



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ



**METAL NANOPARÇACIK MODİFİYE KALEM GRAFİT
ELEKTROT KULLANILARAK AKIŞA ENJEKSİYON ANALİZDE
SENSÖR VE BİYOSENSÖR UYGULAMALARI**

Serkan KARAKAYA

Kimya Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

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

**METAL NANOPARÇACIK MODİFİYE KALEM GRAFİT
ELEKTROT KULLANILARAK AKIŞA ENJEKSİYON ANALİZDE
SENSÖR VE BİYOSENSÖR UYGULAMALARI**

Serkan KARAKAYA

Kimya Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 28/01/2019

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Yusuf DİLGİN

ÇANAKKALE

Serkan KARAKAYA tarafından Prof. Dr. Yusuf DİLGİN yönetiminde hazırlanan ve 28/01/2019 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Metal Nanoparçacık Modifiye Kalem Grafit Elektrot Kullanılarak Akışa Enjeksiyon Analizde Sensör ve Biyosensör Uygulamaları**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof. Dr. Yusuf DİLGİN

Başkan

Prof. Dr. Selehattin YILMAZ

Üye

Prof. Dr. Hatice İsmet GÖKÇEL

Üye

Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

Üye

Doç. Dr. Funda ÖZTÜRK

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



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

Serkan KARAKAYA

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve alanımda yetişmemde büyük emekleri olan çok kıymetli danışman hocam sayın Prof. Dr. Yusuf DİLGİN'e tüm içtenliğimle teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora tez çalışmalarım süresince bilgileri ve deneyimleriyle bana yol gösteren değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Hatice İsmet GÖKÇEL'e ve sayın Prof. Dr. Selehattin YILMAZ'a çok teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmalarım süresince tecrübelerinden faydalandığım Dr. Bensu ERTEK'e, Yüksek Kimyager Özlem SAĞLAM'a ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Mehmet GÜNEŞ'e, Yüksek Kimyager Gamze EMİR'e ve Yüksek Kimyager Selen AYAZ'a teşekkür ederim. Ayrıca doktora tez çalışmalarım süresince manevi yardımlarını ve desteğini gördüğüm Arş. Gör. Dr. Melek TERCAN YAVAŞOĞLU'na çok teşekkür ederim. Tez çalışmalarım süresince laboratuvar imkânlarından faydalandığım Kimya Bölüm Başkanlığına teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmalarım süresince maddi manevi desteklerini esirgemeyen, yaşadığım zorluklar karşısında hep yanımda olan sevgili annem Hava KARAKAYA'ya ve sevgili babam Ömer KARAKAYA'ya çok teşekkür ederim. Akademik hayatta tecrübeleriyle bana yol gösteren, kıymetli dayım Bozok Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. İsmail AKDENİZ'e çok teşekkür ederim. Bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi değerli hocam sayın Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca doktora tezi kapsamında gerçekleştirilen ölçümler için sağladığı cihaz desteği sebebiyle değerli hocam sayın Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK'e teşekkürü bir borç bilirim.

2211/E Doğrudan Yurtiçi Doktora Bursiyerliği programı kapsamında tarafıma sağladığı burs için TÜBİTAK'a (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna) çok teşekkür ederim. Ayrıca Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) kapsamında tez çalışmalarına maddi destek sağlayan YÖK'e (Yüksek Öğretim Kurumuna) teşekkürü bir borç bilirim.

Serkan KARAKAYA
Çanakkale, Ocak 2019

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Amper
AA	L-Askorbik asit
Ag	Gümüş
AgCl	Gümüş klorür
AOx	Askorbat oksidaz
BRBS	Britton Robinson tampon çözeltisi (Britton Robinson Buffer Solution)
C	Derişim
CH ₃ COOH	Asetik asit
cm	Santimetre
CV	Döngüsel voltammetri (Cyclic voltammetry)
DA	Dopamin
dk	Dakika
DPV	Differansiyel puls voltammetri (Differential pulse voltammetry)
e ⁻	Elektron
EDX	Enerji yayınlımlı X-ışını (Energy dispersive X-ray)
FAD	Flavin adenin dinükleotit
FADH ₂	Flavin adenin dinükleotitin indirgenmiş kinon formu
FI	Akışa enjeksiyon (Flow injection)
FIA	Akışa enjeksiyon analizi
g	Gram
GL	D(+)-Glukoz
GLA	L-Glutamik asit
GOx	Glukoz oksidaz
H ⁺	Proton
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
H ₃ BO ₃	Borik asit
H ₃ PO ₄	Fosforik asit
KCl	Potasyum Klorür
LOD	Gözlenebilme sınırı (Limit of detection)
LOQ	Kantitatif ölçme sınırı (Limit of quantification)
M	Molar

mA	Miliamper
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MNP	Metal nanoparçacıklar
mV	Milivolt
μ A	Mikroamper
μ L	Mikrolitre
nA	Nanoamper
NaOH	Sodyum hidroksit
Nf	Nafyon
NP	Nanoparçacık
PBS	Fosfat tampon çözeltisi (Phosphate buffer solution)
PGE	Kalem grafit elektrot (Pencil graphite electrode)
p.PGE	Ön koşullandırılmış (Pre-treated) PGE
s	Saniye
SA	Sitrik asit
SAL	Salisilik asit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
ÜA	Ürik asit
V	Volt
XRD	X-ışını kırınımı
-Z''	Sanal direnç
Z'	Gerçek direnç

ÖZET

METAL NANOPARÇACIK MODİFİYE KALEM GRAFİT ELEKTROT KULLANILARAK AKIŞA ENJEKSİYON ANALİZDE SENSÖR VE BİYOSENSÖR UYGULAMALARI

Serkan KARAKAYA

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Yusuf DİLGİN

28/01/2019, 228

Bu tez çalışmasında, (i) yüksek iletkenlik özelliğine ve katalitik etkinliğe sahip metal nanoparçacıklar (Au, Pt ve Pd), (ii) ucuz ve tek kullanımlık kalem grafit elektrot (pencil graphite electrode, PGE), (iii) hızlı ve rutin analizlere olanak sağlayan akışa enjeksiyon analiz (Flow Injection Analysis, FIA) metodu gibi üç faydalı bileşen üzerinden elektrokimyasal sensör ve biyosensör çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Au, Pt, Pd ve Pt-Pd nanoparçacıklar PGE yüzeyine elektrokimyasal olarak biriktirilmiş ve elde edilen elektrotların H_2O_2 'ye yanıtı döngüsel voltammetri (CV) tekniği ile incelenmiştir. Elektrokimyasal H_2O_2 sensörü, sırasıyla Au ve Pt ile Pd ve Pt-Pd modifiye PGE'lerde H_2O_2 'nin yükseltgenmesi ve indirgenmesi üzerine geliştirilmiştir. Her bir modifiye elektrot için çalışma potansiyeli ve akış hızı optimize edilmiş ve FIA sisteminde amperometrik H_2O_2 sensörünün analitiksel parametreleri belirlenmiş ve gerçek örneklere uygulanabilirlikleri başarıyla test edilmiştir.

Tezin ikinci kısmında ise metal/bimetal nanoparçacık modifiye PGE'ler yüzeyine glukoz oksidaz (GOx) immobilize edilmiş ve glukoz biyosensör çalışmaları CV tekniğiyle gerçekleştirilmiştir. Glukoza en iyi elektrokatalitik etkinliğin ve yanıtın alındığı elektrotlar GOx immobilize Pt ve Pt-Pd modifiye PGE'ler olarak belirlenmiştir. Her iki elektrot için FIA sisteminde geliştirilen amperometrik glukoz biyosensörünün optimize edilen koşullar altında analitiksel performansları belirlenmiş ve gerçek örneklere uygulanabilirlikleri başarıyla test edilmiştir. Askorbik asit, dopamin ve ürik asitin geliştirilen glukoz biyosensörüne girişim etkileri, $NaBiO_3$ önyükseltgeyicisi kullanılarak önemli derecede

giderilmiştir. Sonuç olarak, metal/bimetal nanoparçacık, PGE ve FIA sistemi bir arada kullanılarak ucuz, hızlı, duyarlı elektrokimyasal sensör ve biyosensör tasarlanması, girişimcilerin giderilmesinde FIA'da NaBiO₃ ön yükseltgeyicisinin ilk defa kullanılması bu çalışmanın özgün kısmını oluşturmaktadır.

Anahtar sözcükler: Elektrokimyasal Sensör/Biyosensör, Akışa Enjeksiyon Analizi, Glukoz Oksidaz, Sodyum Bizmutat, Metal Nanoparçacık, Kalem Grafit Elektrot.



ABSTRACT

SENSOR AND BIOSENSOR APPLICATIONS IN FLOW INJECTION ANALYSIS USING METAL NANOMATERIAL MODIFIED PENCIL GRAPHITE ELECTRODE

Serkan KARAKAYA

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Science and Engineering

Doctoral Dissertation in Chemistry

Advisor : Prof. Dr. Yusuf DİLGİN

28/01/2019, 228

In this thesis, electrochemical sensor and biosensor studies were performed based on three useful components (i) metal nanoparticles (Au, Pt and Pd) with their high conductivity and catalytic activity, (ii) low-cost and disposable pencil graphite electrode (PGE) and (iii) flow injection analysis (FIA) which provides fast and routine analysis. For this purpose, Au, Pt, Pd and Pt-Pd nanoparticles were electrochemically deposited on the PGE surface and the response of the obtained electrodes to H_2O_2 was investigated by using cyclic voltammetry (CV) technique. The electrochemical H_2O_2 sensor was developed on the oxidation and reduction of H_2O_2 at the Au, Pt and Pd, Pt-Pd modified PGEs, respectively. The applied potential and flow rate for each modified electrode has been optimized and the analytical parameters of the amperometric H_2O_2 sensor in FIA have been determined and their applicability to the real samples has been successfully tested.

In the second part of the thesis, glucose oxidase (GOx) was immobilized on the surface of metal/bimetal nanoparticle modified PGEs and glucose biosensor studies were performed by using CV technique. The electrodes which give the best electrocatalytic activity and response to glucose were identified as GOx immobilized Pt and Pt-Pd modified PGEs. Analytical performances of the amperometric glucose biosensor constructed in FIA system for both electrodes were determined under optimized conditions and their applicability to the real samples was successfully tested. The interference effects of ascorbic acid, dopamine and uric acid on the developed glucose biosensor were significantly reduced by using a pre-oxidant, $NaBiO_3$. As a result, the design of cheap, fast, sensitive electrochemical sensor and biosensor using a combination of metal/bimetal

nanoparticle, PGE and FIA system and the uses of the NaBiO_3 as a pre-oxidant for the first time in FIA system for the elimination of interferences constitutes the original part of this study.

Keywords: Electrochemical Sensor/Biosensor, Flow Injection Analysis, Glucose Oxidase, Sodium Bismuthate, Metal Nanoparticle, Pencil Graphite Electrode.



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxviii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1. Elektrokimyasal Sensör ve Biyosensör Tasarımında Kalem Grafit Elektrot (Pencil Graphite Electrode, PGE).....	5
1.2. Elektrokimyasal Sensör ve Biyosensör Yapımında Kullanılan Metal Nanoparçacıklar	8
1.3. Elektrokimyasal Sensör ve Biyosensör Tasarımında Akışa Enjeksiyon Analizi (FIA).....	10
1.4. Hidrojen Peroksidin Çevre ve Canlı Sistemlerdeki Önemi.....	11
1.5. Glukoz Oksidaz (GOx) Temelli Elektrokimyasal Glukoz Biyosensörleri.....	12
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	16
2.1. Kalem Grafit Elektrot Kullanılarak Gerçekleştirilen Elektrokimyasal Sensör/Biyosensör Çalışmaları	16
2.2. Akışa Enjeksiyon Analiz Sisteminde Gerçekleştirilen Amperometrik H ₂ O ₂ Sensör ve Glukoz Biyosensör Çalışmaları.....	24
2.3. PGE Kullanılarak FIA Sisteminde Gerçekleştirilen Amperometrik Sensör ve Biyosensörler.....	31
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	37
3.1. Sarf Edilen Kimyasal Malzemeler	37
3.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	37
3.3. Tez Çalışmalarında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	39
3.3.1. Elektrokimyasal Sensör ve Biyosensör Çalışmalarında Kullanılan Destek Çözeltilerin Hazırlanması	39
3.3.2. Metal Nanoparçacık Modifiye Kalem Grafit Elektrotların (MNPs/PGE) Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler	40

3.3.3. Oksidaz Enzimlerinin MNPs/PGE'lere İmmobilizasyonunda Kullanılan Çözeltiler	41
3.3.4. CV ve İmpedans Analizleri için Hazırlanan Redoks Probu Çözeltisi.....	41
3.3.5. Metal Nanoparçacık Modifiye PGE'lerin H ₂ O ₂ 'ye Elektrokatalitik Yanıtlarının CV Yöntemi ile İncelenmesinde Kullanılan Çözeltiler.....	41
3.3.6. FIA Sisteminde Amperometrik H ₂ O ₂ Sensör Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler	42
3.3.7. GOx Modifiye MNP/PGE'lerin Glukoza Elektrokatalitik Yanıtının CV ile İncelenmesinde Kullanılan Çözeltiler	43
3.3.8. FIA Sisteminde Glukoza Amperometrik Cevabın İncelenmesinde Kullanılan Çözeltiler	43
3.3.9. Permanganometrik Titrasyonda Kullanılan Çözeltiler	44
3.4. Metal Nanoparçacık Modifiye PGE'lerin Hazırlanışı, GOx İmmobilizasyonu ve Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi	44
3.4.1. Kalem Grafit Elektrodun (PGE) Ön Koşullandırılması İşlemi	44
3.4.2. Monometalik Nanoparçacıkların p.PGE Yüzeyine Elektrokimyasal Olarak Biriktirilmesi.....	45
3.4.3. Bimetalik Nanoparçacıkların p.PGE Yüzeyine Elektrokimyasal Modifikasyonu	45
3.4.3.1. Bimetallik Nanoparçacık Elektrotların p.PGE Yüzeyine Ardışık Biriktirilerek Hazırlanması	45
3.4.3.2. Bimetallik Nanoparçacık Elektrotların p.PGE Yüzeyine Eşzamanlı Biriktirilerek Hazırlanması (Metal 1-Metal 2/p.PGE).....	47
3.4.4. p.PGE ve Metal Nanoparçacık Modifiye p.PGE'lere GOx Enziminin İmmobilasyonu	47
3.4.5. Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi	48
3.4.6. Modifiye Elektrotların Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesi	48
3.5. Elektrokimyasal H ₂ O ₂ Sensörü Çalışmaları.....	49
3.5.1. Metal Nanoparçacık Modifiye PGE'lerin H ₂ O ₂ 'ye Elektrokatalitik Yanıtlarının Döngüsel Voltametri Yöntemi ile İncelenmesi	49
3.5.2. FIA Sisteminde Amperometrik H ₂ O ₂ Sensör Çalışmaları.....	49
3.5.2.1. Girişim Çalışmaları.....	50
3.5.2.2. Tasarlanan Sensörün Gerçek Örnekte Uygulama Çalışmaları	50
3.5.2.3. FIA Sisteminde Tekrarlanabilirlik ve Kararlılık Testleri	51
3.6. Permanganometrik Titrasyon Metodu Kullanılarak H ₂ O ₂ Tayini.....	52
3.6.1. 0,05 M KMnO ₄ Çözeltisinin Na ₂ C ₂ O ₄ 'e Karşı Ayarlanması	52

3.6.2. Ayarlı KMnO_4 (0,048 M) Çözeltisi ile Gerçek Örneklerdeki H_2O_2 'nin Titr Edilmesi	52
3.7. Elektrokimyasal Glukoz Biyosensör Çalışmaları	52
3.7.1. GOx-CT/MNP/p.PGE'lerin Glukoza Elektrokatalitik Yanıtlarının Döngüsel Voltammetri Yöntemi ile İncelenmesi	52
3.7.2. FIA Sisteminde Amperometrik Glukoz Biyosensör Çalışmaları	53
3.7.2.1. FIA Sisteminde Girişim Çalışmaları	53
3.7.2.2. FIA Sisteminde Gerçek Örneğe Uygulama Çalışmaları	54
3.7.2.3. FIA Sisteminde Tekrarlanabilirlik ve Kararlılık Çalışmaları	54
BÖLÜM 4	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	55
4.1. H_2O_2 'nin Elektrokimyasal Tayinine Yönelik Sensör Çalışmaları	55
4.1.1. Au/p.PGE ile Gerçekleştirilen Çalışmalar	55
4.1.1.1. AuNP'lerin p.PGE Yüzeyine Elektrokimyasal Biriktirilmesi	55
4.1.1.2. Au/p.PGE'lerin Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi	55
4.1.1.3. Au/p.PGE'lerin Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesi	59
4.1.1.4. Au/p.PGE'de H_2O_2 'nin Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi	64
4.1.1.5. Au/p.PGE ile FIA Sisteminde Gerçekleştirilen Çalışmalar	69
4.1.1.5.1. Uygulama Potansiyelinin Belirlenmesi	69
4.1.1.5.2. Taşıyıcı Çözeltinin Akış Hızının Belirlenmesi	71
4.1.1.5.3. Analitiksel Parametrelerin Belirlenmesi	72
4.1.1.5.4. Au/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Sensörün Seçiciliğinin İncelenmesi	75
4.1.1.5.5. Au/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan H_2O_2 Sensörünün Gerçek Örneğe Uygulanması	77
4.1.1.5.6. Au/p.PGE'nin Tekrarlanabilirliğinin ve Kararlılığının Test Edilmesi ..	79
4.1.2. Pt/p.PGE ile Gerçekleştirilen Çalışmalar	81
4.1.2.1. PtNP'lerin p.PGE Yüzeyine Elektrokimyasal Biriktirilmesi	81
4.1.2.2. Pt/p.PGE'lerin Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi	82
4.1.2.3. Pt/p.PGE'lerin Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesi	85
4.1.2.4. Pt/p.PGE'de H_2O_2 'nin Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi	88
4.1.2.5. Pt/p.PGE ile FIA Sisteminde Gerçekleştirilen Çalışmalar	92
4.1.2.5.1. Uygulama Potansiyelinin Belirlenmesi	92
4.1.2.5.2. Taşıyıcı Çözeltinin Akış Hızının Belirlenmesi	95
4.1.2.5.3. Analitiksel Parametrelerin Belirlenmesi	96

4.1.2.5.4. Pt/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Sensörün Seçiciliğinin İncelenmesi	97
4.1.2.5.5. Pt/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Sensörün H ₂ O ₂ İçeren Bir Örneğe Uygulanması	99
4.1.2.5.6. Pt/p.PGE'nin Tekrarlanabilirliğinin ve Kararlılığının Test Edilmesi .	101
4.1.3. Pd/p.PGE ile Gerçekleştirilen Çalışmalar	103
4.1.3.1. PdNP'lerin p.PGE Yüzeyine Elektrokimyasal Biriktirilmesi.....	103
4.1.3.2. Pd/p.PGE'lerin Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi	104
4.1.3.3. Pd/p.PGE'lerin Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesi	107
4.1.3.4. Pd/p.PGE'de H ₂ O ₂ 'nin Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi	110
4.1.3.5. Pd/p.PGE ile FIA Sisteminde Gerçekleştirilen Çalışmalar	116
4.1.3.5.1. Uygulama Potansiyelinin Belirlenmesi.....	116
4.1.3.5.2. Taşıyıcı Çözeltinin Akış Hızının Belirlenmesi	118
4.1.3.5.3. Analitiksel Parametrelerin Belirlenmesi	119
4.1.3.5.4. Pd/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Sensörün Seçiciliğinin İncelenmesi	121
4.1.3.5.5. Pd/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Sensörün H ₂ O ₂ İçeren Örneklere Uygulanması	124
4.1.3.5.6. Pd/p.PGE'nin Tekrarlanabilirliğinin ve Kararlılığının Test Edilmesi	125
4.1.4. Bimetalik Nanoparçacık Modifiye p.PGE ile Gerçekleştirilen Çalışmalar	127
4.1.4.1. Bimetalik Nanoparçacık Modifiye p.PGE'lerin H ₂ O ₂ 'ye Elektrokatalitik Yanıtının İncelenmesi	127
4.1.4.2. Bimetalik (Pt-Pd) Nanoparçacıkların p.PGE Yüzeyine Eşzamanlı Biriktirilmesi	130
4.1.4.3. Pt-Pd/p.PGE'lerin Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi	132
4.1.4.4. Pt-Pd/p.PGE'nin Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesi.....	135
4.1.4.5. Pt-Pd/p.PGE ile FIA Sisteminde Gerçekleştirilen Çalışmalar	138
4.1.4.5.1. Uygulama Potansiyelinin Belirlenmesi.....	138
4.1.4.5.2. Taşıyıcı Çözeltinin Akış Hızının Belirlenmesi	139
4.1.4.5.3. Analitiksel Parametrelerin Belirlenmesi	140
4.1.4.5.4. Pt-Pd/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Sensörün Seçiciliğinin İncelenmesi	143
4.1.4.5.5. Pt-Pd/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Sensörün H ₂ O ₂ İçeren Örneklere Uygulanması	145
4.1.4.5.6. Pt-Pd/p.PGE'nin Tekrarlanabilirliğinin ve Kararlılığının Test Edilmesi	147

4.2. H ₂ O ₂ 'nin Enzimsiz Redoks Tepkimelerinin Mekanizmaları	148
4.3. Tasarlanan Amperometrik H ₂ O ₂ Sensörlerinin Literatürdeki Benzer Çalışmalar ile Karşılaştırılması	149
4.4. Metalik/Bimetalik Nanoparçacık Modifiye PGE Kullanılarak Glukoz Oksidaz (GOx) Enzimine Dayalı Biyosensör Çalışmaları	155
4.4.1. GOx İmmobilizasyonu ve Tasarlanan Biyosensöre ait Döngüsel Voltammetrik Çalışmalar	155
4.4.2. GOx İmmobilize Edilmiş Pt ve Pt-Pd Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi.....	161
4.4.3. Enzim İmmobilize Elektrotların Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesi	163
4.4.4. Elektrokimyasal Glukoz Biyosensörü Tasarımında Döngüsel Voltammetri Yöntemiyle Optimizasyon Çalışmaları	164
4.4.4.1. İmmobilizasyon Esnasında Kullanılacak GOx Derişiminin Optimizasyonu	165
4.4.4.2. Glukoz Biyosensöründe Destek Elektrolit pH'sının Optimizasyonu	166
4.4.5. GOx-CT/Pt/p.PGE Kullanılarak FIA'da Glukoz Biyosensörü Çalışmaları .	167
4.4.5.1. Uygulama Potansiyelinin Belirlenmesi	167
4.4.5.2. Taşıyıcı Çözeltinin Akış Hızının Belirlenmesi.....	169
4.4.5.3. GOx-CT/Pt/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Glukoz Biyosensörünün Analitiksel Parametrelerinin Belirlenmesi.....	170
4.4.5.4. GOx-CT/Pt/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Glukoz Biyosensörünün Seçiciliğinin İncelenmesi	173
4.4.5.5. GOx-CT/Pt/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Biyosensörün Glukoz İçeren Örneklere Uygulanması	185
4.4.5.6. GOx-CT/Pt/p.PGE'nin Tekrarlanabilirliğinin ve Kararlılığının Test Edilmesi	187
4.4.6. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE Kullanılarak FIA Sisteminde Glukoz Biyosensörü Çalışmaları.....	189
4.4.6.1. Uygulama Potansiyelinin Belirlenmesi	189
4.4.6.2. Taşıyıcı Çözeltinin Akış Hızının Belirlenmesi.....	190
4.4.6.3. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Glukoz Biyosensörünün Analitiksel Parametrelerinin Belirlenmesi.....	191
4.4.6.4. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Glukoz Biyosensörünün Seçiciliğinin İncelenmesi	193
4.4.6.5. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Biyosensörün Glukoz İçeren Örneklere Uygulanması	199

4.4.4.6. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin Tekrarlanabilirliğinin ve Kararlılığının Test Edilmesi	201
4.5. Glukozun Enzimatik Redoks Tepkimelerine İlişkin Mekanizmalar	202
4.6. Tasarlanan Amperometrik Glukoz Biyosensörlerinin Literatürdeki Benzer Çalışmalar ile Karşılaştırılması	203
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER	207
5.1. Metal/Bimetal Nanoparçacık Modifiye PGE'lerin Hazırlanması, Elektrokimyasal ve Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesi ve H ₂ O ₂ 'ye Elektrokimyasal Yanıtı	208
5.2. Metal/Bimetal Nanoparçacık Modifiye Elektrotlar ile H ₂ O ₂ 'nin FIA Sisteminde Amperometrik Tayini	209
5.3. GOx İmmobilize Pt ve Pt-Pd/p.PGE'lerin Hazırlanması, Glukoza Yanıtı ve Elektrokimyasal ve Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesi	211
5.4. GOx İmmobilize Modifiye Elektrotlar ile Glukozun FIA Sisteminde Amperometrik Tayini	212
KAYNAKLAR	215
EKLERİ	I
EK 1. Sensitive Flow-Injection Electrochemical Determination of Hydrogen Peroxide at a Palladium Nanoparticle-Modified Pencil Graphite Electrode (<i>Tezden Üretilen SCI Yayını</i>)	II
EK 2. Flow Injection Amperometric Analysis of H ₂ O ₂ at Platinum Nanoparticles Modified Pencil Graphite Electrode (<i>Tezden Üretilen SCI Yayını</i>)	III
EK 3. Flow Injection Analysis of H ₂ O ₂ Using Pd Nanoparticles Modified Pencil Graphite Electrode (<i>Tezden Üretilen Uluslararası Poster Bildiri</i>)	IV
EK 4. Electrochemical Determination of H ₂ O ₂ in Flow Injection Analysis System with Using Platinum Nanoparticles Modified Pencil Graphite Electrode (<i>Tezden Üretilen Uluslararası Poster Bildiri</i>).....	V
EK 5. Altın Nanoparçacık Modifiye Kalem Grafit Elektrot Kullanılarak H ₂ O ₂ 'in Akışa Enjeksiyon Analiz Sisteminde Elektrokimyasal Tayini (<i>Tezden Üretilen Ulusal Sözlü Bildiri</i>).....	VI
ÖZGEÇMİŞ	VII

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Biyosensörün bileşenleri ve çalışma prensibi (Shavanova ve ark., 2016; Solanki ve Kaushik, 2011; Ronkainen ve ark., 2010).....	2
Şekil 1.2. Dönüştürücü sisteme göre biyosensörlerin sınıflandırılması (Shavanova ve ark., 2016)	2
Şekil 1.3. Elektrokimyasal bir dönüştürücü ile birlikte bir biyosensörün şematize edilmiş hali (Ronkainen ve ark., 2010).....	3
Şekil 1.4. Kurşun kalemlerin renk tonları ve karbon yüzdeleri (Queen Studies Authority)....	7
Şekil 1.5. Normal bir FIA sisteminin şematik gösterimi (Trojanowicz ve Kołacińska, 2016)	10
Şekil 1.6. 1., 2. ve 3. nesil amperometrik biyosensörlerde glukozun enzimatik yükseltgenmesinin şematik özeti (Toghill ve Compton, 2010; Chen ve ark., 2013a)	15
Şekil 2.1. PGE yüzeyine Ag/FeOOH modifiye edilerek hazırlanan bir elektrokimyasal H ₂ O ₂ sensörüne ilişkin şematik gösterim (Zhang ve Zheng, 2015).....	17
Şekil 2.2. Pt nanoparçacık modifiye PGE kullanılarak iki farklı uygulama potansiyelinde (+500 mV ve +700 mV) H ₂ O ₂ 'nin ardı sıra 10 µM'lık eklemeleri sonucunda alınan amperometrik yanıtlara ait akım-zaman grafikleri (Destek çözelti: 0,10 M pH 7,0 PBS) (Kawde ve ark., 2015).....	17
Şekil 2.3. Yalın (a ve a') ve Pd modifiye PGE (b ve b') için +800 mV uygulama potansiyelinde (a ve b) H ₂ O ₂ 'nin ardı sıra 10 µM'lık eklemeleri sonucunda alınan amperometrik yanıtlara ait akım-zaman grafikleri ve -250 mV uygulama potansiyelinde (a' ve b') ardı sıra 50 µM'lık eklemeleri sonucunda alınan amperometrik yanıtlara ait akım-zaman grafikleri (Destek çözelti: 0,10 M pH 7,0 PBS) (Aziz ve Kawde, 2013).....	18
Şekil 2.4. a) H ₂ O ₂ tayini için Cu/PGE'de kaydedilen DP voltammogramları (Destek çözelti: 0,10 M NaOH çözeltisi) ve b) Elde edilen kalibrasyon eğrisi (Kamyabi ve Hajari, 2017)	19
Şekil 2.5. Mikrotitrasyon plakalarında GOx modifiye PGE'nin hazırlanmasına ve robotik amperometrik glukoz biyosensörüne ilişkin şematik gösterimler (YE: yardımcı elektrot; ÇE: çalışma elektrodu ve RE: referans elektrot) (Teaphonkrang ve Schulte, 2017)	20
Şekil 2.6. Glukozun tayini için geliştirilen rGO-GOx/PPGE biyosensörünün yapımına ait şematik gösterim (Vijayaraj ve ark., 2016).....	21
Şekil 2.7. İğne tipi glukoz biyosensörüne ait şematik gösterim (Chen ve ark., 1992)	22
Şekil 2.8. a) Nanoparçacık modifiye elektrodun 10 µM H ₂ O ₂ 'ye verdiği FI amperometrik yanıt ve b) 0,50 nM H ₂ O ₂ 'nin sisteme enjeksiyonu ile alınan yanıt (Uygulama potansiyeli +500 mV; taşıyıcı çözelti: pH 7,2 PBS ve akış hızı: 1,0 mL/dk) (Chakraborty ve Raj, 2009).....	24
Şekil 2.9. FI Amperometrik sistemde 0,1 – 1,0 mM H ₂ O ₂ için elde edilen a) FI amperomogramları ve b) kalibrasyon grafiği (Reanpang ve ark., 2015).....	25
Şekil 2.10. APS-PFeW ₁₁ -CPE için H ₂ O ₂ 'nin artan derişimlerine alınan FI amperometrik yanıtlar (Taşıyıcı çözelti: 0,5 M pH 2,0 H ₂ SO ₄ ; uygulama potansiyeli: 0 mV (vs. Ag/AgCl); örnek hacmi: 75 µL ve akış hızı 0,6 mL/dk) (Hamidi ve ark., 2009)	25
Şekil 2.11. GOx-POM-g-rGO için a) glukozun artan derişimlerine (2 – 20 mM) alınan FI amperometrik yanıtlar ve b) 0,2 mM askorbik asit (AA) ve ürik asit (ÜA) girişimcilerinin varlığında 2,0 mM glukozun FI-Amperometrik yanıtları	

