1999; Haddour ve ark., 2004; Liang ve ark., 2006; Deng ve ark., 2008; Guo ve ark., 2010; Ojani ve ark., 2012; Hu ve ark., 2013; Zhang ve Zhao, 2013; Ge ve ark., 2014; Yıldız ve ark., 2014).

Fotoelektrokatalitik sensörlerde duyarlık ve seçicilik açısından elektrot materyali seçimiyle beraber elektrot modifikasyonu da oldukça önemlidir. Bunun için CdS, ZnS, CdTe, ZnO, CuO, TiO₂ gibi anorganik materyaller (Huang ve ark., 2005; Du ve ark., 2012; Ojani ve ark., 2012; Qian ve ark., 2012; Wang ve ark., 2012a; Du ve ark., 2013), fenilenvinilen ve türevleri ile politiyofen gibi iletken polimerler (Rotenberg ve ark., 2002;

Haddour ve ark., 2004; Sharma, 2006; Yıldız ve ark., 2014), geçiş metal kompleksleri, rutenyum bispiridin gibi kompleksler ve türevleri, porfirin ve türevleri, fenazin türü boyar maddeler ve ftalosiyanın gibi organik materyaller (Cooper ve ark., 1998; Cooper ve ark., 1999; Dilgin ve ark., 2003; Dilgin, 2004; Haddour ve ark., 2004; Dilgin ve ark., 2005; Dilgin ve Nişli, 2006; Liang ve ark., 2006; Dilgin ve ark., 2007; Deng ve ark., 2008; Dilgin ve ark., 2010; Guo ve ark., 2010; Dilgin ve ark., 2011; Dilgin ve ark., 2012a; Hu ve ark., 2013; Ge ve ark., 2014; Yıldız ve ark., 2014; Dilgin ve Gökçel, 2015), organik materyal, anorganik materyal birleşimi veya farklı bant boşluğuna sahip iki anorganik materyalin birleşimi ile oluşan kompozit materyaller, son yıllarda kompozit elektrotların yapımında altın nanoparçacıklar (Au-NP), fullerenler, grafen ya da karbon nanoparçacıklarla (CNT) ile birlikte CdS, CdSe, ZnS gibi yarı iletkenler (Peng ve ark., 1997; Liu ve ark., 2007; Xu ve ark., 2007; Sun ve ark., 2009; Wang ve ark., 2009a; Schubert ve ark., 2010; Gu ve ark., 2011; Ho ve ark., 2011; Tanne ve ark., 2011; Wang ve ark., 2011; Zheng ve ark., 2011; Wang ve ark., 2012b; Huang ve ark., 2013; Razmi ve Razei, 2013; Riedel ve ark., 2013; Salimi ve ark., 2013; Butwong ve ark., 2014; Ge ve ark., 2014; Jafari ve ark., 2014b; Liu ve ark., 2015) sıklıkla kullanılmıştır.

1.6. Kalem Grafit Elektrot (Pencil Graphite Electrode, PGE)

Tek kullanımlı, kolay elde edilebilir düşük maliyet, kolay modifikasyon ve diğer karbon bazlı elektrotlarda temizleme ve elektrot yüzeyinin parlatılması gibi uzun süren işlemlerin olmaması gibi üstün özelliklere sahip PGE ile birçok elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal biyosensör tasarımında camımsı karbon, karbon pasta, altın nanopartikül, karbon nanotüp, grafen, metal oksit, modifiye elektrotlar vb. olmak üzere çok çeşitli elektrot materyalleri kullanılmış olsa da, PGE ile gerçekleştirilen enzim bazlı biyosensör tasarımı ya da NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi üzerine sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (Dilgin ve ark., 2012b; Dilgin ve ark., 2013; Zhu ve ark., 2014).

Son zamanlarda PGE kullanılarak geliştirilen elektrokimyasal sensor, enzimatik biyosensör ve DNA biyosensörüne ilişkin çalışmalar popüler bir hal almıştır (Wang ve ark., 2000; Keskin ve ark., 2010; Özcan ve Sahin, 2010; Doğan Topal ve Özkan, 2011; Özcan ve Sahin, 2011; Devi ve ark., 2013; Yardım ve Şentürk, 2013; Congur ve ark., 2014; Elahi ve ark., 2014; Erdem ve ark., 2014; Kuralay ve ark., 2014; Meşe ve ark., 2014; Pala ve ark., 2014; Zhu ve ark., 2014; Dervisevic ve ark., 2015; Sehat ve ark., 2015).

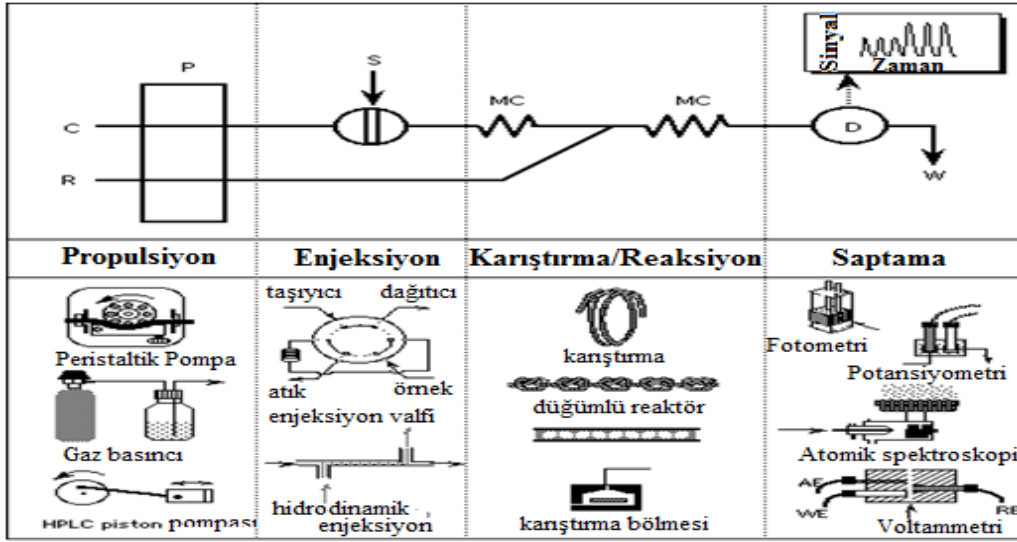
1.7. Akışa Enjeksiyon Analiz (Flow Injection Analysis, FIA) Sistemi

Son dönemlerde analitik kimyada meydana gelen en önemli gelişmelerden biri otomatik analiz yöntemleridir. Bu yöntemlerde çok sayıda rutin analiz çok daha az maliyetle hızlı bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Analizde otomasyon en fazla klinik laboratuvarlarında kullanılmaktadır. Böylece biyolojik örnekler hızlı ve doğru bir şekilde gerçekleştirilmekte bu da hastalık tanılarına yansımaktadır. Klinik kimyanın dışında otomasyon, sanayide ürün kalitesinin kontrolünde, hava, su ve toprak örneklerinde çok sayıda ürün tayininde, ilaç ve tarım ürünlerinin saptanmasında sıkça kullanılmaktadır (Nişli G., 2001).

Son zamanlarda akış koşullarında analiz, analitik uygulamalar, kimyasal proseslerin incelenmesi, sensörlerin test edilerek geliştirilmesi ve çeşitli enstrümanların performanslarının artırılması gibi uygulamalarda geniş yer bularak gittikçe artan bir ilgi görmektedir. Ayrıca difüzyon katsayısı, reaksiyon hızı, kararlılık sabiti, komplekslerin bileşimi ve çözünme ürünleri gibi temel değerlerin ölçülmesinde de bu sistemden yararlanılmaktadır (Ruzicka ve Hansen, 1988).

Kesiksiz akış sistemi olarak tanımlanan FIA ilk kez Ruzicka ve Hansen tarafından 1974 yılında önerilmiştir. “Akan bir sisteme enjeksiyonla analiz” olarak tanımlanan FIA, akışın sürekli olduğu ortama örnek enjeksiyonu ile oluşan örnek zonu dedektör sistemine taşınarak, sinyalin devamlı izlenmesi ilkesine dayanmaktadır. Elde edilen sinyal zamana bağlı olarak pik formunda gelmektedir. FIA sistemi ile kapalı sistemde çalışılmakta, böylece analizci doğrudan zehirli maddelerle temas etmemekte ayrıca örnek ve reaktiflerin hava ile teması önlenmektedir. FIA sistemi az bir tecrübe ve ucuz bir alet donanımı ile gerçekleştirilebilmektedir. (Nişli ve ark., 2002).

Dedektörler akış sistemlerinin en önemli kısmını oluşturmaktadır. Dedektör sistemleri, geniş derişim aralığında madde miktarıyla doğru orantılı yanıt veren, düşük gürültü sinyaline sahip akışkan geçişli bir hücre ile yazıcıdan oluşan sistemlerdir. Tayin sınırının düşük ve pik genişliğine etkisinin az olması sebebiyle elektrokimyasal sensör tasarımında oldukça sık kullanılmaktadır. Duyucu sistemin küçük boyutlarda olması elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektrokimyasal tepkimeler açısından büyük yarar sağlamaktadır. Akışa enjeksiyon sistemi ile, birçok bileşimin analizi polarografik, potansiyometrik, amperometrik, wall-jet amperometrik ve fotoamperometrik dedektörler geliştirilerek hızlı, seçimli ve duyar bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Mckelvie, 1999; Gao ve ark., 2004). Şekil 1.11’de basit iki hatlı bir FIA düzeneği gösterilmiştir (Mckelvie, 1999).



Şekil 1.11. Normal bir FIA düzeneğinin şematik diyagramı. P: pompa C ve R: sırasıyla taşıyıcı ve reaktif hatları, S: örnek enjeksiyonu, MC: karışımın gerçekleştiği kolon, D: dedektör ve W: atık hattı (Mckelvie, 1999)

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

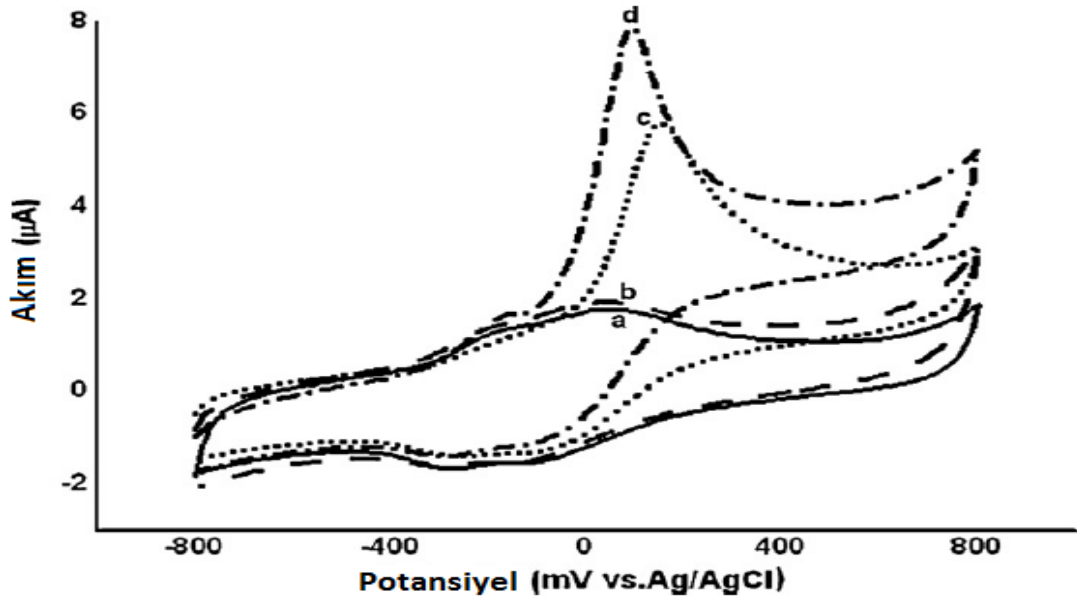
2.1. NADH'nin Fotoelektrokatalitik Yükseltgenmesi

Dehidrogenaz enzimlerine dayalı biyosensör tasarımında kullanılan ve biyolojik açıdan oldukça önemli bir koenzim olan NADH'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenmesi fotoelektrokimyasal sensörlerin önemli uygulamalarından biridir. Bu amaçla organik redoks mediyatörlere dayalı modifiye elektrotlar kullanıldığı gibi (Dilgin ve ark., 2007; Gligor ve ark., 2009; Dilgin ve ark., 2010; Dilgin ve ark., 2011) son zamanlarda anorganik nanomateryal yada kompozit materyal modifiye elektrotların kullanılmıştır (Wang ve Hu, 2009; Schubert ve ark., 2010; Ho ve ark., 2011; Wang ve ark., 2012a; Jafari ve ark., 2014a, b; Liu ve ark., 2015). Ancak tez konusuyla alakalı olduğundan bu kısımda anorganik nanomateryallere dayalı fotoelektrokatalitik NADH yükseltgenmesine ait çalışmalardan daha detaylı bahsedilecektir.

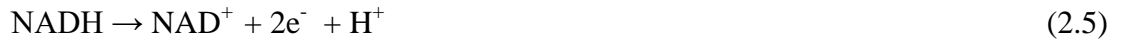
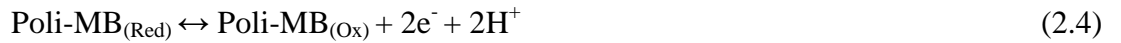
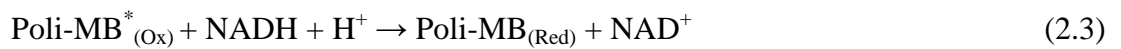
Organik redoks mediyatörlere dayalı modifiye elektrotlarda boyar maddeler NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinde redoks mediyatörü olarak oldukça çok kullanılmışlardır. Bunun nedeni birçok bileşiğin yükseltgenmesine iyi bir elektrokatalitik etki gösterme özelliğine sahip olmalarındandır. Bu amaçla toluidin mavisi (TM), metilen mavisi (MM), metilen yeşili (MY), azure A (AzA), azure B (AzB) gibi fenotiyazin grubu boyar maddeler, nil mavisi (NM), meldola mavisi (MdM), brilliant kresil mavisi (BKM) gibi fenoksazin ve nötral kırmızısı (NK) gibi fenazin türü boyar maddelerle modifiye elektrotlar hazırlanmıştır.

Bu konuda yapılan çalışmalardan bir tanesi fenotiyazin grubu boyar madde olan metilen mavisinin GCE yüzeyine elektropolimerizasyonu ile gerçekleştirilmiştir (Dilgin ve ark., 2011). Hazırlanan poly-MB/GCE kullanılarak NADH'nin elektro ve fotoelektrokatalitik yükseltgenmesi FIA sisteminde incelenmiştir. Elde edilen döngüsel voltammetrik sonuçlar, yalın GCE ile +510 mV'da yükseltgenen NADH'nin, poly-MB/GCE ile +160 mV, yüzey ışıklandırıldığında ise +90 mV'da yükseltgendiğini göstermektedir. Aynı zamanda anodik pik akımı da ışıksız ortamda alınan sonuçlara göre daha yüksek elde edilmiştir. Bu sonuçlar poly-MB/GCE ile NADH'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenmesini katalizlediğini göstermektedir (Şekil 2.1).

NADH'nin fotoelektrokimyasal yükseltgenmesine ait mekanizma aşağıda verilmiştir. FIA sisteminde optimum koşullarda alınan sonuçlarda doğrusal kalibrasyon aralığı $1,0 \times 10^{-7}$ - $2,0 \times 10^{-4}$ M olarak bulunmuştur. (Dilgin ve ark., 2011).

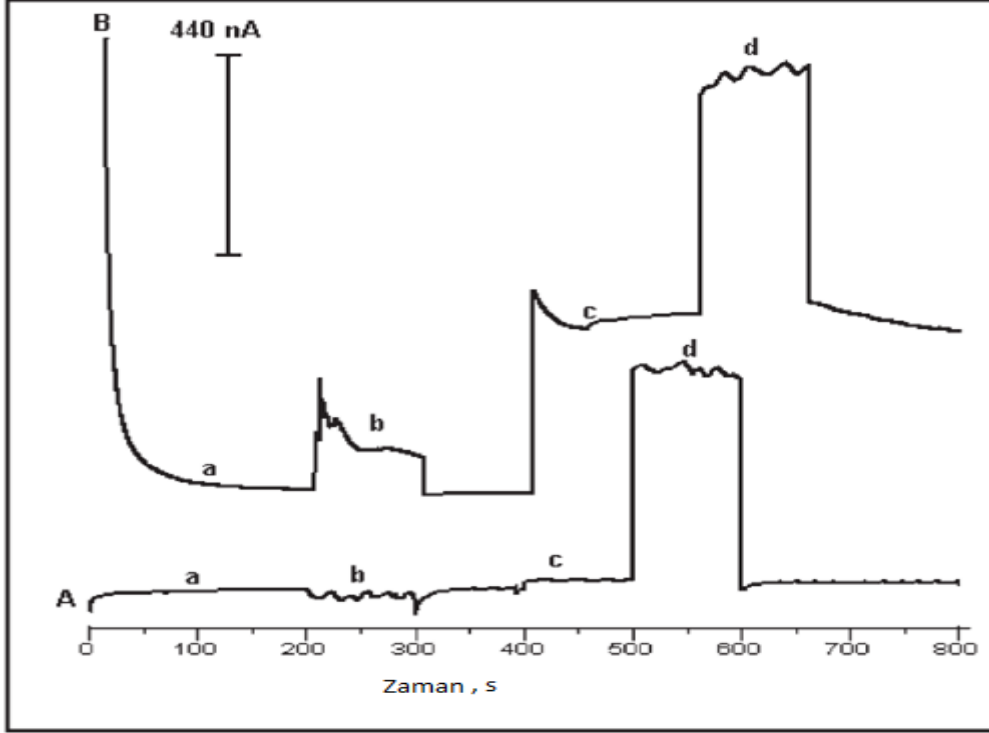


Şekil 2.1. (a ve b) 0,40 mM NADH yokluğunda, (c ve d) 0,40 NADH varlığında, (a ve c) ışıksız, (b ve d) ışıklı ortamda poli-MB/GCE (pH 5,0 fosfat çözeltisinde hazırlanmış) ile alınmış döngüsel voltammogramlar (tarama hızı: 50 mVs^{-1} , destek elektrolit: 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu) (Dilgin ve ark., 2011)



Fenotiyazin grubu boyar maddelerden Toluidin Mavisinin (TM) kullanıldığı bir başka çalışmada ise GCE yüzeyi TM'nin elektropolimerizasyonu ile modifiye edilmiş ve NADH'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenmesinde kullanılmıştır (Dilgin ve ark., 2007). Elde edilen döngüsel voltammetrik sonuçlar poli-TM modifiye GCE yüzeyi ışıklandırıldığında NADH'nin yükseltgenme pik akımı artarken potansiyelinde ise negatif potansiyellere kayma gözlenmiştir. Alınan amperometrik ve fotoamperometrik sonuçlar

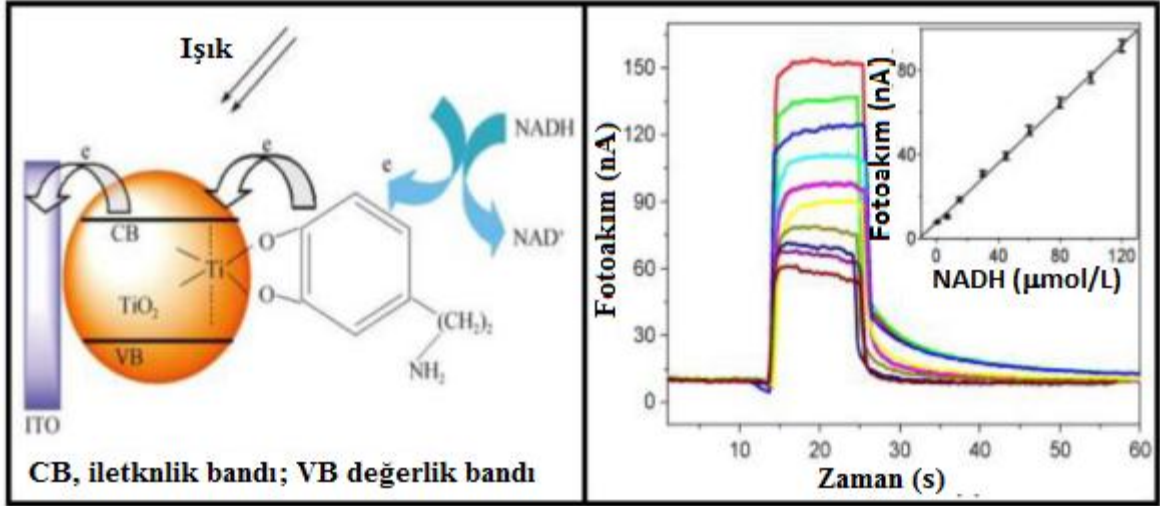
Şekil 2.2’de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi modifiye elektrot yüzeyi ışıklandırıldığında elde edilen akım değerleri normalde alınan çok daha yüksektir. Bu da NADH’nin fotoelektrokatalitik yükseltgenmesinin katalizlendiğini göstermektedir (Dilgin ve ark., 2007).



Şekil 2.2. (a ve b) 0,20 mM NADH yokluğunda, (c ve d) 0,40 NADH varlığında, (a ve c) ışıksız, (b ve d) ışıklı ortamda poly-TM/GCE ile alınmış döngüsel voltammogramlar. Uygulama potansiyeli: A) -100 mV, B) +100 mV (destek elektrolit: 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu) (Dilgin ve ark., 2007)

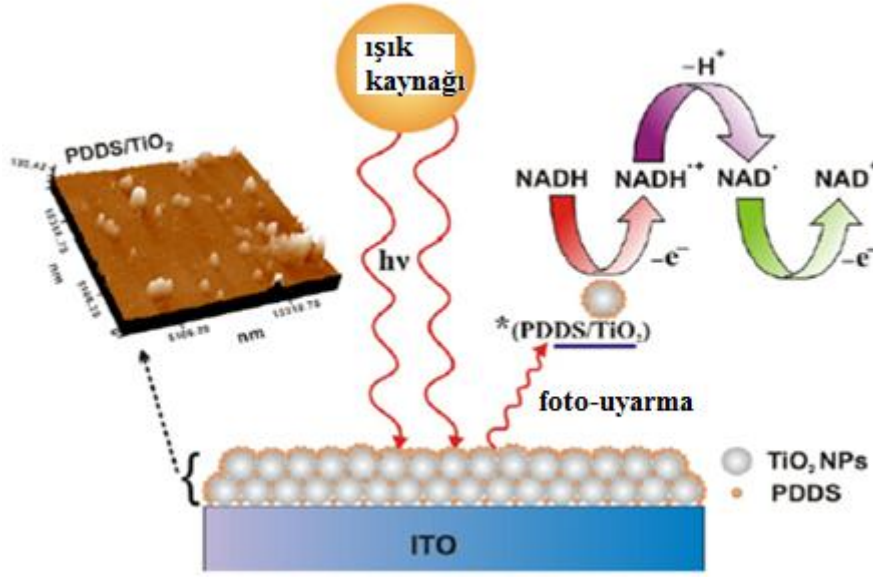
Anorganik nanomateryal olarak ise daha çok TiO_2 kullanılmıştır. Bu çalışmalarda nano TiO_2 tek başına elektrot yüzeylerine modifiye edilmemiş, dopamin (Wang ve ark., 2012a) ve poly(4,4'-diaminophenly sulfone) (Ho ve ark., 2011) ile birlikte indiyum kalay oksit (Indium Tin Oxide, ITO) elektoda ve grafen- TiO_2 nanohibritinin (Wang ve Hu, 2009) camımsı karbon elektrot (glassy carbon electrode, GCE) yüzeyine modifikasyonundan sonra kullanılmıştır. Bunun sebebinin ise fotoelektrokimyasal biyosensörlerde TiO_2 nanopartiküllerin uygulamalarda bazı sınırlamalara sahip olmasına bağlanmıştır. Çünkü, TiO_2 geniş bir bant boşluğuna sahip bir yarıiletken olup, sadece UV ışınları altında fotoelektrokimyasal olarak aktiftirler. Oysa UV ışınlarında biyolojik sistemlerin birçoğu bozunabilmektedir. Diğer taraftan TiO_2 'nin ışınlandırılmasıyla oluşan

foto h^+ 'lar, oldukça güçlü yükseltgenler olduğundan biyomoleküllere bozucu etkiler yapabilir. Bu yüzden, analitler için daha kararlı sonuçlar verdiği için görünür bölgede uyarılmaya bağlı fotoelektrokimyasal biyosensörler tercih edilmektedir (Wang ve ark., 2012a; Zhao ve ark., 2014). Bu çalışmaların birinde TiO_2 'e koordinatif kovalent bağlı dopamin modifiye ITO elektrot da bu amaçla hazırlanmış ve görünür bölgede geniş bir uyarılma aralığına sahip olduğu tespit edilmiş ve NADH'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenmesinde kullanılmıştır (Wang ve ark., 2012a). Önce sentezlenen TiO_2 nanopartiküllerde hazırlanmış süspansiyon ITO elektrot yüzeyine damlatılmış havada kurutulduktan sonra $450\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 30 dk sinterleştirilmiştir. Daha sonra su ile yıkanan TiO_2 kaplı ITO elektrot 0,015 M dopamin çözeltisinde 15 dk bekletilerek, dopamin ile Ti arasında yük transfer kompleksi oluşumu sağlanmış ve bu prosesle hazırlanmış modifiye elektrot ile NADH'nin fotoamperometrik yanıtı 0 mV'da izlenmiştir. Fotoelektrokimyasal sensörün mekanizması ve elde edilen fotoamperometrik yanıtlar sırasıyla Şekil 2.3A ve Şekil 2.3B'de verilmiştir (Wang ve ark., 2012a). Şekil 2.3A'da önerilen mekanizmaya göre; 1) önce görünür bölge (430 nm) ışınını absorplayan dopamin- TiO_2 kompleksi e^-h^+ çiftini oluşturmaktadır; 2) daha sonra oluşan e^-h^+ hemen birbirlerinden ayrılarak, elektron dopaminin endiol gruplarının uyarılmış hallerinden geçmeksizin direk olarak TiO_2 'in iletkenlik bandına geçmektedir. h^+ 'lar ise dopamin üzerinde yoğunlaşır. Çözeltide eğer bir elektron alıcısı ya da vericisi yoksa, e^-h^+ çiftinin yeniden birleşimi artar ve kimyasal reaksiyonlar meydana gelebilir (dopamin h^+ tarafından yükseltgenerek radikalik forma dönüşebilir). Bunun sonucu olarak bağıl küçük fotoakımlar oluşabilir. Çözeltiye NADH ilave edildiğinde ise NADH dopamin üzerine yerleşmiş h^+ 'lara elektron transfer edebilir ve yük transfer kompleksinin e^-h^+ ayrımını arttırabilir. Böylece, yük transfer kompleksinin fotoakımı NADH varlığında artar. Bu çalışmada NADH nin doğrusal çalışma aralığı 0,5-120 μM olup LOD'si ise 0,14 μM 'dır (Wang ve ark., 2012a).

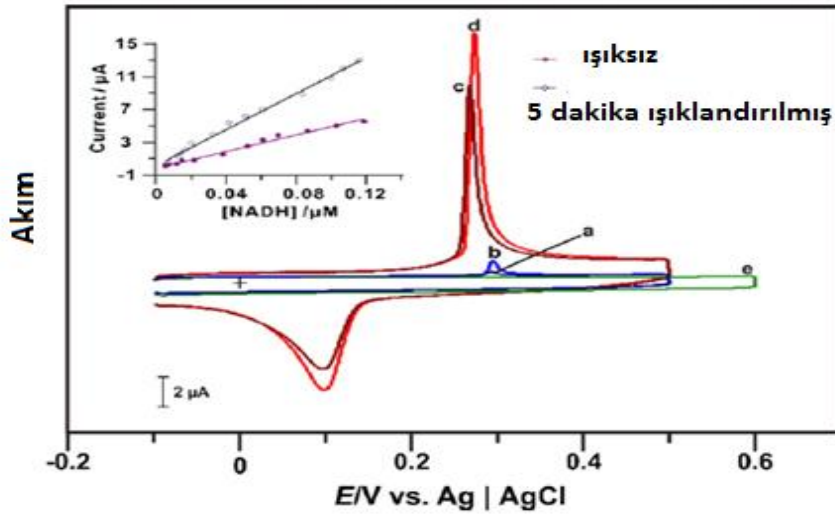


Şekil 2.3. A) Dopamin-TiO₂ modifiye ITO elektrotta NADH'nin fotoelektrokimyasal sensörüne ilişkin şematik gösterim, B) Değişen NADH derişimlerine karşı alınan fotoelektrokimyasal sinyaller (Wang ve ark., 2012a) 'dan modifiye edilmiştir

Benzer bir başka çalışmada NADH'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenmesi poly(4,4'diaminodifenil sülfon)/nano TiO₂ (PDDS/TiO₂) kompozit modifiye ITO elektrot kullanılarak çalışılmıştır. Elde edilen döngüsel voltammetrik sonuçlar kompozit filmin NADH'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenmesini katalizlediğini ve anodik pik akımında yalın ITO elektrot, TiO₂ ya da PDDS filme göre 18 kat artış sağladığını göstermektedir. Şekil 2.4'de kompozit film modifiye ITO elektrot yüzeyinde gerçekleşen NADH'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenme mekanizması verilmiştir (Ho ve ark., 2011). Modifiye elektrotla NADH'nin doğrusal derişim aralığı 0,005-0,12 µM olarak saptanmıştır. Şekil 2.5'de farklı elektrotlarla farklı NADH varlığında ışıklı ve ışısız ortamlarda alınan döngüsel voltammogramlar verilmiştir.

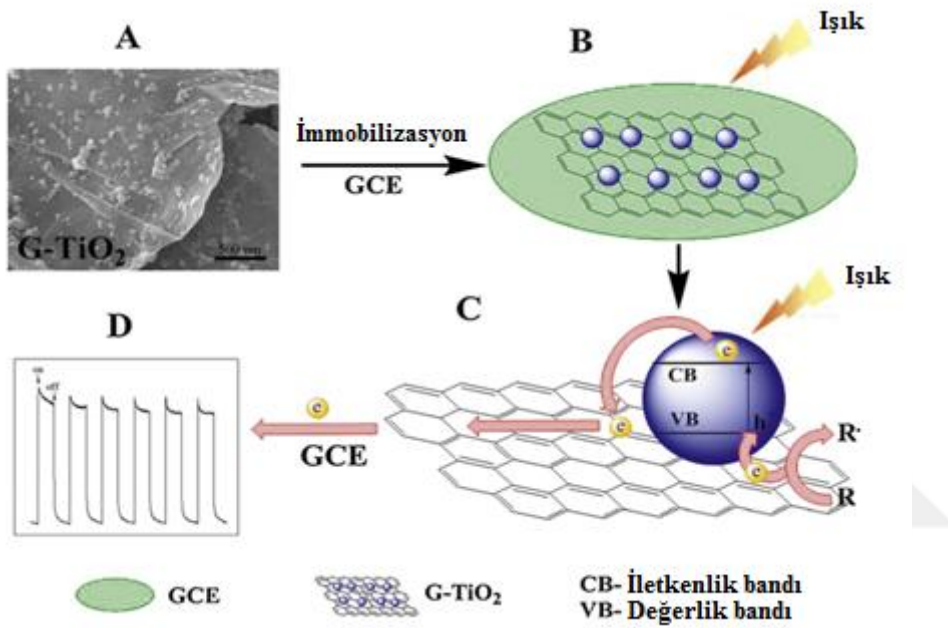


Şekil 2.4. Poly(4,4'diaminodifenil sülfon)/nano TiO₂ (PDDS/TiO₂) kompozit modifiye ITO elektrot yüzeyinde NADH'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenme mekanizması (Ho ve ark., 2011)'den modifiye edilmiştir



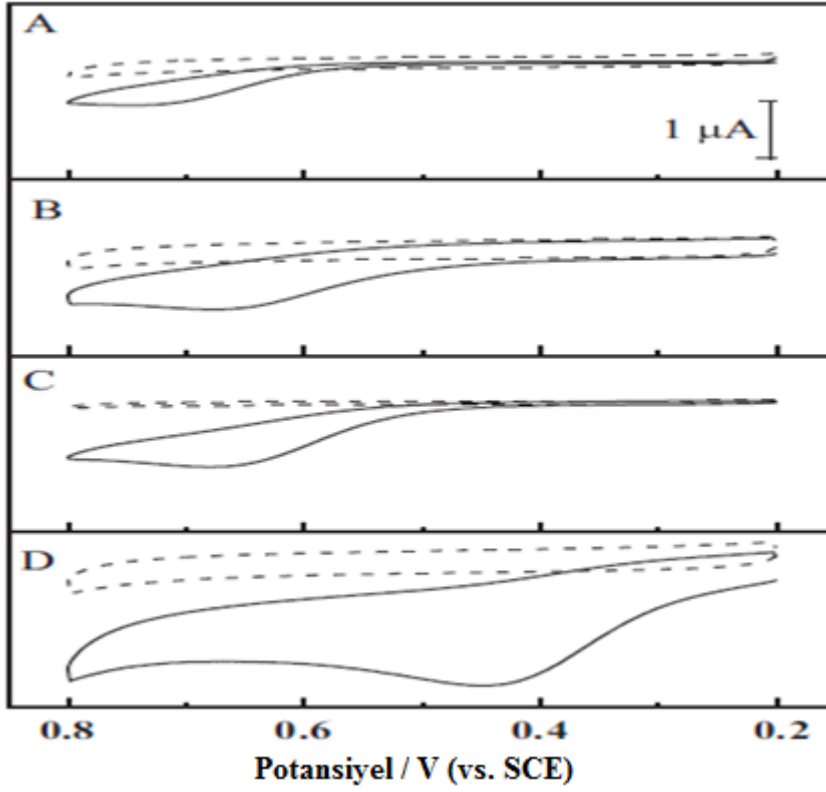
Şekil 2.5. a) 0,005 μM NADH varlığında PDDS/TiO₂ kompozit film ile 5 dakika ışık verilmeden önce ve b) sonraki döngüsel voltammogramlar; c) ve d) aynı koşullar altında 0,12 μM NADH varlığında; e) yalın ITO ile 5 dakika ışıklandırmanın sonunda 0,12 μM NADH varlığında alınmış döngüsel voltammogramlar. Tarama hızı: 50 mVs^{-1} ; destek elektrolit: 0,1 M H_2SO_4 . İç Şekil: NADH'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenme pik akımlarına karşı NADH derişim grafiği (5 dakika ışık/ışıksız ortamda) NADH aralığı: 0,005-0,12 μM

NADH'nin fotoelektrokimyasal yükseltgenmesinin incelendiği bir diğer çalışmada ise grafen-TiO₂ (G-TiO₂) nanohibrit kullanılmıştır. Işık altında G-TiO₂ nanohibritler kullanılarak elde edilen akım, yalnız TiO₂ nanokristallere göre ölçülen akımdan 5 kat daha fazladır. Geliştirilen fotoelektrokimyasal NADH biyosensörü ile doğrusal aralık $1,0 \times 10^{-8}$ – $2,0 \times 10^{-3}$ M olarak bulunurken tayin sınırı $3,0 \times 10^{-9}$ M olarak hesaplanmıştır (Wang ve ark., 2012a). Şekil 2.6'da G-TiO₂ nanohibritler kullanılarak GCE'nin modifikasyonu ve ışıkla etkileşimine ait mekanizma verilmiştir.

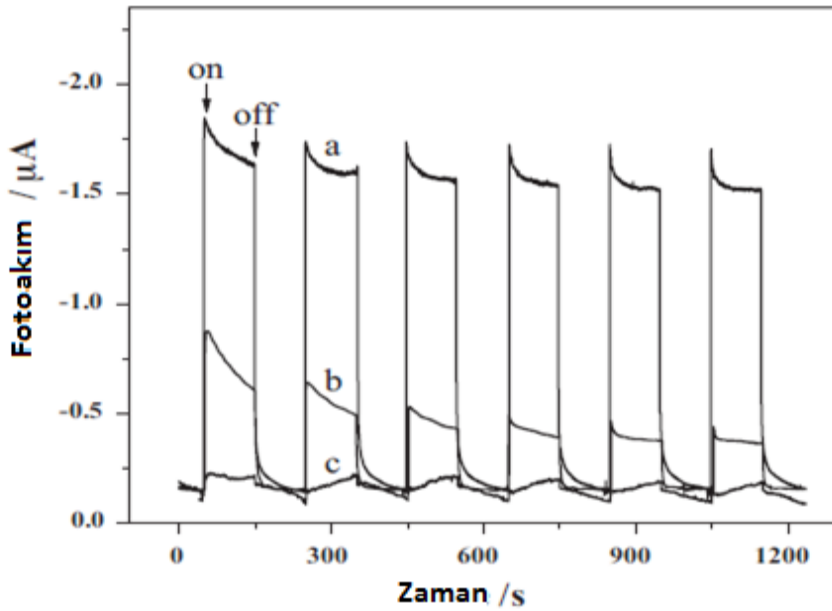


Şekil 2.6. G-TiO₂ nanohibritler kullanılarak GCE'nin modifikasyonu ve ışıkla etkileşimine ait mekanizma (Wang ve ark., 2012a)'dan modifiye edilmiştir

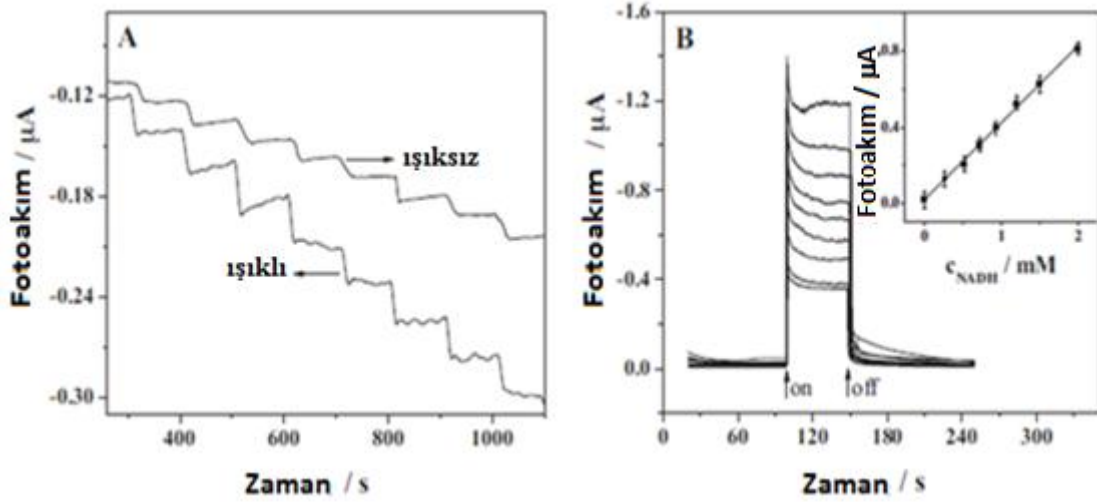
Şekil 2.7'de farklı şekilde modifiye edilmiş elektrotlarla 0,1 M pH 7,0 PBS ortamında ışıklı (düz çizgi) ışıksız (kesikli çizgi) olacak şekilde elde edilen döngüsel voltammogramlar verilmiştir. Döngüsel voltammogramlardan G-TiO₂ modifiye GCE kullanıldığında NADH'nin fotoelektrokimyasal yükseltgenmesinin çok daha iyi bir şekilde gözlemlendiği elde edilen akımlardan görülmektedir. Bu durum Şekil 2.8'da aynı elektrotlar kullanılarak 0,45 V ile ışıklandırıldığında elde edilen fotoakım izlenerek de ispatlanmıştır. Şekil 2.9'da ise G-TiO₂/GCE'nin farklı NADH konsantrasyonlarında 0,1 M pH 7,0 PBS ortamında alınmış fotoakım yanıtı kullanılarak kalibrasyon grafiği elde edilmiştir (Wang ve ark., 2012a).



Şekil 2.7. A)Yalın GCE, B) grafen, C) TiO₂, D) G-TiO₂ modifiye GCE ile 1×10^{-3} M NADH varlığında 0,1 M pH 7,0 PBS ortamında ışıklı (düz çizgi) ışiksiz (kesikli çizgi) olacak şekilde elde edilen döngüsel voltammogramlar. Tarama hızı: 20 mVs^{-1} (Wang ve ark., 2012a)'dan modifiye edilmiştir



Şekil 2.8. a) G-TiO₂/GCE, b) TiO₂/GCE, c) grafen/GCE'nin 1×10^{-3} M NADH varlığında 0,1 M pH 7,0 PBS ortamında 0,45 V ile ışıklandırıldığında elde edilen fotoakım



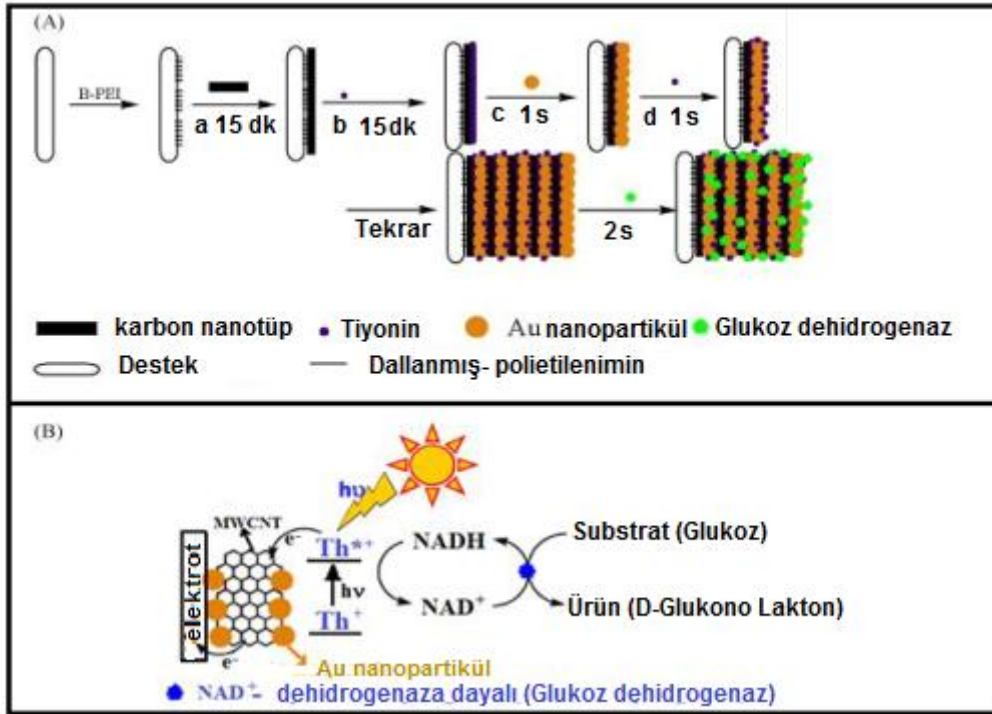
Şekil 2.9. A) G-TiO₂/GCE 1x10⁻⁵ M NADH varlığında, ışıksız ve 0,45 V ile ışıklandırıldığında elde edilen fotoakım, B) G-TiO₂/GCE'nin farklı NADH konsantrasyonlarında 0,1 M pH 7,0 PBS ortamında alınmış fotoakım yanıtı. İç Şekil: NADH tayini için kalibrasyon grafiği (Wang ve ark., 2012a)'dan modifiye edilmiştir

Sonuç olarak NADH'nin elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik yükseltgenmesinde organik redoks mediyatörlere dayalı modifiye elektrotlar kullanıldığı gibi son zamanlarda artan bir trendle anorganik yarı iletken yada anorganik yarı iletken-organik redoks mediyatör modifiye elektrotlar kullanılmaya başlanmıştır.

2.2. Dehidrogenaz Enzimine Dayalı Modifiye Elektrotlarla Fotoelektrokimyasal Biyosensör Çalışmaları

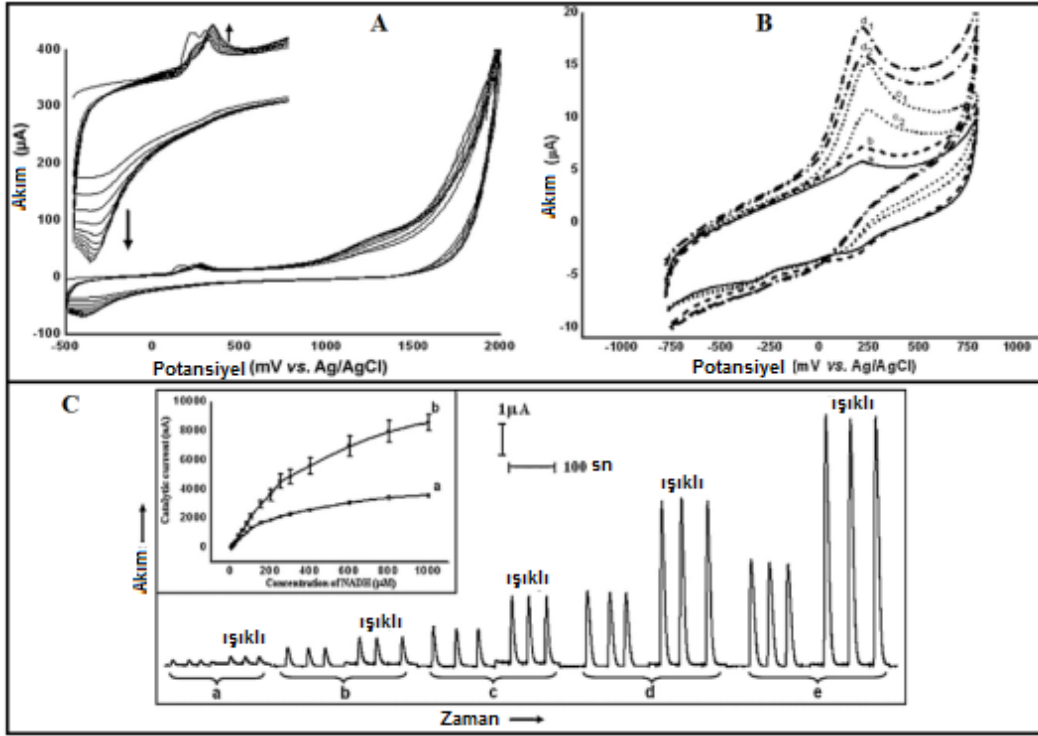
Biyolojik öneme sahip birçok molekülün dehidrogenaz enzimine dayalı elektrokimyasal biyosensörünün yapımında ve geliştirilmesinde NAD⁺/NADH redoks çifti dönüşümü oldukça sık kullanılmıştır (Cosnier ve Lous, 1996; Lobo ve ark., 1996; Silber ve ark., 1996; Villamil ve ark., 1997; Santos ve ark., 2006; Chakraborty ve Raj, 2007; Du ve ark., 2007; Yan ve ark., 2007; Dai ve ark., 2008; Kumar ve Chen, 2008; Zhou ve ark., 2008; Meng ve ark., 2009; Radoi ve Compagnone, 2009; Yang ve Liu, 2009; Hua ve ark., 2013). Son zamanlarda ise NAD⁺/NADH redoks çifti ve dehidrogenaz enzimlerine dayalı fotoelektrokimyasal sensörler ön plana çıkmıştır. Bu çalışmalarda organik redoks mediyatör, anorganik yarı iletken ve organik materyal-anorganik nanomateryallerden oluşan kompozit modifiye elektrotlar kullanılarak duyar fotoelektrokimyasal biyosensörler geliştirilmiştir.

İlk çalışma niteliği taşıyan ve organik redoks mediyatör, NAD^+/NADH redoks çifti ve dehidrogenaz enzimine dayalı fotoelektrokimyasal biyosensör çalışması Deng ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (Deng ve ark., 2008). Bu çalışmada organik boyar madde olarak Thionin (TH) kullanılmıştır, Şekil 2.10.A'da gösterilen modifikasyona göre ITO elektrot yüzeyine MWCNT, Au-NP ve TH birlikte modifiye edilmiş ve son olarak da enzim immobilize edilmiştir. Şekil 2.10.B'deki fotoelektrokatalitik yükseltgenme mekanizması kullanılarak da, glukoz için bir fotoelektrokimyasal biyosensör önerilmiştir. Daha önce önerilen mekanizmayla elde edilen amperometrik akım-zaman eğrilerinden hem doğrudan NADH 'nin hem de glukoz derişimiyle orantılı olarak enzimatik yolla oluşan NADH 'nin 200 mV uygulama potansiyelindeki akımlarının ışıkla arttığı saptanmıştır. Karanlıkta elde edilen verilere göre ışıkla doğrudan NADH için duyarlılığın 7 kat arttığı, LOD'nin ise 2 kat azaldığı, glukoz biyosensörü için ise duyarlılığın 2 kat arttığı LOD'nin ise 7 kat azaldığı tespit edilmiştir (Deng ve ark., 2008).



Şekil 2.10. A) TH/MWCNT/AuNP/GDH/ITO elektrot için tasarlanan biyosensörde elektrot modifikasyon şeması, B) Fotoelektrokimyasal biyosensörde gerçekleşen reaksiyonlar için önerilen mekanizma (Deng ve ark., 2008)'den modifiye edilmiştir

Dilgin ve Gökçel (2015) tarafından gerçekleştirilen diğer bir çalışmada poli-HT modifiye GCE yüzeyine glukoz dehidrogenaz (GDH) enzimi immobilize edilerek fotoelektrokimyasal glukoz biyosensörü tasarlanmış ve ilk defa FIA sisteminde glukozun fotoelektrokimyasal tayini gerçekleştirilmiştir. Poli-HT modifiye elektrotla NADH için alınan döngüsel voltammogram ve değişen NADH derişimiyle elde edilen amperometrik ve fotoamperometrik fiyagramlar Şekil 2.11’da verilmiştir.

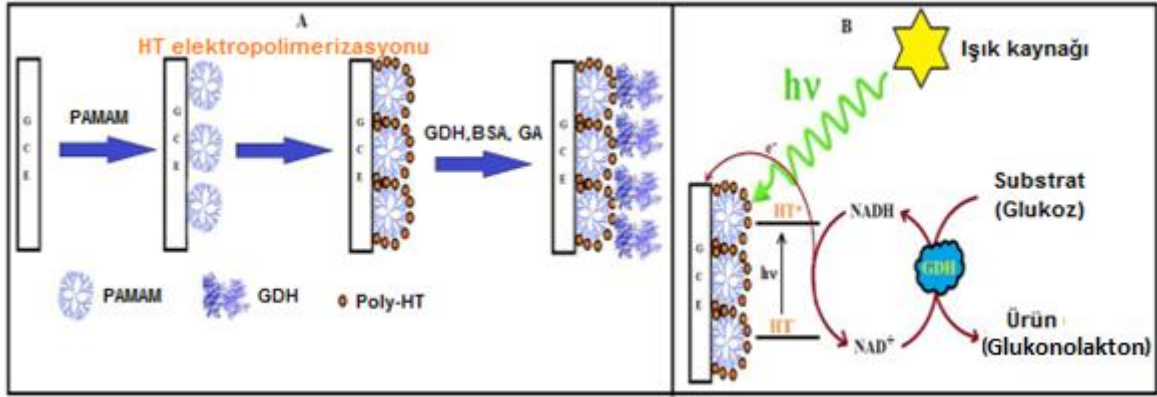


Şekil 2.11. 0,1 M NaNO₃ içeren pH 7,0 fosfat tamponu destek elektrolitlerinde 0,3 mM HT'nin, ardışık olarak alınan döngüsel voltammogramları (tarama hızı: 100 mV/s). B) Poli-HT/GCE'nin a) ışksız ve b) ışıklı ortamdaki döngüsel voltammogramı; 0,8 mM NADH'nin Poli-HT/GCE kullanılarak c1 ve c2) ışksız ve d1 ve d2) ışıklı ortamdaki döngüsel voltammogramı. Tarama hızı: 50 mV/s, destek elektrolit: 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, C) FIA sisteminde poli-HT/GCE kullanılarak a) 10, b) 40, c)100, d) 400, e) 1000 mM NADH için elde edilen akım-zaman eğrileri (Taşıyıcı elektrolit: 0,1 M KCl içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu; Uygulama potansiyeli: +300 mV; akış hızı: 1,3 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 mL; kolon uzunluğu: 10 cm) (Dilgin ve Gökçel, 2015)'den modifiye edilmiştir

Şekil 2.11.A'daki döngüsel voltammogramlar HT monomerinin GCE yüzeyinde elektropolimerizasyon yoluyla modifiye edildiğini göstermektedir. Şekil 2.11B'de ise bu modifiye elektrotla NADH'nin elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik yükseltgenmesine ait döngüsel voltammogramları gösterilmektedir. Poli-HT'ye ilişkin yaklaşık 230 mV'da anodik pik ve 210 mV civarında ise katodik bir pik (Şekil 2.11. B-a) ve yüzey ışıklandırıldığında bu piklerde çok az bir artış gözlenmiştir (Şekil 2.11 B-b). NADH ortamında ise HT'nin 230 mV'daki pik akımı artmış ikinci döngüde ise bir miktar azalmıştır (Şekil 2.11 B, c1 ve c2). Sonuçta yalın GCE'ye göre NADH'nin yükseltgenmesi (+550 mV, bu şekilde gösterilmemiş) yaklaşık 320 mV daha negatife kaymıştır. Ancak elektrot yüzeyine ışık düşürüldüğünde NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine ilişkin pik akımının arttığı ve ikinci döngüde daha az azaldığı gözlenmiştir (Şekil 2.11, B-d1 ve d2). Bu sonuçlar poli-HT/GCE'nin NADH'ye iyi bir elektrokatalitik ve özellikle de fotoelektrokatalitik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Şekil 2.11C'de ise yüzeye ışık düşürülmeksizin ve yüzey ışıklandırılarak FIA sisteminde farklı NADH derişimlerinde alınmış fiagramlar ve elde edilen derişim akım grafiği verilmiştir. Doğrusal kalibrasyon aralığı, amperometrik yöntem için $1,0 \times 10^{-7} - 1,5 \times 10^{-4}$ M, fotoamperometrik yöntem için ise $1,0 \times 10^{-7} - 2,5 \times 10^{-4}$ M olarak bulunmuş ve bu iki metodun doğrusallıkları sırasıyla $I(\text{nA}) = 11,96C (\mu\text{M}) + 29,22$, $R^2=0,9902$ ve $I(\text{nA}) = 18,51C(\mu\text{M}) + 47,54$, $R^2=0,9953$ denklemleriyle ifade edilmiştir. Denklemden I pik akımı, C ise NADH'nin derişimidir. Bu denklemlerdeki eğimler karşılaştırıldığında fotoamperometrik yöntemle elde edilen doğrunun eğiminin (18,51), amperometrik yöntemle elde edilenden (11,96) yaklaşık 1,5 kat daha büyük olduğu saptanmış ve dolayısıyla, GCE'nin modifiye edilmesiyle artırılmış olan duyarlılığın elektrot yüzeyinin ışıklandırılmasıyla bir miktar daha artırılması başarılmıştır.

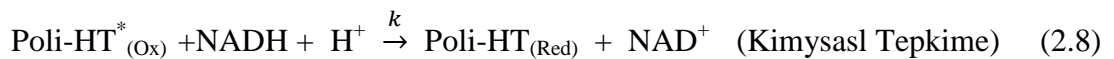
Fotoelektrokimyasal biyosensör tasarımıında elektrot yüzeyi ışıklandırılarak enzimatik tepkime sonucu oluşan NADH'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenmesi izlenerek kullanılacak enzime bağlı olarak dolaylı yoldan substrat için biyoalgılama gerçekleştirilmektedir. Poli-HT/Glukoz dehidrogenaz (GDH) enzimine bağlı fotoelektrokimyasal biyosensör tasarımına bakacak olursak, Şekil 2.12A'da gösterilen elektrot modifikasyon prosedürü uygulanarak GCE yüzeyine önce PAMAM, sonra poli-HT ve son olarak da GDH enzimi tutturularak modifiye GCE hazırlanmış ve bu elektrot kullanılarak, Şekil 2.12B'de gösterilen fotoelektrokimyasal glukoz biyosensörü

mekanizmasına göre, hem voltammetrik hem de FIA sisteminde amperometrik fotoelektrokimyasal biyosensör çalışmaları başarıyla gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.12. A) Poli-HT/GDH enzime bağlı tasarlanan biyosensörde elektrot modifikasyon şeması B) Fotoelektrokimyasal biyosensörde gerçekleşen reaksiyonlar için önerilen mekanizma (Dilgin ve Gökçel, 2015)'den modifiye edilmiştir

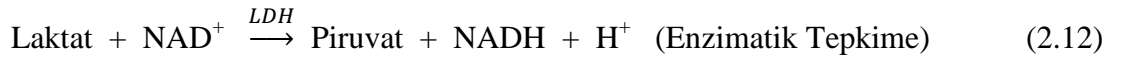
HT ile gerçekleştirilen çalışmalarda fotoelektrokatalitik sisteme ait mekanizma yine Compton ve arkadaşlarının önerdiği mekanizmayla aşağıdaki şekilde açıklanmıştır. Önce elektrot yüzeyindeki HT absorpladığı ışıkla uyarılmış hale dönüşmekte, daha sonra uyarılmış HT* gerek doğrudan NADH ile gerekse glukozun enzimatik tepkimesi sonucu oluşan NADH ile tepkimeye girerek NADH, NAD⁺'ya yükseltgenmekte, HT ise indirgenmiş formuna dönüşmektedir. Son olarak elektrot tepkimesiyle HT'nin indirgenmiş formu tekrar yükseltgenerek yükseltgenmiş formuna dönüşür ve fotoelektrokataliz devam eder. Gerçekleşen tepkimeler aşağıda verilmiştir (Tepkime 2.6-2.10) (Dilgin ve Gökçel, 2015). FIA sisteminde fotoelektrokimyasal biyosensör tasarımı ilk defa bu çalışma ile gerçekleştirilmiştir.



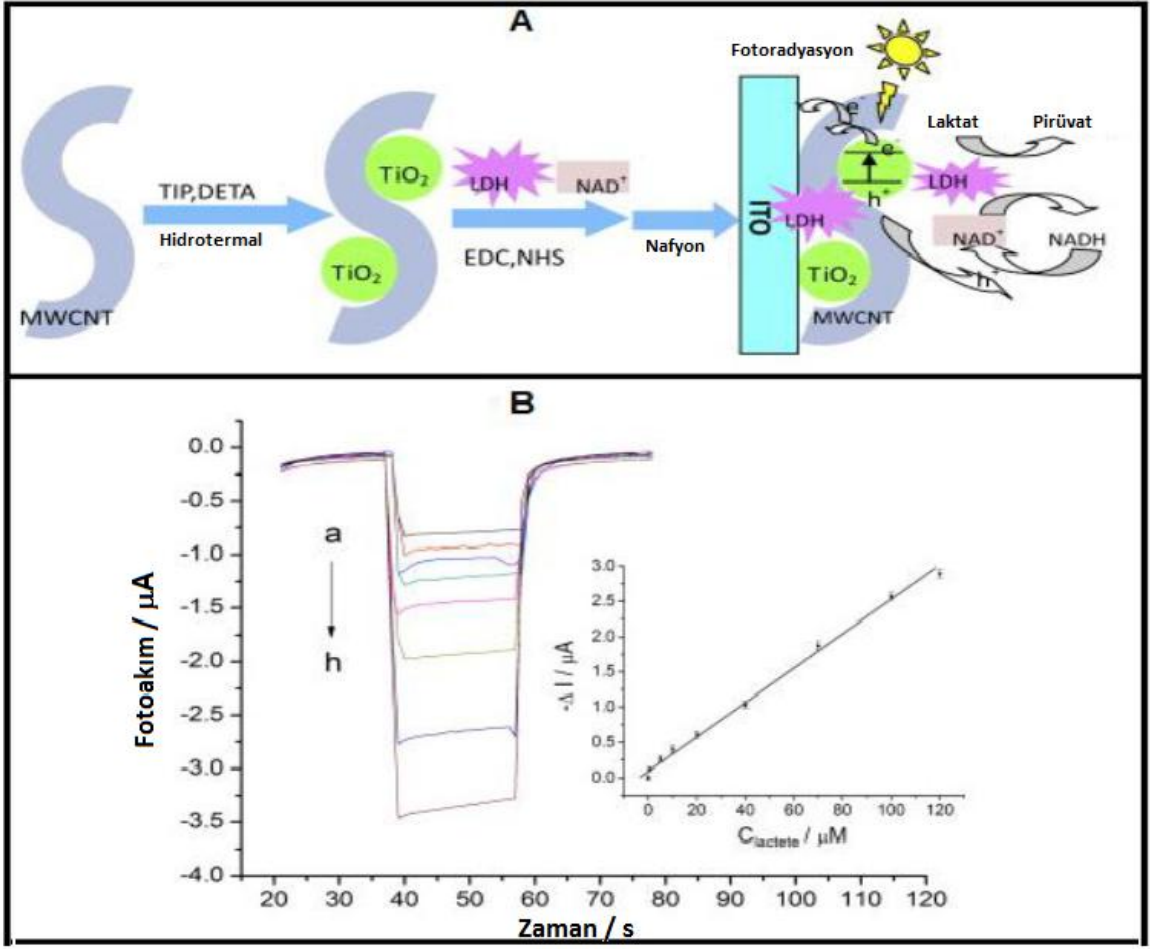
Fotoelektrokimyasal biyosensör tasarımında organik redoks mediyatörler kullanıldığı gibi anorganik yarı iletken materyallerde kullanılmıştır. TiO₂ modifiye elektrotlar sadece NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinde kullanıldığı gibi (Schubert ve ark., 2010; Jafari ve ark., 2014a,b; Liu ve ark., 2015) dehidrogenaz enzimi ve NAD⁺/NADH redoks çiftine dayalı fotoelektrokimyasal biyosensör tasarımında da kullanılmıştır (Schubert ve ark., 2010; Jafari ve ark., 2014a,b; Liu ve ark., 2015). Bu amaçla 2015 yılında yapılan bir çalışmada, çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) ve TiO₂ nanopartikülünden oluşan kompozit materyal ITO elektrot yüzeyine modifiye edilmiş ve ardından laktat dehidrogenaz immobilize edilerek NAD⁺/NADH redoks çiftine dayalı fotoelektrokimyasal biyosensör tasarlanmıştır (Liu ve ark., 2015). Tasarlanan fotoelektrokimyasal biyosensörün mekanizması Şekil 2.13A'da verilmiştir. Şekil 2.11A'da verilen mekanizmaya göre elektrot yüzeyi ışıklandırıldığında TiO₂'in değerlik bandındaki elektronlar iletkenlik bandına geçerek e⁻-h⁺ çiftini oluşturur.



İletkenlik bandındaki elektronlar ITO elektroda aktarılırken bu arada enzimatik tepkime sonucu oluşan NADH'de elektronlarını değerlik bandındaki h⁺'ya vererek laktat derişimine bağlı bir anodik fotoakım oluşmaktadır.

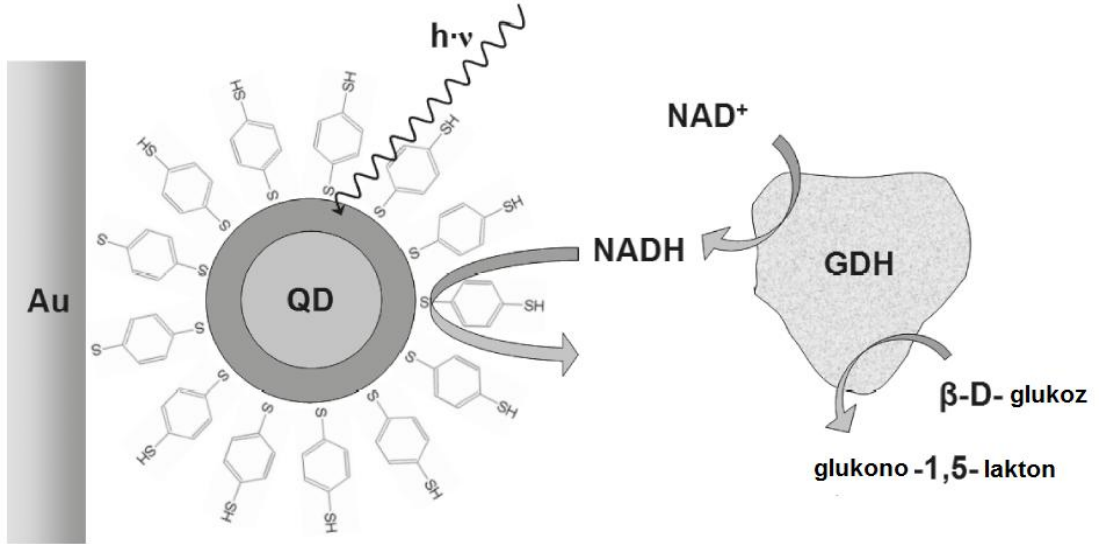


Bu mekanizmaya bağlı olarak, değişen laktat derişimine karşı fotoakım-zaman eğrisi Şekil 2.13B'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi laktat derişimi arttıkça fotoakımın arttığı ve doğrusal kalibrasyon aralığının 0,5 ile 120 µM olduğu ve gözlenebilme sınırının 0,1 µM laktat olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 2.13. A)MWCNT-TiO₂/LDH/NAD⁺/ITO nanokompozit elektroduna bağlı fotoelektrokimyasal laktat biyosensör mekanizması B) Elektrodun artan sodyum laktat derişimine bağı (a → h, 0 → 100 μM) fotoakım-zaman eğrileri. Uygulama potansiyeli: 0,2 V (Liu ve ark., 2015)'den modifiye edilmiştir

Benzer bir çalışmada, benzen ditiyol vasıtasıyla CdSe/ZnS kuantum nokta Au elektrot yüzeyine kimyasal adsorpsiyon yoluyla bağlanmış ve NADH/NAD⁺ redoks çiftine dayalı glukoz fotobiyosensörü geliştirilmiştir (Schubert ve ark., 2010). Glukoz dehidrogenaz ve NAD⁺ içeren bir çözeltide glukoz ilavesiyle, NAD⁺, NADH'ye indirgenirken, glukoz enzimatik tepkime sonucu glukonolaktone yükseltgenmiştir. CdSe/ZnS kuantum nanoparçacık modifiye Au elektrodun ise enzimatik tepkime sonucu oluşan NADH'nin tekrar NAD⁺'ya yükseltgenmesine elektrokatalitik etki gösterdiği ve yüzeye ışık düşürüldüğünde NADH'ye ait yükseltgenme pik akımının arttığı ve böylece enzim bazlı, duyar ve seçici bir fotobiyosensör geliştirildiği sonucuna varılmıştır. Elde edilen fotobiyosensörün tipik şematik gösterimi ise Şekil 2.14.'de verilmiştir (Schubert ve ark., 2010).

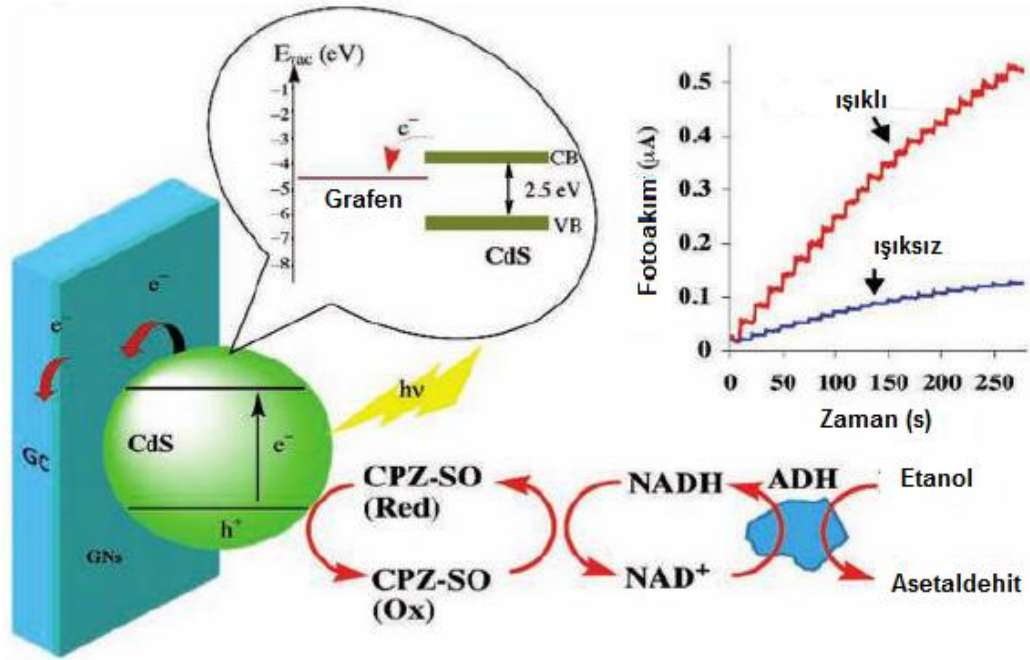


Şekil 2.14. CdSe/ZnS Modifiye Au elektrotta NAD^+/NADH redoks çiftine dayalı enzimatik glukoz fotobiyosensörü (Schubert ve ark., 2010)'dan modifiye edilmiştir

Son yıllarda yapılan birkaç çalışmada ise hem organik redoks mediyatör hem de anorganik nanomateryalden oluşan kompozit elektrot yüzeyine modifiye edilmiş ve fotoelektrokimyasal biyosensör tasarımında kullanılmıştır (Jafari ve ark., 2014a, b). Bu çalışmaların birinde Grafen/CdS kuantum nokta/iyonik sıvı/klorpromazin sülfoksit (redoks mediyatör olarak) nanokompoziti GCE yüzeyine modifiye edilmiş ve bu modifiye elektrodun NADH 'nin yükseltgenmesine iyi bir elektrokatalitik ve özellikle fotoelektrokatalitik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Jafari ve ark., 2014b). Daha sonra bu elektrot yüzeyine alkol dehidrogenaz immobilize edilmiş ve etanol varlığında oluşan NADH 'nin amperometrik yanıtı izlenerek fotoelektrokimyasal etanol biyosensörü geliştirilmiştir. Tasarlanan biyosensöre ilişkin elektrot modifikasyonu, elektrodun etanole fotoelektrokimyasal yanıt mekanizması ve ışıklı/ışısız ortamda alınan amperometrik eğriler Şekil 2.15.'de verilmiştir (Jafari ve ark., 2014b). Şekilden de görüldüğü gibi fotoelektrokimyasal yanıt mekanizması sırasıyla aşağıdaki adımlarla verilmiştir.

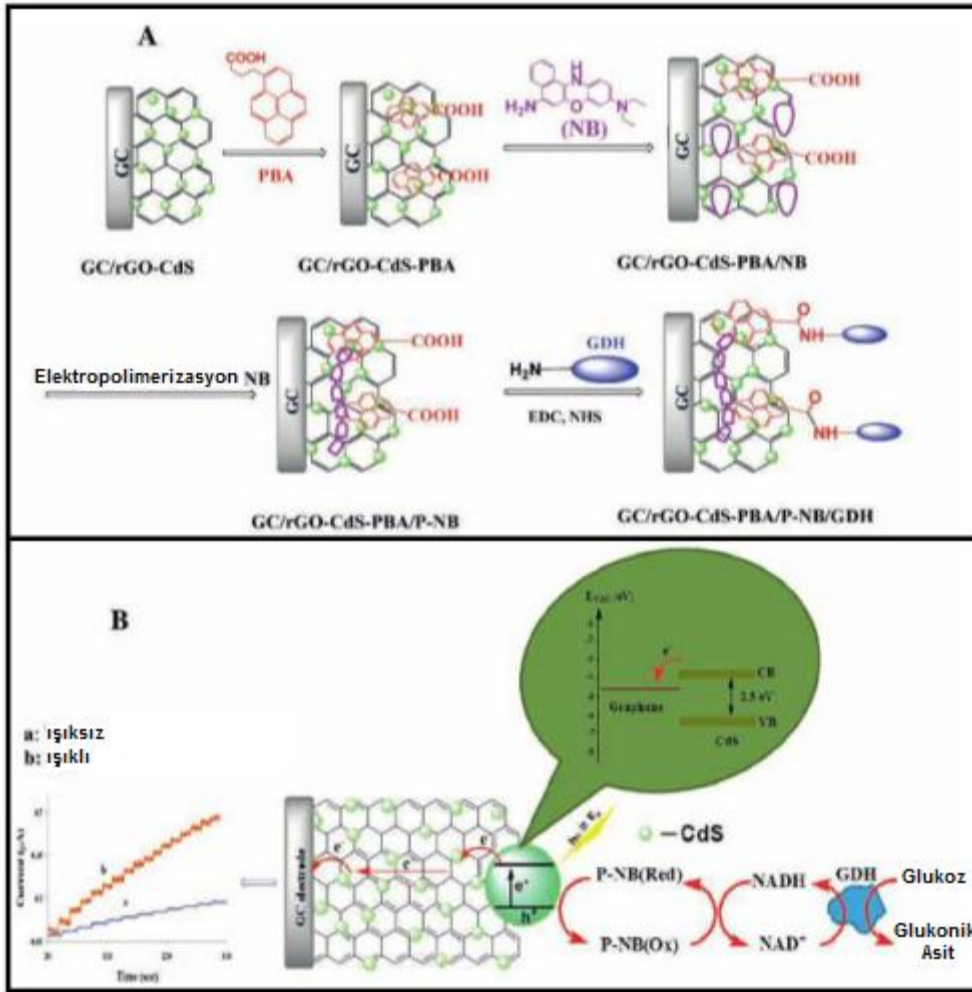
- i) elektrot yüzeyinin ışıklandırılmasıyla e^-h^+ çifti oluşması
- ii) iletkenlik bandındaki elektronun elektroda transferi
- iii) etanolün enzimatik tepkimesi sonucu NAD^+ 'nin NADH 'ye dönüşmesi
- iv) Oluşan NADH 'nin mediyatörün yükseltgenmiş formuyla (CPZ-SO) kimyasal tepkimesi sonucu tekrar NAD^+ 'ya dönüşmesi
- v) bir önceki adımda oluşan mediyatörün indirgenmiş formunun (CPZ-SO(Red)) elektronlarını değerlik bandındaki h^+ 'a transfer etmesi

Sonuç olarak etanolün derişimine bağlı bir anodik fotoakım oluşmuş ve bu anodik fotoakımın izlenmesine bağlı olarak da amperometrik bir alkol biyosensörü geliştirilmiştir.



Şekil 2.15. Grafen/CdS QD/IL/CPZ-SO nanokompozit modifiye elektrotta yük ayrılması ve fotoelektrokimyasal alkol biyosensörü mekanizması. Etanol için elde edilen elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal akım-zaman eğrileri. İç kısım: Işıklı ve ışiksiz ortamda elde edilen fotoakım-zaman eğrileri (Jafari ve ark., 2014b)'den modifiye edilmiştir

Benzer başka bir çalışmada ise organik redoks mediyatör olarak nil mavisi ve anorganik yarıiletken olarak da CdS kullanılmıştır. Bu amaçla indirgenmiş Grafen/CdS QDs/poli-NB nanokompoziti ile modifiye GCE hazırlanmış ve bu elektrodun NADH'nin yükseltgenmesine çok iyi bir elektrokatalitik ve özellikle fotoelektrokatalitik etki gösterdiği saptanmıştır (Jafari ve ark., 2014a). Bu çalışmada ise bu elektrot yüzeyine glukoz dehidrogenaz enzimi immobilize edilerek glukoz için fotoelektrokimyasal biyosensör tasarlanmıştır. Bu çalışmada elektrot modifikasyon prosedürü ve fotoelektrokimyasal biyosensör mekanizmasına ilişkin şematik bir gösterim Şekil 2.16'da verilmiştir.

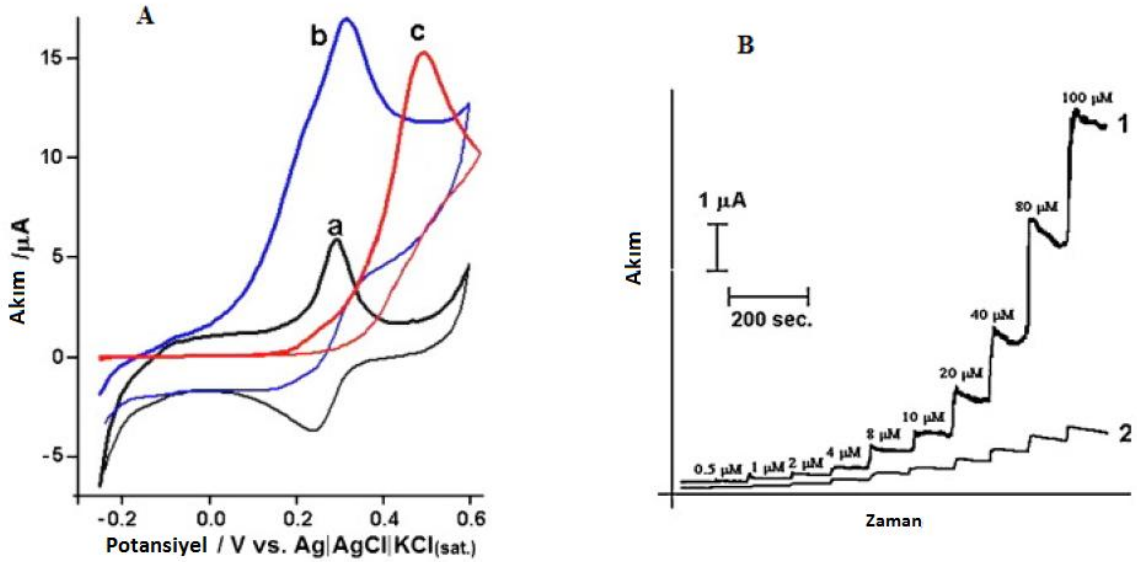


Şekil 2.16. A) GC/rGO-CdS QDs/PBA/P-NB/GDH modifiye elektrodunun hazırlanmasına ilişkin şematik gösterim ve B) Enzim modifiye elektrotta glukozun fotoelektrokimyasal biyosensör mekanizması ve ışıklı ve ışısız ortamda elde edilen fotoakım-zaman eğrileri (Jafari ve ark., 2014a)'dan modifiye edilmiştir

2.3. Kalem Grafit Elektrot Kullanılarak NADH'nin Elektrokatalitik Yükseltgenmesi ve Biyosensör Çalışmaları

Literatürde PGE ile birçok elektrokimyasal sensör, enzimatik biyosensör ve DNA biyosensör tasarımına ilişkin çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Wang ve ark., 2000; Wang ve ark., 2001; Keskin ve ark., 2010; Ozcan ve Sahin, 2010; Dogan Topal ve Ozkan, 2011; Ozcan ve Sahin, 2011; Dilgin ve ark., 2012b, c, d; Devi ve ark., 2013; Dilgin ve ark., 2013; Uygun ve Dilgin, 2013; Yardım ve Senturk, 2013; Congur ve ark., 2014; Dede ve ark., 2014; Elahi ve ark., 2014; Erdem ve ark., 2014; Kuralay ve ark., 2014; Mese ve ark., 2014; Pala ve ark., 2014; Zhu ve ark., 2014; Dervisevic ve ark., 2015; Sehat ve ark., 2015).

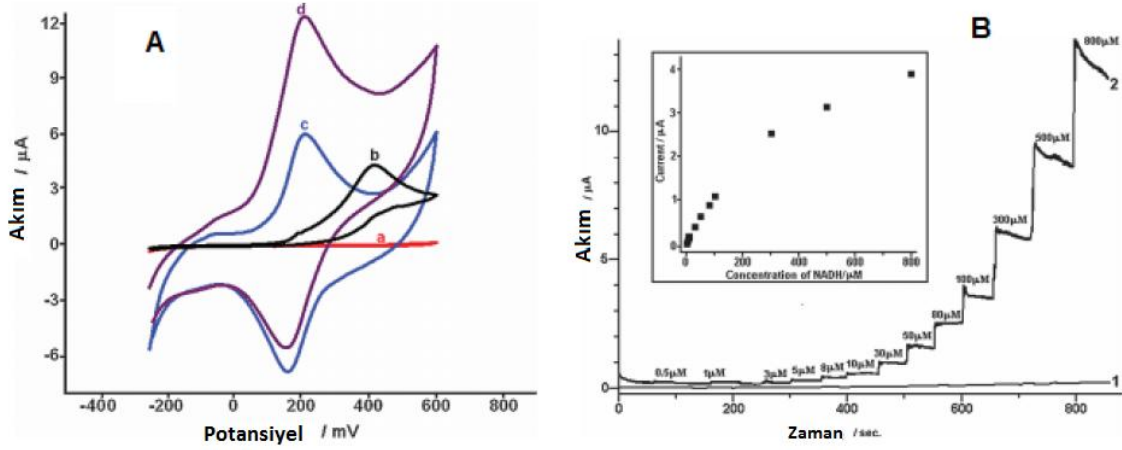
Gerçekleştirilen bir çalışmada, bir flavonoid türü olan kuersetin kalem grafit elektrot yüzeyine adsorpsiyon yoluyla tutturulmuş ve hem NADH'nin hem de sülfürün elektrokatalitik yükseltgenmesinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Dilgin ve ark., 2012b; Dilgin ve ark., 2013). NADH ile ilgili yapılan çalışmada alınan döngüsel voltammogramlar ve amperometrik akım-zaman eğrileri Şekil 2.17'de verilmiştir.



Şekil 2.17. A) Kuersetin modifiye PGE'nin a) NADH yokluğunda b) 0,5 mM NADH varlığında c) yalın PGE'nin 0,5 mM NADH varlığında 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 50 mV/s tarama hızında elde edilen döngüsel voltammogramlar B) 1) Kuersetin modifiye PGE'nin 2) yalın PGE'nin +300 mV'da artan NADH derişimine bağı amperometrik akım-zaman eğrileri (Dilgin ve ark., 2012b) 'den modifiye edilmiştir

Şekil 2.17A'da verilen döngüsel voltammogramlardan görüldüğü gibi NADH'nin yükseltgenmesi, yalın PGE'de yaklaşık 500 mV'da gerçekleşirken Şekil 2.17A/c), kuersetin modifiye PGE'de ise yaklaşık 300 mV'da gerçekleşmiş (Şekil 2.17A/ a ve b) ve 200 mV'luk bir negatife kaydırmayla iyi bir elektrokatalitik etkinlik sağlanmıştır. +300 mV'da değişen NADH derişimine karşılık alınan akım-zaman eğrilerinden de 1 numara ile gösterilen modifiye elektrodun NADH'nin yükseltgenme akımına verdiği yanıt, 2 numara ile gösterilen yalın PGE'den oldukça iyi olduğunu göstermektedir (Şekil 2.17B). Sonuç olarak kuersetin modifiye PGE'nin NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine iyi yanıt verdiği tespit edilmiştir (Dilgin ve ark., 2013). Başka bir çalışmada da katekol grupları içeren hematoksilin yine PGE yüzeyine modifiye edilmiş ve yine hem NADH'nin hem de

sülfürün elektrokatalitik yükseltgenmesinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Dilgin ve ark., 2012b; Dilgin ve ark., 2013). Bu çalışmalardan ise NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi ile ilgili yapılan çalışmada alınan döngüsel voltammogramlar ve amperometrik akım-zaman eğrileri Şekil 2.18'de verilmiştir.



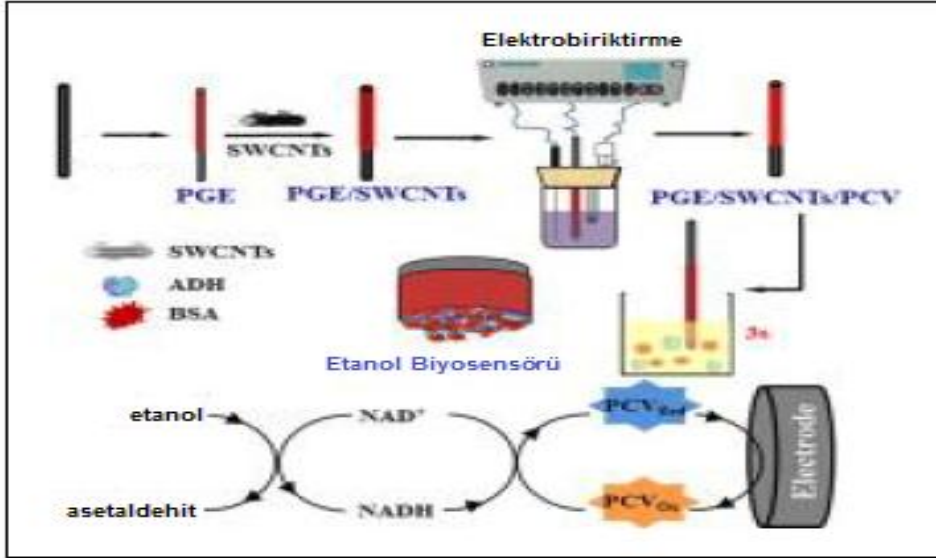
Şekil 2.18. A) Yalın PGE'nin a) NADH yokluğunda b) 0,5 mM NADH varlığında ve yalın Hematoksilin modifiye PGE'nin c) NADH yokluğunda ve d) 0,5 mM NADH varlığında 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda 50 mV/s tarama hızında elde edilen döngüsel voltammogramlar B) 1) Hematoksilin modifiye PGE'nin ve 2) yalın PGE'nin +200 mV'da artan NADH derişimine bağıli amperometrik akım-zaman eğrileri (Dilgin ve ark., 2012b) 'den modifiye edilmiştir

Şekil 2.17'de gösterilen kuersetin modifiye elektrota benzer şekilde hematoksilin redoks mediyatörünün NADH'ye iyi bir elektrokatalitik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Yalın PGE'de yaklaşık 450 mV'da yayvan bir şekilde yükseltgenen NADH, hematoksilin modifiye PGE'de yaklaşık 200 mV'da yükseltgenerek potansiyelde 250 mV'luk bir negatife kayma elde edilmiştir. Yine +200 mV potansiyelde elde edilen amperometrik yanıtlardan yalın PGE'ye göre modifiye elektrodun NADH'ye yanıtının oldukça iyi olduğu Şekil 2.18'de görülmektedir (Dilgin ve ark., 2012b; Dilgin ve ark., 2013).

Ancak kuantum nokta modifiye PGE'ye ilişkin bir çalışmaya rastlanılmamıştır. PGE ile gerçekleştirilen enzim bazlı biyosensör tasarımı ya da NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi üzerine sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Enzim bazlı biyosensör tasarımında tek örnek olan çalışma aşağıda verilmiştir.