(Uygulama potansiyeli: +20 mV ve akış hızı 1,0 mL/dk) (Yang ve ark., 2016)	26
Şekil 2.12. GOx/ANFE ve GOx/Au elektrotlar için glukozun artan derişimlerine alınan FI amperometrik yanıtlaa ait akım-zaman grafikleri ve kalibrasyon grafikleri (Uygulama potansiyeli: +500 mV) (Yang ve ark., 2014)	27
Şekil 2.13. FIA sisteminde fotoamperometrik ve amperometrik metotlar ile GOx-CT/ZnS-CdS/MWCNT/GCE için glukozun artan derişimlerine bağlı olarak kaydedilen amperomogramlar (Taşıyıcı çözelti: pH 6,0 BRBS; uygulama potansiyeli: -500 mV ve akış hızı: 1,5 ml/dk) (Sağlam ve Dilgin, 2017)	28
Şekil 2.14. GOx/CT/ZnS-CdS/PGE için 0,01 mM – 1,0 mM arasında artan glukoz derişimine bağlı FIA’da kaydedilen amperomogramlar (Taşıyıcı çözelti: pH 6,0 BRBS; uygulama potansiyeli: -500 mV ve akış hızı: 1,3 mL/dk) (Sağlam ve ark., 2016)	31
Şekil 2.15. GDH/CdS-ZnS/MAA/PGE kullanılarak FIA sisteminde glukozun farklı derişimleri varlığında elde edilen amperometrik (ışıksız) ve fotoamperometrik (ışıklı) yanıtlaa ait akım-zaman eğrileri (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl ve 10 mM NAD ⁺ içeren 0,10 M PBS (pH 7,0); uygulama potansiyeli: +800 mV; akış hızı: 0,6 mL/dk; örnek hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm) (Ertek ve ark., 2016)	32
Şekil 2.16. GDH/Poly-MB/PAMAM/PGE kullanılarak 0,01 – 5,0 mM arasında değişen glukoz derişimine bağlı FIA’da kaydedilen amperomogramlar (Uygulama potansiyeli: +200 mV; akış hızı: 0,6 mL/dk; taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl ve 10 mM NAD ⁺ içeren 0,1 M PBS çözeltisi (pH 7,0)) (Dilgin ve ark, 2018)	33
Şekil 2.17. A) Atık bambu çubuklarındaki enzim hidrolizatındaki glukoz içeriğinin gerçek zamanlı tayini için enzim elektrodu ile birlikte FIA sistemine sistemine ait şematik gösterim ve B) özel olarak tasarlanan üç elektrotlu akış hücresinin üstten (solda) ve yandan (sağda) görünümü (Cheng ve ark., 2012)	35
Şekil 3.1. Çalışma elektrodunu sabitlemek amacıyla kullanılan, elektriksel bağlantısı yapılmış Rotring (Germany) Tikky 0,50 mm mekanik uçlu kalemi	38
Şekil 3.2. FIA çalışmalarında kullanılan, PGE için tasarlanmış akış enjeksiyon analiz hücresinin temsili bir gösterimi (teflondan yapılmış gövde: T; fiber optik ışık kaynağı: L; kuartz cam pencere: G) (Dilgin, 2015; Sağlam ve ark., 2016)	39
Şekil 3.3. Modifiye elektrotların hazırlanması sürecinin temsili bir gösterimi	48
Şekil 3.4. FIA sisteminin temsili bir gösterimi	49
Şekil 4.1. p.PGE’nin, 0,02 M KCl ve 0,2 mM HAuCl ₄ içeren ve Ar ile doyurulmuş 0,02 M pH 7,0 PBS’de ardışık 40 döngü ile kaydedilen CV’leri (Tarama hızı: 50 mV/s)	55
Şekil 4.2. PGE, p.PGE ve elektrobiriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Au/p.PGE’lerin 0,01 M K ₃ [Fe(CN) ₆], 0,01 M K ₄ [Fe(CN) ₆] içeren 0,1 M KCl destek çözeltisinde kaydedilen CV’leri (tarama hızı: 50 mV/s)	56
Şekil 4.3. Elektrokimyasal impedans devre modeli ve impedans eğrisinin gösterimi (R _s : çözelti direnci; R _{et} : elektron transfer direnci; C: sığa; W: Warburg impedansı) (Sağlam, 2016)	57
Şekil 4.4. PGE, p.PGE ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Au/p.PGE’lerin 0,01 M K ₃ [Fe(CN) ₆], 0,01 M K ₄ [Fe(CN) ₆] içeren 0,1 M KCl destek çözeltisinde kaydedilen impedans eğrileri (Uygulanan frekans aralığı: 100000 Hz – 0,1 Hz; uygulanan potansiyel: +170 mV; sinüsodiyal sinyal: 5 mV)	58
Şekil 4.5. p.PGE (a, 1 µm x5000) ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayısının kullanımıyla elde edilen AuNP modifiye elektrotların SEM	

	görüntüleri: b) 5, c) 10, d) 20, e) 30 ve f) 40 döngü, 1 μm x20000).....	60
Şekil 4.6.	Elektrokimyasal biriktirme esnasında 40 döngü ile elde edilen Au/p.PGE'nin farklı yakınlıştırılma oranlarında kaydedilen SEM görüntüleri; a) 10 μm x350; b) 1 μm x3500; c) 1 μm x20000 ve d) 100 nm x30000	61
Şekil 4.7.	p.PGE'nin (A) ve elektrokimyasal biriktirme esnasında 40 döngü ile elde edilen Au/p.PGE'nin (B) EDX ve p.PGE (siyah) ve Au/p.PGE'nin (turuncu) (C) XRD spektrumu.....	63
Şekil 4.8.	Au/p.PGE'nin pH'sı 2,0 ile 12 arasında değişen BRBS ve 0,1 M NaOH çözeltisinde (siyah voltammogramlar), 16 mM H_2O_2 varlığında (kırmızı voltammogramlar) kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50 mV/s)	65
Şekil 4.9.	p.PGE (A) ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayılarında (5 (B), 10 (C), 20 (D), 30 (E) ve 40 (F)) hazırlanan Au/p.PGE'lerin 0,10 M KCl içeren 0,10 M NaOH çözeltisinde (siyah voltammogramlar) ve 16 mM (kırmızı voltammogramlar) H_2O_2 varlığında kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50mV/s)	67
Şekil 4.10.	A) p.PGE ve B) Au/p.PGE'nin 0,1 M KCl içeren 0,1 M NaOH destek çözeltisinde artan H_2O_2 derişimine (0, 8, 16 ve 32 mM) bağlı olarak kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50mV/s).....	68
Şekil 4.11.	p.PGE (A ve B) ve Au/p.PGE'nin (C ve D) farklı uygulama potansiyel değerlerinde 100 μM H_2O_2 'nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (A ve C) (Taşıyıcı çözelti: Ar ile doyurulmuş 1,0 M KCl ihtiva eden 0,1 M NaOH çözeltisi; akış hızı: 2,0 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: 100 μL ; kolon uzunluğu: 10 cm) ve bu amperomogramlardan elde edilen akım-potansiyel değişim grafikleri (B ve D)	70
Şekil 4.12.	Au/p.PGE kullanılarak -300 mV (A) ve +400 mV (B) uygulama potansiyellerinde hava atmosferi, Ar ve O_2 ile ayrı ayrı doyurulmuş akış çözeltisi ortamında 100 μM H_2O_2 'nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Taşıyıcı çözelti: Ar ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren 0,10 M NaOH; akış hızı 2,0 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: 100 μL ; kolon uzunluğu: 10 cm)	71
Şekil 4.13.	Au/p.PGE'nin farklı akış hızlarında 100 μM H_2O_2 'nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (A) (Uygulama potansiyeli: +300 mV; taşıyıcı çözelti: Ar ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren 0,10 M NaOH çözeltisi; örnek kolonunun hacmi: 100 μL ; kolon uzunluğu: 10 cm) ve bu amperomogramlardan elde edilen akım-akış hızı değişim grafiği (B)	72
Şekil 4.14.	p.PGE (A) ve Au/p.PGE'nin (B) artan H_2O_2 derişimine bağlı olarak FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Uygulama potansiyeli: +300 mV; akış hızı 2,4 mL/dk; taşıyıcı çözelti: Ar ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren 0,10 M NaOH çözeltisi; örnek kolonunun hacmi: 100 μL ; kolon uzunluğu: 10 cm)	73
Şekil 4.15.	p.PGE (A ve B) ve Au/p.PGE'nin (C ve D) artan H_2O_2 derişimlerine (A için 10,0 μM – 10,0 mM ve C için 1,0 μM – 7,5 mM H_2O_2)) verdiği yanıtlara ait akım-derişim grafiği (A ve C) ve elde edilen kalibrasyon grafikleri (B için 10,0 μM – 5,0 mM H_2O_2 aralığında, $I(\mu\text{A}) = 0,0031 C(\mu\text{M}) + 0,2658$ ve $R^2 = 0,9984$ ve D için 1,0 μM – 1000 μM H_2O_2 aralığında $I(\mu\text{A}) = 0,0613 C(\mu\text{M}) + 0,5434$ ve $R^2 = 0,9993$)	74
Şekil 4.16.	Au/p.PGE'de 100 μM H_2O_2 göre artan oranlarda girişimci molekül (AA (A), DA (B), SA (C), GL (D), SAL (E), GLA (F) ve ÜA (G)) içeren çözeltilerin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramlar (Şekil 4.13'de	

	kullanılan optimize edilmiş koşullar altında).....	76
Şekil 4.17.	A) Seyreltik örnek (1/10000 seyreltik) ve bu örnekte 100, 250, 500, 750 ve 1000 μM H_2O_2 içerecek şekilde hazırlanan standart çözeltilerinin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.13’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında) ve B) Elde edilen standart katma grafiği ($I(\mu\text{A}) = 0,0469 C(\mu\text{M}) + 4,1504$ ve $R^2 = 0,9966$)	78
Şekil 4.18.	Au/p.PGE’de 100 μM H_2O_2 çözeltisinin ardışık 41 kez enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.13’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında).....	80
Şekil 4.19.	A) Au/p.PGE’de 100 μM H_2O_2 çözeltisinin günler arası üçer kez enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları ve B) akımın zamana (gün) bağlı değişimi (Şekil 4.13’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)	81
Şekil 4.20.	p.PGE’nin 1,0 mM H_2PtCl_6 içeren Ar ile doyurulmuş 0,10 M KCl’de ardışık 30 döngü ile kaydedilen CV’leri (Tarama hızı: 50 mV/s)	82
Şekil 4.21.	PGE, p.PGE ve elektrobiriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Pt/p.PGE’lerin 0,01 M $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 0,01 M $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ içeren 0,1 M KCl destek çözeltisinde kaydedilen CV’leri (Tarama hızı: 50 mV/s)....	83
Şekil 4.22.	PGE, p.PGE ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Pt/p.PGE’lerin 0,01 M $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 0,01 M $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ içeren 0,1 M KCl destek çözeltisinde kaydedilen impedans eğrileri (Uygulanan frekans aralığı: 100000 Hz – 0,1 Hz; uygulanan potansiyel: +170 mV; sinüsodiyal sinyal: 5 mV)	84
Şekil 4.23.	p.PGE (A, 1 μm x10000) ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayısının kullanımıyla elde edilen PtNP modifiye elektrotların SEM görüntüleri: B) 5, C) 10, D) 20, E) 30, F) 40 ve G) 50 döngü, 1 μm x30000) .	86
Şekil 4.24.	Elektrokimyasal biriktirme esnasında 30 döngü ile elde edilen Pt/p.PGE’nin (A) EDX ve p.PGE (siyah) ve Pt/p.PGE’nin (kırmızı) (B) XRD spektrumları	88
Şekil 4.25.	Pt/p.PGE’nin pH’sı 2 ile 12 arasında değişen BRBS’de ve 0,1 M NaOH çözeltisinde (siyah voltammogramlar), 16 mM H_2O_2 varlığında (kırmızı voltammogramlar) kaydedilen CV’leri (Tarama hızı: 50 mV/s)	89
Şekil 4.26.	p.PGE (A) ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayılarında (10 (B), 20 (C), 30 (D), 40 (E) ve 50 (F)) hazırlanan Pt/p.PGE’lerin, 0,10 M KCl içeren 0,10 M NaOH çözeltisinde (siyah voltammogramlar), 8 mM (kırmızı voltammogramlar) ve 16 mM (mavi voltammogramlar) H_2O_2 varlığında kaydedilen CV’leri (Tarama hızı: 50mV/s)	91
Şekil 4.27.	A) p.PGE ve B) Pt/p.PGE’nin 0,1 M KCl içeren 0,1 M NaOH destek çözeltisinde artan H_2O_2 derişimine (0, 2, 4, 8, ve 16 mM) bağlı olarak kaydedilen CV’leri (Tarama hızı: 50 mV/s)	92
Şekil 4.28.	p.PGE (A ve C) ve Pt/p.PGE’nin (B ve D) farklı uygulama potansiyel değerlerinde 100 μM H_2O_2 ’nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (A ve B) (Taşıyıcı çözelti: Ar ile doyurulmuş 1,0 M KCl ihtiva eden 0,1 M NaOH çözeltisi; akış hızı: 2,0 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: 100 μL ; kolon uzunluğu: 10 cm) ve bu amperomogramlardan elde edilen akım-potansiyel değişim grafikleri (C ve D)	93
Şekil 4.29.	Pt/p.PGE kullanılarak -300 mV (A) ve +100 mV (B) uygulama potansiyellerinde hava atmosferi, Ar ve O_2 ile ayrı ayrı doyurulmuş akış çözeltisi ortamında 100 μM H_2O_2 ’nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Taşıyıcı çözelti: Ar ile doyurulmuş 1,0 M KCl	

- içeren 0,10 M NaOH; akış hızı: 2,0 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm) 94
- Şekil 4.30. Pt/p.PGE'nin farklı akış hızlarında 100 µM H₂O₂'nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (A) (Uygulama potansiyeli: +100 mV; taşıyıcı çözelti: Ar ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren 0,10 M NaOH; örnek kolonunun hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm) ve bu amperomogramlardan elde edilen akım-akış hızı değişim grafiği (B) 95
- Şekil 4.31. p.PGE (A) ve Pt/p.PGE'nin (B) artan H₂O₂ derişimine bağlı olarak FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Uygulama potansiyeli: +100 mV; akış hızı 2,4 mL/dk; taşıyıcı çözelti: Ar ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren 0,10 M NaOH; örnek kolonunun hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm) 96
- Şekil 4.32. p.PGE (A ve B) ve Pt/p.PGE'nin (C ve D) artan H₂O₂ derişimlerine (A için 25,0 µM – 100,0 mM ve C için 2,5 µM – 10 mM H₂O₂) verdiği yanıtlara ait akım-derişim grafiği (A ve C) ve elde edilen kalibrasyon grafikleri (B için 25,0 µM – 10,0 mM H₂O₂ aralığında, $I(\mu A) = 0,0013 C(\mu M) + 0,1502$ ve $R^2 = 0,9982$ ve D için 2,5 µM – 750 µM H₂O₂ aralığında $I(\mu A) = 0,0707 C(\mu M) + 0,2779$ ve $R^2 = 0,9984$) 97
- Şekil 4.33. Pt/p.PGE'de 100 µM H₂O₂'ye göre artan oranlarda girişimci molekül (AA (A), AA (AOx/Pt/p.PGE kullanıldığında, B), DA (C), ÜA (D), SA (E), SAL (F), GLA (G) ve GL (H)) içeren çözeltilerin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramlar (Şekil 4.30'da kullanılan optimize edilmiş koşullar altında) 98
- Şekil 4.34. A) Seyreltik örnek (1/100000 seyreltik) ve bu örnekte 10, 25, 50, 75, 100 ve 250 µM H₂O₂ içerecek şekilde hazırlanan standart çözeltilerinin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.30'da kullanılan optimize edilmiş koşullar altında) B) Elde edilen standart katma grafiği ($I(\mu A) = 0,0581 C(\mu M) + 1,5318$ ve $R^2 = 0,9983$) 100
- Şekil 4.35. Pt/p.PGE'de 100 µM H₂O₂ çözeltisinin sisteme ardışık 75 kez enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.30'da kullanılan optimize edilmiş koşullar altında) 101
- Şekil 4.36. A) Pt/p.PGE'de 100 µM H₂O₂ çözeltisinin günler arası üçer kez enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları ve B) akımın zamana (gün) bağlı değişimi (Şekil 4.30'da kullanılan optimize edilmiş koşullar altında) .. 102
- Şekil 4.37. p.PGE'nin 1,0 mM PdCl₂ içeren Ar ile doyurulmuş 0,10 M KCl'de ardışık 30 döngü ile kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 25 mV/s) 104
- Şekil 4.38. PGE, p.PGE ve elektrobiriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Pd/p.PGE'lerin 0,01 M K₃[Fe(CN)₆], 0,01 M K₄[Fe(CN)₆] içeren 0,10 M KCl destek çözeltisinde kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50 mV/s) 105
- Şekil 4.39. PGE, p.PGE ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Pd/p.PGE'lerin 0,01 M K₃[Fe(CN)₆], 0,01 M K₄[Fe(CN)₆] içeren 0,10 M KCl destek çözeltisinde kaydedilen impedans eğrileri (Uygulanan frekans aralığı: 10⁵ Hz – 10⁻¹ Hz; uygulanan potansiyel: +170 mV; sinüsodiyal sinyal: 5 mV) 106
- Şekil 4.40. p.PGE (A, 1 µm x10000) ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayısının kullanımıyla elde edilen PdNP modifiye elektrotların SEM görüntüleri: B) 5, C) 10, D) 20, E) 30, F) 40, G) 50 ve H) 60 döngü, 100 nm x40000 108
- Şekil 4.41. Elektrokimyasal biriktirme esnasında 30 döngü ile elde edilen Pd/p.PGE'nin (A) EDX ve p.PGE (siyah) ve Pd/p.PGE'nin (yeşil) (B) XRD spektrumu 110
- Şekil 4.42. Pd/p.PGE'nin pH'sı 2 ile 12 arasında değişen BRBS'de ve 0,10 M NaOH

- çözeltilisinde (siyah voltammogramlar), 16 mM H₂O₂ varlığında (kırmızı voltammogramlar) kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50 mV/s) 112
- Şekil 4.43. p.PGE (A) ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayılarında (5 (B), 10 (C), 20 (D), 30 (E), 40 (F), 50 (G) ve 60 (H)) hazırlanan Pd/p.PGE'lerin, 0,10 M KCl içeren pH 9,0 BRBS'de (siyah voltammogramlar), 16 mM (kırmızı voltammogramlar) H₂O₂ varlığında kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50 mV/s) 115
- Şekil 4.44. A) p.PGE ve B) Pd/p.PGE'nin 0,1 M KCl içeren 0,1 M pH 7,0 PBS'de artan H₂O₂ derişimine (0, 8, 16 ve 32 mM) bağılı olarak kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50 mV/s) 116
- Şekil 4.45. Pd/p.PGE'nin farklı uygulama potansiyel değerlerinde 2,5 mM H₂O₂'nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl ihtiva eden 0,10 M pH 7,0 PBS; akış hızı: 2,0 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm)..... 117
- Şekil 4.46. p.PGE (A ve C) ve Pd/p.PGE'nin (B ve D) farklı uygulama potansiyel değerlerinde 2,5 mM H₂O₂'nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (A ve B) (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 PBS; akış hızı: 2,0 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm) ve bu amperomogramlardan elde edilen akım-potansiyel değişim grafikleri (C ve D)..... 118
- Şekil 4.47. Pd/p.PGE'nin farklı akış hızlarında 2,5 mM H₂O₂'nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (A) (Uygulama potansiyeli: -100 mV; taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren 0,1 M pH 7,0 PBS; örnek kolonunun hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm) ve bu amperomogramlardan elde edilen akım-akış hızı değişim grafiği (B) 119
- Şekil 4.48. p.PGE (A) ve Pd/p.PGE'nin (B) artan H₂O₂ derişimine bağılı olarak FIA'da kaydedilen amperomogramları (Uygulama potansiyeli: -100 mV; akış hızı 2,0 mL/dk; taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 PBS; örnek kolonunun hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm)..... 120
- Şekil 4.49. p.PGE (A) ve Pd/p.PGE'nin (B) artan H₂O₂ derişimlerine verdiği yanıtlara ait kalibrasyon grafikleri (A için 0,25 mM – 50 mM aralığında, $I(\mu A) = 0,037 C(mM) + 0,050$; $R^2 = 0,9989$ ve B için 0,01 mM – 10 mM H₂O₂ aralığında, $I(\mu A) = 12,6058 C(mM) + 0,1005$; $R^2 = 0,9993$) 121
- Şekil 4.50. Pd/p.PGE'de 2,5 mM H₂O₂ göre artan oranlarda girişimci molekül (GL (A), GLA (B), SA (C), SAL (D), AA (E), AA (AOx/Pd/p.PGE kullanıldığında, F), DA (G), DA (Nf/Pd/p.PGE kullanıldığında, H), ÜA (J) ve ÜA (Nf/Pd/p.PGE kullanıldığında, K) içeren çözeltilerin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramlar (Şekil 4.47'de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında) 122
- Şekil 4.51. Antiseptik çözelti (1/1000 seyreltik) (A) ve saç ağartıcı krem (1/5000 seyreltik) (B) için hazırlanan standart çözeltilerinin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramlar ve elde edilen standart katma grafikleri (C için $I(\mu A) = 13,220 C(mM) + 11,682$ ve $R^2 = 0,9966$ ve D için $I(\mu A) = 11,804 C(mM) + 6,256$ ve $R^2 = 0,9970$) (Şekil 4.47'de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında) 124
- Şekil 4.52. Pd/p.PGE'de 2,5 mM H₂O₂ çözeltilisinin sisteme ardışık 30 kez enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.47'de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)..... 126
- Şekil 4.53. A) Pd/p.PGE'de 2,5 mM H₂O₂ çözeltilisinin günler arası üçer kez enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları ve B) akımın zamana (gün)

	bağlı değişimi (Şekil 4.47’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında) ..	127
Şekil 4.54.	Au/p.PGE (A), Pt/p.PGE (B), Pd/p.PGE (C), Au/Pt/p.PGE (D), Au/Pd/p.PGE (E), Pt/Pd/p.PGE (F), Pt/Au/p.PGE (G), Pd/Au/p.PGE (H), Pd/Pt/p.PGE (I), Au-Pt/p.PGE (J), Au-Pd/p.PGE (K) ve Pt-Pd/p.PGE’nin (L) 0,10 M pH 7,0 PBS’de (siyah voltammogramlar), 8 mM (kırmızı voltammogramlar), 16 mM (yeşil voltammogramlar), 32 mM (mavi voltammogramlar) H ₂ O ₂ varlığında kaydedilen CV’leri (Tarama hızı: 50 mV/s)	129
Şekil 4.55.	p.PGE’nin 1,0 mM H ₂ PtCl ₆ ve 1,0 mM PdCl ₂ içeren Ar ile doyurulmuş 0,10 M KCl’de ardışık 30 döngü ile kaydedilen CV’leri (Tarama hızı: 50 mV/s)	132
Şekil 4.56.	Değişen Pt ⁴⁺ /Pd ²⁺ derişimlerinde (mavi: 1,0/0,25; yeşil: 1,0/0,50; turuncu: 1,0/0,75; kırmızı: 1,0/1,0 ve mor: 0,50/1,0 mM) hazırlanan Pt-Pd/p.PGE’lerle birlikte p.PGE’nin (siyah) 8 mM H ₂ O ₂ ve 0,10 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 PBS’de kaydedilen CV’leri (Tarama hızı: 50 mV/s)	133
Şekil 4.57.	PGE, p.PGE ve elektrobiriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Pt-Pd/p.PGE’lerin 0,01 M K ₃ [Fe(CN) ₆], 0,01 M K ₄ [Fe(CN) ₆] içeren 0,10 M KCl destek çözeltisinde kaydedilen CV’leri (Tarama hızı: 50 mV/s)	134
Şekil 4.58.	PGE, p.PGE ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Pt-Pd/p.PGE’lerin 0,01 M K ₃ [Fe(CN) ₆], 0,01 M K ₄ [Fe(CN) ₆] içeren 0,10 M KCl destek çözeltisinde kaydedilen impedans eğrileri (Uygulanan frekans aralığı: 10 ⁵ Hz – 10 ⁻¹ Hz; uygulanan potansiyel: +170 mV; sinüsodiyal sinyal: 5 mV)	135
Şekil 4.59.	A) p.PGE (1 µm x5000) ve B) elektrokimyasal biriktirme esnasında ardışık 30 döngü ile elde edilen Pt-Pd/p.PGE’nin (100 nm x40000) SEM görüntüleri, C) Pt-Pd/p.PGE’nin EDX ve D) p.PGE (siyah) ile Pt-Pd/p.PGE’nin (mor) XRD spektrumları	137
Şekil 4.60.	Pt-Pd/p.PGE’nin farklı anodik uygulama potansiyel değerlerinde 100 µM H ₂ O ₂ ’nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 PBS; akış hızı: 2,0 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm)	138
Şekil 4.61.	p.PGE (A ve C) ve Pt-Pd/p.PGE’nin (B ve D) farklı uygulama potansiyel değerlerinde 100 µM H ₂ O ₂ ’nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (A ve B) (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 PBS; akış hızı: 2,0 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm) ve bu amperomogramlardan elde edilen akım-potansiyel değişim grafikleri (C ve D)	139
Şekil 4.62.	Pt-Pd/p.PGE’nin farklı akış hızlarında 100 µM H ₂ O ₂ ’nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA’da kaydedilen amperomogramları (A) (Uygulama potansiyeli: -100 mV; taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 PBS; akış hızı: 2,0 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm) ve bu amperomogramlardan elde edilen akım-akış hızı değişim grafiği (B)..	140
Şekil 4.63.	p.PGE (A) ve Pt-Pd/p.PGE’nin (B) artan H ₂ O ₂ derişimine bağlı olarak FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Uygulama potansiyeli: -100 mV; akış hızı 1,7 mL/dk; taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 PBS; örnek kolonunun hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm)	142
Şekil 4.64.	p.PGE (A) ve Pt-Pd/p.PGE’nin (B) artan H ₂ O ₂ derişimlerine verdiği yanıtlara ait kalibrasyon grafikleri (A için 0,25 mM – 50 mM aralığında, I(µA) = 0,037 C(mM) + 0,050; R ² = 0,9989 ve B için 0,025 mM – 2,5 mM H ₂ O ₂ aralığında, I(µA) = 59,247 C(mM) + 0,055 ve R ² = 0,9979)	143
Şekil 4.65.	Pt-Pd/p.PGE’de 100 µM H ₂ O ₂ göre artan oranlarda girişimci molekül (GL (A),	

- GLA (B), SA (C), SAL (D), AA (E), DA (F) ve ÜA (G)) içeren çözeltilerin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramlar (Şekil 4.62'de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)..... 144
- Şekil 4.66. A) Seyreltik örnek (1/10000 seyreltik) ve bu örnekte 0,10, 0,25, 0,50, 0,75 ve 1,0 mM H₂O₂ içerecek şekilde hazırlanan standart çözeltilerinin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.62'de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında) ve B) Elde edilen standart katma grafiği ($I(\mu A) = 44,786 C(mM) + 3,9767$ ve $R^2 = 0,9960$) 146
- Şekil 4.67. Pt-Pd/p.PGE'de 100 μ M H₂O₂ çözeltisinin sisteme ardışık 30 kez enjeksiyonuyla FIA'da kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.62'de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)..... 147
- Şekil 4.68. A) Pt-Pd/p.PGE'de 100 μ M H₂O₂ çözeltisinin günler arası üçer kez enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları ve B) akımın zamana (gün) bağlı değişimi (Şekil 4.62'de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında) 148
- Şekil 4.69. Metalik ve bimetalik nanoparçacık modifiye p.PGE yüzeyinde gerçekleşen redoks tepkimelerine için temsili bir gösterim..... 149
- Şekil 4.70. A) CT/p.PGE, B) GO_x-CT/p.PGE, C) CT/Au/p.PGE, D) GO_x-CT/Au/p.PGE, E) CT/Pd/p.PGE, ve F) GO_x-CT/Pd/p.PGE'nin, sırasıyla Ar (siyah), O₂ (kırmızı) ile doyurulmuş pH 6,0 BRBS ortamında ve 8 mM (mavi), 16 mM (Yeşil) ve 32 mM glukoz (mor) içeren O₂ ile doyurulmuş destek elektrolitte kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 20 mV/s) 158
- Şekil 4.71. A) CT/Pt/p.PGE, B) GO_x-CT/Pt/p.PGE, C) CT/Pt-Pd/p.PGE ve D) GO_x-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin, sırasıyla Ar (siyah), O₂ (kırmızı) ile doyurulmuş pH 6,0 BRBS ortamında ve 8 mM (mavi), 16 mM (Yeşil) ve 32 mM glukoz (mor) içeren O₂ ile doyurulmuş destek elektrolitte kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 20 mV/s)..... 159
- Şekil 4.72. GO_x immobilize elektrotların O₂ ile doyurulmuş pH 6,0 BRBS'de 32 mM glukoz ortamında kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 20 mV/s)..... 160
- Şekil 4.73. p.PGE, p.PGE, CT/p.PGE, GO_x-CT/p.PGE, GO_x-CT/Pt/p.PGE ve GO_x-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin 0,01 M K₃[Fe(CN)₆], 0,01 M K₄[Fe(CN)₆] içeren 0,10 M KCl destek çözeltisinde 50 mV/s tarama hızında kaydedilen CV'leri (A) ve 10⁵ Hz – 10⁻¹ Hz frekans aralığında kaydedilen impedans eğrileri (B) 162
- Şekil 4.74. A) p.PGE, B) GO_x-CT/p.PGE, C) Pt/p.PGE, D) GO_x-CT/Pt/p.PGE, E) Pt-Pd/p.PGE ve F) GO_x-CT/Pt-Pd/p.PGE'ye ait SEM görüntüleri (1 μ m x15000-20000) 164
- Şekil 4.75. % 0,5 CT içeren farklı derişimlerdeki (10, 20, 40, 100 ve 200 mg/mL) GO_x çözeltilerine daldırılarak hazırlanmış A) GO_x-CT/Pt/p.PGE ve B) GO_x-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin 16 mM glukoz içeren O₂ ile doyurulmuş pH 6,0 BRBS'de, 20 mV/s tarama hızında kaydedilen CV'leri..... 166
- Şekil 4.76. Farklı derişimli enzim çözeltilerine (mavi: 40 ve kırmızı: 200 mg/mL GO_x) daldırılarak hazırlanan GO_x-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin 0,01 M K₃[Fe(CN)₆], 0,01 M K₄[Fe(CN)₆] içeren 0,10 M KCl destek çözeltisinde 50 mV/s tarama hızında kaydedilen CV'leri (A) ve 10⁵ Hz – 10⁻¹ Hz frekans aralığında kaydedilen impedans eğrileri (B) 166
- Şekil 4.77. % 0,5 CT içeren 40 mg/mL GO_x çözeltilerine daldırılarak hazırlanmış A) GO_x-CT/Pt/p.PGE ve B) GO_x-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin 16 mM glukoz içeren O₂ ile doyurulmuş farklı pH'lardaki BRBS'de ve pH 7,0 PBS'de kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 20 mV/s)..... 167
- Şekil 4.78. GO_x-CT/p.PGE'nin farklı anodik çalışma potansiyellerinde 1,0 mM glukozun 3

	ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Taşıyıcı çözelti: O ₂ ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren pH 6,0 BRBS; akış hızı 1,25 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm).....	167
Şekil 4.79.	A) GOx-CT/Pt/p.PGE'nin farklı anodik çalışma potansiyellerinde 1,0 mM glukozun 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Taşıyıcı çözelti: O ₂ ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren pH 6,0 BRBS; akış hızı 1,25 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm) ve B) bu amperomogramlardan elde edilen akım-potansiyel değişim grafiği	168
Şekil 4.80.	A) GOx-CT/Pt/p.PGE'nin farklı akış hızlarında 1,0 mM glukozun 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Uygulama potansiyeli: +600 mV; taşıyıcı çözelti: O ₂ ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren pH 6,0 BRBS; örnek kolonunun hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm) ve B) bu amperomogramlardan elde edilen akım-akış hızı değişim grafiği.....	169
Şekil 4.81.	A) GOx-CT/p.PGE'nin artan glukoz derişimine bağı olarak FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Uygulama potansiyeli: +600 mV; taşıyıcı çözelti: O ₂ ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren pH 6,0 BRBS çözeltisi; örnek kolonunun hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm), B) akım-zaman eğrilerinden elde edilen akım-derişim grafiği ve C) doğrusal yanıt alınan derişimler için kalibrasyon grafiği (7,5 – 75 mM glukoz; I(µA) = 0,00148 C(mM) + 0,00842; R ² = 0,9997).....	171
Şekil 4.82.	Pt/p.PGE'nin artan glukoz derişimine bağı olarak FIA'da kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.80'de belirtilen koşullar altında).....	172
Şekil 4.83.	GOx-CT/Pt/p.PGE'nin artan glukoz derişimine (0,010 mM – 75 mM) bağı olarak FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.80'de belirtilen koşullar altında)	172
Şekil 4.84.	GOx-CT/Pt/p.PGE'nin artan glukoz derişimlerine (0,010 – 75 mM) verdiği yanıtlara ait akım-derişim grafiği (A) ve elde edilen kalibrasyon grafiği (B) (0,010 – 10 mM glukoz; I(µA) = 1,0691 C(mM) + 0,1302; R ² = 0,9989).....	173
Şekil 4.85.	GOx-CT/Pt/p.PGE'de 1,0 mM glukozu göre artan oranlarda girişimci molekül (GLA (A), SA(B) ve SAL (C)) içeren çözeltilerin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramlar (Şekil 4.80'de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında).....	175
Şekil 4.86.	Girişim etkisi gösteren AA, DA ve ÜA'nın NaBiO ₃ doldurulmuş enjektör ile ön yükseltgenmelerinin ve FIA sisteminde glukoz biyosensörünün şematik gösterimi	178
Şekil 4.87.	Üç farklı derişimde taşıyıcı çözelti içerisinde hazırlanmış AA (A), DA (B) ve ÜA (C)'nin boş (a) ve NaBiO ₃ doldurulmuş enjektör (b) ile FIA sistemine enjeksiyonuyla GOx-CT/Pt/p.PGE'de kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.80'de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında).....	180
Şekil 4.88.	A) Farklı derişimlerde taşıyıcı çözelti içerisinde hazırlanmış glukoz çözeltilerinin boş (a) ve NaBiO ₃ doldurulmuş enjektör (b) ile FIA sistemine enjeksiyonuyla GOx-CT/Pt/p.PGE'de kaydedilen amperomogramları ve B) elde edilen kalibrasyon grafiği (I(µA) = 1,1324 C(mM) + 0,0008 ve R ² = 0,9960)	182
Şekil 4.89.	Glukozu (1,0 mM) göre artan oranlarda girişimci molekül (AA (A), DA (B) ve UA (C)) içeren çözeltilerinin, NaBiO ₃ içermeyen ve içeren enjektör kullanılarak FIA sistemine enjeksiyonuyla GOx-CT/Pt/p.PGE'de kaydedilen amperomogramlar (Şekil 4.80'de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)	184

Şekil 4.90. Taşıyıcı çözelti ile seyreltilmiş yapay kan serumu (1/10) (A), dekstroz serum (1/250) (B), oral glukoz test içeceği (1/2000) (C) ve bu seyreltik örneklerde 0, 0,5, 1,0 1,5 ve 2,0 mM glukoz içerecek şekilde hazırlanan standart çözeltilerinin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.80’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında, A için NaBiO ₃ ’lı, B ve C için NaBiO ₃ ’sız enjektör kullanılmıştır) ve elde edilen standart katma grafikleri.....	186
Şekil 4.91. GOx-CT/Pt/p.PGE’de 1,0 mM glukoz çözeltisinin ardışık 30 kez enjeksiyonuyla FIA’da kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.80’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında).....	188
Şekil 4.92. GOx-CT/Pt/p.PGE’de 1,0 mM glukoz çözeltisinin arda arda 1. ve 2. gün enjeksiyonuyla FIA’da kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.80’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında).....	188
Şekil 4.93. A) GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE’nin farklı anodik çalışma potansiyellerinde 1,0 mM glukozun 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Taşıyıcı çözelti: O ₂ ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren pH 6,0 BRBS; akış hızı 1,25 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm) ve B) bu amperomogramlardan elde edilen akım-potansiyel değişim grafiği	190
Şekil 4.94. A) GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE’nin farklı akış hızlarında 1,0 mM glukozun 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Uygulama potansiyeli: +600 mV; taşıyıcı çözelti: O ₂ ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren pH 6,0 BRBS; örnek kolonunun hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm) ve B) bu amperomogramlardan elde edilen akım-akış hızı değişim grafiği.....	191
Şekil 4.95. Pt-Pd/p.PGE’nin artan glukoz derişimine bağlı olarak FIA’da kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.94’de belirtilen koşullar altında).....	192
Şekil 4.96. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE’nin artan glukoz derişimine (0,010 mM – 75 mM) bağlı olarak FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.94’de belirtilen koşullar altında)	192
Şekil 4.97. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE’nin artan glukoz derişimlerine (0,010 – 75 mM) verdiği yanıtlara ait akım-derişim grafiği (A) ve elde edilen kalibrasyon grafiği (B) (0,010 – 10 mM Glukoz; $I(\mu A) = 1,7365 C(mM) + 0,1438$; $R^2 = 0,9994$)	193
Şekil 4.98. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE’de 1,0 mM glukozu göre artan oranlarda girişimci molekül (GLA (A), SA(B) ve SAL (C)) içeren çözeltilerin enjeksiyonuyla FIA’da kaydedilen amperomogramlar (Şekil 4.94’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında).....	194
Şekil 4.99. Üç farklı derişimde taşıyıcı çözelti içerisinde hazırlanmış AA, DA ve ÜA’nın boş (a) ve NaBiO ₃ doldurulmuş enjektör (b) ile FIA sistemine enjeksiyonuyla GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE’de kaydedilen amperomogramları	195
Şekil 4.100. A) Farklı derişimlerde taşıyıcı çözelti içerisinde hazırlanmış glukoz çözeltilerinin boş (a) ve NaBiO ₃ doldurulmuş enjektör (b) ile FIA sistemine enjeksiyonuyla GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE’de kaydedilen amperomogramları ve B) elde edilen kalibrasyon grafiği ($I(\mu A) = 1,4576 C(mM) + 0,0035$, $R^2 = 0,9997$)	196
Şekil 4.101. Glukoza (1,0 mM) göre artan oranlarda girişimci molekül (AA (A), DA (B) ve UA (C)) içeren çözeltilerinin, NaBiO ₃ içermeyen ve içeren enjektör kullanılarak FIA sistemine enjeksiyonuyla GOx-CT/Pt-Pt/p.PGE’de kaydedilen amperomogramlar (Şekil 4.94’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)	198
Şekil 4.102. Taşıyıcı çözelti ile seyreltilmiş yapay kan serumu (1/10) (A), dekstroz serum	

(1/100) (B), oral glukoz test içeceği (1/2000) (C) ve bu seyreltik örneklerde 0, 0,5, 1,0 1,5 ve 2,0 mM glukoz içecek şekilde hazırlanan standart çözeltilerinin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.94'de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında, A için NaBiO ₃ 'lu, B ve C için NaBiO ₃ 'süz enjektör kullanılmıştır) ve elde edilen standart katma grafikleri.....	200
Şekil 4.103. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'de 1,0 mM glukoz çözeltisinin ardışık 30 kez enjeksiyonuyla FIA'da kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.94'de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında).....	201
Şekil 4.104. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'de 1,0 mM glukoz çözeltisinin arda arda 1. ve 2. gün enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.94'de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında).....	202
Şekil 4.105. GOx enzim temelli elektrokimyasal biyosensörlerin mekanizmasına ilişkin şematik bir gösterim.....	203



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

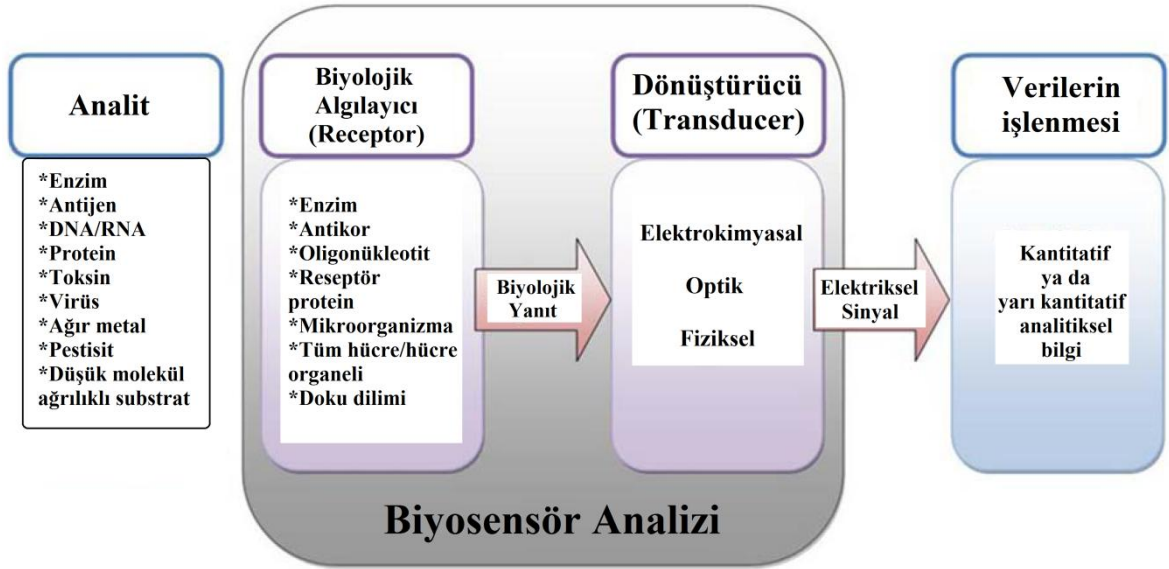
Çizelge 1.1. Kalem ucundaki karbon içeriği ile direncin karşılaştırılması (Queen Studies Authority).....	6
Çizelge 2.1. PGE kullanılarak H ₂ O ₂ ve glukozun tayinine yönelik yapılan elektrokimyasal sensör ve biyosensör çalışmaları.....	23
Çizelge 2.2. FI Sistemde farklı elektrotlar kullanılarak enzim kullanılmadan ve kullanılarak H ₂ O ₂ tayinine yönelik yapılan amperometrik sensör ve biyosensör çalışmaları.....	29
Çizelge 2.2.'nin devamı	30
Çizelge 3.1. Monometalik nanoparçacık ve ardışık biriktirme yapılarak elde edilen bimetalik nanoparçacık modifiye p.PGE'lerin hazırlanmasına ilişkin kullanılan prosedürler	46
Çizelge 4.1. Yalın PGE, p.PGE ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Au/p.PGE'lerin Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks probu ortamında kaydedilen impedans eğrileri ve CV'lerinden çıkarılan veriler (n=3).....	59
Çizelge 4.2. Her biri 100 µM sabit H ₂ O ₂ içeren 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 ve 1:100 oranındaki girişimcilerin Au/p.PGE'de H ₂ O ₂ 'nin yükseltgenme pik akımına gösterdikleri değişimler (n=3).....	77
Çizelge 4.3. Antiseptik çözeltide tayin edilen H ₂ O ₂ 'ye ait analiz sonuçları (n=5).....	79
Çizelge 4.4. Yalın PGE, p.PGE ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Pt/p.PGE'lerin Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks probu ortamında kaydedilen impedans eğrileri ve CV'lerinden çıkarılan veriler (n=3).....	84
Çizelge 4.5. Herbiri 100 µM sabit H ₂ O ₂ içeren 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 ve 1:100 oranındaki girişimcilerin Pt/p.PGE'de H ₂ O ₂ 'nin yükseltgenme pik akımına gösterdikleri değişimler (n=3).....	99
Çizelge 4.6. Saç Oksidasyon Kreminde tayin edilen H ₂ O ₂ 'ye ait analiz sonuçları (n=5) .	100
Çizelge 4.7. Yalın PGE, p.PGE ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Pd/p.PGE'lerin Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks probu ortamında kaydedilen impedans eğrileri ve CV'lerinden çıkarılan veriler (n=3).....	106
Çizelge 4.8 Her biri 2,5 mM sabit H ₂ O ₂ içeren 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 ve 1:50 oranındaki girişimcilerin Pd/p.PGE'de H ₂ O ₂ 'nin indirgenme pik akımına gösterdikleri değişimler (n=3).....	123
Çizelge 4.9. Antiseptik Çözeltide ve Saç Oksidasyon Kreminde tayin edilen H ₂ O ₂ 'ye ait analiz sonuçları (n=5)	125
Çizelge 4.10. Yalın PGE, p.PGE ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Pt-Pd/p.PGE'lerin Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks probu ortamında kaydedilen impedans eğrileri ve CV'lerinden çıkarılan veriler (n=3).....	135
Çizelge 4.11. Herbiri 100 µM sabit H ₂ O ₂ içeren 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 ve 1:100 oranındaki girişimcilerin Pt-Pd/p.PGE'de H ₂ O ₂ 'nin indirgenme pik akımına gösterdikleri değişimler (n=3).....	145
Çizelge 4.12. Antiseptik Çözeltide tayin edilen H ₂ O ₂ 'ye ait analiz sonuçları (n=5).....	147
Çizelge 4.13. Tasarlanan amperometrik H ₂ O ₂ sensörlerinin literatürdeki benzer çalışmalar ile kıyaslanması.....	153
Çizelge 4.13'ün devamı	154

Çizelge 4.14. PGE, p.PGE, GOx-CT/p.PGE, Pt/p.PGE, GOx-CT/Pt/p.PGE, Pt-Pd/p.PGE ve GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE için CV ve impedans grafiklerinden elde edilen potansiyel, pik akımları ve direnç değerlerinin standart sapmaları ile tablosu (n=3).....	163
Çizelge 4.15. Her biri 1,0 mM sabit glukoz içeren 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 ve 1:100 oranındaki girişimcilerin GOx-CT/Pt/p.PGE’de glukozla bağlı enzimatik tepkime sonucu oluşan H ₂ O ₂ ’nin yükseltgenme pik akımına gösterdikleri değişimler (n=3)..	176
Çizelge 4.16. Her biri 1,0 mM sabit glukoz içeren 1:1, 1:5 ve 1:10 oranındaki girişimcilerin GOx-CT/Pt/p.PGE’de glukozla bağlı enzimatik tepkime sonucu oluşan H ₂ O ₂ ’nin yükseltgenme pik akımında gösterdikleri değişimler (n=3)	185
Çizelge 4.17. GOx-CT/Pt/p.PGE kullanılarak tasarlanan FI amperometrik glukoz biyosensörünün farklı örneklerle uygulanması ile elde edilen sonuçlar (n=3)	187
Çizelge 4.18. Her biri 1,0 mM sabit glukoz içeren 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 ve 1:100 oranındaki girişimcilerin GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE’de glukozla bağlı enzimatik tepkime sonucu oluşan H ₂ O ₂ ’nin yükseltgenme pik akımına gösterdikleri değişimler (n=3).....	194
Çizelge 4.19. Her biri 1,0 mM sabit glukoz içeren farklı derişimlerdeki AA, DA ve ÜA varlığında glukozla bağlı enzimatik tepkimesi sonucu oluşan H ₂ O ₂ ’nin elektrokatalitik pik akımındaki değişimler (n=3)	199
Çizelge 4.20. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE kullanılarak tasarlanan FI amperometrik glukoz biyosensörünün farklı örneklerle uygulanması ile elde edilen sonuçlar (n=3)	201
Çizelge 4.21. Tasarlanan amperometrik glukoz biyosensörlerinin literatürdeki benzer çalışmalar ile kıyaslanması	206
Çizelge 5.1. Tasarlanan amperometrik H ₂ O ₂ sensörlerine ait analitiksel parametreler.....	211
Çizelge 5.2. Tasarlanan amperometrik glukoz biyosensörlerine ait analitiksel parametreler	213

BÖLÜM 1

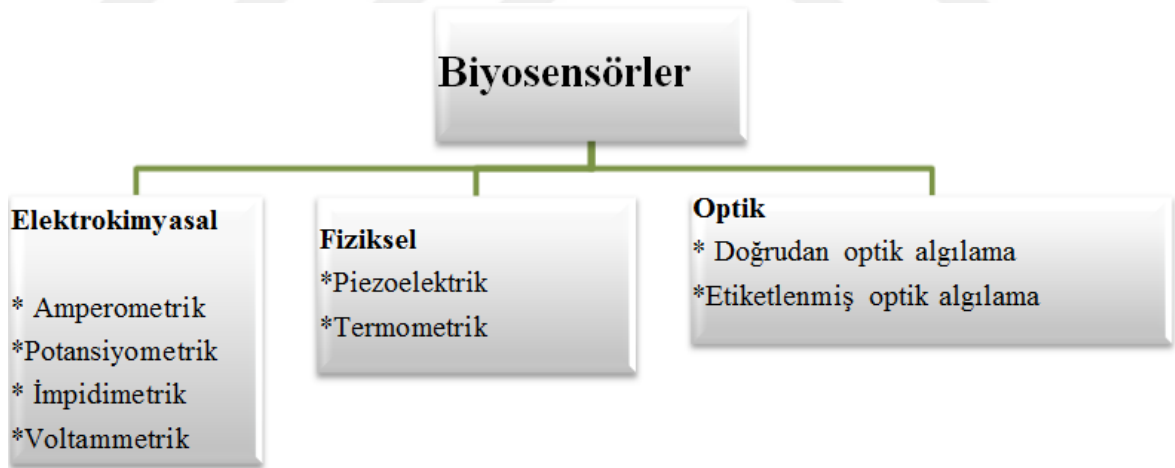
GİRİŞ

Sensörler, bir sinyal dönüştürücüsü (transducer) ile birlikte aktif bir algılama malzemesinden (recognition element) oluşan aygıtlardır. Sensörlerde bu iki önemli bileşenlerin rolü, sinyali bir tepkimedeki yükten ya da seçici bir bileşikten kaynaklı olarak arttırılmaksızın iletmektedir. Bu aygıtlar sonraki aşamalarda dijital sinyallere dönüştürülebilir elektriksel, ısı ya da optik çıkış sinyallerini üretirler. Sensörler, bu çıkış sinyallerine dayanarak optik, elektrokimyasal, termal vb. sensörler şeklinde sınıflandırılabilir (Yogeswaran ve Chen, 2008). Diğer taraftan sensörler algılama malzemesinin türüne göre kimyasal sensörler ve biyosensörler olmak üzere iki şekilde sınıflandırılabilir. Kimyasal sensörler, belirli bir analitin derişimine bağı olarak kimyasal tepkime yoluyla seçici bir şekilde yanıt veren ve bu yanıtı analitiksel sinyale dönüştürebilen aygıtlardır (Eggins, 2002; Compagnone ve ark., 2017). Biyosensörler ise bir biyolojik algılama olayını gerçek zamanlı ölçülebilir optik, kimyasal, elektriksel ya da fiziksel sinyallere dönüştüren analitiksel bir aygıttır (Shavanova ve ark., 2016; North ve Lock, 2010). Bir başka deyişle, bir biyosensör sinyali algılamak üzere biyoduyarlı bir katman ile dönüştürücü sistemin entegre edildiğı minyatürize bir aygıttır. Biyoduyarlı katman, dönüştürücüye immobilize edilen algılama elementinden (enzim, antikor, oligonükleotit, reseptör protein, mikroorganizma ya da hücrenin tamamı) yapılır. Biyoduyarlı katman, hedef analiti (enzim, antijen, DNA/RNA, toksin, virüs, ağır metal, pestisit vb.) algılamak üzere biyoseçici ve duyarlı olmalıdır (Shavanova ve ark., 2016; Solanki ve Kaushik, 2011). Bir biyosensörün bileşenlerini ve çalışma prensibini gösteren şematik bir gösterim Şekil 1.1’de verilmiştir (Shavanova ve ark., 2016).



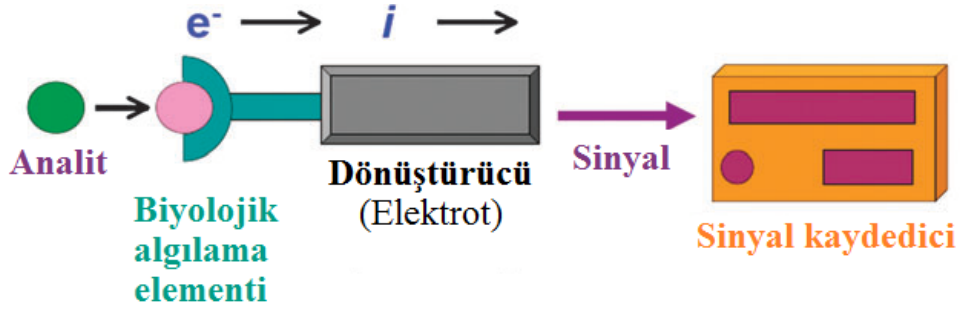
Şekil 1.1. Biyosensörün bileşenleri ve çalışma prensibi (Shavanova ve ark., 2016; Solanki ve Kaushik, 2011; Ronkainen ve ark., 2010)

Biyosensörler, algılama yöntemine ve dönüştürücü sisteme bağlı olarak elektrokimyasal, fiziksel ve optik biyosensörler olmak üzere üç grupta sınıflandırılırlar (Şekil 1.2) (Shavanova ve ark., 2016).



Şekil 1.2. Dönüştürücü sisteme göre biyosensörlerin sınıflandırılması (Shavanova ve ark., 2016)

Bunlardan en çok kullanılan elektrokimyasal sensörler/biyosensörler olup, elektrokimyasal bir biyosensöre ait şematik gösterim Şekil 1.3'de verilmiştir (Ronkainen ve ark., 2010).



Şekil 1.3. Elektrokimyasal bir dönüştürücü ile birlikte bir biyosensörün şematize edilmiş hali (Ronkainen ve ark., 2010)

Biyosensörlerde elektrot yüzeyinde bulunan aktif algılama malzemesi, bir katalizör olarak davranmalı ve biyokimyasal bileşiklerin tepkimesini, çıkış sinyallerini elde etmek üzere katalizlemelidir. Bu iki farklı sınıflandırma biçiminin birleşimi, bir biyosensörün tasarımında ve çalışmasında uygulanan ve elektrokimyasal biyosensörler olarak adlandırılan yeni tip biyosensörlerin artmasına vesile olmuştur (Yogeswaran ve Chen, 2008). Kemilüminesans, florimetri, spektrofotometri, titrimetri, fosforesans ve kromatografi gibi çeşitli analitiksel tekniklere dayanan sensörler geliştirilmiş olmasına rağmen, bu teknikler genellikle pahalı ve karmaşık cihazları gerektirmekle birlikte zaman alıcı ve düşük seçicilik gibi sınırlamaları da içermektedirler (Zhang ve ark., 2016a). Ayrıca bu teknikler, analiz edilecek örnekler için zahmetli ve zaman alıcı ön hazırlama basamakları içermekle birlikte, analitin olası kaybına da sebebiyet vermektedirler (Lima ve ark., 2018). Elektrokimyasal teknikler ise düşük gözlenebilme sınırı (LOD), yüksek seçicilik ve basit aletlerin/malzemelerin kullanılması gibi avantajlara sahip olması nedeniyle diğer yöntemlere karşı üstünlük sağlamaktadır. Ayrıca elektrokimyasal teknikler, farklı analitlerin hızlı analizine olanak sağlamakla birlikte, biyolojik örneklerin gerçek zamanlı analizine de imkân tanımaktadır (Wang ve ark., 2015). Elektrokimyasal teknikler ile tasarlanan sensörler diğer sensör türleri ile karşılaştırıldığında elektrotların konuk konakçı (host-guest) sisteme herhangi bir zarar vermeden analit malzemeleri algılamasına olanak sağlamaktadır (Yogeswaran ve Chen, 2008). Özellikle klinik kimya laboratuvarlarında yapılan klinik analizler pahalı ve zaman alıcı süreçler olduğundan hasta başında, hastahane dışında bakım verenler ve evde bulunan hastalar da olmak üzere çeşitli yerlerde daha fazla analit ölçümü gerçekleştirilmektedir. Günümüzde başlıca zorluklardan biri, bu hızlı in-situ (doğal ortamında) analizleri gerçekleştirecek yöntemlerin geliştirilmesidir. Bu yöntemler, gerçek zamanlı örneklerde bulunan farklı özelliklerdeki çeşitli analitlerin hassas ve doğru olarak ölçümlerine olanak sağlamalıdır. Yüksek seçicilik

ve duyarlılık, portatif boyutları, hızlı yanıt zamanı ve düşük maliyeti gibi çok avantajlı özelliklerinden dolayı özellikle klinik kimya uygulamalarında analitlerin ölçümleri için elektrokimyasal sensörlerin tercih edilmesi oldukça uygun görülmektedir (Wang ve ark., 2008).

Elektrokimyasal sensörler üzerine son yıllarda oldukça fazla çalışma gerçekleştirilmiş ve tasarlanan sensör ve biyosensörlerle tıp, biyoloji, çevre, sağlık, ilaç vb. alanlarda oldukça önemli olan birçok bileşiğin analizi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal sensörler tasarlanırken en önemli parametrelerden biri elektrot materyalidir. Elektrot materyali olarak çok sayıda elektrot kullanılmakla birlikte son yıllarda elektrokimyasal analizlerde birçok avantajı olan kalem grafit elektrot (Pencil Graphite Electrode, PGE) kullanılmıştır (Aziz ve Kawde, 2013; Kawde ve ark., 2015; Zhang ve Zheng, 2015; Chaisuksant ve ark., 2016; Kamyabi ve Hajari, 2017; Teanphonkrang ve Schulte, 2017; Vijayaraj ve ark., 2016; Cheng ve ark., 2012; Sehat ve ark., 2014; Sağlam ve ark., 2016; Ertek ve ark., 2016; Dilgin ve ark., 2018; Emir ve Dilgin; 2018; Ayaz ve Dilgin; 2017). Kalem grafit elektrot birçok bileşiğin elektrokimyasal tayininde yalın olarak kullanıldığı gibi yüzeyi organik redoks mediyatörler, metal nanoparçacıklar, kuantum noktalar, nanoparçacıklar, iletken polimerler vb. birçok materyalle modifiye edilerek elektrokimyasal sensör/biyosensör tasarımında başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Aziz ve Kawde, 2013; Kawde ve ark., 2015; Zhang ve Zheng, 2015; Chaisuksant ve ark., 2016; Kamyabi ve Hajari, 2017; Teanphonkrang ve Schulte, 2017; Vijayaraj ve ark., 2016; Cheng ve ark., 2012; Sehat ve ark., 2014; Sağlam ve ark., 2016; Ertek ve ark., 2016; Dilgin ve ark., 2018; Emir ve Dilgin; 2018; Ayaz ve Dilgin; 2017). Bu tez kapsamında da PGE yüzeyine Au, Pt, Pd ve bunların bimetalik formları modifiye edilerek, hidrojen peroksitin hem yükseltgenmesine hem de indirgenmesine dayalı elektrokimyasal sensörler FIA sisteminde ilk defa gerçekleştirilmiştir. Bunun dışında bu metalik ve bimetalik nanoparçacıklarla modifiye PGE yüzeyine glukoz oksidaz (GOx) enzimi immobilize edilerek yine FIA sisteminde glukoz biyosensörleri gerçekleştirilmiştir. Bu tez konusu doğrultusunda bundan sonraki kısımlarda,

- 1) Elektrokimyasal Sensör ve Biyosensör Tasarımında Kalem Grafit Elektrot (Pencil Graphite Electrode, PGE)
- 2) Elektrokimyasal Sensör ve Biyosensör Yapımında Kullanılan Metal Nanoparçacıklar
- 3) Elektrokimyasal Sensör ve Biyosensör Tasarımında Akışa Enjeksiyon Analizi (FIA)
- 4) Hidrojen Peroksidin Çevre ve Canlı Sistemlerdeki Önemi
- 5) Glukoz Oksidaz (GOx) Temelli Elektrokimyasal Glukoz Biyosensörler

hakkında daha detaylı bilgiler sunulmaktadır.

1.1. Elektrokimyasal Sensör ve Biyosensör Tasarımında Kalem Grafit Elektrot (Pencil Graphite Electrode, PGE)

Bir elektrokimyasal sensörde kullanılan elektrodun türü, sensörün yapımında maliyeti, seçiciliği, duyarlılığı ve kararlılığı etkilediğinden, elektrokimyasal sensör ve biyosensör yapımında elektrot malzemesinin seçimi oldukça önem arz etmektedir (Saglam ve ark., 2016). Literatürler incelendiğinde Au, Pt, ITO gibi elektrot materyalleri kullanıldığı gibi karbon bazlı elektrot materyalleri de oldukça fazla ilgi görmüştür. Karbon bazlı elektrotlar arasında camımsı karbon elektrot (glassy carbon electrode, GCE) (Saglam ve Dilgin, 2017; Pei ve Li, 1999; Chakraborty ve Raj, 2009), karbon pasta elektrot (carbon paste electrode, CPE) (Amatatongchai ve ark., 2017; Schachl ve ark., 1997; Hamidi ve ark., 2009), perde baskılı karbon elektrot (screen printed carbon electrode) (Reanpang ve ark., 2015; Mehmeti ve ark., 2017; Samphao ve ark., 2015), PGE gibi elektrot malzemeleri kullanılmış ve ayrıca bu elektrotlara karbon nanotüp, grafen, metal nanoparçacıklar, iletken polimerler gibi materyaller ile modifikasyon yapılarak elektrokimyasal sensör/biyosensör çalışmalarında kullanılmıştır. Son yıllarda ise PGE üzerine çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir (Aziz ve Kawde, 2013; Kawde ve ark., 2015; Zhang ve Zheng, 2015; Chaisuksant ve ark., 2016; Kamyabi ve Hajari, 2017; Teanphonkrang ve Schulte, 2017; Vijayaraj ve ark., 2016; Cheng ve ark., 2012; Sehat ve ark., 2014; Sağlam ve ark., 2016; Ertek ve ark., 2016; Dilgin ve ark., 2018; Emir ve Dilgin; 2018; Ayaz ve Dilgin; 2017).


PGE, grafit tozu ve kil (bağlayıcı malzeme) malzemelerini içeren kompozit karışımın ekstrüzyon yöntemi ile şekillendirilip, ardından sertleşinceye kadar 1000 °C'ye ısıtılması ile elde edilmektedir. Elde edilen ürünün bir bal mumu banyosuna daldırılarak gözeneklerin dolması sağlanır ve son ürüne düzgün bir görünüm kazandırır (Torroinha ve ark., 2018; Down ve ark., 2016). Karbon bazlı elektrotlarda bulunan karbonların yaptığı hibritleşme türü oldukça önem arz etmektedir. Örneğin, içerdiği tüm karbonların sp^3 hibritleşmesi yapılarından dolayı elmasın elektriksel iletkenliği zayıftır. Elmasın elektriksel iletkenliğini arttırmak amacıyla bor gibi başka iletken malzemelerle modifiye edilir (Torroinha ve ark., 2018; Down ve ark., 2016). Diğer taraftan grafit içeren PGE ve GCE'de, tüm karbonlar sp^2 hibritleşmesi yapmakla birlikte, bu hibritleşmiş karbonlar yüksek iletkenlik sergilediği gibi ve analitin kolay adsorpsiyonuna imkân sağlarlar (Torroinha ve ark., 2018; Down ve ark., 2016). Ayrıca, grafit karbonlarında bulunan 3 değerlik elektronu kovalent bağ yapmakla birlikte, 4. değerlik elektronu bağ yapmamıştır

ve serbestçe yapıya dağılabilmektedir. Bu nedenle grafitte elektriksel bir akım uygulandığında, bağ yapmamış bu elektronlar elektriğin belirli yönler akışına imkân vermektedir. Grafitin aksine iyon değiştirici özellik gösteren ve doğal olarak oluşmuş bir alümina silikat olan kilin (Alipour ve ark., 2013) PGE’de kullanılması sonucu, değerlilik elektronları kovalent bağ oluşumunda kullanıldığından dolayı elektriği iyi iletmez. Dolayısıyla grafit içeriğinin yükselmesiyle iletkenliğin arttığı bilinmektedir (Everything2 Media, 2012). Ayrıca, kalem uçlarındaki grafit oranının artması ile oluşan iletkenlik artışı, sensörün yanıtı üzerindeki etkisi de büyüktür. Kalem ucunun içeriği kil oranı arttıkça direncin arttığı rapor edilmiştir (Çizelge 1.1) (Queen Studies Authority).

Çizelge 1.1. Kalem ucundaki karbon içeriği ile direncin karşılaştırılması (Queen Studies Authority)

Kalem ucu türü	Karbon (%)	Direnç (Ω)
2H	60	23,3
HB	68	10,0
2B	47	5,9
4B	79	3,6
6B	84	3,1
8B	90	2,0

PGE genel olarak içeriğinde ağırlıkça yaklaşık % 65 oranında grafit, % 30 oranında kil ve bir bağlayıcı (balmumu, reğine ya da büyük polimer) içeren kompozit bir malzemedir (Alipour ve ark., 2013). Grafit içeriğinin fazla olması kalem ucunu yumuşak yapmakla birlikte, kil içeriğinin fazla olması kalem ucunu daha sert yapar (Akanda ve ark., 2016; Kariuki, 2012; Tavares ve Barbeira, 2008; Vishnu ve Kumar, 2015). PGE sertliğe bağlı olarak 8B (en yumuşak) ile 9H (en sert) arasında 9 kademedede derecelendirilmiştir (Akanda ve ark., 2016). Grafit/kil oranlarına göre en yumuşak (9B) türü küttele % 93 grafit ve % 2 kil içermekle birlikte, en sert (9H) türü ise % 41 grafit ve % 53 kil oranlarında içeriği bilinmektedir (Torrinha ve ark., 2018). Grafit kalemlerin sertliklerine göre değişen küttele karbon ve kil yüzdeleri ile renk tonları Şekil 1.4’de verilmiştir.



Sertlik	9H	8H	7H	6H	5H	4H	3H	2H	H	F	HB	B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B
Karbon (%)	41	44	47	50	52	55	58	60	63	66	68	71	74	76	79	82	84	87	90	93
Kil (%)	53	50	47	45	42	39	36	34	31	28	26	23	20	18	15	12	10	7	5	2
Bal mumu (%)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Şekil 1.4. Kurşun kalemlerin renk tonları ve karbon yüzdeleri (Queen Studies Authority)

Özelikle 6B (Torroinha ve ark., 2018; Down ve ark., 2016; Foster ve ark., 2016) ya da 8B (Lee ve ark., 2016) gibi kalemler, artan elektrokimyasal performansa bağlı olarak en iyileri olduğu rapor edilmiştir. Diğer taraftan PGE'nin kil içeriğinin yüksek olması bazı uygulamalarda performansın yükselmesine olanak sağladığı da bildirilmiştir. Örneğin, 2B ile karşılaştırıldığında 5H kalemler ile ağrı kesici bir ilaç olan asetaminofenin tayininde oldukça yüksek oksidasyon pikleri elde edildiği raporlanmıştır (Masawat ve ark., 2002). Ayrıca, kafeik asidin tayininde HB ucunun 2B, 2H ve 5H türlerine göre daha iyi sinyal/gürültü oranı elde edildiği de belirtilmiştir (Buratti ve ark., 2008). Bahsedilen çalışmalarla birlikte birçok karbon kökenli elektrotlar içerisinde PGE,

- Kolay bulunabilir olması,
- Düşük teknoloji ile üretimi,
- Ucuz olması,
- İyi mekaniksel kararlılık göstermesi,
- Kimyasal olarak inert olması,
- İlgü çekici elektrokimyasal özelliklere sahip olması,
- Düşük zemin akımı göstermesi,
- Geniş bir potansiyel çalışma aralığı sağlaması,
- Analitin adsorpsiyonuna imkân tanınması,
- Kolay modifikasyon ve minyatürize edilebilmesi

gibi çok çeşitli ve üstün avantajlara sahiptir. Ayrıca tek kullanımlık özelliğinden dolayı PGE, zahmetli ve uzun yüzey temizleme basamakları içeren GCE gibi katı elektrotlara göre yenilenebilir yüzeyler sunmakla birlikte tekrarlanabilirliği yüksek sonuçlara da olanak sağlamaktadır (Özcan ve ark., 2008, Özcan ve Şahin, 2010; Özcan ve Şahin, 2011; Wang ve ark., 2000; Wang ve Hu, 2009; Ertek ve ark., 2016; Sağlam ve ark., 2016; Emir ve Dilgin, 2018; Ayaz ve Dilgin, 2017; Dilgin ve ark., 2018; Akanda ve ark., 2016). Ayrıca,

PGE, geniş ve aktif bir yüzey alanına sahip olması sebebiyle analitin düşük derişimlerinin algılanmasına imkân sağlamaktadır. Özellikle çok az miktarlardaki analitlerin nicel tayini söz konusu olduğunda, bu durum daha da önem kazanmaktadır (Özcan ve ark., 2008). PGE'nin kullanışlı özelliklerinden dolayı, elektrokimyasal uygulamalarda elektrot malzemesi olarak kullanımı artarak devam etmektedir (Torrinha ve ark., 2018).

1.2. Elektrokimyasal Sensör ve Biyosensör Yapımında Kullanılan Metal Nanoparçacıklar

Literatürde GCE, CPE ve PGE kullanılarak yapılan birçok elektrokimyasal sensör çalışmaları bulunmasına rağmen, bu elektrotların yüzeyinde doğrudan elektron transferi oldukça tersinmez olup, aşırı potansiyellerde gerçekleşmektedir (elektrot türüne bağlı olarak 0,50 V ile 1,0 V arası). İlaveten, aşırı potansiyellerde elektrot yüzeyine yükseltgenme ürünleri ve ara radikalik türler adsorplanarak elektrot yüzeyinin kirlenmesine sebebiyet vermektedirler (Dilgin ve Gökçel, 2015; Dilgin ve ark., 2018; Gorton ve Domínguez, 2002; Blaedel ve Jenkins, 1975). Nanoparçacıklar geniş yüzey alanı, yüksek elektriksel iletkenlik ve yüzey aktivitesi, yüksek katalitik etkinlik ve biyo uyumluluğa sahip olmalarından dolayı elektrokimyasal sensörlerin yapımında analitiksel verimliliği arttırmak amacıyla son zamanlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Devi ve ark., 2013; Chen ve ark., 2013b). Bu bağlamda metal nanoparçacıklar, elektrokatalitik etkinliklerinden dolayı elektrokimyasal sensör ve biyosensörlerde analitiksel birçok önemli elektrokimyasal tepkimenin aşırı potansiyellerini düşürerek yalın (modifiye edilmemiş) elektrotlarda tersinmez olan redoks tepkimelerinin tersinir olarak gerçekleşmesini sağlar. Ayrıca, aynı potansiyelde yalın elektrot kullanıldığında yavaş olan elektron transfer hızını modifiye elektrotta katalizin arttırdığı bilinmektedir (Bagheri ve ark., 2017). Bu nanoparçacıkların eşsiz özellikleri nedeniyle çeşitli elektrokimyasal algılama sistemlerinde farklı rolleri olmasına rağmen, nanoparçacıkların temel fonksiyonları şöyle sıralanabilir:

1) Biyomoleküllerin modifiye edilmemiş (yalın) yüzeylere adsorbsiyonu sıklıkla yapılarının bozulmasına ve biyoaktivitelerini yitirmesine yol açabilir. Diğer taraftan, biyomoleküllerin nanoparçacıkların yüzeyine adsorbsiyonu, nanoparçacıkların biyouyumlu olmalarından dolayı bu biyomoleküllerin biyoaktivitelerini sürdürmelerine yardımcı olabilir. Nanoparçacıkların birçoğu üzerlerinde yük barındırdığından, biyomolekülleri farklı yükler ile elektrostatik olarak adsorblar. Ayrıca geniş, spesifik yüzey alanı ve yüzeylerinde oldukça yüksek serbest enerji barındırmalarından dolayı nanoparçacıklar, biyomolekülleri güçlü bir şekilde adsorbe edebilir ve biyosensör tasarımında kullanılan

biyomoleküllerin immobilizasyonunda önemli bir rol üstlenirler;

2) Birçok nanoparçacık, özellikle metal nanoparçacıklar mükemmel katalitik özelliklere sahiptir. Katalitik özellikleri ile birlikte, metal nanoparçacıklar, elektrokimyasal sensör ve biyosensörlere uygulanarak analitiksel olarak önemli birçok elektrokimyasal tepkimenin aşırı potansiyellerini düşürerek, aşırı potansiyellerde etkin olan elektroaktif türlerin girişim etkisini giderebilir, seçiciliği arttırabilir ve geleneksel modifiye edilmemiş elektrotlarda gerçekleşen ve tersinmez olan bazı redoks tepkimelerinin tersinir olmasını sağlayabilirler;

3) Redoks enzimlerinin elektrotlar ile elektriksel bağlantısı, üçüncü nesil enzim elektrotlar için anahtar bir basamaktır. Enzimlerin elektrotlar ile doğrudan elektriksel bağlantısı, enzimin ince protein katmanları ile izole edildiğinden dolayı oldukça zayıftır ve bu durum enzimin aktif merkezleri ve elektrotlar arasında elektron transferini engellemektedir. Nano boyutlardaki iletken özelliklere sahip metal nanoparçacıklar, mediyatör ya da elektriksel bir tel gibi davranarak enzimin aktif merkezleri ve elektrotlar arasında elektron transferinin arttırılmasına yardımcı olur;

4) Antijen, antikor ve DNA gibi biyomoleküllerin nanoparçacıklar ile etiketlenmesi duyarlı elektrokimyasal biyosensörlerin yapımında önemli bir rol oynamaktadır. Nanoparçacıklar ile etiketlenmiş biyomoleküller biyoaktivitelerini koruyabilir, birbirleri ile etkileşebilir ve bu nanoparçacıkların elektrokimyasal tayinine bağlı olarak analit miktarı tayin edilebilir;

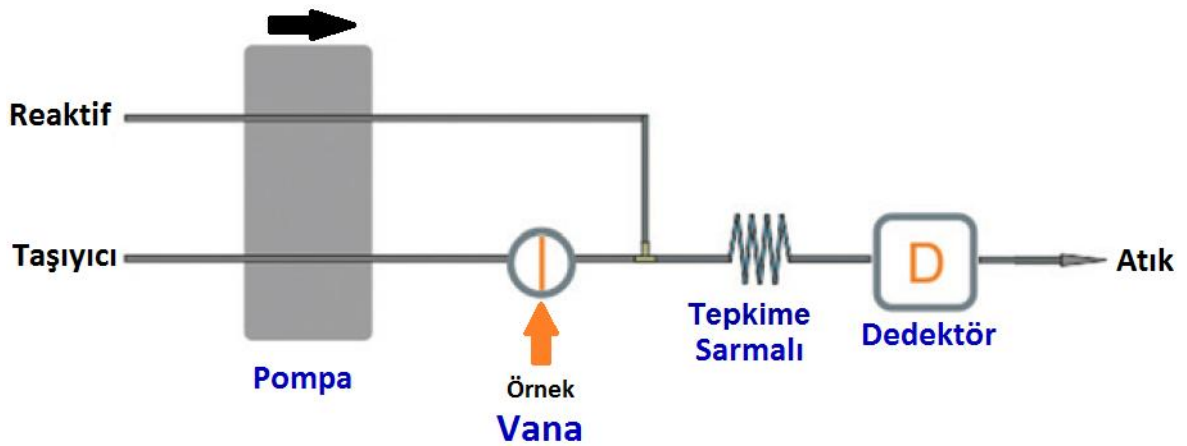
5) Bazı nanoparçacıkların kimyasal özellikleri yığımsal materyallerden oldukça farklı olup, yüksek yüzey enerjilerine bağlı olarak kimyasal aktiviteleri yüksek olabilir. Örneğin yığımsal (bulk) MnO_2 'in, H_2O_2 ile doğrudan tepkimeye girebilmesinden dolayı, H_2O_2 'nin bozunmasını katalizlediği bilinir. Nanoparçacıkların aktif özelliklerinin ve bu nanoparçacıkların özel reaktifler olarak kullanımı gibi avantajları göz önüne alındığında, bazı özgün elektrokimyasal analiz sistemlerinin tasarlanabilmesine de imkân sağlayabilmektedir (Luo ve ark., 2006).