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada ise pirokatekol violet redoks mediyatörü tek duvarlı karbon nanotüp modifiye edilmiş PGE yüzeyine adsorbe edilerek hem NADH'nin

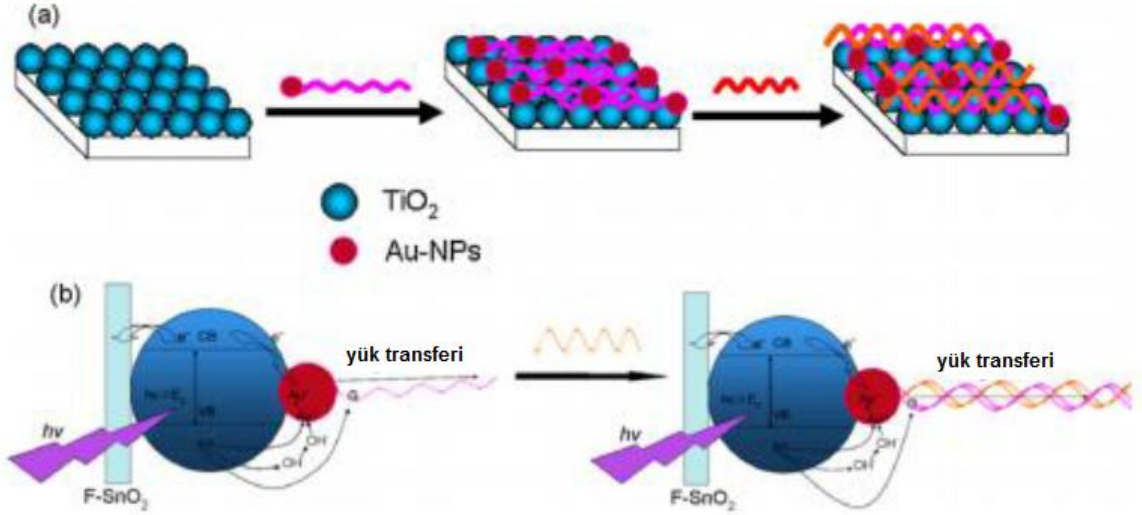
elektrokatalitik yükseltgenmesi gerçekleştirilmiş hem de alkol dehidrogenaz yüzeye immobilize edilerek $NAD^+/NADH$ redoks çiftine dayalı alkol biyosensörü tasarlanmıştır (Zhu ve ark., 2014). Tasarlanan biyosensör mekanizması ise Şekil 2.19'da verilmiştir.



Şekil 2.19. Tek duvarlı karbon nanotüp modifiye kalem grafit elektrot yüzeyinde pirokatekol violet ile birlikte enzim immobilizasyon prosedürleri ve $NAD^+/NADH$ redoks çiftine bağlı geliştirilen biyosensörün mekanizması (Zhu ve ark., 2014)'den modifiye edilmiştir

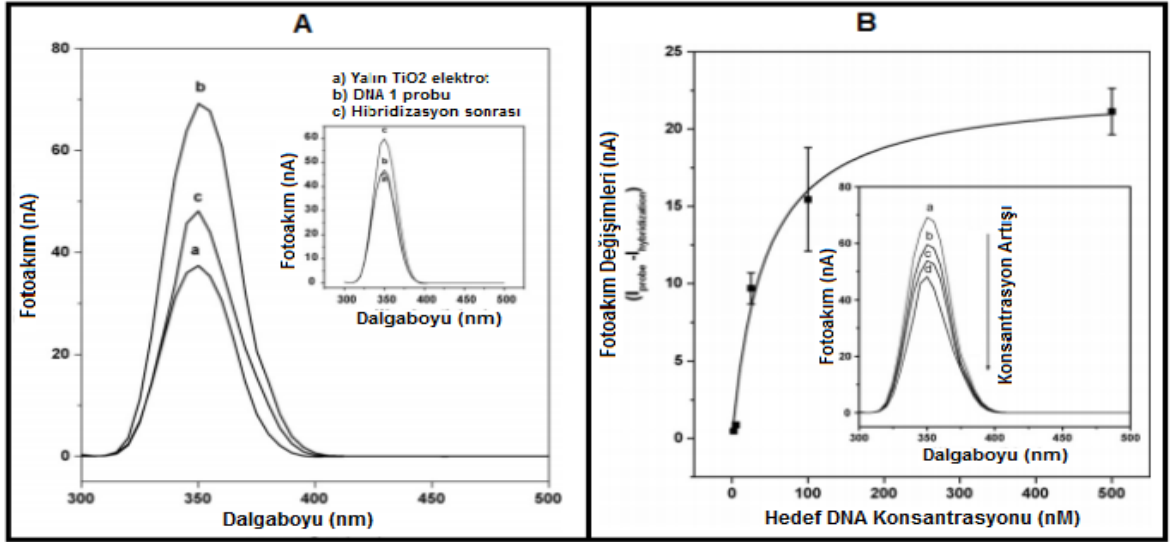
2.4. Fotoelektrokimyasal DNA Biyosensörleri

Benzer mekanizmayla anorganik yarıiletken nanomateryaller kullanılarak, fotoelektrokimyasal nükleik asit biyosensörleri de geliştirilmiştir (Tokudome ve ark., 2005; Lu ve ark., 2008b; Xu ve ark., 2008; Fan ve ark., 2010; Ferancova ve ark., 2010; Fan ve ark., 2014). Bu çalışmaların birinde tiyol grubu içeren bir DNA zinciri (SH-5'-GGG AAA AGG AAT TCG AAA AAA AGG GG-3', DNA1) kendiliğinden oluşmalı tek tabaka yöntemiyle (self-assembled monolayer, SAM) sentezlenen Au nanopartikül (AuNP) yüzeylerine tutturulmuş ve bu AuNPs'lerde TiO_2 tutturulmuş FTO elektrot yüzeyine modifiye edilmiştir. Modifikasyona ve fotoelektrokimyasal DNA biyosensör mekanizmasına ilişkin şematik bir gösterim Şekil 2.20'de verilmiştir (Lu ve ark., 2008b).



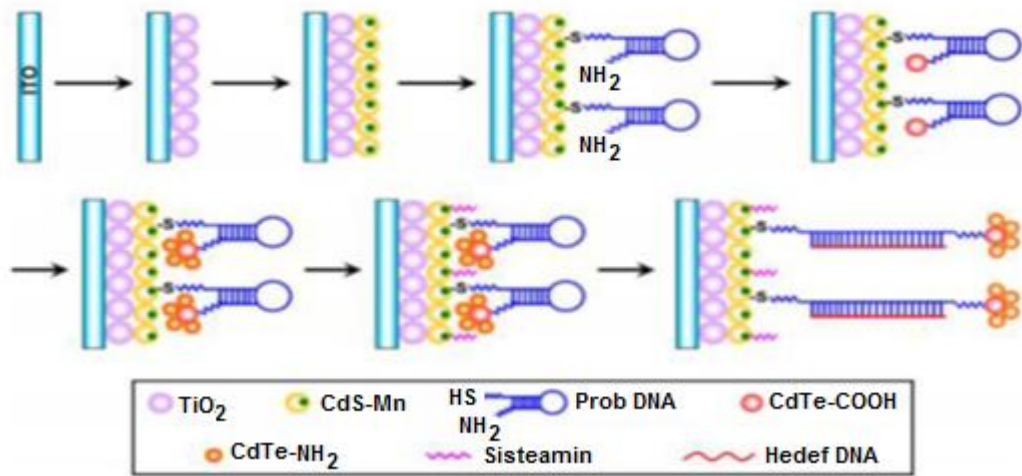
Şekil 2.20. a) DNA1-AuNP modifiye TiO₂/FTO elektrodun hedef DNA için hazırlanması
b) Fotoelektrokimyasal DNA biyosensör mekanizması (Lu ve ark., 2008b)'den modifiye edilmiştir

Daha sonra değişen dalga boyuna bağlı fotakım izlenerek fotoelektrokimyasal DNA biyosensörü tasarlanmıştır. Önce TiO₂/FTO elektrodun, ardından DNA1 tutturulmuş AuNPs-DNA/TiO₂/FTO'nun ve sonrasında bu elektrodun tamamlayıcı tiyol içeren DNA (komplementer DNA, SH-5'-CC CCT TTT TTT CGA ATT CCT TTT CCC-3', cDNA) ile hibridizasyonundan sonra akım-dalga boyu eğrisi alınarak fotoelektrokimyasal DNA biyosensörü tasarlanmıştır. Elde edilen eğriler Şekil 2.21A'da verilmiştir (Lu ve ark., 2008b). Şekilden görüldüğü gibi TiO₂'in yaklaşık 350 nm'de bir fotoakım verdiği (Şekil 2.21A/a eğrisi), AuNPs-DNA1 bağlandığında ise bu akımın arttığı (Şekil 2.21A/b eğrisi) ve son olarak hedef cDNA ile hibridizasyonu sonrası DNA1-AuNPs'e göre akımın azaldığı (Şekil 2.21A/c eğrisi) gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre hedef DNA ile hibridizasyonu sonrası akımdaki azalışa bağlı olarak fotoelektrokimyasal DNA biyosensörünün geliştirildiği rapor edilmiştir. Kıyaslama yapmak amacıyla da AuNPs içermeyen sadece TiO₂ ile modifiye elektrotlarla da benzer deneyler yapılmış ancak aynı sonuçlar elde edilememiştir. Son olarak artan cDNA derişimi ile hibridizasyon sonucu AuNPs-DNA/TiO₂/FTO da elde edilen fotoakım dalga boyu grafiği ve derişim akım derişimi grafiği Şekil 2.21B'de verilmiştir. Şekilden artan hedef cDNA ile akımın azaldığı ve fotoelektrokimyasal DNA biyosensörünün gerçekleştirilebileceği görülmektedir.



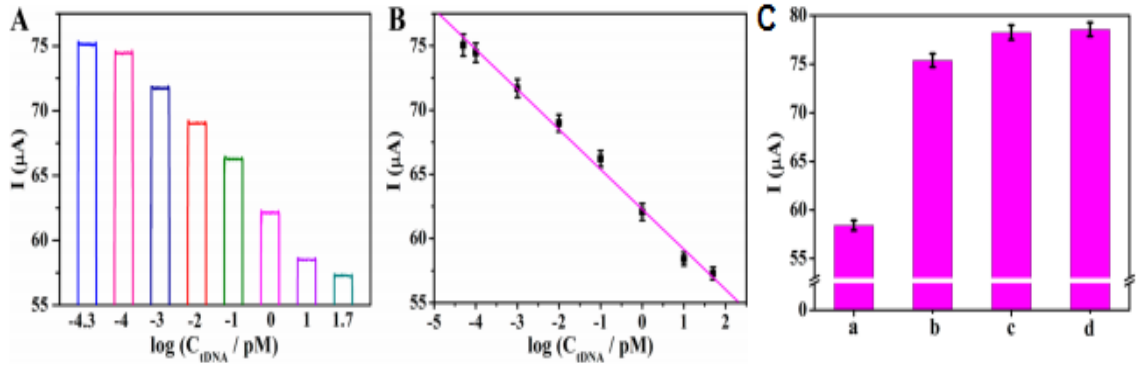
Şekil 2.21. A)TiO₂/FTO elektrodun a) prob yokken b) AuNPs-DNA1 prob modifiye edildiğinde c) b + hedef cDNA ile hibridizasyonundan sonra elde edilen fotoakım spektrumları İç kısım: AuNPs yokken TiO₂ için elde edilen fotoakım spektrumları B) Fotoakım değişiminin hedef DNA derişimi ile değişim grafiği ve bu grafiğe ait fotoakım spektrumları

Başka bir çalışmada ITO elektrot yüzeyine sırasıyla TiO₂, CdS:Mn nanokompoziti, Prob heparin DNA ve bu prob DNA'ya da CdTe-COOH ve CdTe-NH₂ immobilize edilmiş ve hedef DNA ile hibridizasyonuna bağlı fotoelektrokimyasal DNA biyosensörü geliştirilmiştir. Modifikasyona ait şematik bir gösterim Şekil 2.22'de verilmiştir (Fan ve ark., 2014).



Şekil 2.22. Heparin DNA fotoelektrokimyasal sensörü için kullanılan modifiye elektrodun hazırlanma prosedürü (Fan ve ark., 2014)'den modifiye edilmiştir

Prob DNA bağılı modifiye ITO elektrodun yüzeyi ışıklandırıldığında büyük bir fotoakım oluştuğu ancak ortama hedef DNA ilave edilip hibridizasyonu sağlandığında bu akımın azaldığı ve dolayısıyla da böyle bir fotoelektrokimyasal DNA biyosensörünün geliştirildiği rapor edilmiştir. Artan hedef DNA derişimine karşı elde edilen akım zaman eğrileri, kalibrasyon eğrisi ve modifiye elektrodun tamamlayıcı DNA, tek bazı değişik DNA ve tamamlayıcı olmayan DNA ile hibridizasyonu sonrası elde edilen yanıtları Şekil 2.23’de verilmiştir. Şekil 2.23C’de görüldüğü gibi hedef DNA ile fotoakım belirli bir miktar azalırken diğerleri pek azalmamıştır (Fan ve ark., 2014).



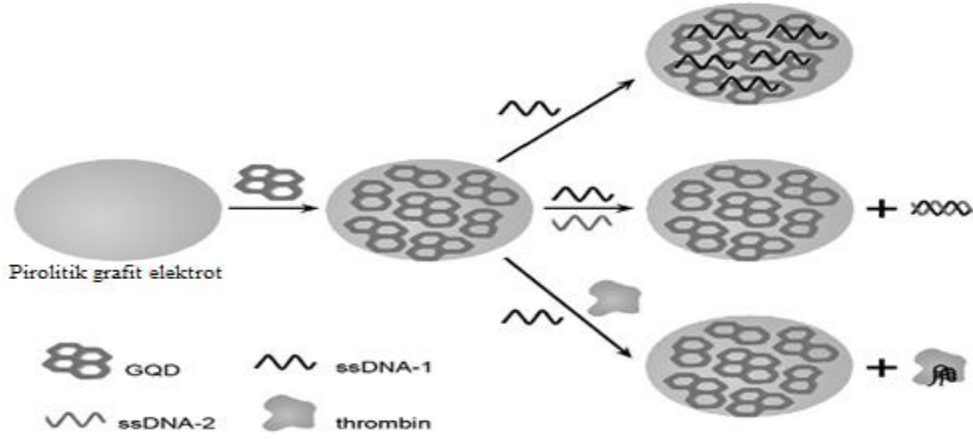
Şekil 2.23. A) Hedef DNA derişimi ile elde edilen fotoakım grafiği B) Derişim –akım değişim grafiği C) Modifiye elektrodun a) Hedef DNA b) Tek baz değişimi DNA c ve d) Tamamlayıcı olmayan DNA ortamındaki fotoakım değişimleri

Zhao ve arkadaşları tek zincirli DNA (ssDNA) ile grafen materyali arasında güçlü etkileşimden yararlanarak, grafen kuantum nokta modifiye pirolitik grafit elektrot (PG) prob olarak ssDNA molekülleri kullanıp elektrokimyasal biyosensör tasarlamışlardır.

Prob molekülleri elektrot yüzeyine tutunduğunda, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ile elektrot arasındaki elektron transferine engel olacaktır. Ancak ortama hedef DNA veya protein ilave edildiğinde ssDNA grafen yerine bu hedefe bağlanacak böylece $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ’e ait pik akımlarında artış gözlenecektir. Şekil Şekil 2.24’de modifiye elektrotun hazırlanma aşamaları verilmiştir (Zhao ve ark., 2011).

ss-DNA 1’e ait baz dizisi: 5’ - TCTCTCAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT -3’.

ss-DNA 2 baz dizisi: 5’- AG TCA CCC CAA CCT GCC CTA CCA CGGACT GAG AGA -3’.



Şekil 2.24. PG elektrotun modifikasyon şeması (Zhao ve ark., 2011)'den modifiye edilmiştir

PG elektrot yüzeyine 10 µL 15 mg/L grafen kuantum noktalar (GKN) ilave edilerek modifiye elektrot hazırlanmıştır.

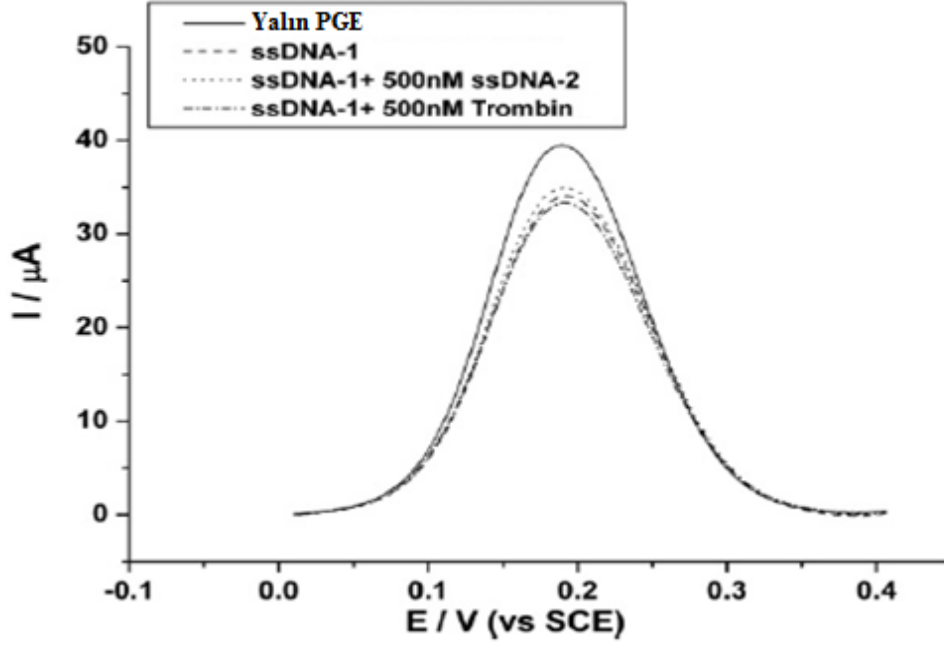
GKN modifiye elektrot yüzeyine ssDNA-1 immobilize etmek için elektrot 500 nM ssDNA-1 içeren 70 µL 10 mM Tris-HCl tamponuna daldırılmıştır. Elektrokimyasal ölçümler için istenen miktarda ssDNA-2 ve trombin ilk olarak ssDNA-1 içeren çözeltiye eklenmeli ve immobilizasyondan önce 1 saat boyunca inkübe edilmelidir.

Elektrokimyasal ölçümler 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ içeren pH 6,0; 10 mM Tris-HCl tamponunda diferansiyel puls voltammetrisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Ortamdaki hedef miktarı arttırıldığında pik akımında artış gözlenmiştir. Ortamdaki hedef ssDNA miktarı arttırıldığında daha fazla hibridizasyon meydana gelmiş, modifiye elektrot yüzeyine bağlı ssDNA miktarı azalacağından pik akımında artış gözlenmiştir.

Çalışmada kullanılan ssDNA probu aynı zamanda trombin aptameri olduğundan aynı biyosensör trombin tayini için de kullanılmıştır.

Şekil 2.25'de yalın pirolitik grafit elektrot kullanılarak ölçüm alınmış ve yalın elektrot ile alınan sonuçlardan prob ssDNA'nın hedef ssDNA veya trombin ile hibridizasyonunu ayırd edemediği gözlenmiştir (Zhao ve ark., 2011).



Şekil 2.25. Yalın pirolitik grafit elektrot ile alınmış DPV sonuçları. Yalın elektroda ssDNA-1 immobilize edilmiş ve ssDNA-2 ve trombinle inkübe edilmiştir (Zhao ve ark., 2011) 'dan modifiye edilmiştir

Sonuçta grafit kuantum noktalar kullanılarak daha duyar, seçici elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir (Zhao ve ark., 2011).

Bu çalışmalar dışında kuantum noktaların kullanıldığı fotoelektrokimyasal sensörlerin geliştirildiği birçok çalışma mevcuttur. Sonuç olarak kuantum nokta modifiye elektrotların son yıllarda elektrokimyasal sensör ve fotoelektrokimyasal sensör alanlarında birçok çalışmada kullanıldığı ve bu yöndeki çalışmaların her geçen gün artacağı sonucu ortaya çıkmaktadır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Kimyasallar

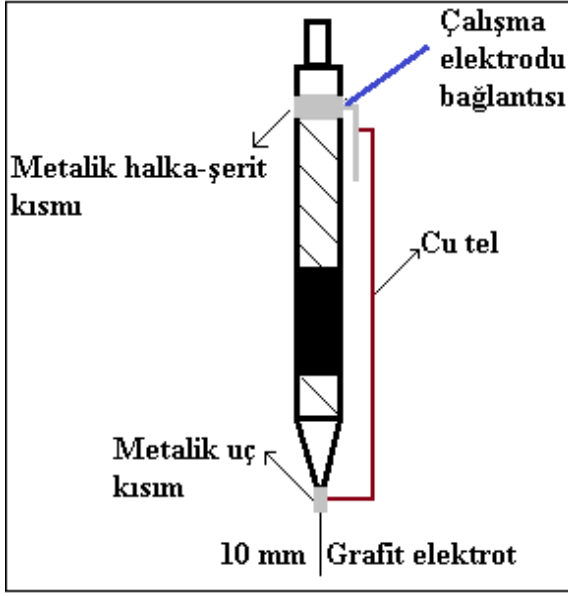
Sodyum hidroksit (NaOH), Sodyum tiosülfat pentahidrat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Çinko klorür (ZnCl_2), Etilen diamin tetraasetik asit'in (EDTA) disodyum tuzu ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Titriplex III, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Potasyum ferrosiyanyür trihidrat ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ve Potasyum ferrisiyanür ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), % 96'lık etil alkol, orto-fosforik asit (H_3PO_4 , % 85), Hidroklorik asit (HCl, % 37), Borik asit (H_3BO_3), alümina bulamaç (1,0 μm , 0,33 μm ve 0,05 μm), Nafion 117 çözeltisi (düşük alifatik alkol ve su karışımında yaklaşık %5'lik), Alkol dehidrogenaz (Alcohol dehydrogenase, *Saccharomyces cerevisiae*, 7,5 KU), glukoz dehidrogenaz (Glucose dehydrogenase, *Pseudomonas sp.*, 340 U/mg protein), PAMAM (Metanolde %10, PAMAM dendirmer, ethylene daimine core, generation 4,0 solution, $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2]:(\text{G}=4)$; dendri PAMAM(NH_2)₆₄) Aldrich firmasından, Nikotinamit adenin dinükleotidin indirgenmiş disodyum tuzu trihidrat (NADH-Na_2 , $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{O}_{14}\text{N}_7\text{P}_2\text{Na}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) Alfa-Aeser firmasından; Nikotinamit adenin dinükleotidin indirgenmiş disodyum tuzu (NADH-Na_2 , $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{O}_{14}\text{N}_7\text{P}_2\text{Na}_2$) Ambresco firmasından; NaNAD^+ , $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{NaO}_{14}\text{P}_2$), merkaptto asetik asit (HSCH_2COOH), D-(+)-glukoz ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) Sigma firmasından; sığır serum albumini (Albumin, from Bovine serum, BSA), glutaraldehit (GA, 25% w/w suda), Potasyum Klorür (KCl) Carlo Erba firmasından, Kadmiyum klorür hemipentahidrat ($\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$) Acros firmasından; multi-walled karbon nanotüp (MWCNT) Dropsens firmasından temin edilmiştir. İnsan Popilloma virüsüne ait (Human Popilloma virus, HPV) tek sarmallı DNA dizileri ise (Prob DNA: 5'-GTA TCT ACC ACA GTA ACA AA-3'; Hedef DNA (tamamlayıcı, DNA): 5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT AC-3; tek dizisi değişik DNA: 5'-TTT GTT ACT GGG GTA GAT AC-3; Hedef dışı DNA (tamamlayıcı olmayan, DNA): 5'-GAA TAT GAT TTA CAG TTT ATT TTT-3') Integrated DNA Technologies (IDT) firmasından temine edilmiştir. 0,5 mm çapındaki kalem uçlar ise TOMBOW marka olacak şekilde kırtasiyelerden satın alınmıştır.

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Döngüsel voltammetrik, impedans ve amperometrik deneyler, geleneksel üçlü elektrot sistemi kullanılarak oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Pt tel yardımcı elektrot, (BASi MW-1032 Pt tel, 7,5 cm uzunluğunda ve 0,5 mm çapında), karşılaştırma elektrodu Ag/AgCl/(doygun KCl) elektrot (BASi RE-5B, 7,5 cm uzunluğunda ve 6,0 mm iç çapında)

ve çalışma elektrodu olarak camımsı karbon elektrot (BASi MF2012 glassy carbon electrode GCE, çapı: 3,0 mm) ile kalem grafit elektrot (Pencil Graphite Electrode, PGE) kullanıldı. 0,5 mm çapında ve 60,0 mm uzunluğunda 0,5 kurşun kalem uçları (Ultra-Polymer, 2B, TOMBOW Japonya) satın alındı. 0,5 kalem (Model T, Rotring, Almanya) kalem uçlarını tutmak için mekaniksel olarak kullanıldı. Elektriksel iletkenliği sağlamak için kalem uçlarını tutan gövdenin metalik kısımları (uç kısmı ve arka tarafın basılı kısmında ceplere koymaya yarayan halka ve şerit şeklindeki metalik kısım) lehimlenerek metalik bir telle birbirine bağlantısı sağlandı (Şekil 3.1.).

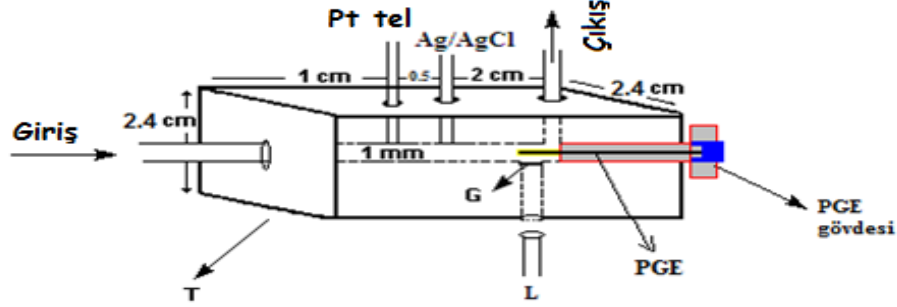
Üçlü elektrot sistemini tamamlamak üzere elektrokimyasal cihazın çalışma elektroduna ait krokodil denen bağlantı ucu hazırlanan kalemin halka kısmına bağlandı böylece üçlü elektrot sistemi tamamlandı. Kalem uçlarının 10,0 mm'lik kısmı destek elektrolite temas edecek şekilde bir cetvelle ölçülerek, kalem gövdesi PGE için özel olarak tasarlanan elektrokimyasal hücreye daldırıldı. Böylece döngüsel voltammetrik ve impedans eğrilerinin kaydedilmesi aşamalarında, her bir ölçüm için toplam ucun 10,0 mm'lik bir kısmı çözeltiye daldırıldı (Alanı:15,90 mm²). FIA sisteminde de yine ucun 10,0 mm'lik kısmı akışkan sistemde olacak şekilde monte edildi



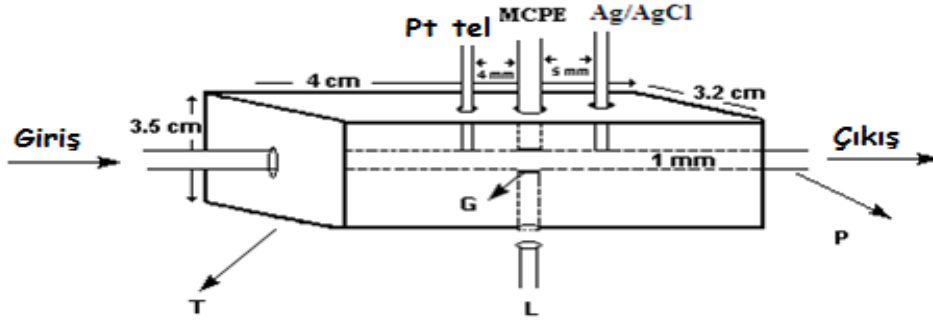
Şekil 3.1. PGE'nin tasarımına ait şematik gösterim

Tüm elektrokimyasal ölçümler Iviumstat ve Compactstat Electrochemical Interface (Ivium Technologies, Eindhoven, the Netherlands) ve Autolab PGSTAT 128N Potentiostat/Galvanostat cihazları kullanılarak gerçekleştirildi. Bütün çözeltilerin pH'ı kombine cam elektrodu (Hanna HI 1332) ile Hanna HI 221 pH metre kullanılarak ölçüldü. Ölçüm öncesi cam elektrodun standart tampon çözeltilerle kalibrasyonu yapıldı. GCE yüzeyinin temizlenmesinde ve bazı çözeltilerin hazırlanmasında ultrasonik banyo (Bandeline Sonorex) kullanıldı. Fotoelektrokimyasal deneyleri gerçekleştirmek için, Fiber optikli 24 V, 250 W halojen lamba (fiber optic illuminator 250 W halogen bulb with Foi-5-light guide, Titan Tool Supply Inc., USA) ile çalışma elektrot yüzeyi ışıklandırıldı. FIA deneylerini gerçekleştirmek için sekiz kanallı peristaltik pompa (Ismatec, Ecoline peristaltic pump with polyethylene tubing (0,75 mm i.d.), bir enjeksiyon vanası (Rhedoyne 8125 sample injection valve) ve fotoelektrokimyasal akış hücreleri kullanıldı. Basit bir şeması Şekil 3.2'de verilen fotoelektrokimyasal akış hücresi ilk defa PGE için tasarlanmış ve Teflondan yaptırılmıştır. Dolayısıyla PGE için bu yeni fotoelektrokimyasal akış hücresi (Şekil 3.2.) kullanılırken, MWCNT modifiye GCE için de daha önce teflondan yaptırılan fotoelektrokimyasal akış hücresi (Şekil 3.3.) kullanılmıştır. Çözeltileri hazırlamak için kullanılan deiyonize su Elga Option Q7B (18,2 MΩ cm) cihazından sağlanmıştır. MWCNT modifiye GCE hazırlanması esnasında IR lamba CNT'lerin kurutulması işleminde kullanıldı. SEM görüntüleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi'nden alınmıştır. Perkin elmer spektrofotometre cihazı UV-Vis

ölçümlerinde kullanıldı. Enzim ve bazı malzemelerin saklanması için -20°C ve $+4^{\circ}\text{C}$ ye uygun derin dondurucu ve buzdolabı kullanıldı. Voltammetrik çalışmalarda O_2 gazını uzaklaştırmak için Ar gazı kullanıldı.



Şekil 3.2. PGE için FIA amperometrik ve fotoamperometrik çalışmalarda kullanılan akış hücresinin şematik gösterimi (T: teflon gövde; L: Fiber optikli Işık kaynağı; P:kolon; G:Kuartz pencere) (Sağlam ve ark., 2016)



Şekil 3.3. GCE ve GCE/MWCNT için FIA amperometrik ve fotoamperometrik çalışmalarda kullanılan akış hücresinin şematik gösterimi (T: teflon gövde; L: Fiber optikli ışık kaynağı; P: kolon; G: kuartz pencere) (Dilgin ve ark., 2003, Dilgin ve ark., 2005; Dilgin ve ark., 2006; Dilgin ve ark., 2010)

3.3. Kullanılan Çözeltiler

3.3.1. Modifiye Elektrotların Hazırlanması İçin Kullanılan Çözeltiler

0,10 M EDTA Çözeltisi: 0,93 g $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MA: 372,24 g/mol) tartılarak bir miktar deiyonize suyla çözüldü ve 25,0 mL'lik balon jöjeye deiyonize suyla tamamlandı.

0,10 M Sodyum Tiyosülfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) Çözeltisi: 0,62 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MA: 248,21 g/mol) tartılarak bir miktar kaynatılmış soğutulmuş deiyonize su ile çözüldü ve

yine kaynatılmış soğutulmuş deiyonize su ile 25,0 mL'lik balon jojenin çizgisine kadar tamamlandı. Bu çözelti günlük olarak hazırlandı.

0,1 M CdCl₂: 0,570 g CdCl₂.2.5H₂O (MA: 228,34 g/mol) tartılarak bir miktar deiyonize su ile çözüldü ve 25,0 mL'lik balon jojeye deiyonize suyla tamamlandı.

0,1 M ZnCl₂: 0,340 g susuz ZnCl₂ (MA: 136,30 g/mol) tartılarak bir miktar deiyonize su ile çözüldü ve 25,0 mL'lik balon jojeye deiyonize suyla tamamlandı.

0,1 M HCl Çözeltisi: Bir miktar deiyonize su içeren bir behere % 37'lik ve yoğunluğu 1,19 g/mL olan HCl'den, bir pipetle 8,4 mL alınıp, 1,0 L'lik balon jojeye ilave edilerek deiyonize su ile balon jojenin çizgisine kadar tamamlandı.

0,10 M NaOH Çözeltisi: 4,0 g NaOH (40 g/mol) tartılarak bir miktar deiyonize su ile çözüldü ve 1,0 L'lik balon jojeye deiyonize suyla tamamlandı.

0,10 M KCl içeren Britton Robinson Tampon Çözeltisi (Britton Robinson Buffer Solution, BRBS, pH:7,0): pH 7,0 olan BRBS hazırlamak için aşağıdaki iki çözeltinin uygun karışımları karıştırılarak elde edildi. Bu çözelti PGE elektrotların koşullandırılması esnasında kullanıldı.

0,10 M KCl içeren 0,04 M Britton Robinson (BR) Çözeltisi: % 85'lik yoğunluğu 1,71 g/mL olan H₃PO₄'den, bir pipetle 2,7 mL, % 96'lık yoğunluğu 1,05 g/mL olan CH₃COOH'den bir pipetle 2,4 mL alınıp, H₃BO₃ katısından 2,47 g ve KCl'den 7,46 g tartılıp az miktar deiyonize su içeren beherde çözüldü ve 1,0 L'lik balonjojeye ilave edilerek yine deiyonize su ile balonjojenin çizgisine kadar tamamlandı.

0,10 M KCl içeren 0,20 M NaOH Çözeltisi: NaOH'den 4,0 g ve KCl'den 3,73 g tartılıp az miktar deiyonize su ile çözüldükten sonra 500,0 mL'lik balonjojeye ilave edilerek yine deiyonize su ile balonjojenin çizgisine kadar tamamlandı.

3.3.2. Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal İmpedans Spektrum ve Döngüsel Voltammogramlarının Kaydedilmesinde Kullanılan Redoks Prob Çözeltisi

0,10 M KCl içeren 1,0x10⁻²M K₃Fe(CN)₆ + 1,0x10⁻²M K₃Fe(CN)₆ Çözeltisi: İlk olarak 0,329 g K₃Fe(CN)₆, 0,422 g K₄Fe(CN)₆.3H₂O ve 0,746 g KCl (MA: 74,55 g/mol) tartılarak, bir miktar deiyonize suyla çözümlenerek 100,0 mL'ye saf su ile tamamlandı. Bu çözelti elektrot modifikasyonundan sonra modifiye elektrotların karakterizasyonu için impedans eğrilerini ve döngüsel voltammogramları kaydetmede destek elektrolit olarak kullanıldı.

3.3.3. NADH'nin elektrokatalik ve fotoelektrokatalitik yükseltgenmesinde kullanılan çözeltiler

0,10 M KCl içeren 0,10 M HCl Çözeltisi: 7,46 g KCl içeren bir behere bir miktar deiyonize su ilave edildikten sonra, %37'lik ve yoğunluğu 1,19 g/mL olan HCl'den, bir pipetle 8,4 mL alınıp 1,0 L'lik balon jöjeye ilave edilerek, deiyonize su ile balon jöjenin çizgisine kadar tamamlandı.

0,10 M KCl içeren 0,10 M NaOH Çözeltisi: 7,46 g KCl ve 4,0 gr NaOH (MA:40 g/mol) tartılarak bir miktar deiyonize su ile çözüldü ve 1,0 L'lik balon jöjeye deiyonize suyla tamamlandı.

0,10 M KCl İçeren Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate buffer solution, PBS, pH:7,0): 1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MA:156,02 g/mol), 1,78 g ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MA:177,99 g/mol), 7,46 g KCl tartıldı ve belli bir miktar deiyonize suyla çözüldükten sonra 1,0 litreye deiyonize suyla tamamlandı. 0,10 M KCl içeren 0,10 M NaOH veya 0,10 M KCl içeren 0,10 HCl çözeltisi ile pH'ı 7,0'ye ayarlandı. Bu çözelti NADH'nin modifiye ve yalın elektrotlardaki döngüsel voltammogramlarını kaydetmek için kullanıldı.

Stok NADH çözeltisi (0,05 M): 0,0348 g Na_2NADH (MA:709,40 gr/mol) tartılarak 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS ile 1,0 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti günlük kullanılmak şartı ile buzdolabında +4 °C'de muhafaza edildi ve çözeltinin UV-Vis Spektrofotometre cihazı kullanılarak 340 nm'de absorbansı ölçülerek derişimde düzeltme faktörü uygulandı.

3.3.4. FIA sisteminde Amperometrik NADH Çalışmaları için kullanılan çözeltiler

1,0 M KCl içeren PBS çözeltisi (pH 7,0): Döngüsel voltammetrik çalışmalarda 0,10 M KCl içeren PBS kullanılırken, FIA amperometrik çalışmalarda Ag/AgCl tel direk kullanıldığından akışkan sistemde 1,0 M KCl olacak şekilde kullanılmıştır. Böylece FIA sisteminde Ag/AgCl (1,0 M KCl) referans elektrodu kullanılmış oldu. 1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MA:156,02 g/mol), 1,78 g ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MA:177,99 g/mol), 74,6 g KCl tartıldı ve belli bir miktar deiyonize suyla çözüldükten sonra 1,0 litreye deiyonize suyla tamamlandı. 1,0 M KCl içeren 0,10 M NaOH veya 1,0 M KCl içeren 0,10 HCl çözeltisi ile pH istenilen değere ayarlandı. Bu çözelti NADH'nin modifiye ve yalın elektrotlar kullanılarak FIA sisteminde akım zaman eğrilerini kaydetmek için kullanıldı.

Standart NADH Çözeltileri: Daha önceki kısımda hazırlanan stok 0,05 M NADH çözeltilerinden uygun seyreltmeler yapılarak ara stok çözeltileri ve ara stok çözeltilerinden de standart çözeltiler 1,0 M KCl içeren pH 7,0 fosfat tamponu ile hazırlandı.

3.3.5. Glukoz dehidrogenaz enzim (GDH) immobilizasyonu ve GDH'a bağlı biyosensör çalışmaları için kullanılan çözeltiler

Stok Glukoz Çözeltisi (1,0M): 1,0 M'lık stok glukoz çözeltisi günlük taze olacak şekilde pH 7,0 PBS'de hazırlandı. Bu amaçla 0,90 gr D-(+)-glukoz tartılarak bir miktar 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS ile çözüldü ve 5,0 mL'lik balonjojeye yine aynı tampon çözeltiyle tamamlandı.

Glukoz Dehidrogenaz (GDH) Çözeltisi: 80 mg/mL (PGE yüzeyine immobilizasyonu için) ve 20 mg/mL (MWCNT/GCE'ye immobilizasyonu için) olacak şekilde GDH literatürdeki prosedür (Dilgin ve Gökçel, 2015) uygulanarak, 0,10 M pH 7,0 PBS ile 1,0 mL'lik ependorf tüpünde günlük hazırlandı ve kullanımdan önce +4 °C'de buzdolabında bekletildi.

%1,0'lik Bovine Serum Albumin (BSA) çözeltisi: 10,0 mg BSA 100,0 µL 0,1 M pH 7,0 PBS ile 1,0 mL'lik ependorf tüpünde çözülerek günlük hazırlandı ve kullanımdan önce +4 °C'de buzdolabında bekletildi.

0,1 M Glutaraldehit (GA) stok çözeltisi: 189,0 µL GA çözeltisi (d:1,061 g/mL, MW:100,12 g/mol, 25% w/w yaklaşık 2,7M) 0,10 M pH 7,0 PBS ile 5,0 mL'ye seyreltildi.

20 mM GA çözeltisi: 0,10 M GA stok çözeltisinden 200,0 µL alınarak, 0,10 M pH 7,0 PBS ile 5,0 mL'ye seyreltildi.

3.3.6. GDH'ya bağlı glukoz biyosensörü için döngüsel voltammetrik çalışmalarda kullanılan destek elektrolit

Glukozun modifiye elektrotlarla döngüsel voltammogramlarının kaydedilmesinde 0,10 M KCl ve 10,0 mM NAD⁺ içeren 0,10 M PBS (pH 7,0) kullanıldı. Bu amaçla 1,56 g NaH₂PO₄.2H₂O, 1,78 g Na₂HPO₄.2H₂O, 7,46 g KCl ve 0,685 g NaNAD⁺ (MA: 685,41 g/mol) tartılarak bir miktar deiyonize suyla çözüldü ve sonra 1,0 litreye deiyonize su ile tamamlandı.

3.3.7. GDH'ya bağlı glukoz biyosensörü için FIA sisteminde amperometrik ve fotoamperometrik çalışmalarda kullanılan taşıyıcı çözelti

Glukozun modifiye elektrotlarla döngüsel voltammogramlarının kaydedilmesinde 0,10 M KCl içeren pH'ı 7,0 PBS kullanılırken, FIA sisteminde amperometrik eğrilerin kaydedilmesinde ise 1,0 M KCl içeren pH'ı 7,0 PBS kullanıldı. Bu amaçla 1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 74,55 g KCl bir miktar deiyonize suda çözülerek 1,0 litreye deiyonize suyla tamamlandı. 1,0 M KCl içeren 0,10 M NaOH veya 0,10 M HCl çözeltisi ile pH 7,0'ye ayarlandı. Bu çözelti glukozun FIA sisteminde amperometrik ve fotoamperometrik yanıtlarını elde etmek için destek elektrolit (taşıyıcı çözelti) olarak kullanıldı.

Standart Glukoz Çözeltileri (FIA amperometrik için): Stok 1,0 M glukoz çözeltilerinden uygun seyreltmeler yapılarak ara stok çözeltileri ve ara stok çözeltilerinden de standart çözeltiler 1,0 M KCl ve 10,0 mM NaNAD^+ içerecek şekilde 0,10 M pH 7,0 PBS ile hazırlandı.

3.3.8. Alkol Dehidrogenaz Enzim (ALDH) İmmobilizasyonu ve ALDH'a bağlı biyosensör çalışmaları için kullanılan çözeltiler

Stok Alkol Çözeltisi (1,0M): 1,0 M'lık Stok etil alkol çözeltisi günlük taze olacak şekilde pH 7,0 fosfat tampon çözeltisinde (phosphate buffer solution, PBS) hazırlandı. Bu amaçla 3,4 mL etanol alınıp 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS ile 5 mL'lik balon jojeye tamamlandı.

Alkol Dehidrogenaz (ALDH) Çözeltisi: 100 mg/mL olacak şekilde hem PGE hem de MWCNT/GCE yüzeyine immobilizasyonu için 0,1 M pH 7,0 PBS ile 1 mL'lik ependorf tüpünde günlük hazırlandı ve kullanımdan önce +4 °C'de buzdolabında bekletildi.

3.3.9. ALDH'ya bağlı etanol biyosensörü için döngüsel voltammetrik çalışmalarda kullanılan destek elektrolit

Etanolün modifiye elektrotlarla döngüsel voltammogramlarının kaydedilmesinde 0,1 M KCl ve 10 mM NAD^+ içeren 0,1 M PBS (pH 7,0) kullanıldı. Bu amaçla $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KCl ve NaNAD^+ 'nın uygun miktarları tartılarak 1 litreye saf su ile tamamlandı.

3.3.10. ALDH'ya bağlı Etanol Biyosensörü için FIA sisteminde Amperometrik ve Fotoamperometrik Çalışmalarda Kullanılan Taşıyıcı Çözelti

1,0 M KCl (Döngüsel voltammogramların kaydedilmesinde 0,1 M KCl kullanıldı) içeren PBS (pH 7,0)

NaH₂PO₄ ve Na₂HPO₄'ın belli miktarlarının çözölüp litreye tamamlanıp ortamda 1,0 M KCl olacak şekilde belli miktar KCl tartılmasıyla hazırlandı. 0,1 M NaOH veya HCl çözeltisi ile pH 7,0'ye ayarlandı. Bu çözelti etanolün FIA sisteminde amperometrik ve fotoamperometrik yanıtlarını elde etmek için destek elektrolit (taşıyıcı çözelti) olarak kullanıldı.

Standart Etanol Çözeltileri: Stok 1,0 M etanol çözeltilerinden uygun seyreltmeler yapılarak ara stok çözeltileri ve ara stok çözeltilerinden de standart çözeltiler 1,0 M KCl ve 10 mM NAD⁺ içerecek şekilde 0,1 M pH 7,0 PBS ile hazırlandı.

3.4. Modifiye Elektrotların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

3.4.1. Kuantum Nokta (QD) Modifiye Elektrotların Hazırlanması

Tüm voltammetrik çalışmalarda üçlü elektrot sistemi kullanıldı. Çalışma elektrodu camımsı karbon elektrot (GCE) veya kalem grafit elektrot (PGE), karşılaştırma elektrodu: Ag/AgCl/KCl_(doygun), yardımcı elektrot: Pt tel kullanıldı. GCE kullanılmadan önce ilk olarak 1,0 µm ardından 0,3 µm ve son olarak 0,05 µm alümina ile parlatıldı daha sonra 3 dk sırasıyla etanol ve saf su içerisinde ultrasonik banyoda bekletildi. Kalem grafit elektrotlar ise her seferinde kullanılıp atıldı.

CdS nanokompozit film modifiye elektrotlar Qian ve arkadaşları (2010) ile Lu ve arkadaşlarının (2008) önerdiği gibi hem GCE hem de PGE yüzeyinde gerçekleştirildi. Bu amaçla, daha önce yine Qian tarafından optimize edilen miktarlarda 15,0 mM Cd²⁺, 8,0 mM S₂O₃²⁻, 8,0 mM EDTA içeren destek elektrolit ortamına üçlü elektrot daldırılarak, hücreye 15 °C'de Ag/AgCl/KCl_(doygun) elektrota karşı 800 s, -1,06 V GCE için ve PGE için -1,0 V'luk potansiyel uygulandı. CdS-ZnS nanokompozit film modifiye elektrotlar için CdS elektrot yüzeyine biriktirildikten sonra elektrot yüzeyine 15,0 mM Zn²⁺, 8,0 mM S₂O₃²⁻, 8,0 mM EDTA içeren destek elektrolit ortamında, 15 °C'de Ag/AgCl/KCl_(doygun) elektrota karşı 1000 s, -1,06 (GCE için) ve -1,0 V'luk (PGE için) potansiyel uygulandı. Hazırlanan elektrotlar saf suyla yıkandıktan sonra elektrotlar elektrokimyasal yöntemlerle karakterize edildi. Elektrot yüzeyine ilk olarak CdS biriktirildi ancak FIA'da yaşanan sorunlar sebebiyle CdS ile kaplanan yüzeye ZnS de biriktirilerek modifikasyon işlemi

gerçekleştirildi.

ALDH enzimi için hazırlanan elektrotun modifikasyonu ise GDH enzimi tutturulan elektrottan farklı olarak destek elektrolit ortamında CdS bulunmaksızın gerçekleştirildi.

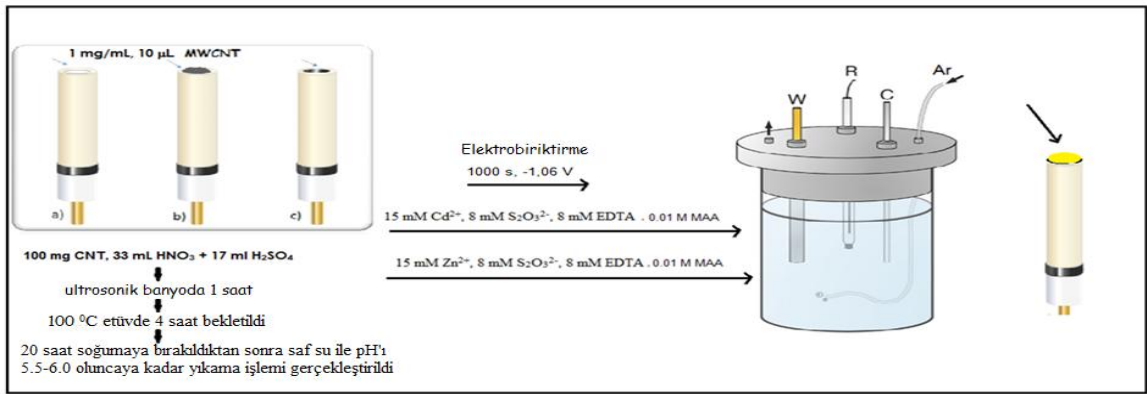
CdS modifiye PGE: Kalem grafit elektrotlar ön temizleme işlemine tabi tutularak ve tutulmaksızın iki şekilde kullanıldı. Öncelikle kalem grafit elektrot yüzeyindeki kimi safsızlıkları uzaklaştırmak ve yüzeyi aktif hale getirmek amacıyla kullanılacak tüm PGE'ler pH 7,0 BRT ortamında +1,45 V'da 60 s amperometrik yöntem uygulanarak koşullandırıldı (K.PGE). Saf suyla yıkandıktan sonra yüzeyine CdS biriktirmek için, Qian ve arkadaşları (2010) ile Lu ve arkadaşlarının (2008) önerdiği prosedür uygulandı. CdS biriktirme işlemi MAA varlığında bahsedilen prosedür kullanılarak gerçekleştirildi. Kalem grafit elektrotlar ise her seferinde kullanılıp atıldı. Elde edilen elektrotlar K.PGE/CdS ve K.PGE/CdS-MAA olarak tanımlandı. PGE'nin hazırlanmasına ait şematik gösterimler daha sonraki aşama olan enzim immobilizasyon kısmında verilmiştir.

Benzer şekilde herhangi bir koşullandırılma yapılmaksızın da CdS, PGE yüzeyinde yukarıda bahsedilen prosedür kullanılarak biriktirildi. Elde edilen elektrotlar PGE/CdS ve PGE/CdS-MAA olarak tanımlandı. Kalem grafit elektrotlar ise her seferinde kullanılıp atıldı.

CdS modifiye GCE/MWCNT: MWCNT kullanılmadan önce derişik asitte koşullandırıldı. Bu amaçla yaklaşık 100 miligram CNT tartılarak üzerine 33 mL HNO₃ + 17 mL H₂SO₄ eklenip 1 saat ultrasonik banyoda bekletildikten sonra 100⁰C'de 4 saat bekletildi. 20 saat kadar soğumaya bırakıldıktan sonra süzülerek süzüntü pH'ı yaklaşık 5,5-6,0 oluncaya kadar saf su ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Son olarak etüvde 80⁰C'de kurutuldu. Kurutulan karbon nanotüpün 1 mg/mL olacak şekilde DMF'de bir süspansiyonu hazırlandı. Ultrasonik banyoda yaklaşık 30 dk bekletildikten sonra 10 µL'lik süspansiyon temizlenmiş GCE yüzeyine damlatılarak IR lamba altında kurutuldu. Böylece MWCNT-GCE kullanıma hazır hale getirilmiş oldu. CdS yukarıda bahsedilen prosedürle MWCNT-GCE yüzeyine MAA varlığında biriktirildi. Hazırlanan elektrotlar MWCNT-GCE-CdS-MAA olarak tanımlandı. QD modifiye GCE/MWCNT'nin hazırlanmasına dair tüm prosedürler şematik olarak Şekil 3.4.'de verilmiştir.

Yukarıda bahsedilen prosedür ve GCE için uygulanan -1,06 V'luk potansiyel kullanılarak MAA varlığında ve yokluğunda GCE/MWCNT yüzeyine CdS biriktirildi. Hazırlanan elektrotlar GCE/MWCNT/CdS ve GCE/MWCNT/CdS-MAA olarak tanımlandı.

CdS modifiye elektrot yüzeylerine ZnS biriktirilmesi: FIA Sisteminde NADH'nin fotoamperometrik çalışmalarının gerçekleştirilmesi sırasında yüzeye biriken CdS'ün akış nedeniyle zamanla yüzeyden sıyrıldığı ve uzun süre ışığa maruz kalması nedeniyle de fotobozunmaya uğradığı ve etkinliğini yitirdiği tespit edilmiştir. Bu olumsuzluğu gidermek için, elektrot yüzeyi CdS ile kaplandıktan sonra yüzeye ZnS aynı koşullarda kaplanmış ve son olarak % 0,025 nafyondan (metanolde) 3 µL GCE/MWCNT-CdS-ZnS-MAA yüzeyine damlatılmış, PGE-CdS-ZnS-MAA ise 15 dk Nafion çözeltisinde bekletilip alındıktan sonra, çözücü buharlaşana kadar buzdolabında +4 °C'de bekletilmiştir. Bu elektrotlar GCE/MWCNT-CdS-ZnS-MAA-Nf ve PGE/CdS-ZnS-MAA-Nf olarak tanımlandı. Bu işlemlerle daha kararlı sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 3.4. GCE/MWCNT/CdS-ZnS'ün hazırlanma prosedürlerine ait şematik bir gösterim

3.4.2. Modifiye Elektrotların Karakterizasyonu

Hazırlanan modifiye elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonu için her bir elektrodun hem elektrokimyasal impedans spektrumları hem de döngüsel voltammogramları kaydedildi. Bu sebeple 0,1 M KCl içeren 1×10^{-2} M K₃Fe(CN)₆ ve 1×10^{-2} M K₄Fe(CN)₆ destek elektrolit ortamında her bir elektrodun elektrokimyasal impedansları alındı. Her bir elektrot için impedans verileri kaydedilerek elde edilen Nyquist eğrileri değerlendirildi. Aynı elektrotların 50 mV/s tarama hızlarında aynı destek elektrolit ortamında döngüsel voltammogramları alınarak Fe³⁺/Fe²⁺'nin pik potansiyelleri kaydedildi ve pik potansiyellerinin modifikasyon işlemi ile değişip değişmediği incelendi. Modifiye elektrotlarla karşılaştırma yapabilmek için, impedans eğrileri ve döngüsel voltammogramlar yalnız GCE, PGE ve GCE/MWCNT için de alındı.

Ayrıca merkapto asetik asitin kuantum noktaları daha kararlı hale getirdiği literatürde belirtildiğinden (Salimi ve ark., 2013) kuantum nokta modifiye elektrotlar seyreltik MAA

ortamında da hazırlanarak hem impedans eğrileri hem de döngüsel voltammogramları kaydedilmiştir.

3.5. Kuantum Nokta Modifiye Elektrotlarla NADH'nin Elektrokatalitik ve Fotoelektrokatalitik Yükseltgenmesi

3.5.1. NADH'nin Yükseltgenmesine Ait Voltammetrik Çalışmalar

QD-modifiye elektrotlar ve yalın modifiye edilmemiş elektrotların her biriyle NADH'nin yükseltgenmesi döngüsel voltammetri yöntemiyle izlendi. Bu amaçla 10,0 mL 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS ortamında önce her bir elektrodun 20 mV/s tarama hızında ve -0,8 ile +0,8 V potansiyel aralığında döngüsel voltammogramı alındı. Sonra destek elektrolit ortamına 2.0 mM NADH olacak şekilde stok NADH çözeltisinden ilave edildi ve döngüsel voltammogramlar aynı koşullarda alındı. Son olarak her bir çalışma elektrot yüzeyi 250 W, 24 V fiber optikli halojen lamba ile ışıklandırılarak ışıklı ortamda da döngüsel voltammogramlar kaydedildi.

3.5.2. FIA Sisteminde Kuantum Nokta Modifiye Elektrotlarla NADH'nin Amperometrik ve Fotoamperometrik Yanıtının İncelenmesi

FIA sisteminde NADH'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenmesine yönelik çalışmaları gerçekleştirmek için, fotoelektrokimyasal bir akış hücresi GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf için de kullanıldı. Bu hücre akış yolunda üçlü elektrot sistemini içerecek ve sadece çalışma elektrodunun yüzeyine ışık düşürülecek biçimde tasarlanarak Teflon'dan yaptırılmıştır (Drop Sens). Bu akış hücresinin detayları Şekil 3.3'de verilmiştir. Ancak, PGE için Şekil 3.3'deki akış hücresi kullanılamayacağından, PGE için tasarlanarak yaptırılan fotoelektrokimyasal akış hücresi kullanılmıştır. Bu akış hücresinin detayları Şekil 3.2'de verilmiştir. NADH'nin FIA amperometrik ve fotoamperometrik çalışmalarında, 1,0 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 PBS taşıyıcı elektrolit olarak kullanıldı. 1,0 mm çapında AgCl kaplı Ag tel ve Pt tel akış hücresine doğrudan monte edildi. FIA düzeneğinin basit olarak şematik gösterimi Şekil 3.5'de verilmiştir. GCE/MWCNT Şekil 3.3'deki akış hücresine, PGE'de Şekil 3.2'deki akış hücresine monte edildikten sonra, Şekil 3.5'de gösterilen FIA sistemi kullanılarak 1,0 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış NADH çözeltisi enjekte edilerek akıma karşı uygulama potansiyeli, akış hızı, kolon boyu ve örnek yükleme hacmi parametreleri hem amperometrik hem de fotoamperometrik yöntem için optimize edilmiştir.

Her bir modifiye elektrodun uygun koşullarında yatışkın hal elde edildikten sonra farklı derişimlerde hazırlanan NADH çözeltileri sisteme en az 3 defa enjekte edilerek, pik akımına karşı derişim ilişkisi incelenmiştir. Aynı deneyler elektrot yüzeyi 250 W halojen lamba ile ışıklandırılarak fotoamperometrik olarak da gerçekleştirilmiştir. Her çalışmanın sonunda sistem, saf su geçirilerek temizlendi.

3.6. QD Modifiye Elektrotlarla Elektrokimyasal ve Fotoelektrokimyasal Biyosensör Çalışmaları

3.6.1 Kuantum Nokta Modifiye Elektrolara Dehidrogenaz Enzim İmmobilizasyonu

Dehidrogenaz enzimi olarak başlangıçta glukoz dehidrogenaz (GDH) enzimi iki farklı modifiye elektrota (K.PGE/CdS-ZnS-MAA ve GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA) farklı şekilde immobilize edilmiştir. K.PGE/CdS-ZnS-MAA yüzeyine GDH immobilizasyonu için, QD modifiye PGE 80,0 mg/mL GDH enzimi ve %1,0 BSA çözeltisi 1:1 oranında karıştırılarak 5,0 µL, ardından 20,0 mM GA çözeltisinden 4,0 µL ilave edilerek hazırlanan karışım içerisine 1 saat daldırıldı, ardından bu çözeltiden çıkarılarak buzdolabında 10 dk kuruyana kadar bekletildikten sonra kullanıma hazır hale getirildi. Elde edilen elektrot K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH olarak tanımlandı. PGE için kullanılan enzim immobilizasyon prosedürüne ilişkin şematik gösterim Şekil 3.6'da verilmiştir.

GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA yüzeyine GDH enzim ise yine 20,0 mM GA kullanılarak çapraz bağlama metodu ile immobilize edilmiştir, ancak daldırma yöntemi yerine, bu dairesel geometrili elektrot için daha uygun olduğundan damlatma yöntemi immobilizasyon için kullanılmıştır. Bu amaçla 20,0 mg/mL GDH enzimi ve %1,0 BSA çözeltisi 1:1 oranında karıştırılarak 5,0 µL, 20,0 mM GA çözeltisinden ise 4,0 µL hazırlanan elektrotların üzerine sırasıyla damlatılarak +4⁰C'de en az 4 saat kurumaya bırakıldı. Elde edilen elektrot GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH olarak tanımlandı. GCE/MWCNT için kullanılan enzim immobilizasyon prosedürüne ilişkin şematik gösterim Şekil 3.7'de verilmiştir.

K.PGE-ZnS-MAA yüzeyine ALDH immobilizasyonu için, modifiye PGE 100 mg.mL⁻¹ GDH enzimi ve %1.0 BSA çözeltisi 1:1 oranında karıştırılarak 5 µL, ardından 20 mM GA çözeltisinden 4 µL ilave edilerek hazırlanan karışım içerisine 1 saat daldırıldı, ardından bu çözeltiden çıkarılarak buzdolabında 10 dk kuruyana kadar bekletildikten sonra kullanıma hazır hale getirildi. Elde edilen elektrot K.PGE/ZnS-MAA-ALDH olarak

tanımlandı. K.PGE/ZnS-MAA-ALDH için kullanılan enzim immobilizasyon prosedürüne ilişkin şematik gösterim Şekil 3.8'de verilmiştir.

GCE/MWCNT/ZnS-MAA-PAMAM yüzeyine ALDH enzimi de GDH'da olduğu gibi 20 mM GA kullanılarak çapraz bağlama metodu ile immobilize edilmiştir. Bu amaçla yine aynı biçimde 100 mg.mL^{-1} ALDH enzimi ve %1,0 BSA çözeltisi 1:1 oranında karıştırılarak 5 μL , 20 mM GA çözeltisinden ise 4 μL hazırlanan elektrotların üzerine sırasıyla damlatılarak $+4^{\circ}\text{C}$ 'de en az 4 saat kurumaya bırakıldı. Elde edilen elektrot GCE/MWCNT/ZnS-MAA-PAMAM-ALDH olarak tanımlandı. GCE/MWCNT/ZnS-MAA-PAMAM-ALDH için kullanılan enzim immobilizasyon prosedürüne ilişkin şematik gösterim Şekil 3.9'da verilmiştir.

3.6.2 GDH Enzimi ve NAD^+/NADH Redoks Çiftine Dayalı Biyosensör Çalışmaları

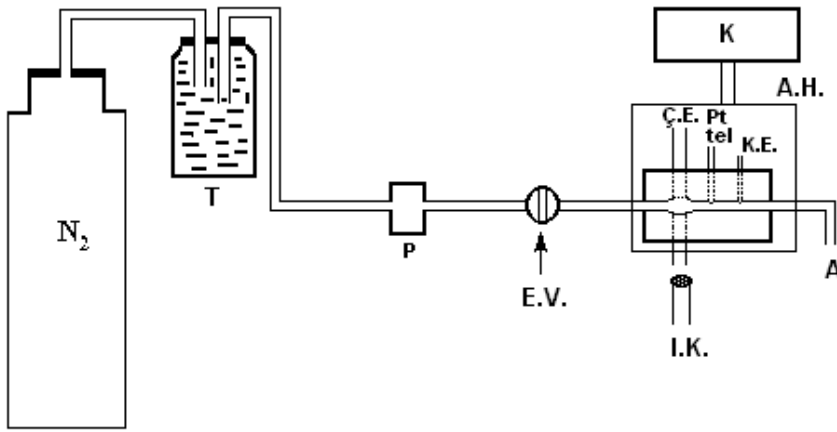
3.6.2.1 Döngüsel Voltammetrik Yöntemle

Hazırlanan K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH üçlü elektrot içeren elektrokimyasal hücreye çalışma elektrodu olarak monte edildikten sonra, 0,10 M KCl ve 10,0 mM NAD^+ içeren PBS ortamında glukoz yokken ve 40,0 mM glukoz varlığında -200 ile +1000 mV potansiyel aralığında ve 20 mV/s tarama hızında elektrot yüzeyi ışıklandırılmadan ve ışıklandırılarak döngüsel voltammogramlar kaydedildi. Karşılaştırmak amacıyla K.PGE/GDH (kuantum nokta içermeyen) elektrot ile de aynı deneyler tekrarlanmıştır. Benzer işlemler GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH ve GCE/MWCNT/GDH için de gerçekleştirilmiştir.

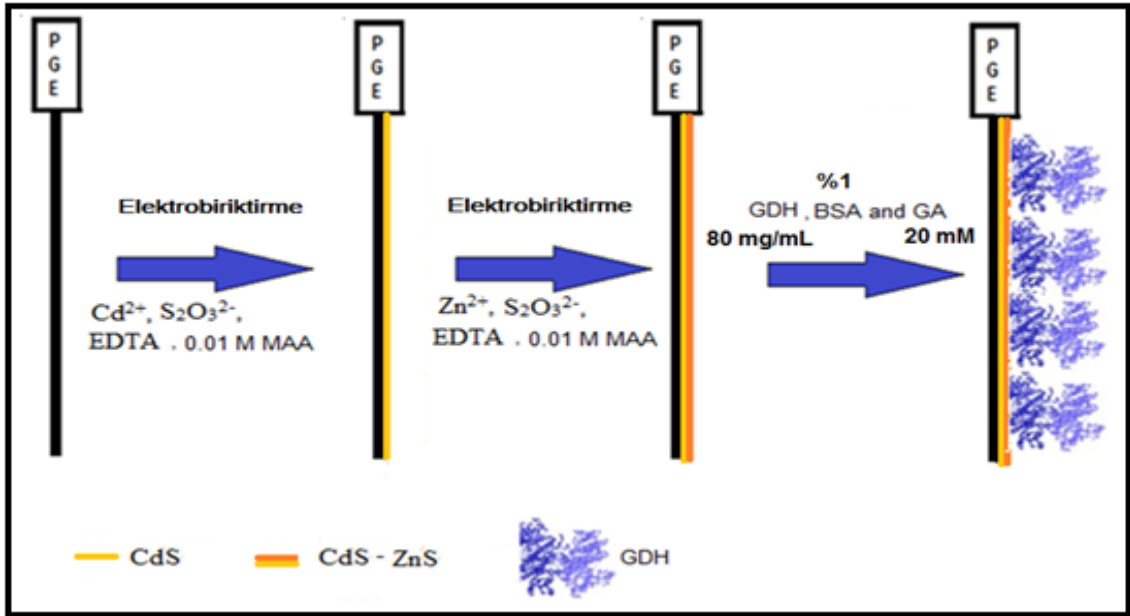
3.6.2.2 FIA Sisteminde Amperometrik ve Fotoamperometrik Yöntemle

Elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal glukoz biyosensörü için daha önce bahsedilen iki akış hücresi (GCE/MWCNT için Şekil 3.3'deki, K.PGE için ise Şekil 3.2'deki, fotoamperometrik akış hücreleri) kullanıldı. Amperometrik ve fotoamperometrik çalışmalarında, 1,0 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 PBS taşıyıcı olarak kullanıldı. 1,0 mm çapında AgCl kaplı Ag tel ve Pt tel akış hücresine doğrudan monte edildi. FIA düzeneğinin basit olarak şematik gösterimi Şekil 3.9'da verilmiştir. GCE/MWCNT ve K.PGE ilgili akış hücrelerine monte edildikten sonra, FIA sistemi kullanılarak 1,0 M KCl ve 10,0 mM NAD^+ içeren 0,10 M pH 7,0 PBS'de hazırlanmış glukoz çözeltileri akışkan taşıyıcı çözeltisine (1,0 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 PBS) enjekte edilerek akıma karşı uygulama

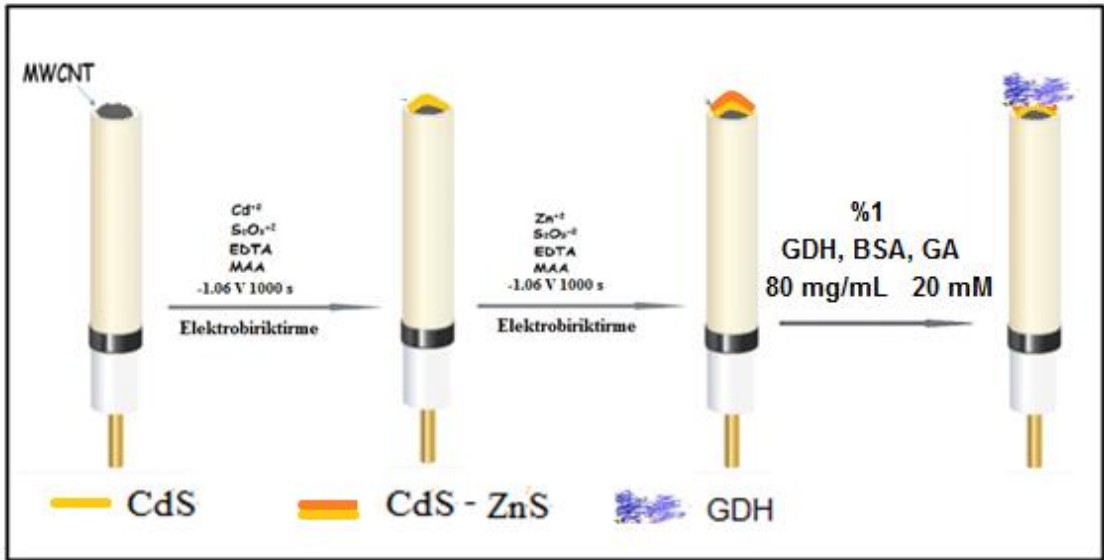
potansiyeli, akış hızı, kolon boyu ve örnek yükleme hacmi parametreleri hem amperometrik hem de fotoamperometrik yöntem için optimize edilmiştir. Her bir modifiye elektrodun uygun koşullarında yatışkın hal elde edildikten sonra farklı derişimlerde hazırlanan glukoz çözeltileri sisteme en az 3 defa enjekte edilerek, pik akımına karşı derişim ilişkisi incelenmiştir. Aynı deneyler elektrot yüzeyi 250 W halojen lamba ile ışıklandırılarak fotoamperometrik olarak da gerçekleştirilmiştir. Her çalışmanın sonunda sistem, saf su geçirilerek temizlendi. Karşılaştırmak amacıyla GDH immobilize edilmiş yalın PGE ve GCE/MWCNT ile de aynı deneyler tekrarlanmıştır.



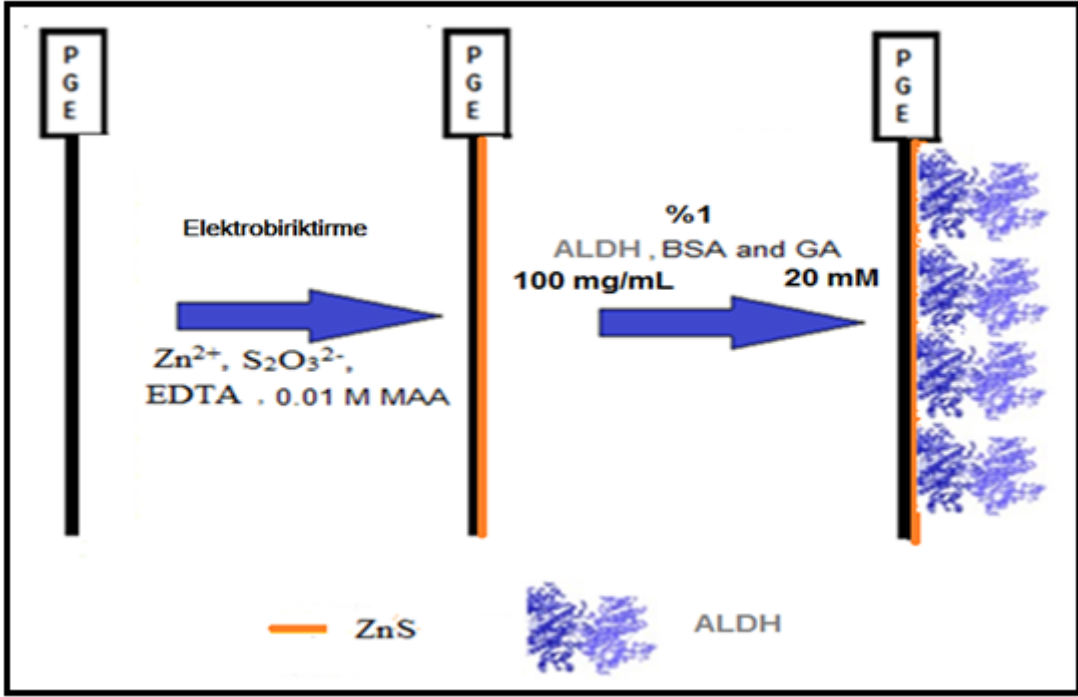
Şekil 3.5. Akışa Enjeksiyon Sistemi düzeneğinin şematik diyagramı Ar= Ar gazı; T=taşıyıcı çözelti; P= Peristaltik pompa; E.V.=Enjeksiyon vanası; I.K.=Işık kaynağı; A=atık; A.H.= Akış hücresi; Ç.E.=Çalışma elektrodu; K.E.=Karşılaştırma elektrodu



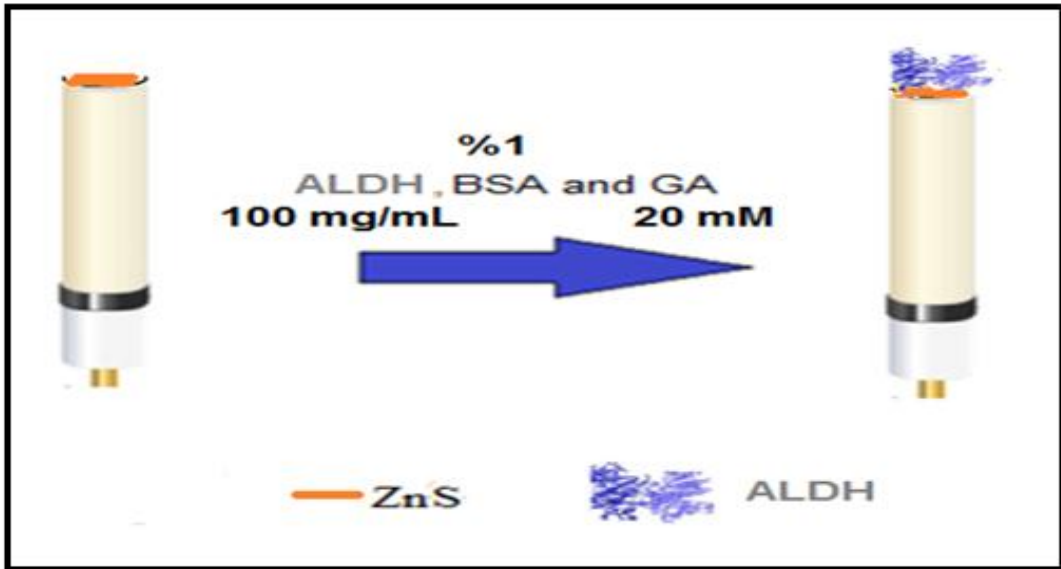
Şekil 3.6. K.PGE/CdS-ZnS-MAA yüzeyine GDH immobilizasyonuna ilişkin şematik gösterim



Şekil 3.7. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA yüzeyine GDH immobilizasyonuna ilişkin şematik gösterim



Şekil 3.8. K.PGE/ZnS-MAA-ALDH yüzeyine ALDH immobilizasyonuna ilişkin şematik gösterim



Şekil 3.9. GCE/MWCNT/ZnS-MAA-PAMAM yüzeyine ALDH immobilizasyonuna ilişkin şematik gösterim

3.7. Fotoelektrokimyasal DNA Biyosensör Çalışmaları

Fotoelektrokimyasal DNA çalışmalarının gerçekleştirilmesinde kullanılan çözeltiler ve deney prosedürleri için ilgili literatürlerden yararlanıldı (Meriç B., 2008; Caliskan ve

ark., 2009). Bu literatürlerdeki bilgiler ışığında aşağıdaki çözeltiler ile deneysel prosedürler, fotoelektrokimyasal DNA biyosensörü için de gerçekleştirildi.

3.7.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

0,050 M PBS (pH 7,4): Ölçümler sırasında kullanılan 0,050 M PBS, litresinde 1,56 g (0,01 mol) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 7,12 g (0,04 mol) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ içermektedir. Hazırlanan tampon çözeltisinin pH değeri yaklaşık 7,4 olmaktadır. Gerekliğinde 0,10 M NaOH ve / veya 0,10 M HCl ilavesiyle pH metre kullanılarak pH 7,4'e ayarlanmıştır. Hazırlanan tampon çözeltiliye iyonik şiddeti sağlamak için çözeltili litresine derişimi 0,020 M olacak şekilde 1,168 g NaCl eklendi.

0,50 M Asetat Tampon Çözeltisi (pH 4,8): Kullanılan 0,50 M asetat tampon çözeltisi için 14,4 mL asetik asit alınarak 250,0 mL'ye tamamlandı. Çözeltinin pH'sı 4,8 değerine gelinceye kadar 0,10 M NaOH çözeltisi ilave edildi, pH 4,8 değerine gelince çözelti 500,0 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı. Çözelti derişimi 0,020 M olacak şekilde NaCl içermektedir.

DNA Dizi Çözeltileri: Liyofilize DNA oligonükleotidlerin (**Prob DNA:** 5'-GTA TCT ACC ACA GTA ACA AA-3'; **Hedef DNA (tamamlayıcı, DNA):** 5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT AC-3; **tek dizisi değişik DNA:** 5'-TTT GTT ACT GGG GTA GAT AC-3; **Hedef dışı DNA (tamamlayıcı olmayan, DNA):** 5'-GAA TAT GAT TTA CAG TTT ATT TTT-3') stok çözeltileri, derişimleri 1000,0 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde deiyonize su ile hazırlandı, 25,0 μL 'lik hacimlerde sterilize edilmiş plastik 0,20 mL'lik PCR tüplerine paylaştırılarak -20°C 'de saklandı. Bu oligonükleotidlere ait seyreltik çözeltiler çalışma sırasında duyulan gereksinimlere bağlı olarak ve bu aşamada kullanılmak üzere, pH'ı 7,4 0,050 M PBS içerisinde hazırlandı.

3.7.2. Elektrot Yüzeyine Prob DNA Tutturulması

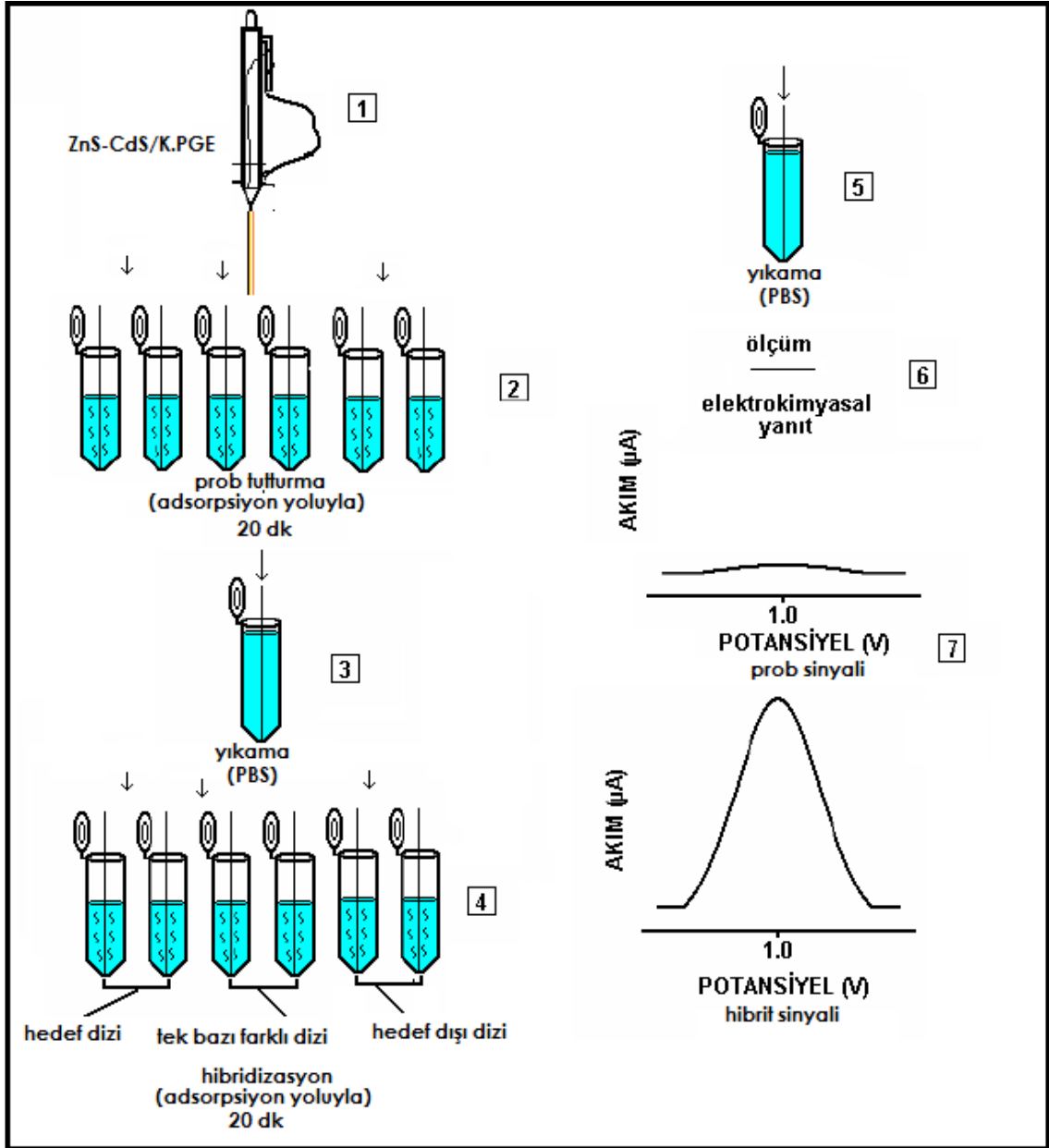
PGE yüzeyine Prob DNA tutturulmadan önce PGE yüzeyine QD (CdS-ZnS) modifiye edildi. Bu amaçla daha öncede bahsedildiği gibi PGE'ler pH 7,0 fosfat tamponu ortamında +1,45 V da 60 s amperometrik yöntem uygulanarak koşullandırıldı (K.PGE). Deiyonize suyla yıkandıktan sonra yüzeyine CdS ve ZnS biriktirme işlemi 3.4.1 kısmında bahsedilen prosedür kullanılarak gerçekleştirildi. Yüzeyi QD (CdS-ZnS) modifiye edilmiş PGE, pH 7,4 PBS içerisinde hazırlanmış olan farklı derişimde prob DNA (5'-GTA TCT ACC ACA GTA ACA AA-3') çözeltisine 20 dakika süreyle daldırıldı ve adsorpsiyon yoluyla prob

DNA elektrot yüzeyine tutturuldu (K.PGE/CdS-ZnS-MAA/Prob-DNA). Elektrot yüzeyi PBS ile yıkandı.

3.7.3. Hedef, Tek Dizisi Değişik ve Hedef Dışı Dizi ile Hibridizasyon

Prob ile kaplı QD modifiye elektrot yüzeyleri (K.PGE/CdS-ZnS-MAA/Prob-DNA), hedef diziler (5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT AC-3'); tek bazı değişik diziler (5'-TTT GTT ACT GGG GTA GAT AC-3') ve hedef dışı diziler (5'-GAA TAT GAT TTA CAG TTT ATT TTT-3') ile ıslak adsorbsiyon tekniği kullanılarak 20 dakika süreyle etkileştirildi. Sonrasında istenmeyen bağlanmaları azaltmak amacıyla PBS ile yıkandı. Tüm prosedürleri gösteren bir şematik gösterim Şekil Şekil 3.10.'da verilmiştir.





Şekil 3.10. QD Modifiye PGE yüzeyine prob-DNA tutturulması ve hibridizasyona ait deneysel prosedürü

3.7.4. Elektrokimyasal Ölçümler

3.7.4.1. Diferansiyel Puls Voltammetrisi Yöntemi

Hedef dizi, tek dizisi değişik dizi ve hedef dışı dizilerle hibridize olmuş her QD modifiye prob-DNA'nın (K.PGE/CdS-ZnS-MAA/Prob-DNA) Diferansiyel puls (DP) voltammogramları kaydedilerek elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal davranışları incelendi. Bu amaçla ile her bir elektrodun 0,020 M NaCl içeren; 0,50 M asetat tamponu içerisinde (pH 4,8), 0,75 V -1,45 V arasında; puls genliği 50 mV, puls zamanı 0,2 s, 16

mV/s tarama hızında DP voltammogramları ölçümler alınarak Guanin pikindeki değişimler izlendi. Aynı deneyler elektrot yüzeyi 250 W halojen lamba içeren fiber optikli ışık kaynağı ile ışıklandırılarak fotoelektrokimyasal olarak da (DP voltammogramları kaydedilerek) gerçekleştirilmiştir.

3.7.4.2. İmpedimetrik Yöntem

0,10 M KCl içeren 2,5 mM $K_3Fe(CN)_6$ ve 2,5 mM $K_4Fe(CN)_6$ destek elektrolit ortamında her bir elektrodun elektrokimyasal impedans eğrileri 1 ile 10000 Hz frekans aralığında, 0,23 V potansiyelde alınarak, impedans verilerinden elde edilen Nyquist eğrileri değerlendirildi.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

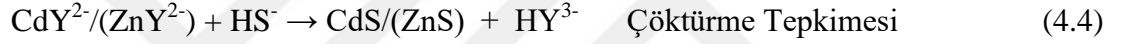
4.1. Kuantum Nokta (QD) Modifiye Elektrotların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Tez kapsamında PGE ve GCE QD modifiye elektrotlarla i) NADH'nin normal yalın elektrotta elektrot türüne göre 500-700 mV'daki yükseltgenme pik potansiyelini daha da negatif potansiyele kaydırmak (yaklaşık 100-200 mV gibi), ii) elektrot yüzeyini ışıklandırarak NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine ait pik akımını arttırmak, iii) NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine ait pik akımı-derişim ilişkisini FIA sisteminde incelemek, vi) elektrot yüzeyine dehidrogenaz enzimi tutturarak NAD^+/NADH redoks çiftine dayalı fotobiyosensör tasarlayıp FIA sisteminde uygulamak amaçlanmıştır. Dolayısıyla hazırlanan QD modifiye elektrotların ilk etapta NADH'nin ışıklı ve ışıksız ortamda döngüsel voltammogramları alınarak elektrodun beklenen amaç doğrultusunda elektrokatalitik yanıt verip vermediği izlenmiş ve bu amaca ulaşmak için değişik yöntemlerle (PAMAM'lı ortamda, PAMAM'sız ortamda, MAA ortamında vb.) QD modifiye elektrotlar hazırlanmıştır.

CdS-ZnS nanokompozit film modifiye PGE ve GCE elektrotların hazırlanmasında, ilk olarak Lu ve arkadaşları (2008) ile Qian ve arkadaşlarının (2010) geliştirdiği prosedür kullanıldı. Qian ve arkadaşlarının (2010) optimize ettiği şekilde PAMAM ortamında GCE için; 15,0 mM Cd^{2+} , 8,0 mM $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, 8,0 mM EDTA, 35,0 μM PAMAM içeren destek elektrolit ortamına üçlü elektrot daldırılarak, 15⁰C'de $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{(\text{doygun})}$ elektrota karşı 1000 s, -1,06 V potansiyel altında, PGE ise aynı koşullarda -1,0 V'luk potansiyel uygulanarak elektrot yüzeyleri CdS-PAMAM ile kaplandı. Ardından, CdS modifiye elektrot yüzeyine aynı koşullar altında Cd^{2+} yerine 15,0 mM Zn^{2+} kullanılarak elektrokimyasal çöktürme yöntemiyle ZnS biriktirildi (CdS-ZnS).

Elektrot yüzeylerinin CdS veya ZnS ile kaplanması, Lu ve arkadaşları (2008a) ile Qian ve arkadaşlarının (2010) literatürde verilmiş olan elektrokimyasal çöktürme mekanizması ile açıklanabilmektedir. Mekanizmaya göre, -1,06 veya -1,0 V gibi oldukça negatif potansiyelerde Cd^{2+} ya da Zn^{2+} iyonlarının metalik Cd ya da Zn olarak birikmemesi için bu iki iyon ortama EDTA (Y^{4-}) ilave edilerek kompleksleştirilmiş ve iki iyonun indirgenmesi daha negatife çekilmiştir. Destek elektrolit ortamına tiyosülfat iyonu ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) CdS ve ZnS'nin elektrokimyasal olarak çökmesi için S^{2-} kaynağı olarak ilave

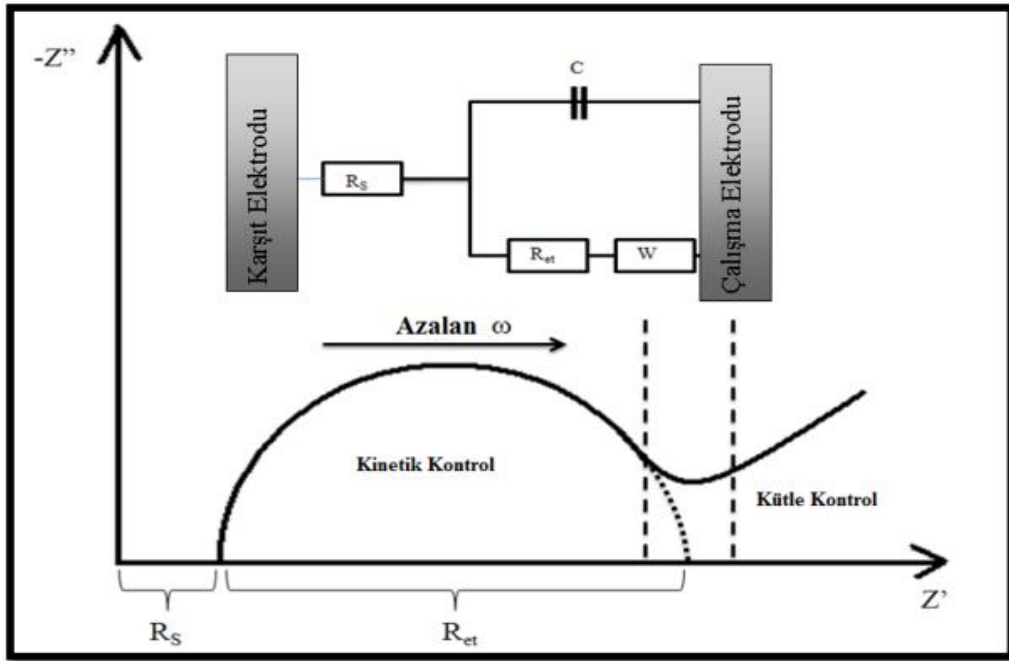
edilmiştir. İlk olarak, ortama ilave edilen $S_2O_3^{2-}$ iyonu $4e^-$ ve $6H^+$ alarak önce S'ye indirgenmekte daha sonra S ise $2e^-$ $1 H^+$ alarak HS^- iyonuna indirgenmektedir. Bu durum aşağıda verilen 4.1. nolu tepkimede ifade edilmektedir. Toplam tepkimede ise elektrot yüzeyinde $S_2O_3^{2-}$ iyonu $8e^-$ ve $8H^+$ alarak H_2O 'ya ve HS^- iyonuna indirgenmekte Cd^{2+} ve Zn^{2+} iyonları da elektrot yüzeyine difüzyonla taşınarak elektrot yüzeyinde oluşan HS^- ile çöktürme reaksiyonu vermekte böylece CdS ve ZnS oluşmaktadır (Lu ve ark. 2008a; Qian ve ark., 2010).



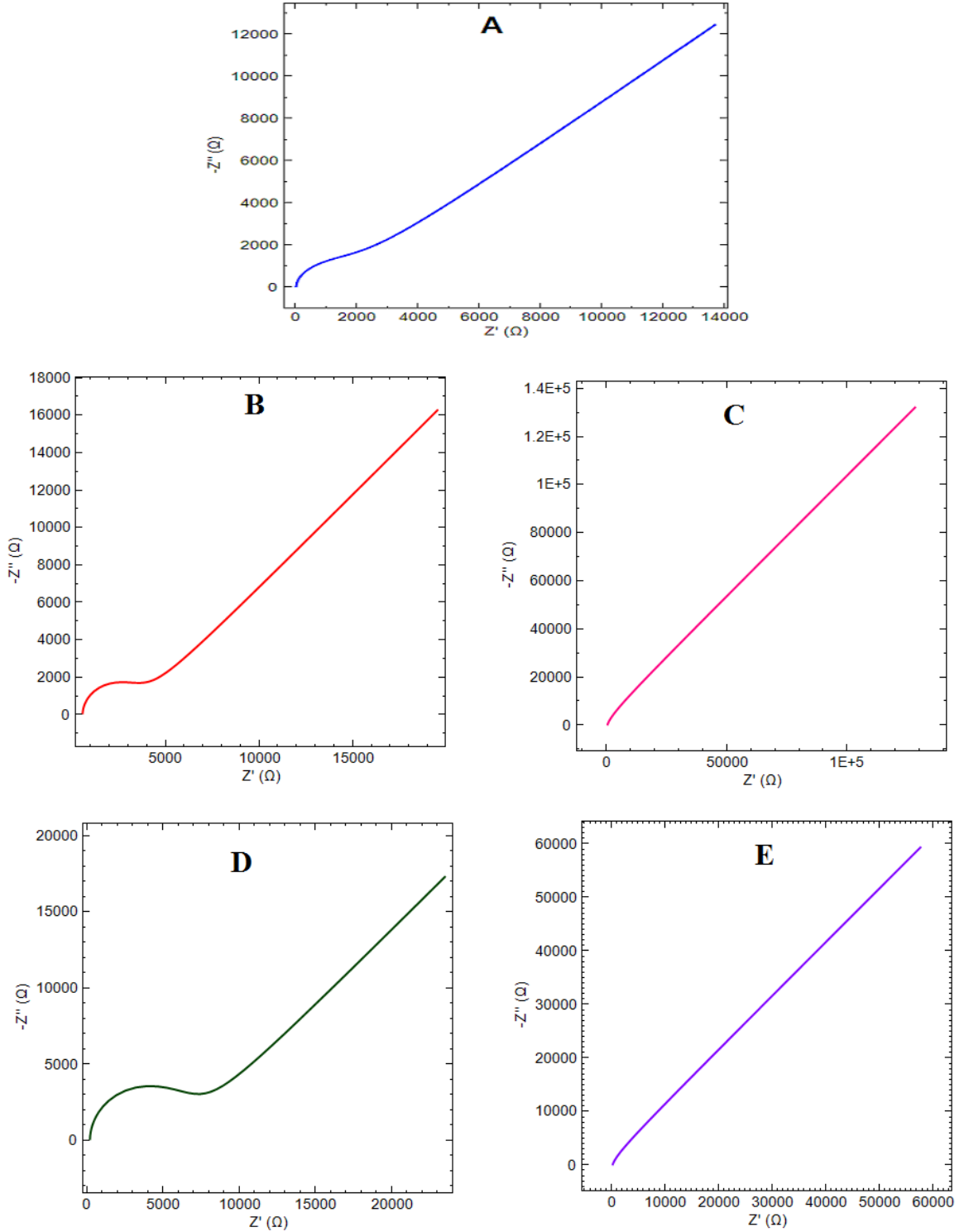
4.1.1. Hazırlanan QD Modifiye PAMAM-GCE'lerin Karakterizasyonu ve NADH'nin Yükseltgenmesine Yanıtı

Öncelikle hazırlanan modifiye GCE'lerin impedans eğrileri ve döngüsel voltammogramları kaydedildi. Yalın GCE, GCE/CdS, GCE/PAMAM-CdS, GCE/CdS-ZnS ve GCE/PAMAM-CdS-ZnS'lerin impedans eğrileri 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi ortamında Şekil 4.1'de gösterilen devreye göre 1 ile 10000 Hz frekans aralığında alındı. Her bir elektrodun impedans çalışmalarından elde edilen Nyquist eğrileri Şekil 4.2'de verilmiştir. Şekil 4.2A'da görüldüğü gibi yalın elektrot için elde edilen impedans eğrisinden herhangi bir direnç gözlenmediği ve bu olayın yalın GCE'nin iletkenliğinin oldukça iyi olduğunu yansıtmaktadır. Ancak elektrot yüzeyi CdS ile kaplandığında direncin arttığı (yaklaşık 4000 ohm) Şekil 4.2B'de gözlenmiştir. Dolayısıyla yüzeye sarımsı bir filmin kaplandığı gözle de görüldüğünden yüzeyin CdS yarı iletkeniyle kaplandığı sonucu elde edilmiştir. PAMAM-CdS ile kaplı elektrodun impedans eğrisi incelendiğinde ise Şekil 4.2B'den farklı olarak direncin yine yalın elektrottaki gibi olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2C). Yüzeyin sarı bir film ile kaplandığı da gözle görülmüştür. Dolayısıyla PAMAM çok fazla sayıda dallara sahip büyük bir makromolekül olup CdS bu makromolekülün dalları ile birlikte yüzeye bağlanmıştır. Her ne kadar CdS yarı iletken

olsa da PAMAM'ın yapısal özelliğinden dolayı GCE/PAMAM-CdS direnci sifira yakın çıkmıştır. Elektrot yüzeyi CdS ile kaplandıktan sonra aynı yöntemle ZnS ile de kaplanmıştır. Elde edilen GCE/CdS-ZnS'nin impedans eğrisinden direncin Şekil 4.2B'deki gibi hem yalın GCE'ye ve hem de GCE/CdS'ye göre arttığı (yaklaşık 8000 ohm) gözlenmiştir (Şekil 4.2D). Hem yüzeye sarımsı bir filmin kaplandığı gözle de görüldüğünden hem de direnç sadece CdS kaplı elektroda göre arttığından yüzeyin CdS-ZnS yarı iletkeniyle kaplandığı sonucu elde edilmiştir. PAMAM-CdS-ZnS ile kaplı elektrodun impedans eğrisi incelendiğinde ise Şekil 4.2D'den farklı olarak direncin yine yalın elektrottaki gibi olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2E). Yüzeyin sarı bir film ile kaplandığı da gözle görülmüştür. Dolayısıyla PAMAM'ın yapısal özelliğinden dolayı GCE/PAMAM-CdS-ZnS direnci sifira yakın çıkmıştır.



Şekil 4.1. Elektrokimyasal impedans devre modeli ve impedans eğrisinin gösterimi. R_s : Çözelti direnci, R_{et} : elektron transfer direnci, C: Sığa, W: Warburg impedansı



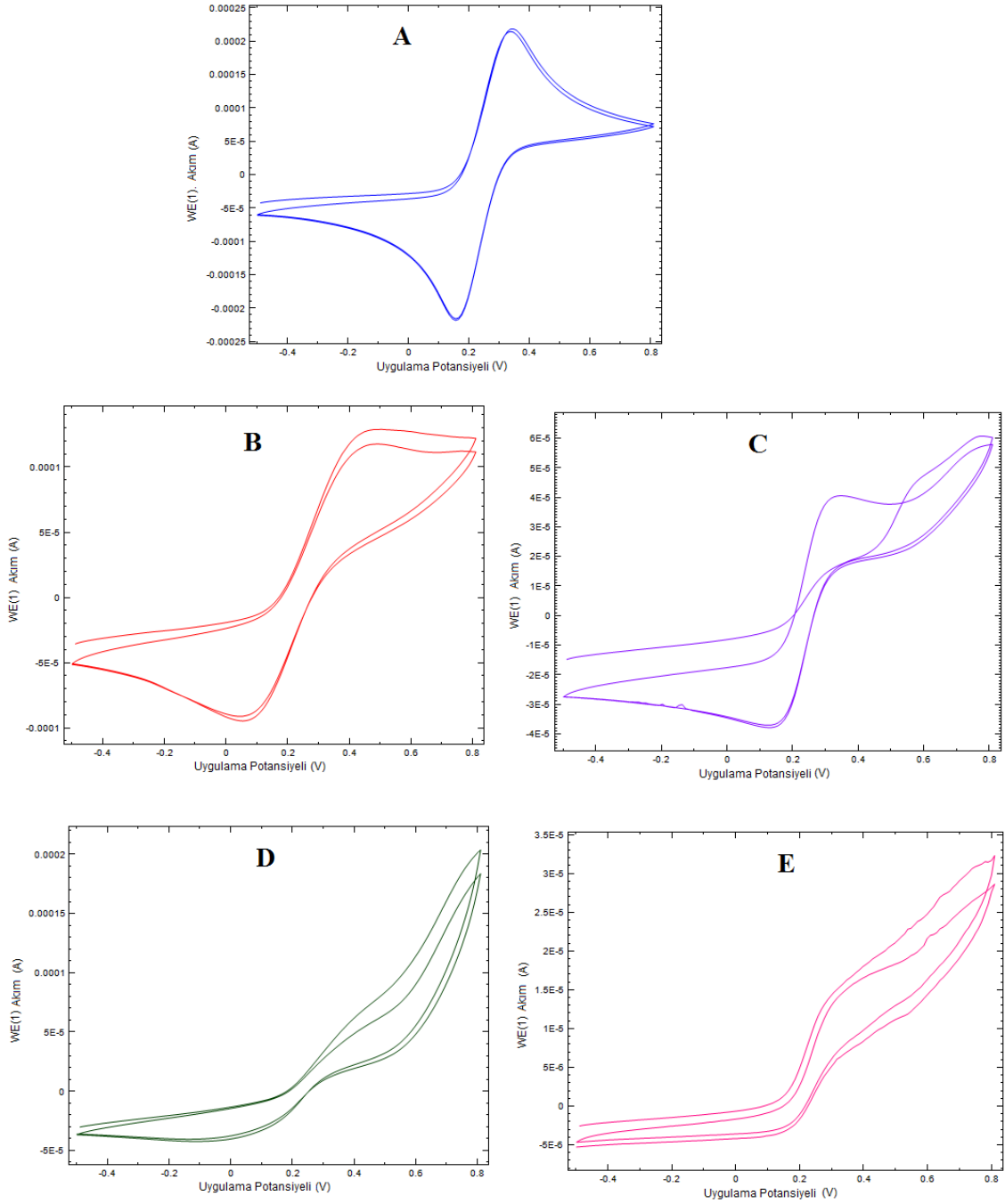
Şekil 4.2. A) Yalın GCE B) CdS/GCE C) CdS-PAMAM /GCE D) CdS-ZnS /GCE E) CdS-ZnS-PAMAM/GCE'nin 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamındaki impedans eğrileri

İmpedans eğrilerinden sonra yalın GCE, CdS /GCE, CdS-PAMAM/GCE, CdS-ZnS/GCE, CdS-ZnS-PAMAM/GCE'nin döngüsel voltammogramları 0,10 M KCl içeren

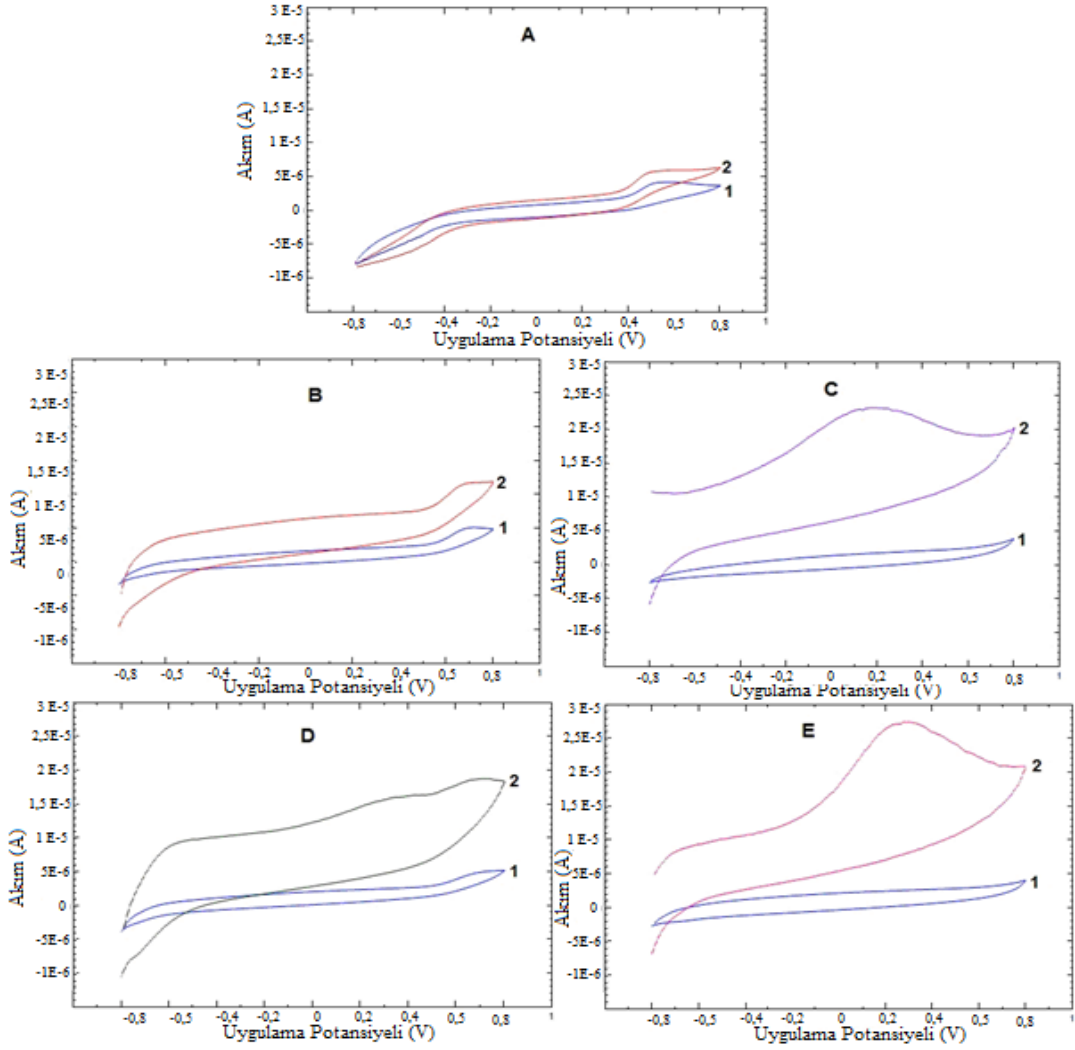
0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi ortamında 50 mV/s tarama hızında ve -0.8 ile + 0,8 V potansiyel aralığında alındı. Elde edilen voltammogramlar Şekil 4.3'de verilmiştir. Şekil 4.3A'da görüldüğü gibi yalın GCE ile alınan voltammogramlarda Fe^{3+}/Fe^{2+} redoks çiftine ait anodik ve katodik pikler sırasıyla yaklaşık +330 mV ve +150 mV'da belirgin bir şekilde gözlenmiştir. Ancak GCE/CdS için anodik pik daha pozitif kayarken (420 mV) katodik pik daha negatif (70 mV) kaymıştır (Şekil 4.3B). Potansiyellerdeki bu kaymanın nedeni yüzeye kaplanan CdS'ün yarı iletken özelliğine bağlanmıştır. Bu sonuçları, impedans eğrilerinde CdS kaplı elektrodun direncinin artması da desteklemektedir. Ancak yüzeye PAMAM-CdS modifiye edildiğinde anodik ve katodik pikler yalın GCE'de elde edilen potansiyellere (anodik pik 305 mV, katodik pik 155 mV) yakın bir değerde gözlenirken, pik akımı oldukça düşmüştür (Şekil 4.3C). GCE/CdS-ZnS için anodik pik daha da pozitif kayarken (450 mV) katodik pik daha da negatif (40 mV) kaymış ve pik şekilleri oldukça yayvanlaşmıştır (Şekil 4.3D). Yine elde edilen verilerle impedans eğrileri birbirini desteklemektedir. GCE/PAMAM-CdS-ZnS'de yine benzer bir şekilde pik potansiyelleri yalın GCE'dekine yakın çıkmış (anodik pik 300 mV katodik pik 180 mV) ancak pik akımları oldukça düşmüştür (Şekil 4.3E). Tüm bu sonuçlar GCE yüzeyinin CdS ve CdS-ZnS ile kaplandığını göstermektedir.

QD modifiye GCE'ler karakterize edildikten sonra bu elektrotların 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS destek elektrolit ortamında döngüsel voltammogramları NADH yokluğunda ve 0,40 mM NADH ortamında alınarak, modifiye elektrotların NADH'ye elektrokatalitik etki gösterip göstermediği tespit edildi. Ayrıca yüzey ışıklandırılarak ışıkla NADH'nin elektrokatalitik akımında artış olup olmadığı da incelendi. Şekil 4.4, yalın GCE, GCE/CdS, GCE/PAMAM-CdS, GCE/CdS-ZnS, GCE/PAMAM-CdS-ZnS'nin NADH ortamında ışıklı ve ışısız elde edilen döngüsel voltammogramlarını göstermektedir. NADH'nin yükseltgenmesi yalın GCE'de yaklaşık 600 mV'da gözlenmiş (Şekil 4.4A 1 nolu voltammogram) ve ışıkla (Şekil 4.4A 2 nolu voltammogram) pik akımının çok az arttığı tespit edilmiştir. GCE/CdS'de ise NADH'nin yükseltgenme pikinde negatif yönde herhangi bir kayma gözlenmemiş ve ışıkla da yalın elektrota göre akımda daha fazla artış gözlenmiştir (Şekil 4.4B, 1 ve 2 nolu voltammogramlar). Ancak GCE/PAMAM-CdS (Şekil 4.4C)'de NADH'nin yükseltgenme piki gözlenmezken ışıkla büyük bir pik gözlenmiş ve dolayısıyla PAMAM'lı modifiye elektrodun NADH'nin yükseltgenmesinde ışıkla birlikte iyi bir elektrokatalitik etki gösterdiği sonucu ortaya çıkmaktadır. Ancak elektrot yüzeyi NADH yokken ışıklandırıldığında da söz konusu

akımın gözlenmesi pikin bir miktarının PAMAM'ın kendisinden kaynaklandığını da yansıtmaktadır. Benzer sonuçlar GCE/CdS-ZnS (Şekil 4.4D) ve GCE/PAMAM-CdS-ZnS (Şekil 4.4E) için de elde edilmiştir. Dolayısıyla bu modifiye elektrodun gerçekten NADH'nin yükseltgenmesine iyi bir yanıt verip vermediği netleştirilememiştir.



Şekil 4.3. A) Yalın GCE B) CdS/GCE C) CdS-PAMAM/GCE D) CdS-ZnS/GCE E) CdS-ZnS-PAMAM/GCE nin 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamında kaydedilen döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 50 mV/s

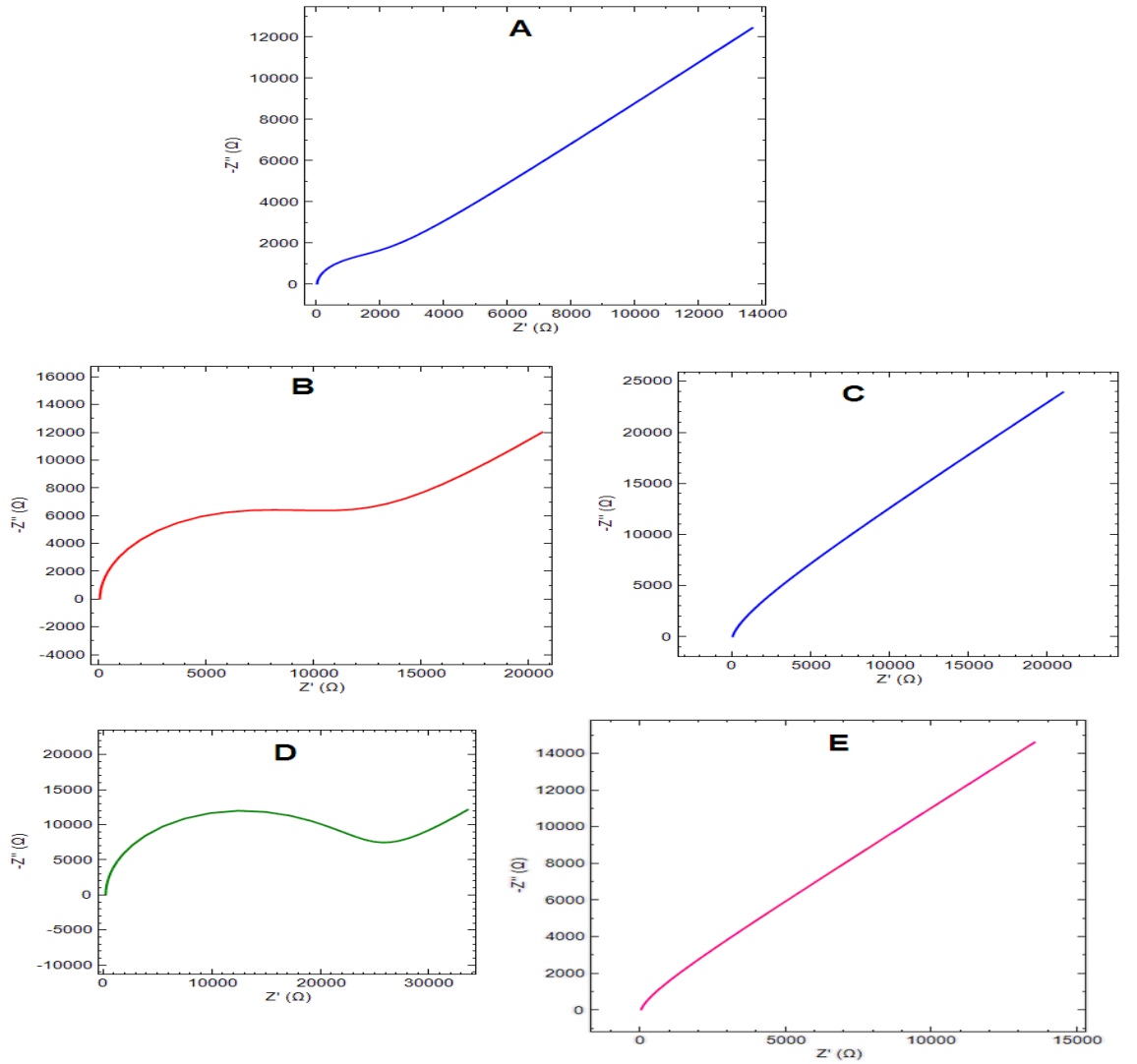


Şekil 4.4. 0,40 mM NADH'nin 0,10 M KCl içeren pH 7,0 fosfat tamponu ortamında A) Yalın GCE B) CdS/GCE C) CdS-PAMAM/GCE D) CdS-ZnS/GCE E) CdS-ZnS-PAMAM/GCE de elde edilen döngüsel voltammogramı 1:İşıksız 2:ışıklı. Tarama hızı: 20 mV/s

4.1.2. Hazırlanan QD Modifiye PAMAM-PGE'lerin Karakterizasyonu ve NADH'nin Yükseltgenmesine Yanıtı

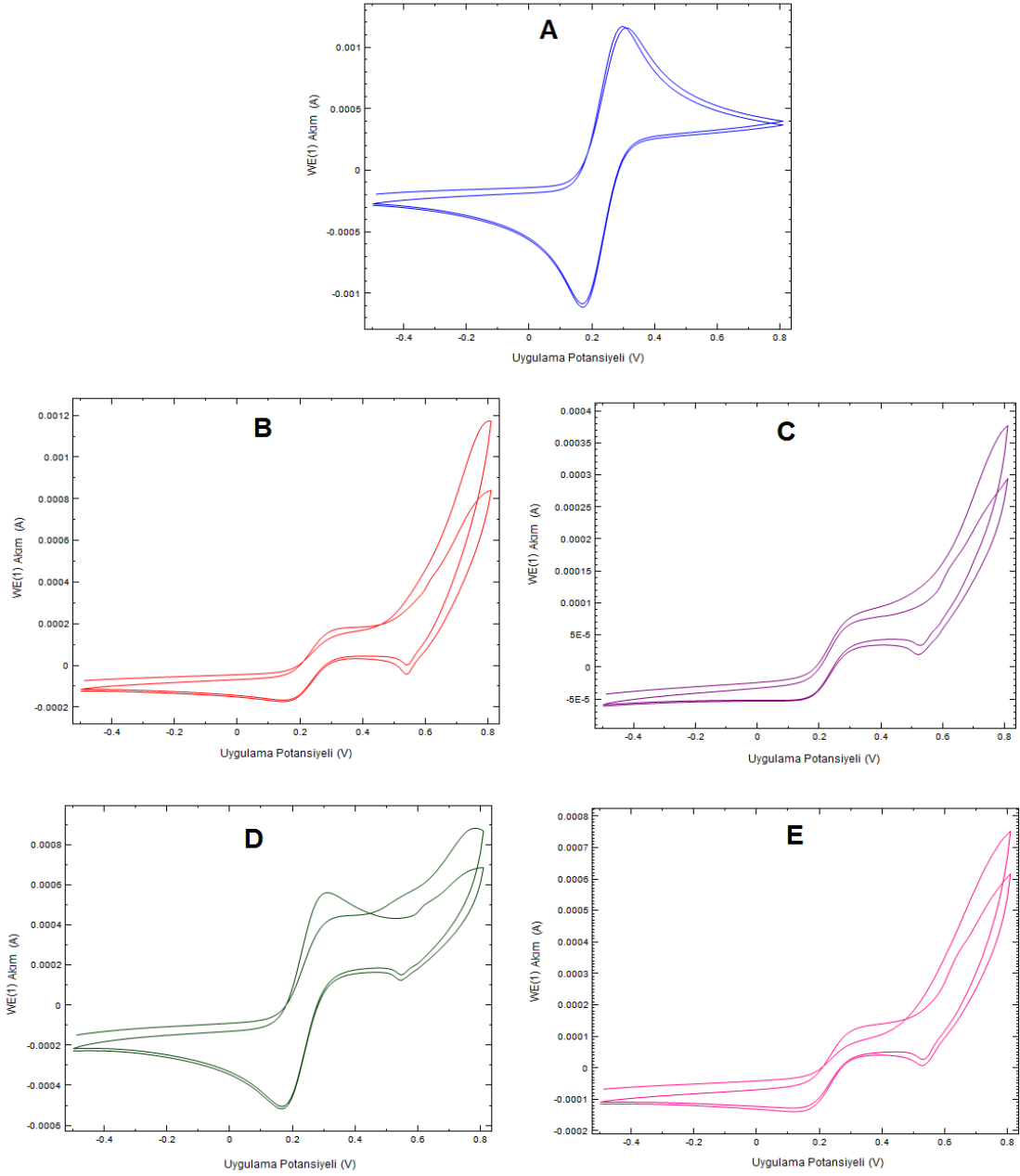
Öncelikle yalın PGE ile hazırlanan modifiye PGE'lerin impedans eğrileri 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi ortamında Şekil 4.1'de gösterilen devreye göre 0,1 ile 10000 Hz frekans aralığında alındı. Yalın PGE, PGE/CdS, PGE/PAMAM-CdS, PGE/CdS-ZnS, PGE/PAMAM-CdS-ZnS için elde edilen impedans eğrileri daha önce GCE için elde edilen eğrilere benzer şekilde olduğu gözlenmiş ve Şekil

4.5'de verilmiştir. Yalın PGE için elde edilen impedans eğrisinde yaklaşık 1000 ohm'luk bir direnç gözlenirken (Şekil 4.5A) daha önce Şekil 4.2A'da impedans eğrisi verilen yalın GCE'de bir direnç gözlenmemiştir. CdS ve CdS-ZnS modifiye edildiğinde bu direnç daha da artmış ve PGE/CdS için yaklaşık 12000 ohm (Şekil 4.5B) ve PGE/CdS-ZnS için yaklaşık 25000 ohm (Şekil 4.5C) olduğu şekilden görülmektedir. Bu da PGE yüzeyine CdS ve CdS-ZnS yarı iletkeninin kaplandığını yansıtmaktadır. Elektrot yüzeyinde sarı renkli partiküllerin gözle de görünmesi bu sonucu doğrulamaktadır. PAMAM'lı ortamda elde edilen verilen eğrilere benzer şekilde olduğu yani direncin PAMAM'sız elektrotlara göre oldukça azaldığı gözlenmiştir.



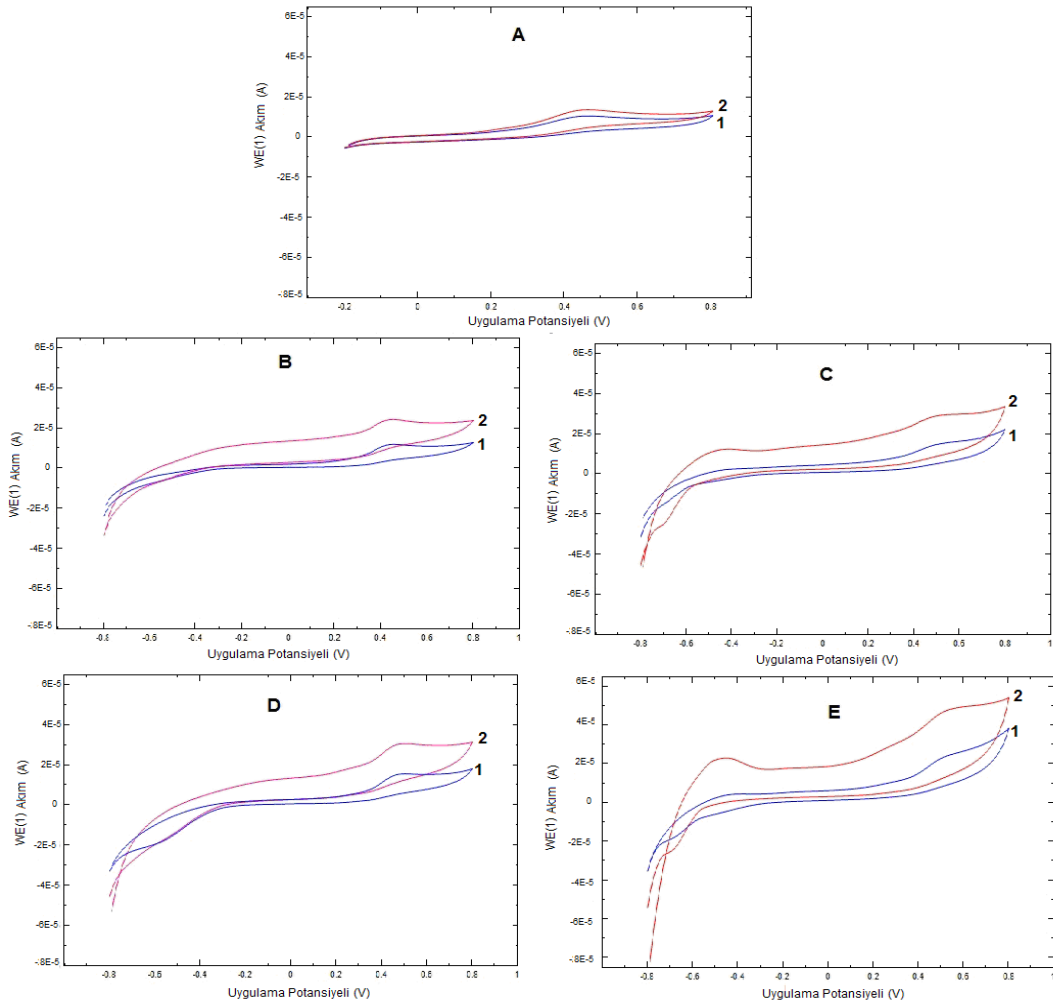
Şekil 4.5. A) Yalın PGE B) CdS/PGE C) CdS-PAMAM/PGE D) CdS-ZnS/PGE E) CdS-ZnS-PAMAM/PGE'nin 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamındaki impedans eğrileri

Şekil 4.6'da ise yalın PGE, PGE/CdS, PGE/PAMAM-CdS, PGE/CdS-ZnS, PGE/PAMAM-CdS-ZnS'nin döngüsel voltammogramları verilmiştir. Bu voltammogramlardan görüldüğü gibi Fe^{3+}/Fe^{2+} 'nin pikleri yalın PGE'de belirgin gözlenirken, modifiye elektrotlarda pik akımları oldukça düşmüş ve potansiyellerde kayma gözlenmiştir. Bu durum PGE yüzeyinin QD'lerle kaplandığını yansıtmaktadır.



Şekil 4.6. A) Yalın PGE B) CdS/PGE C) CdS-PAMAM/PGE D) CdS-ZnS/PGE E) CdS-ZnS-PAMAM/PGE'nin 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamında kaydedilen döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 50 mV/s

Son olarak PGE ile tüm modifiye PGE'lerin 0,40 mM NADH ortamında voltammogramları hem yüzeye ışık düşürülmeden hem de yüzeye ışık düşürülerek kaydedilmiştir (Şekil 4.7). Ancak voltammogramlardan da gözleildiği gibi NADH'ye beklenen elektrokatalitik etki (Yani yalnız PGE'de elde edilen pik potansiyeline göre daha negatif kayma) gözlenmemiştir. Bu beklenen bir durum değildir. Ancak elektrot yüzeyleri ışıklandırıldığında beklenildiği gibi QD'lerle elde edilen pik akımlarının yalnız elektrottaki artışa göre oldukça fazla olduğu tespit edilmiştir. Çünkü QD modifiye elektrot yarı iletken özellik gösterdiğinden pik akımı yüzey ışıklandırıldığında iletkenlik artacağından pik akımı da artacaktır. Ancak pik potansiyelinde de GCE'de elde edildiği gibi bir kayma gözlenmemiştir.



Şekil 4.7. 0,40 mM NADH'nin M KCl içeren pH 7,0 fosfat tamponu ortamında A) Yalnız PGE B) CdS/PGE C) CdS-PAMAM/PGE D) CdS-ZnS/PGE E) CdS-ZnS-PAMAM/PGE de elde edilen döngüsel voltammogramı 1:İşıksız 2:ışıklı. Tarama hızı: 20 mV/s

Tezde asıl hedeflenen daha önce belirtildiği gibi elektrot yüzeyini ışıklandırarak NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine ait pik akımını arttırmak ve NADH'nin normal yalın elektrottaki yükseltgenmesine ait pik potansiyelini daha da negatife çekmek, sonrasında NAD^+/NADH redoks çiftine dayalı foto-biyosensörü FIA sisteminde gerçekleştirmektir. Dolayısıyla hazırlanan QD modifiye elektrotların ilk etapta NADH'nin ışıklı ve ışıksız ortamda döngüsel voltammogramları alınarak elektrodun beklenen amaç doğrultusunda elektrokatalitik yanıt verip vermediği izlenmiş ve bu amaca ulaşmak için değişik yöntemlerle (PAMAM'lı ortamda, PAMAM'sız ortamda) QD modifiye elektrotlar hazırlanmıştır. Ancak PAMAM'lı ortamda elektrot yüzeyi NADH yokken ışıklandırıldığında da akımın gözlenmesi pikin bir miktarının PAMAM'ın kendisinden kaynaklandığını yansıtmaktadır. Dolayısıyla bu modifiye elektrodun gerçekten NADH'nin yükseltgenmesine iyi bir yanıt verip vermediği netleştirilememiştir. Ayrıca PAMAM'lı ortamda enzim immobilize edilmiş elektrotlarla da beklenen sonuçlar elde edilemediğinden çalışmalara PAMAM'sız ortamda devam edilmiştir.

4.1.3. QD Modifiye GCE'lerin Karakterizasyonu

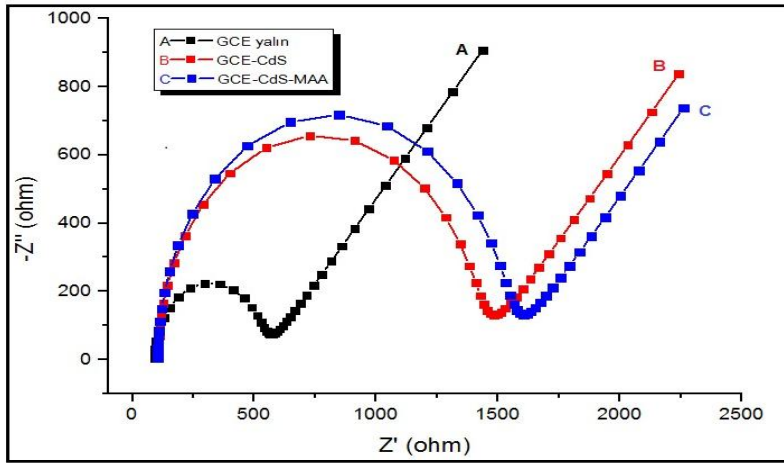
QD modifiye GCE'ler yalın GCE'nin dikkatli bir şekilde temizlenmesinden sonra materyal ve yöntem kısmında bahsedildiği şekilde hazırlanmış ve yalın GCE de dahil olmak üzere her bir modifiye elektrodun impedans eğrileri ve döngüsel voltammogramları 0,010 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ ortamında alınmıştır. Çizelge 4.1.'de 5 farklı QD modifiye ve yalın elektrotlar için alınan impedans eğrilerinden direnç değerleri ve döngüsel voltammogramlardan $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ redoks çifti için pik potansiyelleri, pik potansiyelleri arasındaki fark (ΔE_p) ve pik akımları verilmiştir.

0,10 M KCl içeren 0,010 M $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ve 0,010 M $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ çözeltisi ortamında, sırasıyla yalın GCE, GCE/CdS ve GCE/CdS-MAA'ya ait impedans eğrileri Şekil 4.1'de verilen devreye göre alınmıştır. Yalın GCE ve QD modifiye elektrotların impedans eğrilerinden elde edilen direnç ya da yarı daire çapı (semi circle diameter) değerleri yorumlandığında, yalın GCE için direnç değerinin CdS kaplı elektrotlara göre daha düşük olduğu (450 ohm) gözlenmiştir, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de görülmektedir. Yalın GCE'ye ait direncin bu şekilde düşük olması, iletkenliğinin CdS modifiye GCE'ye göre daha iyi olduğunu göstermektedir. Direnç GCE/CdS için elektrot yüzeyi CdS ile kaplandığında 1506 ohm'a kadar artmıştır. GCE/CdS ile kıyaslandığında CdS-MAA ile

kaplı GCE'nin direnç değerinin (yaklaşık 1543 ohm) çok fazla değişmediği gözlenmiştir. Elektrotlara ait Nyquist eğrileri Şekil 4.8.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Yalın ve QD modifiye elektrotların impedans ve döngüsel voltammogramlarından elde edilen değerler (n=5)

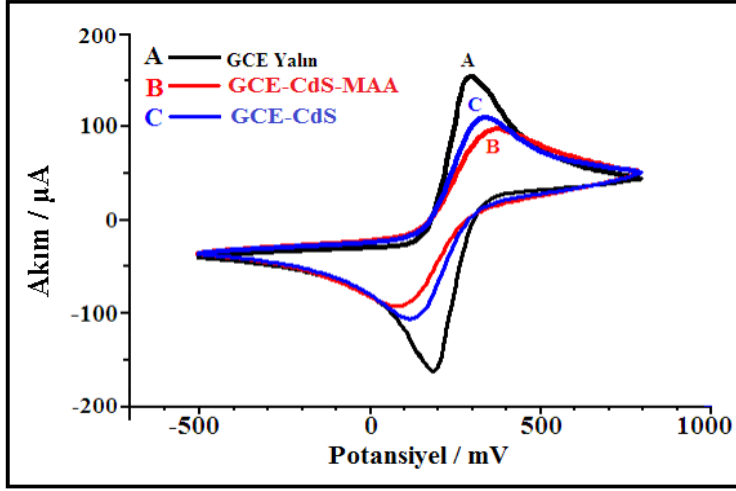
Elektrot tipi	E_a (mV)	E_k (mV)	ΔE_p (mV)	I_{pa}	I_{pk}	I_{pa}/I_{pk}	Z'' (ohm)
Yalın GCE	298±5	195±5	103±5	154±4	156±6	0.99±0.02	450±22
GCE/CdS	335±10	115±13	220±18	85±8	88±6	0.96±0.07	1506±40
GCE/CdS-MAA	338±12	117±15	117±15	98±7	94±8	1.05±0.07	1543±72
Yalın PGE	306±6	154±15	152±13	268±10	279±9	0.96±0.07	503±19
PGE/CdS	344±10	119±17	225±17	161±10	165±13	0.96±0.04	632±36
PGE/CdS-MAA	377±12	132±11	245±22	162±11	171±13	0.95±0.04	783±58
KPGE	288±8	156±17	133±14	310±13	315±14	0.99±0.01	222±30
KPGE/CdS	348±14	140±11	208±23	252±16	261±16	0.97±0.03	555±48
KPGE/CdS-MAA	355±9	141±7	214±13	181±17	197±19	0.97±0.03	897±66
GCE/MWCNT	283±4	188±4	95±5	296±3	306±3	0.97±0.02	122±3
GCE/MWCNT/CdS	308±8	185±5	123±3	153±2	142±9	1.09±0.05	178±5
GCE/MWCNT/CdS-MAA	312±6	170±4	142±8	160±12	169±11	0.94±0.03	205±6



Şekil 4.8. A) Yalın GCE, B) GCE/CdS, C) GCE/CdS-MAA'nın 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamındaki impedans eğrileri

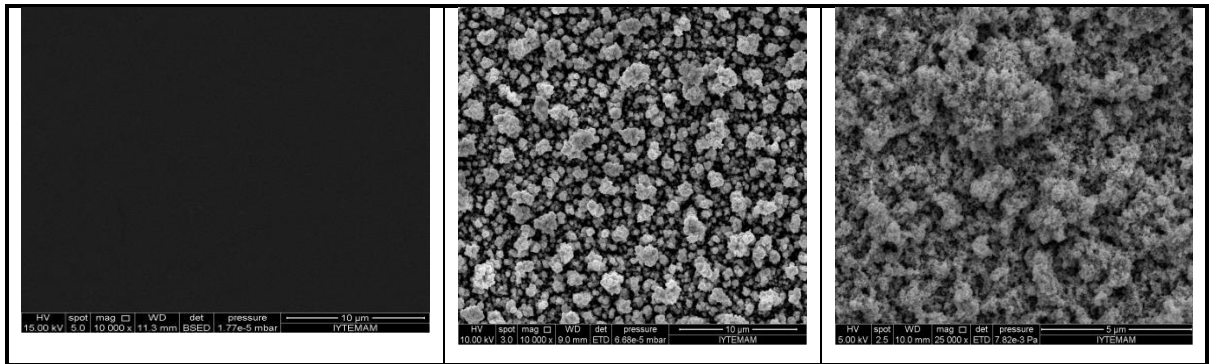
İmpedans eğrilerinin ardından, 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi ortamında 50 mV/s tarama hızında ve -0,5 ile + 0,8 V potansiyel aralığında, yalın GCE, GCE/CdS ve GCE/CdS-MAA'nın döngüsel voltammogramları alınmıştır. Çizelge 4.1.'de, her bir elektroda ait anodik ve katodik pik potansiyelleri (E_a ve E_k), pik potansiyelleri arasındaki fark (ΔE_p), anodik ve katodik pik akımları (I_{pa} ve I_{pk}) ve anodik pik akımının katodik pik akımına oranı (I_{pa}/I_{pk}) verilmiştir. ΔE_p değerlerinin yalın GCE için 103 mV, GCE/CdS için 220 mV ve GCE/CdS-MAA için ise 222 mV olarak elde edildiği çizelge 4.1.'de görülmektedir. Her bir elektrot için alınan voltammogramlardan biri Şekil 4.9.'da verilmiştir.

Şekil 4.9A'da yalın GCE ile alınan voltammogramlarda Fe^{3+}/Fe^{2+} redoks çiftine ait anodik ve katodik pikler sırasıyla yaklaşık +300 mV ve +200 mV'da belirgin bir şekilde görülmektedir. Ancak Şekil 4.9 B ve C'de görüldüğü gibi GCE/CdS ve GCE/CdS-MAA için anodik pik daha pozitif kayarken (350 mV) katodik pik daha negatif (100 mV) kaymıştır ve pik akımlarında da önemli bir düşüş gözlenmiştir. Yalın GCE ve CdS modifiye elektrotların I_{pa}/I_{pk} oranı 1'e yakın çıkmış olmasına rağmen CdS modifiye GCE'lerin pik akımları yalın GCE'ye göre önemli derecede azalmıştır. Yalın GCE'ye göre CdS modifiye elektrotların potansiyellerindeki kayma ve pik akım değerlerindeki düşme yüzeye kaplanan CdS'nin yarı iletken özelliğine bağlanmaktadır. Bu elde edilen sonuçları CdS kaplı elektrotların, yalın GCE'ye kıyasla dirençlerindeki artış da desteklemektedir.



Şekil 4.9. A) Yalın GCE B) GCE-CdS C) GCE-CdS-MAA'nın 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamında kaydedilen döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 50 mV/s

Son olarak yüzey özelliklerinin incelenebilmesi için yalın GCE ve GCE/CdS'nin SEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 4.10B'de CdS ile kaplandığında yüzeyin morfolojisinin değiştiği, 4.10A'da ise yalın GCE'nin pürüzsüz bir yüzeye sahip olduğu görülmektedir. Şekil 4.10B'de CdS noktaların yaklaşık 300-400 nm aralığında olduğu gözlenmiş ve genelde koagüle şeklinde biriktiği saptanmıştır. Bu ise istenmeyen bir durumdur. Bu durumu önlemek için CdS biriktirme aşamasında MAA kullanılmıştır. Alınan SEM görüntülerinden MAA'li ortamda elde edilen modifiye elektrodun (GCE/CdS-MAA) SEM görüntüsünün GCE/CdS'den farklı olduğu Şekil 4.10 C'de görülmektedir.



Şekil 4.10. A) Yalın GCE, B) GCE-CdS ve C) GCE-CdS-MAA'nın SEM görüntüleri

GCE yüzeyinin CdS ile kaplandığı alınan impedans, döngüsel voltammogram ve SEM görüntülerinden anlaşılmaktadır. Yüzeyin sarı bir film ile kaplandığı da gözle

görülmüştür. Şekil 4.11.'de GCE, GCE/CdS ve GCE/CdS-MAA yüzeylerinin fotoğrafları verilmiştir. GCE yüzeyi siyah iken (Şekil 4.11A), GCE/CdS yüzeyinin sarı bir filmle kaplandığı (Şekil 4.11B) ve MAA ortamında ise bu sarı filmin daha homojen olduğu (Şekil 4.11C) görülmektedir. GCE için gerçekleştirilen benzer işlemler tekrarlanarak CdS ve ardından ZnS'nin hem MWCNT/GCE hem de PGE yüzeyine modifikasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.11. A) Yalın GCE, B) GCE/CdS, C) GCE/CdS-MAA'nın fotoğrafları

4.1.4. QD Modifiye GCE'nin NADH'nin Yükseltgenmesine Yanıtı

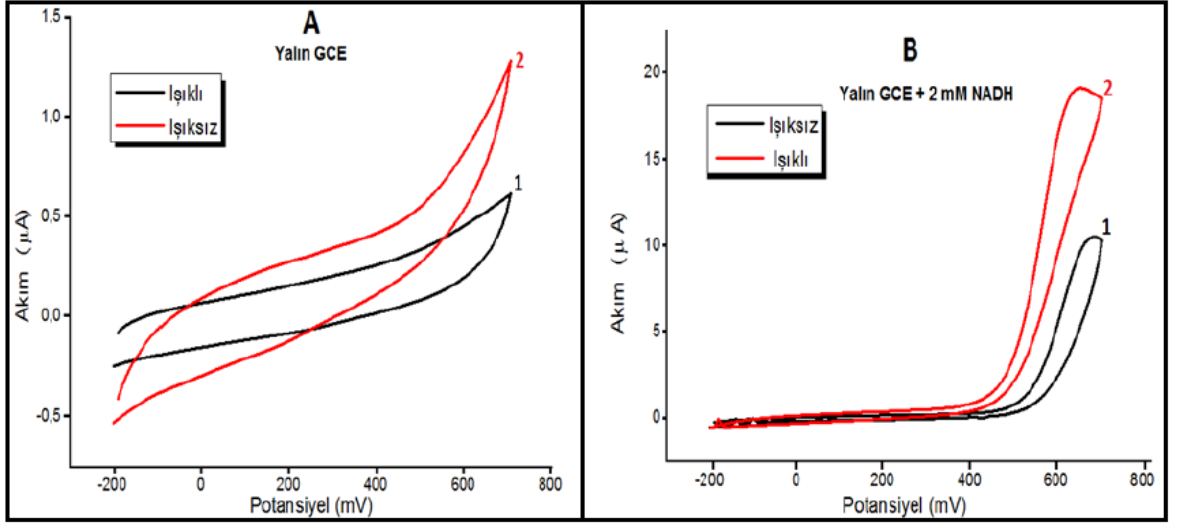
NADH'nin CdS modifiye GCE'de elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik yanıtını gözlemek için öncelikle yalın GCE'nin çalışılan destek elektrolitte (0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS'de) ışıklı ve ışıksız döngüsel voltammogramları kaydedilmiş (Şekil 4.12A) ve aynı destek elektrolite 2,0 mM olacak şekilde NADH eklenerek ışıklı ve ışıksız ortamda NADH'nin döngüsel voltammogramları kaydedilmiştir (Şekil 4.12B). Şekil 4.12A'da görüldüğü gibi GCE'nin ışıksız voltammogramında (siyah çizgili, 1) kapasitif akımın yüzeyin ışıklandırılmasıyla (kırmızı çizgili, 2) çok az arttığı tespit edilmiştir. 2,0 mM NADH ortamında alınan döngüsel voltammogramda (Şekil 4.12B, siyah çizgili,1) ise NADH'nin yalın GCE'deki yükseltgenme pikinin 680 mV da gözlemlendiği, yüzey ışıklandırıldığında ise (Şekil 4.12B, kırmızı çizgili, 2) pik potansiyelinin 650 mV'a kaydığı, pik akımının ise 11 μ A'den yaklaşık 18 μ A'e arttığı ve yalın GCE'nin de NADH'nin yükseltgenmesine bir miktar fotoelektrokatalitik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

GCE-CdS'ün de benzer şekilde döngüsel voltammogramları alınmış ve Şekil 4.13A ve B'de verilmiştir. Şekil 4.13A'da görüldüğü gibi GCE/CdS'nin döngüsel voltammogramının, yüzey ışıklandırıldığında yalın GCE'ye göre oldukça farklı olduğu tespit edilmiş ve bunun nedeninde yüzeydeki yarı iletken CdS'nin ışıkla etkileşimine bağlanmıştır. 2,0 mM NADH ortamında alınan döngüsel voltammogramda (Şekil 4.13B)

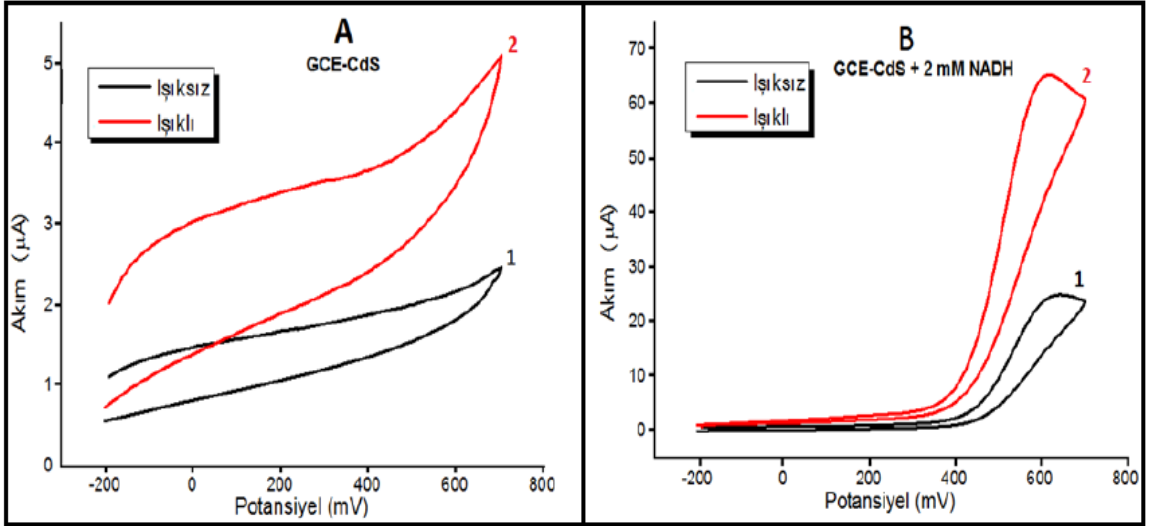
ise yine yalnız GCE'ye göre ışıkla NADH'nin yükseltgenmesine ait pik akımının daha fazla arttığı, ancak pik potansiyelinde beklenildiği gibi negatife kaymanın gözlenmediği görülmüştür. QD'lerin daha kararlı kıldığı ve boyutlarını daha küçülttüğü bilinen MAA (Salimi ve ark., 2013), GCE yüzeyine CdS biriktirilme aşamasında kullanılmıştır. Aynı şekilde GCE/CdS-MAA'nın da döngüsel voltammogramları kaydedilmiş (Şekil 4.14A ve B) ve GCE/CdS'ye oldukça yakın voltammogramlar elde edilmiştir. Bu çalışmadan beklenti NADH'nin yükseltgenmesine ait pik potansiyelinin 600-700 mV'lardan 200-300 mV değerlerine olacak şekilde negatife doğru kaydırmaktı. Ancak voltammogramlardan da görüldüğü gibi MAA kullanılan elektrotta da herhangi bir kayma gözlenmemiştir. 3 farklı yalnız ve QD modifiye GCE'lerin 2,0 mM NADH ortamında ve elektrot yüzeleri ışıklandırılarak ve ışıklandırılmadan alınan döngüsel voltammogramlardan elde edilen pik potansiyeli ve pik akım değerleri, diğer elektrotlarla (PGE, K.PGE ve GCE/MWCNT) birlikte Çizelge 4.2'de verilmiştir. GCE/CdS ya da GCE/CdS-MAA'nın yüzey ışıklandırıldığında NADH'nin yükseltgenmesine ait pik akımında ciddi artış sağladığından, NADH'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenmesinde ve NAD^+/NADH redoks çiftine dayalı biyosensör tasarımında her ne kadar potansiyel kayması gözlemlenirse de kullanılabileceği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. 2,0 mM NADH'nin döngüsel voltammogramlarından elde edilen yükseltgenme pik potansiyelleri ve akımı (n=3)

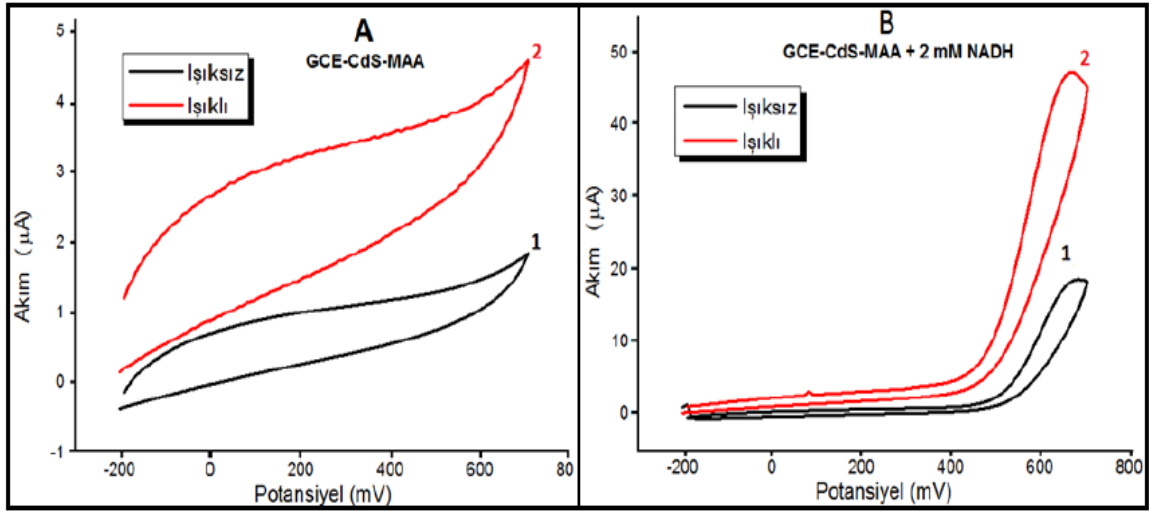
Elektrot tipi	E (mV) ışıksız	E (mV) ışıklı	Ip (μA) ışıksız	Ip (μA) ışıklı
Yalnız GCE	665±12	665±7	11,5±0,7	17,6±0,9
GCE-CdS	639±9	615±6	22±2	42±3
GCE-CdS-MAA	666±10	665±13	21±2	40±2
Yalnız-PGE	566±15	586±13	16±3	25±2
PGE-CdS	493±20	509±16	20±2	31±2
PGE-CdS-MAA	485±16	505±10	20±1	39±2
KPGE	488±5	518±5	23±2	34±3
KPGE-CdS	481±12	505±8	20±2	46±3
KPGE-CdS-MAA	483±8	510±10	22±2	48±3
MWCNT/GCE	63±2	20±3	17±1	28±3
MWCNT/GCE-CdS	61±3	32±3	28±3	46±4
MWCNT/GCE-CdS-MAA	89±3	39±3	23±4	72±8



Şekil 4.12. A) Yalın GCE'nin destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH'nin yalın GCE'deki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışksız 2) ışıklı



Şekil 4.13. A) GCE/CdS'nin destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH'nin GCE/CdS'deki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışksız 2) ışıklı



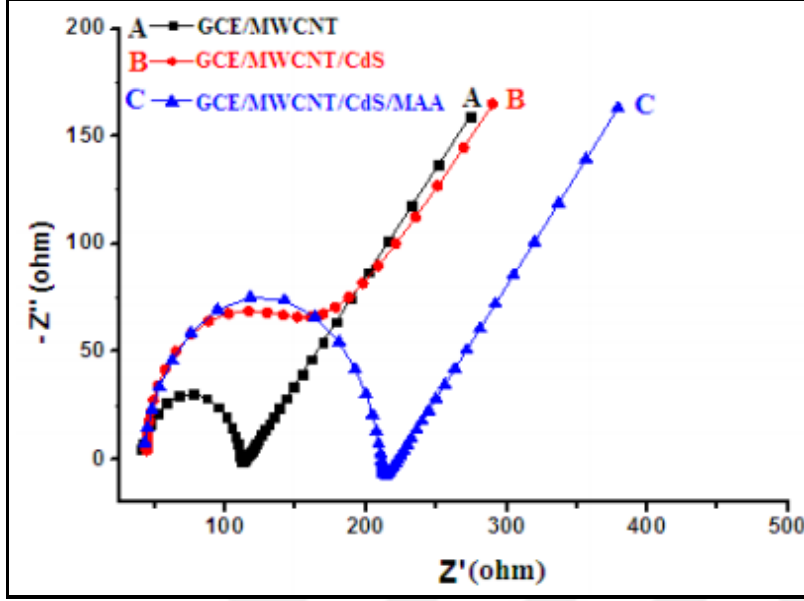
Şekil 4.14. A) GCE/CdS-MAA'nin destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH'nin GCE/CdS-MAA'daki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışksız 2) ışıklı

4.1.5. PAMAM'sız QD Modifiye GCE/MWCNT'nin Karakterizasyonu

QD modifiye GCE/MWCNT'ler materyal ve yöntem kısmında bahsedildiği şekilde hazırlanmış ve yalın GCE'de dahil olmak üzere MWCNT ve QD modifiye GCE/MWCNT'lerin impedans eğrileri ve döngüsel voltammogramları yine 0,010 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ ortamında alınmıştır. Çizelge 4.1.'de 5 farklı QD modifiye ve yalın elektrotlar için alınan impedans eğrilerinden direnç değerleri ve döngüsel voltammogramlardan $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ redoks çifti için pik potansiyelleri, pik potansiyelleri arasındaki fark (ΔE_p) ve pik akımları verilmiştir.

0,10 M KCl içeren 0,010 M $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ve 0,010 M $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ çözeltisi ortamında, MWCNT modifiye GCE ve CdS kaplı MWCNT modifiye GCE'nin impedans eğrileri Şekil 4.1'de verilen devreye göre 1 ile 150,000 Hz frekans aralığında alınmıştır. GCE/MWCNT, GCE/MWCNT/CdS ve GCE/MWCNT/CdS-MAA'ya ilişkin impedans eğrileri Şekil 4.15'de, döngüsel voltammogramları ise Şekil 4.16'da verilmiştir. Yalın GCE ve QD modifiye elektrotların impedans eğrilerinden elde edilen direnç ya da yarı daire çapı (semi circle diameter) değerleri yorumlandığında, MWCNT'nin diğer elektrotlara göre direncinin oldukça düşük olduğu (yaklaşık 122 ohm) görülmüş, bunun sebebinin ise MWCNT'nin diğer elektrotlara göre yüzey alanının daha büyük olması ve iletkenliğinin daha iyi olması şeklinde yorumlanmıştır (Suehiro ve ark., 2003; Zhao ve ark., 2005). Direnç GCE/MWCNT için (150 ohm) elektrot yüzeyi CdS ile kaplandığında hem MAA'lı hem MAA'sız ortamda yaklaşık 250 ohm'a kadar artmıştır ve GCE/MWCNT

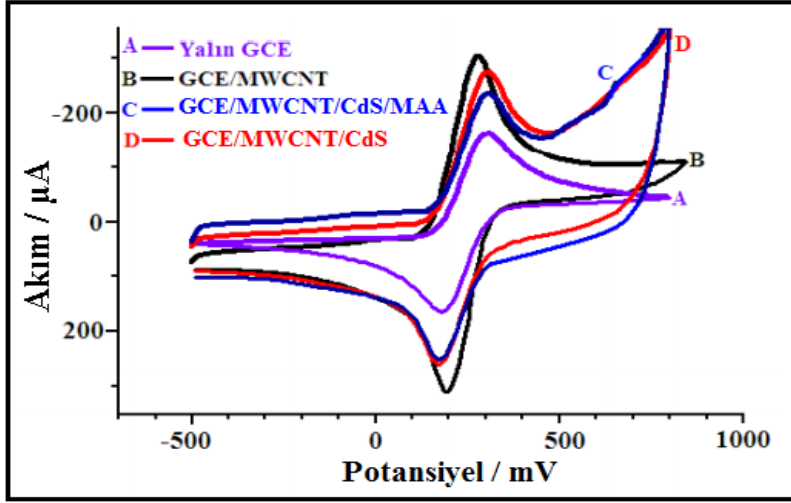
yüzeyine CdS'nin kaplandığı sonucuna varılmıştır. Elektrotlara ait Nyquist eğrileri Şekil 4.15A'da verilmiştir. Ayrıca yüzeyde belirgin sarı rengin gözlenmesi de bu sonuçları desteklemektedir.



Şekil 4.15. A) GCE/MWCNT, B) GCE/MWCNT/CdS, C) GCE/MWCNT/CdS-MAA'nın 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamında kaydedilen impedans eğrileri

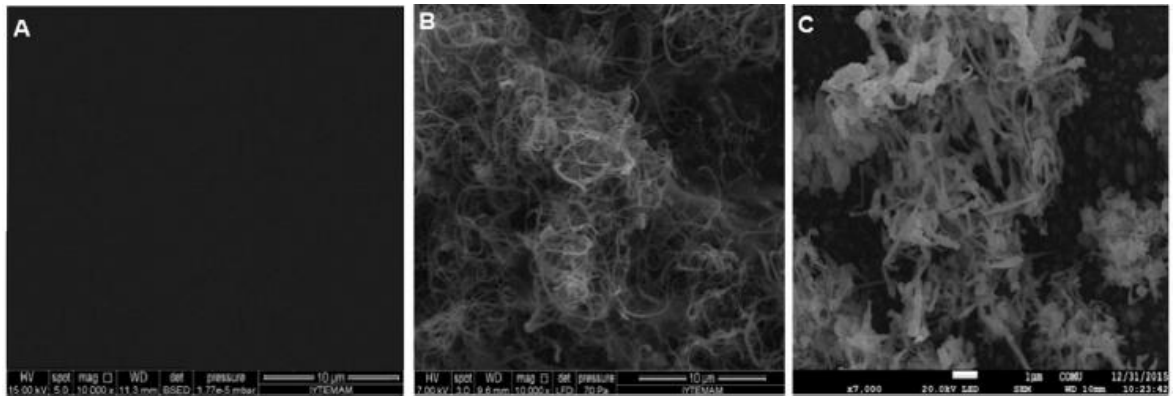
5 farklı MWCNT için alınan döngüsel voltammogramlardan elde edilen sonuçlar incelendiğinde yalnız elektrotlar arasında GCE/MWCNT'nin hem pik potansiyelleri arasındaki farkın daha az hem de pik akımlarının daha yüksek olduğu ve bu durumun impedans eğrileri ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Bu durum Çizelge 4.1.'de özetlenmiştir. CdS ile yüzey modifiye edildiğinde pik akımlarının azaldığı ve ΔE_p değerlerinin arttığı gözlenmiş bu sonuç ise CdS'ün yarı iletken özelliğine bağlanmıştır (Çizelge 4.1.). Her bir elektrot için örnek bir şekil, Şekil 4.16'da verilmiştir. Şekil 4.16A'da yalnız GCE'nin döngüsel voltammogramı, Şekil 4.16B'de ise GCE/MWCNT'nin döngüsel voltammogramı verilmiştir. Şekilden, MWCNT ile elde edilen voltammogramların hem pik akımlarının daha yüksek hem de pik potansiyelleri arasındaki farkın daha az olduğu ve bu durumun impedans eğrileri ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. GCE/MWCNT için Fe^{3+}/Fe^{2+} redoks çiftine ait anodik ve katodik pikler Şekil 4.16B'de sırasıyla yaklaşık +280 mV ve +210 mV'da belirgin bir şekilde gözlenmiştir. Ancak GCE/MWCNT/CdS ve GCE/MWCNT/CdS-MAA için anodik pik daha pozitif kayarken (310 mV) katodik pik daha

negatife (190 mV) kaymıştır (Şekil 4.16C ve D). Yüzeğe kaplanan CdS'ün yarı iletken özelliği potansiyellerdeki bu kaymaya sebep olmaktadır. Bu sonuçları, İmpedans eğrilerinde CdS kaplı elektrodun direncinin artması da desteklemektedir.



Şekil 4.16. A)Yalın GCE, B) GCE/MWCNT, C) GCE/MWCNT/CdS, D) GCE/MWCNT/CdS-MAA'nın 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamında kaydedilen döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 50 mV/s

Son olarak yüzey özelliklerinin incelenebilmesi için yalın GCE, GCE/MWCNT ve GCE/MWCNT/CdS'nin SEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 4.17B'de MWCNT ile kaplandığında yüzeyin morfolojisinin değiştiği, 4.17A'da ise yalın GCE'nin pürüzsüz bir yüzeğe sahip olduğu görülmektedir. Ancak MAA'lı ortamda CdS biriktirildiğinde yüzeğe noktacıklar halinde CdS'nin birikimine ait bir görüntü elde edilmiştir (Şekil 4.17C).

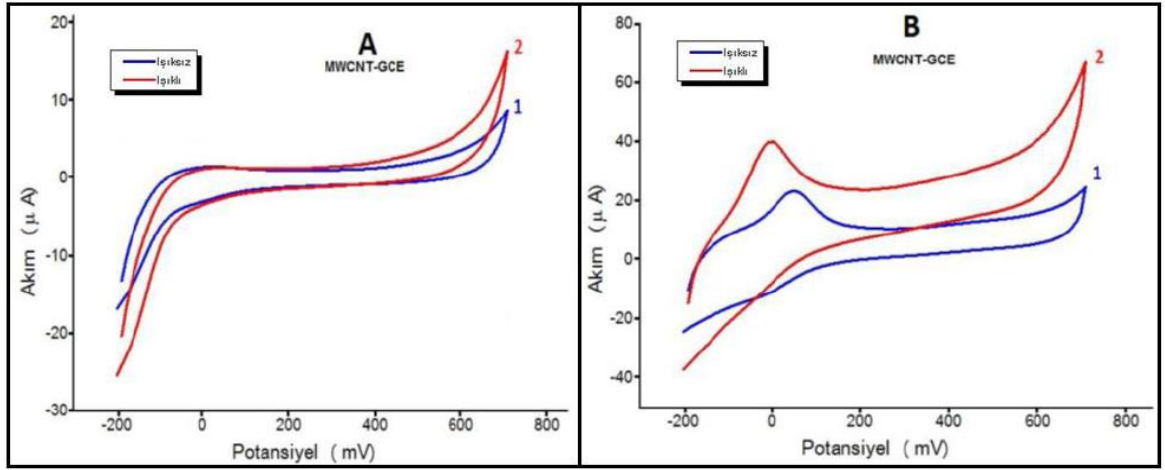


Şekil 4.17. A) Yalın GCE, B) GCE/MWCNT C) GCE/MWCNT/CdS-MAA'nın SEM görüntüleri

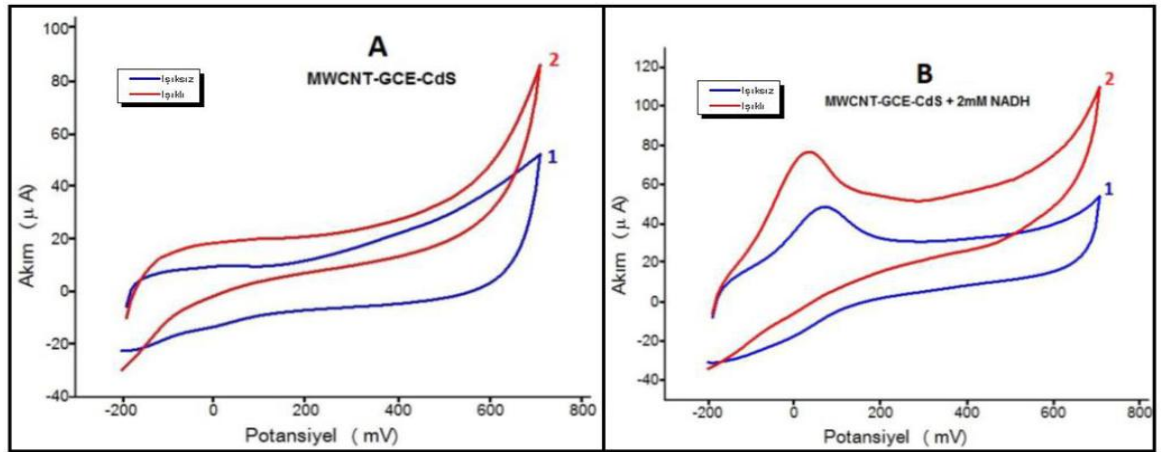
4.1.6. QD Modifiye GCE/MWCNT'nin NADH'nin Yükseltgenmesine Yanıtı

NADH'nin CdS modifiye GCE/MWCNT'de elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik yanıtını gözlemek ve GCE, PGE ve K.PGE ile elde edilen verileri karşılaştırmak için öncelikle GCE/MWCNT'nin 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS'de ışıklı ve ışısız döngüsel voltammogramları kaydedilmiş (Şekil 4.18A) ve aynı destek elektrolite 2,0 mM olacak şekilde NADH eklenerek ışıklı ve ışısız ortamda NADH'nin döngüsel voltammogramları kaydedilmiştir (Şekil 4.18B). Şekil 4.18A'da görüldüğü gibi GCE/MWCNT'nin ışısız voltammogramında (mavi çizgili), elde edilen kapasitif akımın yüzey ışıklandırıldığında çok az miktarda (kırmızı çizgili) arttığı tespit edilmiştir. 2,0 mM NADH ortamında alınan döngüsel voltammogramda (Şekil 4.18B, mavi çizgili) ise NADH'nin yükseltgenme pikinin yaklaşık 50 mV'da gözlemlendiği, yüzey ışıklandırıldığında ise (Şekil 4.18B, kırmızı çizgili) pik potansiyelinin 0 mV'a kaydığı ve pik akımının ise yaklaşık 21 μA 'den yaklaşık 38 μA 'e arttığı ve GCE/MWCNT'nin de NADH'nin yükseltgenmesine fotoelektrokatalitik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer elektrotlarla (GCE, PGE ve K.PGE) ile karşılaştırıldığında GCE/MWCNT'nin NADH'nin yükseltgenme pik potansiyelini oldukça negatife kaydırıldığı (yaklaşık 50 mV) ve pik akımının da oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir.

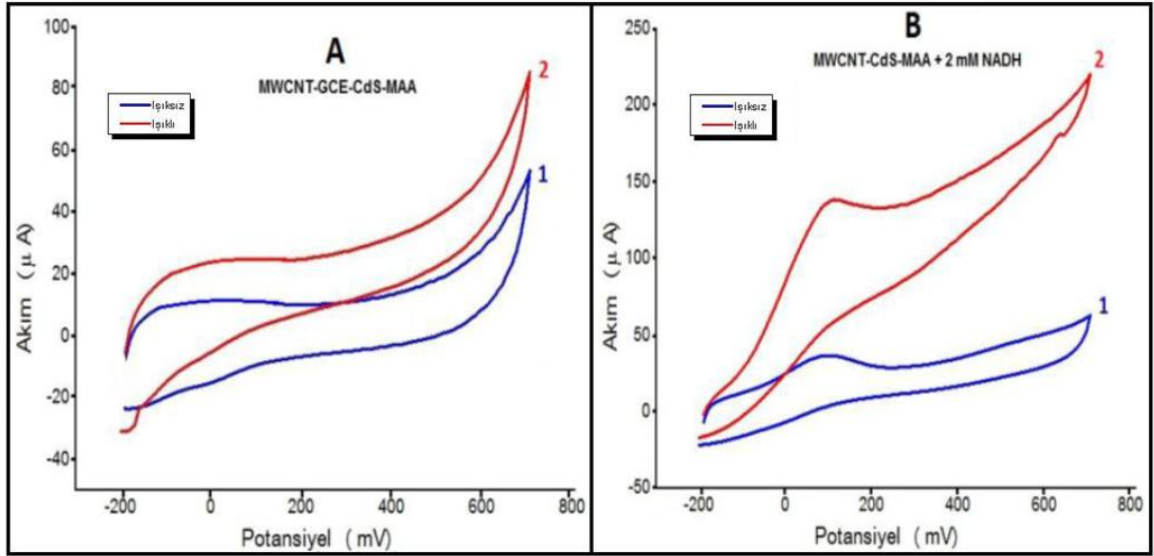
CdS kaplı modifiye elektrotlardan GCE/MWCNT/CdS ile GCE/MWCNT/CdS-MAA'nın döngüsel voltammogramına ışığın etkisinin yine GCE ve PGE'de olduğu gibi kapasitif akımı artırma şeklinde olduğu Şekil 4.19A ve Şekil 4.19A'dan görülmektedir. Bu elektrotlarla NADH'nin döngüsel voltammogramı kaydedildiğinde ise NADH'nin yükseltgenmesine ait pik akımının ışıkla arttığı ve pik potansiyelinin yaklaşık 100 mV'da olduğu Şekil 4.18B ve 4.19 Şekil 4.20B'den görülmektedir. En büyük artışın MAA'lı ortamda hazırlanan elektrotla alınması MAA'nın MWCNT'teki etkinliğinin daha fazla olduğunu yansıtmaktadır.



Şekil 4.18. A) GCE/MWCNT'nin destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH'nin GCE/MWCNT'deki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışksız 2) ışıklı



Şekil 4.19. A) GCE/MWCNT/CdS'nin destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH'nin GCE/MWCNT/CdS'deki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışksız 2) ışıklı



Şekil 4.20. A) GCE/MWCNT/CdS-MAA'nın destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH'nin GCE/MWCNT/CdS-MAA'deki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışısız 2) ışıklı

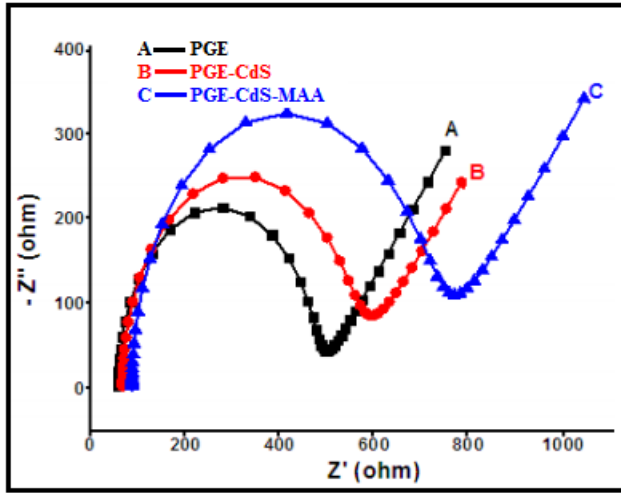
Sonuç olarak NADH'nin elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik yanıtı için dört farklı elektrot için alınan değerler Çizelge 4.2'de verilmiştir. Bu çizelgede de görüldüğü gibi, NADH'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenmesinde hem akım artışı hem de potansiyel kayması açısından en uygun QD modifiye elektrodun GCE/MWCNT olduğu, bununla birlikte K.PGE'nin de akım artışı açısından oldukça kullanışlı ve yararlı (tek kullanımlı ve ucuz olması açısından) bir elektrot materyali olarak kullanılabileceği ortaya çıkmıştır.

4.1.7. PAMAM'sız QD Modifiye PGE'nin Karakterizasyonu

Modifiye PGE'ler, Materyal ve Yöntem bölümünde bahsedildiği gibi bir ön koşullandırma işlemi (pH 7,0 BRT'de 60 s 1,45 V kronoamperometri uygulama) uygulanarak (koşullandırılmış PGE, K.PGE) ve uygulanmaksızın (yalın PGE) iki şekilde kullanılmıştır. PGE ile CdS biriktirmede CdS'nin oluştuktan sonra çözeltiye katmanlar halinde salındığı gözlenmiştir. Bu durumu minimize etmek için CdS biriktirme işleminde daha önce kullanılan 15 °C olarak kullanılan ortam sıcaklığı 25 °C olarak değiştirilmiştir.

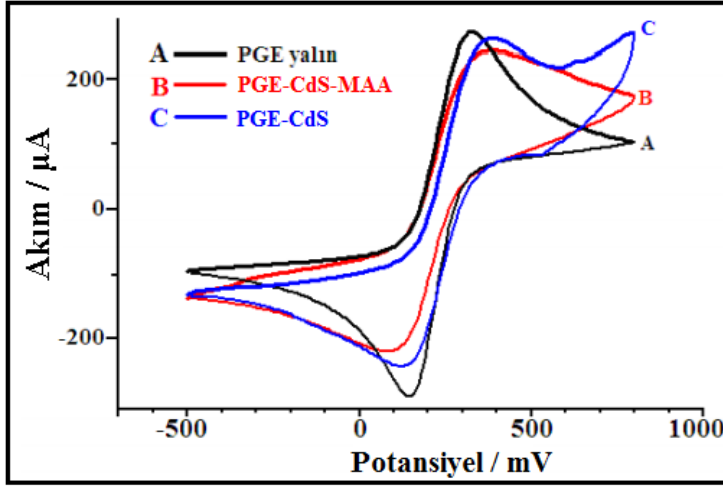
0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi ortamında Şekil 4.1'de verilen devreye göre sırasıyla yalın PGE, PGE/CdS ve PGE/CdS-MAA için impedans eğrileri alınmış ve 5 farklı elektrot için elde edilen direnç değerlerinin ortalaması her bir elektrot için Çizelge 4.1'de verilmiştir. Direnç değerleri yalın PGE, PGE-CdS ve PGE-CdS-MAA için sırasıyla yaklaşık 503, 632 ve 783 ohm bulunmuştur. Beklendiği gibi

CdS kaplandığında elektrot yüzeylerinin direnci yalnız PGE'ye göre artmıştır. Her bir elektrodun impedans çalışmalarından elde edilen Nyquist eğrileri Şekil 4.21'de verilmiştir.



Şekil 4.21. A) Yalnız PGE, B) PGE-CdS, C) PGE-CdS-MAA'nın 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamındaki impedans eğrileri

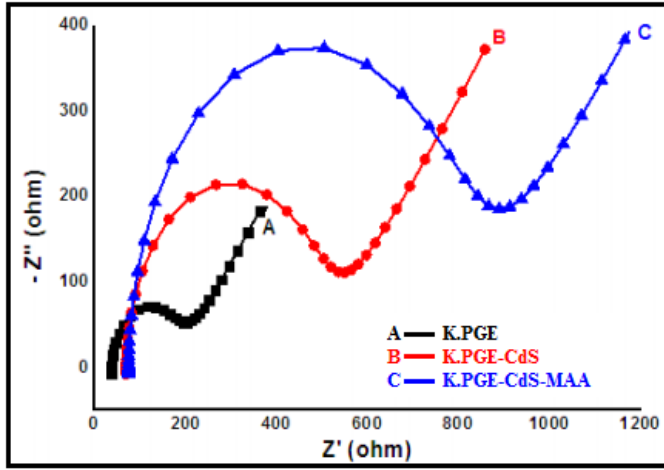
0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi ortamında 50 mV/s tarama hızında ve -0,5 ile + 0,8 V potansiyel aralığında yalnız PGE, PGE/CdS ve PGE/CdS-MAA'nın döngüsel voltammogramları alınmıştır. Elde edilen pik akımları, pik potansiyelleri arasındaki fark (ΔE_p) ve pik potansiyelleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde, CdS modifiye elektrotlardaki pik akımlarının yalnız PGE'ye göre düştüğü, elektrotlardaki pik potansiyelleri arasındaki farkın ise arttığı görülmektedir. Şekil 4.22'de her bir elektrot için kaydedilen voltammogramlardan biri verilmiştir. Sonuçların impedans eğrileri ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.22. A) Yalın PGE, B) PGE-CdS, C)PGE-CdS-MAA'nın 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamında kaydedilen döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 50 mV/s

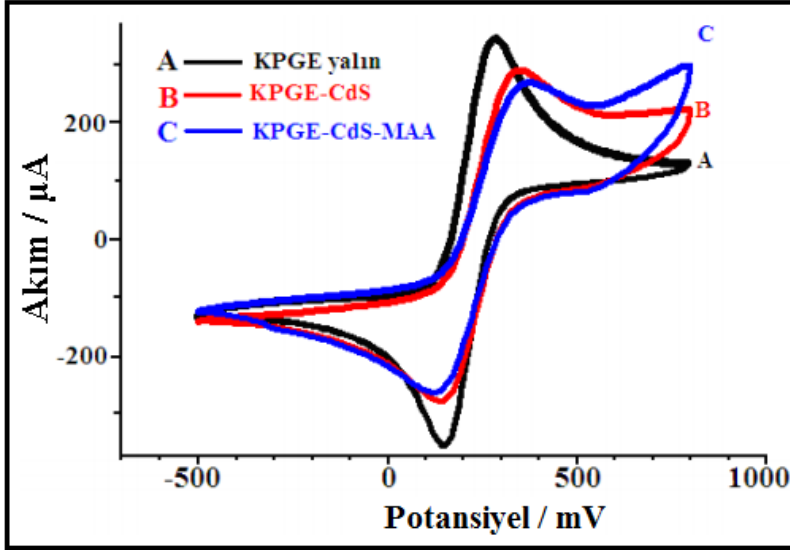
0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi ortamında, sırasıyla yalın K.PGE, K.PGE/CdS ve K.PGE/CdS-MAA'nın impedans eğrileri Şekil 4.1'de verilen devreye göre alınmıştır. K.PGE ve PGE'nin impedans eğrilerinden elde edilen direnç ya da yarı daire çapı değerleri yorumlandığında, K.PGE'nin direncinin (220 ohm) yalın PGE'ye göre oldukça düşük olduğu (yaklaşık 300 ohm) görülmüştür. Bu sonuçlar PGE'ye göre K.PGE yüzeyinin iletkenliğinin arttığını göstermektedir. K.PGE yüzeyine CdS biriktirildiğinde ise direncin yarı iletken CdS'den dolayı yine arttığı (K.PGE/CdS için yaklaşık 555 ohm iken K.PGE/CdS-MAA için yaklaşık 897 ohm) gözlenmiştir. Her bir elektrot için örnek bir Şekil 4.23'de verilmiştir.