6) Ayrıca bimetalik nanoparçacıkların (Pt-Au), sinerjistik etki göstererek analit ile elektrot arasındaki elektron transferini arttırdığı ve analite alınan yanıtın yükselmesine olanak sağladığı da rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2009a).

Bahsedilen üstün avantajlarından dolayı metal nanoparçacıkların ve hibrit türlerinin elektrokimyasal sensör/biyosensör tasarımında kullanımlarına olan ilgi artarak devam etmektedir.

1.3. Elektrokimyasal Sensör ve Biyosensör Tasarımında Akışa Enjeksiyon Analizi (FIA)

Akışa enjeksiyon analizi (FIA), sürekli akışın olduğu ortama sıvı örneğin enjekte edilerek, örneğin bir akış dedektörüne taşınması ve dedektörde elde edilen sinyalin gözlenmesi ilkesine dayanır. Elde edilen sinyal zamana bağlı pik şeklindedir (Nişli ve ark., 2002). Bu yöntem ilk olarak, Ruzicka ve Hansen tarafından 1975 yılında geliştirilmiştir (Ruzicka ve Hansen; 1975). Sistem, (i) taşıyıcı çözeltiyi sisteme göndermek için kullanılan çok kanallı bir peristaltik pompa, (ii) enjeksiyon vanası (iii) tepkime sarmalı (genelde kolon) ve (iv) bir dedektörden oluşmaktadır (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Normal bir FIA sisteminin şematik gösterimi (Trojanowicz ve Kołacińska, 2016)

FIA yöntemi pahalı cihazlar gerektirmeksizin, büyük örnekleme hızına imkân sağlayan yüksek doğruluğa ve kesinliğe sahip bir yöntemdir. FIA sistemleri, sıvı-sıvı ekstraksiyonu, iyon değişimi, gaz difüzyonu ve diyalize dayalı ayırma tekniklerinde ve kararlı olmayan reaktiflerin hazırlanması gibi farklı amaçlarda kullanılabilir (Nişli ve ark., 2002; Dilgin ve Gökçel, 2015). FIA sistemi, hızlı analize olanak sağlayan bir yöntem olup, özellikle kapalı bir sisteme sahip olması sebebiyle tehlikeli ya da toksik maddelerin deriyle doğrudan temasını önlemekle beraber, örneklerin ve reaktiflerin hava ile etkileşimlerini ortadan kaldırmaktadır (Nişli ve ark., 2002). FIA yöntemi rutin analizler için, oldukça sınırlı örnek tüketimi, bir akış dedektörü içinde geçici sinyal ölçümüne dayalı kısa analiz süresi, türlerin tayininde oldukça zor ayrımlar ve analizde kimyasal dönüşümler için uygun bir yöntem olması gibi önemli avantajlara sahiptir. FIA'nın bu önemli avantajlarından dolayı, kabul edilebilir bir doğrulukta, tekrarlanabilir, kararlı ve hızlı yanıt almak için çeşitli modifiye elektrotlar kullanılarak sensör ve biyosensör

çalışmaları FIA sisteminde de gerçekleştirilmiştir (Yu ve ark., 2003; Dilgin ve Gökçel, 2015; Sağlam ve ark. 2016; Ertek ve ark., 2016; Sağlam ve Dilgin., 2017; Emir ve Dilgin, 2018; Ayaz ve Dilgin, 2017; Dilgin ve ark., 2018).

1.4. Hidrojen Peroksidin Çevre ve Canlı Sistemlerdeki Önemi

Hidrojen Peroksit (H_2O_2), gıda ve tekstil endüstrileri, kâğıt hamuru ve kâğıt ağartma, ilaç araştırmaları, klinik laboratuvarlar, tıbbi teşhis, çevre analizi, antiseptik ve dezenfektan üretimi, temizlik ürünleri, minerallerin işlenmesi ve biyokimya gibi çok çeşitli alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır. H_2O_2 , çeşitli biyolojik olaylarda ve hücre içi yollarda yer alır ve glukoz oksidaz, kolesterol oksidaz, glutamat oksidaz, ürat oksidaz, laktat oksidaz, alkol oksidaz, D-aminoasit oksidaz, lisin oksidaz ve okzalot oksidaz gibi oksidazların enzimatik tepkimelerinin yan ürünü olarak ortaya çıkar ve aynı zamanda horseradish peroksidaz enzimi için bir substrattır. Güçlü bir yükseltgeyici reaktif olan H_2O_2 birçok organik bileşiklerin sentezinde kullanılabilir ve aynı zamanda sıvı temelli yakıt hücreleri için oksitleyici olarak uygulanabilir (Chen ve ark., 2013b). Canlı organizmalarda iyi bilinen zehir etkilerinin yanı sıra H_2O_2 , immün hücre aktivasyonu, vasküler (damarsal) yeniden biçimlenme, hücre ölümü, stoma kapanması ve kök büyümesi gibi çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde bir sinyalleşici molekül olarak önemli rol oynar (Chen ve ark., 2012a). Ayrıca, H_2O_2 seviyelerinin yüksek olması (genellikle $\geq 50 \mu M$) çok çeşitli hayvan, bitki ve bakteri hücreleri için zehir etkisi meydana getirdiği bilinmekte olup, H_2O_2 'nin hücre içi sınır derişimi 20-50 μM olarak verilmiştir (Halliwell ve ark., 2000). Parkinson ve Alzheimer gibi birçok nörodejeneratif hastalık, aşırı miktarda H_2O_2 ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Bu nedenlerden ötürü, H_2O_2 , biyolojik süreçlerin görüntülenmesinde temel bileşiklerden biri haline gelmiştir. H_2O_2 seviyelerinin tespiti, fizyoloji, patoloji ve çevre alanları için önem arz etmekte olup, H_2O_2 'nin doğru ve duyarlı olarak tayini, farklı çevresel sistemler için bir gereklilik halini almıştır (Al-Hardan ve ark., 2018). Son zamanlarda kemilüminesans (Tasplev, 2012; Mahbub ve ark, 2015), floresans (Wen ve ark, 2011), spektrofotometrik (Vasicek, 2011) ve titrimetrik (Gimeno, 2013) yöntemler H_2O_2 'nin tayininde kullanıldığı görülmektedir. Fakat pahalı cihaz gereksinimi, fazla çözücü tüketimi ve örnek hazırlama basamakları bu metotların kullanılabilirliklerini kısıtlamaktadır. Bu yöntemler ile karşılaştırıldığında, elektroanalitik yöntemlerin düşük maliyetli ve kolay uygulanabilir olması, hızlı ve duyar tayinlere olanak vermesi oldukça önemli üstünlükleridir (He ve ark., 2017). Özellikle, yeni tasarlanan elektrokimyasal akış hücreleriyle birlikte FIA sisteminin elektrokimyasal tekniklere entegre edilmesi, bir çok

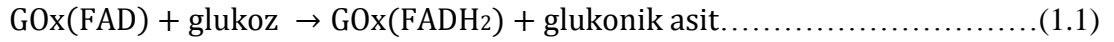
analit için duyarlı, hızlı ve yüksek doğrulukta elektrokimyasal sensör ve biyosensör geliştirilmesine olanaklar sunmaktadır (Hansen, 1996; Mayer ve Ruzicka 1996).

1.5. Glukoz Oksidaz (GOx) Temelli Elektrokimyasal Glukoz Biyosensörleri

Glukozun tayini, biyomedikal uygulamalardan çevreyle ilgili uygulamalara kadar değişen birçok alanda büyük öneme sahiptir. Klinik tıpta şeker hastalığı (diabetes mellitus), ölüm, metabolik ve fiziksel bozukluklar ile sonuçlanan hastalıklardan birisidir. Bu metabolik hastalık, insülin eksikliğinden kaynaklanır ve açlık kan şekeri (3,9 – 6,2 mM) ile tokluk kan şekeri (3,9 – 7,8 mM; yemekten iki saat sonra) sınırlarından daha yüksek derişimlerde kan şekeri yüksekliği ile kendini göstermektedir. Bu sebeple, kandaki glukozun nicel olarak tayini, şeker hastalığından kaynaklı kalp hastalığı, böbrek yetmezliği ya da körlük gibi önemli hastalıkları azaltmak açısından klinik uygulamalarda büyük bir öneme sahiptir (Chen ve ark., 2013a). Günümüzde diyet kısıtlamaları ve kan glukoz seviyelerini kontrol etmek, şeker hastalığı için en etkili tedavilerdir. Kan glukoz seviyesi, şeker hastalığının teşhisi için önemli bir belirteçdir. Bu amaçla, hızlı, verimli ve düşük maliyetli bir glukoz saptama yöntemi oldukça önem arz etmektedir. Kolorimetri, fluorometri ve enzimatik elektrotlar kan glukozunun nicel olarak belirlenmesinde ana yöntemlerdir. Bunlar içerisinde enzimatik elektrot temelli glukoz biyosensörleri, yüksek seçicilikleri, yüksek duyarlılıkları, kısa cevap süresi, düşük maliyeti ve karmaşık bir sistemde glukozu sürekli olarak ölçebilme gibi avantajlarından dolayı en çok kullanılan yöntemdir (Zeng ve ark., 2018).

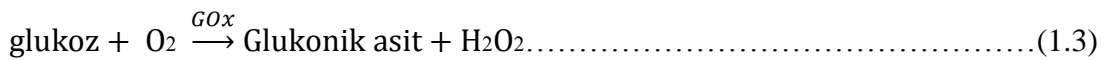
Biyospesifik enzim tepkimelerine dayanan elektrokimyasal biyosensörler, son otuz yılda büyük ilgi çeken ve halâ aktif olarak devam eden bir araştırma alanıdır. Enzim temelli amperometrik biyosensörlerde, oksidaz ve dehidrogenaz enzimleri çeşitli yükseltgenme-indirgenme tepkimelerini katalizlemek için en çok kullanılan enzimlerdir (Dilgin ve ark., 2018). Glukoz oksidaz (Glucose oxidase (GOx), *Aspergillus Niger*'den elde edilen, enzim kodu (E.C.): 1.1.3.4), Clark ve Lyons'un (1962) sperm (seminal) çalışmasına kadar dayanan ve elektrokimyasal uygulamalar için en çok çalışılan redoks enzimidir. Kolay temin edilebilmesi, oldukça aktif ve kararlı olması, substratı olan β -D-glukozun izlenmesi ve en önemlisi diyabetin yönetimi açısından hayati öneme sahip olması gibi çok çeşitli avantajlarından dolayı oldukça popüler bir enzimdir (Bartlett ve ark., 2018). İlâveten GOx, düşük maliyeti, yüksek seçiciliği ve yüksek duyarlılığı bakımından glukoz biyosensörlerinin tasarımında yaygın olarak kullanılmaktadır. GOx temelli bir glukoz biyosensörünün biyokatalitik tepkimesi, enzimdeki flavin adenin dinükleotit (FAD)

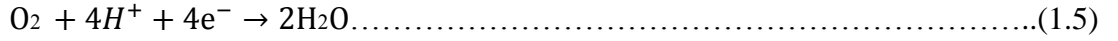
grubunun glukoz ile enzimatik tepkimeye girerek glukozu, glukonik aside yükseltmesi ve kendisinin de indirgenmiş formuna (GOx-FADH₂) dönüşmesi esasına dayanır. Ardından elektron akseptörü (Med_{ox}) tarafından GOx-FADH₂ tekrar yükseltgenmiş formuna (GOx-FAD) dönüştürülerek okside formu tekrar elde edilmiş olur (Chen ve ark., 2013a).



Enzimatik döngüdeki FAD grubunun tekrardan oluşması hayati öneme sahiptir, çünkü aksi halde bir enzim molekülü sadece bir kez etkili olabilir ve bir sonraki enzimatik tepkime döngüsü bozulur (Chen ve ark., 2013a). GOx(FAD)'nin rejenere edilmesinde (yeniden oluşumunda) kullanılan elektron alıcısının (Med_{yük}) doğasına bağlı olarak amperometrik glukoz biyosensörleri üç nesil içinde sınıflandırılabilir.

*1. Nesil Biyosensörler: Birinci nesil enzim temelli biyosensörlerde GOx(FAD)'yi rejenere etmek için akseptör (Med_{yük}) olarak fizyolojik O₂ kullanılır ve glukozu belirlemek amacıyla enzimatik bir tepkime sürecinde O₂ tüketimi ve H₂O₂'nin oluşumu izlenir. O₂, GOx'un fizyolojik elektron akseptörüdür (alıcısıdır) ve dolayısıyla elektron iletimi oldukça hızlı olmalıdır. Genellikle O₂ tüketimini izlemek glukozun nicel tayinini gerçekleştirmek için kullanılırken, H₂O₂'nin enzimatik olarak oluşumu, H₂O₂'nin hem yükseltgenmesi hem de indirgenmesi ile izlenebilir ve H₂O₂'nin anodik yükseltgenmesi, enzimatik döngüyü ilerletmek amacıyla O₂'yi tekrar oluşturur/yeniler. O₂ tüketimi ve H₂O₂'nin oluşumuna dayanan birinci nesil biyo algılama yöntemi, basitlik, kararlılık ve minyatürize edilmiş küçük aygıtlara uyarlanabilmesi açısından avantajlıdır. Birinci nesil glukoz biyosensörlerinin yanıtı, çözeltideki O₂ derişimi ile doğrudan ilişkili olup, O₂ miktarı analizde önemli rol oynamaktadır. Kandaki oksijenin on katı kadar fazla glukoz varlığı, oksijen eksikliğine sebep olmakla beraber, birinci nesil amperometrik biyosensörler için en ciddi problemi oluşturmaktadır (Toghill ve Compton, 2010; Chen ve ark., 2013a).

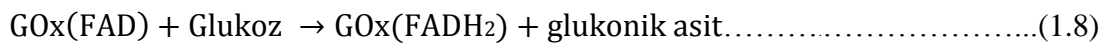


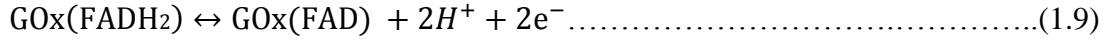


*2. Nesil Biyosensörler: Biyosensörlerin elektron transfer hızını arttırmak amacıyla en etkili yöntem, GOx döngüsünü devam ettirmek için O₂ yerine sentetik (el yapımı) akseptör, Med_{yük} kullanmaktır. Bu Med_{yük}, çözelti ortamında enzimin aktif bölgesinin içine ya da dışına difüzlenebilir, mediyatör enzime doğrudan bağlanıp, enzim filmi içerisinde tutulabilir ya da bir redoks iletken polimer kullanarak elektronların, enzimin aktif bölgesinden veya aktif bölgesine doğru transferi sağlanabilir. Bir amperometrik biyosensörde, FAD'yi rejenere edip enzim döngüsünü devam ettirebilmek adına O₂ yerine sentetik (el yapımı) akseptör, Med_{yük} kullanılması durumunda ikinci nesil biyosensörler sınıfında yer alır. Ferrosen, ferrisiyanür, kinon bileşikleri ve geçiş-metal kompleksleri GOx enzimi için en etkili mediyatörlerdir (Toghill ve Compton, 2010; Chen ve ark., 2013a).

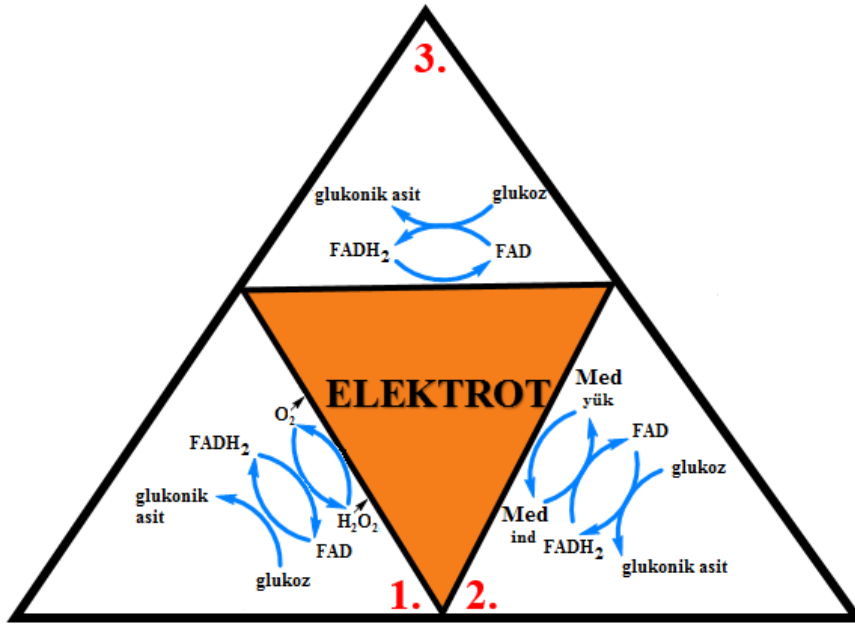


*3. Nesil Biyosensörler: Üçüncü nesil biyosensörler oldukça ilgi çekicidir, çünkü mediyatörlerin yokluğunda yapılan biyo algılama en idealidir. GOx'un doğrudan elektriksel iletimi, GOx'un redoks potansiyelinden (yaklaşık -0.50 V vs. Ag/AgCl) biraz pozitif olan düşük potansiyellerinde glukozun tayinine de katkıda bulunabilir. Enzimlerin doğrudan elektron iletimini gerçekleştirmek, önemli ölçüde enzimin prostetik grubuna ve elektrot yüzeyi arasındaki uzaklığına önemli ölçüde bağlıdır. Apoproteinlerin kofaktör modifiye elektrotlar üzerine modifikasyonu ve Au kofaktörler ile fonksiyonelleştirilmiş Au nanoparçacıklar, redoks enzimlerin elektrotlar üzerine modifikasyonu için çok yönlü bir yöntem olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Chen ve ark., 2013a; Zayats ve ark., 2005; Willner ve ark., 1996; Fruk ve ark., 2009; Xiao ve ark., 2003; Patolsky ve ark., 2004; Zayats ve ark., 2002; Zayats ve ark., 2008). Bu yöntem, enzimler ile elektrotlar arasındaki elektriksel iletkenliği arttırmada etkili olmasına rağmen, içerdikleri karmaşık prosedürler, pratikte kullanılabilirliğini kısıtlamaktadır (Chen ve ark., 2013). Üçüncü nesil biyosensörlerde glukozun doğrudan yükseltgenmesine ilişkin tepkime basamakları aşağıda verilmiştir (Chen ve ark., 2013a).





Özetle, GOx(FAD)’nin rejenere edilmesinde Med_{yük} olarak O₂ fizyolojik medyatörü kullanıldığında birinci nesil, Med_{yük} olarak el yapımı (sentetik) elektron alıcısı (akseptörü) kullanıldığında ikinci nesil ve Med_{yük} olarak GOx’un formal potansiyelinin pozitif bir potansiyelinde uyarlanmış (potantiostated) elektrotlar kullanıldığında ise üçüncü nesil amperometrik biyosensörler olarak sınıflandırılır (Şekil 1.6) (Toghill ve Compton, 2010; Chen ve ark., 2013a).



Şekil 1.6. 1. 2. ve 3. nesil amperometrik biyosensörlerde glukozun enzimatik yükseltgenmesinin şematik özeti (Toghill ve Compton, 2010; Chen ve ark., 2013a)

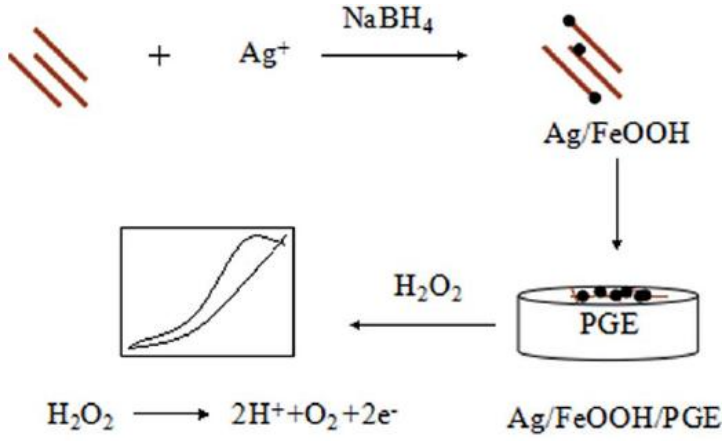
BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Literatürde gerek H_2O_2 'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi ya da indirgenmesine bağlı elektrokimyasal H_2O_2 sensörü ve gerekse oksidaz enzimine bağlı elektrokimyasal glukoz biyosensörü üzerine çok sayıda çalışma mevcuttur. Bu tez kapsamında karbon bazlı elektrotlara göre birçok avantajı olan tek kullanımlı PGE ve metal nanoparçacık modifiye elektrotlar kullanıldığından, önceki çalışmalar kısmında sadece bu elektroda dayalı elektrokimyasal H_2O_2 sensörü ve elektrokimyasal glukoz biyosensöründen bahsedilecektir. Bunun dışında FIA sisteminde de bu yönde çalışmaların mevcut olduğu makaleler de yayınlanmıştır. Tez kapsamında FIA sistemi kullanıldığından bu yönde yapılan çalışmalardan da kısaca bahsedilecektir.

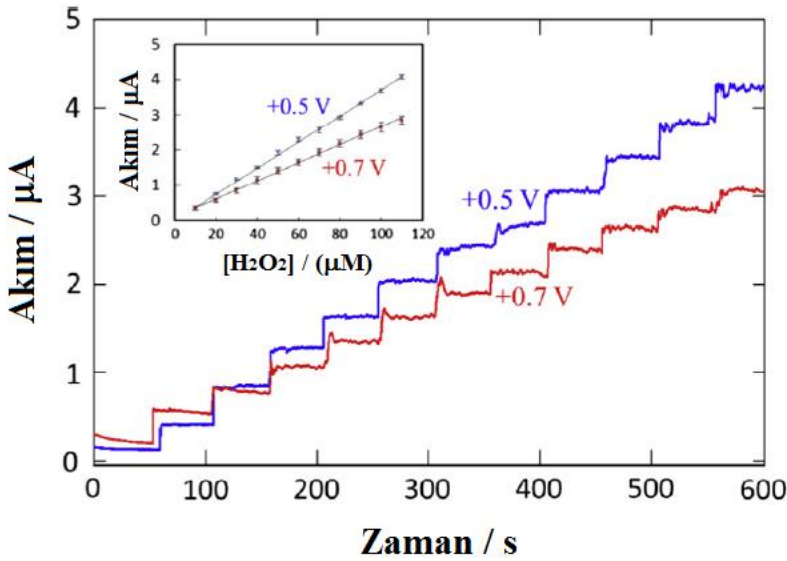
2.1. Kalem Grafit Elektrot Kullanılarak Gerçekleştirilen Elektrokimyasal Sensör/Biyosensör Çalışmaları

PGE kullanılarak H_2O_2 'nin doğrudan (enzim kullanmadan) elektrokimyasal tayinine yönelik literatürde çeşitli çalışmalar rapor edilmiştir. Zhang ve Zheng (2015) tarafından rapor edilen bir çalışmada, Ag/FeOOH nanokompozit malzeme ile modifiye edilmiş bir PGE, H_2O_2 'nin doğrudan elektrokimyasal tayini için geliştirilmiştir (Şekil 2.1). Geliştirilen sensör, H_2O_2 'nin yükseltgenmesine iyi bir elektrokatalitik performans göstermiş olup, amperometrik yöntem kullanılarak H_2O_2 'ye 0,03 – 15,0 mM arasında doğrusal yanıt aralığı ile birlikte LOD 22,8 μ M H_2O_2 olarak belirlenmiştir. İlâveten tasarlanan sensörün performansı H_2O_2 içeren bir dezenfektan üzerinde başarıyla test edilmiş ve H_2O_2 'ye tekrarlanabilir yanıtların alındığından bahsedilmiştir (Zhang ve Zheng, 2015). Ag/FeOOH nanokompozit modifiye PGE ile H_2O_2 'nin yükseltgenmesine bağlı elektrokimyasal sensör geliştirilmiş olup, H_2O_2 'nin tayininde yüksek seçicilik ve kararlılık gösterdiği vurgulanmıştır.



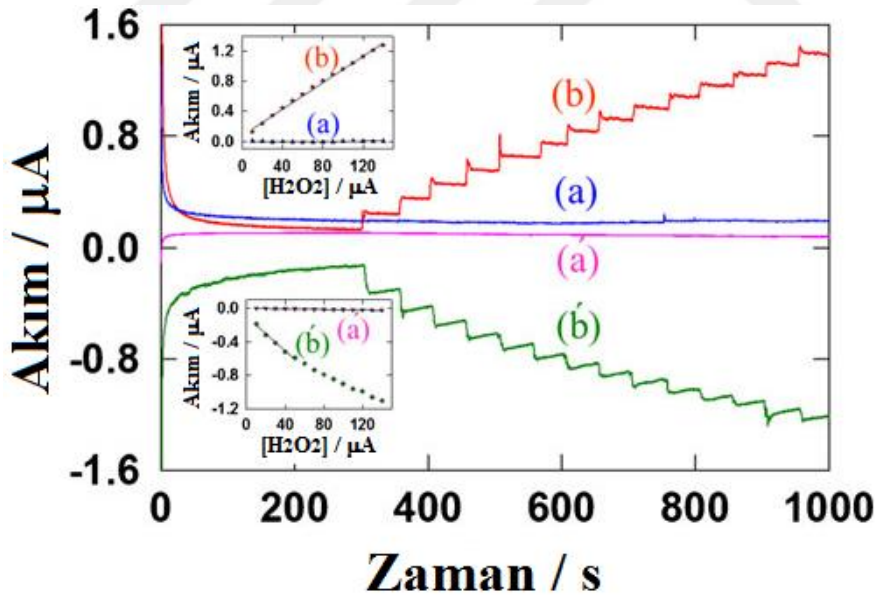
Şekil 2.1. PGE yüzeyine Ag/FeOOH modifiye edilerek hazırlanan bir elektrokimyasal H₂O₂ sensörüne ilişkin şematik gösterim (Zhang ve Zheng, 2015)

Diğer bir çalışmada, Kawde ve ark. (2015) PGE yüzeyini iyi bir iletken olan Pt nanoparçacıklar ile modifiye ederek H₂O₂'nin yükseltgenmesi üzerinden amperometrik olarak tayin edilebileceğini göstermişlerdir (Şekil 2.2). Elde edilen sonuçlara göre, Pt nanoparçacık modifiye PGE'nin modifiye edilmemiş PGE'ye göre iyi bir elektrokatalitik etki gösterdiği belirtilmiş olup, +500 mV uygulama potansiyelinde 10 – 110 µM H₂O₂ doğrusal yanıt aralığı ile birlikte LOD 3,6 µM olarak hesaplanmıştır (Kawde ve ark., 2015).



Şekil 2.2. Pt nanoparçacık modifiye PGE kullanılarak iki farklı uygulama potansiyelinde (+500 mV ve +700 mV) H₂O₂'nin ardı sıra 10 µM'lık eklemeleri sonucunda alınan amperometrik yanıtlara ait akım-zaman grafikleri (Destek çözelti: 0,10 M pH 7,0 PBS) (Kawde ve ark., 2015)

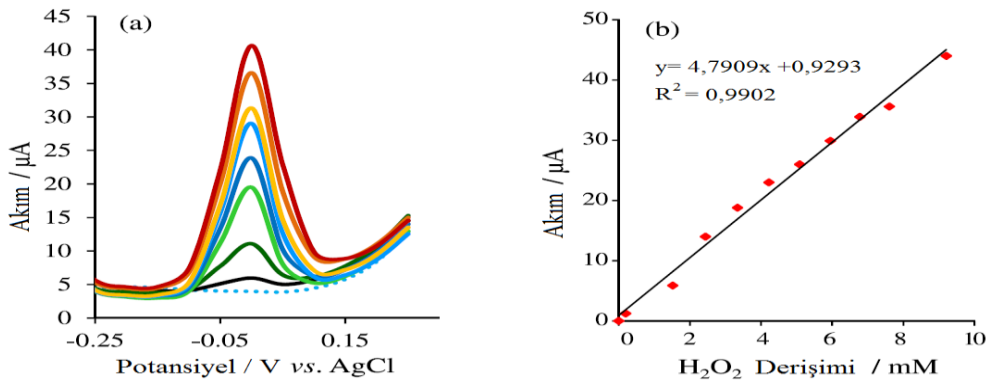
Başka bir çalışmada, Aziz ve Kawde (2013), eşsiz elektrokatalitik özellikleri, yüksek kararlılıkları ve yüksek yüzey/hacim oranları gibi özelliklere sahip metal nanoparçacıklardan biri olan Pd nanoparçacıkları PGE yüzeyine modifiye etmişler ve bu elektrot kullanılarak H_2O_2 'nin tayinine yönelik basit ve hızlı bir yöntemi literatüre kazandırmışlardır. Döngüsel voltammetri yöntemi kullanılarak, tasarlanan sensörün H_2O_2 'ye yanıtı incelenmiş ve Pd nanoparçacık modifiye PGE'nin H_2O_2 'nin indirgenmesine karşı belirgin bir elektrokatalitik etkinlik gösterdiği belirtilmiştir. +800 mV ve -250 mV uygulama potansiyellerinde sırasıyla H_2O_2 'nin yükseltgenmesi ve indirgenmesi üzerine yapılan amperometrik çalışmalar sonucu doğrusal yanıt aralıkları sırasıyla 10 – 50 μM ve 10 – 140 μM H_2O_2 olarak tespit edilmiş olup, LOD değerleri 0,045 μM ve 1,0 μM olarak tayin edilmiştir (Şekil 2.3). Bahsedilen çalışmalar (Kawde ve ark., 2015; Aziz ve Kawde, 2013) tez kapsamında kullanılan çalışmaya benzer olsa da, tez çalışmasındaki fark, FIA sisteminde daha duyar ve hızlı amperometrik H_2O_2 sensörü geliştirilmiştir. Ayrıca tez çalışmasında PtNP ve PdNP'ler PGE yüzeyine elektrokimyasal yolla biriktirilmişken, literatüde verilen bu çalışmalarda kimyasal yolla elde edilen PtNP ve PdNP'ler PGE yüzeyine sonradan modifiye edilmiştir.



Şekil 2.3. Yalın (a ve a') ve Pd modifiye PGE (b ve b') için +800 mV uygulama potansiyelinde (a ve b) H_2O_2 'nin ardı sıra 10 μM 'lık eklemeleri sonucunda alınan amperometrik yanıtlara ait akım-zaman grafikleri ve -250 mV uygulama potansiyelinde (a' ve b') ardı sıra 50 μM 'lık eklemeleri sonucunda alınan amperometrik yanıtlara ait akım-zaman grafikleri (Destek çözelti: 0,10 M pH 7,0 PBS) (Aziz ve Kawde, 2013)

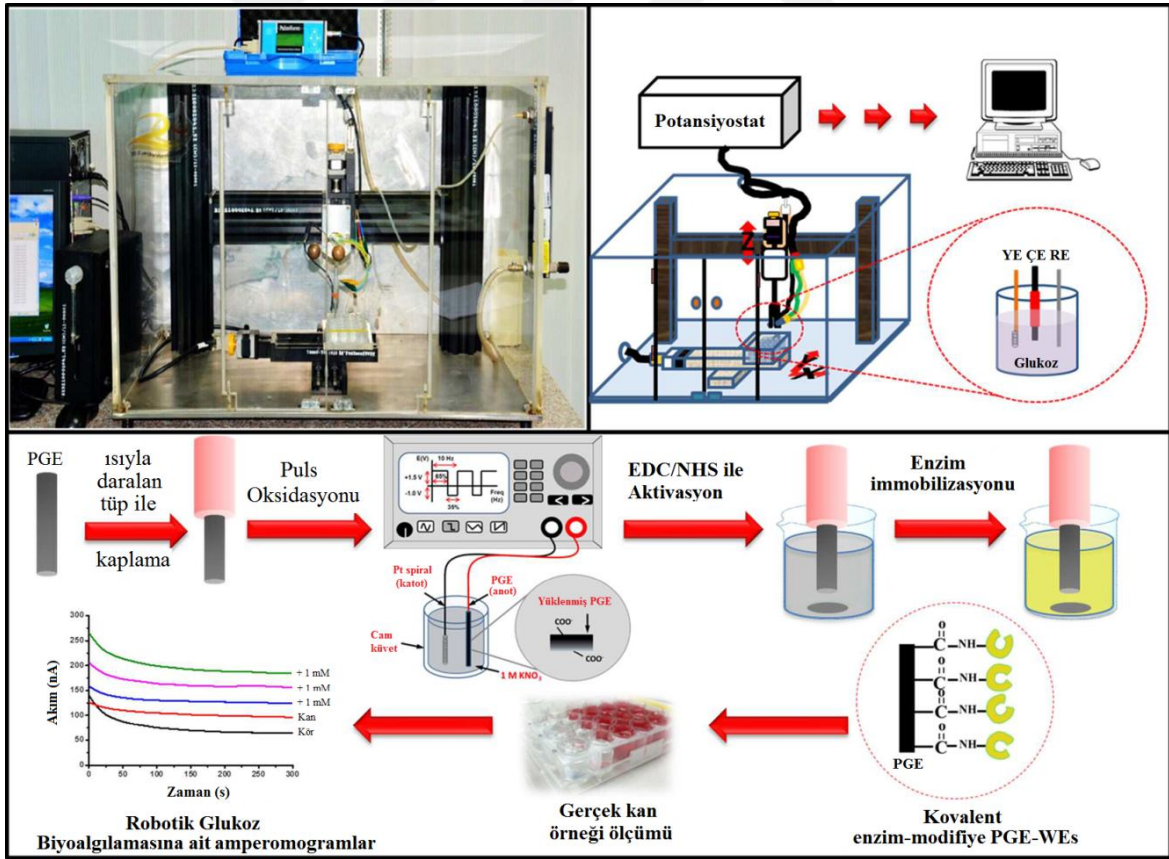
Chaisuksant ve ark. (2016) ise O_2 'nin indirgenmesine aracılık yapan ve bir redoks mediyatör gibi davranan mangan (IV) oksiti (MnO_2) ince bir film şeklinde PGE yüzeyine modifiye ederek H_2O_2 'nin yükseltgenmesine dayalı düşük maliyetli bir H_2O_2 sensörü tasarlamışlardır. İlâveten, H_2O_2 tayini için tasarlanan modifiye elektrodun bazik ortamda yalın formuna göre (+800 mV) daha düşük bir uygulama potansiyeli uygulayarak (+500 mV) H_2O_2 'nin amperometrik yanıtı incelenmiştir. Çalışmalar neticesinde, H_2O_2 'ye doğrusal yanıtın alındığı derişim aralığı 0,015 mM ile 4,06 mM arasında bulunmakla birlikte LOD 8,0 μM olarak tayin edilmiştir. Ayrıca, tasarlanan sensörün performansı dört farklı saç boyası örneklerinde standart katma metodu ile test edilmiş olup, elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında MnO_2 modifiye PGE'nin gerçek örneklerle uygulanabileceğini göstermişlerdir (Chaisuksant ve ark., 2016).