Yalın elektrot için elde edilen impedans eğrilerinin direnci (220 ohm), beklenildiği gibi CdS modifiye elektrotlara göre düşüktür (Şekil 4.123A). Elektrot yüzeyi CdS ile kaplandığında (K.PGE/CdS) direncin arttığı (yaklaşık 550 ohm) Şekil 4.23B'de gözlenmiştir. Şekil 4.23C'de CdS-MAA ile kaplı elektrodun impedans eğrisi verilmiştir. Buradan direncin 900 ohm'a kadar arttığı gözlenmektedir.



Şekil 4.23. A) K.PGE, B) K.PGE/CdS, C) K.PGE/CdS-MAA'nın 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamındaki impedans eğrileri

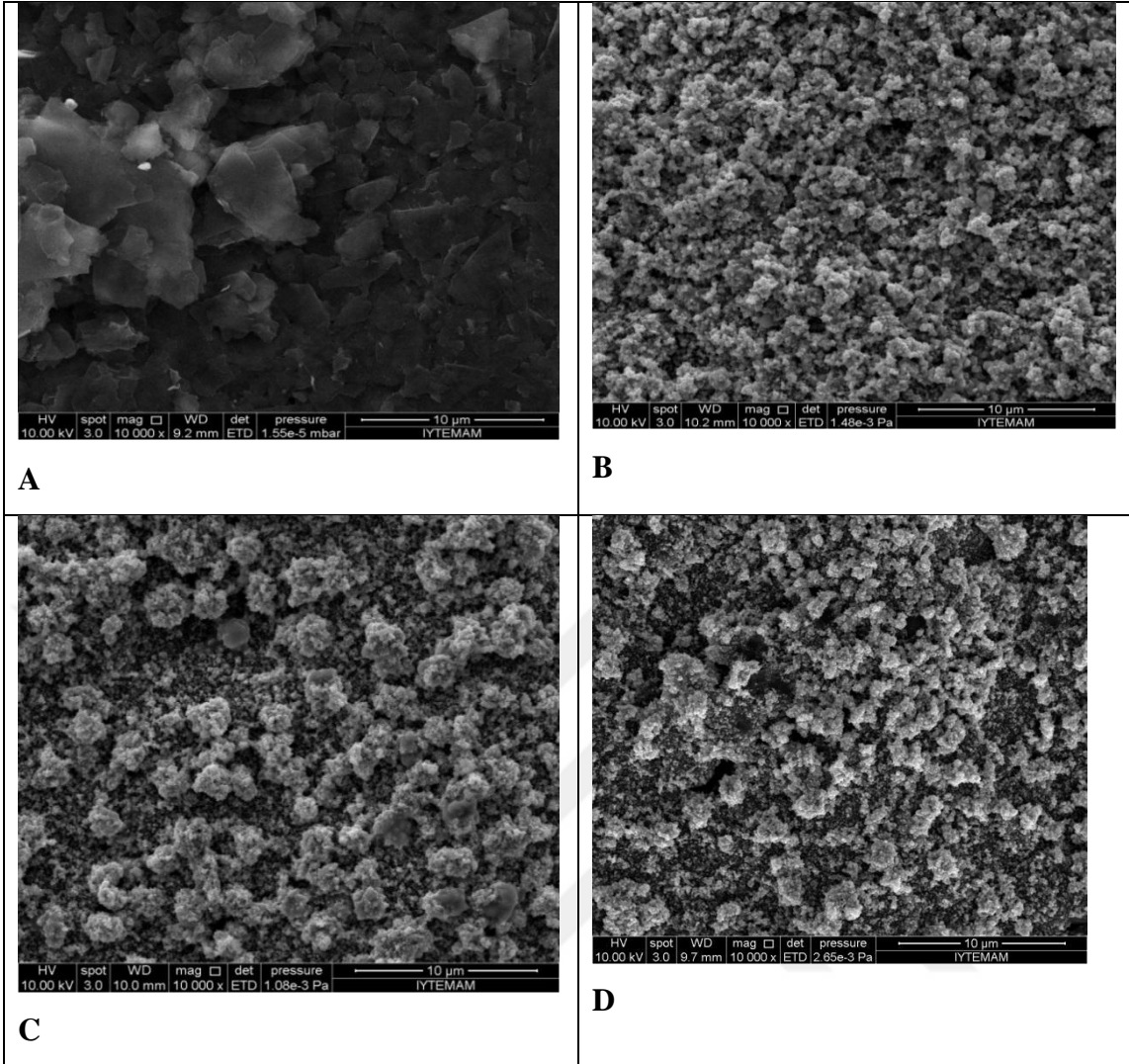
5 farklı elektrot için alınan döngüsel voltammogramlardan elde edilen sonuçlar incelendiğinde ΔE_p değerleri K.PGE, KPGE/CdS ve K.PGE/CdS-MAA için sırasıyla 133, 208 ve 214 mV bulunmuş ve pik akımlarının CdS kaplı elektrotlarda önemli ölçüde düştüğü gözlenmiştir. Sonuçların impedans eğrileri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Her bir elektrot için örnek bir voltammogram Şekil 4.24'de verilmiştir. Yalın K.PGE için Fe^{3+}/Fe^{2+} redoks çiftine ait anodik ve katodik pikler Şekil 4.24A'da sırasıyla yaklaşık +280 mV ve +160 mV'da belirgin bir şekilde gözlenmiştir. Ancak K.PGE/CdS ve K.PGE/CdS-MAA için anodik pik daha pozitive kayarken (370 mV) katodik pik daha negatife (180 mV) kaymıştır (Şekil 4.24B ve C). Yüze kaplanan CdS'ün yarı iletken özelliği potansiyellerdeki bu kaymaya sebep olmaktadır. Bu sonuçları, impedans eğrilerinde CdS kaplı elektrodun direncinin artması da desteklemektedir.



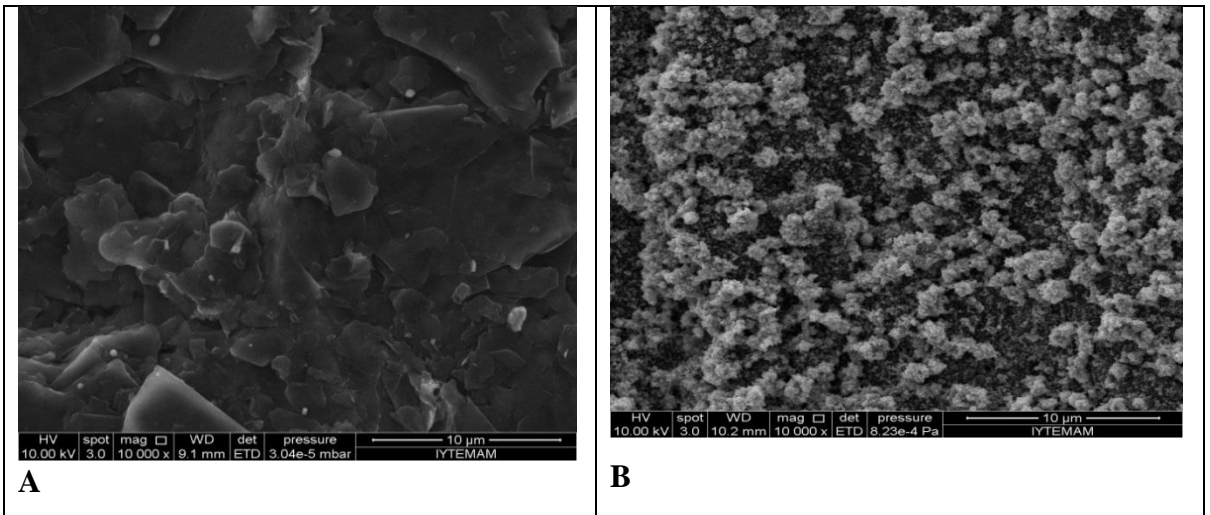
Şekil 4.24. A) K.PGE, B) K.PGE-CdS, C)K.PGE-CdS-MAA'nın 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,010 M $K_3Fe(CN)_6$ ortamında kaydedilen döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 50 mV/s

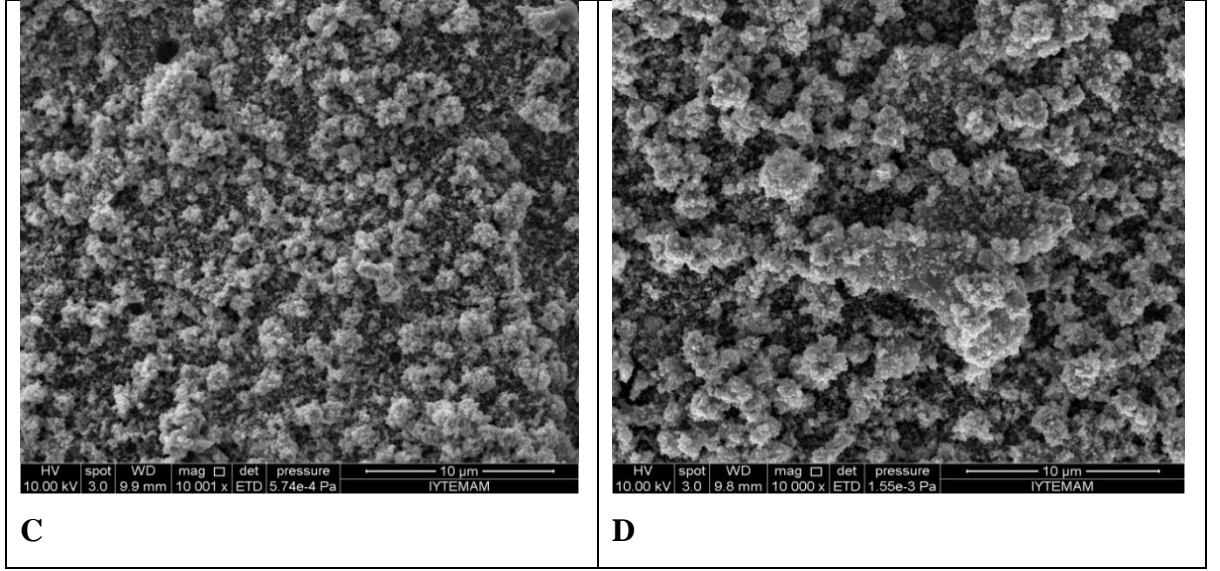
Son olarak PGE (Şekil 4.25) ve (K.PGE Şekil 4.26.) ile elde edilen QD modifiye elektrotların SEM görüntüleri yalın elektrotlarla beraber alınarak yüzey morfolojileri ve aralarındaki farklar değerlendirilmiştir. Şekil 4.25A'da yalın PGE ile Şekil 4.25B'de CdS kaplı PGE görülmekte ancak biriken CdS'lerin koagüle olduğu gözlenmiştir. Bu durumu önlemek için MAA'li ortamda elektrodun (PGE/CdS-MAA) SEM görüntüsü (Şekil 4.25C) alınarak koagülasyonun bir miktar azaltılmıştır. Alınan impedans eğrileri ve döngüsel voltammogramlar ile SEM görüntülerinin uyumlu olduğu gözlenmiştir. Son olarak elektrokimyasal biyosensör çalışmalarında daha kararlı sonuçlar veren PGE/CdS-ZnS-MAA'nın da SEM görüntüsü alınmış ve Şekil 4.25D'de verilmiştir. Bu elektrodun da PGE/CdS ve PGE/CdS-MAA'ya göre farklı olduğu gözlenmiştir.

Şekil 4.26'da ise K.PGE ile alınan SEM görüntüleri verilmiştir. Şekil 4.26A'da K.PGE'nin CdS ile kaplandığında (Şekil 4.26B) ise yüzeyin morfolojisinin yalın K.PGE'ye göre değiştiği gözlenmiştir. Şekil 4.26B'de CdS noktaların PGE yüzeyinde bölgesel olarak koagüle şeklinde biriktiği görülmektedir (Wang ve ark., 2002; Xu ve ark., 2004). MAA ortamında elde edilen elektrodun (K.PGE/CdS-MAA, Şekil 4.26 C) SEM görüntüsünün PGE'de elde edilen SEM görüntüsüne benzer olduğu gözlenmiştir. Son olarak da K.PGE/CdS-ZnS-MAA'nın SEM görüntüsü Şekil 4.26D'de verilmiş ve diğerlerinden farklı olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.25. A) Yalnız PGE, B) PGE/CdS, C) PGE/CdS-MAA, D) PGE/CdS-ZnS-MAA'nın SEM görüntüleri





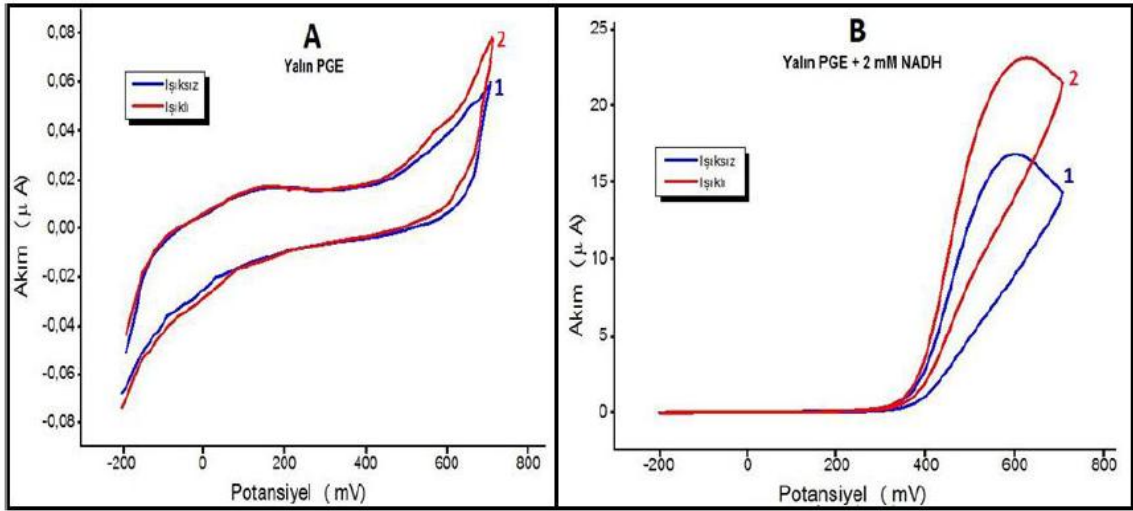
Şekil 4.26. A) Yalın K.PGE, B) K.PGE/CdS C) K.PGE/CdS-MAA D) K.PGE/CdS-ZnS-MAA'nın SEM görüntüleri

4.1.8. QD Modifiye PGE'nin NADH'nin Yükseltgenmesine Yanıtı

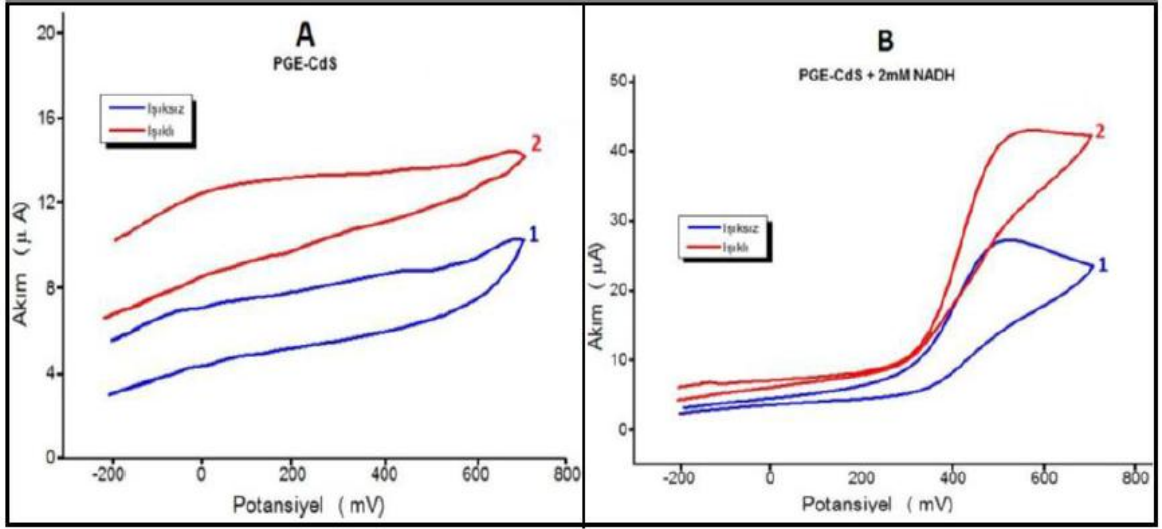
PGE ile yapılan çalışmalar yine koşulsuz ve koşullu PGE olacak şekilde iki farklı modifikasyonla gerçekleştirilmiştir. NADH'nin CdS modifiye PGE'de elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik yanıtını gözlemek ve GCE ile elde edilen verileri karşılaştırmak için öncelikle herhangi bir ön işlem görmemiş yalın PGE'nin 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS'de ışıklı ve ışısız döngüsel voltammogramları (Şekil 4.27A) ve daha sonra aynı destek elektrolite 2,0 mM olacak şekilde NADH eklenerek ışıklı ve ışısız ortamda döngüsel voltammogramları kaydedilmiştir (Şekil 4.27B). Şekil 4.27A'da görüldüğü gibi yalın PGE'nin ışısız voltammogramı (mavi çizgili, 1) ile yüzey ışıklandırıldığında kaydedilen döngüsel voltammogramda (kırmızı çizgili, 2) herhangi bir değişikliğin olmadığı tespit edilmiştir. 2,0 mM NADH ortamında alınan döngüsel voltammogramda (Şekil 4.27B, mavi çizgili, 1) ise NADH'nin yalın PGE'deki yükseltgenme pikinin 600 mV'da gözlemlendiği, ancak yüzey ışıklandırıldığında (Şekil 4.27B, kırmızı çizgili, 2) pik potansiyelinin değişmediği, pik akımının ise yaklaşık 17 μ A'dan yaklaşık 23 μ A'a arttığı ve yalın PGE'nin de NADH'nin yükseltgenmesine bir miktar fotoelektrokatalitik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

PGE/CdS'ün ve PGE/CdS-MAA'nın da benzer şekilde döngüsel voltammogramları alınmış ve sırasıyla Şekil 4.19A-B ile Şekil 4.20A-B'de verilmiştir. Hem PGE/CdS'nin (Şekil 4.28A) hem de PGE/CdS-MAA'nın (Şekil 4.29) döngüsel voltammogramlarının yüzey ışıklandırıldığında önemli derecede arttığı gözlemlenmiş ve bu durumun yine yarı

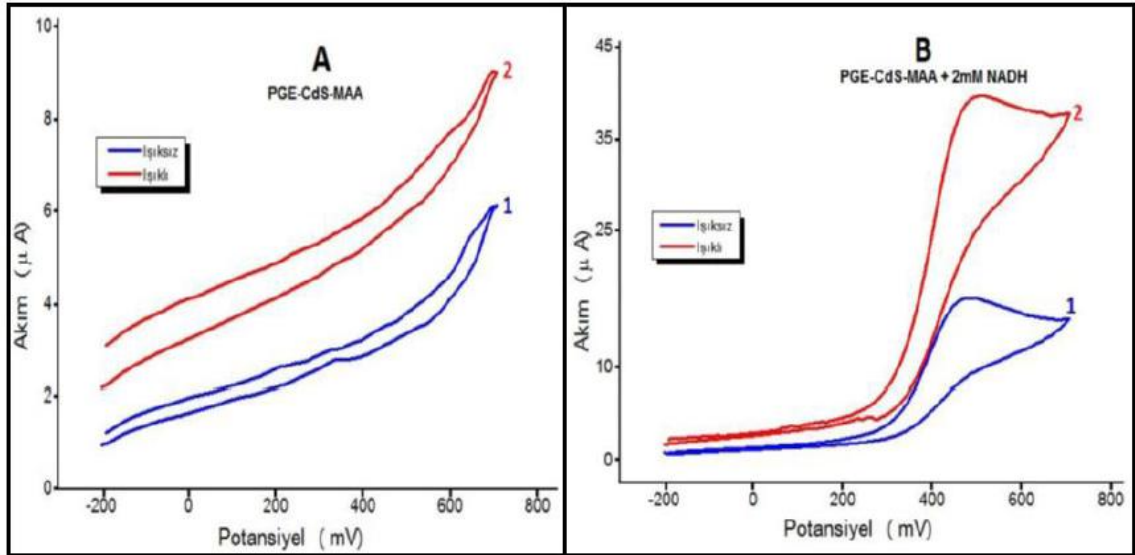
iletken CdS'nin ışıkla etkileşiminden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Aynı elektrotların 2,0 mM NADH ortamında alınan döngüsel voltammogramları incelendiğinde NADH'nin PGE/CdS'de (Şekil 4.28B) yaklaşık 520 mV'da, PGE/CdS-MAA'da (Şekil 4.29B) ise 480 mV'da yükseltendiği ve ışıkla pik akımlarının yaklaşık 2-2,5 kat arttığı gözlenmiştir. PGE'nin GCE'ye göre hem pik potansiyelini bir miktar daha negatife kaydırıldığı hem de pik akımında artış sağladığı göz önüne alındığında GCE'ye göre daha avantajlı bir elektrot olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.27. A) Yalın PGE'nin destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH'nin yalın PGE'deki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışısız 2) ışıklı



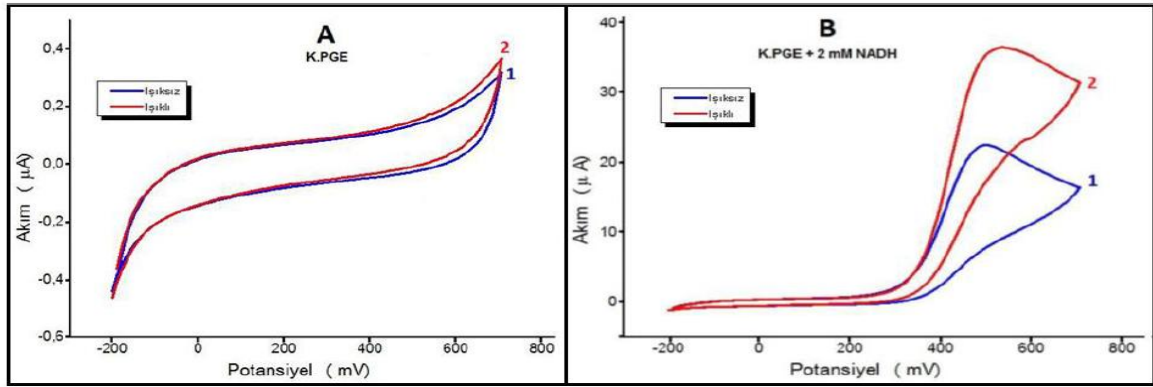
Şekil 4.28. A) PGE/CdS'nin destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH'nin PGE/CdS'deki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışiksiz 2) ışıklı



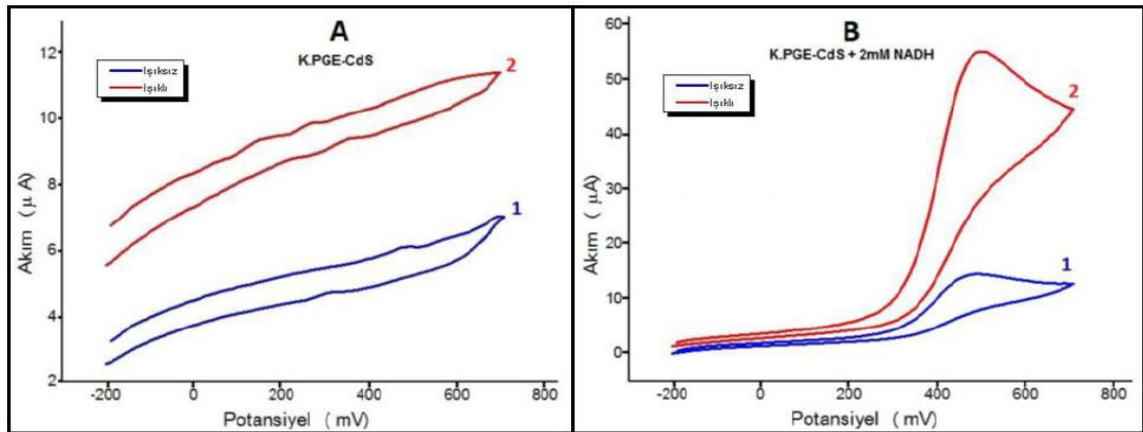
Şekil 4.29. A) PGE/CdS-MAA'nin destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH'nin PGE/CdS-MAA'daki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışiksiz 2) ışıklı

K.PGE'nin de benzer şekilde voltammogramları alınmış ve sırasıyla Şekil 4.30, 4.31 ve 4.32'de verilmiştir. Şekil 4.30A'da görüldüğü gibi K.PGE'nin voltammogramına ışığın herhangi bir etki etmediği, ancak K.PGE/CdS (Şekil 4.31) ve K.PGE/CdS-MAA (Şekil 4.32A) ışıkla voltammogramlarının farklandığı tespit edilmiştir. K.PGE'de NADH'nin döngüsel voltammogramında NADH'ye ait yükseltgenme pik akımı ışıkla yine artmış ve

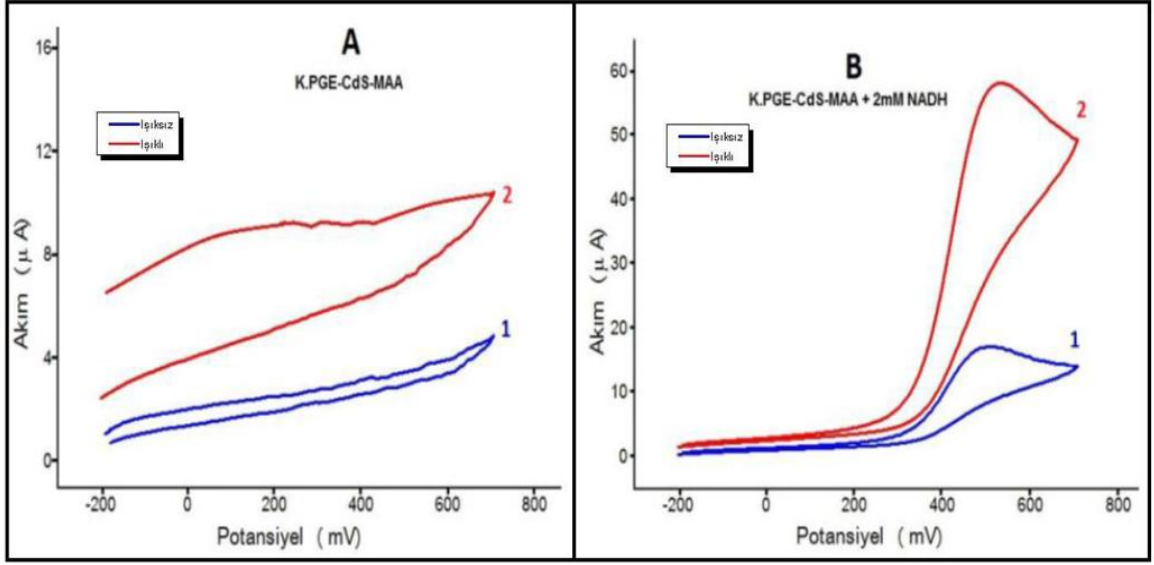
yalın PGE’de 600 mV’daki yükseltgenme pikinin K.PGE’de 500 mV’da gözleendiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte CdS modifiye elektrotlardan hem K.PGE/CdS (Şekil 4.31B) hem de K.PGE/CdS-MAA’nın (Şekil 4.32B) ışıklı ortamda NADH’ye yanıtının koşullandırılmamış PGE’ye göre oldukça iyi olduğu sonucuna varılmıştır. PGE yüzeyinin 1,45 V da 60 s kronoamperometri uygulanarak koşullandırılmasıyla hem yüzeydeki safsızlıklar giderilmiş hem de yüzeyde karbosiklik asit grupları elde edilerek yüzey aktive edilmiştir. Bu yüzden normal koşullandırılmamış PGE’de CdS biriktirilirken, biriken CdS’lerin yüzeyden ayrıldığı ancak K.PGE’de ise daha az ayrıldığı gözlenmiştir.



Şekil 4.30. A) K.PGE’nin destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH’nin K.PGE’deki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışısız 2) ışıklı



Şekil 4.31. A) K.PGE-CdS’nin destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH’nin K.PGE/CdS’deki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışısız 2) ışıklı



Şekil 4.32. A) K.PGE/CdS-MAA'nın destek elektrolitteki ve B) 2,0 mM NADH'nin K.PGE/CdS-MAA'daki döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS; 1) ışksız 2) ışıklı

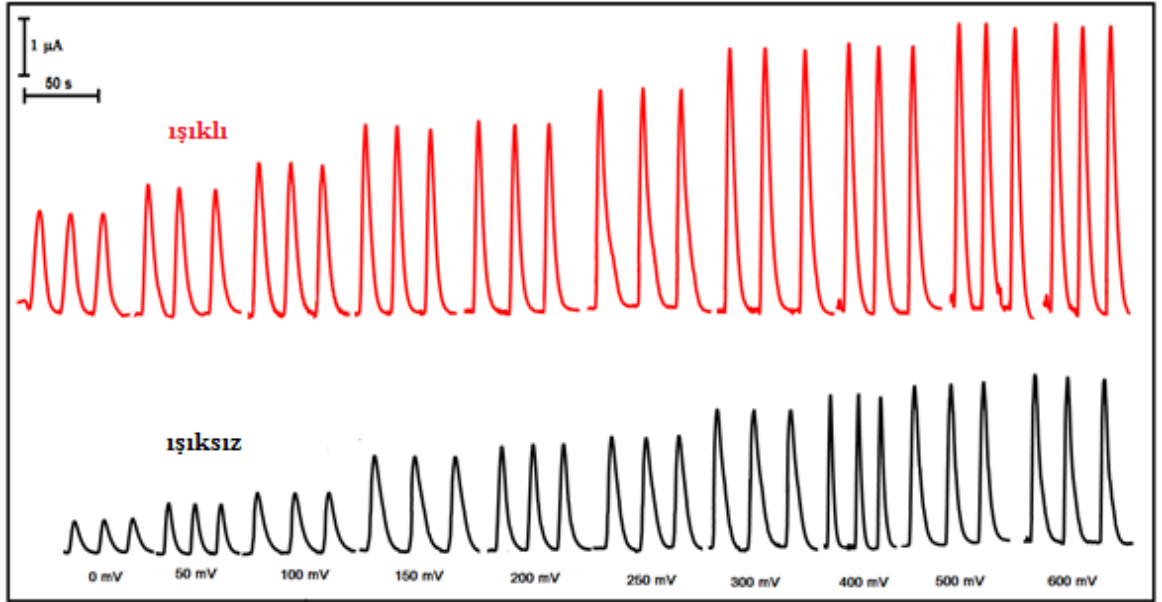
4.2. QD Modifiye Elektrotlarla FIA Sisteminde NADH'nin Amperometrik ve Fotoamperometrik Yükseltgenmesi

FIA sisteminde hem K.PGE/CdS hem de GCE/MWCNT/CdS sırasıyla Şekil 3.2 ve 3.3'de verilen fotoelektrokimyasal akış hücreleri ile birlikte kullanılarak NADH'nin elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik yükseltgenmesine ilişkin öndeneyle gerçekleştirilmiştir. Ancak, FIA sisteminde yüzeyden akış nedeniyle zamanla CdS yüzeyden azaldığı ve yüzeyin uzun süre ışıklandırılması nedeniyle fotobozunmaya uğradığı ve elde edilen NADH piklerinin tutarsız olduğu gözlenmiştir. Bu amaçla yüzeydeki CdS'nin akışa ve fotobozunmaya karşı daha dirençli olması için yüzeye CdS'den sonra ZnS biriktirilerek çekirdek-kabuk (core-shell) şeklinde yüzey daha kararlı hale getirilmiştir. Akış sisteminde, elektrot yüzeyinde biriktirilen kuantum nanopartiküllerin taşıyıcı elektrolitle sürüklenip gitmesini engellemek için elektrot yüzeyine 3 µL % 0,025 nafyon damlatılarak oda koşullarında kurumaya bırakılmıştır. Bu işlemlerden sonra NADH'nin pik akımları daha kararlı elde edilmiştir. Bu nedenlerden ötürü, bundan sonraki çalışmalarda K.PGE/CdS-ZnS-MAA-Nf ve GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf FIA sisteminde kullanılmıştır.

4.2.1. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf İle İlgili Çalışmalar

FIA sisteminde GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf'nin NADH'ye verdiği en iyi amperometrik ve fotoamperometrik yanıtı elde etmek için sırasıyla uygulama potansiyeli, akış hızı parametreleri optimize edildi. Öncelikle 1,3 mL/dk akış hızı, 100 µL örnek yükleme hacmi ve 10 cm kolon uzunluğunda çalışıldı. 1,0 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 PBS taşıyıcı elektrolitine, yatışkan hal akımı elde edildikten sonra 0,10 mM NADH enjekte edilerek farklı potansiyelerde akım-zaman eğrileri GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf için kaydedilerek en uygun uygulama potansiyeli belirlendi.

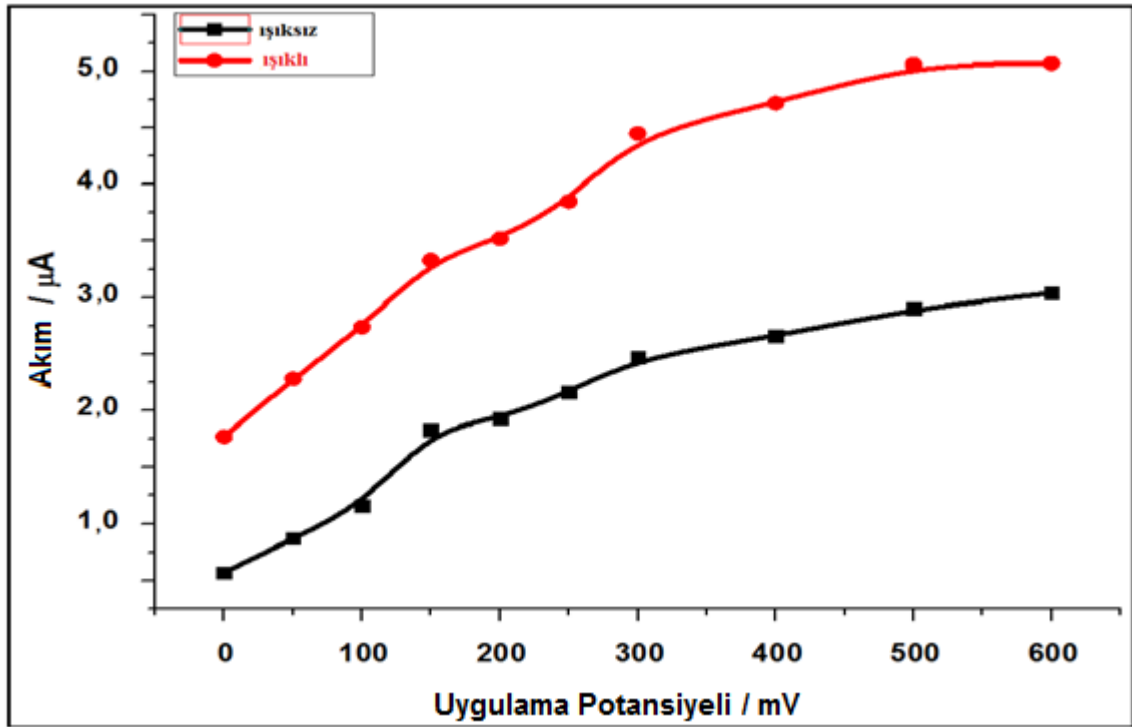
Şekil 4.33 GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak 0 ile +600 mV arasında değişen uygulama potansiyellerinde 0,10 mM NADH için elde edilen fiagramları göstermektedir. Bu Şekillerden, hem amperometrik hem de fotoamperometrik akım değerleri hesaplanmış ve bu değerlerin uygulama potansiyeline karşı çizilen grafikleri Şekil 4.34'de verilmiştir.



Şekil 4.33. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak farklı uygulama potansiyellerinde 0,10 mM NADH için elde edilen fiagramlar. (akış hızı: 1,3 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL ve kolon uzunluğu: 10 cm, taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS)

GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf'de hem elektrokatalitik hem de fotoelektrokatalitik akım düşük potansiyelerde gözlenmiş ve yaklaşık 150-300 V arası sabitlemiş ve 300 mV'dan sonra çok fazla olmamakla birlikte bir miktar arttığı

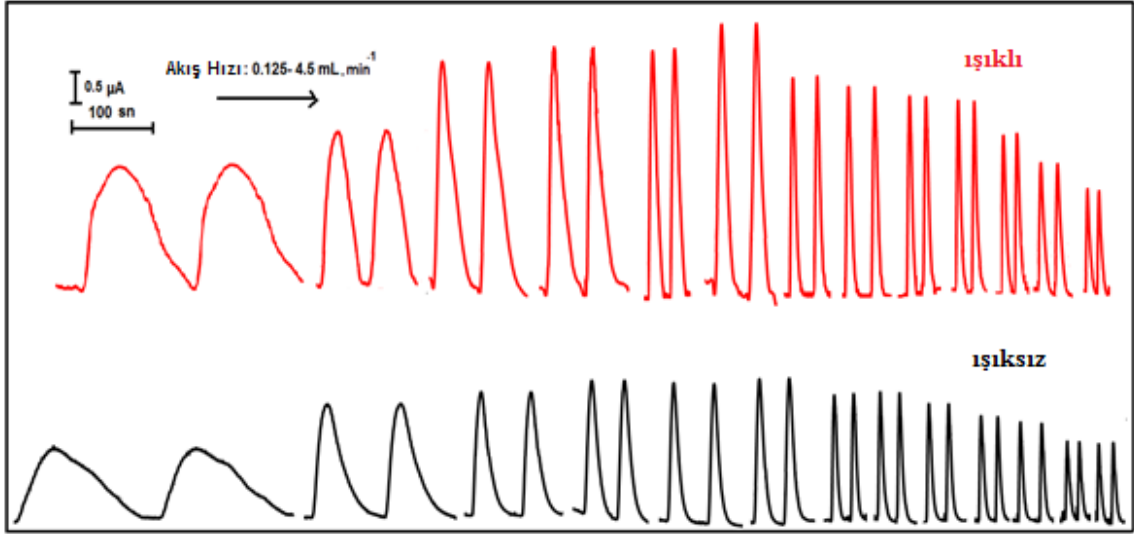
gözlenmiştir. Ayrıca Şekil 4.33 ve 4.34'den, fotoamperometrik yöntemle elde edilen akım değerlerinin amperometrik yöntemle elde edilenlerden yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Böylece GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf için en iyi uygulama potansiyelinin, her ne kadar 500-600 mV da maksimum pik elde edilmiş olsa da, daha negatif potansiyelde çalışma açısından +150 mV optimum potansiyel olarak seçilmiştir ve bundan sonraki adımlarda bu potansiyel değerinin kullanılması gerektiğine karar verilmiştir.



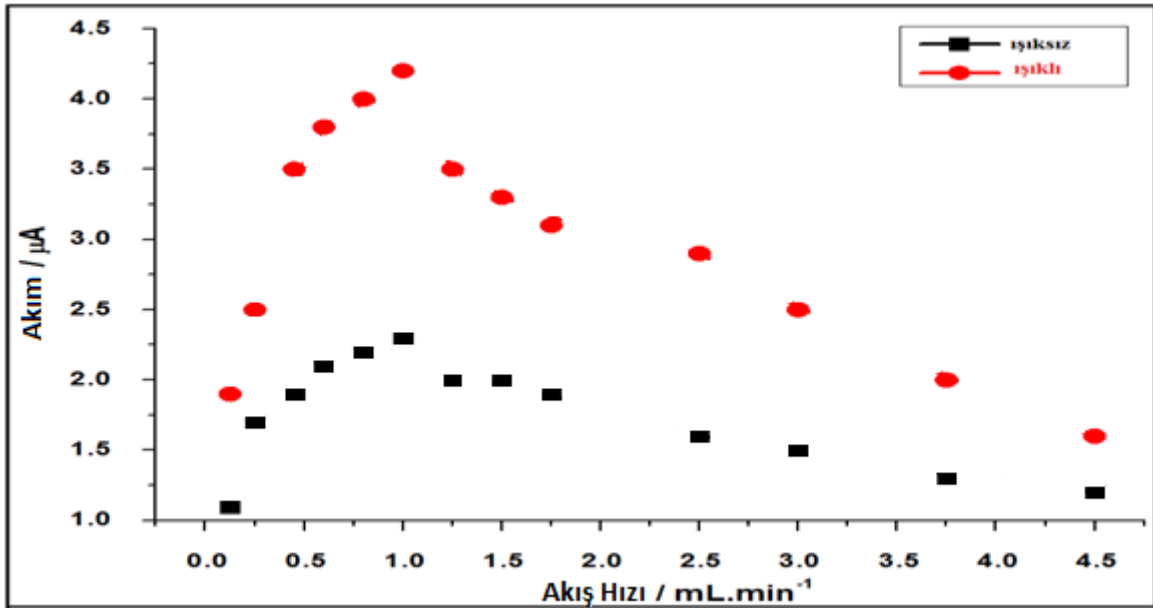
Şekil 4.34. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak elde edilen fiagramlardan, 0,10 mM NADH için hesaplanan amperometrik (siyah çizgi) ve fotoamperometrik (kırmızı çizgi) pik akımlarının uygulama potansiyeli ile değişimi

İkinci olarak amperometrik ve fotoamperometrik akımlara akış hızının etkisi incelendi. Bu amaçla +150 mV uygulama potansiyeli, 100 µL örnek yükleme hacmi ve 10 cm kolon uzunluğunda çalışıldı. 1,0 mM KCl içeren pH 7,0 fosfat tamponu taşıyıcı elektrolitine, yatışkan hal akımı elde edildikten sonra 0,10 mM NADH enjekte edilerek farklı akış hızlarında akım-zaman eğrileri kaydedildi (Şekil 4.35). Bu akım zaman eğrilerinden amperometrik ve fotoamperometrik akım değerleri hesaplanarak akış hızına karşı çizilen grafik Şekil 4.36'de gösterilmiştir. Akım değerlerinin 0,125 mL/dk'lık akış hızından 1,0 mL/dk'ya gidildiğinde arttığı, ancak 1,0 mL/dk akış hızından sonraki daha

büyük akış hızlarında azaldığı gözlenmiştir. Bu olay yüksek akış hızlarında enjekte edilen NADH ile modifiye elektrot yüzeyindeki QD'lerin etkileşime girmesi için yeterli zamanın olmamasından kaynaklanabileceğine bağlanmıştır.



Şekil 4.35. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak farklı akış hızlarında 0,10 mM NADH için elde edilen fiagramlar (uygulama potansiyeli: +150 mV, örnek yükleme hacmi: 100 μ L ve kolon uzunluğu: 10 cm, taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS)

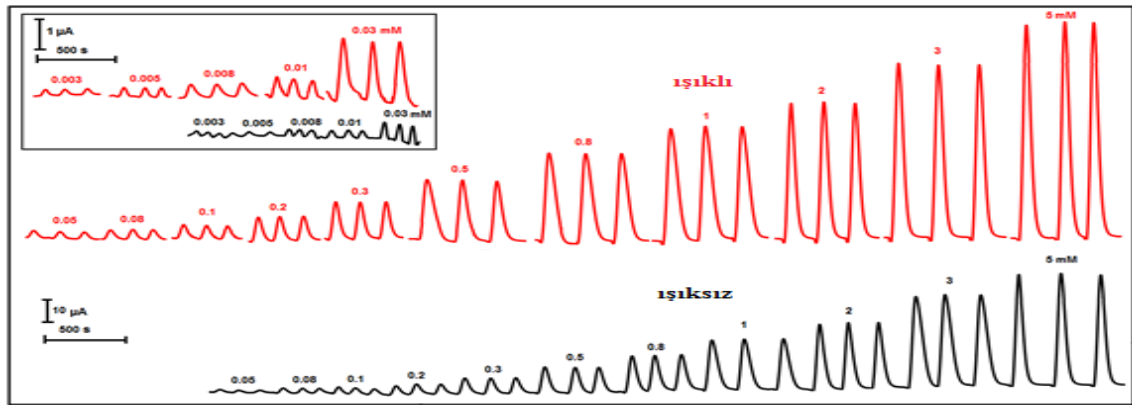


Şekil 4.36. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak 0,10 mM NADH için elde edilen fiagramlardan hesaplanan a) amperometrik ve b) fotoamperometrik akımların akış hızıyla değişim grafiği

Ayrıca 1,0 mL/dk akış hızı ve +150 mV uygulama potansiyeli koşullarında, örnek yükleme hacminin (20, 50 ve 100 μ L) 0,10 mM NADH'nin pik akımına etkisi incelenmiştir. Örnek yükleme hacminin artmasıyla pik akımı doğrusal olarak artarken, piklerde genişleme olduğu saptanmıştır. Bu yüzden 100 μ L enjeksiyon hacmi en uygun örnekleme hacmi olarak seçilmiştir.

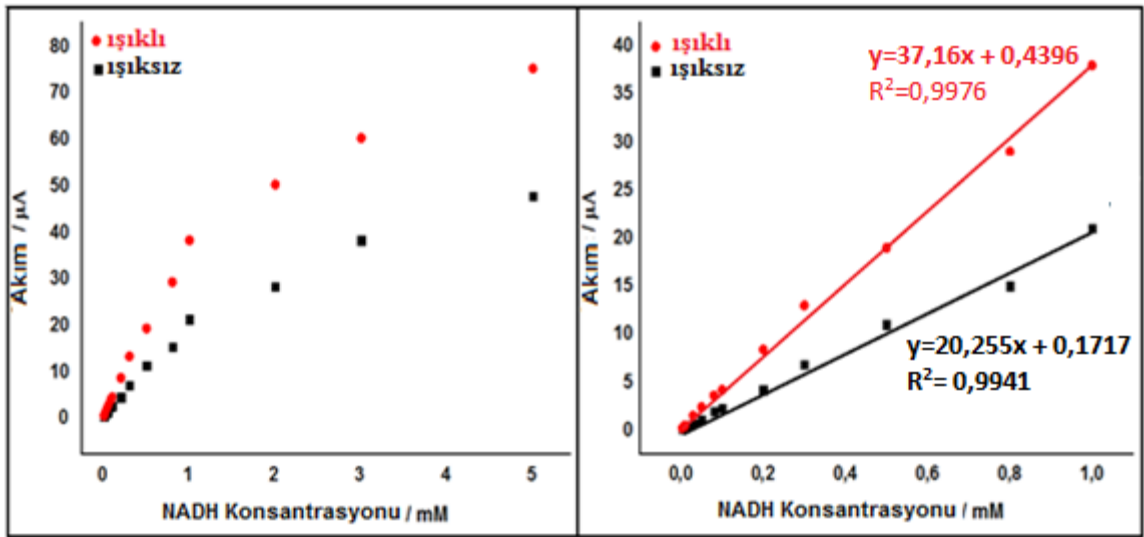
FIA sistemlerinde etkin bir parametre olan kolon uzunluğunun (10, 25 ve 50 cm) pik akımına etkisi de diğer parametrelerin saptanan optimum koşullarında incelenmiş, 10 cm'lik en düşük kolon uzunluğunun uygun olduğu saptanmıştır. Çünkü enjekte edilen NADH zonunun kolon boyunca ilerlerken bu uzunluktaki dispersiyonunun sınırlı olması nedeniyle pik genişliği azaltılmıştır.

Sonuç olarak optimizasyon çalışmalarından; en uygun uygulama potansiyeli, +150 mV; akış hızı 1,0 mL/dk; örnek yükleme hacmi 100 μ L ve kolon uzunluğu 10 cm olarak saptanmıştır. Bu koşullarda GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak farklı derişimlerde NADH FIA sistemine enjekte edilerek, hem amperometrik hem de fotoamperometrik akım değerlerine ilişkin pikler kaydedilmiştir. Farklı derişimlerdeki NADH için elde edilen amperometrik ve fotoamperometrik akım-zaman eğrileri Şekil 4.37'de verilmiştir. Her iki yöntemde de NADH derişimi arttıkça pik yüksekliklerinin artmasıyla birlikte, tüm derişimlerde elektrot yüzeyinin ışıklandırılmasıyla pik yüksekliğinde, normal ışıksız konumda elde edilenlere göre önemli artışlar gözlenmiştir.



Şekil 4.37. FIA sisteminde GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak farklı derişimlerde NADH için elde edilen akım-zaman eğrileri (Taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS; Uygulama potansiyeli: +150 mV; akış hızı: 1,0 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 μ L; kolon uzunluğu: 10 cm)

Şekil 4.38 NADH'nin derişimine karşı FIA sistemde elde edilen elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik akım grafiğini göstermektedir. Bu şekilden doğrusal kalibrasyon aralığı, hem amperometrik hem de fotoamperometrik yöntem için $3,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-3}$ M, bulunmuş ve bu iki metodun doğrusallıkları sırasıyla $I(\mu A) = 20,26C$ (mM) + 0,17 $R^2=0,9941$ ve $I(\mu A) = 37,16C$ (mM) + 0,44; $R^2=0,9976$ denklemleriyle ifade edilmiştir. Denklemden I pik akımı, C ise NADH'nin derişimidir. Bu denklemlerdeki eğimler karşılaştırıldığında fotoamperometrik yöntemle elde edilen doğrunun eğiminin (37,16), amperometrik yöntemle elde edilenden (20,26) yaklaşık 1,8 kat daha büyük olduğu saptanmış ve dolayısıyla, duyarlığın elektrot yüzeyinin ışıklandırılmasıyla bir miktar daha artırılması başarılmıştır.

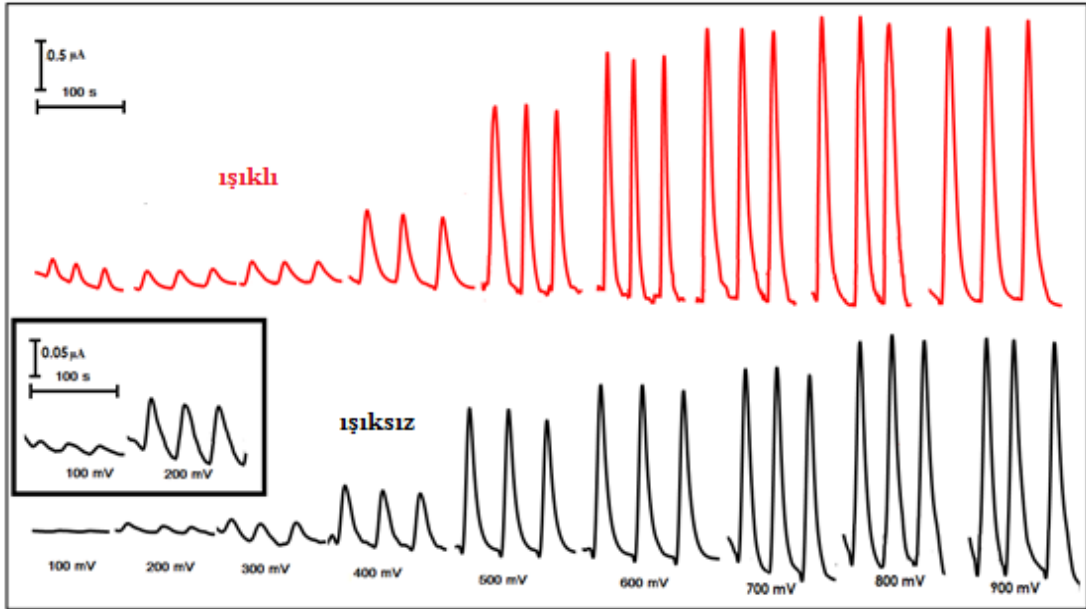


Şekil 4.38. FIA sisteminde GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak optimum koşullarda a) amperometrik, b) fotoamperometrik yöntemle elde edilen pik akımlarının NADH derişimine karşı değişimi

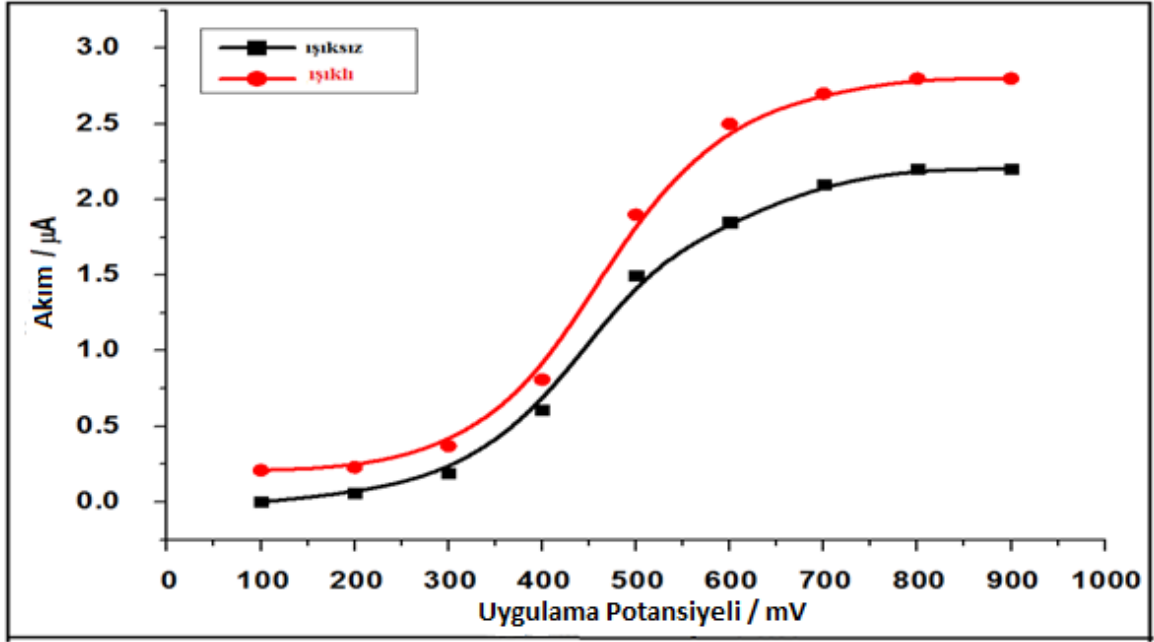
Her iki yöntemin kesinliği, optimum koşullarda $1,0 \times 10^{-4}$ M NADH'nin sisteme 8 kez ardışık olarak enjekte edilmesiyle incelenmiş ve bağıl standart sapma amperometrik yöntem için % 2,2 ve fotoamperometrik yöntem için % 4,3 olarak bulunmuştur. En düşük NADH derişiminin ($1,0 \times 10^{-7}$ M) sisteme 10 kez ardışık olarak enjekte edilmesiyle elde edilen pik akım değerlerinden her iki yöntem için gözlenebilme sınırı (limit of detection, LOD, 3sk/m) değerleri hesaplanmış ve amperometrik yöntem için $4,0 \times 10^{-8}$ M, fotoamperometrik yöntem için ise $3,0 \times 10^{-8}$ M olarak bulunmuştur.

4.2.2. K.PGE/CdS-ZnS-MAA-Nf ile İlgili Çalışmalar

FIA sisteminde K.PGE/CdS-ZnS-MAA-Nf'nin NADH'ye verdiği en iyi amperometrik ve fotoamperometrik yanıtı elde etmek için GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf'de olduğu gibi yine sırasıyla uygulama potansiyeli, akış hızı parametreleri optimize edildi. Elde edilen fiagramlar ve amperometrik ile fotoamperometrik akım değerlerinin uygulama potansiyeli ile değişim grafiği sırasıyla Şekil 4.39 ve 4.40'da verilmiştir. K.PGE/CdS-ZnS-MAA-Nf de hem elektrokatalitik hem de fotoelektrokatalitik akım düşük potansiyelerde oldukça düşük olduğu ve 400 mV'dan sonra belirginleştiği yaklaşık +600-700 mV arası sabitlendiği gözlenmiştir. Bu verilerin daha önceki kısımlarda verilen döngüsel voltammogramlarla uyumlu olduğu görülmüştür. Ayrıca Şekil 4.39 ve 4.40'dan, fotoamperometrik yöntemle elde edilen akım değerlerinin amperometrik yöntemle elde edilenlerden yaklaşık 1.4 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu artışın MWCNT'ye göre oldukça düşük olmasının nedeni PGE için tasarlanan akış hücresinde yüzeyin tamamının ışıkla etkileşmemesine bağlanabilir. Böylece K.PGE/CdS-ZnS-MAA-Nf için en iyi uygulama potansiyeli +600 mV olarak seçilmiştir ve bundan sonraki adımlarda bu potansiyel değerinin kullanılması gerektiğine karar verilmiştir.

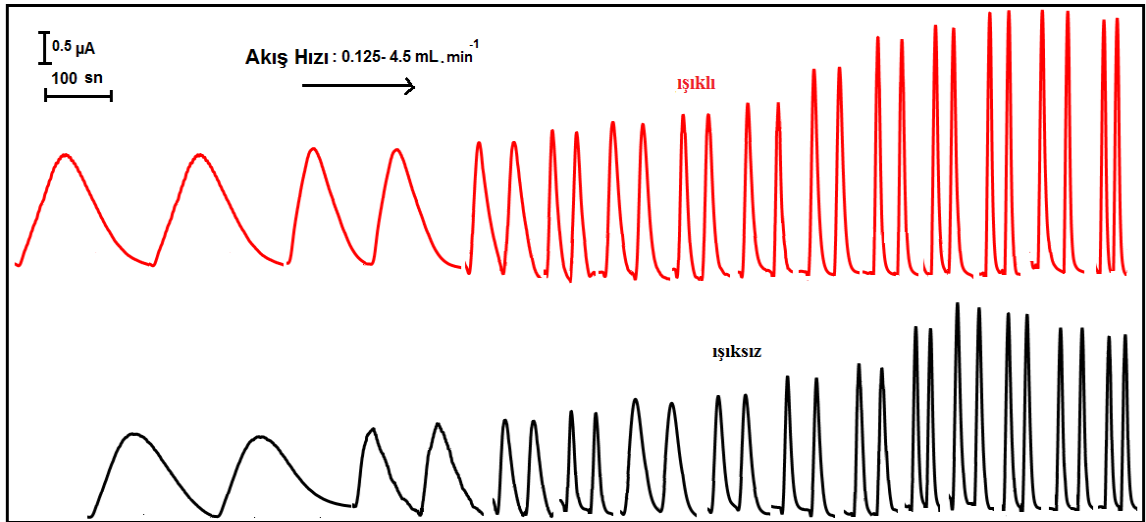


Şekil 4.39. K.PGE/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak farklı uygulama potansiyellerinde 0,10 mM NADH için elde edilen fiagramlar (akış hızı: 1,3 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL ve kolon uzunluğu: 10 cm, taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS)

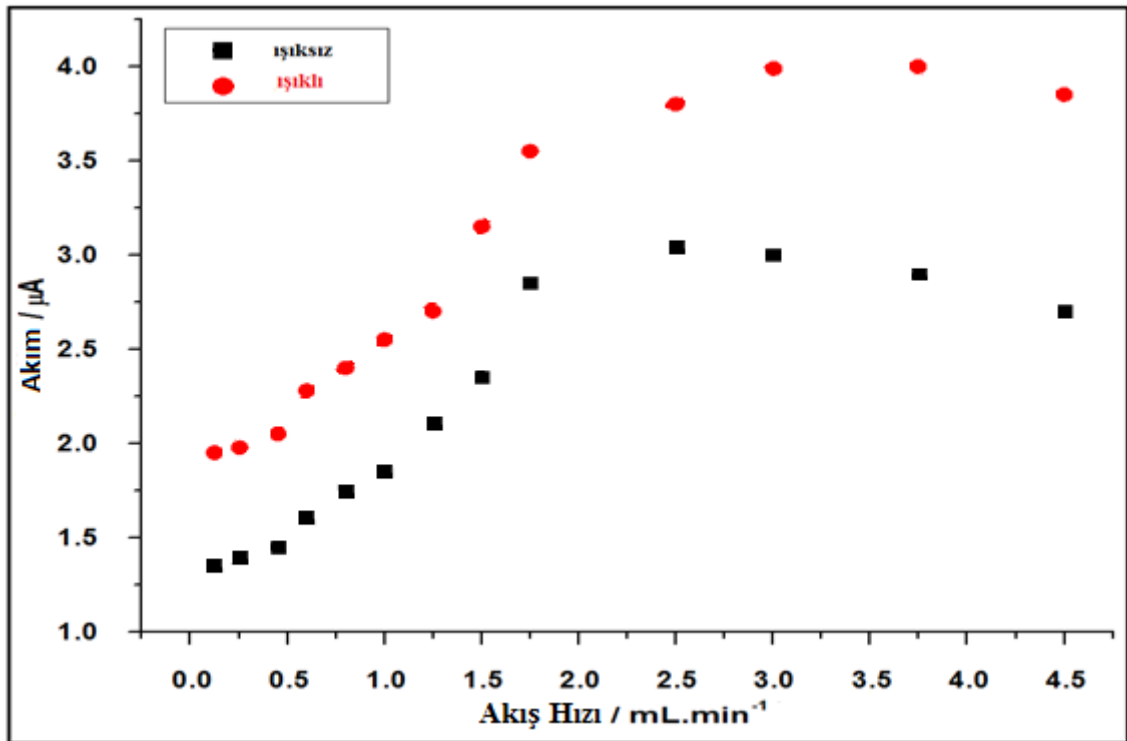


Şekil 4.40. K.PGE/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak elde edilen fiagramlardan, 0,10 mM NADH için hesaplanan amperometrik (siyah çizgi) ve fotoamperometrik (kırmızı çizgi) pik akımlarının uygulama potansiyeli ile değişimi

İkinci olarak amperometrik ve fotoamperometrik akımlara akış hızının etkisi incelendi. Bu amaçla +600 mV uygulama potansiyeli, 100 µL örnek yükleme hacmi ve 10 cm kolon uzunluğunda çalışıldı. 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS taşıyıcı elektrolitine, yatışkan hal akımı elde edildikten sonra 0,10 mM NADH enjekte edilerek farklı akış hızlarında akım-zaman eğrileri kaydedildi (Şekil 4.41). Bu akım zaman eğrilerinden amperometrik ve fotoamperometrik akım değerleri hesaplanarak akış hızına karşı çizilen grafik Şekil 4.42’de gösterilmiştir. Akım değerlerinin 0,125 den 1,75 mL/dk’a gidildiğinde arttığı, ancak 1,75 mL/dk akış hızından sonraki daha büyük akış hızlarında azaldığı gözlenmiştir. Bu olay yüksek akış hızlarında enjekte edilen NADH ile modifiye elektrot yüzeyindeki kuantum noktaların etkileşime girmesi için yeterli zamanın olmamasından kaynaklanabileceğine bağlanmıştır.



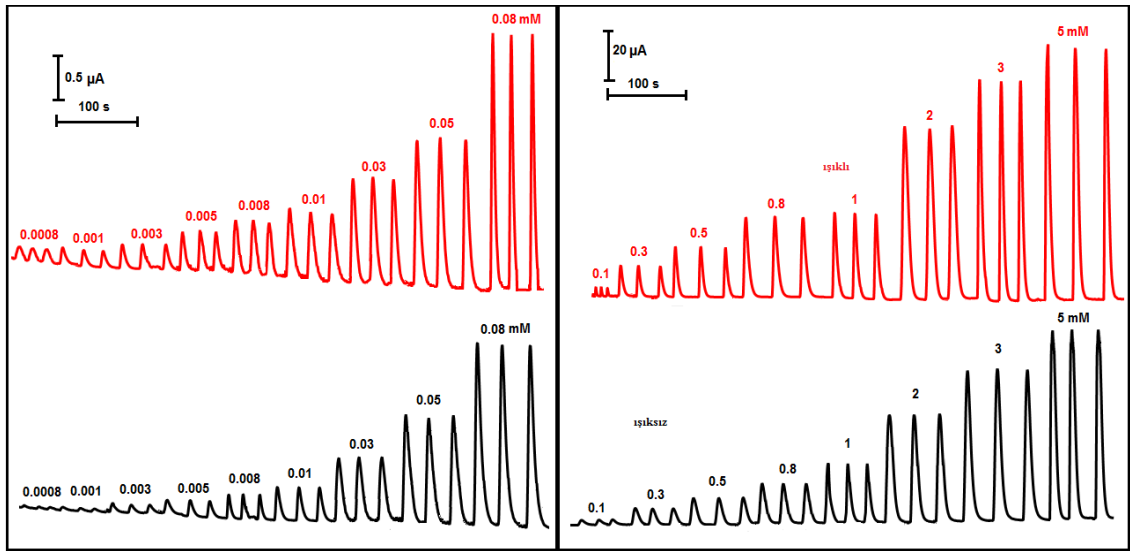
Şekil 4.41. K.PGE/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak farklı akış hızlarında 0,10 mM NADH için elde edilen fiagramlar (uygulama potansiyeli: +600 mV, örnek yükleme hacmi: 100 μ L ve kolon uzunluğu: 10 cm, taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS)



Şekil 4.42. K.PGE-CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak 0,10 mM NADH için elde edilen fiagramlardan hesaplanan a) amperometrik ve b) fotoamperometrik akımların akış hızıyla değişim grafiği

Sonuç olarak optimizasyon çalışmalarından; en uygun uygulama potansiyeli, +600 mV; akış hızı 1,75 mL/dk; örnek yükleme hacmi 100 μ L ve kolon uzunluğu 10 cm olarak

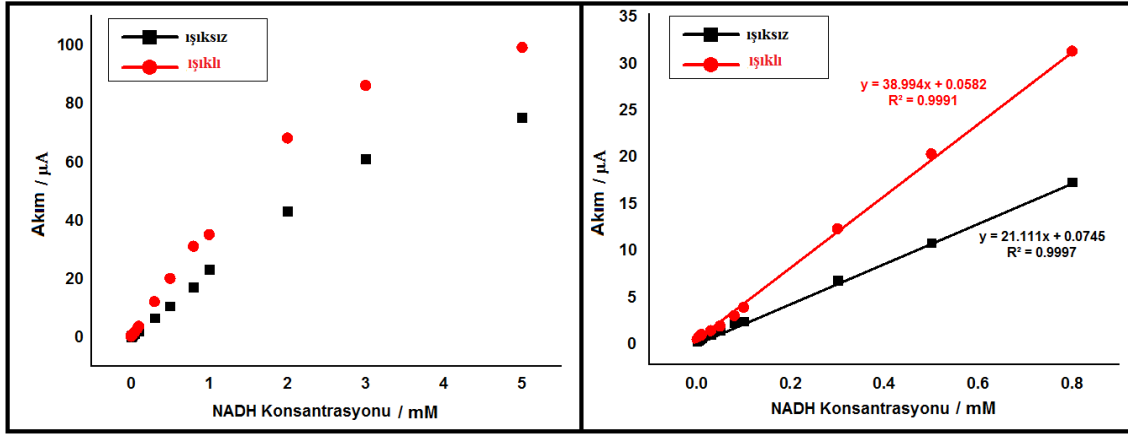
saptanmıştır. Bu koşullarda K.PGE/CdS-ZnS-Nf kullanılarak farklı derişimlerde NADH, FIA sistemine enjekte edilerek, hem amperometrik hem de fotoamperometrik akım değerlerine ilişkin pikler kaydedilmiştir. Farklı derişimlerdeki NADH için elde edilen amperometrik ve fotoamperometrik akım-zaman eğrileri Şekil 4.43’de verilmiştir. Her iki yöntemde de NADH derişimi arttıkça pik yüksekliklerinin artmasıyla birlikte, tüm derişimlerde elektrot yüzeyinin ışıklandırılmasıyla pik yüksekliğinde, normal ışıksız konumda elde edilenlere göre önemli artışlar gözlenmiştir.



Şekil 4.43. FIA sisteminde K.PGE/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak farklı derişimlerde NADH için elde edilen akım-zaman eğrileri (Taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS; Uygulama potansiyeli: +600 mV; akış hızı: 1,75 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 L; kolon uzunluğu: 10 cm)

Şekil 4.44, NADH’nin derişimine karşı FIA sistemde elde edilen elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik akım grafiğini göstermektedir. Bu şekilden doğrusal kalibrasyon aralığı, hem amperometrik hem de fotoamperometrik yöntem için $8,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-5}$ M, bulunmuş ve bu iki metodun doğrusallıkları sırasıyla $I(\mu A) = 21,11C (mM) + 0,075$, $R^2=0,9997$ ve $I(\mu A) = 38,99C(mM) + 0,058$, $R^2=0,9991$ denklemleriyle ifade edilmiştir. Denklemden I pik akımı, C ise NADH’nin derişimidir. Bu denklemlerdeki eğimler karşılaştırıldığında fotoamperometrik yöntemle elde edilen doğrunun eğiminin (38,99), amperometrik yöntemle elde edilenden (21,11) yaklaşık 1,8 kat daha büyük olduğu saptanmış ve dolayısıyla, duyarlığın elektrot yüzeyinin ışıklandırılmasıyla bir miktar daha

arttırılması başarılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3’de GCE/MWCNT için elde edilen değerlerle birlikte verilmiştir.



Şekil 4.44. FIA sisteminde K.PGE-CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak optimum koşullarda a) amperometrik, b) fotoamperometrik yöntemle elde edilen pik akımlarının NADH derişimine karşı değişimi

Çizelge 4.3. QD modifiye elektrotlarla NADH'a dayalı biyosensör için elde edilen analitiksel parametreler

Elektrot	Yöntem	Doğrusal aralık	Doğru denklemi	LOD/LOQ
K.PGE-CdS-ZnS-MAA-Nf	Amp.	$8,0 \times 10^{-4}$ - $8,0 \times 10^{-2}$ mM	$I(\mu A) = 21,11C (mM) + 0,075$ $R^2=0,9997$	-
	Fotoamp.	$8,0 \times 10^{-4}$ - $8,0 \times 10^{-2}$ mM	$I(\mu A) = 38,99C(mM) + 0,058$, $R^2=0,9991$	-
GCE/MWCNT-CdS-ZnS-MAA-Nf	Amp.	$3,0 \times 10^{-3}$ -1,0 mM	$I(\mu A) = 20,26 C(mM) + 0,17$ $R^2=0,994$	$4,0 \times 10^{-5} / 1,3 \times 10^{-4}$ mM
	Fotoamp.	$3,0 \times 10^{-3}$ -1,0 mM	$I(\mu A) = 37,16 C(mM) + 0,44$, $R^2=0,998$	$3,0 \times 10^{-5} / 1,0 \times 10^{-4}$ mM

Bundan sonraki adımda ise bu elektrot yüzeylerine dehidrogenaz enzimleri immobilize edilerek daha önce bahsedilen dehidrogenaz enzimine dayalı biyosensör mekanizmasıyla, dehidrogenaz ve $NAD^+/NADH$ redoks çiftine dayalı elektrokimyasal ve foto elektrokimyasal biyosensör çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla enzim olarak glikoz dehidrogenaz (GDH) ile alkol dehidrogenaz (ALDH) ve substrat olarak glukoz ile etanol model olarak seçilmiş ve detaylı çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

4.3. Dehidrogenaz Enzimine Dayalı Biyosensör Çalışmaları

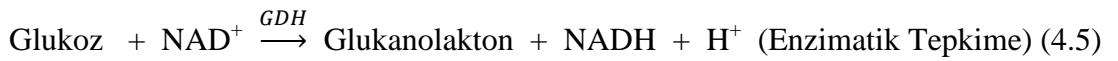
4.3.1. GDH ve NAD⁺/NADH Redoks Çiftine Dayalı Biyosensör Çalışmaları

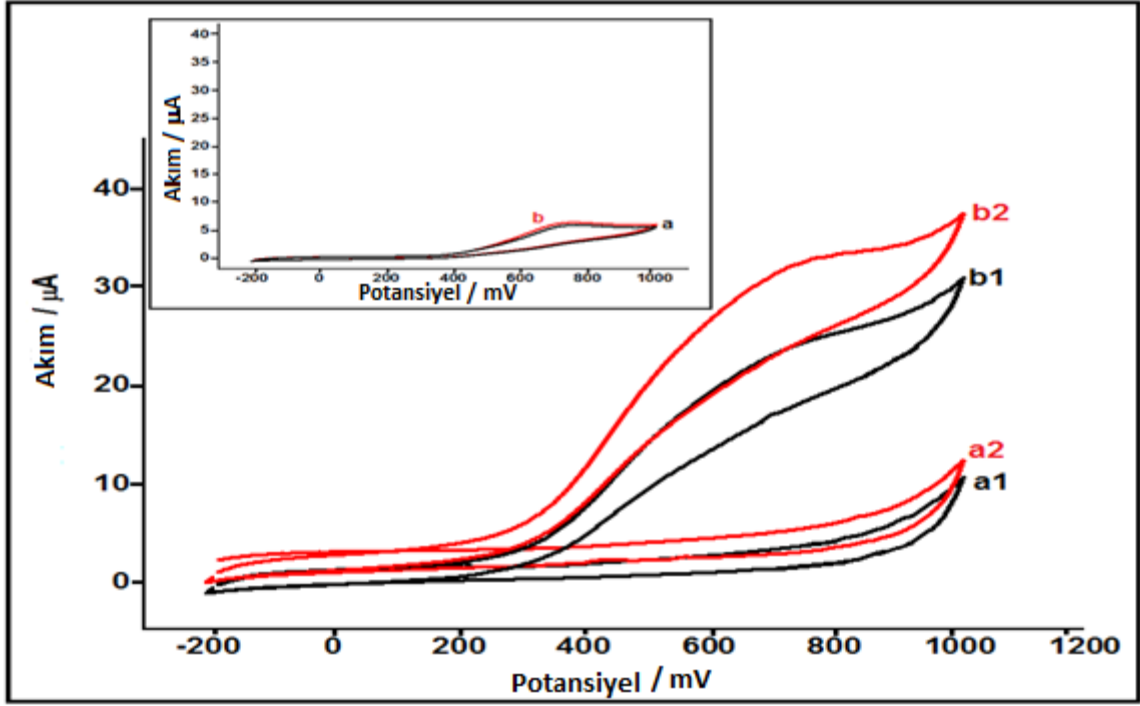
4.3.1.1. QD Modifiye K.PGE İle İlgili Yapılan Çalışmalar

QD modifiye K.PGE ile elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal biyosensör çalışmaları hem döngüsel voltammetrik yöntemle hem de Materyal ve Metot kısmında Şekil 3.2’de gösterilen fotoelektrokimyasal akış hücresi kullanılarak FIA sisteminde amperometrik olarak gerçekleştirildi.

4.3.1.1.1. Döngüsel Voltammetrik Yöntemle Elde Edilen Sonuçlar

Glukoz ile NAD⁺’nin GDH varlığında enzimatik tepkimesi sonucu oluşan NADH’nin K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH yüzeyinde elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik yükseltgenmesi döngüsel voltammogramların kaydedilmesiyle incelendi. Bu amaçla öncelikle karşılaştırma yapmak amacıyla, QD modifiye edilmemiş K.PGE yüzeyine GDH yine deneysel prosedürdeki gibi tutturulmuş ve bu elektrotta glukozun (K.PGE/GDH) elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal yanıtını izlemek için döngüsel voltammogramlar kaydedilmiştir. Şekil 4.45’in iç kısmı, 40.,0 mM glukozun K.PGE/GDH’ın 0,10 M KCl ve 10,0 mM NAD⁺ içeren pH 7,0 PBS destek elektrolitinde ve 20 mV/s tarama hızındaki döngüsel voltammogramlarını göstermektedir. Şekilden görüldüğü gibi substrata (glukoz) ilişkin yaklaşık 720 mV’da tersinmez bir pik gözlenmiş (Şekil 4.45 iç kısım a) ve yüzeyin ışıklandırılmasıyla da bu pikte pek değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.45 iç kısım b). Bu pik, yukarıda da bahsedildiği gibi enzimatik tepkime sonucu oluşan NADH’nin tersinmez olarak NAD⁺’ya yükseltgenmesine bağlanmaktadır (Tepkime 4.5 ve 4.6).



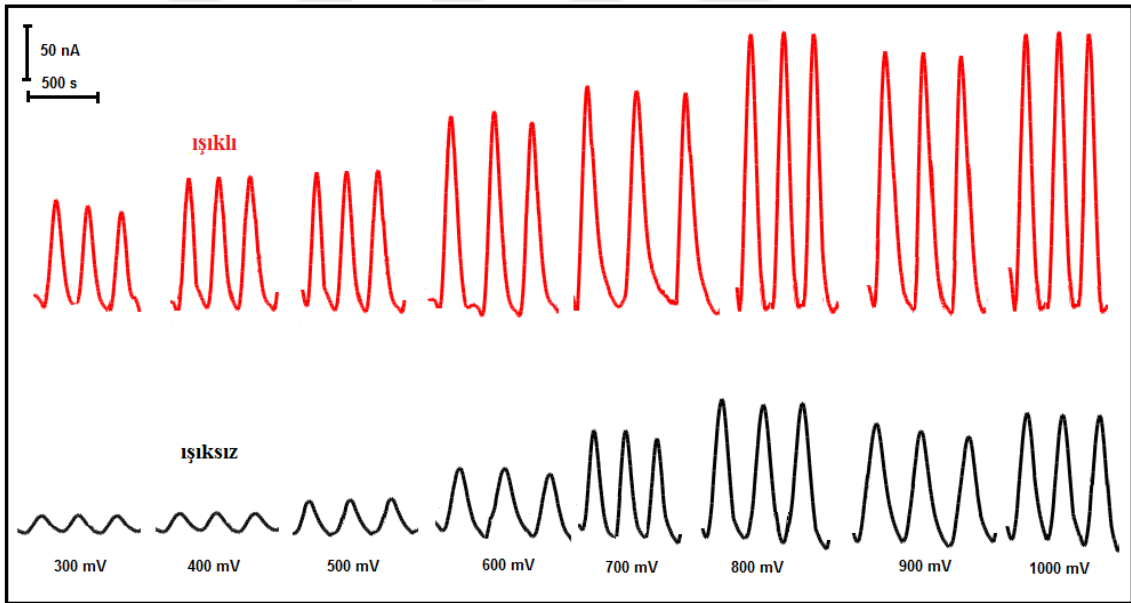


Şekil 4.45. K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH'nin destek elektrolitteki (a1 ve a2) ve 40,0 mM glukoz ortamındaki (b1 ve b2) döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl ve 10,0 mM NAD⁺ içeren pH 7,0 PBS; a1 ve b1: ışısız; a2 ve b2: ışıklı. İç Şekil: K.PGE/GDH'nin 40,0 mM glukoz ortamındaki ışısız (a) ve ışıklı (b) döngüsel voltammogramlar

CdS-ZnS ve enzim modifiye elektrotta (K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH) alınan voltammogramlar Şekil 4.45'de verilmiştir. QD modifiye elektrotun destek elektrolitte (glukoz yokken) alınan döngüsel voltammogramı Şekil 4.45/a1 de gösterilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi ortamda substrat (glukoz) olmadığından herhangi bir pik gözlenmemiştir. Ancak yüzeye ışık düşürüldüğünde (Şekil 4.45/a2) kapasitif akımın ışıkla çok az değiştiği gözlenmiştir. 40,0 mM glukoz ortamında alınan döngüsel voltammogramda (Şekil 4.45/b1) ise enzimatik tepkime sonucu oluşan NADH'nin yükseltgenme pikinin K.PGE/GDH'daki gibi yaklaşık 720 mV'da gözlendiği, ancak yüzey ışıklandırıldığında (Şekil 4.45/b2) pik potansiyelinin değişmediği, pik akımının ise yaklaşık 2 kat arttığı ve QD ve enzim modifiye PGE'nin glukozla dolaylı olarak fotoelektrokatalitik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

4.3.1.1.2. FIA Sisteminde Amperometrik Yöntemle Elde Edilen Sonuçlar

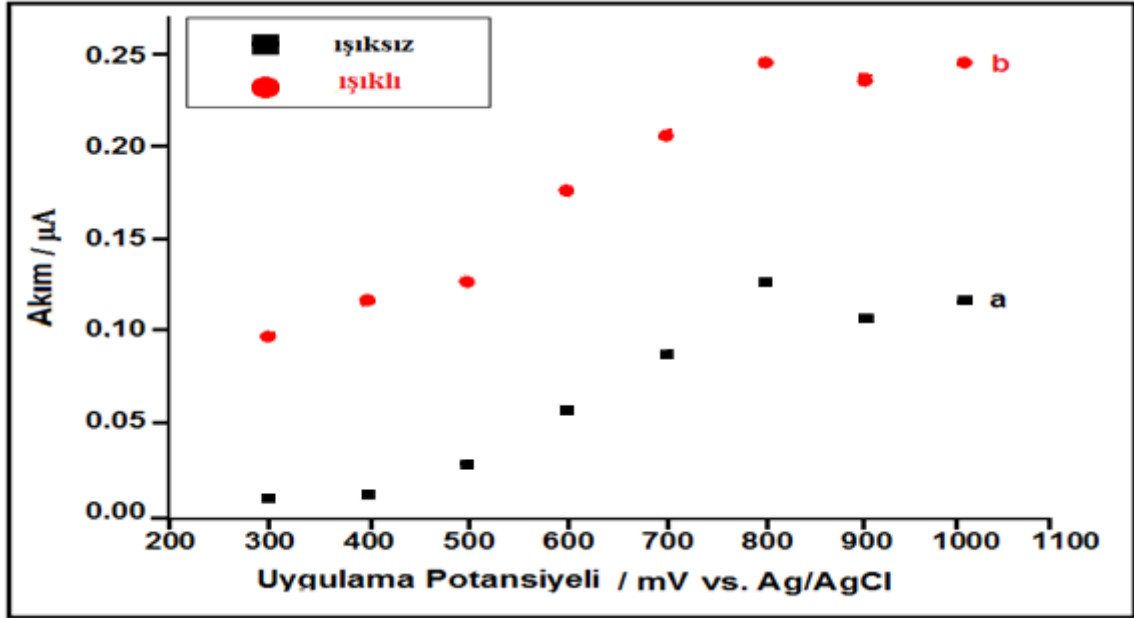
FIA sisteminde K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH'nin glukozu verdiği en iyi amperometrik ve fotoamperometrik yanıtı elde etmek için sırasıyla uygulama potansiyeli, akış hızı parametreleri optimize edildi. Öncelikle 1,3 mL/dk akış hızı, 100 µL örnek yükleme hacmi ve 10 cm kolon uzunluğunda çalışıldı. 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS taşıyıcı elektrolitine, yatışkan hal akımı elde edildikten sonra 1,0 M KCl ve 10,0 mM NAD⁺ içeren pH 7,0 PBS'de hazırlanmış 0,50 mM glukoz enjekte edilerek farklı potansiyelerde akım-zaman eğrileri K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH için kaydedilerek en uygun uygulama potansiyeli belirlendi. Şekil 4.46 K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak 300 ile 1000 mV arasında değişen uygulama potansiyellerinde 0,50 mM glukoz için elde edilen fiagramları göstermektedir. Bu şekillerden, hem amperometrik hem de fotoamperometrik akım değerleri hesaplanmış ve bu değerlerin uygulama potansiyeline karşı çizilen grafikleri Şekil 4.47'de verilmiştir.



Şekil 4.46. K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak farklı uygulama potansiyellerinde 0,50 mM glukoz için elde edilen fiagramlar (akış hızı: 1,3 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL ve kolon uzunluğu: 10 cm, taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS)

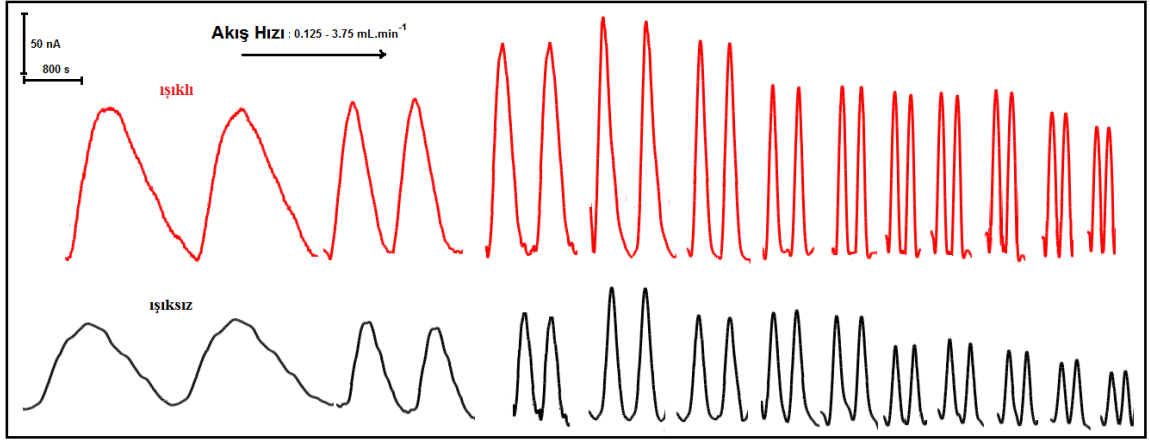
K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH'da hem elektrokatalitik hem de fotoelektrokatalitik akım düşük potansiyelerde de gözlenmiş ve uygulama potansiyeli arttıkça pik akımı 800 mV'a kadar belirgin bir şekilde artmış ve 800 mV'dan sonra çok fazla olmamakla birlikte bir miktar arttığı gözlenmiştir. Ayrıca Şekil 4.46 ve 4.47'den, fotoamperometrik yöntemle

elde edilen akım değerlerinin amperometrik yöntemle elde edilenlerden yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Böylece K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH için en iyi uygulama potansiyeli +800 mV optimum potansiyel olarak seçilmiştir ve bundan sonraki adımlarda bu potansiyel değerinin kullanılması gerektiğine karar verilmiştir.