H_2O_2 'nin algılanmasına yönelik başka bir çalışma, Kamyabi ve Hajari (2017) tarafından rapor edilmiştir. İlgili çalışmada, bakır oksit (CuO) nanoparçacıkları aktifleştirilmiş PGE yüzeyine elektrokimyasal biriktirme yoluyla modifiye edilerek diferansiyel puls voltammetrik yöntem (DPV) ile H_2O_2 'nin enzimatik olmayan yoldan tayini için kullanmışlardır (Şekil 2.4). Analizler neticesinde H_2O_2 için doğrusal yanıt aralığı 5,0 μM ile 1,6 mM arasında bulunmuş olup, LOD 0,21 μM olarak saptanmıştır. Ayrıca glukoz, askorbik asit ve ürik asit varlığında sensörün seçiciliği incelenmiş ve belirlenen koşullarda gerçekleştirilen analizler neticesinde glukoz ve ürik asidin girişim etkisinin olmadığı görülmüş olup, askorbik asidin H_2O_2 'nin pik akımına etkisinin % 3'ten az olduğu bulunmuştur. Ayrıca sensör iki farklı süt örneğine uygulanarak % 98 ve % 97 oranında geri kazanımlar ile H_2O_2 'nin yüksek doğrulukta tayinine imkân sağladığı rapor edilmiştir.



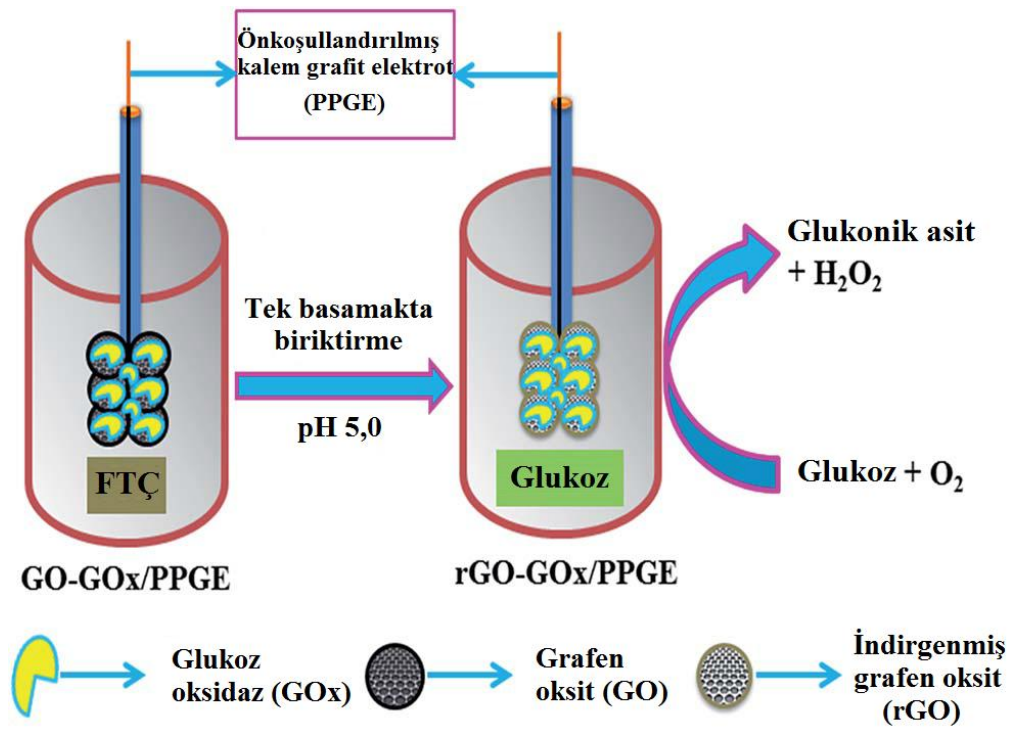
Şekil 2.4. a) H_2O_2 tayini için Cu/PGE'de kaydedilen DP voltammogramları (Destek çözelti: 0,10 M NaOH çözeltisi) ve b) Elde edilen kalibrasyon eğrisi (Kamyabi ve Hajari, 2017)

H_2O_2 'nin enzim kullanılmadan tayin edilmesine yönelik gerçekleştirilen çalışmaların yanı sıra, GOx enzimi kullanılarak glukozun enzimatik yükseltgenmesi sonucu oluşan yan ürün H_2O_2 'nin yükseltgenmesi ve/veya indirgenmesinin izlenmesi üzerine geliştirilen çeşitli elektrokimyasal biyosensörler de literatürlerdeki yerlerini almıştır. Bu çalışmaların birinde, glukozun enzimatik yoldan tayinine ilişkin yeni bir metot ortaya konulmuştur (Teanphonkrang ve Schulte, 2017). Buna göre, ucuz ve kolay bulunabilir bir elektrot olan PGE yüzeyinde anodik yükseltgeme sonucu oluşturulan karboksilat gruplarının GOx'daki amino grupları ile karbonimid/süksinimid çapraz bağlanması üzerine özgün ve basit bir fabrikasyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.5). Amperometrik ölçümler sonucunda +600 mV uygulama potansiyelinde doğrusal yanıt aralığı ve LOD sırasıyla 0,10 – 8,0 mM ve 0,05 mM glukoz olarak ölçülmüştür. Robotik otomasyon sistemi ile mikro plakalar üzerinde standart ekleme metodu kullanılarak insan kan serumu örneklerinde glukoz için % 100'e yakın bir geri kazanım elde edildiği görülmüş ve glukoz için tasarlanan biyosensör sisteminin gerçek örneklere uygulanabilirliği başarıyla test edilmiştir.



Şekil 2.5. Mikrotitrasyon plakalarında GOx modifiye PGE'nin hazırlanmasına ve robotik amperometrik glukoz biyosensörüne ilişkin şematik gösterimler (YE: yardımcı elektrot; ÇE: çalışma elektrodu ve RE: referans elektrot) (Teanphonkrang ve Schulte, 2017)

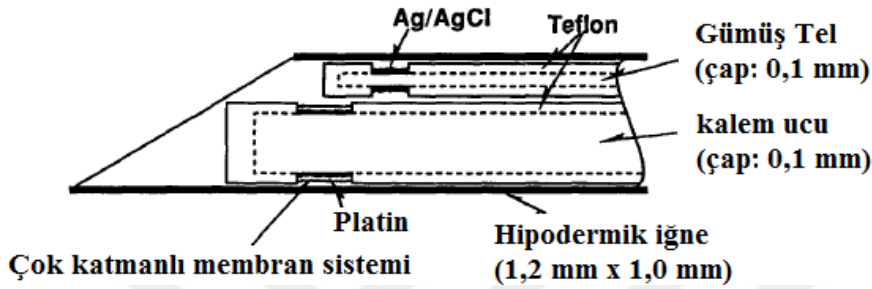
PGE kullanılarak glukozun tayinine yönelik geliştirilen başka bir biyosensör çalışması, Vijayaraj ve ark. (2016) tarafından yayınlanmıştır. Çalışmada ön koşullandırılmış PGE yüzeyine indirgenmiş grafen oksit (rGO) ve GOx modifiye edilmiş ve glukozun enzimatik yoldan tayin edilmesinde kullanılmıştır. CV yöntemi kullanılarak yapılan analizler neticesinde, kullanılan rGO'nun PGE yüzeyi ve GOx arasındaki doğrudan elektron transferini artırması yoluyla tasarlanan biyosensöre yüksek duyarlılık, seçicilik, tekrarlanabilirlik ve kararlılık sağladığı belirtilmiştir. Glukozun amperometrik olarak tayini, glukozun dolaylı yoldan enzimatik tepkimesi sonucu oluşan O_2 'nin indirgenmesi üzerinden gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Glukozun tayini için geliştirilen rGO-GOx/PPGE biyosensörünün yapımına ait şematik gösterim (Vijayaraj ve ark., 2016)

Amperometrik ölçümler sonucunda 10 – 100 μ M glukoz derişim aralığında doğrusal yanıt alındığı görülmüş ve LOD 5,8 μ M olarak belirlenmiştir. Ayrıca tasarlanan glukoz biyosensörünün çeşitli girişimcilerin varlığında glukozun seçici olarak tayinine olanak sağladığı da belirtilmiştir. Biyosensör insan kan serumları üzerinde uygulanarak, biyosensörün performansı test edilmiştir. Uygulanabilirlik testleri sonucunda % 95 - 110,6 arasında elde edilen geri kazanımlar ile biyosensörün gerçek örneklere başarıyla uygulanabileceği ortaya konmuştur.

Chen ve ark. (1992) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise, iğne tipi amperometrik glukoz biyosensörü tasarlanarak enzimatik yolla oluşan H_2O_2 'nin elektrokatalitik yükseltgenmesinin amperometrik metot ile izlenmesi üzerine bir çalışma gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.7) (Chen ve ark., 1992). Tasarlanan biyosensörün hızlı yanıt verdiği (<120 s), geniş bir doğrusal yanıt aralığına (0,28 – 33,3 mM), iyi tekrarlanabilirliğe (RE< % 3), iyi bir kararlılığa (kontrol serumunda 36 saatten fazla) ve iyi bir biyoseçiciliğe sahip olduğu vurgulanmıştır.



Şekil 2.7. İğne tipi glukoz biyosensörüne ait şematik gösterim (Chen ve ark., 1992)

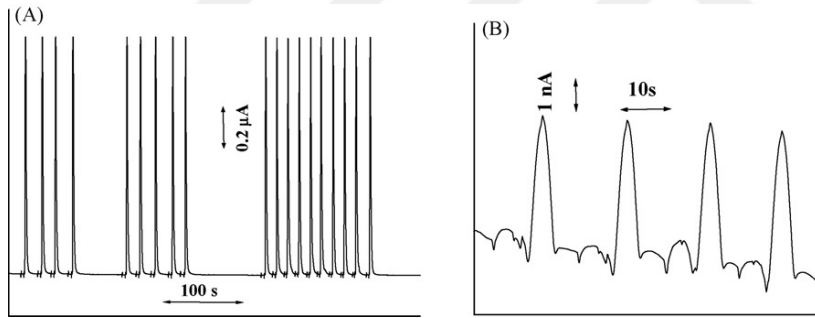
Literatürde, farklı elektrotlar ve modifikasyon malzemeleri kullanılarak hem H_2O_2 'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi ya da indirgenmesine bağlı elektrokimyasal H_2O_2 sensörü hem de GOx immobilize edilmiş modifiye elektrotlarla glukoz biyosensörüne ilişkin gerçekleştirilen benzer çalışmalar bir tablo halinde Çizelge 2.1'de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. PGE kullanılarak H₂O₂ ve glukozun tayinine yönelik yapılan elektrokimyasal sensör ve biyosensör çalışmaları

Çalışma Elektrodu	Metot	Analit	Analitin Davranışı	Uygulama Potansiyeli (mV)	Doğrusal Aralık (µM)	LOD (µM)	Duyarlılık	Kaynak
Ag/FeOOH/PGE	Amperometri	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ 'nin İndirgenmesi	-200	30 – 15000	22,8	8,07 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	(Zhang ve Zheng, 2015)
PtNP-PGE	Amperometri	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+500	10 – 110	3,6	0,37 A mM ⁻¹ cm ⁻²	(Kawde ve ark., 2015)
PdNP-PGE	Amperometri	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+800	10 – 50	0,045	Belirtilmemiş	(Aziz ve Kawde, 2013)
			H ₂ O ₂ 'nin İndirgenmesi	-250	10 – 140	1,0	Belirtilmemiş	
MnO ₂ -PGE	Amperometri	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+500	0,015 – 4,06	8,0	Belirtilmemiş	(Chaisuksant ve ark., 2016)
CuO/PGE	DPV	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	-	5,0 – 1600	0,21	4,75 µA mM ⁻¹	(Kamyabi ve Hajari, 2017)
GOx-p.PGE	Amperometri	Glukoz	H ₂ O ₂ oluşumu	+600	100 – 8000	50	20,5 nA mM ⁻¹	(Teanphonkrang ve Schulte, 2017)
GOx-rGO/p.PGE	Amperometri	Glukoz	O ₂ Tüketimi	-400	0,01 – 1,0	5,8	9,60 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	(Vijayaraj ve ark., 2016)
GOx/Pt Electroplated-PGE	Amperometri	Glukoz	H ₂ O ₂ oluşumu	+600	0,28 – 33,3	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	(Chen ve ark., 1992)
PGE/rGO-GOx	Amperometri	Glukoz	O ₂ Tüketimi	-600	40 – 600	0,61	278,4 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	(Sehat ve ark., 2014)

2.2. Akışa Enjeksiyon Analiz Sisteminde Gerçekleştirilen Amperometrik H₂O₂ Sensör ve Glukoz Biosensör Çalışmaları

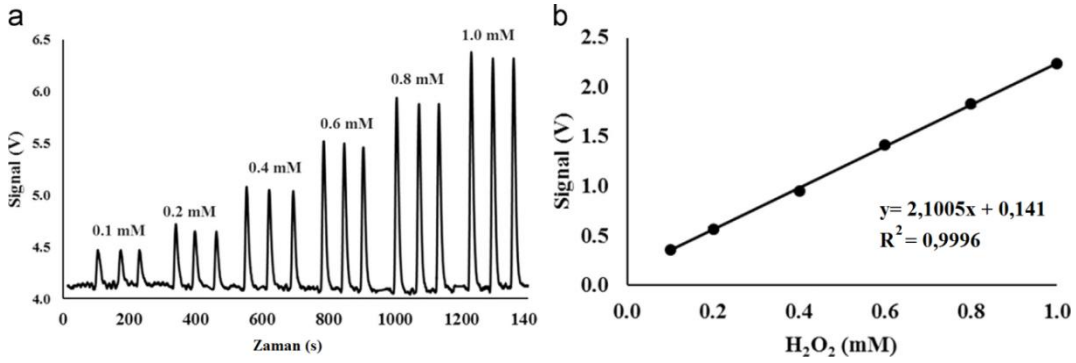
Literatürde H₂O₂'nin enzimlessiz (doğrudan) ve enzimli amperometrik tayinine yönelik birçok çalışma bulunmasının yanı sıra, farklı karbon temelli elektrotlar kullanılarak FIA metodu gibi hızlı, rutin çalışmalara olanak sağlayan yararlı bir yöntem ile yapılmış sınırlı sayıda birkaç çalışma da literatürdeki yerini almıştır. Örneğin, Chakraborty ve Raj (2009) H₂O₂'nin enzim kullanılmadan elektrokimyasal tayinine imkân sağlayan bir yöntem önermişlerdir. Bu yöntemde, GCE yüzeyine PDDA (Poly(dialildimetilammonyum) klorür) ve Pt nanoparçacıklar modifiye edilerek FIA sisteminde H₂O₂'nin yükseltgenmesinin izlenmesi üzerine amperometrik tayinini gerçekleştirmişlerdir (Şekil 2.8). +500 mV uygulama potansiyelinde gerçekleştirilen çalışmada, tasarlanan sensörün H₂O₂'ye 0,5 nM – 4,0 mM gibi oldukça geniş doğrusal yanıt aralığının olduğu belirlenmiş olup, sensör için LOD ve duyarlılık sırasıyla 0,5 nM ve 9,15 $\mu\text{A mM}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. İlgili çalışmanın, yakın gelecekte biyolojik öneme sahip analitler için sensörlerin ve biosensörlerin geliştirilmesinde kullanılabileceği öngörülmüştür.



Şekil 2.8. a) Nanoparçacık modifiye elektrodun 10 μM H₂O₂'ye verdiği FI amperometrik yanıt ve b) 0,50 nM H₂O₂'nin sisteme enjeksiyonu ile alınan yanıt (Uygulama potansiyeli +500 mV; taşıyıcı çözelti: pH 7,2 PBS ve akış hızı: 1,0 mL/dk) (Chakraborty ve Raj, 2009)

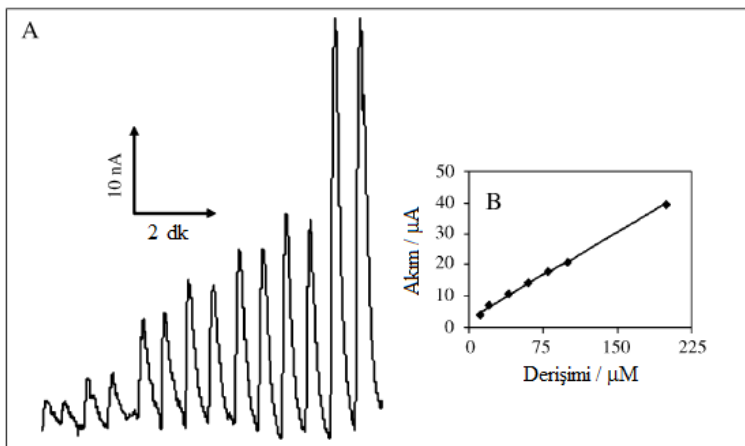
Reanpang ve ark. (2015) gerçekleştirdiği bir çalışmaya göre perde baskılı karbon elektrot (Screen printed carbon electrode, SPCE) yüzeyi karbon nanotüp (CNT) ve Pd nanoparçacık ile modifiye edildiğinde H₂O₂'nin indirgenmesine iyi bir elektrokatalitik etkinlik gösterdiğini belirlenmiştir. İlgili modifiye elektrot FIA sisteminde H₂O₂'nin enzimatik olmayan yoldan amperometrik tayini için kullanılmıştır. Bu amaçla, H₂O₂'nin artan derişimlerinin sisteme enjekte edilmesiyle okunan akımın değerleri veri sisteminde voltaj sinyaline dönüştürülerek grafiklere yansıtılmıştır (Şekil 2.9). Tasarlanan sensör ile 0,1 – 1,0 mM H₂O₂ arasında doğrusal yanıt alındığı rapor edilmiş ve H₂O₂ için LOD 20

μM olarak hesaplanmıştır. Ayrıca önerilen amperometrik sensör, dezenfektan, saç boyası ve süt örneklerine uygulanarak % 90 – 109 arasında geri kazanımlar elde edilmiş ve sensörün gerçek örneklere uygulanabilirliği kanıtlanmıştır.



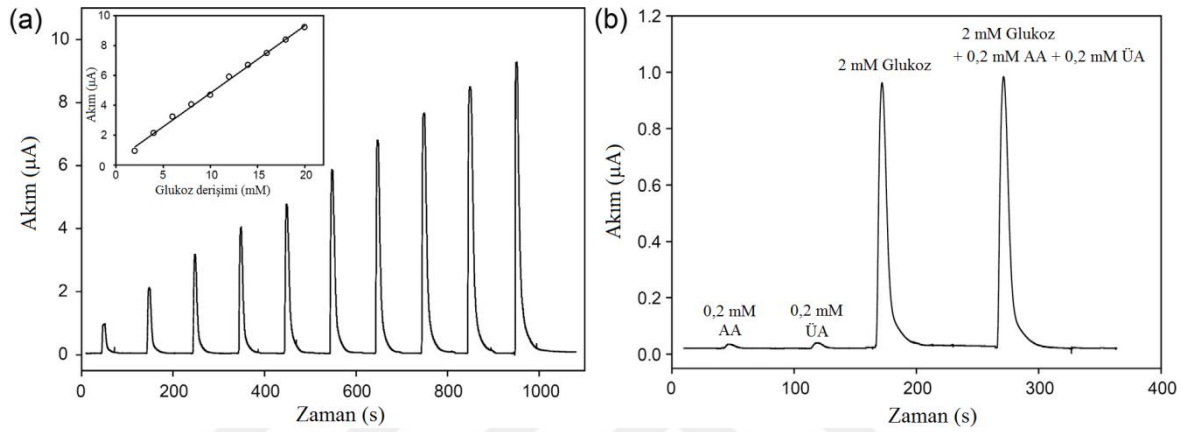
Şekil 2.9. FI Amperometrik sistemde 0,1 – 1,0 mM H_2O_2 için elde edilen a) FI amperomogramları ve b) kalibrasyon grafiği (Reanpang ve ark., 2015)

H_2O_2 'nin indirgenmesine iyi bir elektrokatalitik etki gösteren bir elektrokimyasal H_2O_2 sensör çalışması ise Hamidi ve ark. (2009) tarafından bildirilmiştir. İlgili çalışmada karbon pasta elektrot (CPE), $[\text{PFeW}_{11}\text{O}_{39}]^{4-}$ poli anyonu ile desteklenmiş amorf porlu silika jel 3-aminopropyl(triethoxy)silane (APS) ile doldurularak FIA sisteminde H_2O_2 'nin indirgenmesini izlemek için kullanılmıştır (Şekil 2.10). Modifiye elektrodun basit bir yolla hazırlanması, iyi mekanik ve kimyasal kararlılığa sahip olması ve tekrarlanabilirlik özelliklerinin iyi olması dikkat çekici avantajları olarak sıralanmıştır.



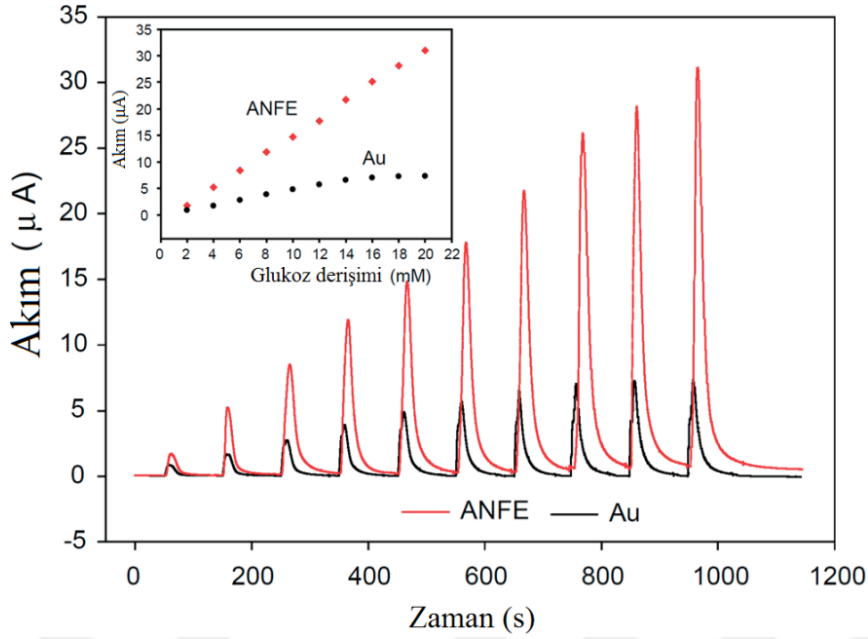
Şekil 2.10. APS-PFeW₁₁-CPE için H_2O_2 'nin artan derişimlerine alınan FI amperometrik yanıtlar (Taşıyıcı çözelti: 0,5 M pH 2,0 H_2SO_4 ; uygulama potansiyeli: 0 mV (vs. Ag/AgCl); örnek hacmi: 75 μL ve akış hızı 0,6 mL/dk) (Hamidi ve ark., 2009)

Yang ve ark. (2016), nano boyutta polioksometalat ile aşılınmış grafen nanohibrit (POM-g-rGO) malzemesini çalışma elektrodu olarak H_2O_2 'nin enzim kullanmadan ve GOx enzimi kullanarak FIA sisteminde amperometrik tayini amacıyla kullanmışlardır. Kullanılan modifiye elektrodun H_2O_2 'nin yükseltgenmesine iyi bir elektrokatalitik etki gösterdiği gibi H_2O_2 'nin ve glukozun FIA sisteminde amperometrik olarak askorbik asit ve ürik asit gibi girişimcilerin varlığında seçici olarak tayin edilebileceğini göstermişlerdir (Şekil 2.11).



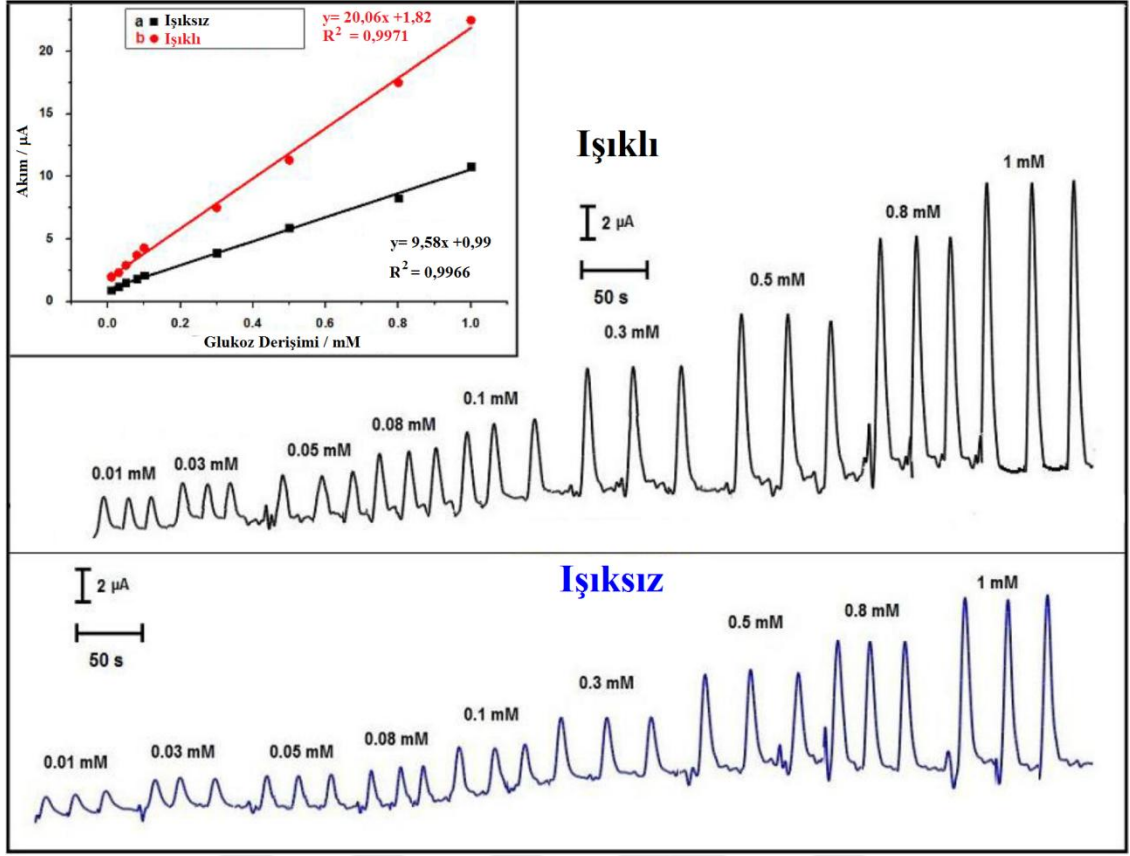
Şekil 2.11. GOx-POM-g-rGO için a) glukozun artan derişimlerine (2 – 20 mM) alınan FI amperometrik yanıtlar ve b) 0,2 mM askorbik asit (AA) ve ürik asit (ÜA) girişimcilerinin varlığında 2,0 mM glukozun FI-Amperometrik yanıtları (Uygulama potansiyeli: +20 mV ve akış hızı 1,0 mL/dk) (Yang ve ark., 2016)

GOx enzimi ve substratı glukoz arasında gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan H_2O_2 'nin oluşumunu ve/veya bu tepkime için tüketilen O_2 miktarındaki azalışı izlemek suretiyle gerçekleştirilen amperometrik sensörlere dayalı literatürde çok çeşitli çalışmalar bulunmakla birlikte, farklı modifiye elektrotlar kullanılarak FIA sisteminde amperometrik tayininin gerçekleştirildiği sınırlı sayıda çalışmalar da gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaların birinde, GOx modifiye altın-nanotüp film elektrot (ANFE) kullanılarak FIA sisteminde glukozun yükseltgenmesi sonucu oluşan H_2O_2 'nin oluşumunun izlenmesi yoluyla amperometrik tayini gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.12) (Yang ve ark., 2014). Tasarlanan GOx/ANFE ve GOx immobilize altın elektrot (GOx-Au) FIA sisteminde +500 mV uygulama potansiyelinde glukozu amperometrik yanıtları kıyaslanmıştır. GOx/ANFE elektrot ile glukozu daha yüksek yanıtların alındığı görülmüştür. GOx/ANFE için -100 mV uygulama potansiyelinde doğrusal yanıtın alındığı derişim aralığı 2,0 – 20 mM glukoz olarak bulunmuş ve LOD 0,07 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 2.12. GOx/ANFE ve GOx/Au elektrotlar için glukozun artan derişimlerine alınan FI amperometrik yanıtlara ait akım-zaman grafikleri ve kalibrasyon grafikleri (Uygulama potansiyeli: +500 mV) (Yang ve ark., 2014)

Glukozun enzimli tayinine yönelik gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise Sağlam ve Dilgin (2017) tarafından rapor edilmiştir. ZnS-CdS kuantum dot ve MWCNT ile modifiye edilmiş GCE yüzeyine GOx ile immobilize edilmesi yoluyla FIA sisteminde glukoz için fotoelektrokimyasal bir biyosensör tasarlamışlardır. Glukoza karşı FI amperometrik yanıtlar, fiber optik ışıklı ve ışısız ortamdaki yanıtları O₂'nin tüketiminin izlenmesi (indirgenmesi) yoluyla karşılaştırılmış bu çalışmaya ilişkin FIA kaydedilen amperomogramlar Şekil 2.13'de verilmiştir. Işık kullanıldığında glukoza daha duyar yanıtın alındığı görülmüş ve glukoza karşı ışıklı ortamda 0,01 – 1,0 mM derişim aralığında doğrusal yanıt aralığıyla birlikte LOD 3,0 μM olarak bulunmuştur.



Şekil 2.13. FIA sisteminde fotoamperometrik ve amperometrik metotlar ile GOx-CT/ZnS-CdS/MWCNT/GCE için glukozun artan derişimlerine bağı olarak kaydedilen amperomogramlar (Taşıyıcı çözelti: pH 6,0 BRBS; uygulama potansiyeli: -500 mV ve akış hızı: 1,5 ml/dk) (Sağlam ve Dilgin, 2017)

FI sistemde H₂O₂ ve glukoz elektrokimyasal tayini için rapor edilen çalışmalar ile birlikte benzer çalışmalar farklı elektrotlar ile gerçekleştirilmiş olup, bunlardan bazıları tablo halinde Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. FI Sistemde farklı elektrotlar kullanılarak enzim kullanılmadan ve kullanılarak H₂O₂ tayinine yönelik yapılan amperometrik sensör ve biyosensör çalışmaları

Çalışma Elektrodu	Metot	Analit	Analitin Davranışı	Çalışma Potansiyeli (mV)	Doğrusal Yanıt Aralığı (μM)	LOD (μM)	Duyarlılık	Kaynak
Pt/PDDA/GCE	FI Amperometri	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+500 mV	5,0x10 ⁻⁴ – 4000	5,0x10 ⁻⁴	9,15 μA mM ⁻¹	(Chakraborty ve Raj, 2009)
Pd-CNT/SPCE	FI Amperometri	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ 'nin İndirgenmesi	-300 mV	1,0x10 ⁻⁴ – 1000	20	Belirtilmemiş	(Reanpang ve ark., 2015)
APS-PFeW ₁₁ -CPE	FI Amperometri	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ 'nin İndirgenmesi	0 mV	10 – 200	7,4	Belirtilmemiş	(Hamidi ve ark., 2009)
Pt/AuE	FI Amperometri	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+600 mV	1,0 – 100	0,29	Belirtilmemiş	(Matos ve ark., 2001)
MnO ₂ /CPE	FI Amperometri	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+460 mV	147 – 13230	138	Belirtilmemiş	(Schachl ve ark., 1997)
RuOHCF	FI Amperometri	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ 'nin İndirgenmesi	0 mV	10 – 500	1,3	Belirtilmemiş	(Paixão ve Bertotti, 2008)
CuPtCl ₆ /GCE	FI Amperometri	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ 'nin İndirgenmesi	+350 mV	50 – 500	0,01	Belirtilmemiş	(Pei ve Li, 1999)
Ni(OH) ₂ /FTO	FI Amperometri	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+50 mV	50 – 750	0,20	509 μA mM ⁻¹ cm ⁻²	(Martins ve ark., 2013)
Pt/Au Electrode	FI Amperometri	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+600 mV	1,0 – 100	0,29	Belirtilmemiş	(Franchini ve ark., 2008)
CNTs-PDDA-PtNPs/CPE	FI Amperometri	Glukoz	H ₂ O ₂ oluşumu	+500 mV	1,0x10 ⁻⁴ – 10 ⁵	15	0,06 μA mM ⁻¹	(Amatatongchai ve ark., 2017)

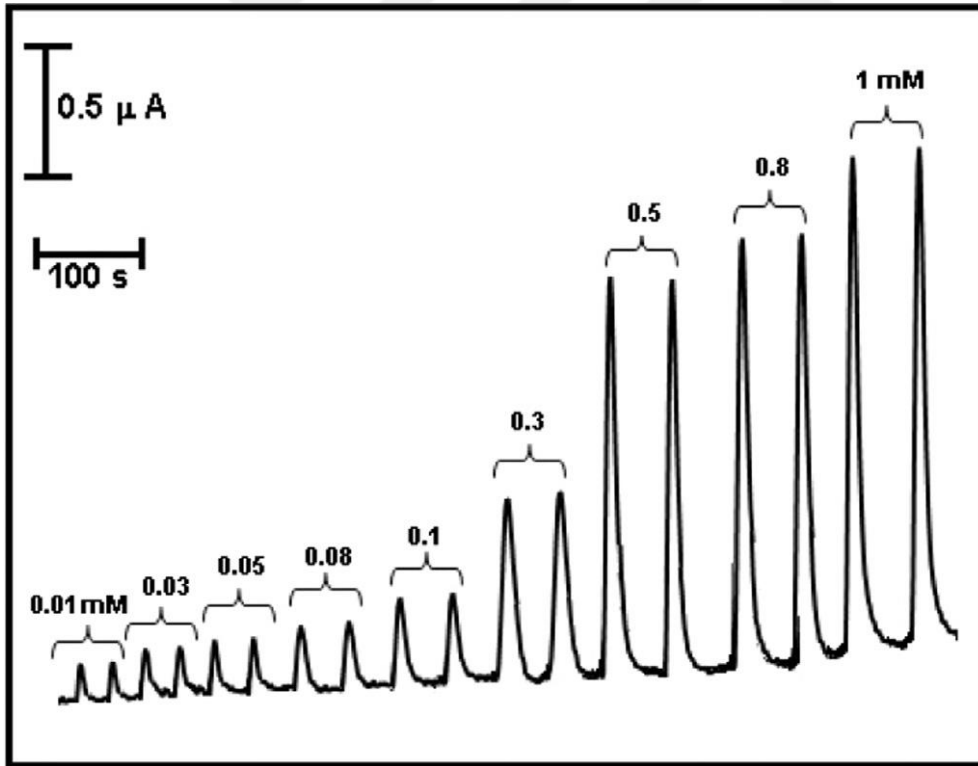
PDDA: Poly(dialildimetilammonyum) klorür; CNT: karbon nanotüp; APS: 3-aminopropil(trietoksi)silan; AuE: altın elektrot; RuOHCF: Rutenyum oksit heksaziyanoferrit; FTO: Flor katkılı titanyum oksit); POM-g-rGO: polioksometalat ile aşılı indirgenmiş grafen oksit; ANFE: altın nanotüp film elektrot; CT: Kitosan; GN: grafen nanoşerit; FAD: flavin adenine dinükleotit; Nf: nafyon.