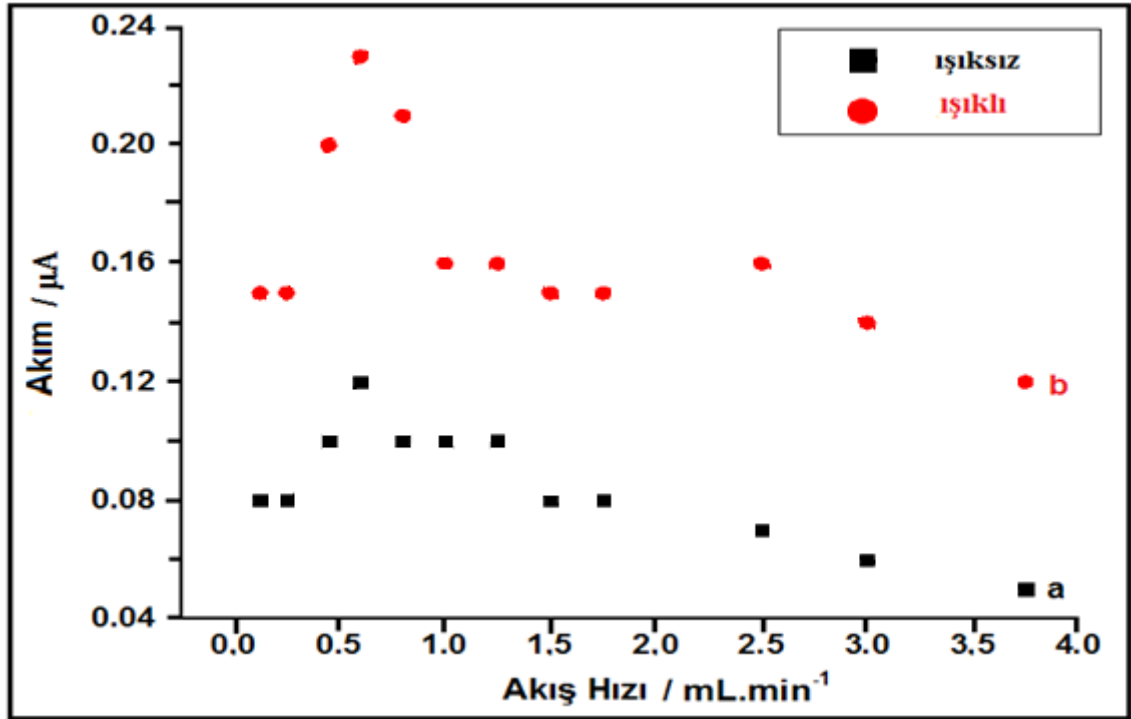


Şekil 4.47. K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak elde edilen fiagramlardan, 0,50 mM glukoz için hesaplanan a) amperometrik ve b) fotoamperometrik pik akımlarının uygulama potansiyeli ile değişimi

İkinci olarak amperometrik ve fotoamperometrik akımlara akış hızının etkisi incelendi. Bu amaçla +800 mV uygulama potansiyeli, 100 µL örnek yükleme hacmi ve 10 cm kolon uzunluğunda çalışıldı. 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS taşıyıcı elektrolitine, yatışkan hal akımı elde edildikten sonra yine 1,0 M KCl ve 10,0 mM NAD⁺ içeren pH 7,0 PBS'de hazırlanmış 0,50 mM glukoz enjekte edilerek farklı akış hızlarında akım-zaman eğrileri kaydedildi (Şekil 4.48). Bu akım zaman eğrilerinden amperometrik ve fotoamperometrik akım değerleri hesaplanarak akış hızına karşı çizilen grafik Şekil 4.49'da gösterilmiştir. Akım değerlerinin 0,125 den 0,60 mL/dk'ya kadar gidildiğinde arttığı, ancak 0,60 mL/dk akış hızından sonraki daha büyük akış hızlarında azaldığı gözlenmiştir. Bu olay yüksek akış hızlarında enjekte edilen glukoz ile modifiye elektrot yüzeyindeki GDH enzimi ile etkileşime girmesi için yeterli zamanın olmamasından kaynaklanabileceğine bağlanmıştır. Ayrıca çok düşük akış hızlarında da piklerin oldukça yayvan olduğu gözlenmiştir.



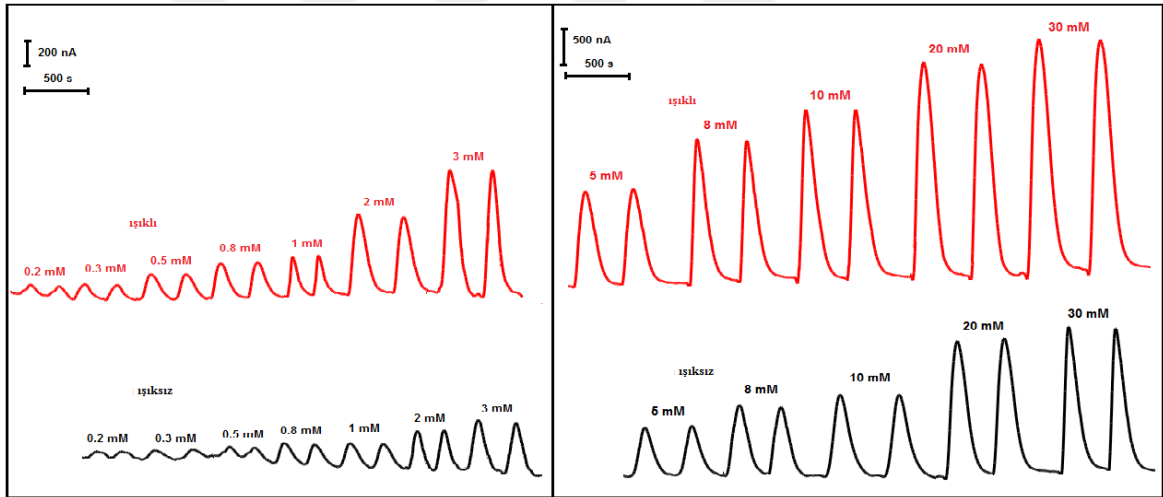
Şekil 4.48. K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak farklı akış hızlarında 0,50 mM glukoz için elde edilen fiagramlar (uygulama potansiyeli: +800 mV, örnek yükleme hacmi: 100 μ L ve kolon uzunluğu: 10 cm, taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS)



Şekil 4.49. K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak 0,50 mM glukoz için elde edilen fiagramlardan hesaplanan a) amperometrik ve b) fotoamperometrik akımların akış hızıyla değişim grafiği

Ayrıca daha önceki kısımlarda NADH'nin doğrudan elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik yükseltgenme çalışmalarında optimize edilen 100 µL'lik örnek yükleme hacmi ve 10 cm'lik kolon uzunluğu glukoz için tekrar optimize edilmeyip bu çalışmada da aynı şekilde kullanılmıştır.

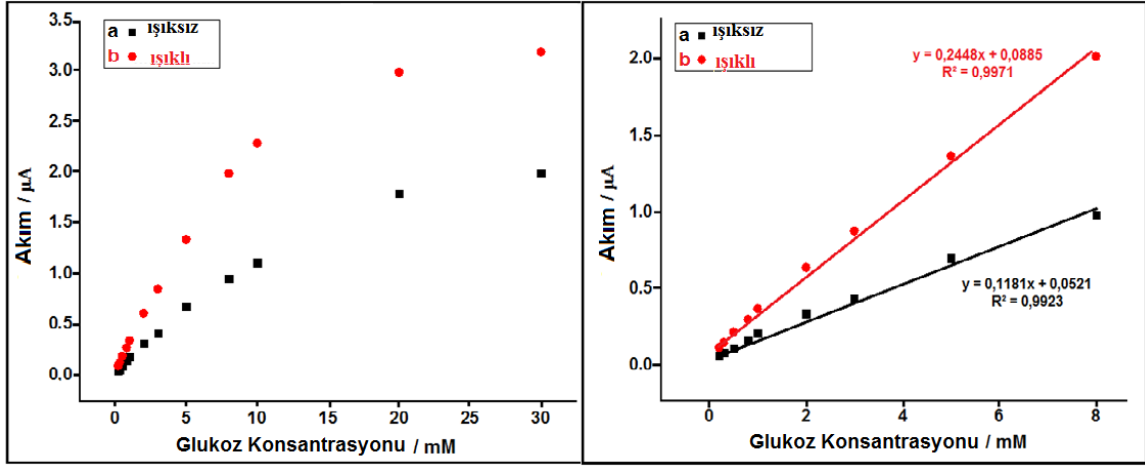
Sonuç olarak optimizasyon çalışmalarından; en uygun uygulama potansiyeli, +800 mV; akış hızı 0,6 mL/dk; örnek yükleme hacmi 100 µL ve kolon uzunluğu 10 cm olarak saptanmıştır. Bu koşullarda K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak farklı derişimlerde glukoz FIA sistemine enjekte edilerek, hem amperometrik hem de fotoamperometrik akım değerlerine ilişkin pikler kaydedilmiştir. Farklı derişimlerdeki glukoz için elde edilen amperometrik ve fotoamperometrik akım-zaman eğrileri Şekil 4.50'de verilmiştir. Her iki yöntemde de glukoz derişimi arttıkça pik yüksekliklerinin artmasıyla birlikte, tüm derişimlerde elektrot yüzeyinin ışıklandırılmasıyla pik yüksekliğinde, normal ışıksız konumda elde edilenlere göre önemli artışlar gözlenmiştir.



Şekil 4.50. FIA sisteminde K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak farklı derişimlerde glukoz için elde edilen akım-zaman eğrileri (Taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS; Uygulama potansiyeli: +800 mV; akış hızı: 0,6 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm)

Şekil 4.51 glukozun derişimine karşı FIA sistemde elde edilen elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik akım grafiğini göstermektedir. Bu şekilden doğrusal kalibrasyon aralığı, hem amperometrik hem de fotoamperometrik yöntem için 0,20-8,0 mM glukoz olarak bulunmuş ve bu iki metodun doğrusallıkları sırasıyla $I(\mu\text{A}) = 0,118C(\text{mM}) + 0,052$ $R^2=0,9923$ ve $I(\mu\text{A}) = 0,245C(\text{mM}) + 0,089$; $R^2=0,9971$ denklemleriyle ifade edilmiştir

(Şekil 4.51). Denklemde I pik akımı, C ise glukozun derişimidir. Bu denklemlerdeki eğimler karşılaştırıldığında fotoamperometrik yöntemle elde edilen doğrunun eğiminin (0,245), amperometrik yöntemle elde edilenden (0,118) yaklaşık 2 kat daha büyük olduğu saptanmış ve dolayısıyla, duyarlılığın elektrot yüzeyinin ışıklandırılmasıyla bir miktar daha artırılması başarılmıştır.



Şekil 4.51. FIA sisteminde K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak optimum koşullarda a) amperometrik, b) fotoamperometrik yöntemle elde edilen pik akımlarının glukoz derişimine karşı değişimi

Gözlenebilme sınırı (Limit of detection, LOD) ve tayin sınırı (Limit of quantification, LOQ) değerlerini elde etmek için glukoz içermeyen 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS’de hazırlanmış 10,0 mM NAD⁺ FIA sistemine 7 kez enjekte edilerek elde edilen verilerden tanık için standart sapma (sk) değerleri hesaplandı. LOD, 3sk/m ve LOQ, 10sk/m den (m: eğim) hem amperometrik hem de fotoamperometrik yöntem için hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4’de GCE/MWCNT için elde edilen değerlerle birlikte verilmiştir.

K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH’nin tekrarlanabilirliği optimum koşullarda 0,50 mM glukozun sisteme 5 kez ardışık olarak enjekte edilmesiyle incelenmiş ve bağıl standart sapmaları sırasıyla amperometrik yöntem için % 3,5 olarak, fotoamperometrik için 4,5 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar QD modifiye K.PGE’nin iyi bir tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.4. QD modifiye elektrotlarla GDH enzimine dayalı biyosensör için elde edilen analitiksel parametreler

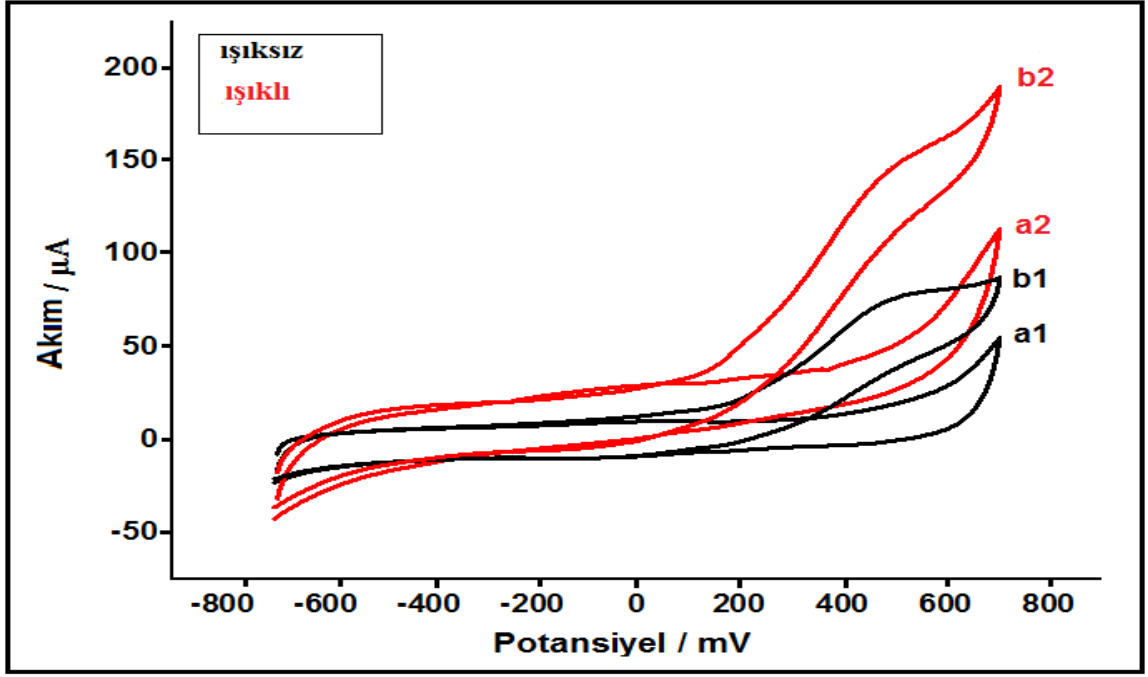
Elektrot	Yöntem	Doğrusal aralık	Doğru denklemi	LOD/LOQ
K.PGE-CdS-ZnS-MAA-GDH	Amp.	0,2-8,0 mM	$I(\mu A)=0,118C(mM) + 0,052$ $R^2=0,9923$	0,09 / 0,3 mM
	Fotoamp.	0,2-8,0 mM	$I(\mu A)=0,245C(mM) + 0,089$ $R^2=0,9971$	0,05 / 0,16 mM
GCE/MWCNT-CdS-ZnS-MAA-GDH	Amp.	0,01-2,0 mM	$I(\mu A)= 2,57(mM) + 0,033$ $R^2=0,9971$	0,006 / 0,02 mM
	Fotoamp.	0,01-2,0 mM	$I(\mu A) = 7,80C(mM) + 0,049$ $R^2=0,9985$	0,004 / 0,012 mM

4.3.1.2. QD Modifiye GCE/MWCNT İle İlgili Yapılan Çalışmalar

GCE/MWCNT ile de elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal biyosensör çalışmaları hem döngüsel voltammetrik yöntemle hem de Şekil 3.3'de gösterilen fotoelektrokimyasal akış hücresi kullanılarak FIA sisteminde amperometrik olarak gerçekleştirildi.

4.3.1.2.1. Döngüsel Voltammetrik Yöntemle Elde Edilen Sonuçlar

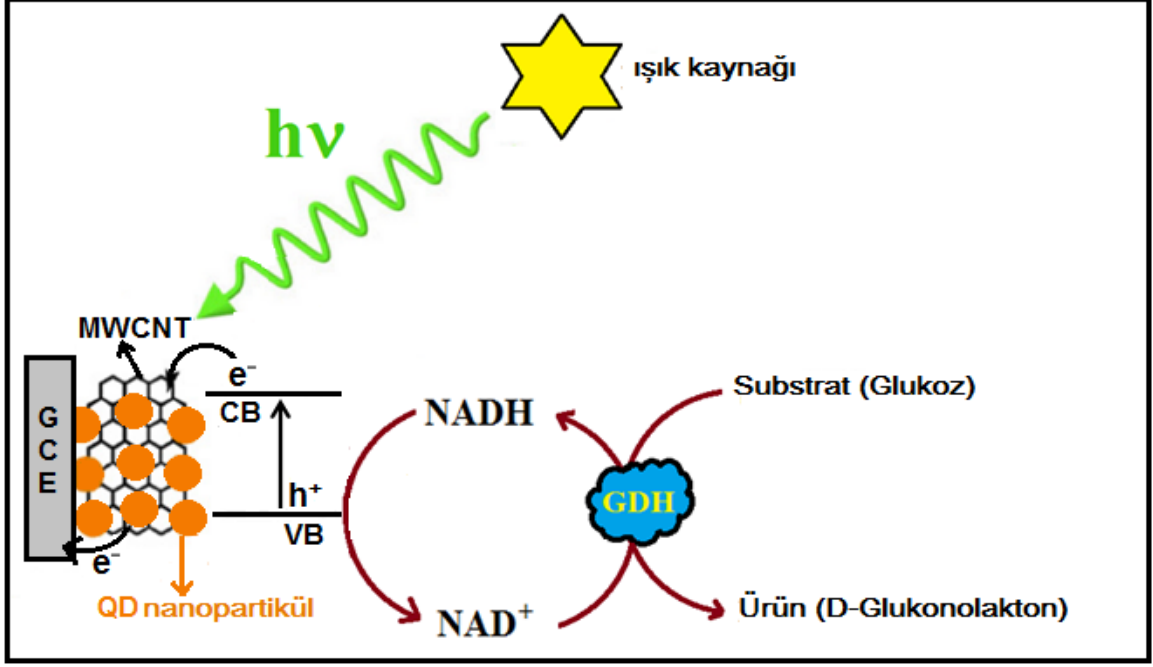
K.PGE ile yapılan çalışmalara benzer olarak, ışıklı ve ışısız ortamda glukozun GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH'daki döngüsel voltammogramları kaydedilmiştir. QD modifiye elektrotun destek elektrolitte (glukoz kullanılmadan) alınan döngüsel voltammogramı Şekil 4.52/a1'e gösterilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi ortamda substrat (glukoz) olmadığından herhangi bir pik gözlenmemiştir. Ancak yüzeye ışık düşürüldüğünde (Şekil 4.52/a2) kapasitif akımın ışıkla çok az değiştiği gözlenmiştir. 20,0 mM glukoz ortamında alınan döngüsel voltammogramda (Şekil 4.52/b1) ise enzimatik tepkime sonucu oluşan NADH'nin yükseltgenme pikinin yaklaşık 500 mV'da gözlendiği, ancak yüzey ışıklandırıldığında (Şekil 4.52/b2) pik potansiyelinin değişmediği, pik akımının ise yaklaşık 2 kat arttığı ve QD ve enzim modifiye GCE/MWCNT'nin glukozla dolaylı olarak fotoelektrokatalitik etki gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.52. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH'nin destek elektrolitteki (a1 ve a2) ve 20,0 mM glukoz ortamındaki (b1 ve b2) döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl ve 10,0 mM NAD^+ içeren pH 7,0 PBS; a1 ve b1: ışıksız; a2 ve b2: ışıklı

K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH ile karşılaştırıldığında enzimatik olarak oluşan NADH'nin yükseltgenme pikinin GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH'da daha negatifte (500 mV) oluştuğu ve pik akımının da 20,0 mM glukoz kullanılmasına rağmen K.PGE'ye göre (K.PGE de 40,0 mM glukoz kullanılmıştı) oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, beklendiği gibi MWCNT modifiye elektrotla elde edilen sonuçların K.PGE modifiye elektroda göre daha duyarlı olduğunu yansıtmaktadır. Bunun nedeni ise MWCNT'ün spesifik yüzey alanına ve iyi elektronik özelliğine bağlanabilir.

Fotoelektrokimyasal glukoz biyosensör mekanizması ise Şekil 4.53'de verilmiştir. Bu mekanizmaya göre önce GCE/MWCNT yüzeyindeki CdS kuantum noktaları 250 W halojen lamba ile ışıklandırıldığında, yarıiletken CdS'ün değerlik bandındaki (VB) elektronlar iletkenlik bandına (CB) transfer olmakta ve elektron-boşluk (e^-h^+ pair) çifti oluşmaktadır. CB'daki e^- GCE/MWCNT'ye transfer olurken enzimatik tepkime sonucu oluşan NADH e^- 'nunu VB'de oluşan pozitif yüklü boşluğa (h^+) vererek NAD^+ 'ya yükseltgenmektedir. NAD^+ tekrar glukoz ile enzimatik tepkimeye girerek glukoz (aslında NADH derişimine bağlı) derişimine bağlı olarak anodik bir fotoakım oluşmaktadır.

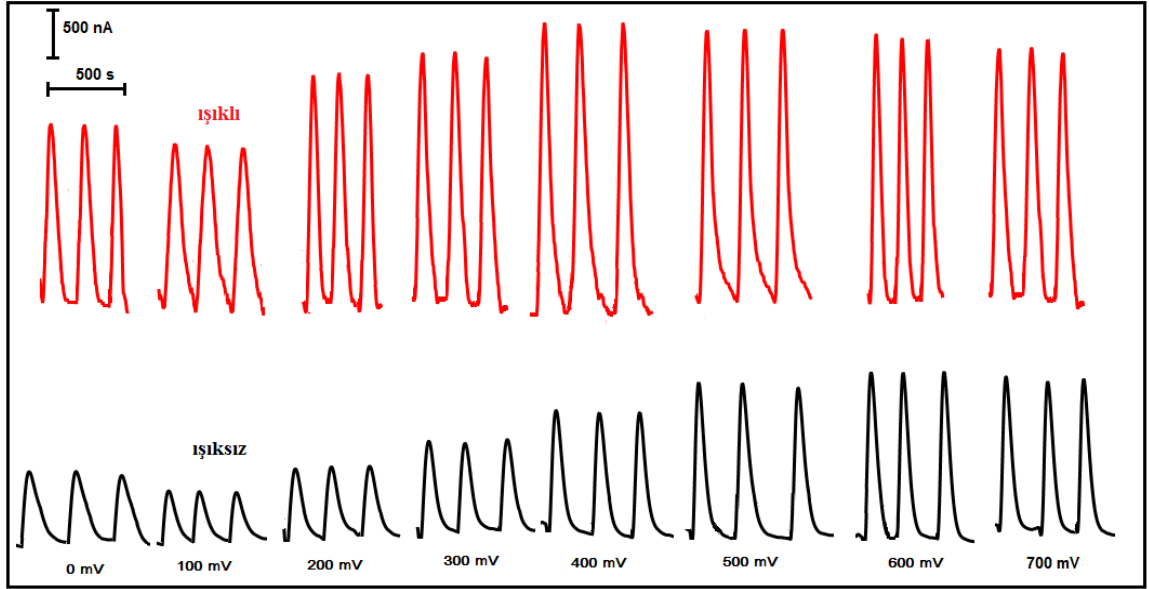


Şekil 4.53. QD modifiye GCE/MWCNT kullanımına ve GDH ve NAD^+/NADH redoks çiftine bağlı fotoelektrokimyasal glukoz biyosensör mekanizmasına ait şematik gösterim

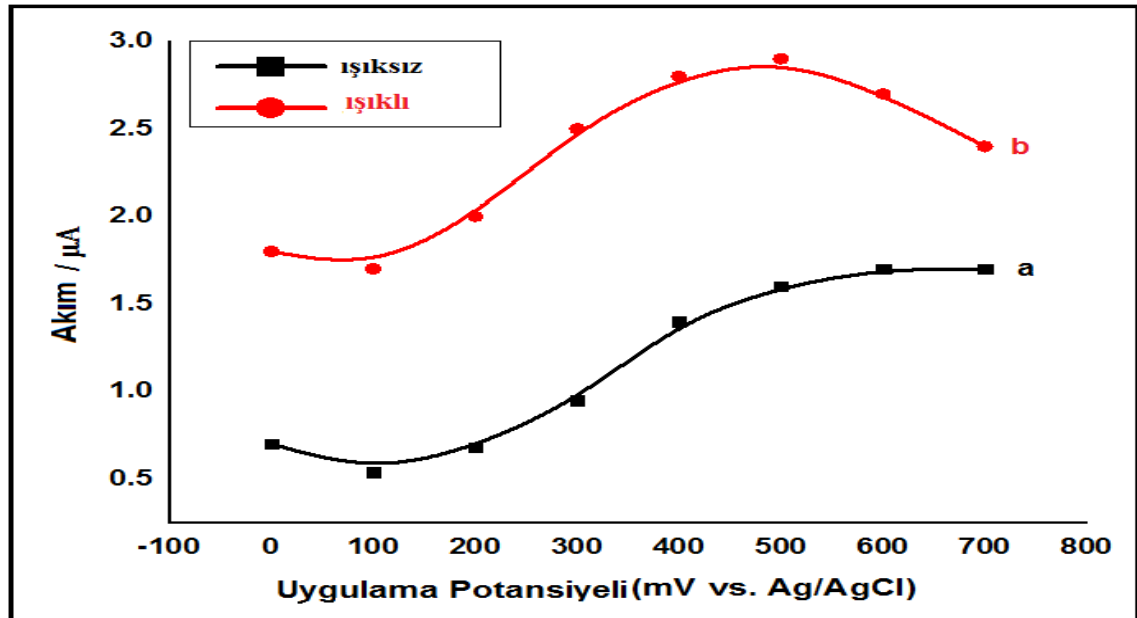
4.3.1.2.2. FIA Sisteminde Amperometrik Yöntemle Elde Edilen Sonuçlar

FIA sisteminde GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH ile de daha önce K.PGE modifiye elektrotta bahsedildiği gibi optimizasyon çalışmaları (uygulama potansiyeli, akış hızı parametreleri) gerçekleştirildi. Öncelikle 0,8 mL/dk akış hızı, 100 μL örnek yükleme hacmi ve 10 cm kolon uzunluğunda çalışıldı. 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS taşıyıcı elektrolitine, yatışkın hal akımı elde edildikten sonra 1,0 M KCl ve 10,0 mM NAD^+ içeren pH 7,0 PBS'de hazırlanmış 0,50 mM glukoz enjekte edilerek farklı potansiyellerde akım-zaman eğrileri GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH için kaydedilerek en uygun uygulama potansiyeli belirlendi.

Şekil 4.54 GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak 0 ile 700 mV arasında değişen uygulama potansiyellerinde 0,50 mM glukoz için elde edilen fiagramları göstermektedir. Bu şekillerden, hem amperometrik hem de fotoamperometrik akım değerleri hesaplanmış ve bu değerlerin uygulama potansiyeline karşı çizilen grafikleri Şekil 4.55'da verilmiştir.



Şekil 4.54. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak farklı uygulama potansiyellerinde 0,50 mM glukoz için elde edilen fiagramlar (akış hızı: 0,8 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 μ L ve kolon uzunluğu: 10 cm, taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS)

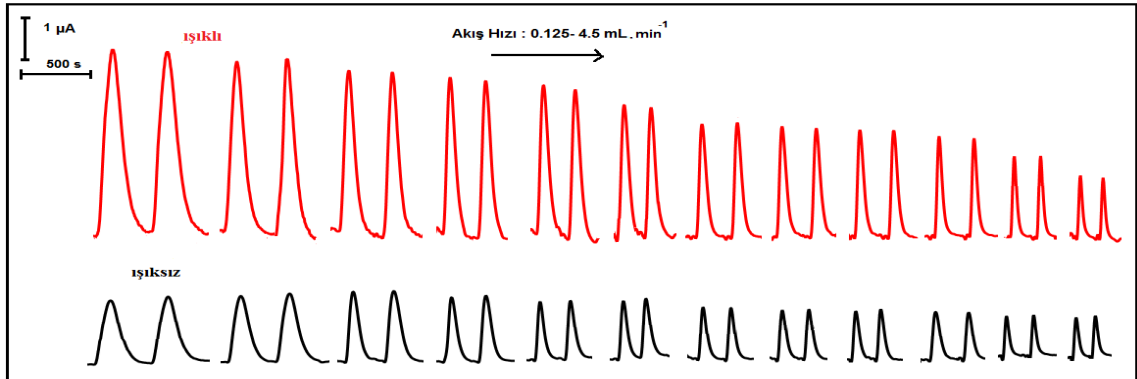


Şekil 4.55. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak elde edilen fiagramlardan, 0,50 mM glukoz için hesaplanan a) amperometrik ve b) fotoamperometrik pik akımlarının uygulama potansiyeli ile değişimi

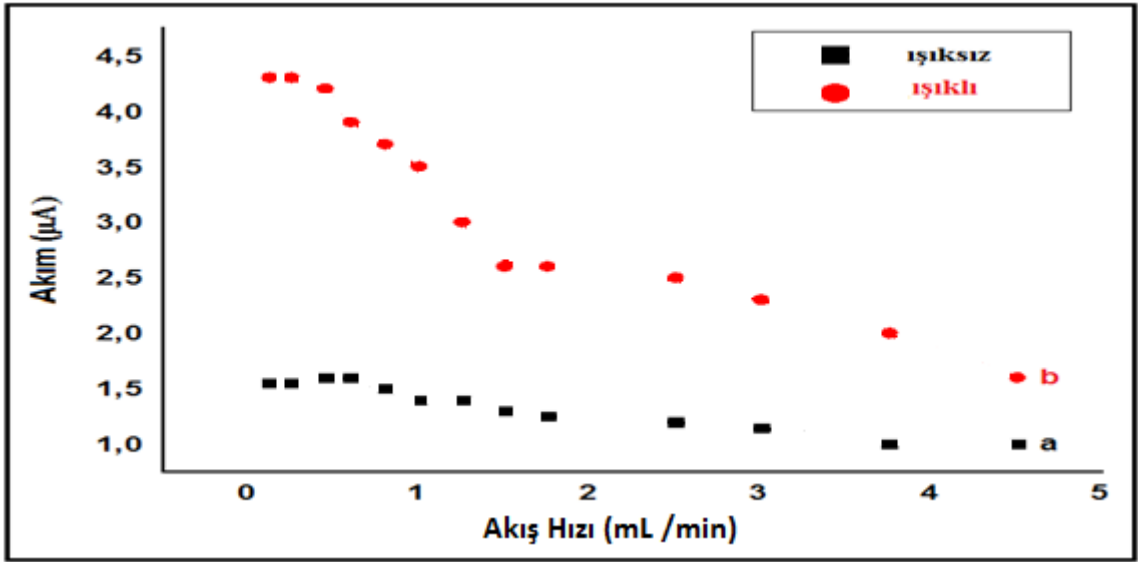
GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH'da hem elektrokatalitik hem de fotoelektrokatalitik akım düşük potansiyellerde de gözlenmiş ve uygulama potansiyeli

artıkça pik akımı 400-500 mV'a kadar belirgin bir şekilde artmış ve 500 mV'dan sonra çok fazla olmamakla birlikte bir miktar azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca 4.54 ve 4.55'den, fotoamperometrik yöntemle elde edilen akım değerlerinin amperometrik yöntemle elde edilenlerden yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Böylece GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH için en iyi uygulama potansiyeli +400 mV optimum potansiyel olarak seçilmiş olup bundan sonraki adımlarda bu potansiyel değerinin kullanılması gerektiğine karar verilmiştir.

İkinci olarak amperometrik ve fotoamperometrik akımlara akış hızının etkisi incelendi. Bu amaçla +400 mV uygulama potansiyeli, 100 µL örnek yükleme hacmi ve 10 cm kolon uzunluğunda çalışıldı. 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS taşıyıcı elektrolite, yatışkın hal akımı elde edildikten sonra yine 1,0 M KCl ve 10,0 mM NAD⁺ içeren pH 7,0 PBS'de hazırlanmış 0,50 mM glukoz enjekte edilerek farklı akış hızlarında akım-zaman eğrileri kaydedildi (Şekil 4.56). Bu akım zaman eğrilerinden amperometrik ve fotoamperometrik akım değerleri hesaplanarak akış hızına karşı değişimi Şekil 4.57'de gösterilmiştir. Akım değerlerinin 0,125'den 4,50 mL/dk'a gidildiğinde azaldığı gözlenmiştir. Bu olay yüksek akış hızlarında enjekte edilen glukoz ile modifiye elektrot yüzeyindeki GDH enzimi ile etkileşime girmesi için yeterli zamanın olmamasından kaynaklanabileceğine bağlanmıştır. Çok düşük akış hızlarında da piklerin oldukça yayvan ve örnekleme frekansının oldukça düşük olmasından dolayı akış hızı olarak 0,125 mL/dk yerine K.PGE de olduğu gibi 0,6 mL/dk akış hızı optimum olarak seçilmiştir.

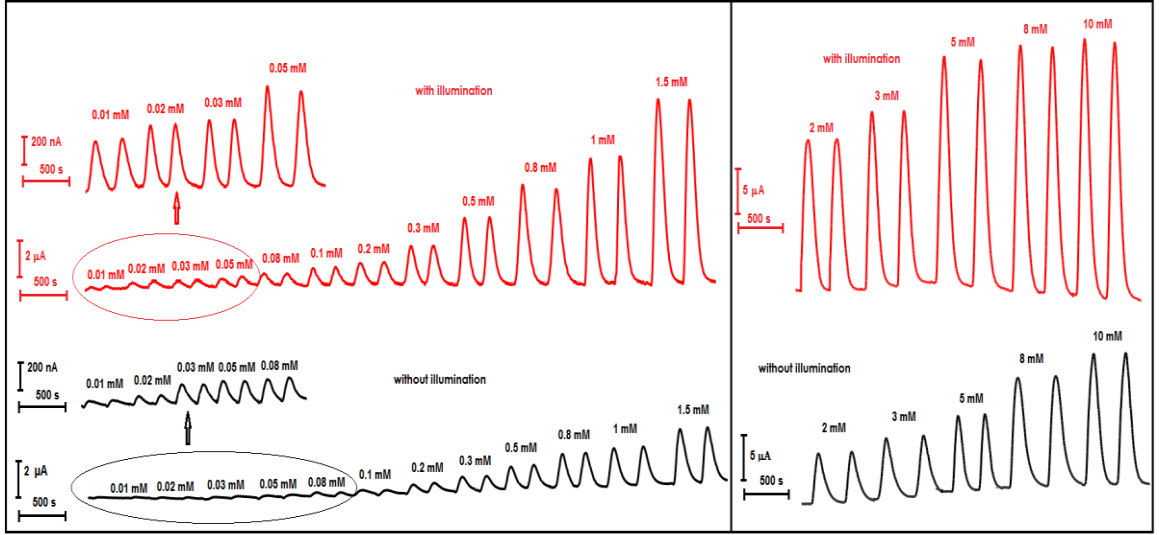


Şekil 4.56. GCE/MWCNT-CdS-ZnS-MAA-GDH kullanılarak farklı akış hızlarında 0,50 mM glukoz için elde edilen fiagramlar (uygulama potansiyeli: +400 mV, örnek yükleme hacmi: 100 µL ve kolon uzunluğu: 10 cm, taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS)



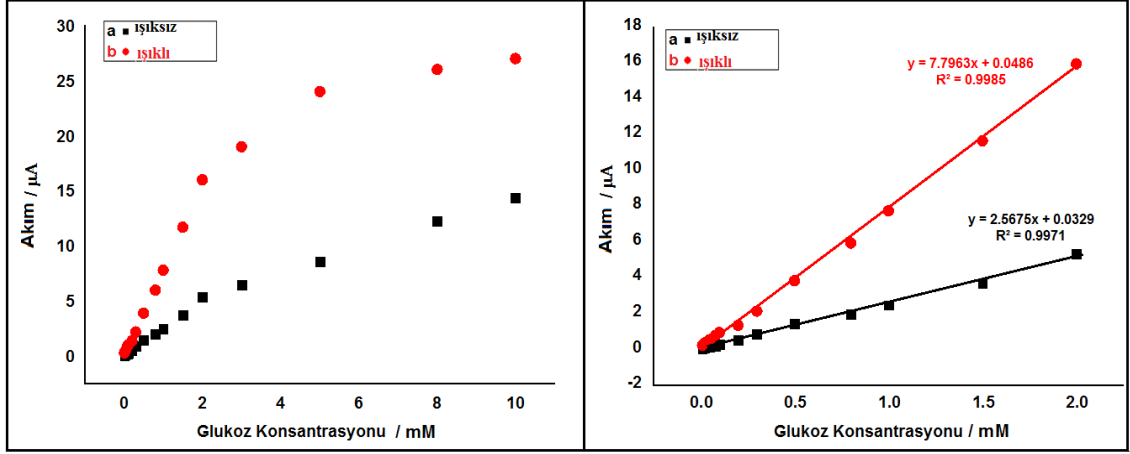
Şekil 4.57. GCE/MWCNT-CdS-ZnS-MAA-GDH kullanılarak 0,50 mM glukoz için elde edilen fiagramlardan hesaplanan a) amperometrik ve b) fotoamperometrik akımların akış hızıyla değişim grafiği

Sonuç olarak optimizasyon çalışmalarından; en uygun uygulama potansiyeli, +400 mV; akış hızı 0,6 mL/dk; örnek yükleme hacmi 100 µL ve kolon uzunluğu 10 cm olarak saptanmıştır. Bu koşullarda GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak farklı derişimlerde glukoz FIA sistemine enjekte edilerek, hem amperometrik hem de fotoamperometrik akım değerlerine ilişkin pikler kaydedilmiştir. Farklı derişimlerdeki glukoz için elde edilen amperometrik ve fotoamperometrik akım-zaman eğrileri Şekil 4.58’de verilmiştir. Her iki yöntemde de glukoz derişimi arttıkça pik yüksekliklerinin artmasıyla birlikte, tüm derişimlerde elektrot yüzeyinin ışıklandırılmasıyla pik yüksekliğinde, normal ışksız konumda elde edilenlere göre önemli artışlar gözlenmiştir.



Şekil 4.58. FIA sisteminde GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak farklı derişimlerde glukoz için elde edilen akım-zaman eğrileri (Taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS; Uygulama potansiyeli: +400 mV; akış hızı: 0,6 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 μ L; kolon uzunluğu: 10 cm)

Şekil 4.59 glukozun derişimine karşı FIA sistemde elde edilen elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik akım grafiğini göstermektedir. Bu şekilden doğrusal kalibrasyon aralığı, hem amperometrik hem de fotoamperometrik yöntem için 0,010-2,0 mM glukoz olarak bulunmuş ve bu iki metodun doğrusallıkları sırasıyla $I(\mu\text{A}) = 2,57C(\text{mM}) + 0,033$ $R^2=0,9971$ ve $I(\mu\text{A}) = 7,80C(\text{mM}) + 0,049$; $R^2=0,9985$ denklemleriyle ifade edilmiştir (Şekil 4.59). Denklemde I pik akımı, C ise glukozun derişimidir. Bu denklemlerdeki eğimler karşılaştırıldığında fotoamperometrik yöntemle elde edilen doğrunun eğiminin (7,80), amperometrik yöntemle elde edilenden (2,57) yaklaşık 3 kat daha büyük olduğu saptanmış ve dolayısıyla, duyarlığın elektrot yüzeyinin ışıklandırılmasıyla bir miktar daha artırılması başarılmıştır.



Şekil 4.59. FIA sisteminde GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak optimum koşullarda a) amperometrik, b) fotoamperometrik yöntemle elde edilen pik akımlarının glukoz derişimine karşı değişimi

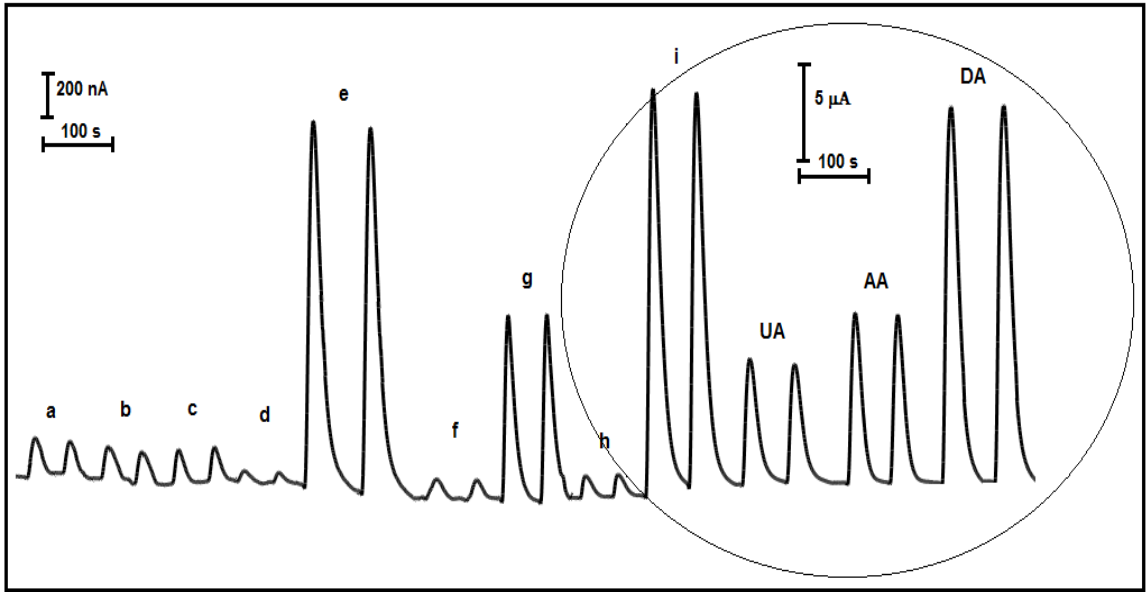
LOD ve LOQ değerleri K.PGE’de bahsedildiği gibi hesaplandı. Elde edilen sonuçlar K.PGE için elde edilen değerlerle birlikte Çizelge 4.3’de verilmiştir. Çizelge 4.3’den görüldüğü gibi GCE/MWCNT’nin hem doğrusal kalibrasyon aralığı hem de duyarlılığının K.PGE den daha iyi olduğu ve elektrot yüzeyinin ışıklandırılmasıyla da artışın daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır.

GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH’nin tekrarlanabilirliği optimum koşullarda 0,50 mM glukozun sisteme 5 kez ardışık olarak enjekte edilmesiyle incelenmiş ve bağıl standart sapmaları sırasıyla amperometrik yöntem için % 3,8 olarak, fotoamperometrik için % 5,8 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, RSD < %10 olduğundan QD modifiye GCE/MWCNT’nin iyi bir tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu göstermektedir.

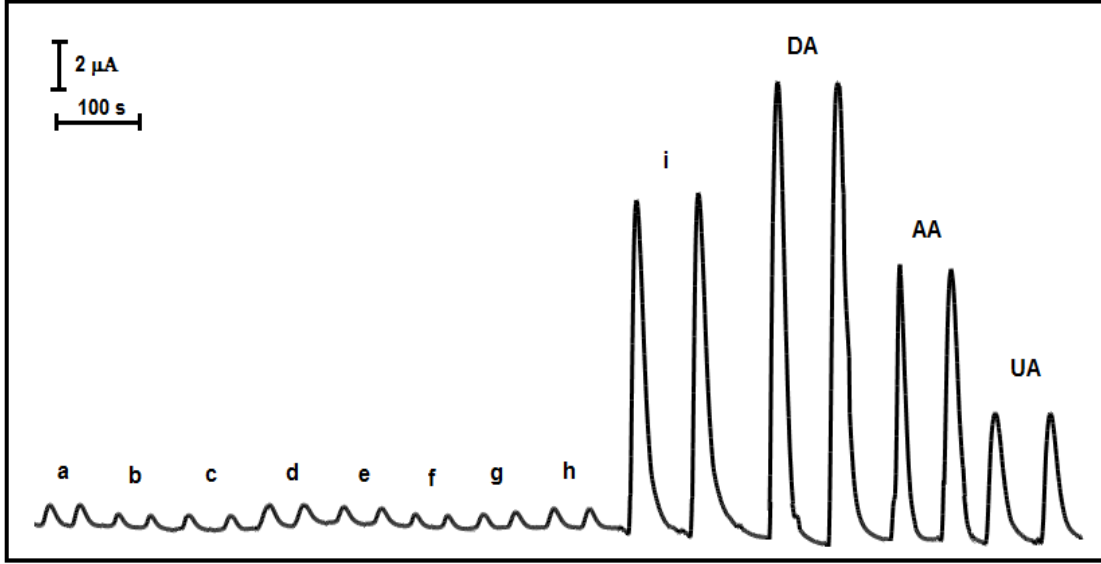
4.3.1.3. Girişim Etkisi Yapabilecek Maddelerin İncelenmesi

Gerçek örnek uygulamalarında, askorbik asit (AA), dopamin (DA), ürik asit (UA), L-sistein (L-Cys) ve galaktoz, sakkaroz gibi diğer monosakkaritler, gerçekleştirilmek istenen glukoz tayinlerinde girişim etkisi yaratmaktadır. Bu amaçla girişime sebep olan bileşikler varlığında glukozu ait fiagramlar, FIA sisteminde amperometrik ve fotoamperometrik olarak, hem GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH hem de K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH elektrot kullanılarak önceden belirlenmiş olan optimum koşullarda kaydedilmiştir. Şekil 4.60’da çeşitli konsantrasyonlarda olası girişimcilerin varlığında, K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak, Şekil 4.61’de ise GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH elektrot kullanılarak 5×10^{-4} M glukoz için alınmış fiagramlar görülmektedir.

Şekil 4.60 ve 4.61'de görüldüğü gibi AA, DA, UA ve L-Cys, amperometrik enzim glukoz sensör kullanımında ciddi girişimlere sebep olmaktadır. Bu durum bu bileşiklerin yükseltgenme potansiyellerinin glukozun yükseltgenme potansiyeline oldukça yakın olmasıyla açıklanabilir. AA'nın sebep olduğu girişimi Kim ve arkadaşları (2013) yaptıkları çalışmada nafyon kullanarak ortadan kaldırmışlardır. Nafyon negatif yüklü olduğundan negatif yüklü AA gibi organik molekülleri uzaklaştırabilmektedir. Ancak DA ve UA gibi pozitif yüklü veya nötr moleküllerin girişimine engel olma konusunda yeterli değildir. Bu bileşiklerin girişim etkisini ortadan kaldırmak için nafyon tabakasına küçük bir miktar kurşun (IV) asetat oksitleyici ajan olarak ilave edilebilir, böylece girişime sebep olan bileşikler elektrot yüzeyine ulaşmadan önce yükseltgenirler. GDH'ın glukozu karşı oldukça seçici olması sebebiyle diğer monosakkaritlerin (galaktoz, sukroz) varlığında GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH elektrot ile herhangi bir girişim etkisi gözlenmemiştir.



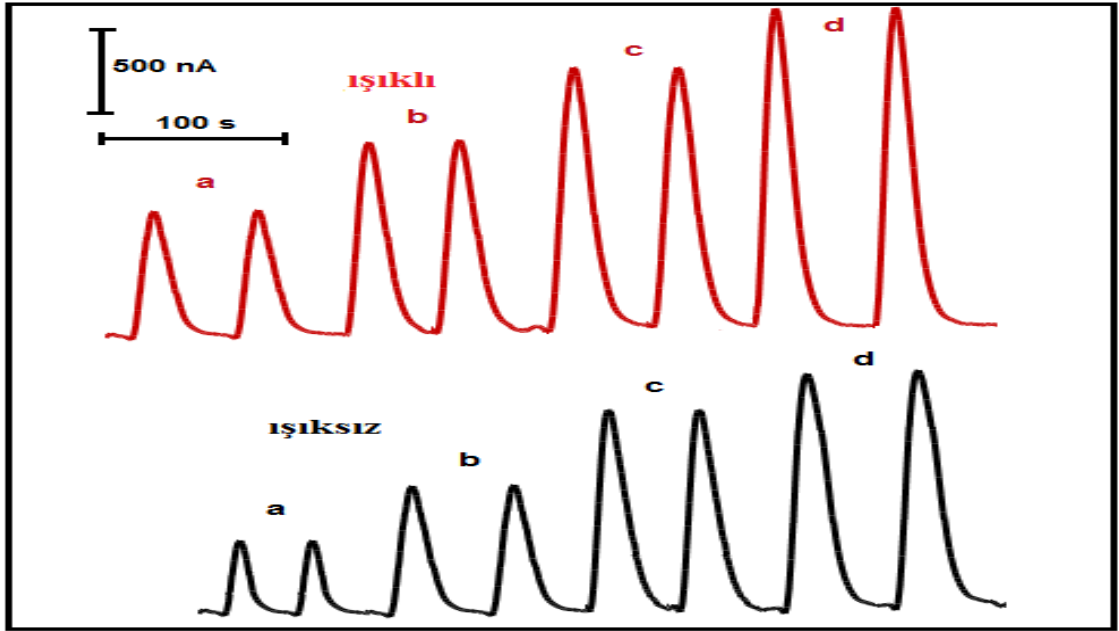
Şekil 4.60. 5×10^{-4} M glukozun (a), 5×10^{-4} M glutamik asit (b), galaktoz (c), sakkaroz (d), L-Cys (e); 5×10^{-2} M glutamik asit (f), galaktoz (g), sakkaroz (h), L-Cys (i) ve 5×10^{-4} M UA, AA, DA varlığında K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH elektrot ile alınmış fiagramları. (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 fosfat tampon çözeltisi, Uygulama potansiyeli: +800 mV; akış hızı: 0,6 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm)



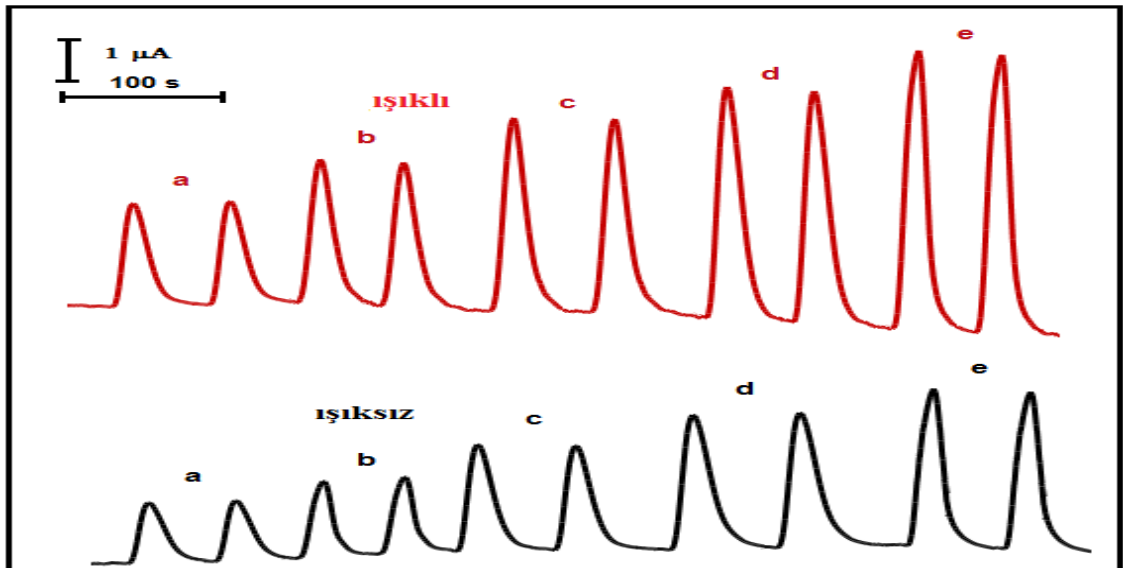
Şekil 4.61. 5×10^{-4} M glukozun (a), 5×10^{-4} M glutamik asit (b), galaktoz (c), sakkaroz (d), L-Cys (e); 5×10^{-2} M glutamik asit (f), galaktoz (g), sakkaroz (h), L-Cys (i) ve 5×10^{-4} M DA, AA, UA varlığında GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH elektrot ile alınmış fiagramları. (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 fosfat tampon çözeltisi, Uygulama potansiyeli: +400 mV; akış hızı: 0,6 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 μL; kolon uzunluğu: 10 cm)

4.3.1.4. Tasarlanan Biyosensörün Gerçek Örneklerle Uygulanması

Hem GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH hem de K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH elektrot ile pratikteki uygulamalarını incelemek amacıyla yapay serum ve ticari olarak satın alınan % 5'lik dekstroz için optimum koşullarda ölçümler gerçekleştirildi. Yapay serum örnekleri (250 μL) 1,0 M KCl ve 10,0 mM NAD^+ içeren pH 7,0 PBS ile 5,0 mL'ye seyreltildi. Glukoz ölçümü seyreltilmiş yapay serumla bilinen hacim ve konsantrasyonlarda glukoz standardı ilave edilerek, standart katma metodu ile FIA sisteminde amperometrik ve fotoamperometrik olmak üzere gerçekleştirildi. Yapay serum için standart katma metoduyla alınan amperometrik ve fotoamperometrik fiagramlar, K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH ve GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH için sırasıyla Şekil 4.62 ve 4.63'de görülmektedir.

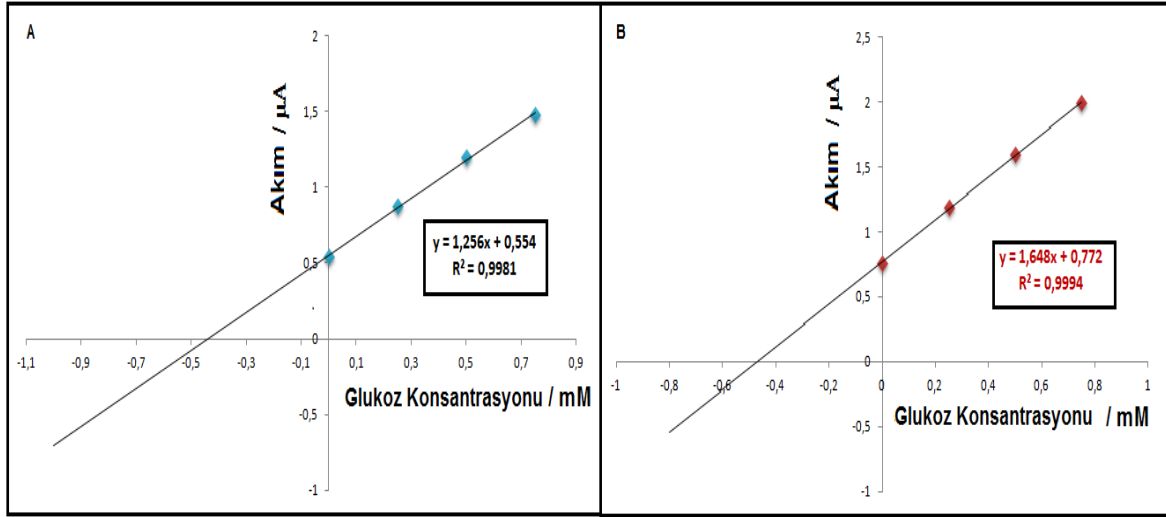


Şekil 4.62. K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH ile alınmış amperometrik (siyah çizgili) ve fotoamperometrik (kırmızı çizgili) standart katma fiagramları, a) örnek, b) örnek+0,25 mM glukoz, c) örnek+0,50 mM glukoz, d) örnek+0,75 mM glukoz. (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS, Uygulama potansiyeli: +800 mV; akış hızı: 0,6 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 μ L; kolon uzunluğu: 10 cm)

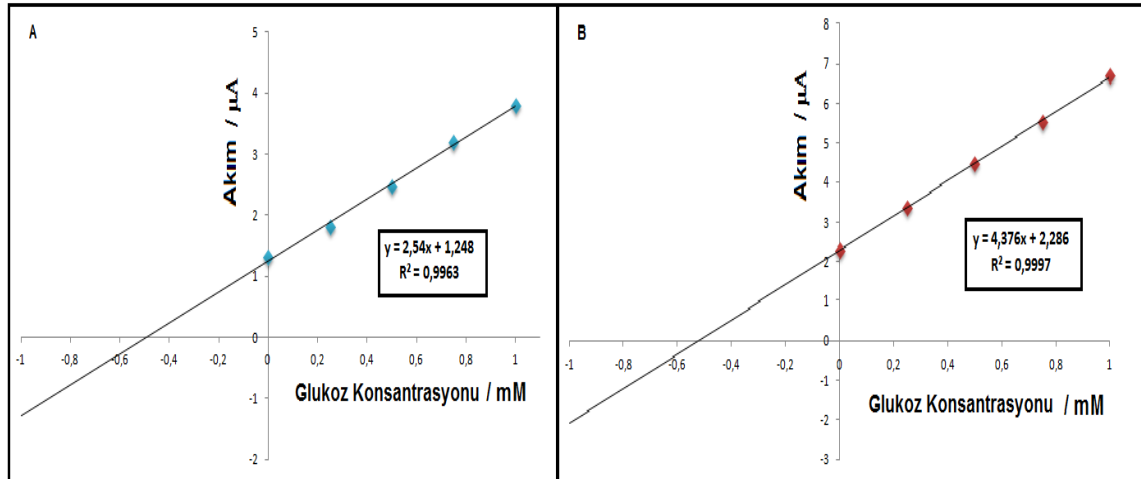


Şekil 4.63. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH ile alınmış amperometrik (siyah çizgili) ve fotoamperometrik (kırmızı çizgili) standart katma fiagramları a) örnek, b) örnek+0,25 mM glukoz, c) örnek+0,50 mM glukoz, d) örnek+0,75 mM glukoz, e) örnek+1,0 mM glukoz (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS, Uygulama potansiyeli: +400 mV; akış hızı: 0,6 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 μ L; kolon uzunluğu: 10 cm)

K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH ile alınan fiagramların pik akımları ölçülerek glukozun derişimine karşı FIA sistemde elde edilen elektrokatalitik (Şekil 4.64A) ve fotoelektrokatalitik (Şekil 4.64B) akım grafiği Şekil 4.64'da, GCE/MWCNT/-CdS-ZnS-MAA/GDH ile alınan elektrokatalitik (Şekil 4.65A) ve fotoelektrokatalitik (Şekil 4.65B) akım grafiği Şekil 4.65'de verilmiştir.



Şekil 4.64. K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH ile yapay serum için alınmış elektrokatalitik (A) ve fotoelektrokatalitik (B) standart katma grafiği



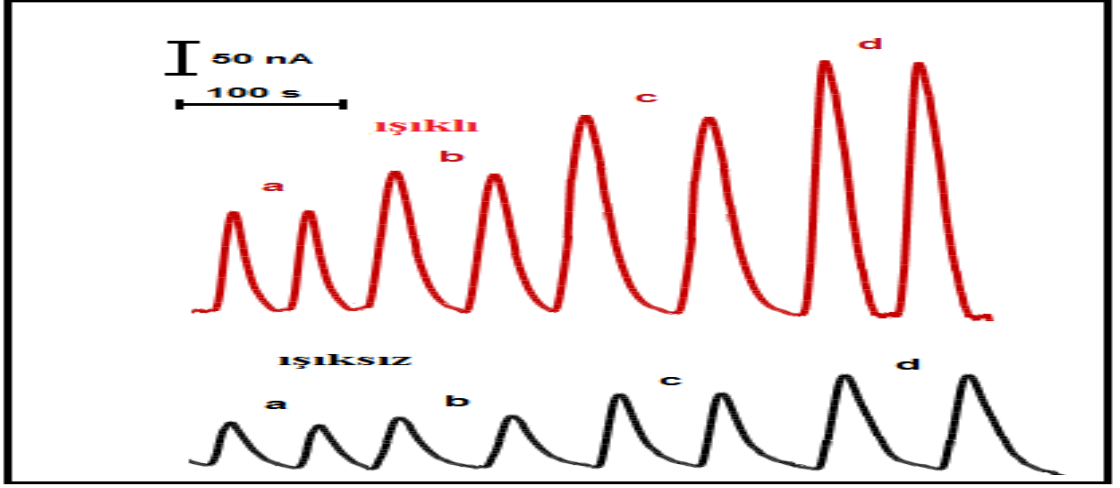
Şekil 4.65. GCE/MWCNT/-CdS-ZnS-MAA/GDH ile yapay serum için alınmış elektrokatalitik (A) ve fotoelektrokatalitik (B) standart katma grafiği

Çizelge 4.5’de K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH ve GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH ile gerçekleştirilen geri kazanım test sonuçları verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi yapay serum için kabul edilebilir değerler elde edilmiştir.

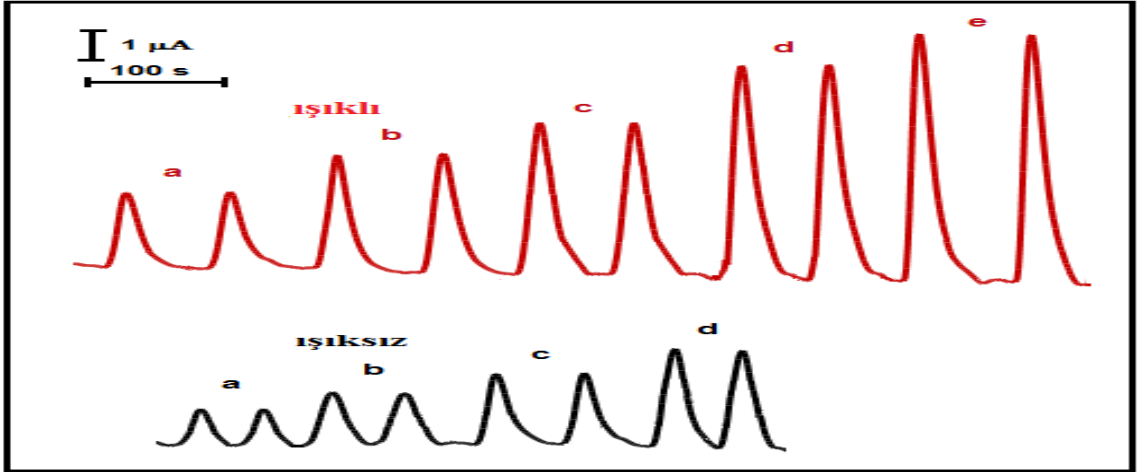
Çizelge 4.5. K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH ve GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH elektrotları ile elde edilen test sonuçları

Elektrot	Yapay Serumda Eklenen Glukoz (mM)	FIA amperometrik			FIA fotoamperometrik		
		Bulunan (mM)	% Geri Kazanım	RSD% (n=3)	Bulunan (mM)	% Geri Kazanım	RSD% (n=3)
(K.PGE-CdS-ZnS-MAA-GDH)	0,25	0,24±0,01	96	4,1	0,26±0,01	104	3,7
	0,50	0,46±0,05	92	9,4	0,51±0,02	102	3,9
	0,75	0,77±0,04	102,6	5,4	0,74±0,015	98,6	2,0
(MWCNT/GCE-CdS-ZnS-MAA-GDH)	0,25	0,22±0,015	88	6,8	0,25±0,05	100	2,3
	0,50	0,48±0,015	96	3,1	0,49±0,01	98	2,0
	0,75	0,76±0,01	103,3	1,3	0,74±0,01	98,6	1,3

Bir diğer gerçek örnek olarak seçilen ve ticari olarak satın alınan dekstroz çözeltisi (5% glukoz içeren yaklaşık 275,5 mM) ise, 1,0 M KCl ve 10,0 mM NAD⁺ içeren pH 7,0 PBS ile seyreltilerek yaklaşık 0,50 mM glukoz içerecek şekilde hazırlandı. Ölçümler ise yapay serumda olduğu gibi standart katma metoduyla gerçekleştirildi. Şekil 4.66’da dekstroz çözeltisinde K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH ile Şekil 4.67’de ise GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH ile, standart katma metoduyla alınan amperometrik ve fotoamperometrik fiagramlar görülmektedir.



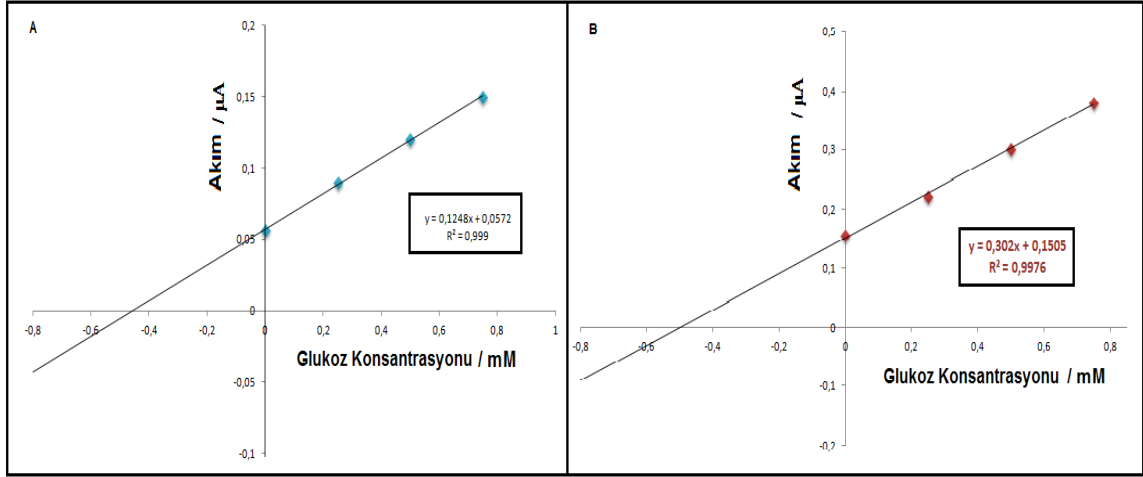
Şekil 4.66. K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH ile alınmış amperometrik (siyah çizgili) ve fotoamperometrik (kırmızı çizgili) standart katma fiagramları a) örnek, b) örnek+0,25 mM glukoz, c) örnek+0,50 mM glukoz, d) örnek+0,75 mM glukoz (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS, Uygulama potansiyeli: +800 mV; akış hızı: 0,6 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 μ L; kolon uzunluğu: 10 cm)



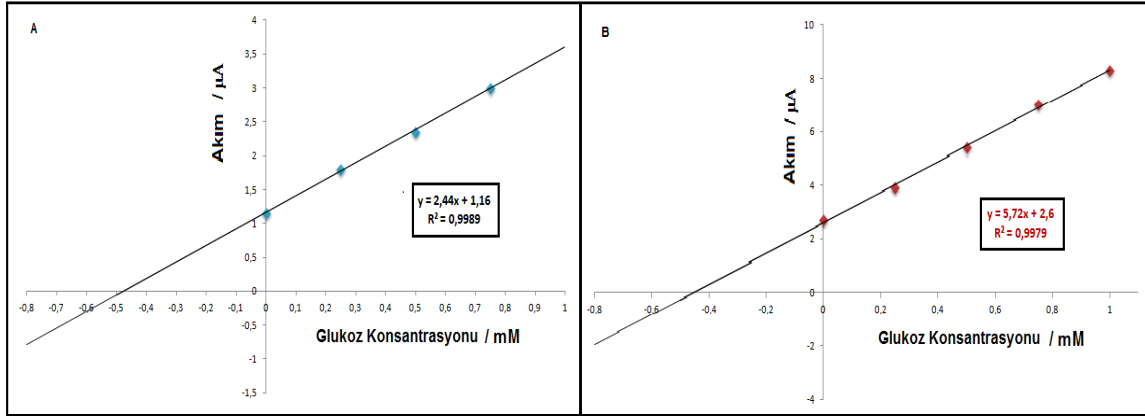
Şekil 4.67. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH ile alınmış amperometrik (siyah çizgili) ve fotoamperometrik (kırmızı çizgili) standart katma fiagramları a) örnek, b) örnek+0,25 mM glukoz, c) örnek+0,50 mM glukoz, d) örnek+0,75 mM glukoz, e) örnek+1,0 M glukoz. (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS, Uygulama potansiyeli: +400 mV; akış hızı: 0,6 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 μ L; kolon uzunluğu: 10 cm)

K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH ile alınan fiagramların pik akımları ölçülerek glukozun derişimine karşı FIA sistemde elde edilen elektrokatalitik (Şekil 4.68A) ve fotoelektrokatalitik (Şekil 4.68B) standart katma grafiği Şekil 4.68'da,

GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH ile alınan elektrokatalitik (Şekil 4.69A) ve fotoelektrokatalitik (Şekil 4.69B) standart katma grafiği Şekil 4.69’da verilmiştir.



Şekil 4.68. K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH ile dekstroz için alınmış elektrokatalitik (A) ve fotoelektrokatalitik (B) standart katma grafiği



Şekil 4.69. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH ile dekstroz için alınmış elektrokatalitik (A) ve fotoelektrokatalitik (B) standart katma grafiği

Çizelge 4.6’da K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH ve GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH elektrotları ile dekstroz çözeltisi için gerçekleştirilen test sonuçları verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi dekstroz için kabul edilebilir değerler elde edilmiştir.

Bir analiz sonucunun güven sınırlarını belirleyen $\mu = \bar{x} \pm t.s/\sqrt{N}$ eşitliğinden yola çıkılarak bulunan değerlerin kabul edilen değere istatistik olarak eşit olup olmadığını belirlemek üzere t testi uygulanmıştır. Buna göre her bir elektrot için amperometrik ve fotoamperometrik yöntemle elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir (N=3, %95 güven

düzeyi için kritik t değeri 4,3'tür).

K.PGE-CdS-ZnS-MAA-GDH için elde edilen değerler amperometrik ve fotoamperometrik yöntemler için sırasıyla $\pm t=6,92$ ve $\pm t=1,76$ 'dır. Fotoamperometrik yöntem için hesaplanan değer, kritik t değerinden küçük olduğu için geliştirilen metotta sistematik hata mevcut değildir. Amperometrik yöntemle elde edilen sonucun kritik t değerinden daha büyük olması, %95 olasılıklı istatistik test deneysel sonuç ile doğru kabul edilen sonuç arasındaki farkın önemli olduğu şeklinde yorumlanabilir.

MWCNT/GCE-CdS-ZnS-MAA-GDH için elde edilen değerler amperometrik ve fotoamperometrik yöntemler için sırasıyla $\pm t=4,1$ ve $\pm t=12,3$ 'dür. Amperometrik yöntem için hesaplanan değer, kritik t değerinden küçük olduğu için geliştirilen metotta sistematik hata mevcut değildir. Fotoamperometrik yöntemle elde edilen sonucun kritik t değerinden daha büyük olması, %95 olasılıklı istatistik test deneysel sonuç ile doğru kabul edilen sonuç arasındaki farkın önemli olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Çizelge 4.6.'daki sonuçlardan K.PGE-CdS-ZnS-MAA-GDH için elde edilen % Gerçeklik ve %BSS değerleri amperometrik yöntem için % Gerçeklik=%92,07 %BSS=%2,15 ve fotoamperometrik yöntem için % Gerçeklik=%101,98 %BSS=%1,9 olarak hesaplanmıştır.

MWCNT/GCE-CdS-ZnS-MAA-GDH için elde edilen % Gerçeklik ve %BSS değerleri amperometrik yöntem için % Gerçeklik=%96 %BSS=%1,72 ve fotoamperometrik yöntem için % Gerçeklik=%94; %BSS=%1,53 olarak bulunmuştur.

Yüzde gerçeklik ve %BSS değerleri kullanılarak yöntemin belirsizliği pratik yoldan aşağıdaki formül ile hesaplanır (Nakiboğlu N., 2014).

$$\%U = \sqrt{|100 - \%G| + 2x\%BSS}$$

Bu belirsizlik değerine göre, dekstroz çözeltisinde glukoz tayininde elde edilen sonuçlar K.PGE-CdS-ZnS-MAA-GDH amperometrik yöntem için; $\mu = \bar{x} \pm \bar{x} \times 0,035$ eşitliği kullanılarak $\mu = 255,5 \pm 8,9$ olarak hesaplanmıştır. Bu sonuca göre güven sınırları 246,6-264,4'dür. Fotoamperometrik yöntem için; $\mu = 283 \pm 6,8$ hesaplanır. Bu sonuca göre güven sınırları 276,2-289,8'dir.

K.PGE-CdS-ZnS-MAA-GDH ve MWCNT/GCE-CdS-ZnS-MAA-GDH ile elde edilen amperometrik ve fotoamperometrik sonuçlara F testi uygulanmış ve her iki ortalamanın kesinlikleri aynı bulunmuştur ($F_{\text{tablo}}=9,27$). Buna göre geçerli olan t testinden hesaplanan sonuçlar için $t_{\text{hsp}} \leq t_{\text{tablo}}$ bulunduğundan "kıyaslanan ortalamalar arasında %95 olasılıkla anlamlı bir fark yoktur" sonucuna varılarak, yöntemin gerçekliği sağladığı

görülmüştür ($t_{\text{tablo}}=2,77$). K.PGE-CdS-ZnS-MAA-GDH, amperometrik ve fotoamperometrik sonuçların ortalamaları için $t_{\text{hsp}}=0,0026$; MWCNT/GCE-CdS-ZnS-MAA-GDH amperometrik ve fotoamperometrik sonuçların ortalamaları için $t_{\text{hsp}}=0,447$; her iki elektrotla amperometrik yöntem için $t_{\text{hsp}}=0,081$; her iki elektrotla amperometrik yöntem için $t_{\text{hsp}}=0,081$ değerleri hesaplanmıştır.

MWCNT/GCE-CdS-ZnS-MAA-GDH amperometrik yöntem için; $\mu=266,6\pm 7,3$ ve sonuca göre güven sınırları 259,4-273,9 iken fotoamperometrik yöntem için; $\mu=261,1\pm 7,8$ olarak hesaplanır. Bu sonuca göre güven sınırları 253,3-269 aralığıdır.

Sonuçlar değerlendirildiğinde, doğru kabul edilen değer olan 277,5 değerinin K.PGE-CdS-ZnS-MAA-GDH fotoamperometrik yöntem ile elde edilen güven sınırları (276,2-289,8) arasında olduğu görülmektedir. Bu elektrot ve yöntemle doğruya en yakın sonucun elde edildiği söylenebilir.

Çizelge 4.6. K.PGE-CdS-ZnS-MAA-GDH ve MWCNT/GCE-CdS-ZnS-MAA-GDH elektrotları ile dekstroz çözeltisi için elde edilen test sonuçları

Elektrot	Örnek	FIA amp.	FIA fotoamp.
		Bulunan (mM)	Bulunan (mM)
(K.PGE-CdS-ZnS-MAA-GDH)	Etikette Belirtilen Miktar (%5 =277,5mM)	255,5±5,5	283±5,4
(MWCNT/GCE-CdS-ZnS-MAA-GDH)		266,6±4,6	261,1±4

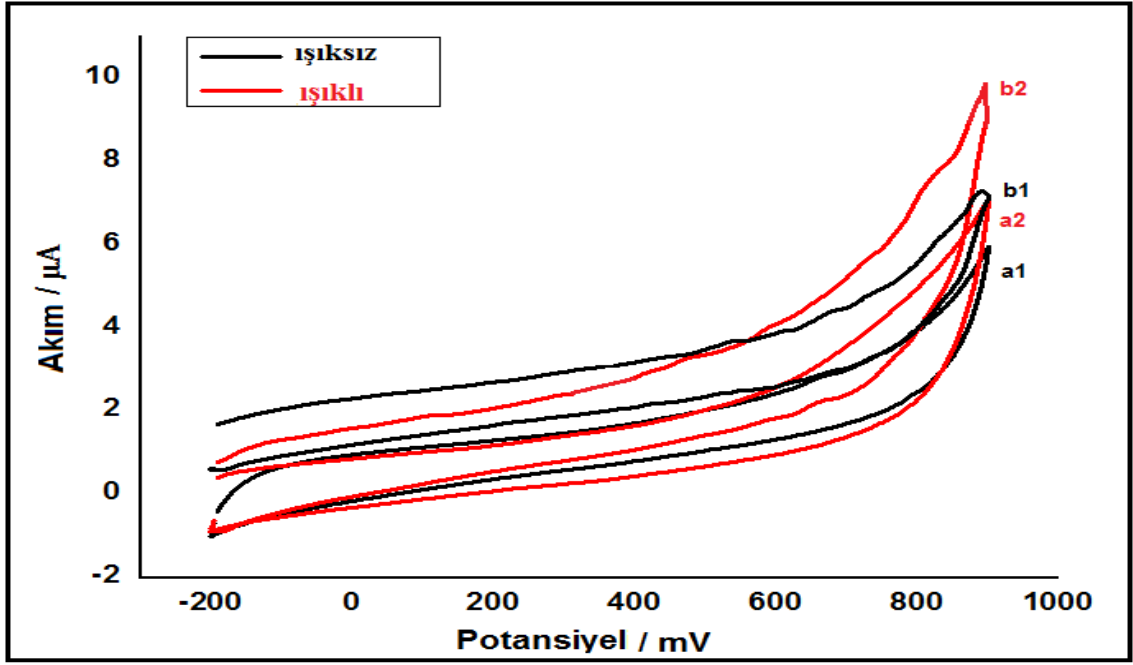
4.3.2. ALDH ve NAD^+/NADH Redoks Çiftine Dayalı Biyosensör Çalışmaları

4.3.2.1. K.PGE Kullanımına Ait Biyosensör Çalışmaları

4.3.2.1.1. Döngüsel Voltammetrik Yöntemle Elde Edilen Sonuçlar

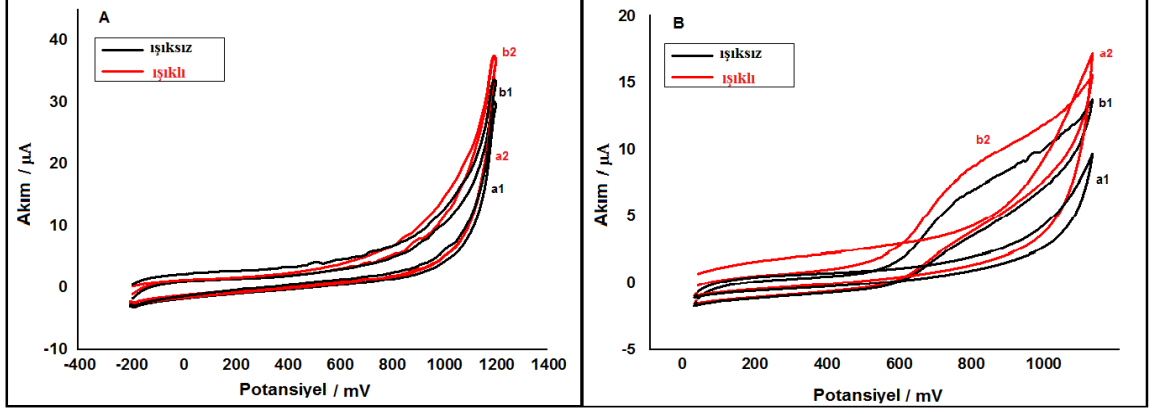
Etanol ile NAD^+ 'nin Alkol dehidrogenaz (ALDH) varlığında enzimatik tepkimesi sonucu oluşan NADH 'nin K.PGE/CdS-ZnS-MAA/ALDH yüzeyinde elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik yükseltgenmesi döngüsel voltammogramların kaydedilmesiyle incelendi. İlk olarak daha önce çalışılan glukoz biyosensöründe olduğu gibi modifiye edilen elektrotlarla istenilen yanıtlar alınamadığından (Şekil 4.70) elektrot hazırlanma prosedüründe birtakım değişiklik yapılma yoluna gidildi.

Elektrot yüzeyi ayrı ayrı CdS ve ZnS ile modifiye edilerek alkole yanıt voltammetrik olarak izlendi. Bunun nedeni Şekil 4.70'de görüldüğü gibi hibrid kuantum nokta (ZnS-CdS) modifiye elektrotla alkole yanıt alınamamasındandır.



Şekil 4.70. K.PGE/CdS-ZnS-MAA/ALDH'nin destek elektrolitteki (a1 ve a2) ve 500,0 mM etanol ortamındaki (b1 ve b2) döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl ve 10,0 mM NAD⁺ içeren pH 7,0 PBS; a1 ve b1: ışıksız; a2 ve b2: ışıklı

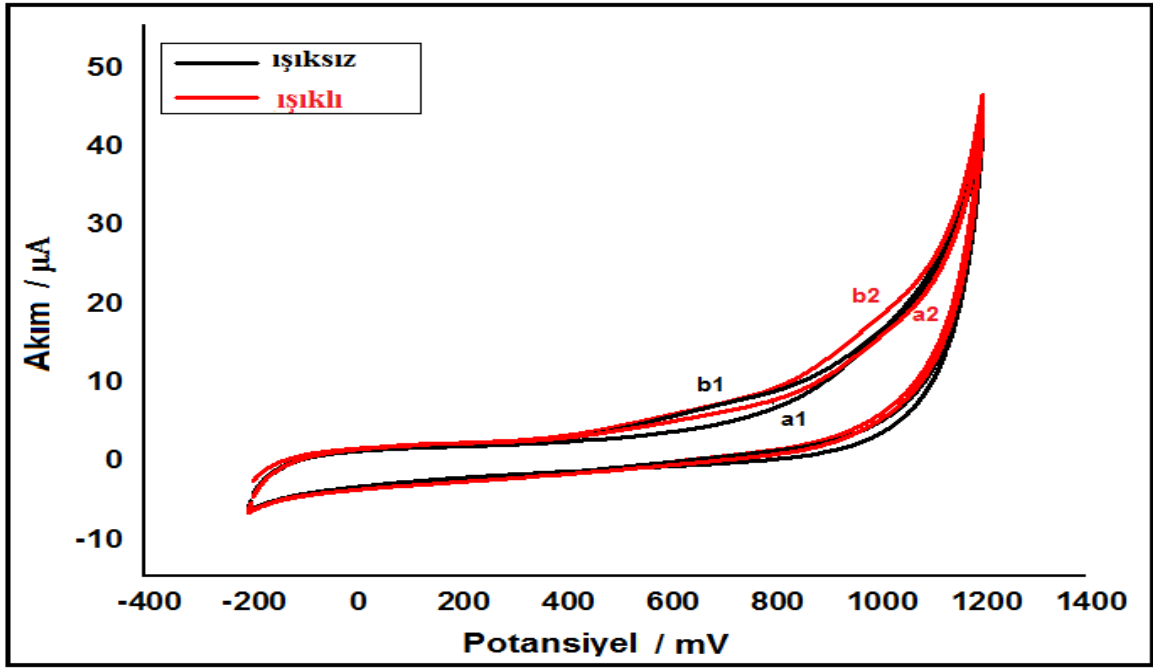
Şekil 4.71'de K.PGE/CdS-MAA/ALDH ve K.PGE/ZnS-MAA/ALDH ile 500,0 mM etanol varlığında alınan döngüsel voltammogramlar görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi elektrot yüzeyi CdS ile modifiye edildiğinde herhangi bir pike rastlanmazken ışığın etkisi de gözlenmemektedir. Buna sebep olarak alkol dehidrogenazın yapısında sıkıca bağlı bulunan Zn atomları ve CdS'ün meydana gelen enzimatik tepkimeyi inhibe etmesi gösterilebilir. K.PGE yüzeyi deneysel prosedürde verildiği gibi ZnS ile modifiye edildiğinde ise hem ortamda etanol bulunmazken hem de 500,0 mM etanol varlığında alınan döngüsel voltammogramlarda ışığın etkisi belirgin şekilde gözlenmektedir. Substrata (etanol) ilişkin yaklaşık 800 mV'da tersinmez bir pik gözlenmiş (Şekil 4.71B/b1) ve yüzeyin ışıklandırılmasıyla da bu pikte potansiyel olarak pek değişim gözlenmezken akımın bir miktar arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.71B/b2). Bu pik, enzimatik tepkime sonucu oluşan NADH'nin tersinmez olarak NAD⁺'ya yükseltgenmesine bağlanmaktadır (Tepkime 4.7 ve 4.8).



Şekil 4.71. A) K.PGE/CdS-MAA/ALDH B) K.PGE/ZnS-MAA/ALDH'nin destek elektrolitteki (a1 ve a2) ve 500,0 mM etanol ortamındaki (b1 ve b2) döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl ve 10,0 mM NAD^+ içeren pH 7,0 PBS; a1 ve b1: ışksız; a2 ve b2: ışıklı



Yukarıda ZnS modifiye K.PGE ile elde edilen voltammogramlar ile yalın elektrotla alınan yanıtı karşılaştırmak için QD modifiye edilmemiş K.PGE kullanılarak etanolün (K.PGE/ALDH) elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal yanıtı izlenmiş ve elde edilen voltammogramlar Şekil 4.72'de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi elektrot modifiye edilmediğinden ortamda substrat yokken ve varken elektrot yüzeyine ışık düşürülmesine rağmen herhangi bir akım artışı gözlenmemiştir. Sonuç olarak K.PGE/ZnS-MAA/ALDH elektrotla çalışmalara devam etmek uygun görülmüştür.