Çizelge 2.2.'nin devamı

Çalışma Elektrodu	Metot	Analit	Analitin Davranışı	Uygulama Potansiyeli (mV)	Doğrusal Yanıt Aralığı (μM)	LOD (μM)	Duyarlılık	Kaynak
POM-g-rGO	FI Amperometri	H_2O_2	H_2O_2 'nin İndirgenmesi	+20	100 – 20000	10,2	$95,5 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	(Yang ve ark., 2016)
GOx/POM-g-rGO	FI Amperometri	Glukoz	H_2O_2 oluşumu	+20	2000 – 20000	67,9	$14,3 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	
GOx/ANFE	FI Amperometri	Glukoz	H_2O_2 oluşumu	-100	2000 – 20000	70	$1,64 \mu\text{A mM}^{-1}$	(Yang ve ark., 2014)
GOx/ZnS-CdS /MWCNT/GCE	FI Fotoamperometri	Glukoz	O_2 tüketimi	-500	10 – 1000	3,0	$20,06 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	(Sağlam ve Dilgin, 2017)
GN/FAD/apo-GOx/Nf/SPCE	FI Amperometri	Glukoz	FAD'nin yükseltgenmesi	+475	50 – 2000	20	Belirtilmemiş	(Mehmeti ve ark, 2017)
$\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Au}/\text{GOx}$ modifiye SPCE $\{\text{MnO}_2\}$	FI Amperometri	Glukoz	H_2O_2 oluşumu	+360	200 – 9000	13,2	$2,52 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	(Samphao ve ark., 2015)
GOx-Au/PGE	FI Amperometri	Glukoz	H_2O_2 oluşumu	+400	0 – 39000	7,8	$2,21 \mu\text{A mM}^{-1}$	(Cheng ve ark., 2012)

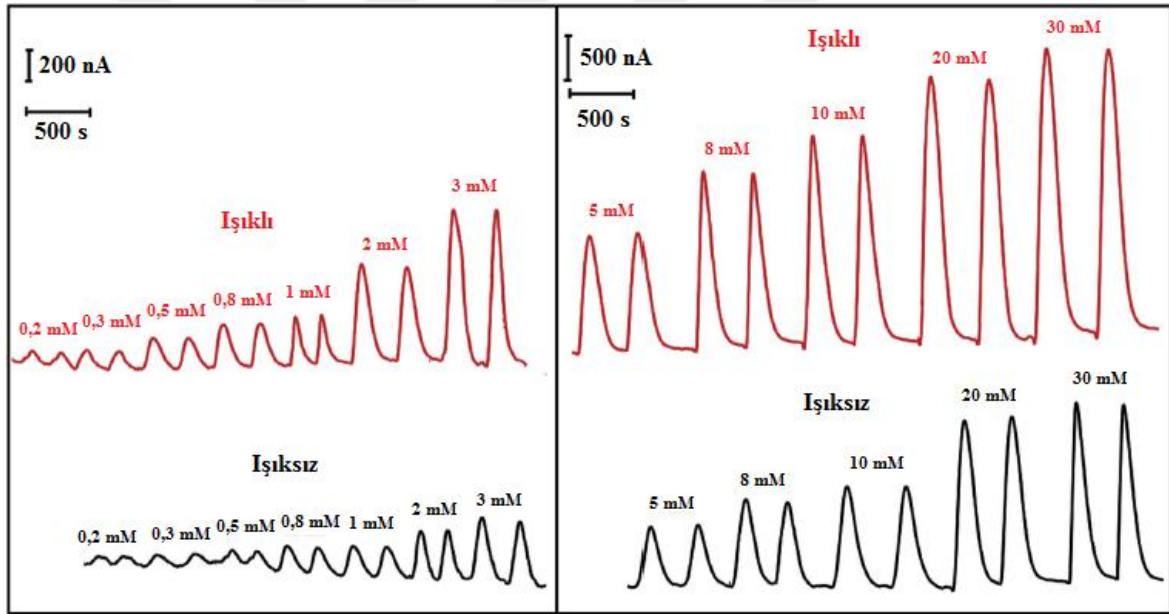
2.3. PGE Kullanılarak FIA Sisteminde Gerçekleştirilen Amperometrik Sensör ve Biyosensörler

Literatürler incelendiğinde karbon temelli farklı elektrotlar ve modifiye formları kullanılarak FI sisteminde sensör ve biyosensör çalışmaları geliştirildiği görülürken, ucuz ve tek kullanımlık bir elektrot olan PGE'nin FIA sisteminde kullanılarak gerçekleştirilen sınırlı sayıda birkaç çalışma da literatürdeki yerini almıştır. Bu çalışmaların birinde, ZnS-CdS quantum nokta parçacıkları ile modifiye edilmiş PGE yüzeyine GOx enzimi immobilize edilerek FIA sisteminde bir elektrokimyasal glukoz biyosensörü tasarlanmıştır (Sağlam ve ark., 2016). FIA sisteminde, glukozun enzimatik yükseltgenmesi sonucu tüketilen O₂'nin elektrokatalitik yanıtının azalışı üzerine tasarlanan biyosensörün, glukozun tek kullanımlık, ucuz, seçici ve duyarlı olarak biyo algılanmasına olanak sağladığı rapor edilmiştir. GOx/CT/ZnS-Cd-S/PGE kullanarak FI amperometrik yöntem ile glukozu 0,01 – 1,0 mM aralığında doğrusal yanıt alınmakla birlikte LOD 3,0 µM glukoz olarak belirtilmiştir (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. GOx/CT/ZnS-CdS/PGE için 0,01 mM – 1,0 mM arasında artan glukoz derişimine bağı FIA'da kaydedilen amperogramlar (Taşıyıcı çözelti: pH 6,0 BRBS; uygulama potansiyeli: -500 mV ve akış hızı: 1,3 mL/dk) (Sağlam ve ark., 2016)

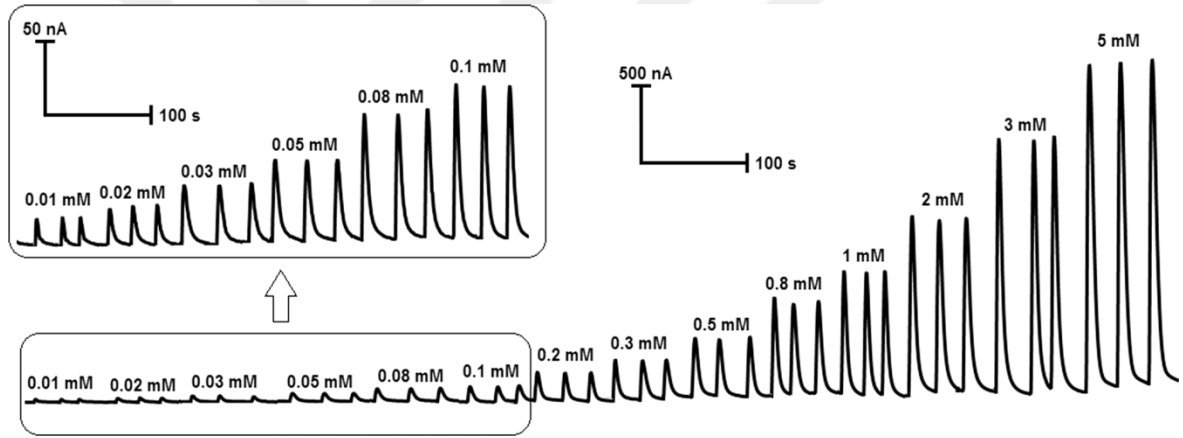
Ertek ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada ise, hibrit kuantum noktalar (Quantum dots, ZnS-CdS) ile modifiye edilmiş PGE yüzeyine, glukoz dehidrogenaz (glucose dehydrogenase, GDH) enzimi immobilize edilmiş ve elde edilen modifiye elektrot ile FIA sisteminde enzimatik olarak üretilen NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine ve fotoelektrokimyasal metoda dayalı bir glukoz biyosensörü literatürde ilk kez gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.15). Tasarlanan biyosensör ile glukozu iyi bir fotoelektrokatalitik yanıt alındığı ve 0,2 – 8,0 mM aralığında glukoz derişimlerine doğrusal yanıtlar verdiği tespit edilmiş ve LOD değeri 0,05 mM glukoz olarak belirlenmiştir. Ayrıca amperometrik yöntem yerine fotoamperometrik yöntem kullanıldığında duyarlılığın yaklaşık 2 kat arttığı ve tasarlanan biyosensörün ışık kullanılarak NADH'nin yükseltgenme pik akımının yükseltilmesi yoluyla glukozun fotoelektrokimyasal tayininde başarıyla uygulanabileceği vurgulanmıştır.



Şekil 2.15. GDH/CdS-ZnS/MAA/PGE kullanılarak FIA sisteminde glukozun farklı derişimleri varlığında elde edilen amperometrik (ışısız) ve fotoamperometrik (ışıklı) yanıtlara ait akım-zaman eğrileri (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl ve 10 mM NAD⁺ içeren 0,10 M PBS (pH 7,0); uygulama potansiyeli: +800 mV; akış hızı: 0,6 mL/dk; örnek hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm) (Ertek ve ark., 2016)

Literatürde, kuantum noktalar ve metal nanoparçacıklar gibi, analit ile elektrot arasında elektron transferini artırarak elektrokimyasal sensör ve biyosensörlerde duyarlılığın artmasına imkân sağlayan redoks mediyatörlerden de yararlanılmıştır. PGE

yüzeyine redoks mediyatörler modifiye edilerek FIA sisteminde gerçekleştirilen birkaç çalışma da mevcuttur. Bunların birinde, metilen mavisi (Methylene blue, MB) PGE yüzeyine elektropolimerizasyon yoluyla modifiye edilmiş ve elde edilen elektrodun yüzeyi GDH ile immobilize edilerek enzimatik tepkime sonucu oluşan NADH'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine dayalı bir amperometrik glukoz biyosensörü ilk kez tasarlanmıştır (Dilgin ve ark., 2018) (Şekil 2.16). FIA sisteminde yapılan amperometrik ölçümler neticesinde tasarlanan biyosensörün NADH'nin enzimatik yükseltgenmesine iyi bir elektrokatalitik etki gösterdiği görülmüş ve glukozu 0,01 – 1,0 mM derişim aralığında doğrusal yanıtlar alındığı not edilmiş ve LOD 4,0 μ M glukoz olarak bulunmuştur. Tasarlanan biyosensör ile glukozun ucuz, hızlı ve duyarlı tayinine olanak sağlamakla birlikte, glutamat, laktat ve alkol gibi başka analitlerin tayinine yönelik biyosensörlerin geliştirilmesinde yeni bir bakış açısı getireceği öngörülmüştür.



Şekil 2.16. GDH/Poly-MB/PAMAM/PGE kullanılarak 0,01 – 5,0 mM arasında değişen glukoz derişimine bağlı FIA'da kaydedilen amperogramlar (Uygulama potansiyeli: +200 mV; akış hızı: 0,6 mL/dk; taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl ve 10 mM NAD⁺ içeren 0,1 M PBS çözeltisi (pH 7,0) (Dilgin ve ark, 2018)

Bu çalışmalara ek olarak, PGE yüzeyine kalmagit (Calmagit) ve pirokatekol violet (Pyrocatechol Violet) gibi organik redoks mediyatörler modifiye edilerek sülfür ve hidrazin gibi analitlerin tayini için gerçekleştirilen çalışmalar da rapor edilmiştir. Örneğin, Emir ve Dilgin (2018) tarafından yapılan bir başka çalışmada, aromatik sülfonik asit grubu içeren bir boyar madde, kalmagit (calmagite) PGE yüzeyine elektropolimerizasyon metodu ile modifiye edilerek sülfürün amperometrik tayini FIA sisteminde gerçekleştirilmiştir. İlgili çalışmada, kalmagit redoks mediyatörü ile birlikte PGE kullanıldığında sülfürün

düşük potansiyelerde yükseltgenmesine iyi bir elektrokatalitik etkinlik göstermekle birlikte iyi yanıtlar alındığı görülmüştür. Tasarlanan kalmagit modifiye PGE ile FIA sisteminde sülfürün 0,10 – 500 μM derişim aralığında doğrusal amperometrik yanıtlar alındığı bulunmuş ve LOD 0,03 μM sülfür olarak tayin edilmiştir. Ayrıca geliştirilen amperometrik sensörün sülfür örnekleri içeren gerçek örneklerle uygulanabilirlikleri test edilerek yüksek geri kazanımlar elde edilmiştir. Dolayısıyla tasarlanan metodun sülfürün hızlı, duyarlı ve ucuz tayinine katkı sağladığı vurgulanmıştır.

Ayaz ve Dilgin (2017) tarafından rapor edilen bir çalışmada ise başka bir organik redoks mediyatör pirokatekol viyolet (Pyrocatechol Violet, PCV) elektropolimerizasyon yoluyla PGE yüzeyine modifiye edilmiş ve hidrazinin elektrokatalitik yükseltgenmesine dayalı bir elektrokimyasal sensör FIA sisteminde gerçekleştirilmiştir. Yapılan ölçümler neticesinde PCV modifiye PGE'nin hidrazinin yükseltgenmesine iyi yanıt vermekle birlikte iyi bir elektrokatalitik etkinlik gösterdiği bulunmuştur. FIA sisteminde yapılan amperometrik çalışmalar neticesinde hidrazine 0,25 – 500 μM derişim aralığında doğrusal amperometrik yanıtlar elde edilmiş ve LOD 0,08 μM olarak bulunmuştur. Ayrıca tasarlanan sensörün hidrazin içeren su örneklerine uygulanabilirliği test edilerek yüksek geri kazanımlar elde edilmiş ve ilgili sensörün başka örneklerde hidrazinin ucuz, hızlı ve duyar tayinine olanak sağlayabileceği belirtilmiştir.

Literatür çalışmaları incelendiğinde metal nanoparçacıklar, metal oksitler ve redoks mediyatörler gibi iletken malzemeler elektrot yüzeyine modifiye edilerek H_2O_2 'nin enzimsiz ve enzimli (GOx) birçok elektrokimyasal sensör ve biyosensör çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ancak, metal nanoparçacık modifiye PGE kullanılarak H_2O_2 'nin FIA sisteminde enzimsiz olarak amperometrik tayinine yönelik gerçekleştirilen herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ayrıca FIA sistemi kullanılmadan PGE ile H_2O_2 'nin enzimsiz amperometrik tayinine yönelik sınırlı sayıda çalışma bildirilmiştir (Çizelge 2.1). Diğer taraftan GOx enzimi kullanılarak H_2O_2 'nin ve dolayısıyla glukozun algılanmasına yönelik literatürlerde oldukça fazla elektrokimyasal biyosensör çalışmaları bulunmasına rağmen, FIA sisteminde amperometrik olarak gerçekleştirilen çalışma sayısının oldukça az olduğu görülmektedir (Çizelge 2.2). İlgili çalışmalar içerisinde FIA sistemi, metal nanoparçacıklar ve PGE'nin kullanıldığı tek çalışma Cheng ve ark. (2012) tarafından gerçekleştirilmiş olup, çalışma elektrodu olarak GOx-Au-PGE kullanılmıştır (Cheng ve ark., 2012). Tez çalışmasından farklı olarak, ikili FIA sistemiyle birlikte immobilize edilmiş bir enzim reaktörüyle birleştirilmiş bir sistem kullanılmıştır (Şekil 2.17). Birincil sistem, özel olarak tasarlanmış üç elektrotlu bir akış hücresi ile durdurmalı (stop-flow)

Dolayısıyla Pt nanoparçacık ve Pt-Pd bimetallik nanoparçacık modifiye elektrotlar ile FIA sistemde gerçekleştirilen herhangi bir elektrokimyasal biyosensör çalışmasına da rastlanılmamıştır. Bu tez çalışması, literatürde gerçekleştirilen elektrokimyasal H₂O₂ sensörü ve glukoz biyosensörü çalışmalarına önemli katkılar sağladığı gibi aşağıda belirtilen 3 önemli husus tezin özgün yönlerini oluşturmaktadır.

(i) Ucuz, kolay bulunabilir, tek kullanımlık bir elektrot olan PGE ile birlikte iletkenlik özellikleri iyi olan Au, Pt, Pd nanoparçacıklar ile Pt-Pd bimetallik nanoparçacıkların kullanılması ile FIA sisteminde amperometrik olarak H₂O₂'nin enzimsiz tayininin literatürde ilk defa gerçekleştirilmesi,

(ii) Metal nanoparçacık modifiye PGE'ler yüzeyine GOx enziminin immobilize edilmesiyle (GOx/Pt/p.PGE ve GOx/Pt-Pd/p.PGE) glukozun ve dolayısıyla H₂O₂'nin FIA sisteminde amperometrik tayinine yönelik çalışmaların literatürlerde ilk kez gerçekleştirilmiş olması,

(iii) FIA sisteminde gerçekleştirilen elektrokimyasal glukoz biyosensör çalışmalarında biyolojik açıdan önemli girişimcilerin giderilmesinde suda çözünmeyen bir ön oksitleyici olan sodyum bizmutatın (NaBiO₃) literatürde ilk kez kullanılması.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Sarf Edilen Kimyasal Malzemeler

Potasyum klorür (KCl), sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 156,01 g/mol), disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 177,99 g/mol), borik asit (H_3BO_3 , 61,83 g/mol), asetik asit (CH_3COOH , %100, 60,05 g/mol; d:1,05 g/mL), fosforik asit (%85, 98 g/mol, d:1,88 g/mL), sodyum hidroksit (NaOH; 40 g/mol), potasyum ferrosiyaniür trihidrat ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 422,35 g/mol), potasyum ferrisiyaniür ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 329,24 g/mol), L(+)-askorbik asit (AA, 176,13 g/mol), sodyum bizmutat (NaBiO_3 , 279,97 g/mol) ve sodyum okzalit ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, 134 g/mol) Merck firmasından tedarik edildi. Au standart çözeltisi (HAuCl_4 , $1003 \pm 3 \mu\text{g/mL}$, d: 1,019 g/mL, %10 HCl) SCP SCIENCE firmasından tedarik edildi. Hidrojen heksakloro platinat çözeltisi (H_2PtCl_6 , %8, d:1,05 g/mL, 409,81 g/mol), paladyum (II) klorür çözeltisi (PdCl_2 , % 5 d:1,06 g/mL, 177,33 g/mol, % 10 HCl), kitosan, D(+)-glukoz (GL, %99,5, 180,16 g/mol), L-glutamik asit (GLA, \geq % 99, 147,13 g/mol), sitrik asit monohidrat (SA, % 99,5, 210,14 g/mol), salisilik asit (SAL, % 99,9, 138,12 g/mol), ürik asit (ÜA, \geq % 99, 168,11 g/mol), hidroklorik asit (HCl, % 37, d:1,18 g/mol, 36,5 g/mol), nafyon (% 5), askorbat oksidaz (AOx, from cucurbita) ve glukoz oksidaz (GOx, 100000-250000 units/g solid, from *Aspergillus niger*) Sigma Aldrich firmasından tedarik edildi. Hidrojen peroksit (%30, 1,11 g/mL, 34,01 g/mol) Carlo Erba şirketinden tedarik edildi. Dopamin hidroklorür (DA, % 99, 189,64 g/mol) Alfa Aesar firmasından tedarik edildi.

Tasarlanan elektrokimyasal H_2O_2 sensörlerinin uygulanabilirliğinin test edilmesi amacıyla kullanılan saç oksidasyon kremi (Wella Koleston, % 9 H_2O_2) bir kozmetik mağazasından, medikal uygulamalarda sıklıkla kullanılan oksijenli su çözeltisi (BİKAR) ise bir eczaneden satın alındı. Tasarlanan elektrokimyasal glukoz biyosensörlerinin uygulanabilirliğinin test edilmesi amacıyla kullanılan dekstroz serum (OSEL, % 5) ve oral glukoz tolerans testi içeceği (Gali-Dex) bir eczaneden satın alındı. Yapay kan serumu ise literatürdeki bir yöntemle göre hazırlandı (Özcan ve Sezgintürk, 2015).

3.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Bu tezde CV, impedans ve FI analizleri için yapılan tüm çalışmalar klâsik üçlü elektrot yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu sistemde yardımcı elektrot olarak Platin tel (BASi marka MW1032 model, uzunluk: 7,5 cm ve çap: 0,5 mm), karşılaştırma

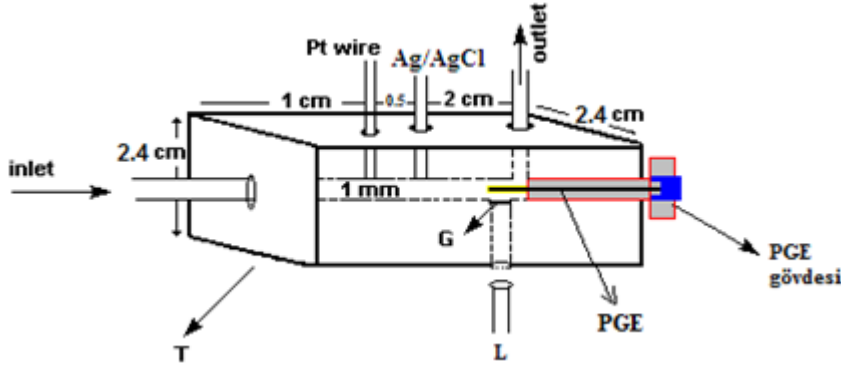
elektrodu olarak Ag/AgCl (doygun KCl) elektrodu (BASi marka RE5B model, uzunluk: 7,5 cm ve çap: 6,0 mm) kullanıldı. Çalışma elektrodu olarak kullanılan grafit içerikli TOMBOW Japan Ultra Polimer 2B kurşun kalem uçları (çap: 0,5 mm, uzunluk: 6,0 cm) bir kırtasiyeden tedarik edildi. Elektrokimyasal analizler için kullanılan kalem uçlarını sabitlemek amacıyla 1979 ile 1996 yılları arasında üretilen Rotring (Germany) marka Tikky model 0,5 mm mekanik kalem kullanıldı ve kalemin metal ucunun bağlı olduğu metal gövde ile metal kısıkaç (elektrot bağlantısı) arası bir bakır tel ile lehim yapılarak elektriksel iletkenliği sağlandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Çalışma elektrodunu sabitlemek amacıyla kullanılan, elektriksel bağlantısı yapılmış Rotring (Germany) Tikky 0,50 mm mekanik uçlu kalemi

Ivium Compactstat Electrochemical Interface (Eindhoven/ Netherlands) ve Autolab marka PGSTAT-128N model Potentiostat&Galvanostat aygıtları elektrokimyasal ölçümleri gerçekleştirmek üzere kullanıldı. Analizler sırasında kullanılan çözeltilerin hazırlanmasında gerekli saf su, Elga Option Q7B (18,2 Ω M cm) marka saf su cihazından sağlandı. Analizler için hazırlanan tampon çözeltilerin pH değerlerinin ayarlanması amacıyla, birleştirilmiş cam elektroda sahip Hanna HI 221 pH metre cihazı kullanıldı. FIA sistemi için (i) TUBİTAK 112T375 nolu proje kapsamında ve daha önceki çalışmalarda kullanılan PGE için teflondan tasarlanmış bir akış hücresi (Şekil 3.2) (Dilgin, 2015;

Sağlam ve ark., 2016), (ii) taşıyıcı çözeltiyi akış hücresine taşınması için Watson Marlow marka peristaltik pompa ve 0,80 mm çaplı silikon hortum (tubing) ve (iii) örnek çözeltileri sisteme vermek amacıyla kullanılan Rheodyne Marka 7725 model bir örnek enjeksiyon vanası kullanıldı.



Şekil 3.2. FIA çalışmalarında kullanılan, PGE için tasarlanmış akışa enjeksiyon analiz hücresinin temsili bir gösterimi (teflondan yapılmış gövde: T; fiber optik ışık kaynağı: L; kuartz cam pencere: G) (Dilgin, 2015; Sağlam ve ark., 2016)

3.3. Tez Çalışmalarında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1. Elektrokimyasal Sensör ve Biyosensör Çalışmalarında Kullanılan Destek Çözeltilerin Hazırlanması

1- pH'sı 7,0 olan 0,1 M Fosfat Tampon Çözeltileri (Phosphate Buffer Solution, PBS):

$\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ çözeltisini hazırlamak için 7,46 g KCl (0,10 M için) veya 74,6 g KCl (1,0 M için), 15,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,10 M için) ve 17,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,10 M için) bileşikleri bir miktar suda çözülüp, saf su ile 1,0 L son hacme tamamlandı.

KCl içeren seyreltik HCl (0,1 M) çözeltisini hazırlamak amacıyla, yoğunluğu 1,18 g/mL olan % 37'lik HCl çözeltisinden 8,20 mL alındı ve 7,46 g KCl (0,10 M için) veya 74,6 g KCl (1,0 M için) bileşiğinin bir miktar saf suda çözülmesiyle elde edilen çözeltilere eklenip, saf su ile 1,0 L son hacme tamamlandı. KCl içeren 0,10 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ çözeltisi ile 0,10 M HCl çözeltisinin uygun miktarları bir pH metre kontrolünde birbiriyle karıştırılarak istenilen pH'ya ayarlandı. CV çalışmaları için 0,10 M KCl içeren, FIA çalışmaları içinse 1,0 M KCl içeren pH 7,0 PBS çözeltisi kullanıldı.

2- 0,02 M KCl içeren 0,02 M pH 7,0 PBS:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ çözeltisini hazırlamak için 1,49 g KCl, 0,31 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 0,36 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bir miktar suda çözülüp, saf su ile 1,0 L son hacme tamamlandı.

KCl içeren seyreltik HCl (0,02 M) çözeltisini hazırlamak amacıyla, yoğunluğu 1,18 g/mL olan % 37'lik HCl çözeltisinden 1,65 mL alındı ve 1,49 g KCl'nin (0,02 M için) bir miktar saf suda çözülmesiyle elde edilen çözeltiliye eklenip, saf su ile 1,0 L son hacme tamamlandı. KCl içeren 0,02 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ çözeltisi ile 0,02 M HCl çözeltisinin uygun miktarları bir pH metre kontrolünde birbiriyle karıştırılarak istenilen pH'ya ayarlandı.

3- 0,10 M KCl Çözeltisi:

0,746 g KCl bir miktar saf suda çözüldü ve saf su ile 100 mL son hacme tamamlandı.

4- Britton Robinson Tampon Çözeltisi (Britton Robinson Buffer Solution, BRBS):

Stok asit çözeltisini hazırlamak için yoğunluğu 1,05 g/mL olan CH_3COOH 'den 2,28 mL (0,04 M), yoğunluğu 1,88 g/mL olan %85'lik H_3PO_4 'den 2,45 mL (0,04 M), H_3BO_3 'ten 2,47 g (0,04 M) ve KCl'den 7,46 g (0,1 M için) veya 74,6 g (1,0 M için) 1,0 L saf suda çözülerek hazırlandı. Stok baz çözeltisi, 0,80 g NaOH (0,02 M) ve 7,46 g KCl (0,1 M için) veya 74,6 g (1,0 M için) 1,0 L saf suda çözülerek hazırlandı. $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_3\text{BO}_3$ çözeltisi ile 0,20 M NaOH çözeltilerinin uygun miktarları bir pH metre kontrolünde karıştırılarak istenen pH değerlerinde (2-12) tampon çözeltiler hazırlandı. CV çalışmaları için 0,10 M KCl ihtiva eden ve FIA çalışmaları içinse 1,0 M KCl ihtiva eden BRBS kullanıldı.

3.3.2. Metal Nanoparçacık Modifiye Kalem Grafit Elektrotların (MNPs/PGE) Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler

Aşağıdaki çözeltiler PGE yüzeyine elektrodepozisyon yoluyla Au, Pt ve Pd nanoparçacıkları ile Pt-Pd bimetallik nanoparçacık biriktirmek için kullanıldı.

1- 0,2 mM Au^{3+} Çözeltisi:

Yoğunluğu 1,019 g/mL olan ve % 10 HCl ihtiva eden HAuCl_4 ($1003 \pm 3 \mu\text{g/mL}$) standart çözeltisinden 400 μL alınıp, 0,02 M KCl ihtiva eden 0,02 M pH 7,0 PBS ile 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

2- 1,0 mM Pt^{4+} Çözeltisi:

Yoğunluğu 1,05 g/mL olan ve % 8 H_2PtCl_6 ihtiva eden standart çözeltisinden 48 μL alınıp, 0,1 M KCl içeren çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3- 1,0 mM Pd^{2+} Çözeltisi:

Yoğunluğu 1,06 g/mL olan ve % 5 PdCl_2 ihtiva eden standart çözeltisinden 33,4 μL alınıp, 0,1 M KCl çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

4- 1,0 mM Pt^{4+} ve 1,0 mM Pd^{2+} Çözeltisi:

Yoğunluğu 1,05 g/mL olan ve % 8,0 H₂PtCl₆ ihtiva eden standart çözeltisinden 48 µL ve yoğunluğu 1,06 g/mL olan ve % 5,0 PdCl₂ ihtiva eden standart çözeltisinden 33,4 µL alınıp, 0,10 M KCl çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.3.3. Oksidaz Enzimlerinin MNPs/PGE'lere İmmobilizasyonunda Kullanılan Çözeltiler

1- % 0,5'lik Kitosan (CT) Çözeltisi:

Literatürde yer alan çalışmalar (Wang ve ark., 2009; Sağlam, 2016) dikkate alınarak, 50,0 mg CT ve 100 µL CH₃COOH 10 mL'lik bir balonjojede bir miktar saf suda çözüldü ve saf suyla son hacmine tamamlanarak hazırlandı. Hazırlanan çözelti +4 °C'de muhafaza edilecek şekilde buzdolabında bekletildi.

2- GOx Enzim Çözeltisi:

Literatürde yer alan çalışmalar dikkate alınarak 10, 20, 40, 80, 100 ve 200 mg/mL GOx içerecek şekilde GOx'un gerekli miktarları tartıldı ve % 0,5'lik CT çözeltisinde çözümlenerek hazırlandı (Qian ve ark., 2012; Sağlam 2016). Hazırlanan GOx çözeltileri -20 °C'de muhafaza edilecek şekilde derin dondurucuda bekletildi.

3.3.4. CV ve İmpedans Analizleri için Hazırlanan Redoks Probu Çözeltisi

1- 0,10 M KCl ve 0,01 M Fe(CN)₆^{3-/4-} içeren Redoks Prob Çözeltisi:

KCl'den 0,746 g, K₃[Fe(CN)₆]'dan 0,329 g ve K₄[Fe(CN)₆].3H₂O'dan 0,422 g, bir miktar saf suda çözülüp 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.3.5. Metal Nanoparçacık Modifiye PGE'lerin H₂O₂'ye Elektrokatalitik Yanıtlarının CV Yöntemi ile İncelenmesinde Kullanılan Çözeltiler

1- 0,10 M KCl içeren 0,10 M NaOH Çözeltisi:

KCl'den 0,745 g ve NaOH'tan 0,40 g alınıp, 100 mL'lik bir balonjoje içerisinde bir miktar saf su içerisinde çözüldü ve saf su ile son hacme tamamlanarak hazırlandı.

2- 1,0 M H₂O₂ Çözeltisi:

% 30'luk H₂O₂ stok çözeltisinden 10 mL'lik bir balonjojeye 1,022 mL alınarak bir miktar 0,10 M KCl ihtiva eden 0,10 M NaOH çözeltisi içerisinde çözüldü ve bu çözelti ile son hacmine tamamlanarak hazırlandı.

3- 0,10 M KCl içeren BRB Çözeltileri:

CV çalışmalarında kullanılan 0,10 M KCl içeren BRB çözeltisinin hazırlanması için daha önce bahsedilen 0,04 M H₃PO₄/CH₃COOH/H₃BO₃ çözeltisi ile 0,20 M NaOH

çözeltisinin uygun miktarları birbiriyle karıştırılarak, karışımın pH'sı 2,0 ile 12,0 arasında olacak şekilde bir pH metre yardımıyla ayarlanarak hazırlandı.

4- 0,10 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 PBS:

CV çalışmalarında kullanılan 0,10 M KCl içeren pH'sı 7,0 olan PBS çözeltisi, daha önce bahsedilen 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ve 0,10 M HCl çözeltilerinin uygun miktarları bir pH metre kontrolünde birbiriyle karıştırılarak hazırlandı.

3.3.6. FIA Sisteminde Amperometrik H_2O_2 Sensör Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

1- 1,0 M KCl ve 0,10 M NaOH içeren Taşıyıcı Çözelti (FIA için):

4,0 g NaOH ve 74,6 g KCl, 1,0 L'lik bir balonjojede bir miktar saf suda çözüldü ve saf suyla son hacmine tamamlanarak hazırlandı.

2- 1,0 M KCl ve 0,10 M NaOH ihtiva eden 1,0 M H_2O_2 Çözeltisi (FIA için):

% 30'luk H_2O_2 stok çözeltisinden 10 mL'lik balonjojeye 1,02 mL alınarak bir miktar 1,0 M KCl ihtiva eden 0,10 M NaOH çözeltisi içerisinde çözüldü ve bu çözelti ile son hacmine tamamlanarak hazırlandı.

3- NaOH Çözeltisi İçerisinde Hazırlanan H_2O_2 Standart Çözeltileri:

1,0 M KCl ihtiva eden 0,10 M NaOH çözeltisi içerisinde hazırlanan 1,0 M H_2O_2 stok çözeltisinden uygun miktarlar alınarak 1,0 M KCl ihtiva eden 0,10 M NaOH çözeltisi ile uygun seyreltmelerle H_2O_2 ara stok çözeltileri hazırlandı.

4- 1,0 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 PBS Taşıyıcı Çözeltisi (FIA için):

FIA çalışmaları için 1,0 M KCl içeren PBS, 0,10 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ile 0,10 M HCl'nin uygun miktarları bir pH metre kontrolünde birbiriyle karıştırılarak hazırlandı.

5- 1,0 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 PBS'de Hazırlanan 1,0 M H_2O_2 Çözeltisi (FIA için):

% 30'luk H_2O_2 stok çözeltisinden 10 mL'lik balonjojeye 1,02 mL alınarak bir miktar 1,0 M KCl ihtiva eden 0,10 M pH 7,0 PBS içerisinde çözüldü ve bu çözelti ile son hacmine tamamlanarak hazırlandı.

6- PBS içerisinde Hazırlanan H_2O_2 Standart Çözeltileri:

1,0 M KCl ihtiva eden 0,10 M pH 7,0 PBS içerisinde hazırlanan 1,0 M H_2O_2 stok çözeltisinden uygun miktarlar alınarak 1,0 M KCl ihtiva eden 0,10 M pH 7,0 PBS çözeltisi ile uygun seyreltmelerle H_2O_2 ara stok çözeltileri hazırlandı.

7- Girişim Çözeltileri:

0,10 mM H_2O_2 ve 2,5 mM H_2O_2 içerecek şekilde iki farklı çözelti hazırlandı.

H₂O₂'nin yükseltgenmesine girişim yapabilecek moleküllerin (GL, GLA, SA, SAL, DA, AA ve ÜA) derişimi H₂O₂'ye göre 1 - 100 kat arasında değişen oranlarda ayrı ayrı içerecek şekilde taşıyıcı çözelti ile seyreltilerek hazırlandı.

8- % 0,5'lik Nafyon Çözeltisi:

% 5'lik Nafyon stok çözeltisinden 10 mL'lik balonjojeye 0,05 mL mutlak etanol ile son hacmine tamamlanarak hazırlandı.

9- AOx Enzim Çözeltisi:

20 mg/mL AOx içerecek şekilde AOx'un gerekli miktarları tartıldı, % 0,5'lik CT çözeltisinde çözülerek hazırlandı. Hazırlanan AOx çözeltisi, -20 °C'de muhafaza edilecek şekilde derin dondurucuda bekletildi.

3.3.7. GOx Modifiye MNP/PGE'lerin Glukoza Elektrokatalitik Yanıtının CV ile İncelenmesinde Kullanılan Çözeltiler

1- 0,10 M KCl içeren BRBS:

CV çalışmalarında kullanılan 0,10 M KCl içeren farklı pH'larda (5-8) BRBS'nin hazırlanması için daha önce bahsedilen 0,04 M H₃PO₄/CH₃COOH/H₃BO₃ ve 0,20 M NaOH çözeltilerinin uygun miktarları bir pH metre kontrolünde birbiriyle karıştırılarak istenilen pH değerinde tampon çözelti hazırlandı.

2- 1,0 M Glukoz Çözeltisi:

1,80 g glukoz 10 mL'lik bir balonjojede bir miktar saf su içerisinde çözüldü ve saf su ile son hacmine tamamlanarak hazırlandı.

3.3.8. FIA Sisteminde Glukoza Amperometrik Cevabın İncelenmesinde Kullanılan Çözeltiler

1- 1,0 M KCl ihtiva eden pH 6,0 BRBS:

CV çalışmalarında kullanılan 1,0 M KCl içeren pH 6,0 BRBS'nin hazırlanması için daha önce bahsedilen 0,04 M H₃PO₄/CH₃COOH/H₃BO₃ ve 0,2 M NaOH çözeltilerinin uygun miktarları bir pH metre kontrolünde birbiriyle karıştırılarak istenilen pH değerinde tampon çözelti hazırlandı.

2- 1,0 M Glukoz Çözeltisi:

Glukozdan 1,80 g 10 mL'lik balonjojeye alınarak, bir miktar 1,0 M KCl ihtiva eden pH 6,0 BRBS içerisinde çözüldü ve bu çözelti ile son hacme tamamlanarak hazırlandı.

3- Glukoz Ara Stok Çözeltileri:

Hazırlanan 1,0 M stok glukoz çözeltisinden uygun hacimler alınarak 1,0 M KCl

ihativa eden pH 6,0 BRBS ile uygun seyreltmelerle glukoz ara stok çözeltileri hazırlandı.

4- Girişim Çözeltileri:

1,0 mM glukoz içerecek şekilde hazırlandı. Glukozun yükseltgenmesine girişim yapabilecek moleküllerin (GLA, SA, SAL, DA, AA ve ÜA) derişimi glukozu göre 1 - 100 kat arasında değişen oranlarda ayrı ayrı içerecek şekilde taşıyıcı çözelti ile seyreltilerek hazırlandı.

5- Yapay Kan Serumı:

Yapay serum, literatürdeki bir yöntemle göre, 5,0 mM CaCl₂, 4,5 mM KCl, 1,6 mM MgCl₂, 4,7 mM D-glukoz, % 0,1 serum albumin, 2,5 mM üre ve 145 mM NaCl içerecek şekilde gerekli miktarlar tartılarak saf suda çözülüp 100 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı (Özcan ve Sezgintürk, 2015).

3.3.9. Permanganometrik Titrasyonda Kullanılan Çözeltiler

1- 3,0 M H₂SO₄ Çözeltisi:

Yoğunluğu 1,84 g/mL olan % 98'lik H₂SO₄ stok çözeltisinden (18,4 mol/L) 40,8 mL alınıp, 250 mL son hacme saf su ile tamamlanarak hazırlandı.

2- % 3 H₂SO₄ Çözeltisi:

Yoğunluğu 1,84 g/mL olan % 98'lik H₂SO₄ stok çözeltisinden (18,4 mol/L) 7,65 mL alınıp, 250 mL son hacme saf su ile tamamlanarak hazırlandı.

3- 0,05 M KMnO₄ Çözeltisi:

1,975 gr KMnO₄ (158,03 g/mol) tartılarak bir miktar saf suda çözüldü ve 250 mL son hacme saf su ile tamamlanarak hazırlandı.

3.4. Metal Nanoparçacık Modifiye PGE'lerin Hazırlanışı, GOx İmmobilizasyonu ve Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

CV, impedans ve kronoamperometrik analizlerin tamamında klâsik üçlü elektrot sistemi (PGE çalışma elektrodu olarak, Ag/AgCl_(3,0 M KCl) karşılaştırma elektrodu olarak ve Pt tel ise yardımcı elektrot olarak) kullanıldı. FIA sisteminde ise aynı çalışma ve yardımcı elektrot sistemi kullanılmış olup, karşılaştırma elektrodu olarak karartılmış Ag tel (Ag/AgCl) kullanıldı.

3.4.1. Kalem Grafit Elektrodun (PGE) Ön Koşullandırılması İşlemi

PGE'lerin yüzeylerindeki kirlilikleri uzaklaştırmak, yüzeyin yükseltgemesi yoluyla aktivitesini arttırarak metal nanoparçacıkların PGE yüzeyine elektrokimyasal

modifikasyonunu kolaylaştırmak amacıyla, 0,1 M KCl içeren pH 7,0 PBS içerisinde +1,45 V'ta 60 s boyunca kronoamperometrik olarak n koşullandırma işlemi gerçekleştirildi.

3.4.2. Monometalik Nanoparçacıkların p.PGE Yüzeyine Elektrokimyasal Olarak Biriktirilmesi

I. AuNP Modifiye p.PGE: Au biriktirilmesi için literatürde bilinen bir yöntem modifiye edilerek kullanıldı (Du ve ark., 2012). Ar ile doyrurulmuş 0,02 M KCl ihtiva eden 0,02 M pH 7,0 PBS içerisinde hazırlanan 0,2 mM H₂AuCl₄ zltisinde p.PGE'nin +0,10 V – -0,85 V potansiyel aralığında 50 mV/s tarama hızında ve farklı döngü sayılarında (5, 10, 20, 30 ve 40 döngü) CV'leri kaydedildi. Hazırlanan elektrotlar Au/p.PGE olarak tanımlandı.

II. PtNP Modifiye p.PGE: Pt biriktirilmesi için literatürde bilinen bir yöntem modifiye edilerek kullanıldı (Anik ve ark., 2016). Ar ile doyrurulmuş 0,1 M KCl zltisi içerisinde hazırlanan 1,0 mM H₂PtCl₆ zltisinde p.PGE'nin +0,80 V – -0,80 V potansiyel aralığında 50 mV/s tarama hızında ve farklı döngü sayılarında (5, 10, 20, 30, 40 ve 50 döngü) CV'leri kaydedildi. Hazırlanan elektrotlar Pt/p.PGE olarak tanımlandı.

III. PdNP Modifiye p.PGE: Pd biriktirilmesi için literatürde bilinen bir yöntem modifiye edilerek kullanıldı (Shi ve Diao, 2011). Ar ile doyrurulmuş 0,1 M KCl zltisi içerisinde hazırlanan 1,0 mM PdCl₂ zltisinde p.PGE'nin +0,40 V – -0,25 V potansiyel aralığında 25 mV/s tarama hızında ve farklı döngü sayılarında (5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 döngü) CV'leri kaydedildi. Hazırlanan elektrotlar Pd/p.PGE olarak tanımlandı.

3.4.3. Bimetalik Nanoparçacıkların p.PGE Yüzeyine Elektrokimyasal Modifikasyonu

p.PGE yüzeyine bimetalik nanoparçacıkların modifikasyonu, monometalik türlerin ardışık ve eşzamanlı modifiye edilmesiyle gerçekleştirildi.

3.4.3.1. Bimetallik Nanoparçacık Elektrotların p.PGE Yüzeyine Ardışık Biriktirilerek Hazırlanması

Bimetalik nanoparçacıkları biriktirmek için önce birinci metalin (Metal 1), sonra ikinci metalin (Metal 2) zltisini içeren ve bir önceki kısımda (Bölüm 3.4.2) verilen ve monometalik nanoparçacıkların biriktirilmesinde kullanılan prosedürler ard arda uygulandı. Hazırlanan elektrotlara (Metal 2/Metal 1/p.PGE) ilişkin prosedürler monometalik nanoparçacıkları da içerecek şekilde tablo halinde verilmiştir (izelge 3.1).

Çizelge 3.1. Monometalik nanoparçacık ve ardışık biriktirme yapılarak elde edilen bimetalik nanoparçacık modifiye p.PGE'lerin hazırlanmasına ilişkin kullanılan prosedürler

Prosedür	Au	Pt	Pd	Au/Pt	Au/Pd	Pt/Pd	Pt/Au	Pd/Au	Pd/Pt
Ar ile doyurulmuş 0,20 mM H _{Au} Cl ₄ ve 0,02 M KCl içeren 0,02 M pH 7,0 PBS içerisinde +0,10 V - -0,85 V potansiyel aralığında, 50 mV/s tarama hızında ve 40 döngü sayısında p.PGE'nin CV'lerinin kaydedilmesi (Du ve ark., 2012)	+	-	-	+ ²	+ ²	-	+ ¹	+ ¹	-
Ar ile doyurulmuş 0,10 M KCl içeren 1,0 mM H ₂ PtCl ₆ çözeltisinde +0,80 V - -0,80 V potansiyel aralığında, 50 mV/s tarama hızında ve 30 döngü sayısında p.PGE'nin CV'lerinin kaydedilmesi (Anik ve ark., 2016)	-	+	-	+ ¹	-	+ ²	+ ²	-	+ ¹
Ar ile doyurulmuş 0,10 M KCl içeren 1,0 mM PdCl ₂ çözeltisinde +0,40 V- -0,25 V potansiyel aralığında, 25 mV/s tarama hızında ve 30 döngü sayısında p.PGE'nin CV'lerinin kaydedilmesi (Shi ve Diao, 2011)	-	-	+	-	+ ¹	+ ¹	-	+ ²	+ ²

1: p.PGE yüzeyine ilk biriktirilen metal nanoparçacık ve 2: p.PGE yüzeyine ikinci biriktirilen metal nanoparçacık.

3.4.3.2. Bimetallik Nanoparçacık Elektrotların p.PGE Yüzeyine Eşzamanlı Biriktirilerek Hazırlanması (Metal 1-Metal 2/p.PGE)

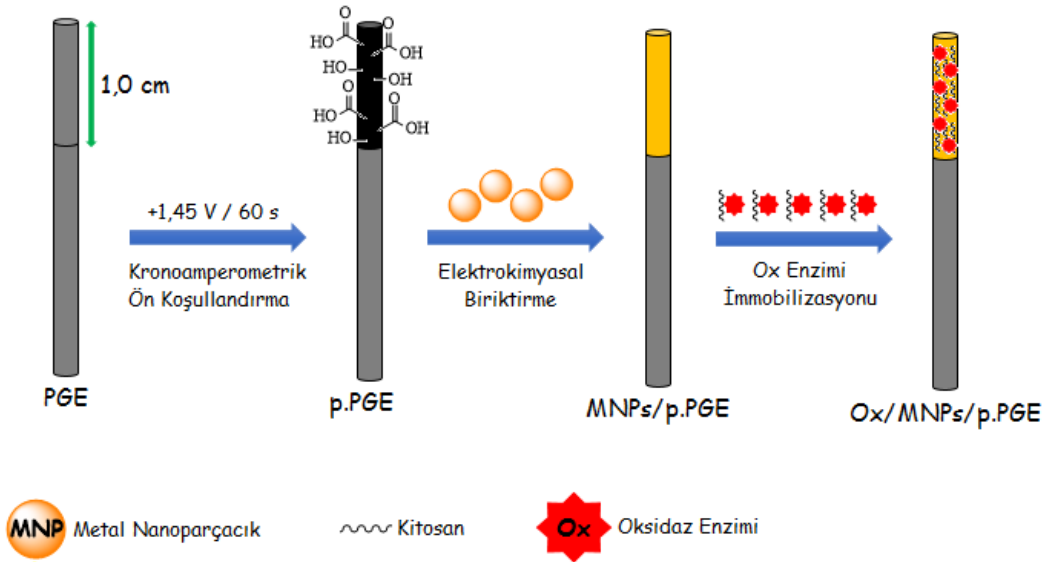
I. Au-Pt/p.PGE: Ar ile doyurulmuş 0,20 mM HAuCl₄, 1,0 mM H₂PtCl₆ ve 0,02 M KCl içeren 0,02 M pH 7,0 PBS içerisinde p.PGE'nin +0,80 V- -0,85 V potansiyel aralığında, 30 döngü sayısında ve 50 mV/s tarama hızında CV'leri kaydedilerek, Au ve Pt elektrot yüzeyine eş zamanlı olarak biriktirildi. Hazırlanan elektrotlar Au-Pt/p.PGE olarak tanımlandı.

II. Au-Pd/p.PGE: Ar ile doyurulmuş 0,2 mM HAuCl₄, 1,0 mM PdCl₂ ve 0,02 M KCl içeren 0,02 M pH 7,0 PBS içerisinde p.PGE'nin +0,80 V- -0,85 V potansiyel aralığında, 30 döngü sayısında ve 50 mV/s tarama hızında CV'leri kaydedilerek, Au ve Pd elektrot yüzeyine eş zamanlı olarak biriktirildi. Hazırlanan elektrotlar Au-Pd/p.PGE olarak tanımlandı.

III. Pt-Pd/p.PGE: Ar ile doyurulmuş 1,0 mM PtCl₂ ve 1,0 mM H₂PtCl₆ içeren 0,10 M KCl çözeltisi içerisinde p.PGE'nin +0,80 V- -0,40 V potansiyel aralığında, 30 döngü sayısında ve 50 mV/s tarama hızında CV'leri kaydedilerek, Pt ve Pd elektrot yüzeyine eş zamanlı olarak biriktirildi. Hazırlanan elektrotlar Pt-Pd/p.PGE olarak tanımlandı.

3.4.4. p.PGE ve Metal Nanoparçacık Modifiye p.PGE'lere GOx Enziminin İmmobilasyonu

GOx enziminin elektrotlar yüzeyine immobilizasyonu için elektrotlar 10, 20, 40, 80, 100 ve 200 mg/mL GOx (100000-250000 units/g solid) ihtiva eden % 0,5'lik CT çözeltilerine +4 °C'deki bir buzdolabında 1 saat süreyle daldırıldı ve daha sonra +4 °C'de 15 dk süreyle kurutuldu. Böylelikle immobilizasyon esnasında kullanılan GOx enziminin derişimine bağlı glukoz biyosensör yanıtı izlenerek optimizasyon gerçekleştirildi. Modifiye elektrotların hazırlanmasına ilişkin genel bir şematik gösterim Şekil 3.3'de verilmiştir. Benzer işlemler metal nanoparçacıklarla modifiye edilmemiş p.PGE için de uygulandı.



Şekil 3.3. Modifiye elektrotların hazırlanması sürecinin temsili bir gösterimi

3.4.5. Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

Yalın ve modifiye elektrotların elektrokimyasal özelliklerini incelemek amacıyla, her bir elektrodun CV'leri ve impedans eğrileri kaydedildi. İlk aşamada, her bir elektrodun 10 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks probu içeren 0,1 M KCl çözeltisinde belirtilen analiz şartlarında (-0,20 V – +0,70 V potansiyel aralığı; 50 mV/s tarama hızı) CV'leri kaydedilerek, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ indirgenme/yükseltgeme pik akımlarındaki ve pik potansiyellerindeki değişimler not edildi. İkinci aşamada ise impedans ölçümlerini gerçekleştirmek için aynı destek çözelti ortamında belirtilen şartlarda (10^5 ile 10^{-1} Hz frekans aralığında ve 170 mV potansiyelde) Nyquist eğrileri kaydedildi.

3.4.6. Modifiye Elektrotların Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesi

Hazırlanan p.PGE, metal ve bimetallik nanoparçacık modifiye p.PGE'lerin yüzey morfolojilerinin incelenmesi amacıyla Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma Merkezinde (ÇOBİLTUM) JEOL SEM-7100-EDX marka cihaz kullanılarak taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM) görüntüleri ile enerji yayımlı X-ışını (Energy Dispersive X-Ray) spektrumları ve PANalytical Empyrean X-RD marka cihaz kullanılarak da X-ışını kırınımı (X-Ray Diffraction, XRD) spektrumları kaydedildi. GOx modifiye p.PGE, Pt/p.PGE ve Pt-Pd/p.PGE'nin yüzey morfolojilerinin araştırılması içinse enzim modifiye elektrotların sadece SEM görüntüleri ve EDX Spektrumları alınarak modifiye elektrot yüzeyinde metal nanoparçacık modifikasyonu ve GOx immobilizasyonu incelendi.

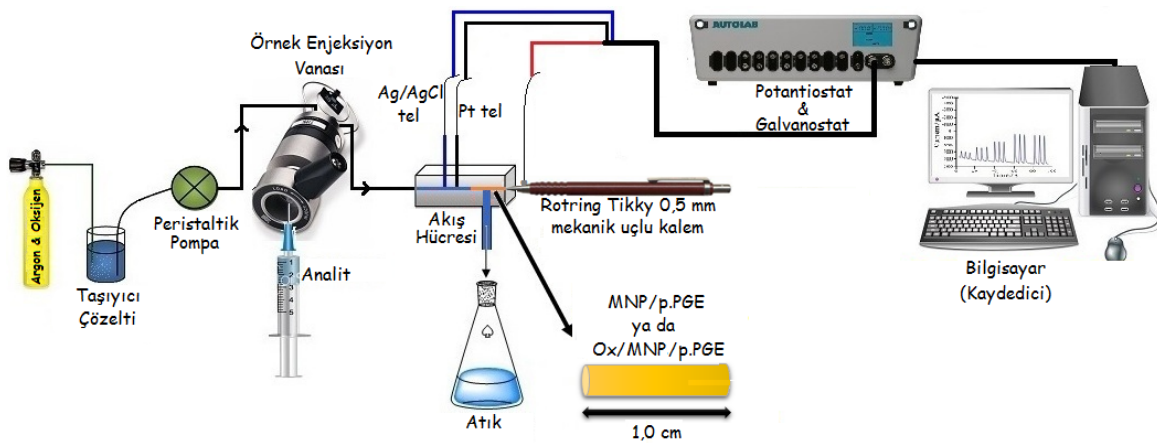
3.5. Elektrokimyasal H₂O₂ Sensörü Çalışmaları

3.5.1. Metal Nanoparçacık Modifiye PGE'lerin H₂O₂'ye Elektrokatalitik Yanıtlarının Döngüsel Voltammetri Yöntemi ile İncelenmesi

Metal nanoparçacık modifiye kalem grafit elektrotların (MNP's/p.PGE) her birinin H₂O₂'nin elektrokatalitik indirgenmesine/yükseltgenmesine yönelik yanıtları, H₂O₂'nin çeşitli derişimlerini (8, 16 ve 32 mM) ihtiva eden ve herbiri 0,1 M KCl içeren farklı pH'lardaki (2,0 – 12) BRBS, 0,1 M NaOH ve pH 7,0 PBS ortamında CV'leri kaydedilerek incelendi. Modifiye elektrotlar için optimum yanıtın alındığı destek elektrolit pH'sı saptandı. Optimize edilen pH'ya ait destek elektrolit ortamında, herbiri farklı metal nanoparçacık türünü ihtiva eden ve farklı döngü sayılarında elektrokimyasal biriktirilmesi ile elde edilen modifiye elektrotlar içerisinde H₂O₂'nin elektrokatalitik indirgenmesine/yükseltgenmesine en iyi yanıt veren döngü sayısı kaydedildi ve elektrokimyasal H₂O₂ sensörleri olarak sonraki çalışmalarda kullanılacak modifiye elektrotlar belirlendi.

3.5.2. FIA Sisteminde Amperometrik H₂O₂ Sensör Çalışmaları

FIA sisteminde amperometrik sensör ve biyosensör çalışmalarını gerçekleştirmek üzere Şekil 3.2'de verilen ve Dilgin ve araştırma grubu tarafından (Dilgin, 2015; Sağlam ve ark., 2016) ilk kez PGE için teflondan tasarlanmış bir akış hücresi kullanıldı. Akış hücresinde, AgCl ile kaplatılmış bir Ag tel ile bir Pt tel bulunmaktadır. Elektrokimyasal sensör ve biyosensör çalışmaları için yararlanılan FIA sistemine ait temsili bir gösterimi Şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.4. FIA sisteminin temsili bir gösterimi

FI amperometrik çalışmalarda kullanılmak üzere belirlenen her bir MNPs/p.PGE için ayrı ayrı optimize edilen, 1,0 M KCl içeren 0,1 M NaOH, 0,1 M pH 7,0 PBS ve pH 6,0 BRBS, akış çözeltileri olarak kullanıldı. Ardından FIA sisteminde uygulanan potansiyel, akış çözeltilerinin sisteme verilme hızı, yüklenecek örneğin hacmi ve kolon uzunluğu gibi önemli sistemsel parametreler için en uygun şartlar belirlendi. FIA sisteminde akımın zamana bağlı değişim eğrilerinde durağan ve düzenli zemin akımı sağlandıktan sonra belirli derişim aralığında akış çözeltilerinde hazırlanan H₂O₂ standart çözeltileri, sisteme bir enjektör vasıtasıyla, 100 µL'lik örnek yükleyici kolonu dolduracak şekilde sisteme en az 3 kez enjekte edilerek verildi. Ölçümler, akımın zamana bağlı değişim grafikleri halinde kaydedildi. Tekrar edilen her bir analizden sonra enjeksiyon vanası ve akış hücresi saf su ile yıkanarak temizlendi ve ilerleyen analizlerde kullanımı için uygun hale getirildi.

3.5.2.1. Girişim Çalışmaları

Au/p.PGE ve Pt/p.PGE kullanılarak yapılan girişim çalışmalarında, 0,10 mM H₂O₂'ye göre 1:1, 1:2, 1:5 1:10 ve 1:100 oranında girişimci maddeler (GL, GLA, SA, SAL, AA, DA ve ÜA) içerecek şekilde çözeltiler, akış çözeltileri kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiler sisteme en az üç kez enjekte edildi ve sonuçlar akım-zaman grafikleri şeklinde kaydedildi. Benzer şekilde Pd/p.PGE için de 2,50 mM H₂O₂'ye göre 1, 2, 5, 10 ve 50 kat ve Pt-Pd/p.PGE için ise 0,10 mM H₂O₂'ye göre 1, 2, 5, 10 ve 100 kat aynı girişimci maddeleri içerecek şekilde hazırlanan çözeltiler sisteme en az üç kez enjekte edilerek optimize edilen koşullar altında FI amperomogramları kaydedildi.

3.5.2.2. Tasarlanan Sensörün Gerçek Örnekte Uygulama Çalışmaları

H₂O₂'nin FIA sisteminde amperometrik tayini için önerilen Au/p.PGE, kozmetik mağazalarında kolayca bulunabilen bir saç oksidasyon kremindeki (Wella Koleston, % 9) H₂O₂ içeriğinin belirlenmesi ile test edildi. Bu amaçla 1,0 mL saç oksidasyon kremi 1/10000 oranında taşıyıcı çözelti (1,0 M KCl içeren 0,1 M NaOH) ile seyreltilti. Seyreltik örnek kısımları içerisine 0, 100, 250, 500, 750 ve 1000 µM H₂O₂ olacak şekilde standart H₂O₂ eklendi ve hazırlanan bu çözeltiler FIA sistemine en az üç kez enjekte edilerek optimize edilen koşullar altında FI amperomogramları kaydedildi. Standart katma yöntemi uygulanarak örnekteki H₂O₂ miktarı hesaplandı.

H₂O₂'nin FIA sisteminde amperometrik tayini için önerilen Pt/p.PGE, medikal uygulamalarda sıklıkla kullanılan % 3,0 H₂O₂ içeren bir antiseptik çözeltilerindeki (BİKAR marka) H₂O₂ içeriğinin belirlenmesi ile test edildi. Bu amaçla 1,0 mL antiseptik çözelti

1/100000 oranında taşıyıcı çözelti (1,0 M KCl içeren 0,1 M NaOH) ile seyreltildi. Seyreltik örnek kısımları içerisinde 0, 10, 25, 50, 75, 100 ve 250 μM H_2O_2 olacak şekilde standart H_2O_2 eklendi ve hazırlanan bu çözeltiler FIA sistemine en az üç kez enjekte edilerek optimize edilen koşullar altında FI amperomogramları kaydedildi. Standart katma yöntemi uygulanarak örnekteki H_2O_2 miktarı hesaplandı.

H_2O_2 'nin FIA sisteminde amperometrik tayini için önerilen Pd/p.PGE, % 3,0 H_2O_2 içeren bir antiseptik çözeltisindeki (BİKAR marka) ve saç oksidasyon kremindeki (Wella Koleston, % 9) H_2O_2 içeriklerinin belirlenmesi ile test edildi. Bu amaçla öncelikle 1,0 mL antiseptik çözelti 1/1000 oranında taşıyıcı çözelti (1,0 M KCl içeren 0,1 M pH 7,0 PBS) ile seyreltildi. Seyreltik örnek kısımları içerisinde 0; 0,50; 0,75; 1,0 ve 2,5 mM H_2O_2 olacak şekilde standart H_2O_2 eklendi ve hazırlanan bu çözeltiler FIA sistemine en az üç kez enjekte edilerek optimize edilen koşullar altında FI amperomogramları kaydedildi. Standart katma yöntemi uygulanarak örnekteki H_2O_2 miktarı hesaplandı. Saç oksidasyon kreminin ihtiva ettiği H_2O_2 içeriğini tayin etmek için ise 1,0 mL saç oksidasyon kremi 1/5000 oranında taşıyıcı çözelti (1,0 M KCl içeren 0,1 M pH 7,0 PBS) ile seyreltildi. Seyreltik örnek içerisinde 0; 0,25; 0,50; 0,75 ve 1,0 mM H_2O_2 olacak şekilde standart H_2O_2 eklendi ve hazırlanan bu çözeltiler FIA sistemine en az üç kez enjekte edilerek optimize edilen koşullar altında FI amperomogramları kaydedildi. Standart katma yöntemi uygulanarak örnekteki H_2O_2 miktarı hesaplandı.

H_2O_2 'nin FIA sisteminde amperometrik tayini için önerilen Pt-Pd/p.PGE, % 3,0 H_2O_2 içeren bir antiseptik çözeltisindeki (BİKAR marka) H_2O_2 içeriğinin belirlenmesi ile test edildi. Bu amaçla 1,0 mL antiseptik çözelti 1/10000 oranında taşıyıcı çözelti (1,0 M KCl içeren 0,1 M pH 7,0 PBS) ile seyreltildi. Seyreltik örnek kısımları içerisinde 0; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75 ve 1,0 mM H_2O_2 olacak şekilde standart H_2O_2 eklendi ve hazırlanan bu çözeltiler FIA sistemine en az üç kez enjekte edilerek optimize edilen koşullar altında FI amperomogramları kaydedildi. Standart katma yöntemi uygulanarak örnekteki H_2O_2 miktarı hesaplandı.

3.5.2.3. FIA Sisteminde Tekrarlanabilirlik ve Kararlılık Testleri

*Tekrarlanabilirlik Testleri: Au/p.PGE, Pt/p.PGE ve Pt-Pd/p.PGE için ayrı ayrı 0,10 mM H_2O_2 'nin, Pd/p.PGE içinse 2,50 mM H_2O_2 'nin FIA sistemine optimize edilen şartlarda tekrarlanan enjeksiyonları ile gerçekleştirildi ve FI amperomogramları kaydedildi.

*Kararlılık Testleri: Au/p.PGE ve Pt/p.PGE ayrı ayrı 0,10 mM H_2O_2 'nin sisteme sırasıyla 1., 8., 15., 22., 29., ve 60. günlerde en az üçer kez enjeksiyonları ile verilerek

gerçekleştirildi. Pd/p.PGE için 2,50 mM H₂O₂'nin FI sistemine optimize edilen şartlarda sırasıyla 1., 8., 15., 22. ve 29. günlerde en az üçer kez enjeksiyonları ile verilerek gerçekleştirildi. Pt-Pd/p.PGE için ise 0,10 mM H₂O₂'nin sisteme sırasıyla 1., 8., ve 15. günlerde en az üçer kez enjeksiyonları ile verilerek gerçekleştirildi ve FI amperogramları kaydedildi.

3.6. Permanganometrik Titrasyon Metodu Kullanılarak H₂O₂ Tayini

3.6.1. 0,05 M KMnO₄ Çözeltisinin Na₂C₂O₄'e Karşı Ayarlanması

105 °C'de 2 saat süreyle kurutulmuş primer standart sodyum okzalattan (Na₂C₂O₄) 0,1 gr bir erlene alınarak, üzerine 100 mL saf su ve 15 mL 3,0 M H₂SO₄ eklendi ve Na₂C₂O₄'ün çözünmesi sağlandı. Büret 0,05 M KMnO₄ ile dolduruldu ve dönüm noktasına kadar (bir damla permanganatın verdiği renk 30 s boyunca kalıcı olana kadar) titre edildi (Jeffery ve ark., 1989; Gündüz, 2012). Titrasyon işlemi 5 kez tekrarlandı. Yapılan tekrarlar sonucunda bürette okunan sarfiyatlardan KMnO₄ çözeltisinin derişimi ortalama 0,048 M olarak hesaplandı.

3.6.2. Ayarlı KMnO₄ (0,048 M) Çözeltisi ile Gerçek Örneklerdeki H₂O₂'nin Titre Edilmesi

Gerçek örneklerin (Wella Saç Oksidasyon Kremi ve BİKAR Antiseptik Çözelti) ihtiva ettiği H₂O₂ içeriği, literatürdeki permanganometrik titrasyon metodundan yararlanarak belirlendi (Jeffery ve ark., 1989; Gündüz, 2012). Gerçek örneklerden alınan 2 mL'lik bir kısım bir erlene alınarak üzerine 75 mL % 3'lük H₂SO₄ çözeltisi eklendi ve 100 mL hacme saf su ile tamamlandı. Ayarlı KMnO₄ (0,048 M) çözeltisi ile dönüm noktasına (pembe renk 30 s boyunca kalıcı olana kadar) kadar titre edildi. Titrasyon işlemi 5 kez tekrarlandı ve KMnO₄ sarfiyatlarından numunelerdeki H₂O₂ derişimleri hesaplandı.

3.7. Elektrokimyasal Glukoz Biyosensör Çalışmaları

3.7.1. GOx-CT/MNP/p.PGE'lerin Glukoza Elektrokatalitik Yanıtlarının Döngüsel Voltammetri Yöntemi ile İncelenmesi

Daha önce belirtilen prosedürlere göre hazırlanan enzim modifiye elektrotlar, GOx enziminin en yüksek aktivite gösterdiği pH değerine (pH 5,5) yakın olan 0,1 M KCl içeren pH 6,0 BRBS içerisinde 1,0 dk süreyle Ar geçirilerek CV'leri alındı. Sonra 1,0 dk süreyle O₂ geçirilerek 3,0 dk boyunca atmosferik O₂ ile dengeye gelmesi beklenildi ve CV'leri alındı. Son aşamada, glukozun artan derişimleri (8, 16 ve 32 mM) eklenerek bir manyetik

bar ile karıştırıldı ve her derişim için ortamdaki oksijenin tüketimine bağlı olarak O₂'nin indirgenme pik akımına ait azalma ve glukozun yükseltgenmesinden oluşan yan ürün H₂O₂'nin yükseltgenme pik potansiyeli ve pik akımı izlendi. Yapılan analizler neticesinde en iyi elektrokatalitik yanıtı bağlı olarak, glukoz için elektrokimyasal biyosensör çalışmalarında kullanılacak MNP/p.PGE'ler belirlendi. Belirlenen modifiye elektrotlar için CV'de sırasıyla destek çözeltinin pH'sı ve enzim modifikasyonu için kitosan çözeltisinde enzim derişimleri optimizasyonları gerçekleştirilerek, glukozun elektrokatalitik yanıtlarına etkileri incelendi ve en uygun destek elektrolit pH'sı ve enzim derişimi belirlendi.

3.7.2. FIA Sisteminde Amperometrik Glukoz Biyosensör Çalışmaları

FIA sisteminde amperometrik elektrokimyasal biyosensör çalışmalarında kullanılmak üzere belirlenen GOx-CT/Pt/p.PGE ve GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE için 1,0 M KCl ihtiva eden pH 6,0 BRBS akış çözeltisi olarak kullanıldı. Enzim modifiye elektrot akış hücresine yerleştirilerek, çalışma, karşılaştırma ve yardımcı elektrotların elektriksel bağlantıları yapılarak analiz aşamasına geçildi. FIA sisteminde uygulanan potansiyel, akış çözeltisinin sisteme verilme hızı, yüklenecek örneğin hacmi ve kolon uzunluğu gibi önemli sistemsel parametreler için en uygun şartlar incelendi. Bu amaçla, akımın zamana bağlı değişim grafiklerinde durağan ve düzenli zemin akımı sağlandıktan sonra çeşitli derişimlerde akış çözeltilerinde hazırlanan glukozun standart çözeltileri sisteme bir enjektör vasıtasıyla, 100 µL'lik örnek yükleyici kolonu dolduracak şekilde en az 3 kez enjekte edildi ve FI amperomogramlar kaydedildi. Tekrar edilen herbir analizden sonra enjeksiyon vanası ve akış hücresi saf su ile yıkanarak temizlendi, kurutuldu ve ilerleyen analizlerde kullanımı için uygun hale getirildi.

3.7.2.1. FIA Sisteminde Girişim Çalışmaları

* GOx-CT/Pt/p.PGE ve GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE kullanılarak 1,0 mM glukoz içeren 1, 2, 5, 10 ve 100 kat girişimci (GLA, SA ve SAL) içerecek şekilde taşıyıcı çözelti ile hazırlanan girişim çözeltileri sisteme en az üç kez enjekte edildi ve sonuçlar amperomogramlar şeklinde kaydedildi. AA, DA ve ÜA girişimcilerinden kaynaklı girişim etkilerini önemsiz seviyelere indirmek amacıyla suda çözünmeyen bir ön yükseltgeyici, sodyum bizmutat (NaBiO₃) kullanıldı. Bu amaçla, bir enjektör 1,0 g NaBiO₃ ile dolduruldu ve glukoz içermeyen sadece bu girişimcilerin farklı derişimlerini (0,01, 0,10 ve 1,0 mM) içeren ayrı ayrı hazırlanmış çözeltileri NaBiO₃ enjektör kullanılmadan ve kullanılarak FIA sistemine en az üç kez enjekte edilerek verildi. Ayrıca, ön yükseltgeyicinin glukozun

amperometrik cevabına etkisini incelemek amacıyla farklı derişimlerde (0,01, 0,05, 0,10, 0,50 ve 1,0 mM) glukoz çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltiler de NaBiO₃ enjektör kullanılmadan ve kullanılarak FIA sistemine en az üç kez enjekte edilerek verildi. Son olarak herbiri 1,0 mM glukoz içerecek şekilde 1, 2, 5 ve 10 kat AA, DA ve ÜA çözeltileri ayrı ayrı hazırlanarak FIA sistemine NaBiO₃ enjektör kullanılmadan ve kullanılarak FIA sistemine en az üç kez enjekte edilerek verildi.