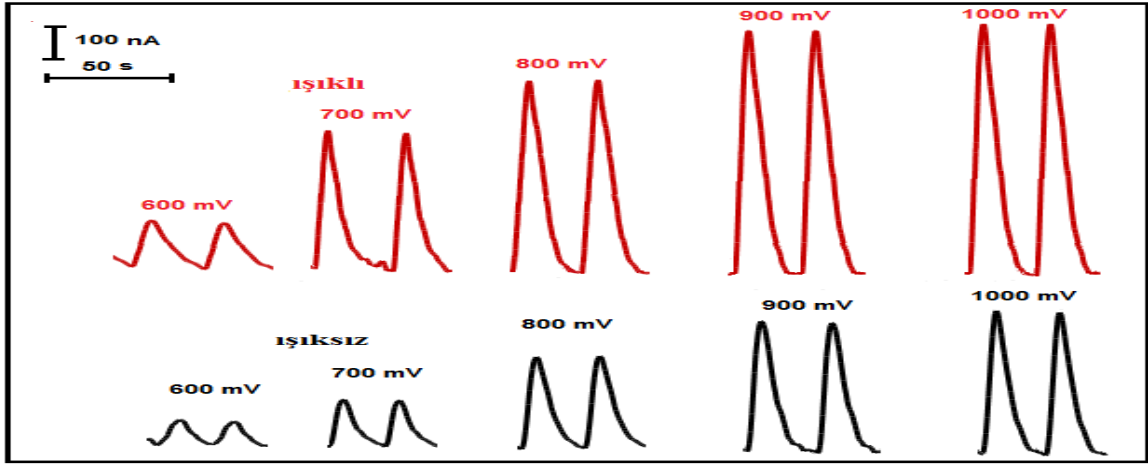
Şekil 4.72. K.PGE/ALDH'nin destek elektrolitteki (a1 ve a2) ve 500,0 mM etanol ortamındaki (b1 ve b2) döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl ve 10,0 mM NAD⁺ içeren pH 7,0 PBS; a1 ve b1: ışksız; a2 ve b2: ışıklı

4.3.2.1.2. FIA Sisteminde Amperometrik Yöntemle Elde Edilen Sonuçlar

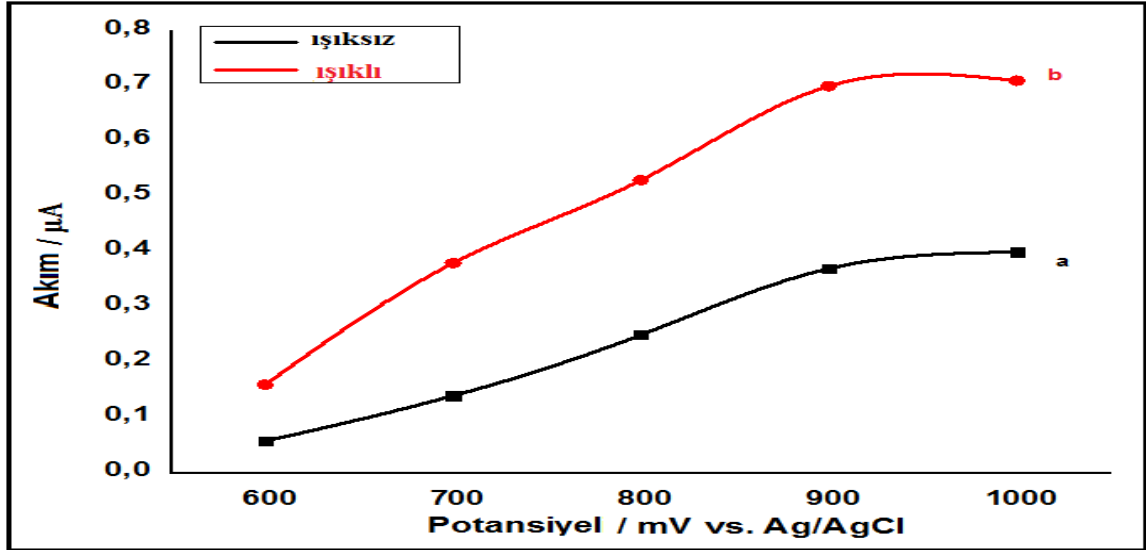
FIA sisteminde K.PGE/ZnS-MAA/ALDH'nin etanole verdiği en iyi amperometrik ve fotoamperometrik yanıtı elde etmek için sırasıyla uygulama potansiyeli, akış hızı parametreleri optimize edilmiştir. Öncelikle 1,3 mL/dk akış hızı, 100 µL örnek yükleme hacmi ve 10 cm kolon uzunluğunda çalışılarak optimum uygulama potansiyeli için ön çalışmalar gerçekleştirildi. 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS taşıyıcı elektrolite, yatışkan hal akımı elde edildikten sonra 1,0 M KCl ve 10,0 mM NAD⁺ içeren pH 7,0 PBS'de hazırlanmış 0,50 mM etanol enjekte edilerek farklı potansiyelerde akım-zaman eğrileri K.PGE/ZnS-MAA/ALDH için kaydedilerek en uygun uygulama potansiyeli belirlendi.

Şekil 4.73 K.PGE/ZnS-MAA/ALDH kullanılarak 600 ile 1000 mV arasında değişen uygulama potansiyelerinde 0,50 mM etanol için elde edilen fiagramları göstermektedir. Bu şekillerden, hem amperometrik hem de fotoamperometrik akım değerleri hesaplanmış ve bu değerlerin uygulama potansiyeline karşı çizilen grafikleri Şekil 4.74'de verilmiştir. K.PGE/ZnS-MAA/ALDH'da hem elektrokatalitik hem de fotoelektrokatalitik akım 600 mV civarında gözlenmiş ve uygulama potansiyeli arttıkça pik akımı 900 mV'a kadar belirgin bir şekilde artmış ve 900 mV'dan sonra çok fazla değişmediği gözlenmiştir.

Ayrıca Şekil 4.73 ve 4.74'den, fotoamperometrik yöntemle elde edilen akım değerlerinin amperometrik yöntemle elde edilenlerden yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Böylece K.PGE/ZnS-MAA/ALDH için en iyi uygulama potansiyeli +900 mV optimum potansiyel olarak seçilmiş olup bundan sonraki adımlarda bu potansiyel değerinin kullanılması gerektiğine karar verilmiştir.

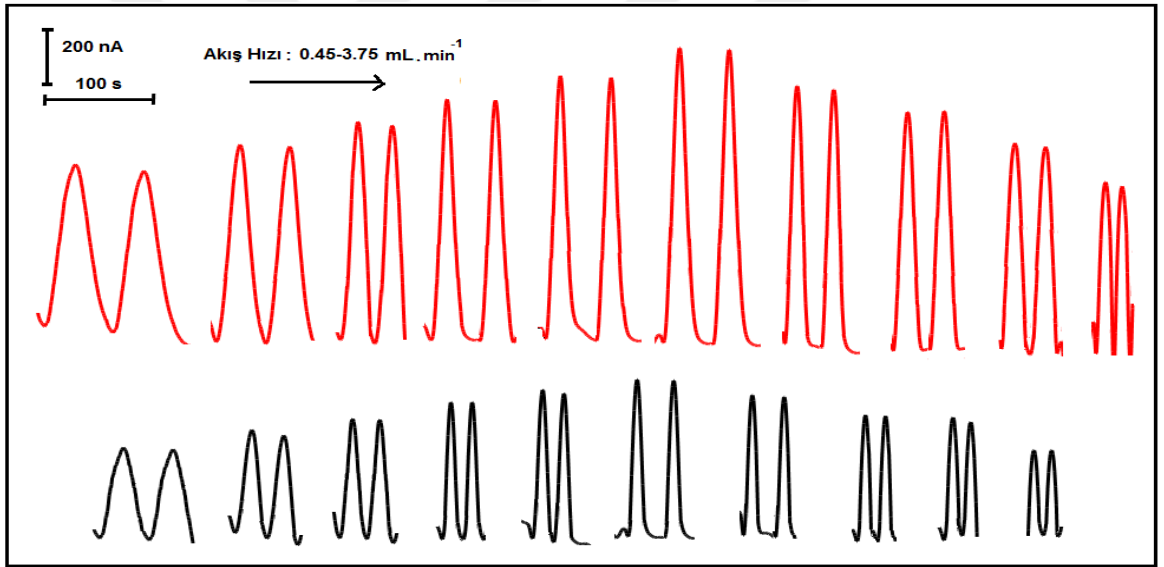


Şekil 4.73. K.PGE/ZnS-MAA/ALDH kullanılarak farklı uygulama potansiyellerinde 0,50 mM etanol için elde edilen fiagramlar (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS, akış hızı: 1,3 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 μ L; kolon uzunluğu: 10 cm)

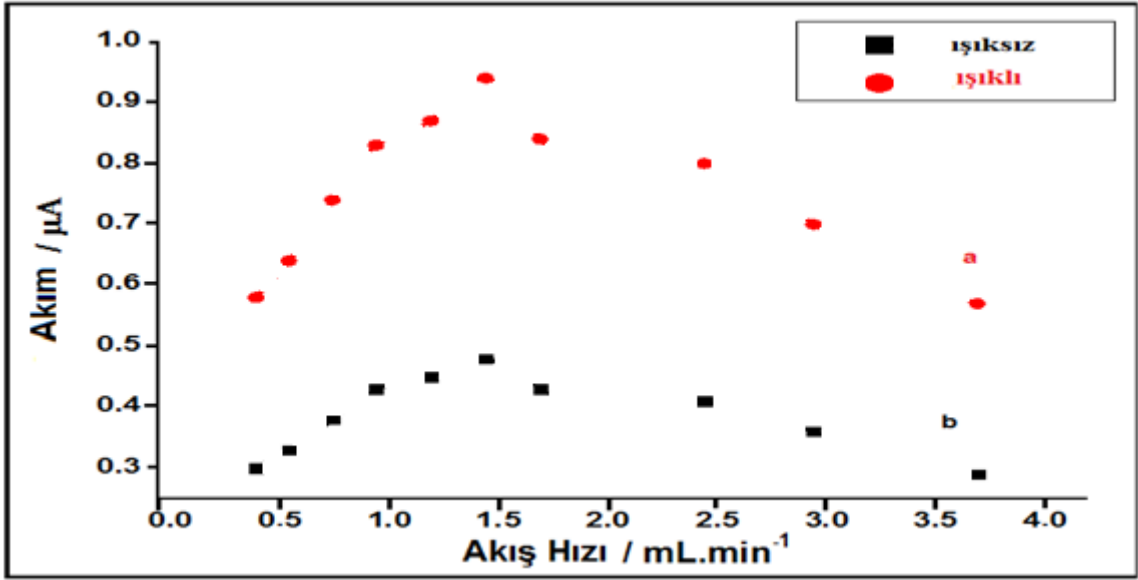


Şekil 4.74. K.PGE/ZnS-MAA/ALDH kullanılarak elde edilen fiagramlardan, 0,50 mM etanol için hesaplanan a) amperometrik ve b) fotoamperometrik pik akımlarının uygulama potansiyeli ile değişimi

İkinci olarak amperometrik ve fotoamperometrik akımlara akış hızının etkisi incelendi. Bu amaçla +900 mV uygulama potansiyeli, 100 µL örnek yükleme hacmi ve 10 cm kolon uzunluğunda çalışıldı. 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS taşıyıcı elektrolite, yatışkın hal akımı elde edildikten sonra yine 1,0 M KCl ve 10,0 mM NAD⁺ içeren pH 7,0 PBS'de hazırlanmış 0,50 mM etanol enjekte edilerek farklı akış hızlarında akım-zaman eğrileri kaydedildi (Şekil 4.75). Bu akım zaman eğrilerinden amperometrik ve fotoamperometrik akım değerleri hesaplanarak akış hızına karşı değişimi Şekil 4.76'de gösterilmiştir. Akım değerlerinin 0,45'den 3,75 mL/dk'a gidildiğinde azaldığı gözlenmiştir. Bu olay yüksek akış hızlarında enjekte edilen etanol ile modifiye elektrot yüzeyindeki ALDH enzimi ile etkileşime girmesi için yeterli zamanın olmamasından kaynaklanabileceğine bağlanmıştır. En yüksek pik akımı 1,5 mL/dk akış hızında gözleendiğinden bu akış hızı optimum olarak seçilmiştir.

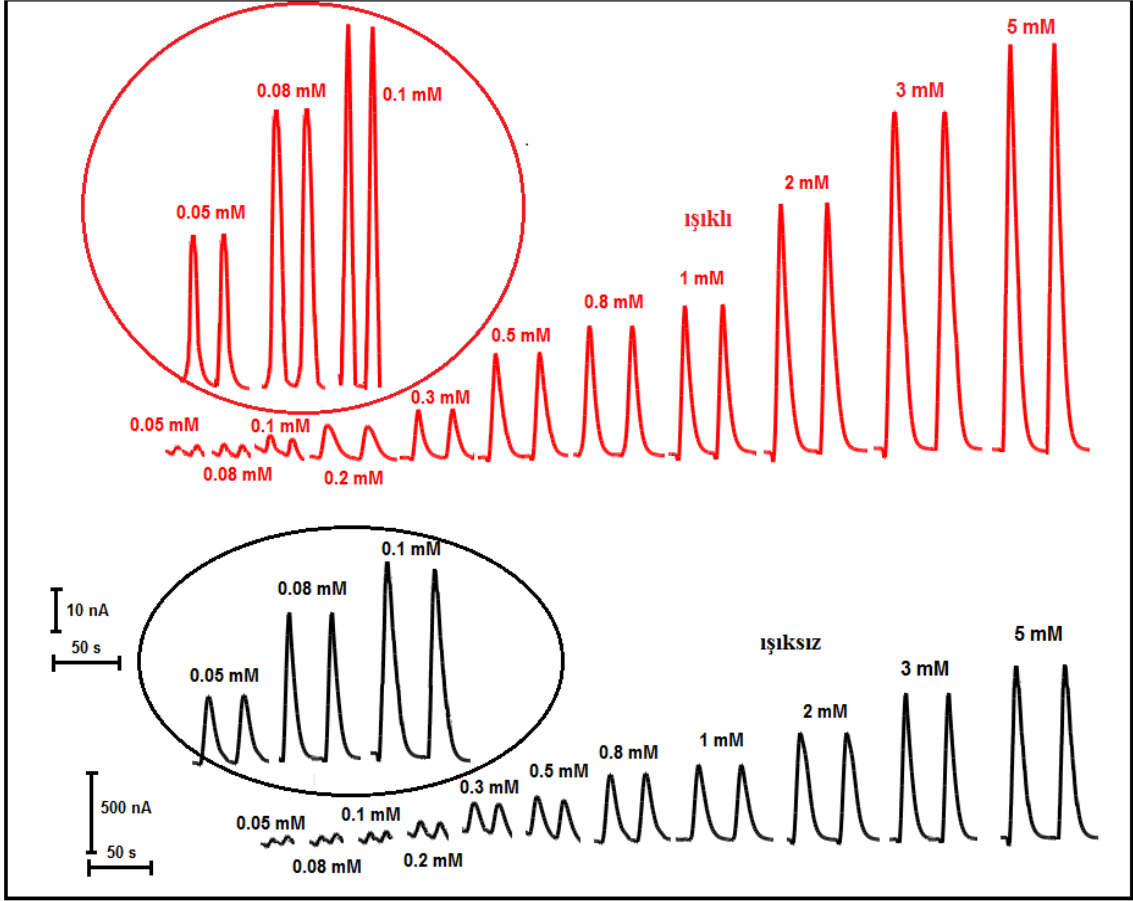


Şekil 4.75. K.PGE/CdS-MAA/ALDH kullanılarak farklı akış hızlarında 0,50 mM etanol için elde edilen fiagramlar (uygulama potansiyeli: +900 mV, örnek yükleme hacmi: 100 µL ve kolon uzunluğu: 10 cm, taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS)



Şekil 4.76. K.PGE/CdS-MAA/ALDH kullanılarak 0,50 mM etanol için elde edilen fiagramlardan hesaplanan a) amperometrik ve b) fotoamperometrik akımların akış hızıyla değişim grafiği

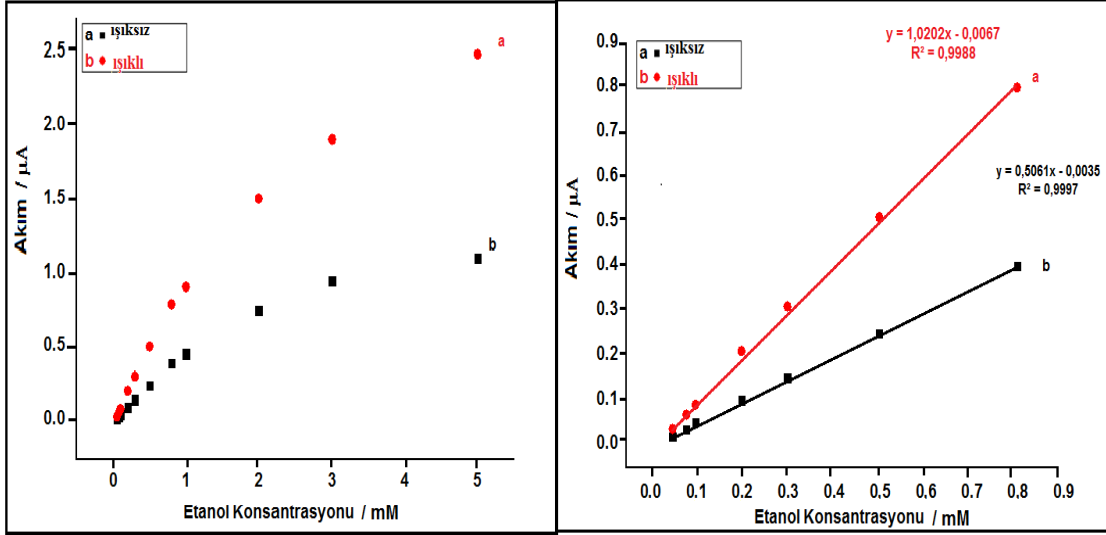
Sonuç olarak optimizasyon çalışmalarından; en uygun uygulama potansiyeli, +900 mV; akış hızı 1,5 mL/dk; örnek yükleme hacmi 100 µL ve kolon uzunluğu 10 cm olarak saptanmıştır. Bu koşullarda K.PGE/CdS-MAA/ALDH kullanılarak farklı derişimlerde etanol FIA sistemine enjekte edilerek, hem amperometrik hem de fotoamperometrik akım değerlerine ilişkin pikler kaydedilmiştir. Farklı derişimlerdeki etanol için elde edilen amperometrik ve fotoamperometrik akım-zaman eğrileri Şekil 4.77’de verilmiştir. Her iki yöntemde de etanol derişimi arttıkça pik yüksekliklerinin artmasıyla birlikte, tüm derişimlerde elektrot yüzeyinin ışıklandırılmasıyla pik yüksekliğinde, normal ışıksız konumda elde edilenlere göre önemli artışlar gözlenmiştir.



Şekil 4.77. FIA sisteminde K.PGE/CdS-MAA/ALDH kullanılarak farklı derişimlerde etanol için elde edilen akım-zaman eğrileri (Taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS; Uygulama potansiyeli: +900 mV; akış hızı: 1,5 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 μ L; kolon uzunluğu: 10 cm)

Şekil 4.78 etanolün derişimine karşı FIA sistemde elde edilen elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik akım grafiğini göstermektedir. Bu şekilden doğrusal kalibrasyon aralığı, hem amperometrik hem de fotoamperometrik yöntem için 0,050-0,80 mM etanol olarak bulunmuş ve bu iki metodun doğrusallıkları sırasıyla $I(\mu\text{A}) = 0,51C(\text{mM}) - 0,0035$ $R^2=0,9997$ ve $I(\mu\text{A}) = 1,02C(\text{mM}) - 0,0067$; $R^2=0,9988$ denklemleriyle ifade edilmiştir (Şekil 4.78).

Denklemden I pik akımı, C ise etanolün derişimidir. Bu denklemlerdeki eğimler karşılaştırıldığında fotoamperometrik yöntemle elde edilen doğrunun eğiminin (1,02), amperometrik yöntemle elde edilenden (0,51) yaklaşık 2 kat daha büyük olduğu saptanmış ve dolayısıyla, duyarlığın elektrot yüzeyinin ışıklandırılmasıyla bir miktar daha artırılması başarılmıştır.



Şekil 4.78. FIA sisteminde K.PGE/CdS-MAA/ALDH kullanılarak optimum koşullarda a) amperometrik, b) fotoamperometrik yöntemle elde edilen pik akımlarının etanol derişimine karşı değişimi

Gözlenebilme sınırı (Limit of detection, LOD) ve tayin sınırı (Limit of quantification, LOQ) değerlerini elde etmek için etanol içermeyen 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS’de hazırlanmış 10,0 mM NAD⁺ FIA sistemine 7 kez enjekte edilerek elde edilen verilerden tanık için standart sapma (sk) değerleri hesaplandı. LOD, 3sk/m ve LOQ, 10sk/m den (m:ęim) hem amperometrik hem de fotoamperometrik yöntem için hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7’de GCE/MWCNT için elde edilen değerlerle birlikte verilmiştir.

K.PGE/CdS-ZnS-MAA/ALDH’nin tekrarlanabilirliği optimum koşullarda 0,50 mM etanolün sisteme 5 kez ardışık olarak enjekte edilmesiyle incelenmiş ve bağıl standart sapmaları sırasıyla amperometrik yöntem için % 2,0 olarak, fotoamperometrik için % 5,4 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar QD modifiye GCE/MWCNT’nin iyi bir tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.7. QD modifiye elektrotlarla ALDH enzimine dayalı biyosensör için elde edilen analitiksel parametreler

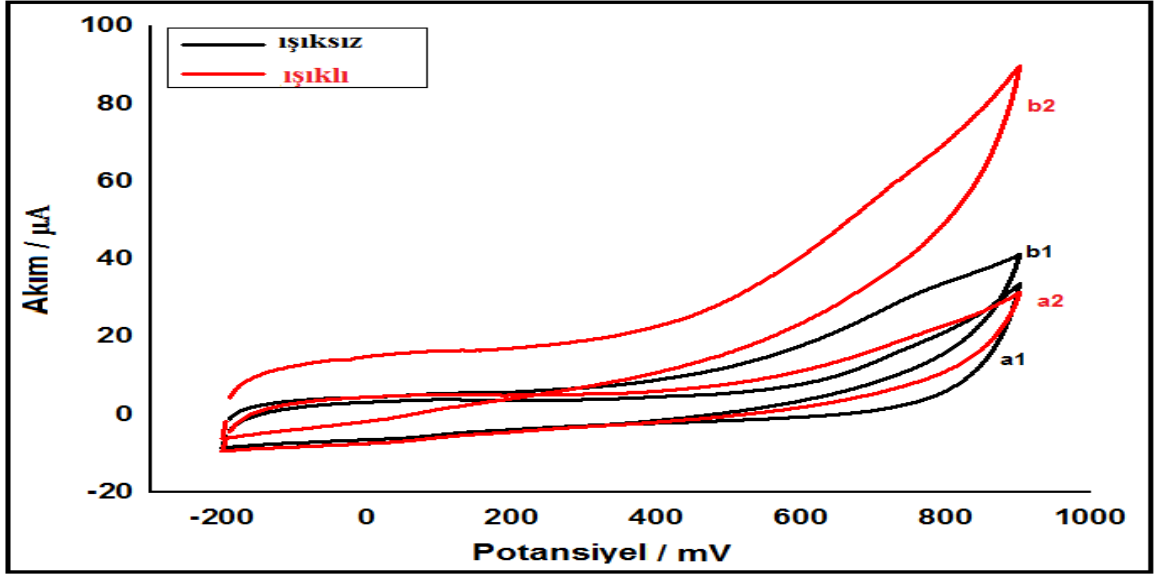
Elektrot	Yöntem	Doğrusal Aralık	Doğru Denklemi	LOD/LOQ
K.PGE/ZnS-MAA/ALDH	Amp.	0,05-0,8 mM	$I(\mu A) = 0,51C(mM) - 0,0035$ $R^2 = 0,9997$	0,005/0,015 mM
	Fotoamp.	0,05-0,8 mM	$I(\mu A) = 1,02C(mM) - 0,0067$ $R^2 = 0,9985$	0,002/0,007 mM
GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH	Amp.	0,05-0,5 mM	$I(\mu A) = 0,65C(mM) - 0,0065$ $R^2 = 0,9985$	0,003/0,012 mM
	Fotoamp.	0,05-0,5 mM	$I(\mu A) = 1,11C(mM) - 0,0206$ $R^2 = 0,9982$	0,0018/0,006 mM

4.3.2.2. MWCNT/GCE Kullanımına Ait Biyosensör Çalışmaları

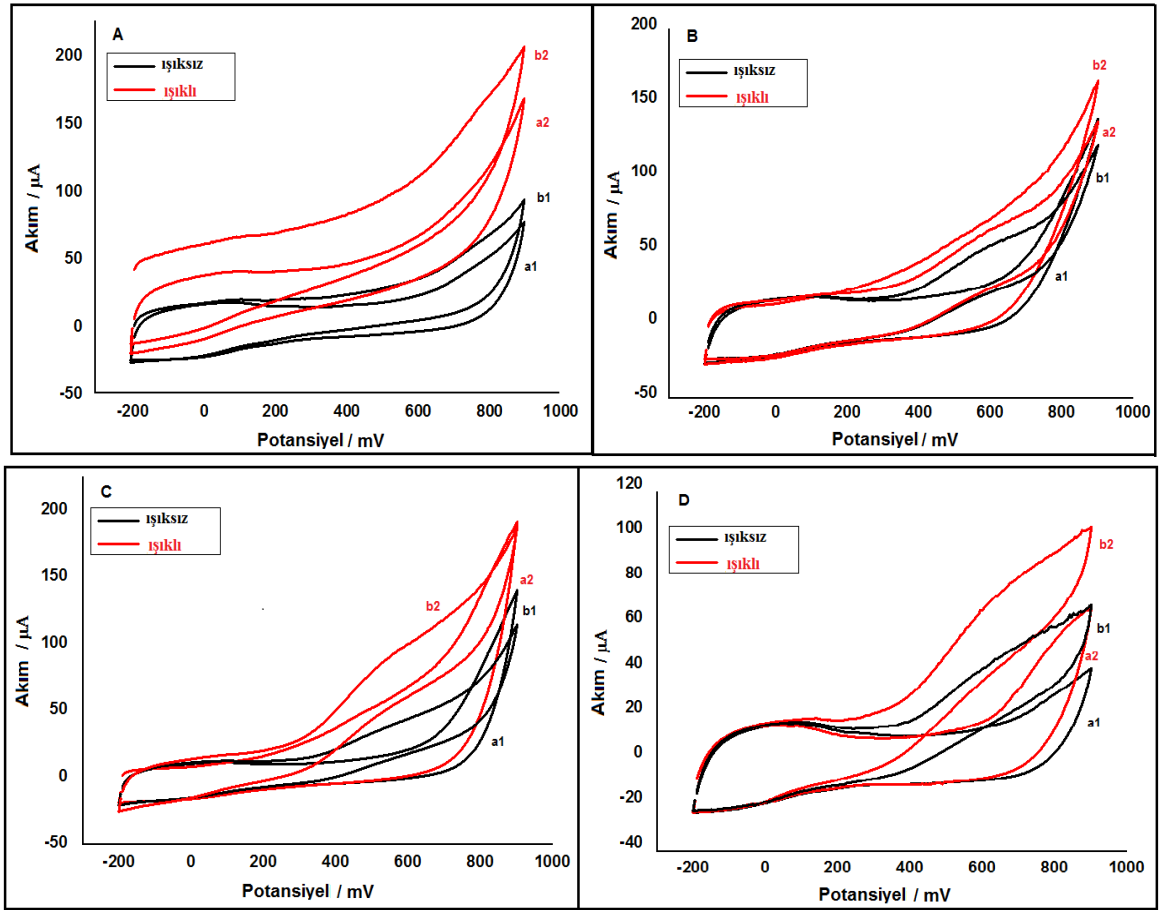
4.3.2.2.1. Döngüsel Voltammetrik Yöntemle Elde Edilen Sonuçlar

Etanol ile NAD^+ 'nin ALDH varlığında enzimatik tepkimesi sonucu oluşan $NADH$ 'nin GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/ALDH yüzeyinde elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik yükseltgenmesi K.PGE elektrotta olduğu gibi döngüsel voltammogramların kaydedilmesiyle incelendi. İlk olarak K.PGE elektrotla olduğu gibi GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/ALDH elektrotlarla çalışıldı. QD ve enzim modifiye elektrotta (GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/ALDH) alınan voltammogramlar Şekil 4.79'de verilmiştir. QD modifiye elektrotun destek elektrolitte (etanol yokken) alınan döngüsel voltammogramı Şekil 4.79/a1'de gösterilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi ortamda substrat (etanol) olmadığından herhangi bir pik gözlenmemiştir. Yüzeyle ışık düşürüldüğünde (Şekil 4.79/a2) kapasitif akımın ışıkla çok az değiştiği gözlenmiştir. 500 mM etanol ortamında alınan döngüsel voltammogramda (Şekil 4.79/b1) ise enzimatik tepkime sonucu oluşan $NADH$ 'nin yükseltgenme pikinin belirgin bir şekilde gözlenmediği, ancak yüzey ışıklandırıldığında (Şekil 4.79/b2) pik akımının Şekil 4.79/a2'deki pik akımına göre arttığı saptanmıştır. Ancak istenilen yanıtlar elde edilemediğinden (Şekil 4.79) elektrot hazırlanma prosedüründe K.PGE/CdS-ZnS-MAA/ALDH elektrotta olduğu gibi birtakım değişiklik yapılmaya gidildi.

Önce elektrot yüzeyi sadece CdS kullanılarak ardından sadece ZnS kullanılarak modifiye edildi. Şekil 4.80'de GCE/MWCNT/CdS-MAA/ALDH (Şekil 4.80A), GCE/MWCNT/ZnS-MAA/ALDH (Şekil 4.80B), GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM MAA/ALDH (Şekil 4.80C) ve GCE/MWCNT/ALDH (Şekil 4.80D) ile 500,0 mM etanol varlığında alınan döngüsel voltammogramlar görülmektedir.



Şekil 4.79. GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/ALDH'nin destek elektrolitteki (a1 ve a2) ve 500,0 mM etanol ortamındaki (b1 ve b2) döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl ve 10,0 mM NAD⁺ içeren pH 7,0 PBS; a1 ve b1: ışısız; a2 ve b2: ışıklı



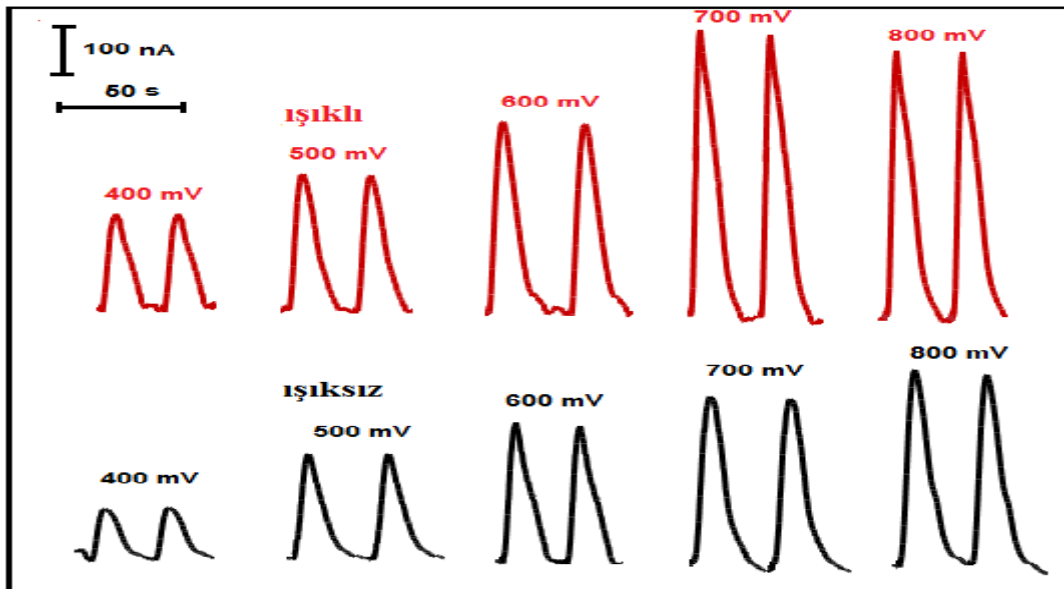
Şekil 4.80. A) GCE/MWCNT/CdS-MAA/ALDH, B) GCE/MWCNT/ZnS-MAA/ALDH, C) GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH, D) GCE/MWCNT/ALDH destek elektrolitteki (a1 ve a2) ve 500,0 mM etanol ortamındaki (b1 ve b2) döngüsel voltammogramları. Tarama hızı: 20 mV/s; Destek elektrolit: 0,10 M KCl ve 10,0 mM NAD^+ içeren pH 7,0 PBS; a1 ve b1: ışiksiz; a2 ve b2: ışıklı

Şekilden 4.80 A'dan görüldüğü gibi elektrot yüzeyi CdS ile modifiye edildiğinde herhangi bir pike rastlanmazken ışıkla artış da kapasitif akımın artışı şeklinde gözlenmektedir. GCE/MWCNT yüzeyi deneysel prosedürde verildiği gibi ZnS ile modifiye edildiğinde ise substrata (etanol) ait pik 600 mV civarında gözlenmiştir (Şekil 4.80 B). ZnS ile beraber PAMAM kullanıldığında ise pik potansiyeli çok fazla değişmezken, elektrot yüzeyi ışıklandırıldığında pik akımı 500,0 mM etanol varlığında 600 mV' da yaklaşık 2 kat artmıştır (Şekil 4.80 C). Elektrot modifiye edilmediğinde kapasitif akım oldukça yüksek gözlenmiş, ayrıca substrata ait yükseltgenme piki belirgin elde edilememiştir. Buradan yola çıkılarak GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH elektrotla çalışılması daha uygun bulunmuştur.

4.3.2.2.2. FIA Sisteminde Amperometrik Yöntemle Elde Edilen Sonuçlar

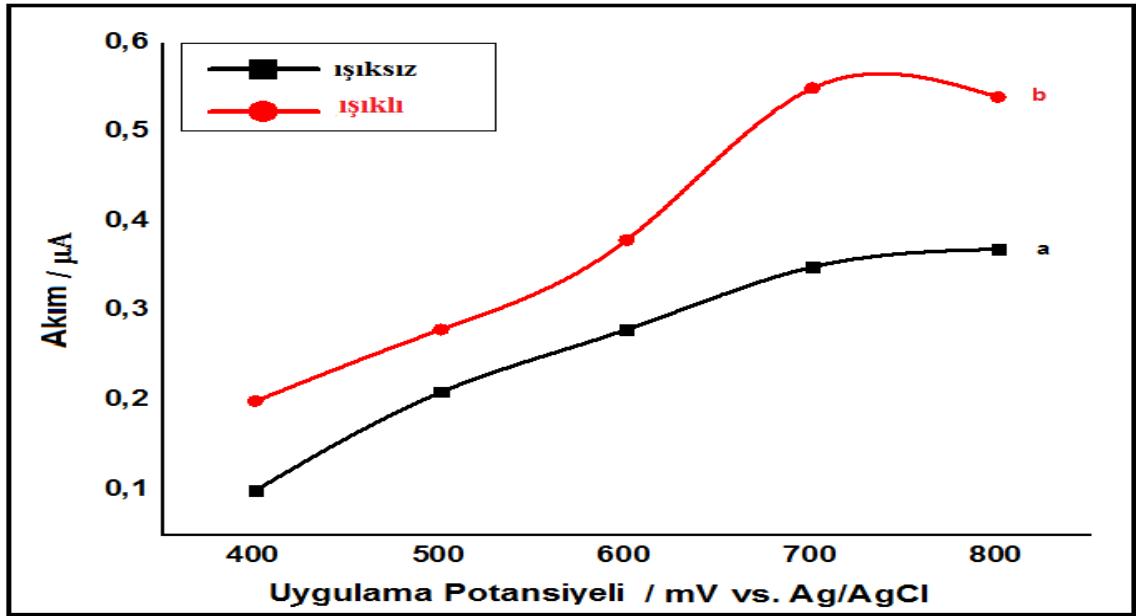
FIA sisteminde GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH'nin etanole verdiği en iyi amperometrik ve fotoamperometrik yanıtı elde etmek için sırasıyla uygulama potansiyeli, akış hızı parametreleri optimize edilmiştir. Öncelikle 1,3 mL/dk akış hızı, 100 µL örnek yükleme hacmi ve 10 cm kolon uzunluğunda çalışılarak optimum uygulama potansiyelinde çalışmalar gerçekleştirildi. 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS taşıyıcı elektrolitine, yatışkan hal akımı elde edildikten sonra 1,0 M KCl ve 10,0 mM NAD⁺ içeren pH 7,0 PBS'de hazırlanmış 0,50 mM etanol enjekte edilerek farklı potansiyellerde akım-zaman eğrileri GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH için kaydedilerek en uygun uygulama potansiyeli belirlendi.

Şekil 4.81 GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH kullanılarak 400 ile 800 mV arasında değişen uygulama potansiyellerinde 0,50 mM etanol için elde edilen fiagramları göstermektedir. Bu şekillerden, hem amperometrik hem de fotoamperometrik akım değerleri hesaplanmış ve bu değerlerin uygulama potansiyeline karşı çizilen grafikleri Şekil 4.82'de verilmiştir.



Şekil 4.81. GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH kullanılarak farklı uygulama potansiyellerinde 0,50 mM etanol için elde edilen fiagramlar (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS, akış hızı: 1,5 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm)

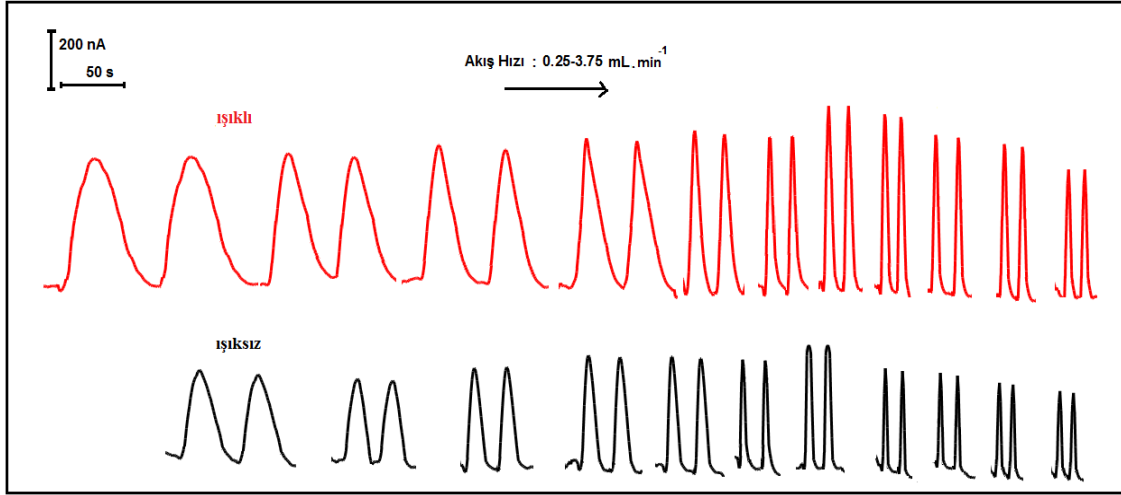
GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH ile hem elektrokatalitik hem de fotoelektrokatalitik akım 400 mV civarında gözlenmiş ve uygulama potansiyeli arttıkça pik akımı 700 mV'a kadar belirgin bir şekilde artmış ve 700 mV'dan sonra çok fazla değişmediği gözlenmiştir. Ayrıca Şekil 4.81 ve 4.82'den, fotoamperometrik yöntemle elde edilen akım değerlerinin amperometrik yöntemle elde edilenlerden özellikle 700 mV ve sonrasında yaklaşık 1,5 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Böylece GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH için en iyi uygulama potansiyeli +700 mV optimum potansiyel olarak seçilmiştir.



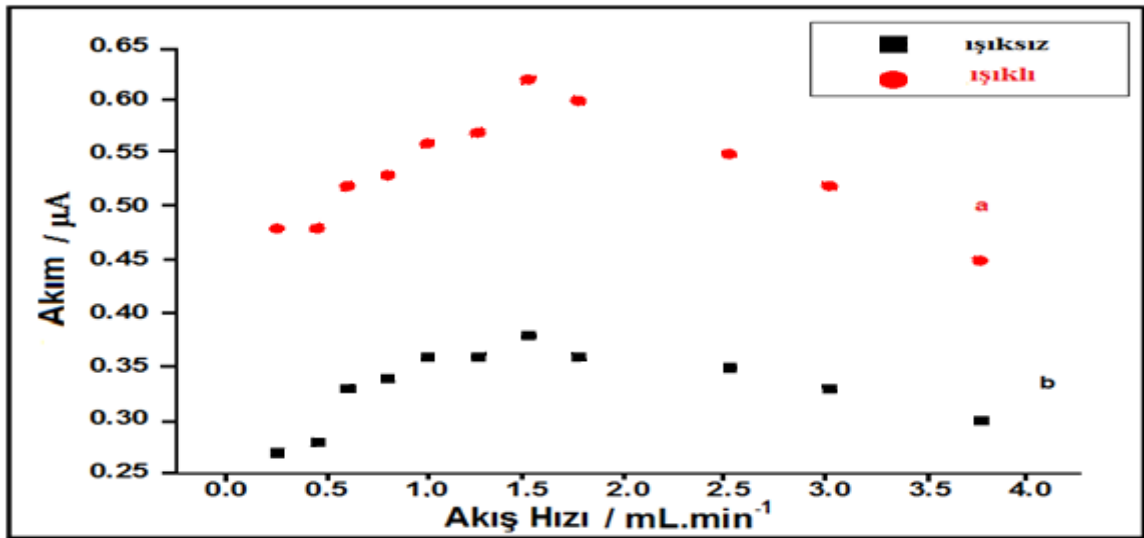
Şekil 4.82. GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH kullanılarak elde edilen fiagramlardan, 0,50 mM etanol için hesaplanan a) amperometrik ve b) fotoamperometrik pik akımlarının uygulama potansiyeli ile değişimi

İkinci olarak amperometrik ve fotoamperometrik akımlara akış hızının etkisi incelendi. Bu amaçla +700 mV uygulama potansiyeli, 100 µL örnek yükleme hacmi ve 10 cm kolon uzunluğunda çalışıldı. 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS taşıyıcı elektrolitine, yatışkan hal akımı elde edildikten sonra yine 1,0 M KCl ve 10,0 mM NAD⁺ içeren pH 7,0 PBS'de hazırlanmış 0,50 mM etanol enjekte edilerek farklı akış hızlarında akım-zaman eğrileri kaydedildi (Şekil 4.83). Bu akım zaman eğrilerinden amperometrik ve fotoamperometrik akım değerleri hesaplanarak akış hızına karşı çizilen grafik Şekil 4.84'de gösterilmiştir. Akım değerlerinin 0,25 den 1,5 mL/dk'a gidildiğinde arttığı, ancak 1,5 mL/dk akış hızından sonraki daha büyük akış hızlarında azaldığı gözlenmiştir. Bu olay

yüksek akış hızlarında enjekte edilen etanol ile modifiye elektrot yüzeyindeki ALDH enzimi ile etkileşime girmesi için yeterli zamanın olmamasından kaynaklanabileceğine bağlanmıştır. Ayrıca çok düşük akış hızlarında da piklerin oldukça yayvan olduğu gözlenmiştir.

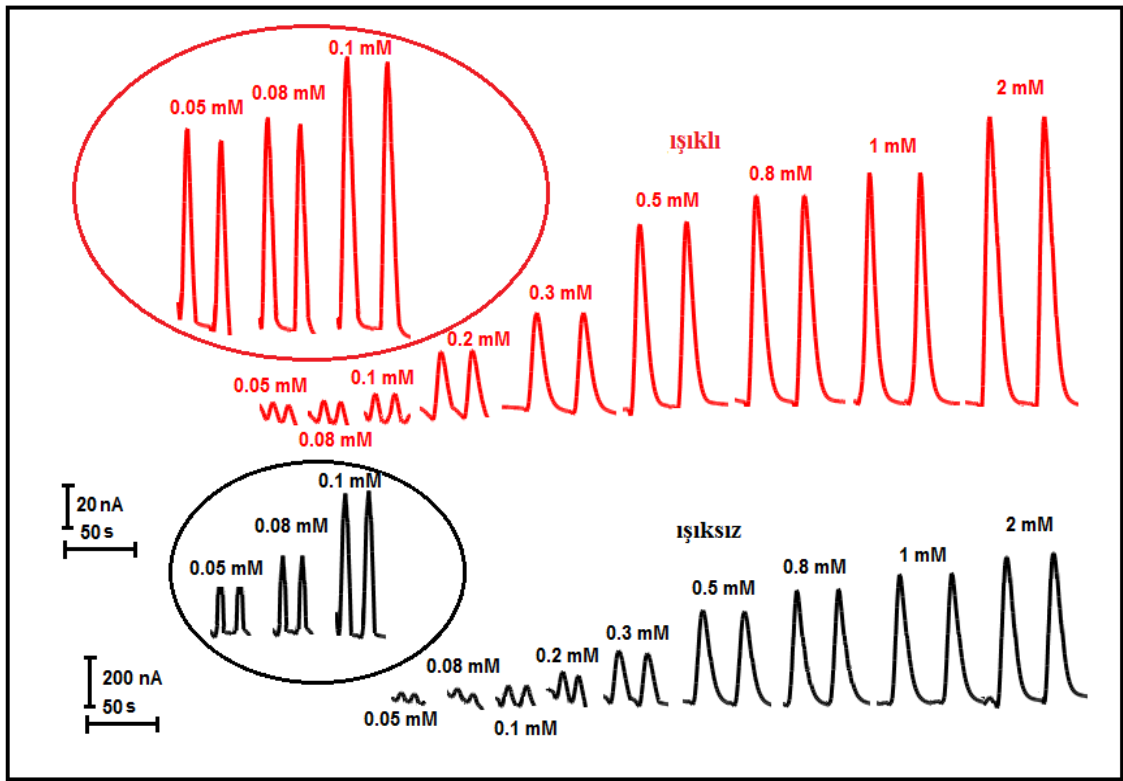


Şekil 4.83. GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH kullanılarak farklı akış hızlarında 0,50 mM etanol için elde edilen fiagramlar (uygulama potansiyeli: +700 mV, örnek yükleme hacmi: 100 μ L ve kolon uzunluğu: 10 cm, taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS)



Şekil 4.84. GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH kullanılarak farklı akış hızlarında 0,50 mM etanol için elde edilen fiagramlar (uygulama potansiyeli: +700 mV, örnek yükleme hacmi: 100 μ L ve kolon uzunluğu: 10 cm, taşıyıcı elektrolit: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS)

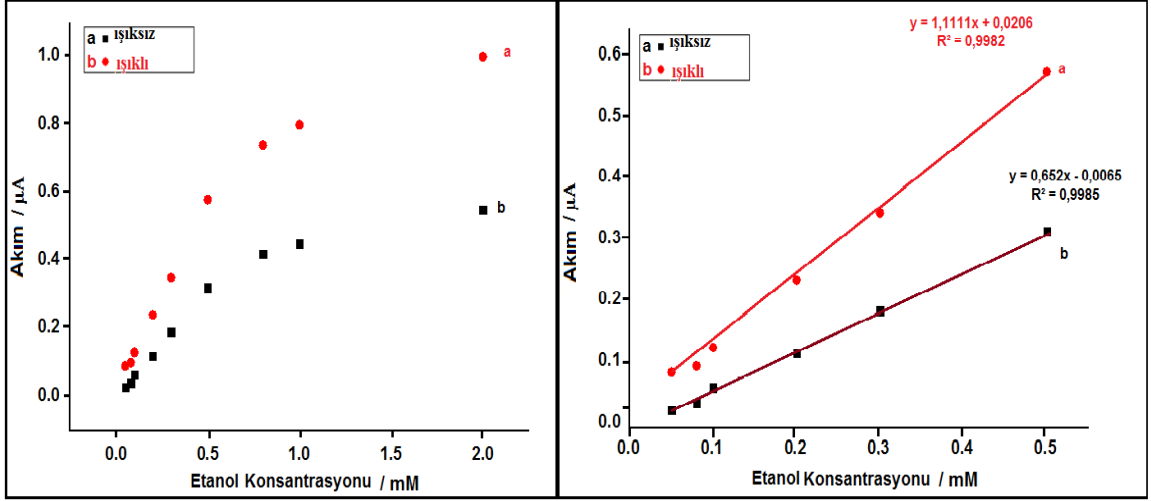
Sonuç olarak optimizasyon çalışmalarından; en uygun uygulama potansiyeli, +700 mV; akış hızı 1,5 mL/dk; örnek yükleme hacmi 100 µL ve kolon uzunluğu 10 cm olarak saptanmıştır. Bu koşullarda GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH kullanılarak farklı derişimlerde etanol FIA sistemine enjekte edilerek, hem amperometrik hem de fotoamperometrik akım değerlerine ilişkin pikler kaydedilmiştir. Farklı derişimlerdeki etanol için elde edilen amperometrik ve fotoamperometrik akım-zaman eğrileri Şekil 4.85’de verilmiştir. Her iki yöntemde de etanol derişimi arttıkça pik yüksekliklerinin artmasıyla birlikte, tüm derişimlerde elektrot yüzeyinin ışıklandırılmasıyla pik yüksekliğinde, normal ışıksız konumda elde edilenlere göre önemli artışlar gözlenmiştir.



Şekil 4.85. FIA sisteminde GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH kullanılarak farklı derişimlerde etanol için elde edilen akım-zaman eğrileri (Taşıyıcı elektrolit: 1.0 M KCl içeren pH 7,0 PBS; Uygulama potansiyeli: +700 mV; akış hızı: 1,5 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm)

Şekil 4.86 etanolün derişimine karşı FIA sistemde elde edilen elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik akım grafiğini göstermektedir. Bu şekilden doğrusal kalibrasyon aralığı, hem amperometrik hem de fotoamperometrik yöntem için 0,050-0,50 mM etanol olarak bulunmuş ve bu iki metodun doğrusallıkları sırasıyla $I(\mu\text{A}) = 0,65C(\text{mM}) - 0,0065$

$R^2=0,9985$ ve $I(\mu A) = 1,11C (mM) + 0,0206$; $R^2=0,9982$ denklemleriyle ifade edilmiştir (Şekil 4.86). Denklemden I pik akımı, C ise etanol derişimidir. Bu denklemlerdeki eğimler karşılaştırıldığında fotoamperometrik yöntemle elde edilen doğrunun eğiminin (1,11), amperometrik yöntemle elde edilenden (0,65) yaklaşık 1.5 kat daha büyük olduğu saptanmış ve dolayısıyla, duyarlılığın elektrot yüzeyinin ışıklandırılmasıyla bir miktar daha artırılması başarılmıştır.



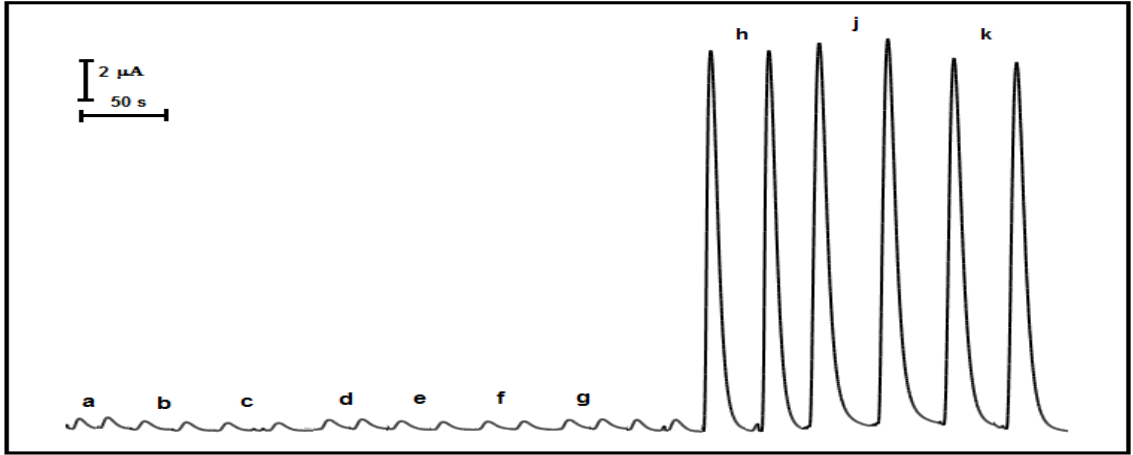
Şekil 4.86. FIA sisteminde GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH kullanılarak optimum koşullarda a) amperometrik, b) fotoamperometrik yöntemle elde edilen pik akımlarının etanol derişimine karşı değişimi

Gözlenebilme sınırı (Limit of detection, LOD) ve tayin sınırı (Limit of quantification, LOQ) değerlerini elde etmek için etanol içermeyen 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS’de hazırlanmış 10,0 mM NAD^+ FIA sistemine 7 kez enjekte edilerek elde edilen verilerden tanık için standart sapma (sk) değerleri hesaplandı. LOD, 3 sk/m ve LOQ, 10 sk/m’den (m:eğim) hem amperometrik hem de fotoamperometrik yöntem için hesaplandı. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.6’da GCE/MWCNT için elde edilen değerlerle birlikte verilmiştir.

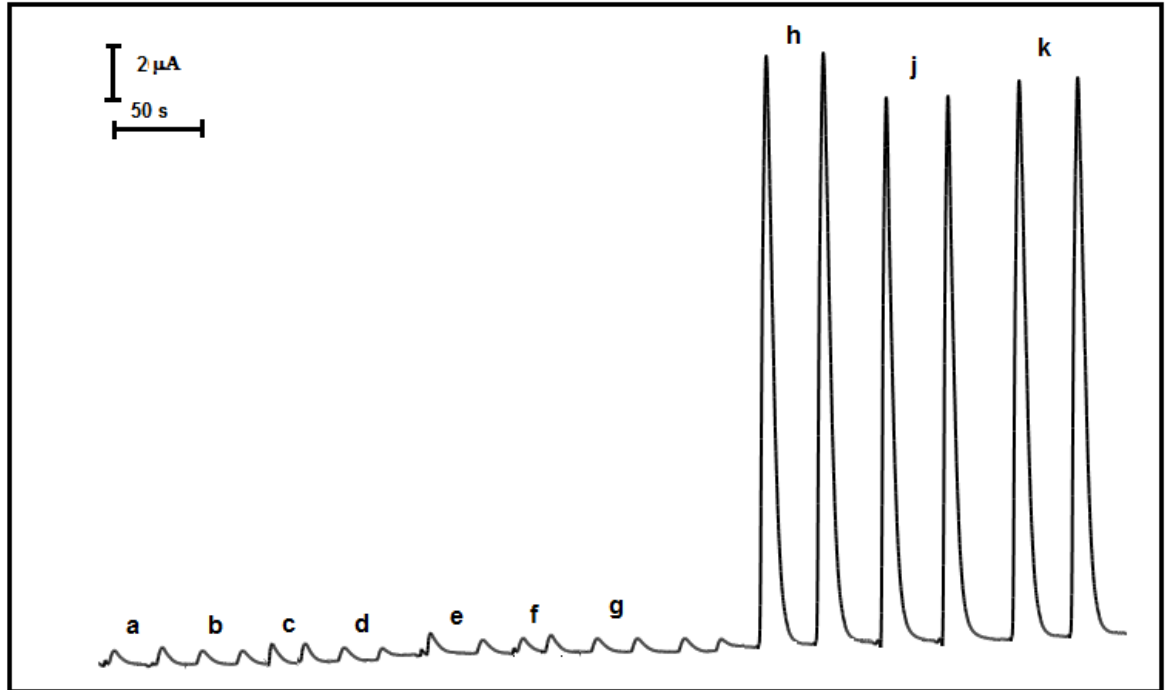
GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH’nin tekrarlanabilirliği optimum koşullarda 0,50 mM etanolün sisteme 5 kez ardışık olarak enjekte edilmesiyle incelenmiş ve bağıl standart sapmaları sırasıyla amperometrik yöntem için %1,1 olarak, fotoamperometrik için %3,2 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar QD modifiye GCE/MWCNT’nin iyi bir tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu göstermektedir.

4.3.2.3. Girişim Etkisi Yapabilecek Maddelerin İncelenmesi

Gerçek örnek uygulamalarında, askorbik asit (AA), dopamin (DA), ürik asit (UA), glukoz, metanol ve izopropanol gibi diğer alkoller, gerçekleştirilmek istenen etanol tayinlerinde girişim etkisi yaratmaktadır. Bu amaçla girişime sebep olan bileşikler varlığında etanole ait fiagramlar, FIA sisteminde amperometrik ve fotoamperometrik olarak, hem GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH hem de K.PGE/ZnS-MAA/ALDH elektrot kullanılarak önceden belirlenmiş olan optimum koşullarda kaydedilmiştir. Şekil 4.87’de çeşitli konsantrasyonlarda olası girişimcilerin varlığında, K.PGE/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH kullanılarak, Şekil 4.88’de ise GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH elektrot kullanılarak 5×10^{-4} M etanol için alınmış fiagramlar görülmektedir. Şekil 4.87 ve 4.88’de görüldüğü gibi AA, DA, UA amperometrik enzim etanol sensör kullanımında ciddi girişimlere sebep olmaktadır. Bu durum bu bileşiklerin yükseltgenme potansiyellerinin etanolün yükseltgenme potansiyeline oldukça yakın olmasıyla açıklanabilir. AA'nın sebep olduğu girişimi Kim ve arkadaşları yaptıkları çalışmada nafyon kullanarak ortadan kaldırmışlardır. Nafyon negatif yüklü olduğundan negatif yüklü AA gibi organik molekülleri uzaklaştırabilmektedir. Ancak DA ve UA gibi pozitif yüklü veya nötr moleküllerin girişimine engel olma konusunda yeterli değildir. Bu bileşiklerin girişim etkisini ortadan kaldırmak için nafyon tabakasına küçük bir miktar kurşun (IV) asetat oksitleyici ajan olarak ilave edilebilir, böylece girişime sebep olan bileşikler elektrot yüzeyine ulaşmadan önce yükseltgenirler. ALDH'ın etanole karşı oldukça seçici olması sebebiyle diğer alkollerin (metanol, izopropanol) varlığında GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH elektrot ile herhangi bir girişim etkisi gözlenmemiştir.



Şekil 4.87. 5×10^{-4} M etanolün (a), 5×10^{-4} M metanol (b), glukoz (c), izopropanol (d); 5×10^{-2} M metanol (e), glukoz (f), izopropanol (g) ve 5×10^{-4} M UA (h), AA (j), DA (k) varlığında K.PGE/ZnS-MAA/ALDH elektrot ile alınmış fiagramları. (Taşıyıcı çözelti: 1.0 M KCl içeren pH 7,0 fosfat tampon çözeltisi, Uygulama potansiyeli: +900 mV; akış hızı: 1,5 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 μ L; kolon uzunluğu: 10 cm)



Şekil 4.88. 5×10^{-4} M etanolün (a), 5×10^{-4} M metanol (b), glukoz (c), izopropanol (d); 5×10^{-2} M metanol (e), glukoz (f), izopropanol (g) ve 5×10^{-4} M UA (h), AA (j), DA (k) varlığında GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH elektrot ile alınmış fiagramları. (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren pH 7,0 fosfat tampon çözeltisi, Uygulama potansiyeli: +700 mV; akış hızı: 1,5 mL/dk, örnek yükleme hacmi: 100 μ L; kolon uzunluğu: 10 cm)

4.4. Fotoelektrokimyasal DNA Biyosensör Çalışmaları

Fotoelektrokimyasal DNA çalışmalarında yalnızca K.PGE kullanıldı. Bu amaçla K.PGE yüzeyine, Materyal ve Yöntem bölümünün 3.4.1 kısmında belirtildiği şekilde CdS-ZnS elektrokimyasal çöktürme yöntemiyle kaplandı. Daha sonra DNA biyosensörü için seçilen human papilloma virüsünün (HPV) prob DNA, hedef DNA, tek dizisi değişken DNA ve hedef dışı DNA dizileri kullanılarak K.PGE/CdS-ZnS-MAA'da hem elektrokimyasal hem de fotoelektrokimyasal DNA biyosensörü differansiyel puls voltammetrik teknikle incelenmiştir.

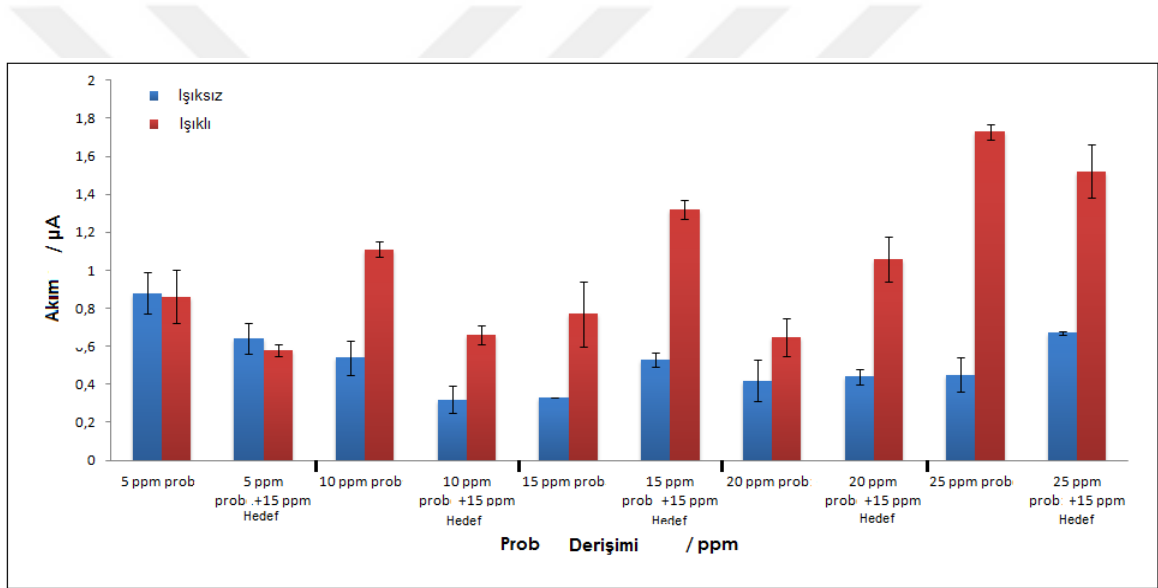
4.4.1. HPV'nin Fotoelektrokimyasal Yoldan Saptanmasında İncelenen Parametreler

4.4.1.1. Hibridizasyonun Saptandığı En Uygun Koşullar

Yapılan çalışmaların tümü HPV'nin elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal biyosensörünün geliştirilmesi için en uygun koşulların optimize edilmesine yönelik olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın kapsamında prob dizi (5'-GTA TCT ACC ACA GTA ACA AA-3') öncelikle K.PGE/CdS-ZnS-MAA'ya adsorpsiyon yoluyla tutturulmuş ve K.PGE/CdS-ZnS-MAA yüzeyindeki prob-DNA dizileri, bu dizilere karşılık gelen hedef diziler (5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT AC-3'); tek bazı değişik diziler (5'-TTT GTT ACT GGG GTA GAT AC-3') ve hedef dışı olan rastgele seçilmiş diziler (5'-GAA TAT GAT TTA CAG TTT ATT TTT-3') ile hibridizasyona tabi tutulmuş ve her bir adımda elektrodun diferansiyel puls voltammogramları kaydedilmiştir. Differansiyel puls voltammogramlarından Guanine ait yükseltgenme pikinde meydana gelen farklanmadan yararlanılarak bu elektrotla elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal DNA biyosensörünün gerçekleştirilip gerçekleştirilemeyeceği incelenmiştir. Hibridizasyon sonrasında hedef dizi ile yüksek sinyal alınması beklenirken hedef dışı olan diziden alınan sinyalin düşük olması beklenmektedir. Her iki dizi ile alınan akım farkları oranı biyosensörün seçimliliğinin göstergesidir. Burada, biyosensörün hedef diziyile en yüksek hibridizasyon yanıtlarını vermesi ve diğer dizi ile düşük yanıtlar vermesi beklentisi temel alınarak kimi optimizasyonlar (en uygun prob derişimi, en uygun hedef dizi derişimi gibi) yapılmıştır. Çalışmada elektrot yüzeyi fiber optikli 250 W halojen ışık kaynağı ile ışıklandırılarak duyarlılık ve seçimliliğin daha fazla artması sağlanmıştır.

4.4.1.1.1. Hibridizasyon İçin En Uygun Prob Derişiminin Belirlenmesi

Çalışmada ilk olarak en uygun prob DNA dizisinin derişimi optimize edildi. Bu amaçla K.PGE/CdS-ZnS-MAA yüzeyine tutturulacak olan prob DNA dizi (5'-GTA TCT ACC ACA GTA ACA AA-3') çözeltilisinin değişen derişimlerine karşı, sabit derişimdeki (15 ppm) hedef dizi (5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT AC-3') ile hibridizasyonu sonrasında elde edilen guanin sinyalleri diferansiyel puls voltammetrisi ile belirtilen koşullarda incelendi. Artan prob derişimleri olarak sırasıyla 5, 10, 15 ve 20 ppm derişimleri kullanıldı. Hibridizasyon sonrasında alınan guanin yükseltgenmesine ait pik akımları arasındaki farklılıkların incelenmesiyle çalışmalar için en uygun prob derişimi belirlendi. Prob ve hedef dizi ile elde edilen voltammogramlardan alınan verilerle guanin sinyali için düzenlenen histogram Şekil 4.89'da verilmiştir.



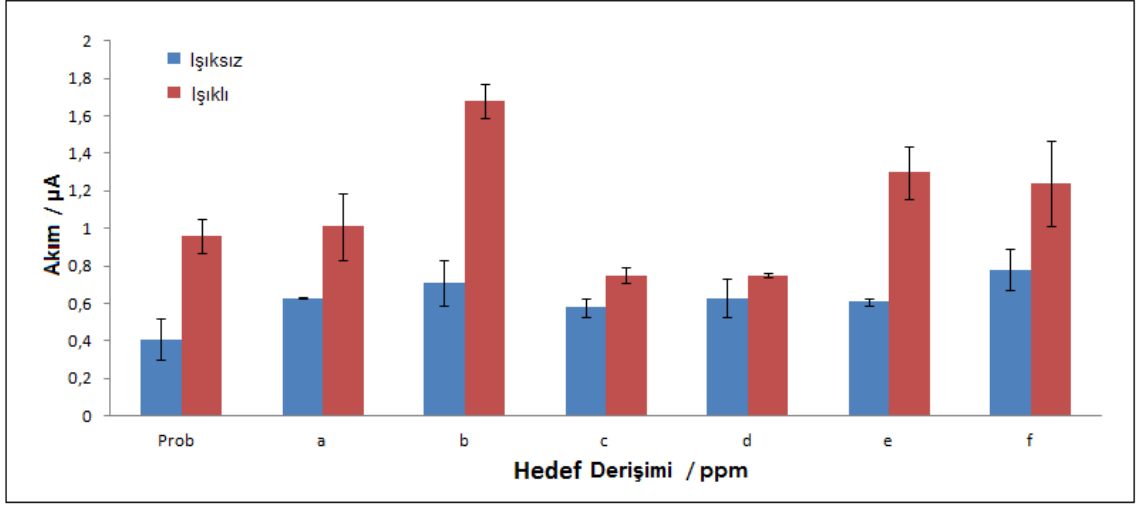
Şekil 4.89. Sabit derişimdeki (15 ppm) hedef dizisi (5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT AC-3') ile artan derişimdeki prob (5, 10, 15, 20 ppm) (5'-GTA TCT ACC ACA GTA ACA AA-3') arasında gerçekleştirilen hibridizasyon sonrasında K.PGE/CdS-ZnS-MAA ile elde edilen guanin sinyalleri için alınmış histogramlar

Yapılan bu optimizasyon çalışmasında elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal DNA biyosensöründe kullanılacak en uygun prob dizi derişiminin bulunması amaçlanmıştır. Hibridizasyon öncesi ve sonrasında Şekil 4.89'da gösterilen histogramlarda farklanmanın en belirgin olduğu prob dizi derişimi 15 ppm olarak görülmektedir. Ayrıca elektrot yüzeyi ışıklandırıldığında sinyallerin yaklaşık 2 kat arttığı ve yine 15 ppm'in prob derişimi için en uygun derişim olduğu görülmektedir. Dolayısıyla 15 ppm prob DNA dizi derişimi

optimum olarak seçilmiştir.

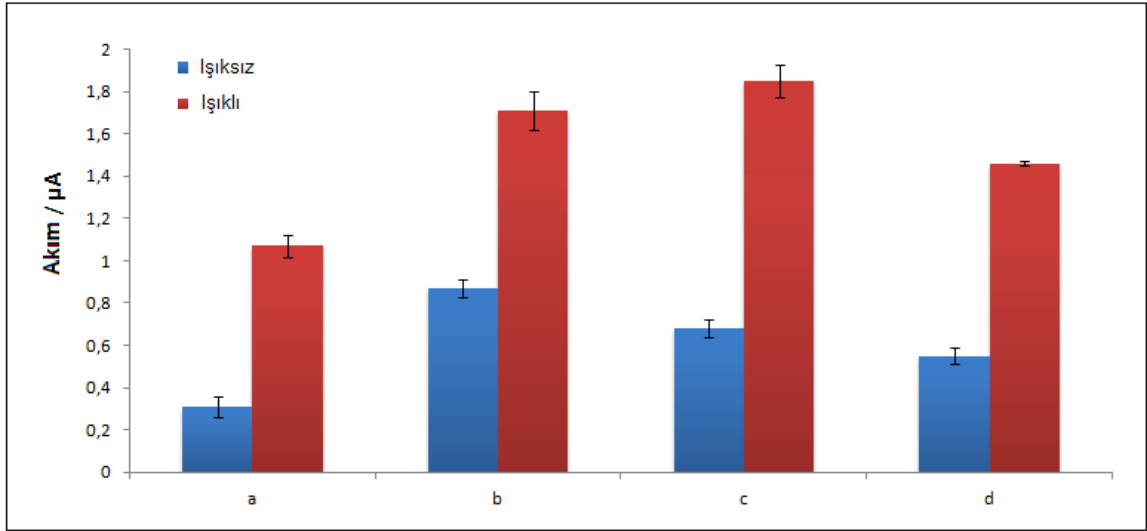
4.4.1.1.2. Hibridizasyon İçin En Uygun Hedef Dizi Derişiminin Belirlenmesi

Prob derişimi optimize edildikten sonra, 15 ppm olarak K.PGE/CdS-ZnS-MAA yüzeyinde adsorplandıktan sonra, hedef dizi, derişimi 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 ppm olacak şekilde arttırılarak hibridizasyon sonrasında elde edilen guanin sinyali ışıklı ve ışıksız olarak her iki şekilde de incelenmiştir. Elde edilen yanıtlara ilişkin histogram Şekil 4.90'da görülmektedir.



Şekil 4.90. Artan hedef dizi konsantrasyonlarında a) 2,5 ppm, b) 5 ppm, c) 7,5 ppm, d)10 ppm, e) 12,5 ppm, f) 15 ppm ve 15 ppm prob dizileri ile K.PGE/CdS-ZnS-MAA kullanılarak, elektrot yüzeyi ışıklandırılarak ve ışıklandırılmaksızın alınan guanin sinyalleri için histogramlar

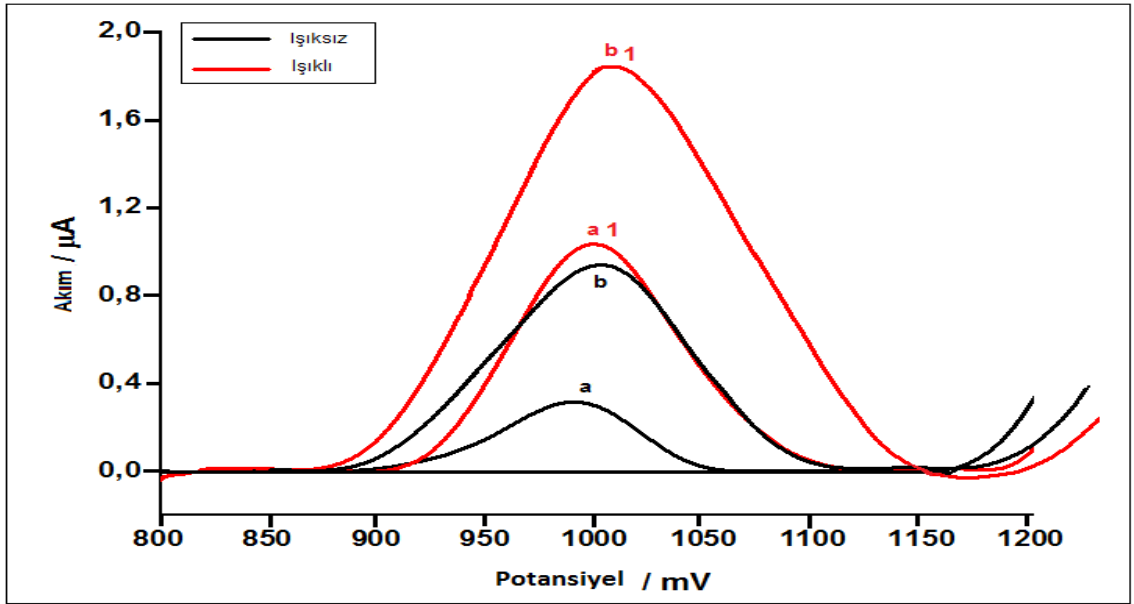
Elde edilen sinyallerden prob dizi ile alınan guanin sinyali ve hedef dizi ile gerçekleşen hibritleşmeden sonra alınan guanin sinyali arasındaki farkın en belirgin 15 ppm prob ve 5 ppm hedef dizi konsantrasyonlarında gözlemlendiği tespit edilmiştir. Burada beklenen biyosensörün hedef diziyile en yüksek guanin sinyalini vermesi ve hedef dışı dizi ile düşük sinyaller vermesidir, her iki dizi ile alınan yanıtların oranı biyosensörün seçimliliği hakkında bilgi vermektedir. Şekil 4.91'de ise K.PGE/CdS-ZnS-MAA yüzeyinde ışıklı ve ışıksız ortamda a) yüzeyde sadece prob varken, b) prob-hedef hibridizasyonu sonrasında, c) tek dizisi değişik DNA ve d) hedef dışı dizi arasındaki hibridizasyondan sonra elde edilen guanine ait histogramlar görülmektedir.



Şekil 4.91. K.PGE/CdS-ZnS yüzeyi ışıklandırılarak ve ışıklandırılmaksızın a) yüzeyde sadece prob varken, b) prob-hedef hibridizasyonu sonrasında, c) tek dizisi değişik DNA ve d) hedef dışı dizi arasındaki hibridizasyondan sonra elde edilen guanine ait histogramlar

Guaninin yükseltgenme pikine ilişkin prob dizilerle beklenildiği gibi düşük sinyaller alınırken, K.PGE/CdS-ZnS-MAA yüzeyine adsorplanmış prob DNA'nın gerek hedef ve gerekse tek dizisi farklı DNA dizisi ile hibridizasyon sonucu (elektrot yüzeyinin taranması sırasında, yaklaşık +1,0 V civarında guanine ait pikin sinyalindeki artış hibridizasyonun gerçekleştiğini kanıtlamaktadır) yüksek sinyaller alınmıştır. Hedef dışı dizi DNA ile hibridizasyonda ise prob-DNA'ya göre çok az farklanmanın olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla gerek elektrokimyasal ve gerekse fotoelektrokimyasal DNA biyosensörünün K.PGE/CdS-ZnS-MAA ile gerçekleştirilebileceği sonucu ortaya çıkmaktadır.

Şekil 4.92'de ise prob DNA tutturulmuş K.PGE/CdS-ZnS-MAA'nın ve bu prob DNA dizisinin hedef dizi ile hibridizasyonundan sonra elde edilen differansiyel puls voltammogramını göstermektedir. Şekilden görüldüğü gibi guanine yükseltgenme piki +1,0 V'da gözlenmiş guanine sinyalinin elektrot yüzeyi ışıklandırılmasıyla, ışısız ortamda alınan sinyallere göre yaklaşık 2 kat arttığı gözlenmiştir. Bu da elektrot duyarlılığının elektrot yüzeyi ışıklandırıldığında yaklaşık olarak 2 kat arttığını göstermektedir.

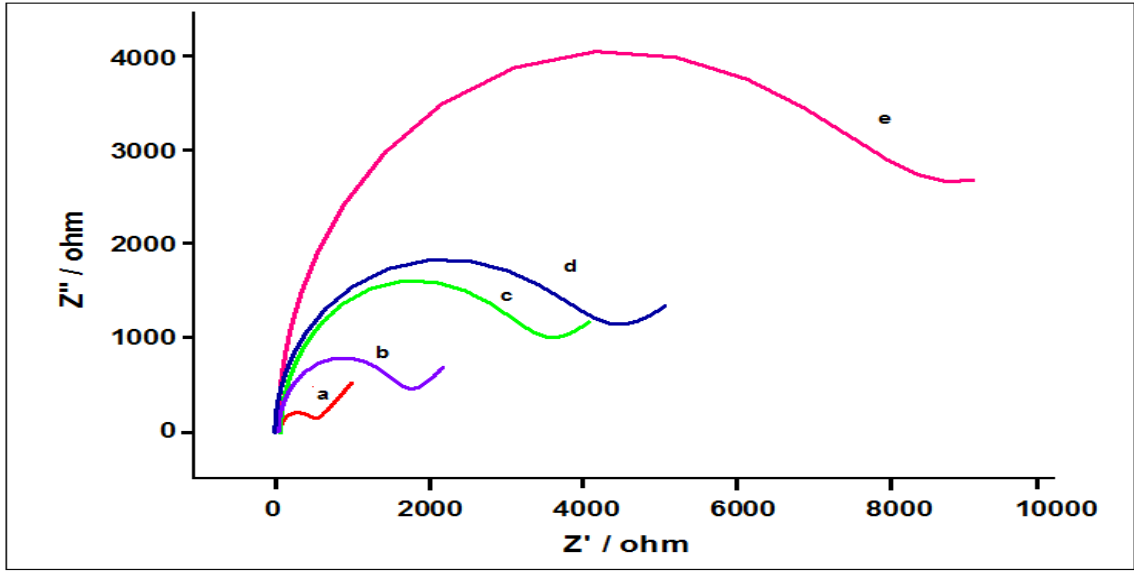


Şekil 4.92. Prob tutturulmuş K.PGE/CdS-ZnS-MAA ile hibridizasyon öncesinde ve sonrasında elde edilen; a) yüzeyde sadece prob varken ışıksız, b) prob DNA ile hedef dizi DNA hibridizasyonundan sonra ışıksız, a1 ve b1 ışıklı ortamda 0,02 M NaCl içeren; 0,50 M asetat tamponu içerisinde (pH 4,8), guanine ait differansiyel puls voltammogramları (puls genliği 50 mV, puls zamanı 0,2. tarama hızı: 16 mV/s)

4.4.2. İmpedimetrik Yöntem ile HPV'nin Tanısına Ait Bulgular

Elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal DNA biyosensörünün K.PGE/CdS-ZnS-MAA kullanılarak voltammetrik olarak gerçekleştirilebileceği kanıtlandıktan sonra ilgili elektrotların impedans eğrileri alınarak elektrokimyasal DNA biyosensörünün impedimetrik olarak da gerçekleştirilip gerçekleştirilemeyeceği incelenmiştir. Şekil 4.93'de, HPV'nin impedimetrik biyosensörüne ait impedans eğrileri ve bu eğriye uygulanan eşleştirilmiş devre modeli görülmektedir. Bu yöntemde sinyal potansiyeli 0,23 volt olarak belirlenmiş olan $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ iyonik çözeltisi içerisinde ölçüm gerçekleştirilmiş ve sabit potansiyel, değişen frekans aralığında farklı elektrot yüzey tabakalarının iyonik ortama karşı gösterdiği direnç eğrileri ölçülerek değerlendirilmiştir. Şekil 4.93'de görüldüğü gibi yalın K.PGE'nin yarı daire çapı 400 ohm iken (Şekil 4.93a), K.PGE/CdS-ZnS-MAA'nın direnci yaklaşık 1800 ohm bulunmuş (Şekil 4.93b), yalın elektrottan daha yüksek olması elektrot yüzeyinin CdS-ZnS ile kaplandığını göstermektedir. K.PGE/CdS-ZnS-MAA yüzeyine prob DNA dizi tutturulduğunda direncin oldukça büyüdüğü (yaklaşık 10000 ohm) (Şekil 4.93e) ve meydana gelen bu direnç artışının dizideki negatif yüklü fosfat gruplarının yine negatif yüklü redoks probunu ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$) elektrostatik olarak

elektrot yüzeyinden itmesine bağlanmıştır. Hedef dizi ile bu prob DNA'nın hibridizasyonundan sonra ise direncin 3500 ohm'a kadar düştüğü (Şekil 4.84c) ve bunun nedenin ise elektrot yüzeyindeki tek sarmal dizinin çift sarmal dizi olarak yüzeyi nötürleştirilmesi ve hedef dizinin sahip olduğu net pozitif yüklere bağlanmaktadır. (Şekil 4.93c). Bununla birlikte hedef dışı dizi DNA'nın direncinin ise yaklaşık 8500 ohm olduğu (Şekil 4.93d) ve hedef DNA'ya göre azalmanın oldukça az olduğu görülmektedir. Deneyler sonucunda elde edilen eğriler ve grafikler beklenen hibridizasyonun gerçekleşmiş olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.93. K.PGE/CdS-ZnS-MAA'ya ait hibridizasyon öncesi ve sonrasında alınmış a) yalnız K.PGE, b) K.PGE/CdS-ZnS-MAA, c) prob ve hedef dizi ile hibridizasyondan sonra, d) prob ve hedef dışı dizi ile hibridizasyondan sonra, e) sadece proba ait 0,1 M KCl içeren 2,5 mM $K_4Fe(CN)_6^{3-} / K_3Fe(CN)_6^{4-}$ içerisinde alınmış impedans eğrileri ve bu eğriye uygulanan impedans denklik devresi.

Bu çalışmada guanin bazının yükseltgenme sinyalindeki değişimler izlenerek elektrot yüzeyine tutturulan prob dizinin niteliğine bağlı olarak HPV virüsüne ait elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal DNA biyosensörünün gerçekleştirilebileceği sonucuna varılmıştır. Böylece geliştirilen sistem, virüsü taşıma ihtimali olan bireyle ilgili olarak pozitif mi negatif mi olduğuna dair yorum yapabilme imkanı sağlamıştır.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tezin amacı, tek kullanımlı, kolay modifikasyon, ticari olarak kolay elde edilebilen, ekonomik ve uzun süre temizleme prosedürleri içermeyen bir elektrot materyali olan PGE ve literatürde oldukça sık kullanılan MWCNT/GCE yüzeyine QD biriktirmek ve hazırlanan bu QD modifiye elektrotlarla elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal biyosensör tasarlamaktır. Bu amaçlar doğrultusunda bu çalışmada aşağıdaki adımlar gerçekleştirilmiştir.

- i) PGE ve GCE/MWCNT ile kauntum nokta modifiye elektrot hazırlanması ve bu elektrotların karakterizasyonu
- ii) Hazırlanan bu modifiye elektrotlarla biyoelektrokimyasal çalışmalarda oldukça önemli olan NADH'nin fotoelektrokatalitik yükseltgenmesinin incelenmesi,
- iii) QD modifiye elektrot yüzeyine dehidrogenaz enzimi immobilize ederek NAD^+/NADH redoks çiftine dayalı elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal biyosensör geliştirilmesi
- iv) PGE için yeni bir fotoelektrokimyasal akış hücresi (Şekil 3.2) ve GCE/MWCNT için daha önceden tasarlanan fotoelektrokimyasal akış hücresi (Şekil 3.3) kullanılarak dehidrogenaz enzimlerine dayalı fotoelektrokimyasal sensörün FIA sisteminde gerçekleştirilmesi
- v) QD modifiye PGE ile fotoelektrokimyasal DNA biyosensörünün gerçekleştirilip gerçekleştirilemeyeceğinin incelenmesi

Dolayısıyla bu çalışma aşağıda özetlendiği gibi gerçekleştirilmiştir.

QD Modifiye PGE ve GCE/MWCNT'lerin Hazırlanması ve

Karakterizasyonu: Elektrot materyali olarak PGE, koşullandırılmış PGE (K.PGE), GCE ve GCE/MWCNT kullanılmış ve bu elektrot yüzeylerine literatürde uygulanan (Lu ve ark., 2008a; Qian ve ark., 2010) ve Materyal ve Metot Bölümünde açıkça belirtilen elektrokimyasal çöktürme prosedürüyle merkptoasetik asitli (MAA) ortamda CdS ve CdS-ZnS (core-shell) biriktirilmiştir. Elektrokimyasal çöktürme mekanizması, -1,06 V gibi negatif potansiyelde biriktirilerek gerçekleşen elektrokimyasal çöktürme işleminde GCE ve GCE/MWCNT'de sorun yaşanmazken PGE ile yapılan çalışmalarda yüzeye biriken sarı renkli CdS tabakasının yüzeyden sıyrılması problemiyle karşılaşmıştır. Bunun nedeni oldukça negatif olan biriktirme potansiyelinde H_2 çıkışının az da olsa gözlenmesine bağlanmış ve bu da etkili bir birikmeyi engellemiştir. Bu sorunu gidermek için biriktirme

potansiyeli bu elektrot için -1,0 V'a çekilmiş ve ortam sıcaklığı değiştirilerek giderilmeye çalışılmıştır. Her bir elektrot yüzeyinde gözle görünür sarı renkli bir tabakanın oluşması bu elektrot yüzeylerinde CdS'nin başarılı bir şekilde biriktiğini göstermektedir.

Hazırlanan tüm modifiye elektrotların 0,10 M KCl içeren 0,010 M $K_4[Fe(CN)_6]$ ve 0,010 M $K_3[Fe(CN)_6]$ redoks probu ortamında hem impedans eğrileri hem de döngüsel voltammogramları alınarak, karakterizasyonu yapılmıştır. İmpedans eğrilerinden, QD modifiye elektrotların yarı daire çapının yalın elektrotlara göre arttığı ve bunun da elektrot yüzeylerine biriken CdS ya da CdS-ZnS filminin yarı iletken özelliğinden kaynaklandığı ve bu sonuçlara göre elektrot yüzeyinin bu yarıiletken materyallerle kaplandığı sonucuna varılmıştır. Aynı şekilde her bir elektrot için alınan döngüsel voltammogramlarda da Fe^{3+}/Fe^{2+} redoks çiftine ait anodik ve katodik piklerin yalın elektrotlarda belirgin çıktığı, ancak QD modifiye elektrotlarda hem pik akımlarının azaldığı hem de pik potansiyeleri arasındaki farkın arttığı ve bu sonuçların impedans eğrilerinden elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu gözlenmiştir.

QD Modifiye Elektrotlarla NADH'nin Yükseltgenmesi: Hazırlanan tüm QD modifiye elektrotların 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS'de NADH ortamında elektrot yüzeyi ışıklandırılmaksızın ve ışıklandırılarak döngüsel voltammogramları kaydedilmiş ve bu elektrotların NADH'nin yükseltgenmesine elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik etki gösterip göstermediği incelenmiştir. Burada amaç CdS, CdS-ZnS gibi QD'lerle modifiye elektrot kullanılarak hem NADH'nin yükseltgenme potansiyelinin yalın elektroda göre daha da negatife çekmek (yaklaşık 50-100 mV arası) hem de akımda büyük artışlar gözlemektir. Ancak gerek GCE ve gerekse PGE modifiye elektrotlarla NADH'nin yükseltgenme potansiyelinde negatife kayma gözlenmemiş ancak elektrot yüzeylerinin ışıklandırılmasıyla akımda önemli artışlar sağlanmıştır. Bu amaçla çalışmanın QD modifiye elektrotlarla hem akım artışını gözlemlemek hem de NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenme potansiyelini negatife çekmek amacıyla farklı modifikasyon işlemleri uygulanmıştır.

Bu amaçla MWCNT modifiye GCE yüzeyine QD biriktirilmiş ve NADH'nin yükseltgenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiş ve PGE ve GCE'ye göre daha negatif potansiyelerde NADH'nin yükseltgenmesi elde edilmiş ve elektrot yüzeyinin ışıklandırılmasıyla da büyük akım artışları gözlenmiştir.

Dört farklı elektrot (GCE, PGE, K.PGE ve MWCNT/GCE) kullanılarak NADH'nin elektrokatalitik ve fotoelektrokatalitik yanıtı için elde edilen potansiyel ve akım değerleri

Çizelge 4.2’de verilmiştir. Bu çizelgeden de görüldüğü gibi, NADH’nin fotoelektrokatalitik yükseltgenmesinde hem akım artışı hem de potansiyel kayması açısından en uygun QD modifiye elektrodun GCE/MWCNT olduğu, bununla birlikte K.PGE’nin de akım artışı açısından oldukça kullanışlı ve yararlı (tek kullanımlı ve ucuz olması açısından) bir elektrot meteryali olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

QD Modifiye Elektrotlarla FIA Sisteminde NADH’nin Amperometrik ve Fotoamperometrik Yükseltgenmesi: FIA sisteminde NADH’nin amperometrik ve fotoamperometrik yükseltgenmesinde QD modifiye K.PGE ve GCE/MWCNT için sırasıyla Şekil 3.2 ve 3.3’deki akış hücreleri kullanılmış ve bunlardan K.PGE için olan akış hücresi (Şekil 3.2) ilk defa tasarlanıp teflondan yaptırılmıştır. Dolayısıyla bu çalışmada yeni bir akış hücresi kullanılarak ilk defa PGE için FIA sisteminde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Fotoamperometrik çalışmalarda elektrot yüzeyi uzun süre ışığa maruz kaldığından sadece CdS ile modifiye elektrotlarda foto bozunmadan kaynaklı takrarlanabilirlik sorunları yaşanmış ve bunun üzerine fotokararlılığı arttırmak için hibrit modifiye (CdS-ZnS) elektrotlarla çalışılmıştır. Ayrıca akışkan sistemde yüzeydeki QD nanoparçacıkların akışa karşı direncini arttırmak amacıyla da son olarak yüzeye Nafyon modifiye edilmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Modifiye elektrotlar için bazı parametreler optimize edilmiş ve GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf için uygun uygulama potansiyeli, +400 mV; akış hızı 0,6 mL/dk; örnek yükleme hacmi 100 µL ve kolon uzunluğu 10 cm ve K.PGE/CdS-ZnS-MAA-Nf için uygulama potansiyeli, +600 mV; akış hızı 1,75 mL/dk; örnek yükleme hacmi 100 µL ve kolon uzunluğu 10 cm olarak saptanmıştır. Bu elektrotlar kullanılarak optimum koşullarda NADH’nin derişimine bağlı akım zaman eğrileri elde edilmiş ve her iki elektrot için de fotoamperometrik yöntemle elde edilen doğrunun eğiminin amperometrik yöntemle elde edilenden yaklaşık 1,8 kat daha büyük olduğu saptanmış ve dolayısıyla, duyarlılığın elektrot yüzeyinin ışıklandırılmasıyla bir miktar daha artırılması başarılmıştır. Ancak, doğrusal kalibrasyon eğrisi QD modifiye GCE/MWCNT ile daha düşük potansiyelde çalışılarak 3,0-1000 µM aralığında elde edilmişken, QD modifiye K.PGE’de daha büyük potansiyelde (600 mV) 0,80-800 µM aralığında elde edilmiştir.

QD modifiye elektrotlarla Dehidrogenaz Enzimine Dayalı Elektrokimyasal ve Fotoelektrokimyasal Bivosensör Tasarımı: Dehidrogenaza dayalı biyosensör çalışmasında glukoz dehidrogenaz (GDH) ve alkol dehidrogenaz (ALDH) gibi iki farklı dehidrogenaz enzimi kullanılarak hem döngüsel voltammetrik hem de FIA sisteminde

elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal biyosensör çalışmaları gerçekleştirilmiştir. GDH'ya dayalı biyosensörde K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH ve GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılırken ALDH'a dayalı biyosensörde CdS-ZnS modifiye elektrotlarla yanıt alınamadığından sadece ZnS modifiye elektrotlar (K.PGE/ZnS-MAA/ALDH ve GCE/MWCNT/ZnS-MAA/ALDH) kullanılmıştır. Bu tür biyosensörde substrat (glukoz ya da etanol) dehidrogenaz enzimi ile ortamda NAD^+ varken enzimatik tepkime sonucu yükseltgenirken (glukoz glukonolakton'a etanol de asetaldehite) NAD^+ $NADH$ 'ye indirgenmektedir. Substrat miktarıyla orantılı oluşan $NADH$ elektrot yüzeyinde yükseltgenerek tekrar NAD^+ oluşmaktadır. Böylece substrata ait elektrokatalitik akım oluşmaktadır.

GDH'ya bağlı biyosensör için kaydedilen döngüsel voltammogramlardan QD modifiye K.PGE'de glukozun enzimatik tepkimesi sonucu oluşan $NADH$ 'nin yükseltgenmesine ait yaklaşık 720 mV'da tersinmez bir pik gözlenmiş ve yüzey ışıklandırıldığında pik potansiyelinin değişmediği, pik akımının ise yaklaşık 2 kat arttığı ve QD ve enzim modifiye PGE'nin glukozla dolaylı olarak fotoelektrokatalitik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.45). Aynı şekilde $NADH$ 'nin yükseltgenme pikinin GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH'da daha negatifte (500 mV) oluştuğu ve pik akımının yüzey ışıklandırılması 2 kat arttığı gözlenmiştir. FIA sisteminde glukoz biyosensörü için enzim immobilize modifiye elektrotlar için bazı parametreler optimize edilmiş ve GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH için uygulama potansiyeli, +150 mV; akış hızı 1,0 mL/dk; örnek yükleme hacmi 100 μ L ve kolon uzunluğu 10 cm ve K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH için uygulama potansiyeli, +800 mV; akış hızı 0,6 mL/dk; örnek yükleme hacmi 100 μ L ve kolon uzunluğu 10 cm olarak saptanmıştır. Bu elektrotlar kullanılarak optimum koşullarda glukozun derişimine bağlı akım zaman eğrileri elde edilmiş ve hem amperometrik hem de fotoamperometrik yöntem için elde edilen analitiksel parametreler Çizelge 4.3'de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi her iki elektrot için de fotoamperometrik yöntemle elde edilen doğrunun eğiminin amperometrik yöntemle elde edilenden K.PGE için yaklaşık 2 kat ve GCE/MWCNT için yaklaşık 3 kat daha büyük olduğu saptanmış ve dolayısıyla, duyarlığın elektrot yüzeyinin ışıklandırılmasıyla bir miktar daha arttırılması başarılmıştır. Her iki elektrot için askorbik asit (AA), dopamin (DA), ürik asit (UA), L.sistein (L-Cys), galaktoz, sakkaroz, glutamik asit gibi bileşiklerin girişim etkisi incelenmiş bunlardan AA, UA, DA ve L-Cys'nin ciddi girişim gösterdiği tespit edilmiş ve bu girişimcilerin bulunduğu bir ortamda mutlaka giderilmesi gerektiği

sonucuna varılmıştır. Bu girişimcileri içermeyen iki örnekte (bir yapay kan serumu diğeri de ticari olarak alınmış % 5'lik dekstroz çözeltisinde) standart katma yöntemiyle her iki elektrot için glukoz tayini FIA sisteminde hem amperometrik hem de fotoamperometrik olarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4 ve 4.5'da verilmiştir. Çizelgelerden görüldüğü gibi bu girişimcilerin olmadığı ortamlarda glukozun başarılı bir şekilde geliştirilen elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal biyosensör ile tayin edilebileceği sonucuna varılmıştır.

Benzer şekilde ALDH enzimine dayalı elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal etanol biyosensörü, K.PGE/ZnS-MAA/ALDH ve GCE/MWCNT/ZnS-MAA/ALDH kullanılarak hem döngüsel voltammetrik hem de FIA sisteminde amperometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Etanolün enzimatik tepkimesi sonucu oluşan NADH'nin yükseltgenmesine ilişkin pik QD modifiye K.PGE'de yaklaşık 800 mV'da tersinmez olarak gözlenirken, QD modifiye GCE/MWCNT'de 600 mV civarında gözlenmiş ve yüzeyin ışıklandırılmasıyla da bu pikte potansiyel olarak pek değişim gözlenmezken akımın bir miktar arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.71 ve 4.80). FIA sisteminde etanol biyosensörü için enzim immobilize modifiye elektrotlar için bazı parametreler optimize edilmiş ve GCE/MWCNT/ZnS-MAA/ALDH için uygulama potansiyeli, +700 mV; akış hızı 1,5 mL/dk; örnek yükleme hacmi 100 µL ve kolon uzunluğu 10 cm ve K.PGE/ZnS-MAA/ALDH için uygulama potansiyeli, +900 mV; akış hızı 1,5 mL/dk; örnek yükleme hacmi 100 µL ve kolon uzunluğu 10 cm olarak saptanmıştır. Bu elektrotlar kullanılarak optimum koşullarda glukozun derişimine bağlı akım zaman eğrileri elde edilmiş ve hem amperometrik hem de fotoamperometrik yöntem için elde edilen analitiksel parametreler Çizelge 4.6'de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi her iki elektrot için de fotoamperometrik yöntemle elde edilen doğrunun eğiminin amperometrik yöntemle elde edilenden her iki elektrot için yaklaşık 2 kat daha büyük olduğu saptanmış ve dolayısıyla, duyarlılığın elektrot yüzeyinin ışıklandırılmasıyla bir miktar daha artırılması başarılmıştır.

Dehidrogenaz dayalı fotoelektrokimyasal biyosensör mekanizması ise glukoz biyosensörü için Şekil 4.53'de verilmiş ve bu mekanizmaya göre önce elektrot yüzeyindeki CdS kuantum noktaları 250 W halojen lamba ile ışıklandırıldığında, yarıiletken CdS'ün valans bandındaki (VB) elektronlar iletkenlik bandına (CB) transfer olmakta ve elektron-boşluk (e^-h^+ pair) çifti oluşmaktadır. Daha sonra, CB'daki e^- elektroda transfer olurken enzimatik tepkime sonucu oluşan NADH e^- 'nunu VB'de oluşan pozitif yüklü boşluğa (h^+) vererek NAD^+ 'ya yükseltgenmektedir. NAD^+ tekrar glukoz ile enzimatik tepkimeye

girerek glukoz (aslında NADH derişimine bağlı) derişimine bağlı olarak anodik bir fotoakım oluşmaktadır.

QD modifiye elektrotlarla Fotoelektrokimyasal DNA Biyosensör Tasarımı:

Fotoelektrokimyasal DNA biyosensör çalışmalarında sadece K.PGE/CdS-ZnS-MAA kullanılmış ve human papilloma virüsünün (HPV) prob DNA, hedef DNA, tek dizisi değişken DNA ve hedef dışı DNA dizileri kullanılarak K.PGE/CdS-ZnS-MAA'da hem elektrokimyasal hem de fotoelektrokimyasal DNA biyosensörü differansiyel puls voltammetrik teknikle incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda prob DNA dizinin hedef DNA ile hibridizasyonundan sonra guaninin yükseltgenme pikindeki farklanmanın en fazla olduğu ve yüzey ışıklandırılarak guanine ait sinyalin yaklaşık iki kat arttığı ve böylelikle bu elektrotla fotoelektrokimyasal DNA biyosensörünün de gerçekleştirilebileceği sonucu ortaya çıkmıştır.

Sonuç olarak bu tez çalışması ile birlikte, amaçlanan tek kullanımlı, kolay elde edilebilir, kolay modifikasyon, ticari olarak kolay elde edilebilen, ekonomik ve uzun süre temizleme prosedürleri içermeyen bir elektrot materyali olan PGE ve literatürde oldukça sık kullanılan MWCNT/GCE yüzeyine QD biriktirmek ve hazırlanan bu QD modifiye elektrotlarla elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal biyosensör hedeflenen şekilde gerçekleştirilmiştir. QD modifiye K.PGE ve GCE/MWCNT kullanılarak FIA sisteminde dehidrogenaz enzimine dayalı elektrokimyasal ve fotoelektrokimyasal biyosensörler başarılı bir şekilde geliştirilmiştir.

Mükemmel bir işleyişe sahip olan biyolojik sistem ile teknolojinin birlikteliğinin ürünü olan biyosensörler günümüzde popüleriğini korumaktadır. Elde edilen bu sonuçlar, QD modifiye K.PGE ve GCE/MWCNT kullanılarak, immobilizasyon işleminin oldukça etkili bir şekilde gerçekleştirilebileceği ve çok iyi çalışabilecek biyosensörlerin tasarlanabileceğini göstermiştir. Bu doğrultuda, ksantin, kolesterol gibi farklı birçok molekölün düşük konsantrasyondaki tayininin de gerçekleştirilebileceği söylenebilir. QD'ların enzimlerle biyoyumluluğu sebebiyle biyosensör geliştirilmesinde enzim immobilizasyon ortamı olarak kullanılmaları ve fotoelektrokatalitik özellikleri sayesinde biyosensör duyarlılığını arttırmaları mümkündür. FIA sisteminin sahip olduğu bazı avantajlar dikkate alınırsa bu yöntem kullanılarak çok farklı biyomoleküllerin tayini için modifiye elektrotlar başarılı bir şekilde hazırlanabilir.

Gerek biyolojide her gün yeni bir bilginin ortaya konması gerekse teknolojide gelişmelerin hız kesmeden devam etmesiyle yeni biyosensörlerin ticarete dönüştürülmeleri,

Üretici firmalar veya ülkeler için önemli kazançlar sağlamaktadır. Bu gelişmelerin uzağında kalmamak için bu şekilde geliştirilen biyosensörlerin üzerlerinde mühendislik alışmaları yapılarak seimliliği ve duyarlılığı yüksek, dşk maliyetli ve hızlı yanıt verebilecek cihazlar tasarlanabilir.



KAYNAKLAR

- Agüi M. L., Eguilaz C., Pena-Farfal P. Yanez-Sedeno, Pingarron J.M., 2009. Lactate Dehydrogenase Biosensor Based On An Hybrid Carbon Nanotube-Conducting Polymer Modified Electrode. *Electroanalysis*, 21: 386–391.
- Algar W. R., Tavares, A. J., Krull, U. J., 2010. Beyond labels: A Review of the Application of QuantumD as Integrated Components of Assays, Bioprobes, and Biosensors Utilizing Optical Transduction. *Analytica Chimica Acta*, 673: 1–25.
- Al-Jawadi E., Pöller S., Haddad R., Schuhmann W., 2012. NADH Oxidation Using Modified Electrodes Based On Lactate And Glucose Dehydrogenase Entrapped Between an Electrocatalyst Film and Redox Catalyst-Modified Polymers. *Microchimica Acta*, 177: 405–410.
- Baskar S., Chang J.L., Zen J.M., 2012. Simultaneous Detection of NADH and H₂O₂ Using Flow Injection Analysis Based on a Bifunctional Poly(thionine)-modified Electrode. *Biosens Bioelectronics*, 33: 95-99.
- Brown G.N., Briks J.W., Koval C.A., 1992. Development and Characterization of a Titanium Dioxide-Based Semiconductor Photoelectrochemical Detecto. *Anal. Chem.*, 64: 427-434.
- Butwong N., Zhou L., Moore, E., Srijaranai S., Luong J.H.T., Glennon J. D., 2014. A Highly Sensitive Hydrogen Peroxide Biosensor Based On Hemoglobin Immobilized On Cadmium Sulfide Quantum Dots/Chitosan Composite Modified Glassy Carbon Electrode. *Electroanalysis*, 26: 2465-2473.
- Caliskan A., Erdem A., Karadeniz H., 2009. Direct DNA Hybridization On The Single-Walled Carbon Nanotubes Modified Sensors Detected by Voltammetry and Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Electroanalysis*, 21: 2116 – 2124.
- Chakraborty S., Raj C.R., 2007. Amperometric Biosensing of Glutamate Using Carbon Nanotube Based Electrode. *Electrochemistry Communications*, 9: 1323-1330.
- Chen Y. L., Yuan J. H., Tian C. X., Wang X. Z., 2004. Flow-injection Analysis and Voltammetric Detection of NADH With a Poly-Toluidine Blue Modified Electrode. *Anal. Sci.*, 20: 507-511.
- Congur G., Eksin E., Mese F., Erdem A., 2014. Succinamic Acid Functionalized PAMAM Dendrimer Modified Pencil Graphite Electrodes for Voltammetric and Impedimetric DNA Analysis. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 201: 59-64.

- Cooper J.A, Wu M., Compton R.G., 1998. Photoelectrochemical Analysis of Ascorbic Acid. *Analytical Chemistry*, 70: 2922-2927.
- Cooper J.A., Woodhouse K.E., Chippindale A.M., 1999. Photoelectrochemical Determination Of Ascorbic Acid Using Methylene Blue Immobilized in A-Zirconium Phosphate. *Electroanalysis*, 11: 1259-1265.
- Cosnier S., Lous K.L., 1996. A New Strategy For The Construction Of Amperometric Dehydrogenase Electrodes Based on Laponite Gel-Methylene Blue Polymer as the Host Matrix. *J. Electroanal. Chem.*, 406: 243-246.
- Cui D., Tian F., Kong Y., Titushikin I., Gao H., 2004. Effects of Single-Walled Carbon Nanotubes on the Polymerase Chain Reaction. *Nanotechnology*, 15: 154-157.
- Cui D., Tian F., Coyer S. R., Wang J., Pan B., Gao F., He R., Zhang Y., 2007. Effects of Antisense myc-Conjugated Single-Walled Carbon Nanotubes on HL-60 Cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 7: 1639-1646.
- Cui D., Pan B., Zhang H., Gao F., Wu R., Wang J., He R., Asahi T., 2008. Self-assembly of Quantum Dots and Carbon Nanotubes For Ultrasensitive DNA and Antigen Detection. *Anal. Chem.* 80: 7996-8001.
- Dai Z-H., Liu F-X., Lu G-F., Bao J-C., 2008. Electrocatalytic Detection of NADH and Ethanol at Glassy Carbon Electrode Modified With Electropolymerized Films From Methylene Green. *J. Solid State Electrochem.*, 12: 175-180.
- Dede E., Sağlam Ö., Dilgin Y., 2014. Sensitive Voltammetric Determination of Niclosamide at a Disposable Pencil Graphite Electrode. *Electrochimica Acta*, 127: 20-26.
- De Lucca A. R., Santos A. D., Pereira A. C., Kubota L. T., 2002. Electrochemical Behavior and Electrocatalytic Study of the Methylene Green Coated on Modified Silica Gel. *J. Colloid Interf. Sci.*, 254:113-119.
- Deng L., Wang Y., Shang L., Wen D., Wang F., Dong S., 2008. A Sensitive NADH and Glucose Biosensor Tuned by Visible Light Based on Thionine Bridged Carbon Nanotubes and Gold Nanoparticles Multilayer. *Biosens Bioelectronics*, 24: 951-957.
- Dervisevic M., Cevik E., Senel 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.
- Devi R., Yadav S., Nehra R., Yadav S., Pundir C. S., 2013. Electrochemical Biosensor Based on Gold Coated Iron Nanoparticles/Chitosan Composite Bound Xanthine

- Oxidase for Detection of Xanthine in Fish Meat. *Journal of Food Engineering*, 115: 207-214.
- 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: 167-180.
- Dilgin Y., 2004. The Uses of Modified Muscovite at Photoelectrochemical Reactions and the Application to New Techniques. PhD Thesis. Ege University, Science Faculty.
- Dilgin Y., Dursun Z., Nişli 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: 162-168.
- Dilgin Y., Nisli G., 2006. Flow Injection Photoamperometric Investigation of Ascorbic Acid Using Methylene Blue Immobilized on Titanium Phosphate. *Analytical Letters*, 39: 451-465.
- Dilgin Y., Gorton L., Nişli G., 2007. Photoelectrocatalytic Oxidation of NADH With Electropolymerized Toluidine Blue O. *Electroanalysis*, 19: 286-293.
- Dilgin D.G., Gligor D., Gökçel H.İ., Dursun Z., Dilgin Y., 2010. Photoelectrocatalytic Oxidation of NADH in a Flow Injection Analysis System Using a Poly-Hematoxylin Modified Glassy Carbon Electrode. *Biosens Bioelectronics*, 26: 411-417.
- Dilgin Y., Dilgin D. G., Dursun Z., Gökçel H.İ., Gligor D., Bayrak B., Ertek B., 2011. Photoelectrocatalytic Determination of NADH in a Flow Injection System With Electropolymerized Methylene Blue. *Electrochimica Acta*, 56: 1138-1143.
- Dilgin Y., Canarslan S., Ayyıldız Ö., Ertek B., Nişli 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., Ertek B., Kızılkaya 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: 920-927.
- Dilgin Y., Kızılkaya B., Ertek B., Işık F., Dilgin D.G., 2012c. Electrocatalytic Oxidation of Sulphide Using a Pencil Graphite Electrode Modified With Hematoxylin. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 171-172: 223-229.
- Dilgin Y., Kızılkaya B., Ertek B., Eren N., Dilgin D.G., 2012d. Amperometric Determination of Sulfide Based On its Electrocatalytic Oxidation at a Pencil Graphite Electrode Modified With Quercetin. *Talanta*, 89: 490-495.

- Dilgin Y., Kizilkaya B., Dilgin D.G., Gökçel H.İ., Gorton L., 2013. Electrocatalytic Oxidation of NADH Using a Pencil Graphite Electrode Modified With Quercetin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102: 816-821.
- Dilgin D.G., Gökçel H.İ., 2015. Photoelectrochemical Glucose Biosensor in Flow Injection Analysis System Based On Glucose Dehydrogenase Immobilized on Poly-Hematoxylin Modified Glassy Carbon Electrode. *Analytical Methods*, 7: 990-999.
- Dogan Topal B., Ozkan S.A., 2011. A Novel Sensitive Electrochemical DNA Biosensor for Assaying of Anticancer Drug Leuprolide and its Adsorptive Stripping Voltammetric Determination. *Talanta*, 83: 780-788.
- Du P., Liu S., Wu P., Cai C., 2007. Single-walled Carbon Nanotubes Functionalized With Poly(nile blue A) and Their Application to Dehydrogenase-Based Biosensors. *Electrochim. Acta*, 53: 1811-1823.
- Du J., Yu X.P., Di J.W., 2012. Comparison of the Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase Immobilized on the Surface of Au, CdS and ZnS Nanostructures. *Biosensors and Bioelectronics*, 37: 88-93.
- Du J., Yu X.P., Wu Y., Di J.W., 2013. ZnS Nanoparticles Electrodeposited onto ITO Electrode as a Platform for Fabrication of Enzyme-Based Biosensors of Glucose. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 33: 2031-2036.
- Eftekhari A., 2001. Glycerol Biosensor Based On Glycerol Dehydrogenase Incorporated Into Polyaniline Modified Aluminum Electrode Using Hexacyanoferrate as Mediator. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 3: 283–289.
- Elahi M. Y., Khodadadi A. A., Mortazavi Y., 2014. A Glucose Biosensor Based on Glucose Oxidase Immobilized on ZnO/Cu₂O Graphene Oxide Nanocomposite Electrode. *Journal of the Electrochemical Society*, 161: B81-B87.
- Erdem A., Congur G., Mese F., 2014. Electrochemical Detection of Activated Protein C Using an Aptasensor Based on PAMAM Dendrimer Modified Pencil Graphite Electrodes. *Electroanalysis*, 26: 2580-2590.
- Ertek B., Akgül 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: 20058-20066.
- Fan H., Ju P., Ai S., 2010. Controllable Synthesis of CdSe Nanostructures With Tunable Morphology and Their Application in DNA Biosensor of Avian Influenza Virus.

- Sensors and Actuators B, 149: 98–104.
- Fan G.C., Han L., Zhang J.R., Zhu J.J., 2014. Enhanced Photoelectrochemical Strategy For Ultrasensitive DNA Detection Based on Two Different Sizes of CdTe Quantum Dots Cosensitized TiO₂/CdS: Mn Structure. *Analytical Chemistry*, 86: 10877-10884.
- Ferancova A., Rengaraj S., Kim Y., Labuda J., Sillanpaa M., 2010. Electrochemical Determination of Guanine and Adenine by CdS Microspheres Modified Electrode and Evaluation of Damage to DNA Purine Bases by UV Radiation. *Biosens. Bioelectron.*, 26: 314–320.
- Florou A. B., Prodromidis M. I., Karayannis M. I., Tzouwara-Karayanni S. M., 1998. Electrocatalytic Oxidation of NADH in Flow Analysis By Graphite Electrode Modified With 2,6-Dichlorophenolindophenol Salts. *Electroanalysis*, 10: 1261-1268.
- Fox M.A., Tien T., 1988. Photoelectrochemical Detector for High-Pressure Liquid Chromatograph. *Anal. Chem.*, 60: 2278-2282.
- Galloway J. F., Winter A., Lee K. H., Park J. H., Dvoracek C. M., Devreotes P., Searson P. C., 2012. Quantitative Characterization of the Lipid Encapsulation Of Quantum Dots for Biomedical Applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8:1190–1199.
- Gao Q., Cui X. Q., Yang F., Ma Y., Yang X. R., 2003. Preparation of Poly(thionine) Modified Screen-Printed Carbon Electrode and its Application to Determine NADH in Flow Injection Analysis System. *Biosens. Bioelectron.*, 19: 277-282.
- Gao Q., Wang W., Ma Y., Yang X., 2004. Electrooxidative Polymerization of Phenothiazine Derivatives on Screen-Printed Carbon Electrode and its Application to Determine NADH in Flow Injection Analysis System. *Talanta*, 62: 477-482.
- Ge L., Wang Y.H., Yang H.M., Yang P., Cheng X., Yan M., Yu J.H., 2014. A Photoelectrochemical Biosensor Using Ruthenium Complex-reduced Graphene Oxide Hybrid as the Photocurrent Signal Reporter Assembled on Rhombic TiO₂ Nanocrystals Driven by Visible Light. *Analytica Chimica Acta*, 828: 27-33.
- Ghanem M.A., Chretien J.M., Kilburn J.D., Bartlett P.N., 2009. Electrochemical and Solid-Phase Synthetic Modification of Glassy Carbon Electrodes With Dihydroxybenzene Compounds and the Electrocatalytic Oxidation of NADH. *Bioelectrochemistry*, 76: 115–125.
- Gligor D., Dilgin Y., Popescu I. C., Gorton L., 2009. Photoelectrocatalytic Oxidation of NADH at Graphite Electrode Modified with a New Polymeric Phenothiazine.

- Electroanalysis, 21(3-5):360-367.
- Gorton L., Dominguez E., 2002. Encyclopedia of Electrochemistry Edited by Allen J. Bard and Martin Stratmann, Volume 9, Bioelectrochemistry edited by George S. Wilson, Wiley WCH Verlag. 67–143.
- Gözükara E., 2001. Biyokimya, cilt 2, dördüncü baskı, 680-682.
- Gu Z.G., Yang S.P., Li Z.J., Sun X.L., Wang G.L., Fang Y.J., Liu J.K., 2011. An Ultrasensitive Electrochemical Biosensor for Glucose Using CdTe-CdS Core-Shell Quantum Dot as Ultrafast Electron Transfer Relay Between Graphene-Gold Nanocomposite and Gold Nanoparticle. *Electrochimica Acta*, 56: 9162-9167.
- Guo Q.Y., Li H., Yang H.Y., Shao J.Y., 2010. Fabrication and Photoelectrochemical Properties of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ on ITO Electrode Associated with the Oxidation of Guanine. *Chemical Research in Chinese Universities*, 26: 649-655.
- Haddour N., Cosnier S., Gondran C., 2004. Electrogeneration of a Biotinylated Poly(pyrrole–ruthenium(II)) Film for the Construction of Photoelectrochemical Immunosensor. *Electrochemistry Communications*, 21: 2472-2473.
- Han M., Gao X., Su J. Z., Nie S., 2001. Quantum-dot-tagged Microbeads For Multiplexed Optical Coding of Biomolecules. *Biotechnol.*, 19: 631-635.
- Hansen E.H., 1996. Principles and Applications of Flow Injection Analysis in Biosensors. *Journal of Molecular Recognition*, 9: 316-325.
- Hasebe Y., Wang Y., Fukuoka K., 2011. Electropolymerized Poly(Toluidine blue)-Modified Carbon Felt for Highly Sensitive Amperometric Determination of NADH in Flow Injection Analysis. *Journal of Environmental Sciences*, 23: 1050-1056.
- Ho Y., Periasamy A.P., Chen S.M., 2011. Photoelectrocatalytic Regeneration of NADH at Poly(4,4'-diaminodiphenyl sulfone)/nano TiO_2 Composite Film Modified Indium Tin Oxide Electrode. *Sensors and Actuators B.*, 156: 84-94.
- Hoshino A., Fujioka K., Manabe N., Yamaya S.I., Goto Y., Yasuhara M., Yamamoto K., 2005. Simultaneous Multicolour Detection System of the Single-Molecular Microbial Antigen With Totalinternal Reflection Fluorescence Microscopy. *Microbiol. Immunol.*, 49: 461-470.
- Hu Y.Q., Xue Z.H., He H.X., Ai R.X., Liu X.H., Lu X.Q., 2013. Photoelectrochemical Sensing for Hydroquinone Based on Porphyrin-Functionalized Au Nanoparticles on Graphene. *Biosensors and Bioelectronics*, 47: 45-49.

- Hua E., Wang L., Jing X.Y., Chen C., Xie G., 2013. One-Step Sabrication of Integrated Disposable Biosensor Based on ADH/NAD⁺/Meldola's Blue/Graphitized Mesoporous Carbons/Chitosan Nanobiocomposite For Ethanol Detection. *Talanta*, 111: 163-169.
- Huang Y.X., Zhang W.J., Xiao H., Li G.X., 2005. An Electrochemical Investigation of Glucose Oxidase at a CdS Nanoparitcles Modified Electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 21: 817-821.
- Huang F., Wang F., Feng S., Li Y.J., Li S.X., Li Y.C., 2013. Direct Electrochemistry and Electrochemical Biosensing of Glucose Oxidase Based on CdSe@CdS Quantum Dots and MWNT-Modified Electrode. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 17: 1295-1301.
- Jafari F., Salimi A., Navaee A., 2014a. 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: 1782-1793.
- Jafari F., Salimi A., Navaee A., 2014b. Electrochemical and Photoelectrochemical Sensing of NADH and Ethanol Based on Immobilization of Electrogenenerated Chlorpromazine Sulfoxide onto Graphene-CdS Quantum Dot/Ionic Liquid Nanocomposite. *Electroanalysis*, 26: 530-540.
- Jaraba P., Agui L., Yanez-Sedeno P., Pingarrom J. M., 1998. NADH Amperomtric Sensor Based on Poly(3- methylthiophene)-Coated Cylindrical Carbon Fiber Microelectrodes: Application to the Enzymatic Determination of L-lactate. *Electrochem. Acta*, 43:3555-3565.
- Jimenez A., Armada M. P. G., Losada J., Villena C., 2014. Amperometric Biosensors for NADH Based on Hyperbranched Dendritic Ferrocene Polymers and Pt Nanoparticles. *Sensors and Actuators B*, 190: 111-119.
- Karadeniz H., Gulmez B., Sahinci F., Erdem A., Irem Kaya G., Unver N., Kivcak B., Ozsoz M., 2003. Disposable Electrochemical Biosensor for the Detection of the Interaction Between DNA and Lycorine Based on Guanine and Adenine Signals. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33: 295-302.
- Katakis I., Dominguez E., 1997. Catalytic Electrooxidation of NADH for Dehydrogenase Amperometric Biosensors. *Mikrochim. Acta*, 126: 11-32.
- Kaul Z., Yaguchi T., Kaul S.C., Hirano T., Wadhwa R., Taira K., 2003. Mortalin Imaging

- in Normal and Cancer Cells With Quantum Dot Immuno-Conjugates. *Cell Res.*, 13: 503-507.
- Keskin E., Yardim Y., Senturk Z., 2010. Voltammetry of Benzo[a]pyrene in Aqueous and Nonaqueous Media: Adsorptive Stripping Voltammetric Determination at Pencil Graphite Electrode. *Electroanalysis*, 22: 1191-1199.
- 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. *Anal. Chem.*, 85: 11643-11649.
- Kumar S.A. ve Chen S.M., 2008. Electroanalysis of NADH Using Conducting and Redox Active Polymer/Carbon Nanotubes Modified Electrodes-A Review. *Sensors*, 8: 739-766.
- Kuralay F., Demirci S., Kiristi M., Oksuz L., Oksuz A.U., 2014. Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene) Coated Chitosan Modified Disposable Electrodes for DNA and DNA-Drug Interaction Sensing. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 123: 825-830.
- Liang M.M., Liu S.L. Wei M.Y., Guo L.H., 2006. Photoelectrochemical Oxidation of DNA by Ruthenium Tris(bipyridine) on a Tin Oxide Nanoparticle Electrode. *Analytical Chemistry*, 78: 621-623.
- Liu M., Shi G., Zhang L., Cheng Y., 2006. Litong Jin Quantum Dots Modified Electrode and its Application in Electroanalysis of Hemoglobin. *Electrochemistry Communications*, 8: 305–310.
- Liu Q., Lu X., Li J., Yao X., Li J.H., 2007. Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase and Electrochemical Biosensing of Glucose on Quantum Dots/Carbon Nanotubes Electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 3203–3209.
- Liu X.Q., Yan R., Zhu J., Huo X., Wang X., 2015. Development of a Photoelectrochemical Lactic Dehydrogenase Biosensor Using Multi-Wall Carbon Nanotube-TiO₂ Nanoparticle Composite as Coenzyme Regeneration Tool. *Electrochimica Acta*, 173: 260-267.
- Lobo M.J., Miranda A.J., Tunon P., 1996. A Comparative Study of Some Phenoxazine and Phenothiazine Modified Carbon Paste Electrodes for Ethanol Determination. *Electroanalysis*, 8: 591-596.
- Lobo M.J., Miranda A.J., Tunon P., 1997. Amperometric Biosensors Based on NAD(P)-Dependent Dehydrogenase Enzymes. *Electroanalysis*, 9: 191-202.

- Lu C., Wang X-F., Xu J.J., Chen H-Y., 2008a. Electrochemical Modulation of Electrogenenerated Chemiluminescence of CdS Nano-Composite. *Electrochem. Commun.*, 10: 1530-1532.
- Lu W., Jin Y., Wang G., Chen D., Li J.H., 2008b. Enhanced Photoelectrochemical Method for Linear DNA Hybridization Detection Using Au-Nanoparticle Labelled DNA as Probe onto Titanium Dioxide Electrode. *Biosens. Bioelectron.*, 23: 1534-1539.
- Ma Q., Su X.G., 2011. Recent Advances and Applications in QDs-Based Sensors. *Analyst*, 136: 4883-4893.
- Manso J., Mena M.L., Yanez-Sedeno P., Pingarron J.M., 2008. Alcohol Dehydrogenase Amperometric Biosensor Based on a Colloidal Gold–Carbon Nanotubes Composite Electrode. *Electrochimica Acta*, 53: 4007–4012.
- Maroneze C.M., Arenas L.T., Luz R.C.S., Benvenuti E.V., Landers R., Gushikem Y., 2008. Meldola Blue Immobilized on a New SiO₂/TiO₂/Graphite Composite for Electrocatalytic Oxidation of NADH. *Electrochimica Acta*, 53: 4167–4175.
- Mayer M., Ruzicka J., 1996. Flow Injection Based Renewable Electrochemical Sensor System. *Analytical Chemistry*, 68: 3808-3814.
- Mckelvie I.D., 1999. Flow Injection Analysis. *Analytical Testing Technology*, 20: 20-24.
- Medintz I.L., Uyeda H.T., Goldman E.R., Mattoussi H., 2005. Quantum Dot Bioconjugates for Imaging, Labelling and Sensing. *Nat. Mater.*, 4: 435-446.
- Meng L., Wu P., Chen G., Cai C., Sun Y., Yua, Z. 2009. Low Potential Detection of Glutamate Based on the Electrocatalytic Oxidation of NADH at Thionine/Single-Walled Carbon Nanotubes Composite Modified Electrode. *Biosens. Bioelectron.*, 24: 1751-1756.
- Meredith M.T., Giroud F., Minter S.D., 2012. Azine/Hydrogel/Nanotube Compositemodified Electrodes for NADH Catalysis and Enzyme Immobilization. *Electrochimica Acta*, 72: 207–214.
- Meriç B., 2008. Influenza A Virüsünün Tanısına Yönelik Elektrokimyasal DNA Biyosensör Tasarımı. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya (Eczacılık) Programı Yüksek Lisans Tezi, Bornova-İzmir.
- Mese F., Congur G., Erdem A., 2014. Voltammetric and Impedimetric Detection of DNA Hybridization by Using Dendrimer Modified Graphite Electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 719: 92-97.
- Monosik R., Stredansky M., Luspai K., Magdolen P., Sturdik E., 2012. Amperometric

- Glucose Biosensor Utilizing FAD-Dependent Glucose Dehydrogenase Immobilized on Nanocomposite Electrode. *Enzyme and Microbial Technology*, 50:227-232.
- Nakiboğlu N., 2014. Elektrokimyasal Yöntemlerde Validasyon, III. Ulusal Uygulamalı Elektrokimya Yaz Okulu ve Çalıştayı. Ed: Karakoç, Ö., Ayvalık, Sayfa:328-351.
- Nişli G., 2001. Kimyasal Otomasyon ve Akışkan Ortamlarda Analiz, Eser Analiz Yaz Okulu. Ed: Henden, E., Gökçel, H.İ., Ertaş, N., İzmir, Sayfa: 237-253.
- Nişli G., Gökçel H.İ., Dursun Z., 2002. Akışkan Sisteme Enjeksiyon (FIA) Tekniği ile Voltammetrik Analizler. Kimyasal Eser Analiz Yaz Okulu II, Ed: Henden, E., Gökçel, H.İ., Ertaş, N., İzmir, Sayfa: 175-195.
- Ojani R., Raoof J.B., Zarei E., 2012. Photoelectrocatalytic Oxidation of Formaldehyde Using a Ti/TiO₂ Foil Electrode. Application for Its Novel and Simple Photoelectrochemical Determination. *Talanta*, 99: 277-282.
- Ozcan A., Sahin Y., 2010. Preparation of Selective and Sensitive Electrochemically Treated Pencil Graphite Electrodes for the Determination of Uric Acid in Urine and Blood Serum. *Biosensors & Bioelectronics*, 25: 2497-2502.
- Ozcan A., Sahin 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: 9-14.
- Pala B.B., Vural T., Kuralay F., Cirak T., Bolat G., Abaci S., Denkbaz E.B., 2014. Disposable Pencil Graphite Electrode Modified with Peptide Nanotubes for Vitamin B-12 Analysis. *Applied Surface Science*, 303: 37-45.
- Pan B., Cui D., He R., Gao F., Zhang Y., 2006. Covalent Attachment of Quantum Dot on Carbon Nanotubes. *Chem. Phys. Lett.*, 417: 419-424.
- Pan B., Cui D., Xu P., Li Q., Huang T., He R., Gao F., 2007a. Study on Interaction Between Gold Nanorod and Bovine Serum Albumin. *Colloids Surface A*, 295: 217-222.
- Pan B., Cui D., Sheng Y., Ozkan C., Gao F., He R., Li Q., Xu P., Huang T., 2007b. Dendrimer Modified Magnetic Nanoparticles Enhance Efficiency Of Gene Delivery System. *Cancer Res.*, 67: 8156-8163.
- Pappas A. C., Prodromidis M. I., Karayannis M. I., 2002. Flow Monitoring of NADH Consumption in Bioassays Based on Packed-Bed Reactors Bearing NAD⁺-

- Dependent Dehydrogenases Determination of Acetaldehyde Using Alcohol Dehydrogenase. *Analytica Chimica Acta*, 467 : 225–232.
- Peng X.G., Schlamp M.C., Kadavanich A.V., Alivisatos A.P., 1997. Epitaxial Growth of Highly Luminescent CdSe/CdS Core/Shell Nanocrystals with Photostability and Electronic Accessibility. *Journal of American Chemical Society*, 119: 7019-7029.
- Petryayeva E., Krull U. J., 2012. Quantum Dot and Gold Nanoparticle Immobilization for Biosensing Applications Using Multidentate Imidazole Surface Ligands. *Langmuir*, 28: 13943–13951.
- 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: 269-274.
- Prasannakumar S., Manjunatha R., Nethravathi C., Suresh G.S., Rajamathi M., Venkatesha T.V., 2012. Graphene–Carbon Nanotubes Modified Graphite Electrode for the Determination of Nicotinamide Adenine Dinucleotide and Fabrication of Alcohol Biosensor. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 16:3189–3199.
- Prieto-Simon B., Macanas J., Munoz M., Fabregas E., 2007. Evaluation of Different Mediator-Modified Screen-Printed Electrodes Used In a Flow System As Amperometric Sensors for NADH. *Talanta*, 71: 2102-2107.
- Qian Z., Bai H. J., Wang G. L., Xu J. J., Chen H.Y., 2010. A Photoelectrochemical Sensor Based on CdS-Polyamidoamine Nano-Composite Film for Cell Capture and Detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 25: 2045–2050.
- Qian J., Yan S.C., Xiao Z.D., 2012. Electrochemical Biosensor Based on CdS Nanostructure Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 366: 130-134.
- Qiu H., Xue L., Ji G., Zhou G., Huang X., Qu Y., Gao P., 2009. Enzyme-Modified Nanoporous Gold-Based Electrochemical Biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 24 :3014–3018.
- Radoi A., Compagnone D., 2009. Recent Advances in NADH Electrochemical Sensing Design. *Bioelectrochemistry*, 76:126–134.
- Ramirez Molina C., Boujtif, M., El Murr N., 2003. New Strategy For Dehydrogenase Amperometric Biosensors Using Surfactant to Enhance the Sensitivity of Diaphorase-Ferrocene Modified Carbon Paste Electrodes for Electrocatalytic Oxidation of NADH. *Electroanalysis*, 15:1095-1100.

- Razmi H., Razei R.M., 2013. Graphene Quantum Dots as a New Substrate for Immobilization and Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase: Application to Sensitive Glucose Determination. *Biosensors and Bioelectronics*, 41: 498-504.
- Riedel M., Gobel G., Abdelmonem A.M., Parak W.J., Lisdat F., 2013. Photoelectrochemical Sensor Based on Quantum Dots and Sarcosine Oxidase. *Chemphyschem*, 14: 2338-2342.
- Rizvi S.B., Ghaderi S., Keshtgar M., Seifalian A.M., 2010. Semiconductor Quantum Dots as Fluorescent Probes for in Vitro and in Vivo Bio-Molecular and Cellular Imaging. *Nano Reviews*, 1: 5161.
- Rotenberg Z.A., Alpatova N.M., Ovsyannikova E.V., Kirchmeyer S.S., Jonas F., 2002. Photoelectrochemical Behavior of Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) in Acetonitrile Solutions During Cathodic Reduction of Oxygen. *Russian Journal of Electrochemistry*, 38: 1244-1249.
- Ruan J., Song H., Qian Q., Li C., Wang K., Bao C., 2012. Daxiang Cui HER2 monoclonal Antibody Conjugated RNase-A-associated CdTe Quantum Dots for Targeted Imaging and Therapy of Gastric Cancer. *Biomaterials*, 33: 7093-7102.
- Ruzicka J. ve Hansen E. H., 1988. Flow Injection Analysis Second Edition. A Series of Monographs on Analytical Chemistry and Its Applications, 4-13.
- Sağlam Ö., Kızılkaya B., Uysal H., Dilgin Y., 2016. Biosensing of Glucose in Flow Injection Analysis System Based on Glucose Oxidase-Quantum Dot Modified Pencil Graphite Electrode. *Talanta*, 147: 315-321.
- Salimi A., Hallaj R., Ghadermazi M., 2005. Modification of Carbon Ceramic Electrode With Sol-Gel Technique by a Thin Film of Chlorogenic Acid Application to Amperometric Detection of NADH. *Talanta*, 65:888–894.
- Salimi F., Negahdary M., Mazaheri G., Akbari-dastjerdi H., Ghanbari-kakavandi Y., Javadi S., Inanloo S., Mirhashemi-route M., Shokoohnia M., Sayad A., 2012. A Novel Alcohol Biosensor Based on Alcohol Dehydrogenase and Modified Electrode with ZrO₂ Nanoparticles. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 7: 7225 - 7234.
- Salimi A., Rahmatpanah R., Hallaj R., Roushani M., 2013. Covalent Attachment of Thionine onto Gold Electrode Modified With Cadmium Sulfide Nanoparticles: Improvement of Electrocatalytic and Photoelectrocatalytic Reduction of Hydrogen Peroxide. *Electrochimica Acta*, 95: 60-70.

- Santos A.S., Pereira A.C., Duran N., Kubota L.T., 2006. Amperometric Biosensor for Ethanol Based On Co-Immobilization Of Alcohol Dehydrogenase And Meldola's Blue On Multi-Wall Carbon Nanotube. *Electrochim. Acta*, 52: 215-220.
- Schubert K., Khalid W., Yue Z., Parak W.J., Lisdat F., 2010. Quantum-Dot-Modified Electrode in Combination With NADH-Dependent Dehydrogenase Reactions for Substrate Analysis. *Langmuir*, 26: 1395–1400.
- 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: 272-286.
- Serban S., El Murr N., 2004. Synergetic Effect for NADH Oxidation of Ferrocene and Zeolite in Modified Carbon Paste Electrodes. *New Approach For Dehydrogenase Based Biosensors. Biosensors and Bioelectronics*, 20:161–166.
- 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. *Microchim. Acta*, 148: 335-341.
- Sharma S. N., 2006. Photophysics and Photochemistry of Colloidal Poly (p-phenylenevinylene) (PPV) Polymer. *Materials Chemistry and Physics*, 100: 345-350.
- 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. *Biosens. Bioelectron.*, 11: 215-223.
- Simon E., Bartlett P.N., 2003. *Biomolecular Films, Design, Function and Applications*. Ed: Rusling, J.F., Marcel Dekker, New York.
- Staden V. J. F., Van Staden R. I. C., 2012. Flow-Injection Analysis Systems With Different Detection Devices and Other Related Techniques for the in vitro and in vivo Determination of Dopamine as Neurotransmitter. A review, *Talanta*, 102: 34-43.
- Suehiro J., Zhou G., Hara M., 2003. Fabrication of a Carbon Nanotube-Based Gas Sensor Using Dielectrophoresis and its Application for Ammonia Detection by Impedance Spectroscopy, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36: 21-26.
- Sun J.J., Zhu Y., Yang X.L., Li C.Z., 2009. Photoelectrochemical Glucose Biosensor Incorporating CdS Nanoparticles. *Particuology*, 7: 347-352.
- Sun B., Ai S.Y., 2014. Fabrication and Application of Photoelectrochemical Sensor. *Progress in Chemistry*, 26: 834-845.

- Tan L., Wana A., Li H., Lu Q., 2012. Novel Quantum Dots–Carboxymethyl Chitosan Nanocomposite Nitric Oxide Donors Capable of Detecting Release of Nitric Oxide in situ. *Acta Biomaterialia*, 8: 3744–3753.
- Tang L., Zeng G., Shen G., Zhang Y., Li Y., Fan Ch., Liu C., Niu Ch., 2009. Highly Sensitive Sensor For Detection of NADH Based on Catalytic Growth of Au Nanoparticles on Glassy Carbon Electrode. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393:1677–1684.
- Tanne J., Schafer D., Khalid W., Parak W.J., Lisdat F., 2011. Light-Controlled Bioelectrochemical Sensor Based on CdSe/ZnS Quantum Dots. *Analytical Chemistry*, 83: 7778-7785.
- Teymourian H., Salimi A., Hallaj R., 2012. Low Potential Detection of NADH Based on Fe₃O₄ Nanoparticles/Multiwalled Carbon Nanotubes Composite: Fabrication of Integrated Dehydrogenase-Based Lactate Biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 33: 60–68.
- Tokudome H., Yamada Y., Sonezaki S., Ishikawa H., Bekki M., Kanehira K., Miyauchi M., 2005. Photoelectrochemical Deoxyribonucleic Acid Sensing on a Nanostructured TiO₂ Electrode. *App. Phys. Lett.*, 87: 213901.
- Tsai Y. C., Chen S. Y., Liaw H. W., 2007. Immobilization of Lactate Dehydrogenase Within Multiwalled Carbon Nanotube-Chitosan Nanocomposite for Application to Lactate Biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 125: 474–481.
- Turner A.P.F., 1987. *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Ed: Turner, A.P.F., Karube, I. and Wilson, G. S.; Oxford University Pres. Oxford, 5-7.
- 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. *Anal. Chim. Acta*, 345: 37-43.
- Wang E., Ji H., Hoy W., 1991. The Use of Chemically Modified Electrodes for Liquid Chromatography and Flow-Injection Analysis. *Electroanalysis*, 3:1-11.
- Wang J., Kawde A.N., Sahlin E., 2000. Renewable Pencil Electrodes for Highly Sensitive Stripping Potentiometric Measurements of DNA and RNA. *Analyst*, 125: 5-7.
- Wang J., Kawde A. N., Erdem A., Salazar M., 2001. Magnetic Bead-Based Label-Free Electrochemical Detection of DNA Hybridization. *Analyst*, 126: 2020- 2024.

- Wang L., Wang L., Zhu C., Wei X., Kan X., 2002. Preparation and Application of Functionalized Nanoparticles of CdS as a Fluorescence Probe. *Analytica Chim. Acta*, 468: 35-41.
- Wang F., Hu S., 2009. Electrochemical Sensors Based on Metal and Semiconductor Materials. *Microchimica Acta*, 165: 1-22.
- Wang G.L., Xu J.J., Chen H.Y., 2009a. Dopamine Sensitized Nanoporous TiO₂ Film on Electrodes: Photoelectrochemical Sensing of NADH Under Visible Irradiation. *Biosensors and Bioelectronics*, 24: 2494-2498.
- Wang G.L., Xu J.J., Chen H.Y., 2009b. Progress in the Studies of Photoelectrochemical Sensors. *Science in China Series B: Chemistry*, 52: 1789-1800.
- Wang K., Li Q., Guan Q.M., Wu J., Li H.N., Yan J.J., 2011. Enhanced Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase and Biosensing for Glucose Via Synergy Effect of Graphene and CdS Nanocrystals. *Biosensors and Bioelectronics*, 26: 2252-2257.
- Wang K., Wu J., Liu Q., Jin Y., Yan J., Cai J., 2012a. Ultrasensitive Photoelectrochemical Sensing of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Based On Graphene-TiO₂ Nanohybrids Under Visible Irradiation. *Analytica Chimica Acta*, 745: 131-136.
- Wang W.J., Bao L., Lei J.P., Tu W.W., Ju H.X., 2012b. Visible Light Induced Photoelectrochemical Biosensing Based On Oxygen-Sensitive Quantum Dots. *Analytica Chimica Acta*, 744: 33-38.
- Xu Y., Cai H., He P. G., Fang Y. Z., 2004. Probing DNA Hybridization by Impedance Measurement Based on CdS-Oligonucleotide Nanoconjugates. *Electroanalysis*, 16: 150-155.
- Xu Y., Liang J., Hu C., Wang F., Hu S., He Z., 2007. A Hydrogen Peroxide Biosensor Based On The Direct Electrochemistry Of Hemoglobin Modified With Quantum Dots. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 12: 421-427.
- Xu Q., Wang J.H., Wang Z., Yin Z.H., Yang Q., Zhao Y.D., 2008. Interaction of CdTe quantum dots with DNA. *Electrochemistry Communicaitons*, 10: 1337-1339.
- Yan Y.M., Yehezekeli O., Willner I. 2007. Integrated, Electrically Contacted NAD(P)⁺-dependent Enzyme-Carbon Nanotube Electrodes For Biosensors and Biofuel Cell Applications. *Chem. Eur. J.*, 13: 10168-10175.

- 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. *Biosens. Bioelectron.*, 25: 733-738.
- Yardim Y., Senturk Z., 2013. Electrochemical Evaluation and Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of Capsaicin or Dihydrocapsaicin on a Disposable Pencil Graphite Electrode. *Talanta*, 112: 11-19.
- Yıldız H.B., Kamaci M., Karaman M., Toppare L., Sayin S., 2014. Photoelectrochemical Biosensing Approach for Alcohol Determination by "Wiring" of Alcohol Oxidase Photonically with P(SNS-NH₂)/AOx/CNT/[Ru(bpy)₃]⁽²⁺⁾ Modified Electrodes. *Journal of Macromolecular Science Part A-Pure And Applied Chemistry*, 51: 385-393.
- Yin H., Zhoua Y., Aia S., Chen Q., Zhu X., Liua X., Zhu L., 2010. Sensitivity and Selectivity Determination of BPA in Real Water Samples Using PAMAM Dendrimer and CoTe Quantum Dots Modified Glassy Carbon Electrode. *Journal of Hazardous Materials*, 174: 236–243.
- You X., He R., Gao F., Shao J., Pan B., Cui D., 2007. Hydrophilic High-Luminescent Magnetic Nanocomposites. *Nanotechnology*, 18: 035701:1-035701:5.
- Yue Z., Lisdat F., Parak W.J., Hickey S.G., Tu L., Sabir N., Dorfs D., Bigall N.C., 2013. Quantum-Dot-Based Photoelectrochemical Sensors for Chemical and Biological Detection. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5: 2800-2814.
- Zhang X., Guo Q., Cui D., 2009. Recent Advances in Nanotechnology Applied to Biosensors. *Sensors*, 9: 1033-1053.
- Zhang P., He Y., Ruan Z., Chen F. F., Yang J., 2012. Fabrication of Quantum Dots-Encoded Microbeads With a Simple Capillary Fluidic Device And Their Application For Biomolecule Detection. *Journal of Colloid and Interface Science*, 385: 8–14.
- Zhang Z.X., Zhao C.Z., 2013. Progress of Photoelectrochemical Analysis and Sensors. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 41: 436-444.
- Zhao G. C., Yin Z. Z., Wei X. W., 2005. Direct Electrochemistry of Cytochrome c on a Multi-Walled Carbon Nanotubes Modified Electrode and its Activity for the Reduction of H₂O₂. *Electrochemistry Communication*, 7: 256-260.
- Zhao J., Chen G., Zhu L., Li G., 2011. Graphene Quantum Dots-Based Platform For The Fabrication Of Electrochemical Biosensors. *Electrochem. Communications*, 13: 31-33.

- Zhao W.W., Xiong M., Li X.R., Xu J.J., Chen H.Y., 2014. Photoelectrochemical Bioanalysis: A Mini Review. *Electrochemistry Communications*, 38: 40-43.
- Zheng H., Zhou J., Zhang J., Huang R., Jia H., Suye S., 2009. Electrical Communication Between Electrode And Dehydrogenase By a Ferrocene-Labeled High Molecular-Weight Cofactor Derivative: Application to a Reagentless Biosensor. *Microchimica Acta*, 165:109–115.
- Zheng M., Cui Y., Li X.Y., Liu S.Q., Tang Z.Y., 2011. Photoelectrochemical Sensing of Glucose Based On Quantum Dot and Enzyme Nanocomposites. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 656: 167-173.
- Zhou D.M., Sun J.J., Chen H.Y., Fang H.Q., 2008. Electrochemical Polymerization Of Toluidine Blue and Its Application For The Amperometric Determination of D-Glucose. *Electrochim. Acta*, 43: 1803-1809.
- Zhu L., Yang R.J., Jiang X., Yang D., 2009. Amperometric Determination of NADH at a Nile Blue/Ordered Mesoporous Carbon Composite Electrode. *Electrochemistry Communications*, 11: 530–533.
- Zhu J., Wu X.Y., Shan D., Yuan P.X., Zhang X.J., 2014. 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.



EKLERİ

Photoelectrochemical glucose biosensor based on a dehydrogenase enzyme and NAD⁺/NADH redox couple using a quantum dot modified pencil graphite electrode†



Bensu Ertek, Cahit Akgül and Yusuf Dilgin*

A simple, disposable and economical modified electrode was prepared by electrodeposition of hybrid quantum dots (ZnS–CdS) onto a pencil graphite electrode (PGE) surface and subsequent immobilization of glucose dehydrogenase (GDH) onto the quantum dot modified electrode (GDH/ZnS–CdS/PGE). The prepared electrode was effectively used for the photoelectrochemical determination of glucose in a flow injection analysis (FIA) system using a new home-made flow cell which was designed for PGEs for the first time. Results from the cyclic voltammetric and FI amperometric measurements revealed that the GDH/ZnS–CdS/PGE is capable of signaling photoelectrocatalytic activity involving NADH when the surface of the GDH/ZnS–CdS/PGE is irradiated with a light source with a fiber optic cable (250 W halogen lamp). The currents of NADH produced by the enzymatic reaction in the photoamperometric FIA system under optimized conditions (carrier stream: 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.0) containing 1.0 M KCl and 10.0 mM NAD⁺, applied potential: +0.8 V vs. Ag/AgCl/KCl_(sat)); flow rate: 0.6 mL min⁻¹, sample loop: 100 µL; transmission tubing length: 10 cm) were linearly correlated with the glucose concentration. Calibration curves were obtained for glucose concentrations within a range from 0.2 to 8.0 mM. The detection limits were found to be 0.09 and 0.05 mM for the amperometric and photoamperometric methods, respectively. The relative standard deviations ($n = 7$) for 0.5 mM glucose were 4.5% and 3.5% from the photoamperometric and amperometric results respectively. The photoelectrochemical biosensor was applied to real samples successfully. The results with this biosensor showed good selectivity, repeatability and sensitivity for monitoring glucose in amperometric and photoamperometric FIA studies.

Received 2nd December 2015
Accepted 24th January 2016

DOI: 10.1039/c5ra25673a

www.rsc.org/advances

Introduction

Semiconductor quantum nanoparticles (QNPs) have received great attention in electrochemical and optical sensor/biosensor studies due to their special electronic and photophysical properties, such as broad adsorption, narrow emission and a high quantum yield.^{1–5} Especially, an increasingly growing area of electrochemical sensing studies is the construction of photoelectrochemical sensors/biosensors based on quantum dot (QD) modified electrodes, which exhibit a powerful way to detect chemical/biochemical molecules compared to other sensor types.^{1,2} The reasons for this can be explained from some significant advantages of QD-based photoelectrochemical sensors such as a fast response, remarkable sensitivity, the simple, cheap and portable design of the sensor system, easy

integration, extension to light addressable sensors *etc.*^{2,6,7} Photoelectrochemical sensor operations consist of a number of steps: (i) immobilization of QDs onto an electrode, (ii) illumination of the electrode surface and (iii) generation of a photocurrent, which depends on the type and concentration of the respective analyte in the supporting electrolyte. When the QD modified electrode surface is illuminated using a light source, photoexcitation of the semiconductor quantum dots yields electron–hole pairs in the conduction- and valence-band levels. If the electrons of the electrode transfer to a hole in the valence band of the QDs and the electrons in the conduction band transfer to electron acceptors (oxidant molecules) in the surrounding solution simultaneously, a cathodic photocurrent is thus generated. On the contrary, if the electrons of the conduction band transfer to the electrode and at the same time electron donors in the solution transfer their electrons to a hole in the valence band, an anodic photocurrent is generated. If the analytes behave as electron donors/acceptors or react with the electron donors/acceptors in the solution, the photocurrent of the electrode can be monitored using the analyte concentration.

Çanakkale Onsekiz Mart University, Science and Art Faculty, Department of Chemistry, 17020 Çanakkale, Turkey. E-mail: ydilgin@yahoo.com; ydilgin@comu.edu.tr; Fax: +90 2862180533; Tel: +90 2862180018

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5ra25673a

Based on this principle, many electrochemical/ photoelectrochemical sensors and biosensors have been developed for the sensitive detection of biological, environmentally important molecules.^{2,6,7}

One of the important applications of semiconductor nanoparticles is in the photoelectrocatalytic oxidation of NADH,^{8–13} and the construction of enzyme based electrochemical and photoelectrochemical biosensors dependent on the NAD⁺/NADH redox couple and dehydrogenase enzymes.^{11–14} Moreover, recently core-shell QDs or QNPs, such as CdS-ZnS and CdSe-CdS, or hybrid nanomaterials such as carbon nanotube-QDs or -QNPs, graphene-QDs or -QNPs *etc.* have been preferred instead of using only QDs or a nanomaterial in the electrochemical studies.^{2,8–14} Core-shell QDs or hybrid nanomaterials have better charge separation than using a single QD or nanomaterial and therefore they are ideal candidates for sensing and biosensing applications due to their high quantum yield, photostability for photoelectrochemical studies, extremely large surface-to-atom ratio and sensitivity to surface ligands.^{2,15–17} For example, dopamine sensitized nanoporous TiO₂ on an indium tin oxide (ITO) electrode,⁸ a poly(4,4'-diaminodiphenyl sulfone)/ nano TiO₂ composite film modified ITO electrode⁹ and a graphene-TiO₂ nanohybrid modified glassy carbon electrode (GCE)¹⁰ have been successfully used for the photoelectrochemical sensing is more sensitive than electrochemical sensing for the detection of NADH and also glucose using the proposed nanocomposite electrodes. In another study, CdSe/ZnS hybrid QDs modified onto a gold electrode by chemisorption *via* benzene dithiol were used for photoelectrochemical sensing of NADH and also glucose.¹³ The current signal was triggered by illumination of the electrode surface.

In this study, a ZnS-CdS hybrid QNP modified pencil graphite electrode (PGE) is proposed for photoelectrochemical sensing of NADH and glucose for the first time. When compared with other carbon based electrodes, PGEs have the same advantages such as high electrochemical reactivity, commercial availability, good mechanical rigidity, disposability, a lower cost, a lower level of technology, and ease of modification.^{18–30} It has been reported that the pencil lead electrodes offer a renewable surface which is simpler and faster to achieve than polishing procedures, common with solid electrodes, and provides useful and reproducible results for the individual surfaces.¹⁸ Thus PGEs have been extensively used in various electroanalytical studies due to the useful properties of PGEs.^{18–30} In addition, a novel part of this study is that the photoelectrochemical biosensing of glucose using glucose dehydrogenase (GDH) immobilized onto the ZnS-CdS/PGE was performed in a FIA system by using a new home-made photoelectrochemical flow cell which was designed for PGEs for the first time. According to a search of the literature,

photoelectrochemical biosensing of glucose in a FIA system using GDH immobilized onto a QD modified PGE has not been reported yet, although a ZnS-CdS modified PGE has been used for the electrochemical biosensing of glucose based on glucose oxidase (GOD) enzymes in a FIA system by using a new home-made photoelectrochemical flow cell.³¹ The superior aspect of the proposed study is the construction of a photoelectrochemical biosensor for a FIA system using a GDH modified PGE compared with the study of ref. 31, in which only an electrochemical biosensor was constructed. Thus, this study uses a combination of QDs, PGEs, photoelectrochemistry and FIA for photoelectrochemical biosensing of glucose, which offers some advantages such as (i) a disposable, practical, easy-to-use and low cost biosensor due to the useful properties of PGEs, (ii) fast and economic analysis (FIA exhibits fast analysis and a lower cost because of lower consumption of the reactant) and (iii) very good immobilization of GDH, resulting in the construction of a photoelectrochemical biosensor with good selectivity and sensitivity due to the unique functions of QDs and advantages of photoelectrochemistry.

Results and discussion

Characterization of the CdS-ZnS/MAA/PGE

circle diameter for the pretreated bare PGE (about 222 ohm, Fig. 1B-A) was very small, indicating that charge transfer was relatively facile at the bare electrode. However, the R_{ct} value slightly increased after CdS (about 600 ohm, Fig. 1B-B) and also CdS-ZnS (about 900 ohm, Fig. 1B-C) were modified onto the PGE surface, indicating that the CdS and also the ZnS on the PGE surface decreased the electron transfer rate between the redox probe and the electrode surface. QDs have semiconductor properties and their conductivities are lower than that of the bare PGE. These results indicated that CdS and ZnS were electrochemically precipitated onto the pretreated PGE surface.

Cyclic voltammograms of each electrode were also recorded in 10.0 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{3-/4-} containing 0.10 M KCl (Fig. 1A). It can be seen that the anodic (+0.288 V) and cathodic (+0.156 V) peaks of the Fe³⁺/Fe²⁺ redox couple recorded with the bare PGE were clear and sharp. The anodic peak potentials of the QD modified electrodes were shifted to more positive values (+0.350 V and +0.355 V for the CdS/PGE and CdS-ZnS/MAA/PGE respectively), while the cathodic peak potentials were shifted to more negative values (+0.140 V for both the CdS/PGE and CdS-ZnS/MAA/PGE). Also, the peak currents of each electrode were decreased compared with the bare PGE. The shifting of the peak potentials can be attributed to the semiconductor surface properties of QDs.

The surface morphologies of the bare pretreated PGE, CdS/MAA/PGE and CdS-ZnS/MAA/PGE were also examined with

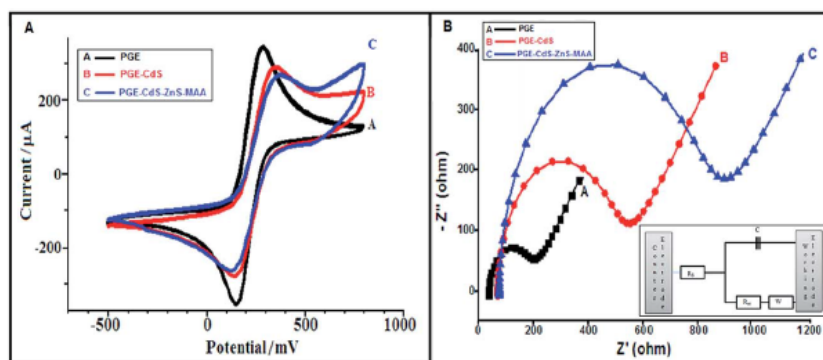


Fig. 1 (A) Cyclic voltammograms (scan rate: 50 mV s^{-1}), and (B) electrochemical impedance spectra of the modified electrodes in 0.1 M KCl containing $10.0 \text{ mM K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. (Inset: electrochemical impedance circuit model and representative faradaic signal. R_s , solution resistance; R_{ct} , charge transfer resistance; C , capacitance; W , Warburg impedance).

scanning electron microscopy (SEM). Fig. 2B and C show SEM images of the CdS/MAA/PGE and CdS-ZnS/MAA/PGE, respectively, which are different from that of the pretreated PGE (Fig. 2A). A generally porous structure was observed from the SEM images of the CdS/MAA/PGE and CdS-ZnS/MAA/PGE, and a number of spongy sites were evident for the formation of the QDs. Although the ZnS-CdS was coagulated, interpretable results were obtained for the glucose biosensor tests.

Oxidation of NADH at the CdS-ZnS/MAA/PGE

Before obtaining the response of the enzyme immobilized electrode in the biosensing of glucose, electrochemical oxidation of NADH at the QD modified PGE was investigated, due to its significance both as a cofactor for the dehydrogenase enzyme and as having a role in the electron transfer chain in biological systems, and also due to the need to develop a biosensor dependent on the NAD^+/NADH redox couple and dehydrogenase enzymes. To check the electrochemical characteristics of the modified electrode toward the oxidation of NADH, cyclic voltammograms of the bare PGE and QD modified PGE were recorded with/without irradiation of the electrode surface in the absence and presence of 2.0 mM NADH (Fig. S1 and S2†). In the cyclic voltammograms of the pretreated PGE in the absence of NADH, no peaks were observed and irradiation of the electrode surface did not affect the voltammogram (inset of Fig. S1†). However, the cyclic voltammogram of the CdS-ZnS/PGE in pH

7.0 PBS changed with irradiation of the electrode surface (inset of Fig. S2†). Moreover, NADH was oxidized at about $+520 \text{ mV}$ (Fig. S1-1†) and $+500 \text{ mV}$ (Fig. S2-1†) at the bare PGE and CdS-ZnS/PGE, respectively. While a small increment in the oxidation peak current of NADH was observed with irradiation of the electrode surface (Fig. S1-2†) for the bare PGE, the peak current increased significantly (approximately from $16 \mu\text{A}$ (without light) to $58 \mu\text{A}$ (under irradiation, Fig. S2-2†)) for the CdS-ZnS/PGE. Therefore it can be said that the CdS-ZnS/PGE showed photoelectrocatalytic effects in the oxidation of NADH, due to an increase of the peak current, even though acceptable shifting of the oxidation potential was not observed.

In order to obtain the best amperometric and photoamperometric response of the CdS-ZnS/PGE towards NADH using a FIA system, the effect of the applied potential and flow rate on the current of 0.10 mM NADH was investigated by recording current-time curves. The results are presented in Fig. S3 to S5† with plots of peak current versus applied potential and flow rate. From the optimization studies, the most suitable applied potential, flow rate, sample volume, and transmission tube length were determined as $+600 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$, 1.75 mL min^{-1} , $100 \mu\text{L}$, and 10 cm , respectively. Plots of both the amperometric and photoamperometric current vs. various concentrations of NADH were recorded using the CdS-ZnS/PGE using these optimum conditions. Fig. S6† shows the current-time curves for the amperometric and photoamperometric FIA

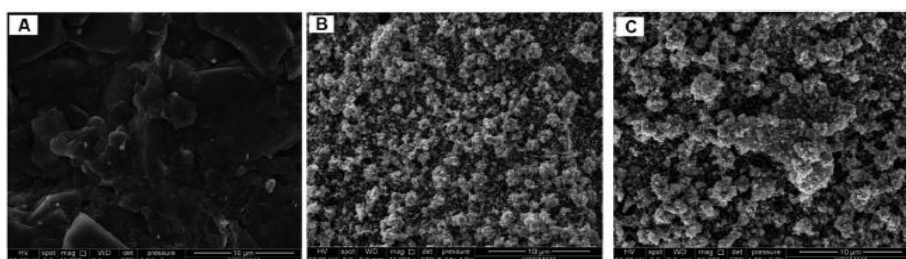


Fig. 2 SEM images of the (A) bare PGE, (B) CdS/MAA/PGE, and (C) CdS-ZnS/MAA/PGE.

responses to various concentrations of NADH. Although the peak current increased depending on the NADH concentration for both the amperometric and the photoamperometric methods, the responses from the photoamperometric method were higher than that from the amperometric for all concentrations. The inset of Fig. S7† shows a plot of catalytic current vs. NADH concentration. From this figure, a linear relationship between the NADH concentration and the peak current was obtained over the concentration range 8.0×10^{-7} to 8.0×10^{-5} M using the amperometric and also the photoamperometric FIA method, with the CdS–ZnS/PGE. The linearity of these methods is described by the equation $I (\mu\text{A}) = 21.11C (\text{mM}) + 0.075$, $R^2 = 0.9997$ and $I (\mu\text{A}) = 38.99C (\text{mM}) + 0.058$, $R^2 = 0.9991$ for the amperometric and photoamperometric studies, respectively, where I is the peak current, C is the NADH concentration, and R is the regression coefficient. If these equations are compared in terms of their slopes, it is obvious that the sensitivity of the photoelectrocatalytic FIA procedure is better than that of the amperometric method and the extent of the improvement is about two fold.

Biosensing of glucose at the GDH/CdS–ZnS/MAA/PGE

Firstly, the electrochemical and photoelectrochemical responses of the dehydrogenase immobilized PGE (GDH/PGE without CdS–ZnS) toward glucose were investigated using cyclic voltammetry. Cyclic voltammograms of the GDH/PGE were recorded using 0.10 M PBS (pH 7.0) containing 0.10 M KCl and 10.0 mM NAD⁺ in the absence and in the presence of 40 mM glucose at a 20 mV s⁻¹ scan rate (Fig. 3A). In the first voltammogram (Fig. 3A-a), an irreversible peak was observed at about 720 mV for the GDH/PGE, which was attributed to oxidation of enzymatically produced NADH to NAD⁺ (reactions 1

and 2). When the electrode surface was irradiated with the light source, the peak current increased a little (Fig. 3A-b).

Cyclic voltammograms of the GDH/CdS–ZnS/MAA/PGE in the absence and in the presence of 40 mM glucose are also shown in Fig. 3. It can be seen that no peak was observed (Fig. 3B-a1) in the absence of glucose, however the capacitive current was changed very little by irradiation of the electrode surface (Fig. 3B-a2). In the presence of 40 mM glucose, oxidation of the NADH, which was formed from enzymatic reactions between NAD⁺ and glucose catalyzed by GDH, was observed at about 720 mV (Fig. 3B-b1). When the surface of the GDH/CdS–ZnS/MAA/PGE was irradiated (Fig. 3B-b2), the irreversible peak current was significantly increased. These results show that the GDH/CdS–ZnS/PGE can be successfully used for photoelectrochemical biosensing of glucose, due to an increase of the oxidation peak current under irradiation of the electrode surface, even though acceptable shifting of the oxidation potential was not observed.

After the cyclic voltammetric studies, photoelectrochemical biosensing of glucose was also investigated using an amperometric technique and a FIA system. In order to obtain the best amperometric and photoamperometric response of the GDH/

CdS–ZnS/MAA/PGE toward glucose in the FIA system, the effect of the applied potential and flow rate on the current for 0.5 mM glucose containing 10.0 mM NAD⁺ and 1.0 M KCl was investigated by recording the diagrams that are presented in Fig. S8 to S10† and plots of peak current *versus* applied potential and flow rate. The best currents for electrocatalytic and photoelectrocatalytic oxidation of NADH produced by enzymatic reactions of glucose in the FIA system were found at about 800 mV. In addition, the current values obtained from the photoamperometric method were about 50 to 40% higher than that

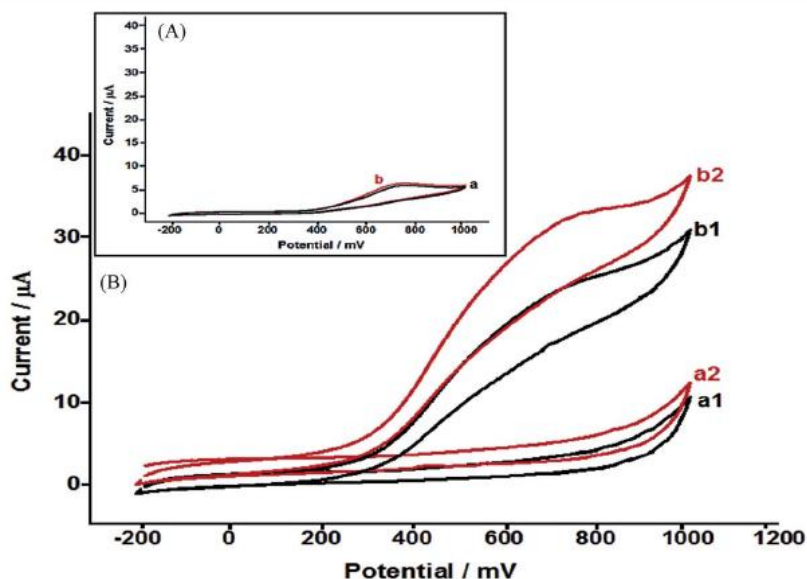


Fig. 3 Cyclic voltammograms of the GDH/CdS–ZnS/MAA/PGE in the absence (a1 and a2) and in the presence of 40 mM glucose (b1 and b2). (a1 and (b1): without light, (a2) and (b2): with light. (Inset: cyclic voltammograms of the GDH/PGE in the presence of 40 mM glucose (a): without light, (b): with light). Supporting electrolyte: 0.10 M PBS (pH 7.0) containing 0.1 M KCl and 10.0 mM NAD⁺, scan rate: 20 mV s⁻¹.

obtained from the amperometric method. Thus an applied potential of 800 mV was selected as the optimum potential value. The maximum peak current was observed at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹, since the biosensors and photoelectrochemical biosensors had enough time for the occurrence of the enzymatic reaction and also photoexcitation of the mediator at a low flow rate. The peak current decreased on increasing the flow rate to more than 0.6 mL min⁻¹. Thus, a flow rate of 0.6 mL min⁻¹ was selected as the optimum flow rate even though the sample frequency is very low.

To establish that a reliable analytical response could be achieved for glucose, under the optimized conditions using a GDH/CdS-ZnS/MAA/PGE, a calibration study was carried out over a range of 0.2 mM to 30 mM glucose concentration, with two injections of each concentration being made *via* a 100 μ L sample loop. Fig. 4 shows the diagrams for the amperometric and photoamperometric FI responses to the various concentrations of glucose. Although the peak current increased depending on the glucose concentration for both the amperometric and the photoamperometric methods, the responses of the photoamperometric method were higher than those of the amperometric for all concentrations.

Fig. 5A shows a plot of catalytic current *versus* glucose concentration. From this figure, a linear relationship between the glucose concentration and the peak current was obtained over the concentration range from 0.2 to 8.0 mM glucose for both the photoamperometric and amperometric FIA method with the glucose biosensor (Fig. 5B). The linearity of these methods is described by the equations $I (\mu\text{A}) = 0.118C (\text{mM}) +$

0.052 , $R^2 = 0.9923$, and $I (\mu\text{A}) = 0.245C (\text{mM}) + 0.089$, $R^2 = 0.9971$ for the amperometric and photoamperometric studies, respectively, where I is the peak current and C is the concentration of glucose. If these equations are compared in terms of their slopes, it is clear that the sensitivity of the photoelectrocatalytic FIA procedure is better than that of the amperometric method and the extent of the improvement is about 2.0 fold.

The limit of detection (LOD) was calculated as 0.09 mM and 0.05 mM glucose for the amperometric and photoamperometric glucose biosensors, respectively, based on $3s_b/m$ where s_b is the standard deviation of the blank response and m is the slope of the calibration curve.

The precision of the electrochemical and photoelectrochemical biosensors was investigated by performing 7 repeat injections of a 0.5 mM glucose solution. The RSD for the electrochemical and photoelectrochemical biosensors was calculated to be 3.5% and 4.5% respectively. These results indicate that the GDH/CdS-ZnS/MAA/PGE has a very good repeatability for electrochemical and photoelectrochemical biosensing of glucose.

Interference studies

The effects of common interfering species such as ascorbic acid (AA), uric acid (UA), dopamine (DA), L-cysteine (L-Cyst), galactose, saccharose and glutamic acid, which may affect the response of the electrode, were investigated. The amperometric responses of the GDH/CdS-ZnS/MAA/PGE using the FIA system under the optimized conditions toward glucose (0.5 mM) were

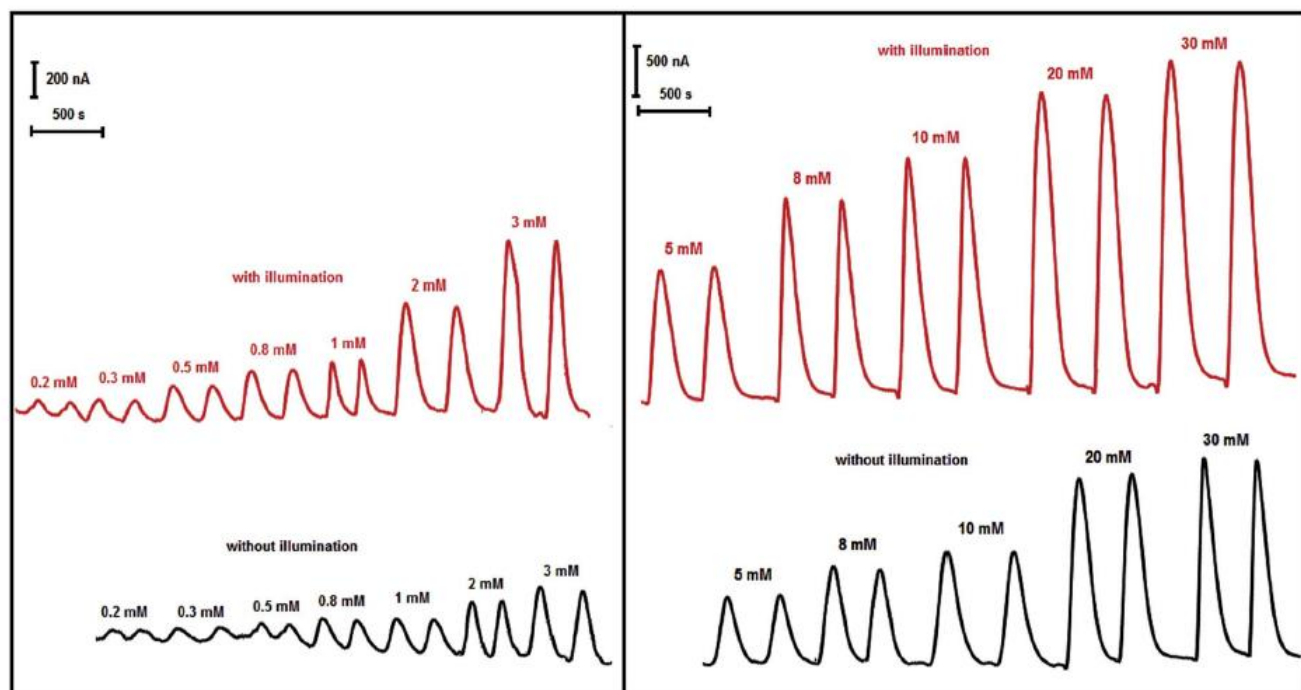


Fig. 4 Current–time diagrams using glucose of different concentrations with the GDH/CdS–ZnS/MAA/PGE and the FIA system for the amperometric and photoamperometric methods. (Carrier stream: 0.1 M PBS (pH 7.0) containing 1.0 M KCl and 10 mM NAD⁺, applied potential: +0.8 V; flow rate: 0.6 mL min⁻¹, sample loop: 100 μ L; transmission tubing length: 10 cm).

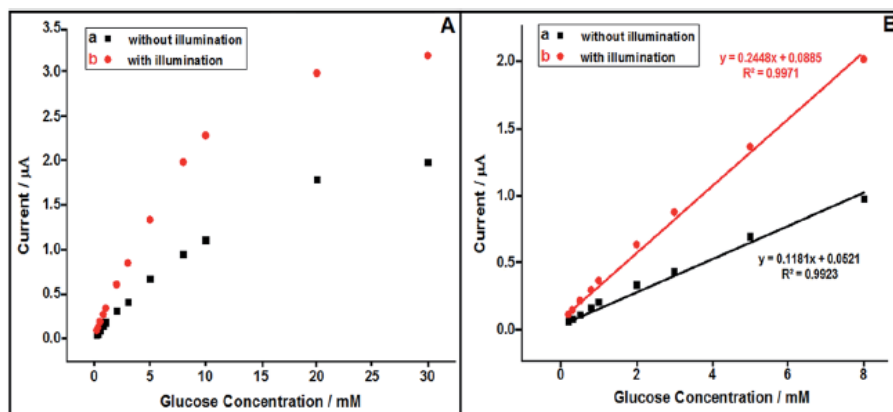


Fig. 5 (A) The curve of the catalytic current vs. the concentration of the injected glucose solution for the amperometric (a) and photoamperometric (b) methods. (B) Calibration curve of peak current versus glucose concentration.

recorded in the presence of these interfering species. The experimental results showed that no significant change in the oxidation peak current could be observed for saccharose, glutamic acid (one hundred fold higher than glucose) and galactose (ten fold higher than glucose) (data not shown), which shows a good selectivity of the enzyme electrode in the presence of other monosaccharides and also disaccharides. However, equimolar amounts of AA, DA, UA and L-Cyst to the glucose concentration showed serious interference (increase of the oxidation current), because their oxidation potentials are close to that of NADH. It has been reported that the interference of AA can be eliminated and the biosensor selectivity towards glucose enhanced by using Nafion as an outer layer coated on the biosensor surface^{33,34} or by using ascorbate oxidase. Another possible way of removing the interfering effect of all these compounds is that a very small amount of lead(IV) acetate as an oxidizing agent can be added to the Nafion layer, which causes preoxidation reactions of these interfering compounds before they reach the electrode surface.³⁵

Real sample analysis

One real sample (a commercial dextrose solution) and spiked serum samples were used for the determination of glucose at the GDH/CdS-ZnS/MAA/PGE as described in the literature.^{36,37} For this, 250 μL samples of the serum were diluted to 5.0 mL with 0.1 M PBS (pH 7.0) containing 10 mM NAD^+ and 1.0 M KCl. Glucose detection was performed by spiking a known volume and concentration of a glucose standard solution into the diluted serum samples in order to obtain various target concentrations, and then by measuring the amperometric and photoamperometric response of the electrode using the FIA system. For determination of the glucose in the commercial dextrose solution (containing 5% glucose), it was diluted 555 times (about 0.5 mM glucose) with 0.1 M PBS (pH 7.0) containing 10 mM NAD^+ and 1.0 M KCl. Glucose detection was also performed for this sample as described for the spiked serum samples. The results of the recovery tests are given in Table 1. It can be seen that acceptable recoveries were obtained for the

spiked glucose in serum plasma and the commercial dextrose solution samples.

Experimental

Chemicals

Glucose dehydrogenase (from *Pseudomonas* sp. 338.7 U mg^{-1}), β -nicotinamide adenine dinucleotide sodium salt (from *Saccharomyces cerevisiae*, $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{NaO}_{14}\text{P}_2$, NaNAD^+ , MW: 685.41 g mol^{-1}), bovine serum albumin (BSA), glutaraldehyde (GA, d : 1.061 g mL^{-1} , MW: 100.12 g mol^{-1} , 25% w/w in water), D-(+)-glucose, reduced β -nicotinamide adenine dinucleotide disodium salt (MW: 709.40 g mol^{-1} $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{Na}_2\text{O}_{14}\text{P}_2$, NADHNa_2), KCl, H_3PO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , CH_3COOH , NaOH, HCl, mercapto acetic acid (MAA), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, ZnCl_2 , the sodium salt of EDTA and $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ were supplied by Merck, Sigma or Carlo Erba.

Stock solutions of glucose (1.0 M) and NAD^+ (0.01 M) were freshly prepared with deionized water daily. A stock solution of NADH (5.0×10^{-2} M) was prepared daily using a pH 7.0 phos-

phate buffer solution (PBS). The concentration of NADH in the diluted solutions was checked using a Perkin Elmer Lambda 35 UV-vis spectrometer. The absorbance of the solution was monitored at 340 nm, considering a molar extinction coefficient of 6600 $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$.³⁸

Apparatus

All the solutions were prepared with ultrapure water from an Elga Option Q7B water purification system (18.2 $\text{M}\Omega \text{ cm}$). All electrochemical experiments were carried out using an Autolab PGSTAT 128N potentiostat/galvanostat equipped with a FRA2 frequency response analyzer. A traditional three-electrode system was used with a platinum wire as the counter electrode, Ag/AgCl/ $\text{KCl}_{(\text{sat.})}$ as the reference electrode, and a PGE as the working electrode.¹⁹⁻²⁴ A pencil lead with a diameter of 0.5 mm (Ultra-Polymer, 2B) and a total length of 60 mm (Tombow, Japan), and a mechanical pencil model T 0.5 (Rotring, Germany), which was used as the holder for the pencil lead, were

Table 1 The results of glucose determination for spiked serum samples ($n = 3$) and a dextrose solution

Sample	Glucose (mM)	FIA amperometric			FIA photoamperometric		
		Found (mM)	Recovery	RSD%	Found (mM)	Recovery	RSD%
Spiked serum	0.25	0.24 ± 0.01	93	4.1	0.26 ± 0.01	101	3.7
	0.50	0.46 ± 0.05	91	9.4	0.51 ± 0.02	98	3.9
	0.75	0.77 ± 0.04	101	5.4	0.74 ± 0.015	98	2.0
Dextrose solution	As label claimed (5% = 277.5 mM)	255.5 ± 5.5	—	—	283 ± 5.4	—	—

purchased from a local bookstore. Electrical contact to the lead was obtained by wrapping a metallic wire round the metallic part of the holder. For each measurement, a total of 10 mm of lead (area of about 15.9 mm²) was immersed into the solution. Cyclic voltammograms and electrochemical impedance curves were recorded in a static cell while the amperometric experiments were performed in a FIA system. A new home-made photoelectrochemical flow cell for only PGEs, which was constructed from TEFLON, was used.³¹ The depth of the pencil lead in this flow cell was arranged as 10 mm. The pH values of the solutions were adjusted using a HI 221 Hanna pH-meter with a combined glass electrode (Hanna Instrument HI-1332). In order to perform the FIA experiments, an eight-channel Ismatec, Ecoline peristaltic pump with polyethylene tubing (0.75 mm i.d.) and a Rheodyne 8125 sample injection valve were used. In order to perform the photoelectrochemical experiments, a fiber optic illuminator with a 250 W halogen bulb and a Foi-5 Light Guide (Titan Tool Supply Inc., USA) was used to illuminate the electrode surface.

Preparation of the modified electrodes and the glucose biosensor

After the surface of the PGE was pretreated by applying a potential of +1.40 V for 60 s in the pH 7.0 PBS, ZnS–CdS was constructed on the PGE using an electrochemical precipitation method according to previous reports with small modifications.^{39,40} Briefly, the pretreated PGE was immersed 10.0 mm into pH 6.0 PBS containing 15.0 mmol L⁻¹ CdCl₂, 8.0 mmol L⁻¹ Na₂S₂O₃, 8.0 mmol L⁻¹ EDTA and 0.05 mmol L⁻¹ MAA, which was used for minimizing coagulation of the QDs,⁴¹ for electrochemical deposition with a deposition potential of -1.00 V vs. Ag/AgCl for 1000 s at 30 °C. After the CdS was prepared on the PGE, similarly, ZnS was prepared on the CdS/PGE using the same conditions but with 15 mmol L⁻¹ ZnCl₂. The modified electrode was designated as CdS–ZnS/MAA/PGE.

The GDH enzyme was immobilized onto the modified PGE using a cross-linking procedure. Typically, 1.0% bovine serum albumin (BSA) was first mixed with GDH (80.0 mg mL⁻¹ in PBS, pH 7.0) in a volume ratio of 1 to 1, and then 5 µL of this mixture was mixed with 4 µL of 20.0 mM glutaraldehyde (GA) as the cross linking reagent. The CdS–ZnS/MAA/PGE was immersed into the final solution for 1 h and then dried for 10 min at +4 °C. Finally, the obtained GDH/CdS–ZnS/MAA/PGE was stored at +4 °C.

Electrochemical procedure

In order to characterize the modified electrode, electrochemical impedance spectra of the bare and modified PGEs were recorded using pH 7.0 PBS containing 10.0 mM K₃Fe(CN)₆, 10.0 mM K₄Fe(CN)₆ and 0.10 M KCl at a formal potential of 180 mV with a frequency range of 10.000 to 0.05 Hz and a signal amplitude of 5 mV (Fig. 1). In addition, cyclic voltammograms were also recorded in pH 7.0 PBS containing 10.0 mM K₃Fe(CN)₆, 10.0 mM K₄Fe(CN)₆ and 0.10 M KCl between -0.5 and +0.8 V at 50 mV s⁻¹. The surface morphologies of the bare and modified PGEs were also examined by recording their scanning electron microscopy (SEM) images.

Electrochemical and also photoelectrochemical biosensing of glucose at the GDH/CdS–ZnS/MAA/PGE were investigated using cyclic voltammetric techniques. Firstly, a cyclic voltammogram of the GDH/CdS–ZnS/MAA/PGE was recorded using 0.10 M PBS (pH 7.0) containing 10.0 mM NAD⁺ in the potential range between -200 and 1000 mV versus Ag/AgCl at a scan rate of 20 mV s⁻¹ in the absence of glucose. To investigate the same conditions but in the presence of 40.0 mM glucose. Cyclic voltammograms were also recorded for a GDH immobilized bare PGE. Finally, photoelectrochemical biosensor studies were carried out under irradiation of the working electrode surface with a fiber optic illuminator with a 250 W halogen bulb.

Photoelectrochemical biosensor studies using the FIA system

Electrochemical and especially photoelectrochemical biosensor studies using the FIA system were performed using a home-made photoamperometric flow cell which was constructed for a PGE for the first time.³¹ In all FIA experiments, 0.10 M PBS (pH 7.0) containing 1.0 M KCl was used as the carrier solution. After the GDH/MAA/ZnS–CdS/PGE had been inserted into a flow cell, optimization studies for the GDH/CdS–ZnS/MAA/PGE were performed using the FIA system. After a steady-state background current was obtained under the optimum conditions (sample loop, flow rate, applied potential, length of tubing), glucose solutions of various concentrations containing 10.0 mM NAD⁺ were injected into the system (three successive injections) and current–time curves were recorded. Current–time curves were also recorded for the photoamperometric FIA study through irradiation of the electrode surface throughout the experiment. All the supporting electrolytes were deaerated by

allowing highly pure argon to pass through them for 5 min before the electrochemical experiments.

In order to show the practical applicability of the proposed biosensor, a real sample (commercial dextrose solution including 5% glucose) and a spiked serum sample were selected for the determination of glucose as described in the literature.^{36,37}

Conclusions

In this study, a constructed photoelectrochemical glucose biosensor dependent on the NAD⁺/NADH redox couple and GDH using a FIA system was proposed using an enzyme modified PGE. Although photoelectrochemical biosensors dependent on the NAD⁺/NADH redox couple–dehydrogenase enzymes have been reported,^{11–13,36,42} according to our search of the literature, the use of PGEs for photoelectrochemical biosensors using a FIA system had not yet been reported. The GDH/CdS–ZnS/MAA/PGE exhibited a good photoelectrocatalytic response for the detection of glucose and a linear relationship was obtained between 0.2 and 8.0 mM glucose with a detection limit of 0.05 mM. The sensitivity of the photoamperometric biosensor in the FIA system was improved by about two fold in comparison with that of the amperometric procedure. It can be concluded that the GDH/CdS–ZnS/PGE can be successfully used for photoelectrochemical biosensing of glucose due to an increasing of the oxidation peak current under irradiation of the

electrode surface even though the oxidation potential of the enzymatically produced NADH is very high (about –800 mV) and an acceptable shifting of the oxidation potential was not observed. In addition, the PGE was successfully used for photoelectrochemical biosensing of glucose in a FIA system by using a new home-made photoelectrochemical flow cell for the first time. As a result, a novel, fast and facile sensor was reported in this study, which is expected to offer new prospects for the development of cheap, sensitive, selective, disposable and faster photoelectrochemical biosensors in the future.

Acknowledgements

We thank The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK) for financial support (project number: 112T375).

References

- 1 G. M. Duran, A. M. Contento and A. Rios, *Curr. Org. Chem.*, 2015, 19, 1134.
- 2 Z. Yue, F. Lisdat, W. J. Parak, S. G. Hickey, L. Tu, N. Sabir, D. Dorfs and N. C. Bigall, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2013, 5, 2800.
- 3 Q. Ma and X. G. Su, *Analyst*, 2011, 136, 4883.
- 4 F. Wang and S. S. Hu, *Microchim. Acta*, 2009, 165, 1.
- 5 I. Willner, R. Baron and B. Willner, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22, 1841.
- 6 G. L. Wang, J. J. Xu and H. Y. Chen, *Sci. China, Ser. B: Chem.*, 2009, 52, 1789.
- 7 Z. X. Zhan and C. Z. Zhao, *Chin. J. Anal. Chem.*, 2013, 41, 436.
- 8 G. L. Wang, J. J. Xu and H. Y. Chen, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 24, 2494.
- 9 Y. Ho, A. P. Periasamy and S. M. Chen, *Sens. Actuators, B*, 2011, 156, 84.
- 10 K. Wang, J. Wu, Q. Liu, Y. Jin, J. Yan and J. Cai, *Anal. Chim. Acta*, 2012, 745, 131.
- 11 F. Jafari, A. Salimi and A. Navaee, *Electroanalysis*, 2014, 26, 1782.
- 12 F. Jafari, A. Salimi and A. Navaee, *Electroanalysis*, 2014, 26, 530.
- 13 K. Schubert, W. Khalid, Z. Yue, W. J. Parak and F. Lisdat, *Langmuir*, 2010, 26, 1395.
- 14 X. Q. Liu, R. Yan, J. Zhu, X. Huo and X. Wang, *Electrochim. Acta*, 2015, 173, 260.
- 15 X. Peng, M. C. Schlamp, A. V. Kadavanich and A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119, 7019.
- 16 J. Li, Y. A. Wang, W. Z. Guo, J. C. Keay, T. D. Mishima, M. B. Johnson and X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 12567.
- 17 F. Huang, F. Wang, S. Feng, Y. Li, S. Li and Y. Li, *J. Solid State Electrochem.*, 2013, 17, 1295.
- 18 J. Wang, A. N. Kawde and E. Sahlin, *Analyst*, 2000, 125, 5.
- 19 Y. Dilgin, B. Ertek, B. Kizilkaya, D. G. Dilgin and H. I. Gokcel, *Sci. Adv. Mater.*, 2012, 4, 920.
- 20 Y. Dilgin, B. Kizilkaya, B. Ertek, N. Eren and D. G. Dilgin, *Talanta*, 2012, 89, 490.
- 21 Y. Dilgin, B. Kizilkaya, D. G. Dilgin, H. İ. Gökçel and L. Gorton, *Colloids Surf., B*, 2013, 102, 816.
- 22 Y. Dilgin, B. Kizilkaya, B. Ertek, F. Işık and D. G. Dilgin, *Sens. Actuators, B*, 2012, 171–172, 223.
- 23 E. Dede, Ö. Sağlam and Y. Dilgin, *Electrochim. Acta*, 2014, 127, 20.
- 24 Z. O. Uygun and Y. Dilgin, *Sens. Actuators, B*, 2014, 188, 78.
- 25 A. N. Kawde, M. Aziz, N. Baig and Y. Temerk, *J. Electroanal. Chem.*, 2015, 740, 68.
- 26 S. Tajik, M. A. Taher, H. Beitollahi and M. Torkzadeh-Mahani, *Talanta*, 2015, 134, 60.
- 27 J. Zhu, X. Y. Wu, D. Shan, P. X. Yuan and X. J. Zhang, *Talanta*, 2014, 130, 96.
- 28 A. Ozcan and S. Ilkbas, *Sens. Actuators, B*, 2015, 215, 518.
- 29 K. K. Tadi, R. V. Motghare and V. Ganesh, *Electroanalysis*, 2014, 26, 2328.
- 30 E. Alipour, M. R. Majidi and O. Hoseindokht, *J. Chin. Chem. Soc.*, 2015, 62, 461.
- 31 Ö. Sağlam, B. Kizilkaya, H. Uysal and Y. Dilgin, *Talanta*, 2016, 147, 315.
- 32 I. I. Suni, *Trends Anal. Chem.*, 2008, 27, 604.
- 33 D. M. Kim, M. Y. Kim, S. S. Reddy, J. Cho, C. H. Cho, S. Jung and Y. B. Shim, *Anal. Chem.*, 2013, 85, 11643.
- 34 T. T. Baby, S. S. J. Aravind, T. Arockiadoss, R. B. Rakhi and S. Ramaprabhu, *Sens. Actuators, B*, 2010, 145, 71.
- 35 F. Pariente, F. Tobalina, G. Moreno, L. Hernandez, E. Lorenzo and H. D. Abruna, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 4065.
- 36 D. G. Dilgin and H. İ. Gökçel, *Anal. Methods*, 2015, 7, 990.
- 37 A. M. Vinu Mohan, K. K. Aswini, A. Maria Starvin and V. M. Biju, *Anal. Methods*, 2013, 5, 1764.

- 38 L. T. Kubota and L. Gorton, *Electroanalysis*, 1999, 11, 719.
- 39 C. Lu, X.-F. Wang, J. J. Xu and H. Y. Chen, *Electrochem. Commun.*, 2008, 10, 1530.
- 40 Z. Qian, H. J. Bai, G. L. Wang, J. J. Xu and H. Y. Chen, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, 25, 2045.
- 41 A. Salimi, R. Rahmatpanah, R. Hallaj and M. Roushani, *Electrochim. Acta*, 2013, 95, 60.
- 42 L. Deng, Y. Wang, L. Shang, D. Wen and F. Wang, *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 24, 951.





Contents lists available at ScienceDirect

Bioelectrochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioelechem



Photoamperometric flow injection analysis of glucose based on dehydrogenase modified quantum dots-carbon nanotube nanocomposite electrode

Bensu Ertek, Yusuf Dilgin*

Çanakkale Onsekiz Mart University, Science and Art Faculty, Department of Chemistry, 17020 Çanakkale, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 October 2015

Received in revised form 15 February 2016

Accepted 23 February 2016

Available online xxx

Keywords:

Glucose dehydrogenase

ZnS-CdS quantum dots

Flow injection analysis

Photoelectrochemical biosensor

NADH

Multiwalled carbon nanotube

ABSTRACT

In this work, a core-shell quantum dot (QD, ZnS-CdS) was electrodeposited onto multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode (ZnS-CdS/MWCNT/GCE) and following glucose dehydrogenase (GDH) was immobilized onto QD modified electrode. The proposed electrode (GDH/ZnS-CdS/MWCNT/GCE) was effectively used for the photoelectrochemical biosensing of glucose in flow injection analysis (FIA) system using a home-made flow cell. Results from cyclic voltammetric and FI amperometric measurements have revealed that GDH/ZnS-CdS/MWCNT/GCE is capable of signaling photoelectrocatalytic activity toward NADH when the surface of enzyme modified electrode was irradiated with a light source (250 W Halogen lamp). Thus, photoelectrochemical biosensing of glucose was monitored by recording current-time curve of enzymatically produced NADH at optimized conditions. The biosensor response was found linear over the range 0.010–2.0 mM glucose with detection limits of 6.0 and 4.0 μ M for amperometric and photoamperometric methods, respectively. The relative standard deviations ($n = 5$) for 0.5 mM glucose were 5.8% and 3.8% for photoamperometric and amperometric results, respectively. The photoelectrochemical biosensor was successfully applied to the real samples. The results with this biosensor showed good selectivity, repeatability and sensitivity for monitoring glucose in amperometric and photoamperometric FIA studies.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Recently, photoelectrochemical (PEC) sensors and biosensors, which uses light to induce electron transfer between photoelectrochemically active molecules, ions or materials and electrode for generating the detectable photocurrent signal, have been received considerable attention in analytical science and technology [1–24]. Because, PEC techniques have some significant advantages such as fast response, remarkable sensitivity, the design of simple, cheap and portable sensor system, easy integration, extension to light addressable sensors etc. [1–5]. As can be seen from previously published PEC sensor studies [1–24], organic material- and inorganic semiconductor nanoparticles-based PEC have been extensively used. Especially, semiconductor materials have found great attention due to their special electronic and photophysical properties, such as broad adsorption, narrow emission and high quantum yield [3,6–9,16–18,20–23]. Moreover, recently core-shell quantum dots (QDs) such as CdS-ZnS, CdSe-CdS or hybrid nanomaterial such as carbon nanotube-QDs, graphene-QDs etc. have been preferred instead of using

only a QD or a nanomaterial in the electrochemical studies [3,16–18,20–23]. Because core-shell QDs and hybrid nanomaterials submit better charge separation than a single QD and nanomaterial and therefore they are ideal candidates for photoelectrochemical sensor and biosensor applications due to their high quantum yield, photostability for photoelectrochemical studies, extremely large surface-to-atom ratio and sensitivity to surface ligands [3,25–27].

One of the important applications of PEC sensors is photoelectrocatalytic oxidation of NADH [12–18] and the construction of enzyme based photoelectrochemical biosensor dependent on NAD^+ /NADH redox couple and dehydrogenase enzymes [19–24]. Recently, many researchers have focused on hybrid nanomaterial modified electrodes for this aim [16–18,20–23]. For example, dopamine sensitized nanoporous TiO_2 on indium tin oxide (ITO) electrode [16], poly(4,4'-diaminodiphenyl) sulfone/nano TiO_2 composite film modified ITO electrode [17] and graphene- TiO_2 nanohybrids modified glassy carbon electrode (GCE) [18] have been successfully used for the photoelectrocatalytic oxidation of NADH under visible light irradiation. These studies reported that the sensitivity of electrochemical determination of NADH was improved by irradiation of electrode surfaces. In addition, Jafari et al. studied electrocatalytic and photoelectrocatalytic oxidation of NADH using reduced graphene

* Corresponding author.

E-mail addresses: ydilgin@yahoo.com, ydilgin@comuedu.tr (Y. Dilgin).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.02.008>

1567-5394/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article as: B. Ertek, Y. Dilgin, Photoamperometric flow injection analysis of glucose based on dehydrogenase modified quantum dots-carbon nanotube nanocomposite el., Bioelectrochemistry (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.02.008>

oxide/CdS-QDs/Poly-Nile Blue nanocomposite modified GCE [21] and electrogenerated chlorpromazine sulfoxide/graphene/CdS-QD/Ionic liquid modified GCE [22] and also photoelectrochemical sensing of glucose [21] and ethanol [22] using glucose dehydrogenase alcohol dehydrogenase immobilized onto nanocomposite modified electrode surface, respectively. They reported that photoelectrochemical sensor is more sensitive than electrochemical sensor for detection of NADH and also glucose and ethanol at proposed nanocomposite electrodes. In another study, CdSe/ZnS QDs modified onto gold electrode by chemisorption via benzene dithiol and proposed electrode was used for photoelectrochemical sensing of NADH and also glucose [20]. The current signal was triggered by irradiation of electrode surface. Liu et al. developed a photoelectrochemical lactate biosensor using lactic dehydrogenase/multiwalled carbon nanotube (MWCNT)-TiO₂ nanoparticle composite/ITO electrode [23]. They reported that the PEC biosensor showed superiority over the electrochemical biosensor in lactate detection, which could be attributed to the excellent biocompatibility and PEC performance of MWCNT-TiO₂ nanoparticle composite.

Although hybrid or composite nanomaterials have been successfully used for the construction of photoelectrochemical biosensor studies, according to our search of the literature, electrochemical biosensing of glucose in flow injection analysis (FIA) system depending on GDH immobilized onto QDs modified electrodes has not been reported, yet. Only one study has been reported for photoelectrochemical glucose biosensing in FIA system using poly-hematoxyline modified GCE [24] as well as a few studies have been published for photoelectrocatalytic oxidation of NADH in FIA system [13,14]. In this study, ZnS-CdS/MWCNT nanocomposite modified GCE was proposed for photoelectrochemical sensing NADH and glucose. The novel statement of this study is that photoelectrochemical biosensing of glucose at GDH immobilized ZnS-CdS/MWCNT/GCE were performed in FIA system by using a home-made photoelectrochemical flow cell which was designed for GCE in our previous studies [10,11,13,14,24]. Thus, this study proposes a combination of QDs, MWCNT, photoelectrochemistry and FIA for photoelectrochemical biosensing of glucose.

This offers advantages such as: i) a sensitive and selective biosensor due to the properties of MWCNT, ii) fast and economical analysis (FIA achieves faster analysis at reduced cost because of lower consumption of reactant), iii) superior immobilization of GDH and construction of a photoelectrochemical biosensor with good selectivity and sensitivity due to the unique functions of QDs and MWCNT, and iv) sensitivity of photoelectrochemistry.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Glucose dehydrogenase (from *Pseudomonas* sp. 338.7 U/mg), β -nicotinamide adenine dinucleotide sodium salt (from *Saccharomyces cerevisiae*, C₂₁H₂₆N₇NaO₁₄P₂, NaNAD⁺, MW: 685.41 g/mol), bovine serum albumin (BSA), glutaraldehyde (GA, d: 1.061 g/mL, MW: 100.12 g/mol, 25% w/w in water), D-(+)-glucose, reduced β -nicotinamide adenine dinucleotide disodium salt (MW: 709.40 g/mol C₂₁H₂₇N₇Na₂O₁₄P₂, NADHNa₂) KCl, H₃PO₄, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, CH₃OOH, NaOH, HCl, mercapto acetic acid (MAA), Na₂S₂O₃, ZnCl₂, sodium salt of EDTA and CdCl₂·2.5H₂O were supplied from Merck, Sigma or Carlo Erba, multiwalled carbon nanotube (MWCNT) was supplied from Dspens.

The stock solutions of glucose (1.0 M) and NAD⁺ (10.0 mM) were freshly prepared with deionized water daily. The stock solution of NADH (5.0 × 10⁻² M) was daily prepared in the pH 7.0 phosphate buffer solution (PBS). The concentration of NADH in the diluted solutions was checked by using a Perkin Elmer Lambda 35 UV-VIS Spectrometer. The absorbance of the solution was monitored at 340 nm considering a molar extinction coefficient of 6600 L/mol·cm [28].

2.2. Apparatus

All the solutions were prepared with ultrapure water from Elga Option Q7B water purification system (18.2 MΩ cm). All electrochemical experiments were carried out using an Autolab PGSTAT 128N Potentiostat/Galvanostat equipped with a FRA2 frequency response analyzer. A traditional three-electrode system was used with a platinum wire as the counter electrode, an Ag/AgCl/KCl_(sat.) as the reference electrode, and a MWCNT modified GCE as the working electrode. Cyclic voltammograms and electrochemical impedance curves were recorded in a static cell while amperometric experiments were performed in a FIA system. The home-made photoelectrochemical flow cell, which was constructed from TEFLON for GCE [10, 11, 13 14, 24], was used. The pH values of the solutions were adjusted using a HI 221 Hanna pH-meter with a combined glass electrode (Hanna Instrument HI-1332). In order to perform FIA experiments, an eight-channel Ismatec, Ecoline peristaltic pump with polyethylene tubing (0.75 mm i.d.), and a Rheodyne 8125 sample injection valve were used. In order to perform the photoelectrochemical experiments, a fiber optic illuminator 250 W halogen bulb with Foi-5 Light Guide (Titan Tool Supply Inc., USA) was used to illuminate the electrode surface. A Bandelin Sonorex RK 100H Ultrasonic bath was used for cleaning procedure of the GCEs before their modification.

2.3. Preparation of the modified electrodes and the glucose biosensor

GCE (3 mm diameter) were polished with 1.0-, 0.3- and 0.05- μ m alumina slurry, respectively. After rinsing thoroughly with deionized water, all polished GCEs were sonicated in absolute ethanol and deionized water for about 5 min., respectively. MWCNTs were functionalized by sonicating in a mixture of concentrated HNO₃ and H₂SO₄ (v/v 1:3) for 1 h followed by extensive washing in deionized water until – filtrate was neutral. Then, a suspension of 1.0 mg/mL MWCNT was prepared into DMF and 10.0 μ L of this suspension was dropped onto GCE and dried under IR lamp for 10 min. ZnS-CdS were electrodeposited onto MWCNT/GCE according to previous reports with small modifications [29,30]. Briefly, the MWCNT/GCE immersed into pH 6.0 PBS containing 15.0 mM CdCl₂, 8.0 mM Na₂S₂O₃, 8.0 mM EDTA and 0.05 mM MAA, which was used minimizing of coagulation of QDs [9], for electrochemical deposition with a deposition potential of – 1.00 V vs. Ag/AgCl for 1000 s at 30 °C. After CdS was prepared on MWCNT/GCE, similarly, the ZnS were prepared on CdS/MWCNT/GCE in the same conditions but in 15 mM ZnCl₂. The modified electrode will be hereafter designated as CdS-ZnS/MWCNT/GCE.

GDH enzyme was immobilized onto modified electrode by the cross-linking procedure. Typically, 1.0% BSA was mixed with GDH (20.0 mg/mL in PBS, pH 7.0) in a volume ratio of 1 to 1, and then 5.0 μ L of this mixture was mixed with 4.0 μ L of 20.0 mM glutaraldehyde as crosslinking reagent. CdS-ZnS/MWCNT/GCE was immersed into the final solution for 1 h and then dried for 10 min. at +4 °C. Finally, obtained GDH/CdS-ZnS/MWCNT/GCE was stored at +4 °C.

2.4. Electrochemical procedure

In order to characterize modified electrode, electrochemical impedance spectra of MWCNT/GCE and QD modified MWCNT/GCE were recorded in pH 7.0 PBS containing 10.0 mM K₃Fe(CN)₆, 10.0 mM K₄Fe(CN)₆ and 0.10 M KCl at the formal potential of 180 mV with a frequency, range of 150.000–1 Hz and a signal amplitude of 5 mV (Fig. 1). The surface morphologies of the bare GCE, MWCNT/GCE and QD modified MWCNT/GCE were also examined by recording their scanning electron microscope (SEM) images.

Electrochemical and also photoelectrochemical biosensing of glucose at GDH/CdS-ZnS/MWCNT/GCE were investigated using cyclic voltammetric techniques. Firstly, a cyclic voltammogram of

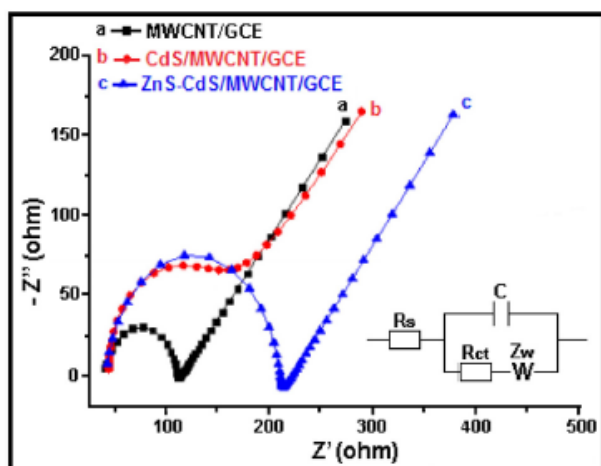


Fig. 1. Electrochemical impedance spectra of modified electrodes in 0.10 M KCl containing 10.0 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$. (Inset: Electrochemical impedance circuit model and representative faradaic signal. R_s , solution resistance; R_{ct} , charge transfer resistance; C, pure capacitance; W, Warburg impedance).

GDH/CdS-ZnS/MWCNT/GCE was recorded in 0.10 M PBS (pH 7.0) containing 10.0 mM NAD^+ in the potential range between -200 and 1000 mV vs. Ag/AgCl at a scan rate of 20 mV/s in the absence of glucose. To see the response of the biosensor toward glucose, cyclic voltammograms of modified electrodes were recorded under the same conditions but in the presence of 40.0 mM glucose. Cyclic voltammograms also were recorded for GDH immobilized onto MWCNT/GCE. Finally, photoelectrochemical biosensor studies were carried out under irradiation of the working electrode surface by a fiber optic illuminator with a 250 W halogen bulb.

2.5. Photoelectrochemical biosensor studies in the FIA system

Electrochemical and especially photoelectrochemical biosensor studies in FIA system were performed by using the home-made photoamperometric flow cell which was constructed for GCE and previous flow set up [10,11,13,14,24]. In all FIA experiments, 0.10 M PBS (pH 7.0) containing 1.0 M KCl was used as carrier solution. After GDH/ZnS-CdS/MWCNT/GCE had been inserted into the photoamperometric flow cell, the optimization studies were performed in FIA system. After a steady-state background current was obtained in optimum conditions (sample loop, flow rate, applied potential, length of tubing) the various concentrations of glucose including 10.0 mM NAD^+ were injected into the system (successive three injections) and the current-time curves were recorded. The current-time curves were also recorded for the photoamperometric FIA study by irradiation of the electrode surface throughout the experiment. All supporting electrolytes were deaerated by allowing highly pure argon to pass through for 5 min before the electrochemical experiments.

In order to show the practical applicability of the proposed biosensor, a real sample (commercial dextrose solution including 5% glucose) and a spiked serum sample were selected for determination of glucose as described in literature [24].

3. Results and discussion

3.1. Characterization of CdS-ZnS/MWCNT/GCE

Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) is a useful technique providing detailed information on the impedance changes of the electrode surface which give useful information about the modification of the electrode surfaces as well as using electrochemical sensing applications [31]. Therefore, EIS spectra of MWCNT/GCE, CdS/MWCNT/GCE and also ZnS-CdS/MWCNT/GCE were recorded in the dark in 10.0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ containing 0.10 M KCl (Fig. 1). While the semicircle diameter was about 450 Ω for bare GCE (data not shown), it was about 122 Ω for MWCNT/GCE (Fig. 1-a) indicating that the charge transfer was relatively facile at MWCNT modified GCE. However, the R_{ct} value slightly increased after CdS (about 180 Ω , Fig. 1-b) and also CdS-ZnS (about 210 Ω , Fig. 1-c) were modified on the MWCNT/GCE surface indicating that the CdS and also ZnS on the MWCNT/GCE surface decreased the electron transfer rate between the redox probe and the electrode surface. Because QDs have semiconductor properties and their conductivities are lower than that of MWCNT/GCE. These results indicated that CdS and ZnS was electrochemically precipitated MWCNT/GCE surface.

The surface morphologies of the bare GCE, MWCNT/GCE, CdS/MWCNT/GCE and ZnS-CdS/MWCNT/GCE were examined also with a scanning electronic microscope (SEM). Fig. 2B shows SEM image of the MWCNT/GCE, which was different from that of the bare GCE (Fig. 2A). Fig. 2C and 2D show SEM images of the CdS/MWCNT/GCE and ZnS-CdS/MWCNT/GCE, respectively which were different from that of the MWCNT/GCE (Fig. 2B). All SEM images show that the prepared quantum dots were regular in shape and uniformly distributed onto MWCNT/GCE surface, though ZnS-CdS were coagulated, interpretable results were obtained for glucose biosensor.

3.2. Oxidation of NADH at CdS-ZnS/MWCNT/GCE

Before response of enzyme immobilized electrode toward biosensing of glucose, the electrochemical oxidation of NADH at QDs modified MWCNT/GCE has been investigated due to its significance both as a co-factor for dehydrogenase enzyme and its role in the electron transfer chain in biological system and also due to the need develop biosensor dependent on $NAD^+/NADH$ redox couple and dehydrogenase enzymes. To check the electrochemical characteristic of modified electrode toward oxidation of NADH, cyclic voltammograms of the ZnS-CdS/MWCNT/GCE were recorded with/without irradiation of the electrode surface in the absence and presence of 2.0 mM NADH (Fig. 3). While the start potential of NADH oxidation was observed at -25 mV and -160 mV without and with illumination of electrode surface respectively, the peak potential was observed at $+80$ mV for both conditions

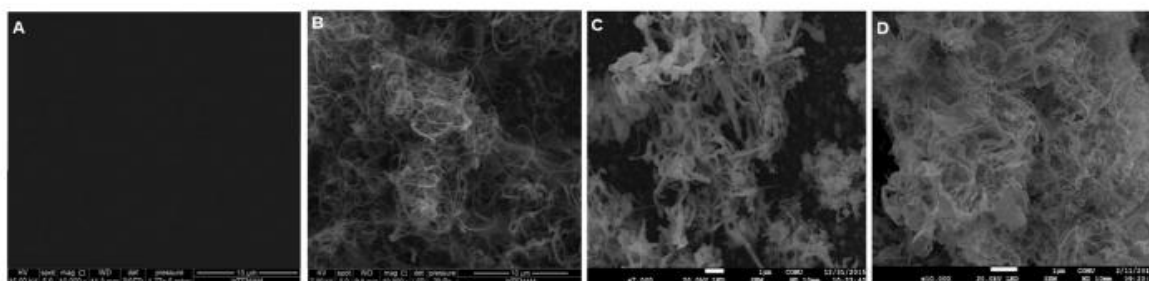


Fig. 2. SEM images of A) bare GCE, B) MWCNT/GCE, C) CdS/MWCNT/GCE D) ZnS-CdS/MWCNT/GCE.

Please cite this article as: B. Ertek, Y. Dilgin, Photoamperometric flow injection analysis of glucose based on dehydrogenase modified quantum dots-carbon nanotube nanocomposite e.l., Bioelectrochemistry (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.02.008>

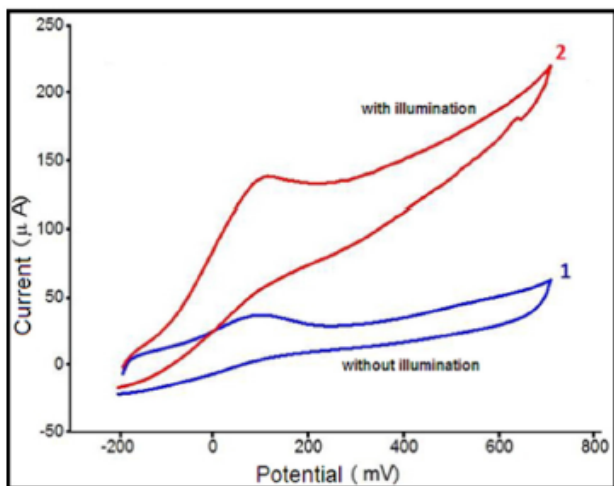


Fig. 3. Cyclic voltammograms of ZnS-CdS/MWCNT/GCE in the presence of 2.0 mM NADH. 1) without light, 2) with light. Supporting electrolyte: 0.10 M PBS (pH 7.0) containing 0.10 M KCl, scan rate: 20 mV/s.

(Fig. 3-1). Moreover, the peak current increased significantly under irradiation of electrode surface (Fig. 3-2). Therefore it can be said that ZnS-CdS/MWCNT/GCE showed a good photoelectrocatalytic effect toward the oxidation of NADH due to increasing of peak current.

After cyclic voltammetric experiments, both amperometric and photoamperometric currents vs. various concentration of NADH in FIA system were recorded in the optimized conditions (0.10 M PBS containing 1.0 M KCl (pH 7.0), applied potential: +150 mV; flow rate: 1 mL/min, sample loop: 100 µL; transmission tubing length: 10 cm) using home-made flow cell. Fig. 4 shows the current-time curves for the amperometric and photoamperometric FIA responses to various concentrations of NADH. Although the peak current was increased depending on NADH concentration for both the amperometric and the photoamperometric methods, the responses of the photoamperometric method were higher than that of the amperometric in all concentrations. A linear relationship between the NADH concentration and the peak current was obtained over the concentration range of 0.030–1.0 mM by the amperometric and also

photoamperometric FIA method, at the ZnS-CdS/MWCNT/GCE. The linearity of these methods is described by the equations $I(\mu\text{A}) = 20.26C(\text{mM}) + 0.17$, $R^2 = 0.9941$ and $I(\mu\text{A}) = 37.16C(\text{mM}) + 0.44$, $R^2 = 0.9976$ for amperometric and photoamperometric studies, respectively, where I is peak current, C is the NADH concentration, and R is the regression coefficient. As these equations are compared in terms of their slopes, it is obvious that the sensitivity of the photoelectrocatalytic FIA procedures better than that of the amperometric method and the ratio of improvement is at about 2 folds.

3.3. Biosensing of glucose at GDH/CdS-ZnS/MWCNT/GCE

Firstly, the electrochemical and photoelectrochemical responses of dehydrogenase immobilized onto ZnS-CdS/MWCNT/GCE toward glucose were investigated by cyclic voltammetry. Cyclic voltammograms of GDH/ZnS-CdS/MWCNT/GCE in the absence and in the presence of 40.0 mM glucose were shown in Fig. 5. It can be seen that no peak was observed (Fig. 5a) in the absence of glucose, however the capacitive current was changed very little under irradiation of electrode surface (Fig. 5b). In the presence of 40.0 mM glucose, the oxidation of the NADH, which was formed from enzymatic reaction between NAD^+ and glucose catalyzed by GDH, was observed at about 500 mV (Fig. 5c). When the surface of GDH/ZnS-CdS/MWCNT/GCE was irradiated (Fig. 5d), the irreversible peak current was significantly increased. These results show that GDH/ZnS-CdS/MWCNT/GCE can be successfully used for photoelectrochemical biosensing of glucose due to increasing of oxidation peak current of enzymatically produced NADH under irradiation of electrode surface even acceptable shifting in oxidation potential was not observed.

Photoelectrochemical biosensor mechanism for overall current was shown in Fig. 6. Photoelectrochemical sensors consist of some steps: i) immobilization of QD onto an electrode ii) illumination of electrode surface and iii) generation of photocurrent which depends on the type and concentration of the respective analyte in the supporting electrolyte. When QDs modified MWCNT/GCE surface is illuminated by a light source, photoexcitation of the semiconductor quantum dots yields an electron-hole pairs in the conduction- and the valence-band levels [3]. Electrons of conduction band transfer to MWCNT/GCE surface and at the same time electron donors in the solution (enzymatically produced NADH) transfer their electron to the hole of valence band and oxidized to NAD^+ , an anodic photoelectrocatalytic current is generated

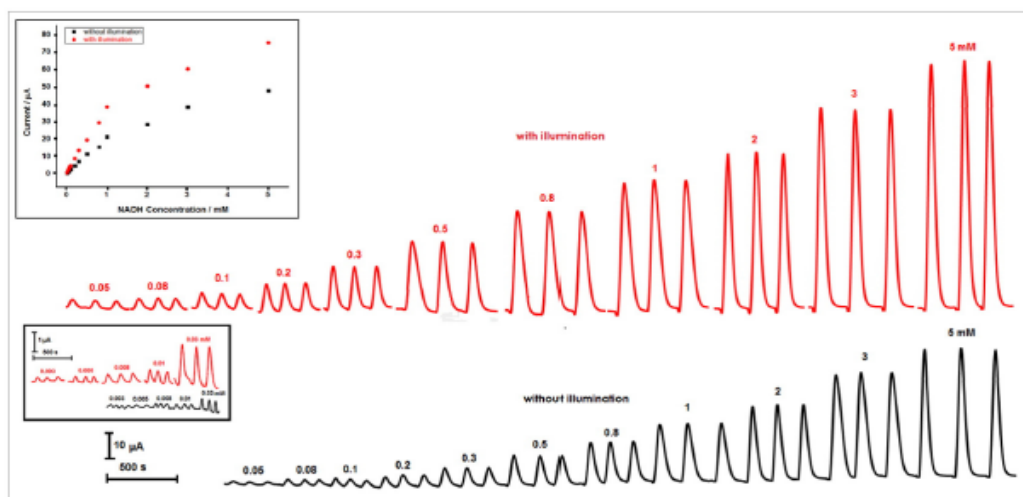


Fig. 4. Current-time curves of NADH with different concentrations using ZnS-CdS/MWCNT/GCE in FIA system for amperometric and photoamperometric methods. (Carrier stream: 0.10 M PBS (pH 7.0) containing 1.0 M KCl, Applied potential: +0.15 V; Flow rate: 1.0 mL/min, sample loop: 100 µL; transmission tubing length: 10 cm). Inset: Plot of peak current versus glucose concentration.

Please cite this article as: B. Ertek, Y. Dilgin, Photoamperometric flow injection analysis of glucose based on dehydrogenase modified quantum dots-carbon nanotube nanocomposite el..., Bioelectrochemistry (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.02.008>

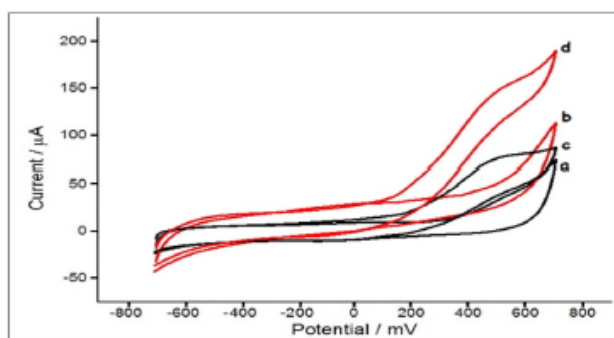


Fig. 5. Cyclic voltammograms of GDH/ZnS-CdS/MWCNT/GCE in the absence (a, b) and in the presence of 40.0 mM glucose (c, d). a and c: without light, b and d: with light. (Supporting electrolyte: 0.10 M PBS (pH 7.0) containing 0.10 M KCl, 10.0 mM NAD^+ scan rate: 20 mV/s.

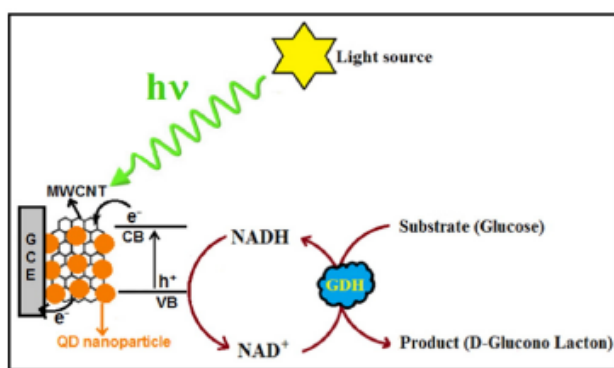


Fig. 6. Schematic representation of the photoelectrochemical glucose biosensor at GDH/ZnS-CdS/MWCNT/GCE.

dependent on glucose concentration. Same mechanism was also presented for glucose, alcohol and lactate biosensor based on dehydrogenase enzyme, NADH/NAD^+ redox couple and quantum dot nanocomposite electrode [21–23].

After cyclic voltammetric studies, photoelectrochemical biosensing of glucose was also investigated using amperometric technique in FIA system. To establish that a reliable analytical response could be achieved for the glucose, under optimized conditions (Carrier stream: 0.10 MPBS containing 1.0 M KCl (pH 7.0), applied potential: +400 mV; flow rate: 0.6 mL/min, sample loop: 100 μL ; transmission tubing length: 10 cm) using a GDH/ZnS-CdS/MWCNT/GCE, a calibration study was carried out over the range from 0.010 mM to 2.0 mM glucose concentration, with two injections of each concentration. Fig. 7 shows the diagrams for amperometric and photoamperometric FI responses to various concentrations of glucose. Although the peak currents increased depending on glucose concentration for both the amperometric and the photoamperometric methods, the responses of photoamperometric method were higher than those of amperometric in all concentrations. A linear relationship between the glucose concentration and the peak current was obtained over the concentration range from 0.010 to 2.0 mM glucose for both the photoamperometric and amperometric FIA method at the glucose biosensor. The linearity of these methods were described by the equations $I(\mu\text{A}) = 2.57C(\text{mM}) + 0.033$, $R^2 = 0.9971$, and $I(\mu\text{A}) = 7.80C(\text{mM}) + 0.049$, $R^2 = 0.9985$ for amperometric and photoamperometric studies respectively, where I is the peak current and C is the concentration of glucose. When these equations are compared in terms of their slopes, it is clear that the sensitivity of the photoelectrocatalytic FIA procedure is better than that of the amperometric method and the ratio of improvement is about 3.0 folds.

The limit of detection (LOD) was calculated as 6.0 μM and 4.0 μM glucose for amperometric and photoamperometric glucose biosensors, respectively, based on $3s_b/m$ where s_b is the standard deviation of the blank response and m is the slope of the calibration curve.

The precision of electrochemical and photoelectrochemical biosensor was investigated by making 5 repeat injections of 0.5 mM glucose solution. The RSD for electrochemical and photoelectrochemical biosensors were calculated to be 3.8% and 5.8% respectively. These results indicate GDH/ZnS-CdS/MWCNT/GCE has very good repeatability for electrochemical and photoelectrochemical biosensing of glucose.

The various analytical parameters, such as electrode type, electrochemical technique, linearity ranges, sensitivity, detection potential, and LOD values obtained from proposed methods were compared with other enzyme modified electrodes in previously-published reports for the photoelectrochemical biosensing of glucose

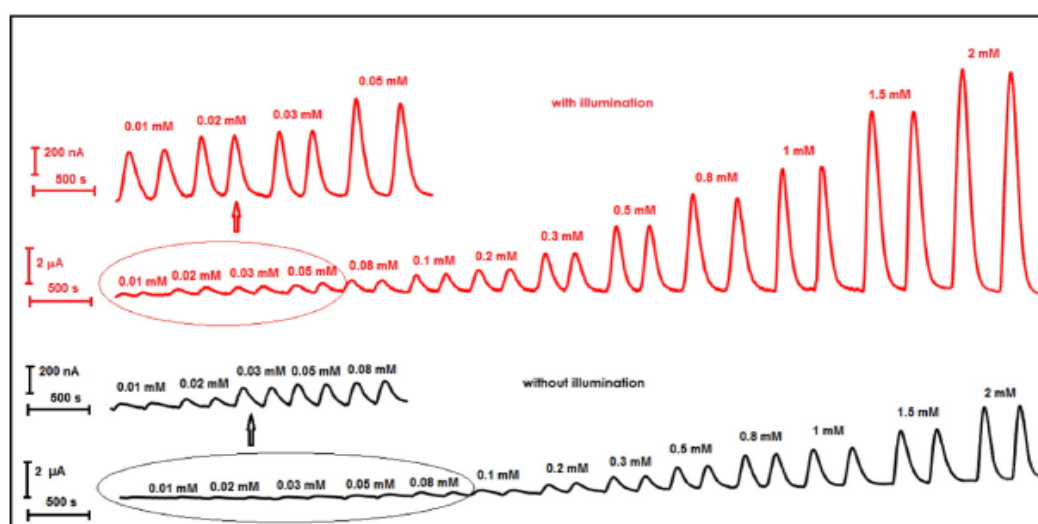


Fig. 7. Current-time curves of glucose with different concentrations using GDH/ZnS-CdS/MWCNT/GCE in FIA system for amperometric and photoamperometric methods. (Carrier stream: 0.10 M PBS (pH 7.0) containing 1.0 M KCl, 10.0 mM NAD^+ , applied potential: +0.4 V; Flow rate: 0.6 mL/min, sample loop: 100 μL ; transmission tubing length: 10 cm).

Please cite this article as: B. Ertek, Y. Dilgin, Photoamperometric flow injection analysis of glucose based on dehydrogenase modified quantum dots-carbon nanotube nanocomposite e.l., Bioelectrochemistry (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.02.008>

Table 1
Comparison of analytical parameters obtained from GDH/ZnS-CdS/MWCNT/GCE with different electrodes in the literature for photoelectrochemical biosensing of glucose dependent on GDH and NAD⁺/NADH redox.

Electrode type	Method	DP ^a	Sensitivity	LR ^b	LOD ^c	Ref. ^d
TH cross-linked MWNTs ^e and Au NPs multilayer functionalized ITO ^f electrode	Amp. ^g in the dark	0.2 V vs. Ag/AgCl (sat.KCl)	7.8 μ A/mM	10 μ M–2.56 mM	5.0 μ M	19
	Amp under irradiation		8.5 μ A/mM	1 μ M–3.25 mM	0.7 μ M	
CdSe/ZnS nanocrystals (QDs) modified Au electrode by chemisorption via a dithiol compound	Amp. under irradiation	0.05 V vs. Ag/AgCl (sat.KCl)	–	Upto 1 mM	–	20
Reduced graphene oxide-cadmium sulfide quantum dots/poly-nile blue nanocomposite	Amp. without irradiation	–0.02 V vs. Ag/AgCl (sat.KCl)	0.4407 μ A/cm ² .mM ¹	Upto 20 mM	–	21
	Amp under irradiation		0.7276 μ A/cm ² .mM			
Poly-hematoxylin modified GCE ^h	FIA ⁱ Amp. without irradiation	0.3 V vs. Ag/AgCl	0.76 μ A/mM	10–1000 mM	3.0 μ M	24
	FIA Amp. with irradiation		1.9 μ A/mM	5–1000 mM	1.5 μ M	
	FIA Amp. without irradiation	0.4 V vs. Ag/AgCl	2.57 μ A/mM	0.01–2.0 mM	6.0 μ M	This work
QDs (ZnS-CdS) modified MWCNT/GCE	FIA Amp. with irradiation		7.80 μ A/mM	0.01–2.0 mM	4.0 μ M	
	FIA Amp. without irradiation					

^a Detection potential.

^b Linearity range.

^c Limit of detection.

^d Reference.

^e Multi-walled carbon nanotube.

^f Indium tin oxide.

^g Amperometry.

^h Glassy carbon electrode.

ⁱ Flow injection analysis.

dependent on NAD⁺/NADH redox couple and dehydrogenase enzyme (Table 1). As can be seen from Table 1, the sensitivity of proposed photoamperometric method was found to be 7.46 μ A/mM, which is better than that of some previously reported biosensors [21,24] and however it is lower than that of reference of [19]. On the other hand, the detection potential of glucose at proposed electrode is higher than previously reported modified electrodes [19–24]. Therefore, it can be said that CdS-ZnS modified MWCNT/GCE is a very useful electrode material for immobilization of GDH and photoelectrochemical biosensing of glucose in FIA system.

3.4. Interference studies

The effects of common interfering species such as ascorbic acid (AA), uric acid (UA), dopamine (DA), L-cysteine (L-Cyst), galactose, saccharose, glutamic acid, which may affect the response of electrode were investigated. Amperometric responses of GDH/ZnS-CdS/MWCNT/GCE toward glucose (0.5 mM) in FIA system under optimized conditions were recorded in the presence of these interference species. Experimental results show that no significant change of oxidation peak current could be observed for saccharose, galactose and glutamic acid at the concentration one hundred fold and for L-cysteine at equimolar as high as that of glucose (data not shown), which shows the good selectivity of the enzyme electrode in the presence of other monosaccharides and also disaccharides. However, equimolar of AA, DA and UA with glucose concentration showed serious interference (increased the oxidation current), because their oxidation potentials were close to that of NADH. It is reported that the interference of AA can be eliminated and enhance the biosensor selectivity toward glucose by using nafion as an over layer cost coated at the biosensor surface or using ascorbate oxidase [32,33]. Another possible way of removing of interfering effect of all these compounds

is that very small amount of lead(IV) acetate as an oxidizing agent can be added to nafion layer due to preoxidation reaction of these interfering compounds before they reach the electrode surface [34].

3.5. Real sample analysis

One real sample (commercial dextrose solution) and one spiked serum sample were used for determination of glucose at GDH/CdS-ZnS/MWCNT/GCE as described in literature [24]. For this, 250.0 μ L of spiked serum samples were diluted to 5.0 mL with 0.10 M PBS (pH 7.0) containing 10.0 mM NAD⁺ and 1.0 M KCl. Glucose detection was performed by spiking a known volume and concentration of glucose standard solution into the diluted serum samples in order to obtain various concentrations, and by measuring of the amperometric and photoamperometric response of electrode in FIA system. For the determination of glucose in commercial dextrose solution (containing 5% glucose), it was diluted 555 times (about 0.5 mM glucose) with 0.10 M PBS (pH 7.0) containing 10.0 mM NAD⁺ and 1.0 M KCl. Glucose detection was also performed for this sample as described spiked serum sample. The results for the recovery test were given in Table 2. It can be seen that acceptable recoveries were obtained for spiked glucose in serum plasma and commercial dextrose solution samples.

4. Conclusions

In this study, the constructing photoelectrochemical glucose biosensor dependent on NAD⁺/NADH redox couple and GDH in FIA system was proposed using enzyme modified MWCNT/GCE. Photoelectrochemical biosensors dependent on NAD⁺/NADH redox couple-dehydrogenase enzymes have been reported in previous studies [19–24] and one of them is for photoelectrochemical glucose biosensing

Table 2
The results of glucose determination in real samples and a dextrose solution (n = 3).

Sample	Glucose (mM)	FIA amperometric			FIA photoamperometric		
		Found (mM)	Recovery	RSD%	Found (mM)	Recovery	RSD%
Spiked serum	0.25	0.22 ± 0.015	88	6.8	0.25 ± 0.050	100	2.3
	0.50	0.48 ± 0.015	96	3.1	0.49 ± 0.010	98	2.0
	0.75	0.76 ± 0.010	103	1.3	0.74 ± 0.010	99	1.3
Dextrose solution	Labeled claim (% = 277.5 mM)	266.6 ± 4.6	–	–	261.1 ± 4.0	–	–

Please cite this article as: B. Ertek, Y. Dilgin, Photoamperometric flow injection analysis of glucose based on dehydrogenase modified quantum dots-carbon nanotube nanocomposite el..., Bioelectrochemistry (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.02.008>

in FIA system using poly-hematoxyline modified GCE [24]. However, according to our search of the literature, the uses of QDs modified MWCNT/GCE has not been reported for photoelectrochemical biosensing of glucose in FIA system yet. GDH/CdS-ZnS/MWCNT/GCE exhibited a good photoelectrocatalytic response for the detection of glucose and a linear range was obtained between 0.010 and 2.0 mM glucose with a detection limit of 4.0 μ M. The sensitivity of the photoamperometric biosensor in FIA system was improved about two folds in compared with that of amperometric procedure. It can be concluded that GDH/CdS-ZnS/MWCNT/GCE can be successfully used for photoelectrochemical biosensing of glucose due to increasing of oxidation peak current under irradiation of electrode surface. As a result, a novel, fast and facile sensor was reported in this study which is expected to offer new prospects for the development of sensitive, selective and faster photoelectrochemical biosensors in the FIA system.

Acknowledgment

We thank the The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK) for financial support (Project number: 112T375).

References

- [1] I. Willner, B. Willner, E. Katz, Biomolecule–nanoparticle hybrid systems for bioelectronic applications, *Bioelectrochemistry* 70 (2007) 2–11.
- [2] G.L. Wang, J.J. Xu, H.Y. Chen, Progress in the studies of photoelectrochemical sensors, *Sci. China, Ser. B Chem.* 52 (2009) 1789–1800.
- [3] Z. Yue, F. Lisdat, W.J. Parak, S.G. Hickey, L. Tu, N. Sabir, D. Dorfs, N.C. Bigall, Quantum-dot based photoelectrochemical sensors for chemical and biological detection, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5 (2013) 2800–2814.
- [4] Z.X. Zhan, C.Z. Zhao, Progress of photoelectrochemical analysis and sensors, *Chin. J. Anal. Chem.* 41 (2013) 436–444.
- [5] W.W. Zhao, M. Xiong, X.R. Li, J.J. Xu, H.Y. Chen, Photoelectrochemical bioanalysis: a mini review, *Electrochim. Commun.* 38 (2014) 40–43.
- [6] J. Tane, D. Schafer, W. Khalid, W.J. Parak, F. Lisdat, Light-controlled bioelectrochemical sensor based on CdSe/ZnS quantum dots, *Anal. Chem.* 83 (2011) 7778–7785.
- [7] M. Zheng, Y. Cui, X. Li, S. Li, Z. Tang, Photoelectrochemical sensing of glucose based on quantum dot and enzyme nanocomposites, *J. Electroanal. Chem.* 656 (2011) 167–173.
- [8] W. Wang, L. Bao, J. Lei, W. Tu, H. Ju, Visible light induced photoelectrochemical biosensing based on oxygen-sensitive quantum dots, *Anal. Chim. Acta* 744 (2012) 33–38.
- [9] A. Salimi, R. Rahmatpanah, R. Hallaj, M. Roushani, Covalent attachment of thionine onto gold electrode modified with cadmium sulfide nanoparticles: improvement of electrocatalytic and photoelectrocatalytic reduction of hydrogen peroxide, *Electrochim. Acta* 95 (2013) 60–70.
- [10] Y. Dilgin, S. Canarslan, Ö. Ayyıldız, B. Ertek, G. Nişli, Flow injection analysis of sulphide based on its photoelectrocatalytic oxidation at poly-methylene blue modified glassy carbon electrode, *Electrochim. Acta* 66 (2012) 173–179.
- [11] Y. Dilgin, Z. Dursun, G. Nişli, L. Gorton, Photoelectrochemical investigation of methylene blue immobilised on zirconium phosphate modified carbon paste electrode in flow injection system, *Anal. Chim. Acta* 542 (2005) 162–168.
- [12] Y. Dilgin, L. Gorton, G. Nişli, Photoelectrocatalytic oxidation of NADH with electropolymerized toluidine blue O, *Electroanalysis* 19 (2007) 286–293.
- [13] D.G. Dilgin, D. Gligor, H.I. Gökçel, Z. Dursun, Y. Dilgin, Photoelectrocatalytic oxidation of NADH in a flow injection analysis system using a poly-hematoxylin modified glassy carbon electrode, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 411–417.
- [14] Y. Dilgin, D.G. Dilgin, Z. Dursun, H.I. Gökçel, D. Gligor, B. Bayrak, B. Ertek, Photoelectrocatalytic determination of NADH in a flow injection system with electropolymerized methylene blue, *Electrochim. Acta* 56 (2011) 1136–1143.
- [15] D.G. Dilgin, D. Gligor, H.I. Gökçel, Z. Dursun, Y. Dilgin, Glassy carbon electrode modified with poly-neutral red for photoelectrocatalytic oxidation of NADH, *Mikrochim. Acta* 173 (2011) 469–476.
- [16] G.L. Wang, J.J. Xu, H.Y. Chen, Dopamine sensitized nanoporous TiO₂ film on electrodes: photoelectrochemical sensing of NADH under visible irradiation, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2494–2498.
- [17] Y. Ho, A.P. Periasamy, S.M. Chen, Photoelectrocatalytic regeneration of NADH at poly(4,4'-diaminodiphenyl sulfone)/nano TiO₂ composite film modified indium tin oxide electrode, *Sensors Actuators B* 156 (2011) 84–94.
- [18] K. Wang, J. Wu, Q. Liu, Y. Jin, J. Yan, J. Cai, Ultrasensitive photoelectrochemical sensing of nicotinamide adenine dinucleotide based on graphene-TiO₂ nanohybrids under visible irradiation, *Anal. Chim. Acta* 745 (2012) 131–136.
- [19] L. Deng, Y. Wang, L. Shang, D. Wen, F. Wang, S. Dong, A sensitive NADH and glucose biosensor tuned by visible light based on thionine bridged carbon nanotubes and gold nanoparticles multilayer, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2008) 951–957.
- [20] K. Schubert, W. Khalid, Z. Yue, W.J. Parak, F. Lisdat, Quantum-dot-modified electrode in combination with NADH-dependent dehydrogenase reactions for substrate analysis, *Langmuir* 26 (2010) 1395–1400.
- [21] F. Jafari, A. Salimi, A. Navaee, Electrochemical and photoelectrochemical sensing of dihydronicotinamide adenine dinucleotide and glucose based on noncovalently functionalized reduced graphene oxide-cadmium sulfide quantum dots/poly-nile blue nanocomposite, *Electroanalysis* 26 (2014) 1782–1793.
- [22] F. Jafari, A. Salimi, A. Navaee, Electrochemical and photoelectrochemical sensing of NADH and ethanol based on immobilization of electrogenerated chlorpromazine sulfoxide onto graphene-CdS quantum dot/ionic liquid nanocomposite, *Electroanalysis* 26 (2014) 530–540.
- [23] X.Q. Liu, R. Yan, J. Zhu, X. Huo, X. Wang, Development of a photoelectrochemical lactic dehydrogenase biosensor using multi-wall carbon nanotube-TiO₂ nanoparticle composite as coenzyme regeneration tool, *Electrochim. Acta* 173 (2015) 260–267.
- [24] D.G. Dilgin, H.I. Gökçel, Photoelectrochemical glucose biosensor in flow injection analysis system based on glucose dehydrogenase immobilized on poly-hematoxylin modified glassy carbon electrode, *Anal. Methods* 7 (2015) 990–999.
- [25] X. Peng, M.C. Schlamp, A.V. Kadavanich, A.P. Alivisatos, Epitaxial growth of highly luminescent CdSe/CdS core/shell nanocrystals with photostability and electronic accessibility, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 7019–7029.
- [26] J. Li, Y.A. Wang, W.Z. Guo, J.C. Keay, T.D. Mishima, M.B. Johnson, X. Peng, Large-scale synthesis of nearly monodisperse CdSe/CdS core/shell nanocrystals using air-stable reagents via successive ion layer adsorption and reaction, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 12567–12575.
- [27] F. Huang, F. Wang, S. Feng, Y. Li, S. Li, Y. Li, Direct electrochemistry and electrochemical biosensing of glucose oxidase based on CdSe@CdS quantum dots and MWNT-modified electrode, *J. Solid State Electrochem.* 17 (2013) 1295–1301.
- [28] L.T. Kubota, L. Gorton, Electrochemical study of flavins, phenazines, phenoxazines and phenothiazines immobilized on zirconium phosphate, *Electroanalysis* 11 (1999) 719–728.
- [29] C. Lu, X.F. Wang, J.J. Xu, H.Y. Chen, Electrochemical modulation of electrogenerated chemiluminescence of CdS nano-composite, *Electrochim. Commun.* 10 (2008) 1530–1532.
- [30] Z. Qian, H.J. Bai, G.L. Wang, J.J. Xu, H.Y. Chen, A photoelectrochemical sensor based on CdS-polyamidoamine nano-composite film for cell capture and detection, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 2045–2050.
- [31] I.I. Suni, Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 604–611.
- [32] D.M. Kim, M.Y. Kim, S.S. Reddy, J. Cho, C.H. Cho, S. Jung, Y.B. Shim, Electron-transfer mediator for a NAD-glucose dehydrogenase-based glucose sensor, *Anal. Chem.* 85 (2013) 11643–11649.
- [33] T.T. Baby, S.S.J. Aravind, T. Arockiadoss, R.B. Rakkhi, S. Ramaprabhu, Metal decorated graphene nanosheets as immobilization matrix for amperometric glucose biosensor, *Sensors Actuators B* 145 (2010) 71–77.
- [34] F. Pariente, F. Tobalina, G. Moreno, L. Hernandez, E. Lorenzo, H.D. Abruna, Mechanistic studies of the electrocatalytic oxidation of NADH and ascorbate at glassy carbon electrodes modified with electrodeposited films derived from 3,4-dihydroxybenzaldehyde, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4065–4075.

Ek 3. Fabrication of Photoelectrochemical Glucose Biosensor Depending on Dehydrogenase Enzyme and NAD^+/NADH Redox Couple Using Quantum Dot Modified Pencil Graphite Electrode, 9th Aegean Analytical Chemistry Days

FABRICATION OF PHOTOELECTROCHEMICAL GLUCOSE BIOSENSOR DEPENDING ON DEHYDROGENASE ENZYME AND NAD^+/NADH REDOX COUPLE USING QUANTUM DOT MODIFIED PENCIL GRAPHITE ELECTRODE

Bensu ERTEK^{1A}, Yusuf DİLGİN^{A,*}

^A Çanakkale Onsekiz Mart Univ. Science and Art Faculty, Department of Chemistry, 17100 Çanakkale-TURKEY

*E-mail: ydilgin@yahoo.com

Semiconductor nanocrystals, also known as quantum dots (QDs), have emerged as a significant new class of materials over the past decade because of their unusual physical and chemical properties. They have long been grabbing scientists' attention for applications in the fields of photoelectrochemical biosensors, biocatalysis, bioelectronics and biomedical⁽¹⁻⁴⁾.

In this study, a semiconductor quantum dot film, CdS/ZnS, was electrodeposited directly onto Pencil Graphite Electrode (PGE). After quantum dot modified electrodes (CdS-ZnS/PGE) were characterized by recording their cyclic voltammograms and electrochemical impedance spectra, glucose dehydrogenase (GDH) was immobilized onto quantum-dot modified electrode for glucose biosensing in flow injection analysis (FIA) system. The effect of illumination of electrode surface on the electrocatalytic oxidation of NADH, and biosensing of glucose dependent on NAD^+/NADH redox couple-dehydrogenase enzyme was investigated by using traditional voltammetric cell for cyclic voltammetry. In addition, the studies on photoelectrochemical and also electrochemical glucose biosensor at quantum dot modified PGE were performed in FIA system using a new home-made flow cell for the first time. In all FIA experiments, Phosphate buffer solution (pH 7.0) containing 1 M KCl was used as carrier solution. Electrochemical responses of NADH on CdS-ZnS/PGE and also NADH obtained from enzymatic reaction of glucose on GDH/CdS-ZnS/PGE were monitored after each modified electrode had been inserted into a flow cell. For this, after a steady-state background current of supporting electrolyte under optimum conditions (flow rate: 1.75 mLmin⁻¹; transmission tubing length: 10 cm; injection volume: 100 μL ; and constant applied potential: + 600 mV vs. Ag/AgCl), the various concentrations of NADH (on CdS-ZnS/PGE) or glucose GDH/CdS-ZnS/PGE containing NAD^+ were injected into the system and the current-time curves were recorded. The peak current for electrocatalytic oxidation of NADH under illumination at modified electrodes increased about 1.6 times compared with the reaction in dark. Moreover, peak current of NADH obtained from enzymatic reaction of glucose also increased by illumination of electrode surface. This results show that, a new photoelectrochemical glucose biosensing platform in FIA system was constructed by using CdS-ZnS/PGE. The photoelectrochemical biosensors developed in the study offer high selectivity, high current outputs, fast response, easy and inexpensive fabrication and simple use, which make them very attractive for practical application.

KEYWORDS: Glucose dehydrogenase, CdS-ZnS quantum dots, Glucose biosensor, Flow Injection Analysis, Photoelectrochemical Sensor, electrocatalytic oxidation of NADH.

REFERENCES:

- 1.L. Deng, Y. Wang, L. Shang, D. Wen, F. Wang, S. Dong, *Biosen. Bioelectron.* (2008) 24 951-957.
- 2.M. Zheng, Y. Cui, X. Li, S. Liu, Z. Tang. *J. Electroanal. Chem.* (2011) 656 167-173.
- 3.X. Ren, D. Chen, X. Meng, F. Tang, X. Hou, D. Han, L. Zhang. *J. Colloid Interface Sci.* (2009) 334 183-187.
- 4.J. Sun, Y. Zhu, X. Yang, C. Li. *Particuology*, (2009) 347-352.

The authors thank the TÜBİTAK (Project number: 112T375) for financial support.

S24

PHOTOELECTROCHEMICAL GLUCOSE BİOSENSOR IN FLOW INJECTION ANALYSIS SYSTEM USING QUANTUM DOT MODIFIED ELECTRODES

Bensu ERTEK¹, Yusuf DİLGİN¹

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Turkey

bensuertek@hotmail.com

Photoelectrochemical biosensing is a newly emerged analytical technique, which uses light to induce electron transfer between photoelectrochemical-active species and electrode for generating the detectable photocurrent signal (1,2). Among the photoelectrochemical materials, quantum dots (QDs) are the excellent candidates in the development of optical and photoelectrochemical biosensing since they have the broad excitation spectrum, good photostability and tunable emission spectrum (1). In this study, firstly, CdS/ZnS quantum dot film was electrochemically deposited on multi walled carbon nanotube (MWCNT) modified Glassy carbon electrode (GCE). Then, the electrocatalytic and photoelectrocatalytic oxidation of NADH was investigated by CdS-ZnS/MWCNT/GCE with cyclic voltammetric and flow injection amperometric techniques. Finally, glucose dehydrogenase was immobilized onto CdS-ZnS/MWCNT/GCE by crosslinking with glutaraldehyde and obtained electrode (GDH/ CdS-ZnS/MWCNT/GCE) was used for electrochemical and photoelectrochemical biosensing of glucose in the flow injection analysis (FIA) system. The results show that CdS-ZnS/MWCNT/GCE offer a good photoelectrocatalytic effect towards the oxidation of NADH and also a good electrode material for the photoelectrochemical biosensing of glucose in FIA system dependent on NADH/NAD⁺ redox couple and dehydrogenase enzyme.

Keywords: Photoelectrochemical biosensing, quantum dots, flow injection analysis, multi walled carbon nanotube, glucose

Acknowledgments: The authors thank the TÜBİTAK (Project number: 112T375) for financial support.

PHOTOELECTROCHEMICAL DNA BIOSENSOR BASED ON QUANTUM DOT MODIFIED PENCIL GRAPHITE ELECTRODE

Bensu ERTEK¹, Arzum ERDEM², Yusuf DİLGİN^{1,*}

¹Çanakkale Onsekiz Mart Univ. Science and Art Faculty, Department of Chemistry, 17100 Çanakkale-TURKEY

²Ege University, Faculty of Pharmacy, Analytical Chemistry Department, 35100 Bornova, İzmir, TURKEY

bensuertek@hotmail.com

arzum.erdem@ege.edu.tr

[*ydilgin@yahoo.com](mailto:ydilgin@yahoo.com)

Semiconductor Quantum dots (QDs), that have had a considerable impact on research in many fields across several sciences, they have unique optical properties that are advantageous for the development of chemical sensors and biosensors⁽¹⁻³⁾. QDs could improve the performance of biosensor and is expected to have the advantages of photoelectrochemistry for photoelectrochemical biosensors⁽⁴⁾. In this study, a semiconductor quantum dot film, CdS-ZnS, was electrodeposited directly onto Pencil Graphite Electrode (PGE). The photoelectrochemical biosensor was designed for the determination of human papillomavirus (HPV). Probe sequences were attached on to the quantum dot modified electrodes (CdS-ZnS/PGE) by using wet adsorption method. At the biosensor design various parameters were optimized as probe concentration, target concentration, sensor selectivity and repeatability effects on detection of HPV.

The studies on photoelectrochemical and electrochemical DNA biosensor at CdS-ZnS/PGE were performed by using differential pulse voltammetry (DPV) in acetate buffer (pH 4.8). The oxidation signal of guanine, under illumination at probe modified electrodes, increased about 2 times compared with the currents recorded in dark. After that, hybridization was performed between probe and complementary target and non-complementary target to assess whether the DNA biosensor responds selectively. The signals of the probe modified CdS-ZnS/PGE were lower, for both electrochemical and photoelectrochemical results, when compared with the signals which were recorded after hybridization. The response of the probe modified CdS-ZnS/PGE which was interacted with a noncomplementary sequence resulted in almost same as probe modified CdS-ZnS/PGE signals and proved the specificity of the hybridization with target. The differences between responses demonstrated that the detection of HPV was performed with photoelectrochemical DNA biosensor. These results show that a new photoelectrochemical DNA biosensor platform was constructed by using CdS-ZnS/PGE. The photoelectrochemical biosensor developed in the study offer high current outputs, high selectivity, fast response, easy and inexpensive fabrication and simple use, which make them attractive for practical application and determining human papillomavirus.

KEYWORDS: CdS-ZnS quantum dots, DNA biosensor, Photoelectrochemical sensor, modified electrodes, pencil graphite electrode.

REFERENCES

1. Frasco, F. S., and N. Chaniotakis. *Sensors*.(2009) 9: 7266-7286.
2. Michalet, X., F.F. Pinaud, L.A. Bentollila, J.M. Tsay, S. Doose, J.J. Li, G. Sundaresan. *Science*. (2005)307: 538-544.
3. Liu, Q., X. Lu, J. Li, X. Yao, and J. Li. *Biosens. Bioelectron.* (2007) 22: 3203-3209.
4. Zhang, M., C. Mullens, and W. Gorski. *Anal. Chem.* (2007) 79 (6): 2446-2450.

The authors thank the The Scientific and Technological Research Council of Turkey (**TÜBİTAK**) for financial support (Project number: 112T375).

Ek 6. Şekil numarasına göre çalışma esnasında elde edilen veriler.

Uygulama Potansiyeli (mV)	Akım (μ A) 0,10 mM NADH için	
	Işıksız	Işıklı
0	0,57	1,77
50	0,87	2,28
100	1,16	2,74
150	1,83	3,33
200	1,93	3,52
250	2,16	3,85
300	2,47	4,45
400	2,66	4,72
500	2,90	5,06
600	3,04	5,07

Ek Şekil 1. 4.34.'e ait GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak elde edilen veriler

Akış Hızı (mL.dk ⁻¹)	Akım (μ A) 0,10 mM NADH için	
	Işıksız	Işıklı
0,13	1,10	1,90
0,25	1,70	2,50
0,45	1,90	3,50
0,60	2,10	3,80
0,80	2,20	4,00
1,00	2,30	4,20
1,25	2,00	3,50
1,50	2,00	3,30
1,75	1,90	3,10
2,50	1,60	2,90
3,00	1,50	2,50
3,75	1,30	2,00
4,50	1,20	1,60

Ek Şekil 2. 4.36.'e ait GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak elde edilen veriler

NADH Konsantrasyonu (mM)	Akım (μA)	
	Işıksız	Işıklı
0.003	0.10	0.19
0.005	0.12	0.25
0.008	0.17	0.35
0.010	0.25	0.50
0.030	0.70	1.50
0.050	1.10	2.40
0.080	2.00	3.60
0.100	2.30	4.20
0.200	4.20	8.40
0.300	6.80	13.00
0.500	11.00	19.00
0.800	15.00	29.00
1.000	21.00	38.00

Ek Şekil 3. 4.38.e ait FIA sisteminde GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak elde edilen veriler

Uygulama Potansiyeli (mV)	Akım (μA) 0.50 mM NADH için	
	Işıksız	Işıklı
100	0.001	0.21
200	0.061	0.23
300	0.190	0.37
400	0.610	0.81
500	1.200	1.52
600	1.600	1.93
700	2.000	2.30
800	2.100	2.40
900	2.100	2.40

Ek Şekil 4. 4.40.'e ait K.PGE/CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak elde edilen veriler.

Akış Hızı (mL.dk ⁻¹)	Akım (µA) 0.50 mM NADH için	
	Işıksız	Işıklı
0.125	1.35	1.95
0.250	1.40	1.98
0.450	1.45	2.05
0.600	1.60	2.28
0.800	1.75	2.40
1.000	1.85	2.55
1.250	2.10	2.70
1.500	2.35	3.15
1.750	2.85	3.55
2.500	3.05	3.80
3.000	3.00	4.00
3.750	2.90	4.00
4.500	2.70	3.85

Ek Şekil 5. 4.42.'e ait K.PGE-CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak elde edilen veriler.

NADH Konsantrasyonu (mM)	Akım (µA)	
	Işıksız	Işıklı
0.0008	0.021	0.14
0.0010	0.031	0.18
0.0030	0.090	0.31
0.0050	0.160	0.45
0.0080	0.260	0.59
0.0100	0.360	0.70
0.0300	0.700	1.10
0.0500	1.130	1.60
0.0800	1.970	2.70
0.1000	2.100	3.60
0.3000	6.500	12.00
0.5000	10.500	20.00
0.8000	17.000	31.00
1.0000	23.000	35.00
2.0000	43.000	68.00
3.0000	61.000	86.00
5.0000	75.000	99.00

Ek Şekil 6. 4.44.'e ait FIA sisteminde K.PGE-CdS-ZnS-MAA-Nf kullanılarak elde edilen veriler.

Glukoz Konsantrasyonu (mM)	Akım (μ A)	
	Işıksız	Işıklı
0.2	0.048	0.098
0.3	0.063	0.13
0.5	0.094	0.20
0.8	0.15	0.28
1	0.19	0.35
2	0.32	0.62
3	0.42	0.86
5	0.68	1.35
8	0.96	2.00
10	1.12	2.30
20	1.80	3.00
30	2	3.20

Ek Şekil 7. 4.51.'e ait FIA sisteminde K.PGE/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak elde edilen veriler.

Uygulama Potansiyeli (mV)	Akım (μ A) 0.50 mM Glukoz için	
	Işıksız	Işıklı
0	0.70	1.8
100	0.54	1.7
200	0.68	2.0
300	0.95	2.5
400	1.40	2.8
500	1.60	2.8
600	1.70	2.7
700	1.70	2.4

Ek Şekil 8. 4.55.'e ait GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak elde edilen veriler.

Akış Hızı (mL.dk ⁻¹)	Akım (µA) 0.50 mM Glukoz için	
	Işıksız	Işıklı
0.25	1.55	4.3
0.45	1.55	4.5
0.60	1.60	4.2
0.80	1.60	3.9
1.00	1.50	3.7
1.25	1.40	3.5
1.50	1.40	3.0
1.75	1.30	2.6
2.50	1.25	2.6
3.00	1.20	2.5
3.75	1.15	2.3
4.50	1.00	2.0

Ek Şekil 9. 4.57.'e ait GCE/MWCNT-CdS-ZnS-MAA-GDH kullanılarak elde edilen veriler.

Glukoz Konsantrasyonu (mM)	Akım (µA)	
	Işıksız	Işıklı
0.01	0.060	0.30
0.02	0.115	0.40
0.03	0.140	0.46
0.05	0.180	0.61
0.08	0.235	0.85
0.10	0.300	1.00
0.20	0.550	1.40
0.30	0.900	2.20
0.50	1.450	3.90
0.80	2.000	6.00
1.00	2.500	7.80
1.50	3.750	11.70
2.00	5.350	16.00
3.00	6.500	19.00
5.00	8.550	24.00
8.00	12.250	26.00
10.00	14.400	27.00

Ek Şekil 10. 4.59.'a ait FIA sisteminde GCE/MWCNT/CdS-ZnS-MAA/GDH kullanılarak elde edilen veriler.

Uygulama Potansiyeli (mV)	Akım (μA) 0.50 mM Etanol için	
	Işıksız	Işıklı
600	0.06	0.16
700	0.14	0.38
800	0.25	0.53
900	0.37	0.70
1000	0.40	0.71

Ek Şekil 11. 4.74.'e ait K.PGE/ZnS-MAA/ALDH kullanılarak elde edilen veriler.

Akış Hızı ($\text{mL}\cdot\text{dk}^{-1}$)	Akım (μA) 0.50 mM Etanol için	
	Işıksız	Işıklı
0.45	0.30	0.58
0.60	0.33	0.64
0.80	0.38	0.74
1.00	0.43	0.83
1.25	0.45	0.87
1.50	0.48	0.94
1.75	0.43	0.84
2.50	0.41	0.80
3.00	0.36	0.70
3.75	0.29	0.57

Ek Şekil 12. 4.76.' a ait K.PGE/CdS-MAA/ALDH kullanılarak elde edilen veriler.

Etanol Konsantrasyonu (mM)	Akım (μA)	
	Işıksız	Işıklı
0.05	0.02	0.04
0.08	0.04	0.07
0.10	0.05	0.09
0.20	0.10	0.21
0.30	0.15	0.31
0.50	0.25	0.51
0.80	0.40	0.80
1.00	0.46	0.92
2.00	0.76	1.52
3.00	0.96	1.92
5.00	1.11	2.50

Ek Şekil 13. 4.78.'e ait FIA sisteminde K.PGE/CdS-MAA/ALDH kullanılarak elde edilen veriler.

Uygulama Potansiyeli (mV)	Akım (μA) 0.50 mM Etanol için	
	Işıksız	Işıklı
400	0.10	0.20
500	0.21	0.28
600	0.28	0.38
700	0.35	0.55
800	0.37	0.54

Ek Şekil 14. 4.82.'e ait GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH kullanılarak elde edilen veriler.

Akış Hızı (mL.dk ⁻¹)	Akım (µA) 0.50 mM Etanol için	
	Işıksız	Işıklı
0.25	0.27	0.48
0.45	0.28	0.48
0.60	0.33	0.52
0.80	0.34	0.53
1.00	0.36	0.56
1.25	0.36	0.57
1.50	0.38	0.62
1.75	0.36	0.60
2.50	0.35	0.55
3.00	0.33	0.52
3.75	0.30	0.45

Ek Şekil 15. 4.84.'e ait GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH kullanılarak elde edilen veriler.

Etanol Konsantrasyonu (mM)	Akım (µA)	
	Işıksız	Işıklı
0.05	0.03	0.09
0.08	0.04	0.10
0.10	0.07	0.13
0.20	0.12	0.24
0.30	0.19	0.35
0.50	0.32	0.58
0.80	0.42	0.74
1.00	0.45	0.80
2.00	0.55	1.00

Ek Şekil 16. 4.86.'e ait FIA sisteminde GCE/MWCNT/ZnS-PAMAM-MAA/ALDH kullanılarak elde edilen veriler.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Bensu ERTEK

Doğum Yeri : Edremit

Doğum Tarihi : 01.01.1985

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Mersin Üniversitesi, Kimya

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Analitik Kimya

Doktora Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Analitik Kimya

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI -Diğer

- 1- Ertek B., Dilgin Y., 2016 "Photoamperometric flow injection analysis of glucose based on dehydrogenase modified quantum dots-carbon nanotube nanocomposite electrode" *Bioelectrochemistry*, in press. **(112T375 nolu proje ve bu tez çalışmasından)**
- 2- Ertek B., Akgül C., Dilgin Y., 2016 "Photoelectrochemical glucose biosensor based on dehydrogenase enzyme and NAD⁺/NADH redox couple using quantum dot modified pencil graphite electrode" *RSC Advances*, 6, 20058-20066. **(112T375 nolu proje ve bu tez çalışmasından)**
- 3- Sağlam Ö., Dilgin G.D., Ertek B., Dilgin, Y., 2016 "Differential pulse voltammetric determination of eugenol at a pencil graphite electrode" *Materials Science & Engineering C*, 60, 156-162.
- 4- Vu D. V., Zabcikova S., Cervenka L., Ertek B., Dilgin Y., "Sensitive Voltammetric Determination of natural flavonoid quercetin on a disposable graphite lead" 2015, *Food Technology and Biotechnology*, 53, 379-384.
- 5- Vu D. V., Ertek B., Dilgin Y., Cervenka L., "Voltammetric determination of tannic acid in beverages using pencil graphite electrode" 2014, *Czech Journal of Food Sciences*, 8, 9278-9286.

- 6- Vu D. V., Ertek B., Dilgin Y., Cervenka L., "Determination of anti-cancer drug using a silica-gel-modified carbon paste electrode" 2014, *Quimica Nova*, 32, 1629-1632.
- 7- Vu D. V., Cervenka L., Ertek B., Dilgin Y., "determination of tannic acid using silica gel modified carbon paste electrode" 2013, *International Journal of Electrochemical Science*, 8, 9278-9286.
- 8- Ertek B., Vu D. V., Cervenka L., Dilgin Y., "Flow injection amperometric detection of sulfide using a prussian blue modified glassy carbon electrode" 2012, *Analytical Sciences*, 28, 1075-1080.
- 9- Dilgin Y., Ertek B., Kızılkaya B., Dilgin G.D., Gökçel H. İ., "Electrocatalytic oxidation of NADH using a pencil graphite electrode modified with hematoxylin" 2012, *Science of Advanced Materials*, 49, 920-927.
- 10- Dilgin Y., Kızılkaya B., Ertek B., Eren N., Dilgin G.D., "Amperometric determination of sulfide based on its electrocatalytic oxidation at a pencil graphite electrode modified with quercetin", 2012, *Talanta*, 89, 490-495.
- 11- Dilgin Y., Canarslan S., Ayyıldız Ö., Ertek B., Nişli G., "Flow injection analysis of sulphide based on its photoelectrocatalytic oxidation at poly-methylene blue modified glassy carbon electrode", 2012, *Electrochimica Acta*, 66, 173-179.
- 12- Dilgin Y., Kızılkaya B., Ertek B., Işık F., Dilgin G.D., "Electrocatalytic oxidation of sulphide using a pencil graphite electrode modified with hematoxylin", 2012, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 171-171, 223-229.
- 13- Dilgin Y., Dilgin G.D., Dursun Z., Gökçel H. İ., Gligor D., Bayrak B., Ertek B., 2011 "Photoelectrocatalytic determination of NADH in a flow injection system with electropolymerized methylene blue" *Electrochimica Acta*, 56, 1138-1143.

b) Bildiriler -Uluslararası -Ulusal

- 1- Ertek B., Erdem A., Dilgin Y., Fabrication of Photoelectrochemical DNA Biosensor Based on Quantum Dot Modified Pencil Graphite Electrode, 2nd International Congress on Biosensors, June 10-12, (Poster) Gediz University, İzmir (**112T375 nolu proje çalışmasından**)
- 2- Ertek B., Dilgin Y. 2014. Fabrication of Photoelectrochemical Glucose Biosensor Depending on Dehydrogenase Enzyme and NAD^+/NADH Redox Couple Using Quantum Dot Modified Pencil Graphite Electrode, 9th Aegean Analytical Chemistry Days, 29 September - 3 October 2014, Chios- Greece (Poster) (**112T375**)

nolu proje ve bu tez çalışmasından)

- 3- Ertek B., Dilgin Y., Photoelectrochemical Glucose Biosensor in Flow Injection Analysis System Using Quantum Dot Modified Electrodes, I. Ulusal Biyosensör Kongresi, 22-28 Haziran 2014 Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ (Sözlü Sunum)
- (112T375 nolu proje ve bu tez çalışmasından)***
- 4- Sağlam Ö., Karaaslan S. Ö., Demir S., Ertek B., Dilgin Y., Kalem Grafit Elektrot Kullanarak Eugenol'ün Voltammetrik Tayini, 7. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Eylül 1-5 2014 Kahramanmaraş (Sözlü Sunum).
 - 5- Ertek B., Eren N., Dilgin Y., Kızılkaya B., Dilgin D. G., Amperometric determination of sulphide depend on its electrocatalytic oxidation at a pencil graphite electrode modified with quercetin, Electrocatalytic oxidation of NADH using a pencil graphite electrode modified with quercetin, 9th International Electrochemistry Meeting in Turkey, 25-29 September 2011, Çeşme, İzmir (Poster)
 - 6- Bayrak B., Ertek B., Dilgin D. G., Gökçel H. İ., Kızılkaya B., Dilgin Y., Photoelectrocatalytic oxidation of NADH at a poly- methylene blue modified glassy carbon electrode, 8th International Electrochemistry Meeting, October 8-11, 2009, Side Antalya (Poster)
 - 7- Dilgin D. G., Gökçel H. İ., Ertek B., Dilgin Y., The construction of biosensor depend on NADH by using electrodes modified with azin type dyes, I. Ulusal Kimya KONGresi, 7-10 Nisan, 2010, Bursa (Sözlü Sunum).
 - 8- Dilgin D. G., Ertek B., Dönmez E., Bayrak B., Gökçel H. İ., Dursun Z., Dilgin Y., Photoelectrocatalytic oxidation of NADH using methylene green modified glassy carbon electrode, I. Ulusal Kimya KONGresi, 7-10 Nisan, 2010, Bursa (Poster)

Katıldığı Projeler

- 1- Tübitak ile Romanya Bilimsel Araştırma Ulusal Otoritesi (Ancs) Arasındaki İşbirliği Çerçevesinde, "Modifiye Elektrotlarla NADH'nin Elektrokatalitik ve Fotoelektrokatalitik Yükseltgenmesi", (Bursiyer, 2008 – 2010 Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Yusuf DİLGİN, Proje No:107T572)
- 2- Tübitak Bilimsel ve Teknoloji Araştırma Projeleri Destekleme Programı, "Akışa enjeksiyon analiz sisteminde prusyan mavisi modifiye camımsı karbon elektrot kullanarak elektrokatalitik sülfür tayini", (Bursiyer, 2011 – 2012 Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Yusuf DİLGİN, Proje No:210T112)

- 3- Tübitak 1001- Bilimsel ve Teknoloji Araştırma Projeleri Destekleme Programı,
“Kuantum Noktalarla Modifiye Edilmiş Elektrotlar Kullanarak Akışa Enjeksiyon
Analiz Sisteminde Fotoelektrokimyasal Sensör Tasarımı” ,(Bursiyer, Kasım 2012 –
Haziran 2014) Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Yusuf DİLGİN, Proje No:112T375)

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl

Pharmactive İlaç Haziran 2015-Devam ediyor

İLETİŞİM

E-posta Adresi: bensuertek@hotmail.com