3.7.2.2. FIA Sisteminde Gerçek Örneğe Uygulama Çalışmaları

* Glukozun FIA sisteminde amperometrik tayini için önerilen GOx-CT/Pt/p.PGE, yapay kan serumundaki glukoz içeriğinin belirlenmesi ile test edildi. Bu amaçla 1,0 mL yapay kan serumu çözeltisi 1/10 oranında taşıyıcı çözelti (1,0 M KCl içeren pH 6,0 BRBS) ile seyreltildi. Seyreltik örnek içerisine 0, 0,5, 1,0 1,5 ve 2,0 mM glukoz olacak şekilde standart glukoz eklendi ve hazırlanan bu çözeltiler FIA sistemine NaBiO₃ ile doldurulmuş enjektör ile en az üç kez enjekte edilerek optimize edilen şartlarda FI amperomogramları kaydedildi. Standart katma yöntemi uygulanarak yapan kan serumundaki glukoz miktarı hesaplandı. Dekstroz serumuna ve ticari olarak satılan oral glukoz tolerans test (OGTT) uygulanabilirliğinin testi için 1,0 mL dekstroz serum çözelti 1/250 oranında ve 1,0 mL OGTT çözeltisi 1/2000 oranında taşıyıcı çözelti (1,0 M KCl içeren pH 6,0 BRBS) ile seyreltildi. Seyreltik örnekler içerisine 0, 0,5, 1,0 1,5 ve 2,0 mM glukoz olacak şekilde standart glukoz eklendi ve hazırlanan bu çözeltiler FIA sistemine en az üç kez enjekte edilerek optimize edilen şartlarda FI amperomogramları kaydedildi. Standart katma yöntemi uygulanarak dekstroz serumdaki ve OGTT çözeltilesindeki glukoz miktarı hesaplandı.

* Benzer şekilde GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE için de gerçek örnek çalışmaları aynen GOx-CT/Pt/p.PGE'de olduğu gibi gerçekleştirilmiş sadece dekstroz için 1/100 oranında seyreltme kullanılmıştır.

3.7.2.3. FIA Sisteminde Tekrarlanabilirlik ve Kararlılık Çalışmaları

* Tekrarlanabilirlik Testleri: GOx-CT/Pt/p.PGE ve GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE kullanılarak 1,0 mM glukozun FIA sistemine sırasıyla ardışık 25 kez tekrarlanan enjeksiyonuyla optimum koşullar altında FI amperomogramları kaydedildi.

* Kararlılık Testleri: GOx-CT/Pt/p.PGE ve GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE kullanılarak 1,0 mM glukozun FIA sistemine sırasıyla 1. ve 2. günler en az üçer kez tekrarlanan enjeksiyonuyla optimum koşullar altında FI amperomogramları kaydedildi.

BÖLÜM 4

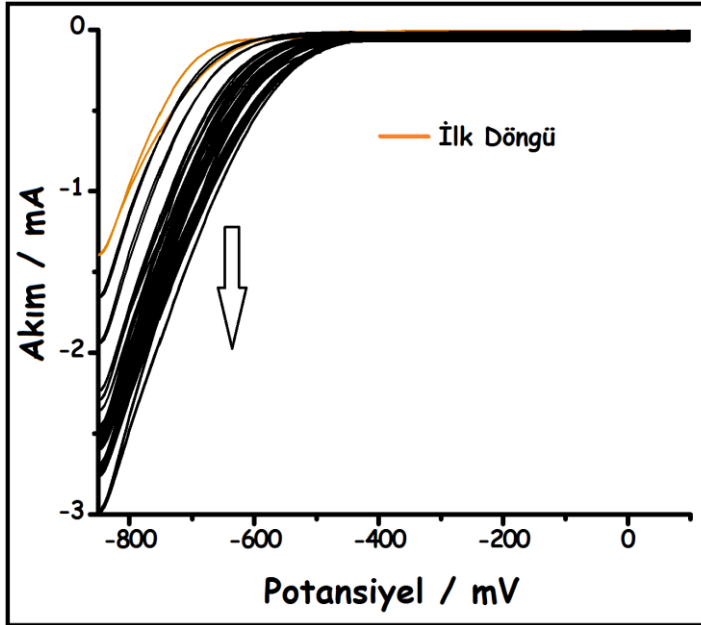
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. H₂O₂'nin Elektrokimyasal Tayinine Yönelik Sensör Çalışmaları

4.1.1. Au/p.PGE ile Gerçekleştirilen Çalışmalar

4.1.1.1. AuNP'lerin p.PGE Yüzeyine Elektrokimyasal Biriktirilmesi

AuNP'ler, koşullandırılmış PGE yüzeyine elektrobiriktirme yöntemiyle modifiye edilmiştir. Bu amaçla, deneysel prosedürde bahsedilen koşullar altında p.PGE'nin HAuCl₄ ortamında farklı döngü sayılarında (5, 10, 20, 30 ve 40 döngü) döngüsel voltammogramları (cyclic voltammograms, CV) kaydedilerek, 5 farklı Au/p.PGE hazırlanmıştır. Örnek olarak, AuNP'lerin p.PGE yüzeyinde elektrobiriktirilmesine ait 40 döngülü CV'leri Şekil 4.1'de verilmiştir. İlk döngüde gözlenen katodik akım, döngü sayısının artmasıyla gittikçe artmıştır. Bu artış, elektrot yüzeyinde Au'nun elektrokimyasal olarak biriktiğini yansıtmaktadır.

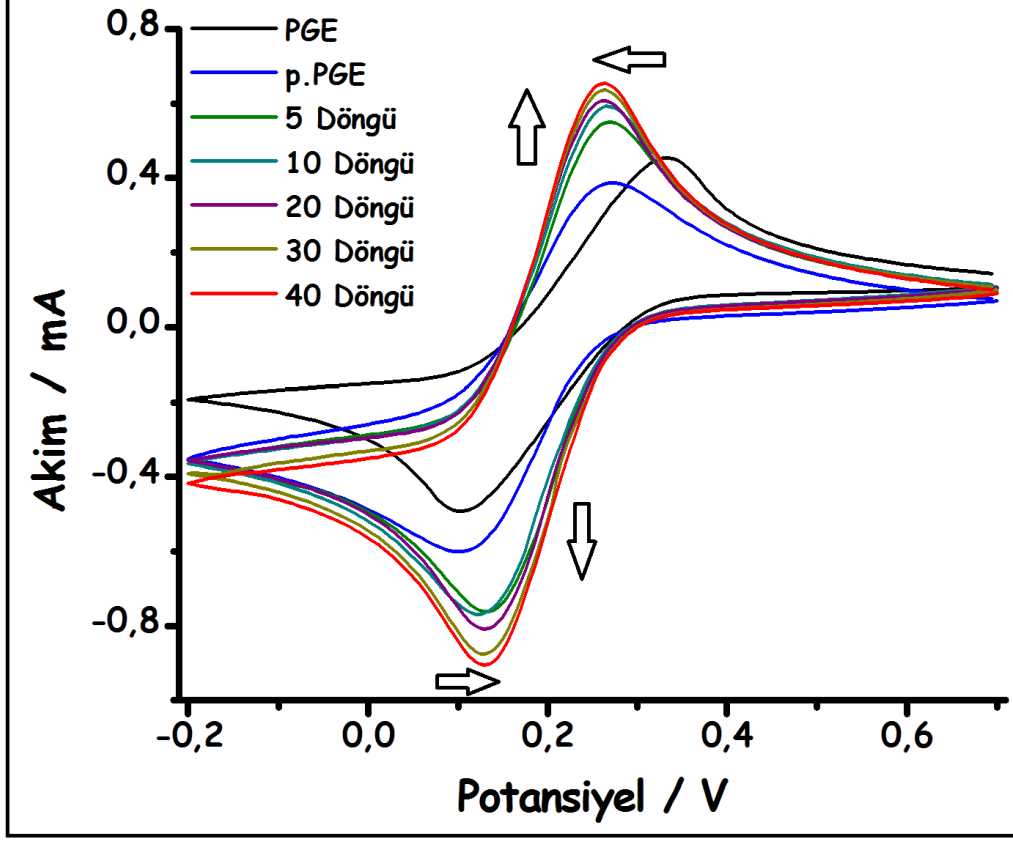


Şekil 4.1. p.PGE'nin, 0,02 M KCl ve 0,2 mM HAuCl₄ içeren ve Ar ile doyurulmuş 0,02 M pH 7,0 PBS'de ardışık 40 döngü ile kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50 mV/s)

4.1.1.2. Au/p.PGE'lerin Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

Elde edilen modifiye elektrotlarla birlikte hem yalın hem de koşullandırılmış PGE'nin elektrokimyasal özellikleri, bu elektrotların Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks probu içeren çözelti ortamında CV'leri ve elektrokimyasal impedans eğrileri kaydedilerek incelenmiştir.

Bu amaçla, yalın PGE, p.PGE ve Au³⁺'nın farklı döngü sayılarında CV'lerinin kaydedilmesi ile (elektrobiriktirme yoluyla) elde edilen Au/p.PGE'lerin 0,01 M Fe(CN)₆^{3-/4-} içeren redoks probu içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki CV'leri Şekil 4.2'de verilmiştir.

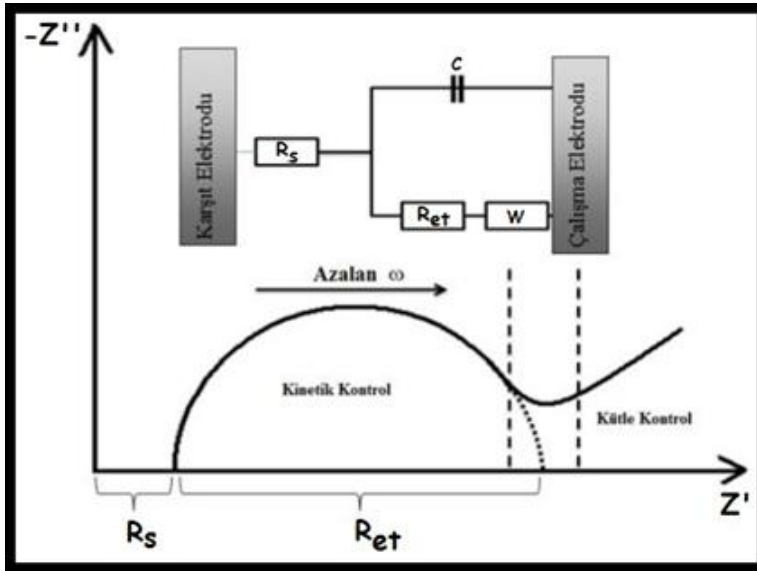


Şekil 4.2. PGE, p.PGE ve elektrobiriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Au/p.PGE'lerin 0,01 M K₃[Fe(CN)₆], 0,01 M K₄[Fe(CN)₆] içeren 0,1 M KCl destek çözeltisinde kaydedilen CV'leri (tarama hızı: 50 mV/s)

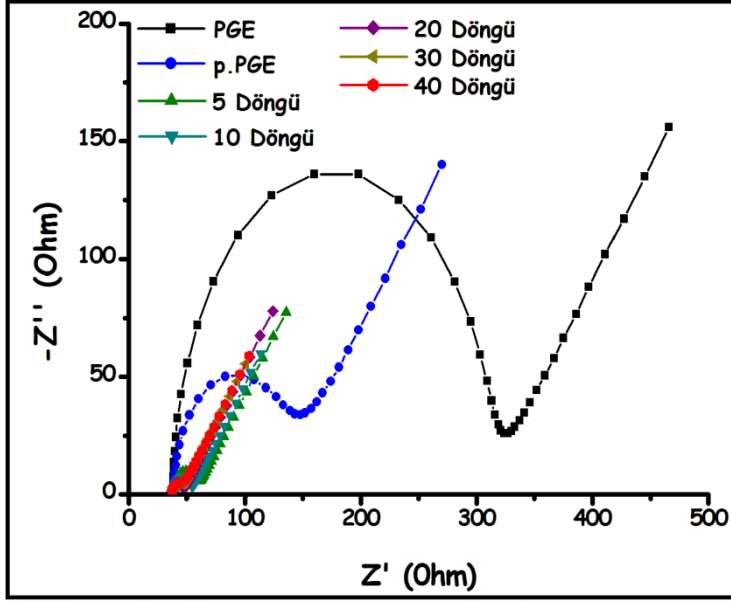
CV'ler incelendiğinde, yalın PGE'de Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks probuna ait +335 mV'da bir yükseltgenme ve +100 mV'da bir indirgenme piki gözlenmiştir. Koşullandırılmış elektrot (p.PGE) kullanıldığında ise yükseltgenme ve indirgenme pik potansiyelleri, yalın PGE'ye göre sırasıyla daha negatif ve daha pozitif kaymıştır. Bu durum, PGE yüzeyinin aktive edilmesi sonucu oluşan karbonil ve hidroksil gibi aktif grupların p.PGE ile Fe(CN)₆^{3-/4-} arasındaki elektron transferini arttırmasına bağlanmaktadır. Koşullandırılmış elektrot yüzeyi AuNP'ler ile modifiye edildiğinde ise Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks probunun yükseltgenme ve indirgenme potansiyelleri, çok az da olsa sırasıyla daha negatif ve daha pozitif potansiyellere kaymış ve Au'nun elektrobiriktirilmesi esnasındaki döngü sayısının artmasıyla da bu potansiyeller çok fazla değişmemiştir. Ancak, Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks probuna

ait indirgenme ve yükseltgenme pik akımları, modifikasyon esnasındaki döngü sayısının artmasına bağlı olarak artmıştır. Özellikle 5 döngülü CV'lerin kaydedilmesiyle elde edilen Au/p.PGE'deki $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 'nin pik akımları, p.PGE'ye göre önemli derecede artmıştır. 5 döngüden sonra döngü sayısının 10'dan 40'a kadar artmasıyla bu pik akımlarındaki artış devam etmiş, ama 5 döngülü Au/p.PGE ile p.PGE arasındaki kadar önemli bir artış gözlenmemiştir. Özellikle, 20, 30 ve 40 döngü sayılarında elde edilen modifiye elektrotlar için yükseltgenme/indirgenme pik potansiyelleri ve pik akımları değerlerinin neredeyse sabitlendiği görülmektedir. Pik akımlarındaki bu artışın nedeni ise elektrobiriktirme esnasında döngü sayısının artmasıyla yüzeydeki AuNP yoğunluğunun artmasına ve yüzeye kaplanan AuNP'lerin iletken özelliğine bağlanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar, p.PGE yüzeyinin AuNP'ler ile modifiye edilmesiyle $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks probu ile elektrot arasındaki elektron transfer hızını önemli derecede artırdığını yansıtmaktadır.

CV ile incelenen modifiye ve yalın elektrotların elektrokimyasal özellikleri, elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile de incelenmiştir. Bu adımda ise tüm elektrotların aynı redoks probunu içeren çözelti içerisinde, Şekil 4.3'de verilen devre modeli kullanılarak impedans eğrileri kaydedilmiştir. Yalın PGE, p.PGE ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayılarında elde edilen herbir modifiye elektrot için kaydedilen Nyquist eğrileri Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Elektrokimyasal impedans devre modeli ve impedans eğrisinin gösterimi (R_s : çözelti direnci; R_{et} : elektron transfer direnci; C : sığa; W : Warburg impedansı) (Sağlam, 2016)



Şekil 4.4. PGE, p.PGE ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Au/p.PGE'lerin 0,01 M $K_3[Fe(CN)_6]$, 0,01 M $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 0,1 M KCl destek çözeltisinde kaydedilen impedans eğrileri (Uygulanan frekans aralığı: 100000 Hz – 0,1 Hz; uygulanan potansiyel: +170 mV; sinüsodiyal sinyal: 5 mV)

İmpedans eğrileri incelendiğinde hiçbir ön işlem ya da modifikasyona uğratılmamış elektroda (Yalın PGE) ait elektron transfer direncinin (R_{et}) diğer elektrotlara göre oldukça yüksek olduğu görülmektedir (285 ohm). Direncin yüksek olmasının sebebi, PGE'nin grafit içeriğinin yanında kil ve safsızlıklar içermesi ve grafit harici bu bileşenlerin, PGE ile redoks probu arasındaki elektron transferini zorlaştırdığı ve bu durumun iletkenlik özelliğini azalttığı şeklinde yorumlanmaktadır. Diğer taraftan, PGE +1,45 V'ta ön koşullandırıldığında ise yalın PGE'ye göre R_{et} değerinde ciddi bir azalma (114 ohm) görülmüştür. Bu azalmanın nedeni, ön koşullandırma basamağında yüzey safsızlıklarından temizlenmesi ile birlikte PGE'nin içerdiği grafitin yükseltgenmesi sonucu elektrot yüzeyinde muhtemel karboksilik asit (-COOH) ve hidroksil (-OH) gibi elektronca zengin fonksiyonel grupların oluşmasına bağlanmaktadır. Bu fonksiyonel grupların, grafit yüzeyini aktifleştirerek elektrot yüzeyi ile redoks probu arasındaki elektron transferini kolaylaştırdığı düşünülmektedir. AuNP modifikasyonu ile bu direnç değerlerinin önemli derecede azaldığı görülmüş ve Au/p.PGE'lerin elektrokimyasal olarak biriktirme yoluyla modifikasyonunda kullanılan döngü sayısının artmasıyla R_{et} değerlerinin de orantılı olarak düştüğü gözlenmiştir (Çizelge 4.1). Örneğin, 5 döngülü CV sonucu elde edilen Au/p.PGE'nin direnç değeri p.PGE için elde edilen 114 ohm değerinden 39 ohm'a

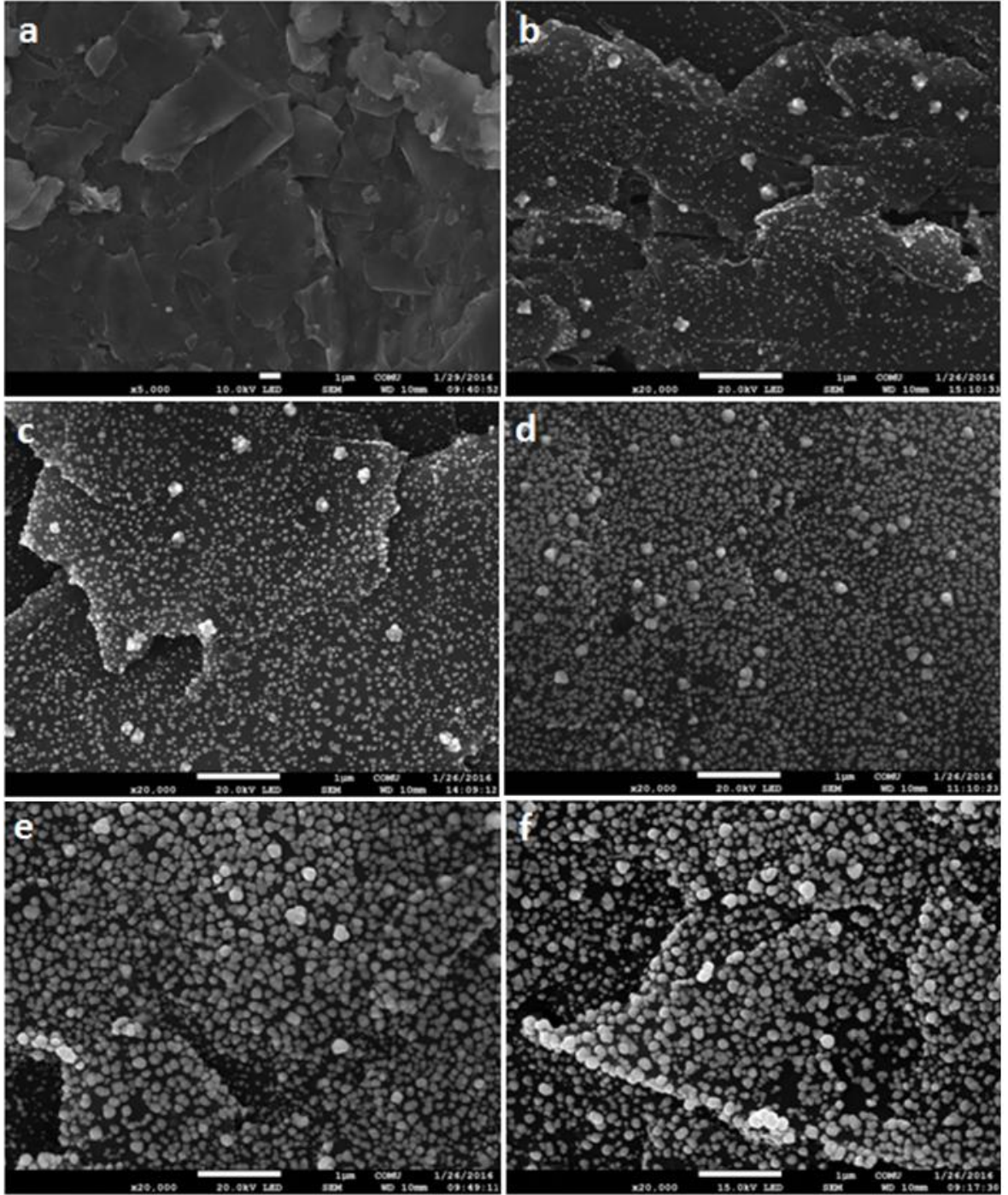
düşerken, 40 döngüde elde edilen elektotta ise bu değer 17 ohm'a kadar düşmüştür. Elektrokimyasal biriktirme yoluyla modifikasyonda döngü sayısının artmasıyla elde edilen AuNP'lerin elektrot yüzeyinde yoğunluğunun artması, elektrot ile $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks probu arasındaki elektron transferini kolaylaştırdığını yansıtmaktadır. Şekil 4.4'te kaydedilen impedans eğrilerinden elde edilen R_{et} değerleri ile Şekil 4.2'de verilen CV'lerdeki redoks probuna ait pik akımındaki artışlar ve potansiyeldeki kaymalar birbirini desteklemektedir. Hem impedans eğrilerinden elde edilen R_{et} değerleri hem de CV'lerden elde edilen anodik ve katodik pik potansiyel ve akımları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Tüm elektrotlar için kaydedilen impedans eğrilerindeki R_{et} değerleri ve CV'lerdeki pik akımının değerlerine göre bir değerlendirme yapıldığında, AuNP'lerin p.PGE yüzeyine başarılı bir şekilde biriktirildiği sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.1. Yalın PGE, p.PGE ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Au/p.PGE'lerin $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks probu ortamında kaydedilen impedans eğrileri ve CV'lerinden çıkarılan veriler (n=3)

Elektrot	E_a (mV)	E_k (mV)	ΔE_p (mV)	I_{pa} (μA)	I_{pk} (μA)	R_{et} (Ohm)
PGE	335	100	235	470 \pm 1,0	443 \pm 2,4	285 \pm 6,4
p.PGE	305	105	200	519 \pm 5,2	445 \pm 2,4	114 \pm 0,6
Au/p.PGE /5 Döngü	285	130	155	533 \pm 4,1	482 \pm 3,8	39 \pm 2,1
Au/p.PGE /10 Döngü	280	130	150	571 \pm 3,8	516 \pm 2,8	36 \pm 1,6
Au/p.PGE /20 Döngü	275	135	140	577 \pm 3,0	528 \pm 2,9	21 \pm 1,0
Au/p.PGE /30 Döngü	275	135	140	592 \pm 2,9	544 \pm 2,3	18 \pm 0,5
Au/p.PGE /40 Döngü	270	135	135	652 \pm 2,5	599 \pm 1,9	17 \pm 0,8

4.1.1.3. Au/p.PGE'lerin Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesi

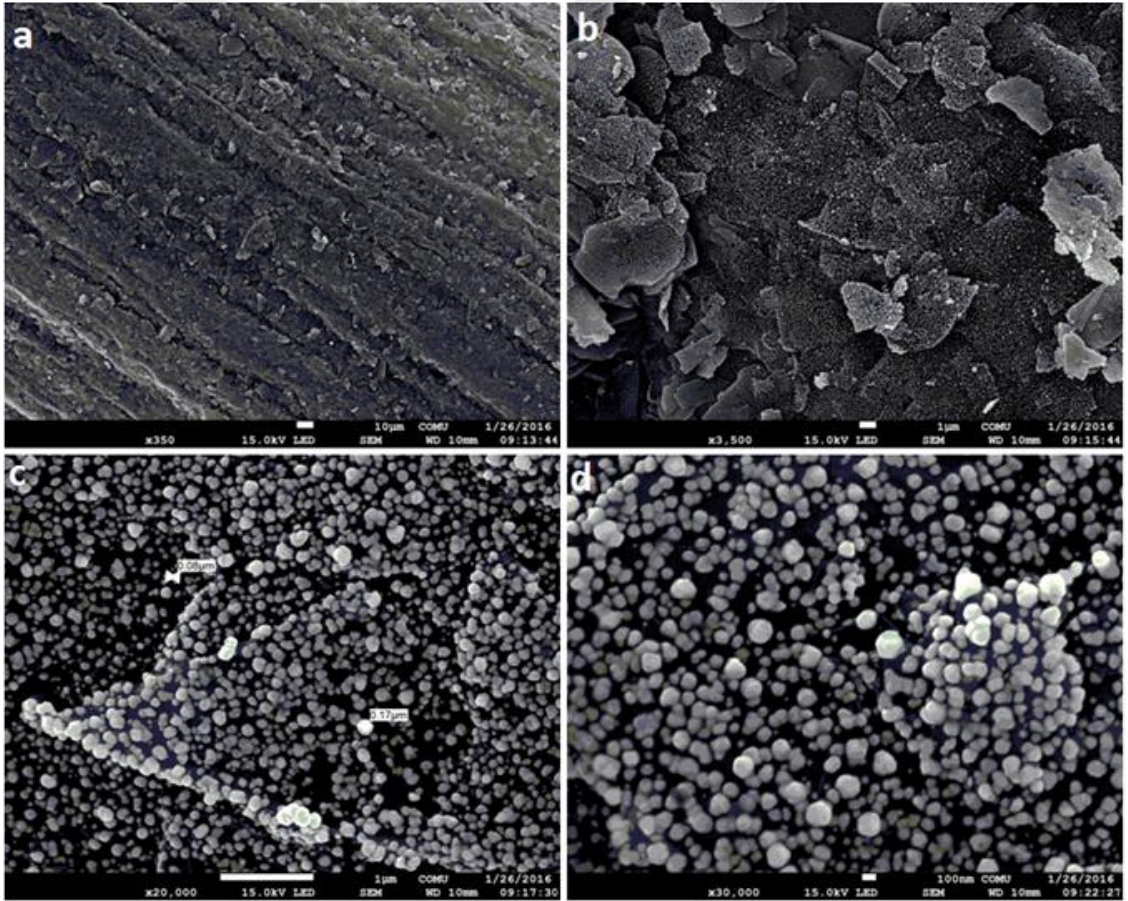
Yalın ve modifiye elektrotların elektrokimyasal özelliklerinin incelenmesi tamamlandıktan sonra, elektrotların yüzey morfolojilerinin incelenmesi amacıyla öncelikle tüm elektrotların taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscopy, SEM) görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. p.PGE (a, 1 μm x5000) ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayısının kullanımıyla elde edilen AuNP modifiye elektrotların SEM görüntüleri: b) 5, c) 10, d) 20, e) 30 ve f) 40 döngü, 1 μm x20000)

SEM görüntüleri incelendiğinde, p.PGE'nin tabakalar şeklinde pürüzsüz ve düz bir yüzeye sahip olduğu (Şekil 4.5 a) ve bu yüzeyin Au'nun elektrokimyasal biriktirmesiyle değiştiği ve AuNP'lerin kürecikler şeklinde p.PGE yüzeyine biriktiği görülmektedir. Au'nun elektrokimyasal biriktirme prosedürü esnasında kullanılan döngü sayısının artmasıyla da

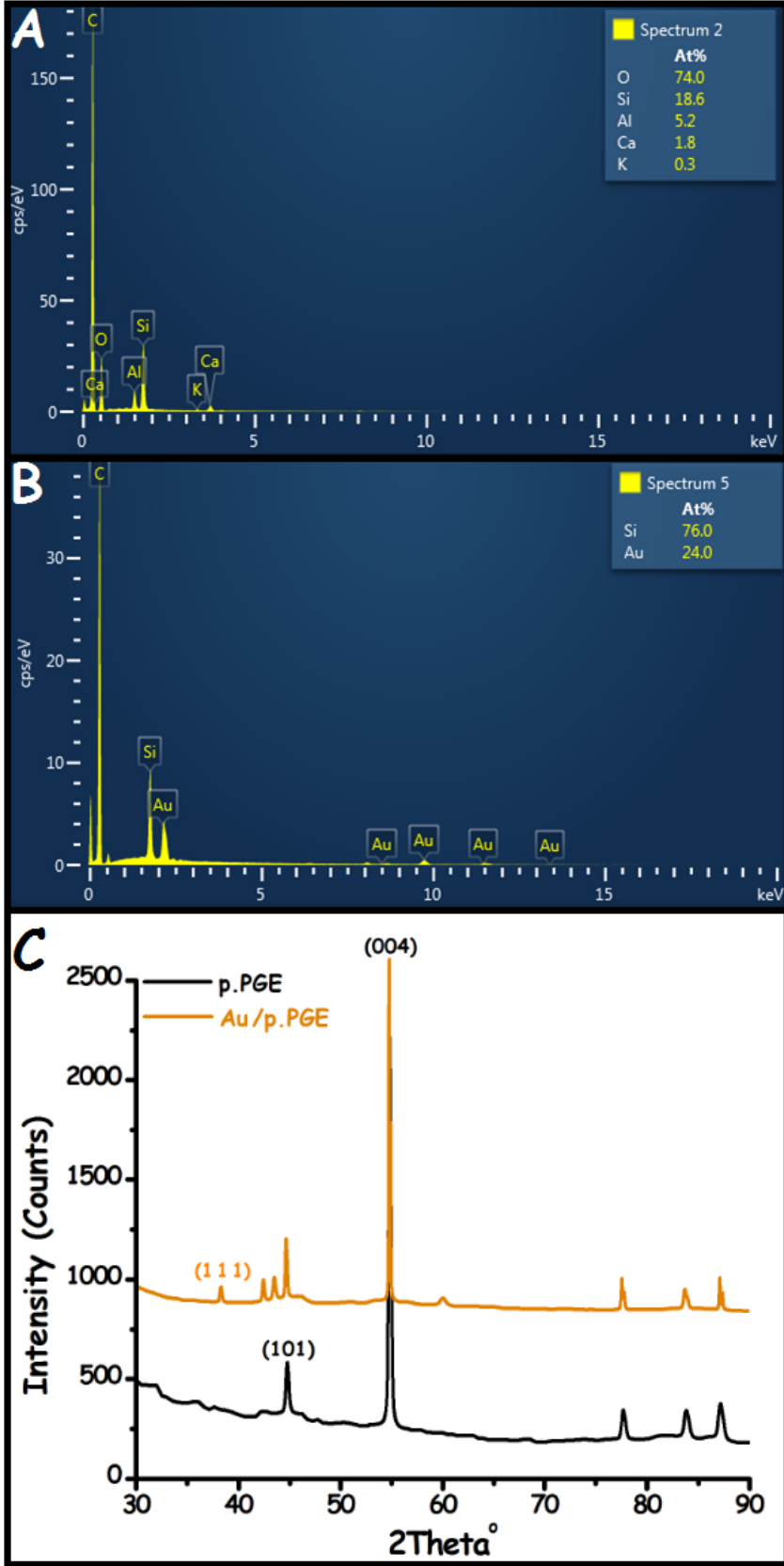
beklenildiği gibi elektrot yüzeyinde Au nanoparçacık yoğunluklarının arttığı da SEM görüntülerinden görülmektedir (Şekil 4.5 b-f). Daha önceki kısımda bahsedilen impedans analizlerinde döngü sayısının artmasıyla elde edilen R_{et} değerlerinin orantısal olarak düşmesi ve dolayısıyla iletkenlikteki artış ve kaydedilen CV'lerdeki $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ ye ait anodik ve katodik pik akımlarındaki orantısal artış SEM görüntülerindeki AuNP yoğunluğunun döngü sayısı ile artmasını desteklemektedir. Daha sonraki kısımda belirtileceği gibi $HAuCl_4$ 'nin p.PGE'de 40 döngü sayısı ile CV'lerin kaydedilmesiyle elde edilen Au/p.PGE'nin H_2O_2 'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine en iyi yanıtı verdiği tespit edildiğinden dolayı, bu elektrodun farklı oranlarda yakınlştırılmış SEM görüntüleri Şekil 4.6'da verilmiştir. 20000 ve 30000 kat büyütmeyle alınan SEM görüntülerinden yapılan hesaplamalara göre elektrot yüzeyinde biriken Au nanoparçacıklarının boyutunun 80 ile 170 nm arasında olup (Şekil 4.6 c), ortalama 100 nm olduğu tespit edilmiştir. (Şekil 4.6 d).



Şekil 4.6. Elektrokimyasal biriktirme esnasında 40 döngü ile elde edilen Au/p.PGE'nin farklı yakınlştırılma oranlarında kaydedilen SEM görüntüleri; a) 10 μm x350; b) 1 μm x3500; c) 1 μm x20000 ve d) 100 nm x30000

SEM görüntülerine ek olarak hem p.PGE'nin hem de Au/p.PGE'nin enerji yayımlı X-ışını (Energy Dispersive X-Ray, EDX) spektrumu ile X-ışını kırınımı (X-Ray Diffraction, XRD) spektrumu kaydedilerek, elektrot yüzeyine metal nanoparçacık modifiye edilmesiyle gerçekleşen yüzey morfolojisi değişimi izlenmiştir (Şekil 4.7). Yalın ve koşullandırılmış elektrodun (p.PGE) EDX spektrumuna göre yüksek miktardaki C oranı (% hesabında değerlendirmeye alınmamıştır), % 74 O, %18,6 Si ve % 5,2 Al oranının bulunması, p.PGE'nin iki temel bileşeni olan grafit ve bir alümino silikat minerali olan kil'den kaynaklanmaktadır (Şekil 4.7 A). Şekil 4.7 B'de ise elektrokimyasal biriktirme esnasındaki 40 döngü sayısı ile elde edilen Au/p.PGE'nin EDX spektrumu verilmiş ve Şekil 4.7A'da gösterilen p.PGE'ye göre farklı olarak yüzeyde % 24 Au bulunmuştur. Bunun yanında grafitteki kil mineralinden kaynaklı %76 Si de kaydedilmiş ve yüksek miktardaki C oranı % hesabında değerlendirmeye alınmamıştır.

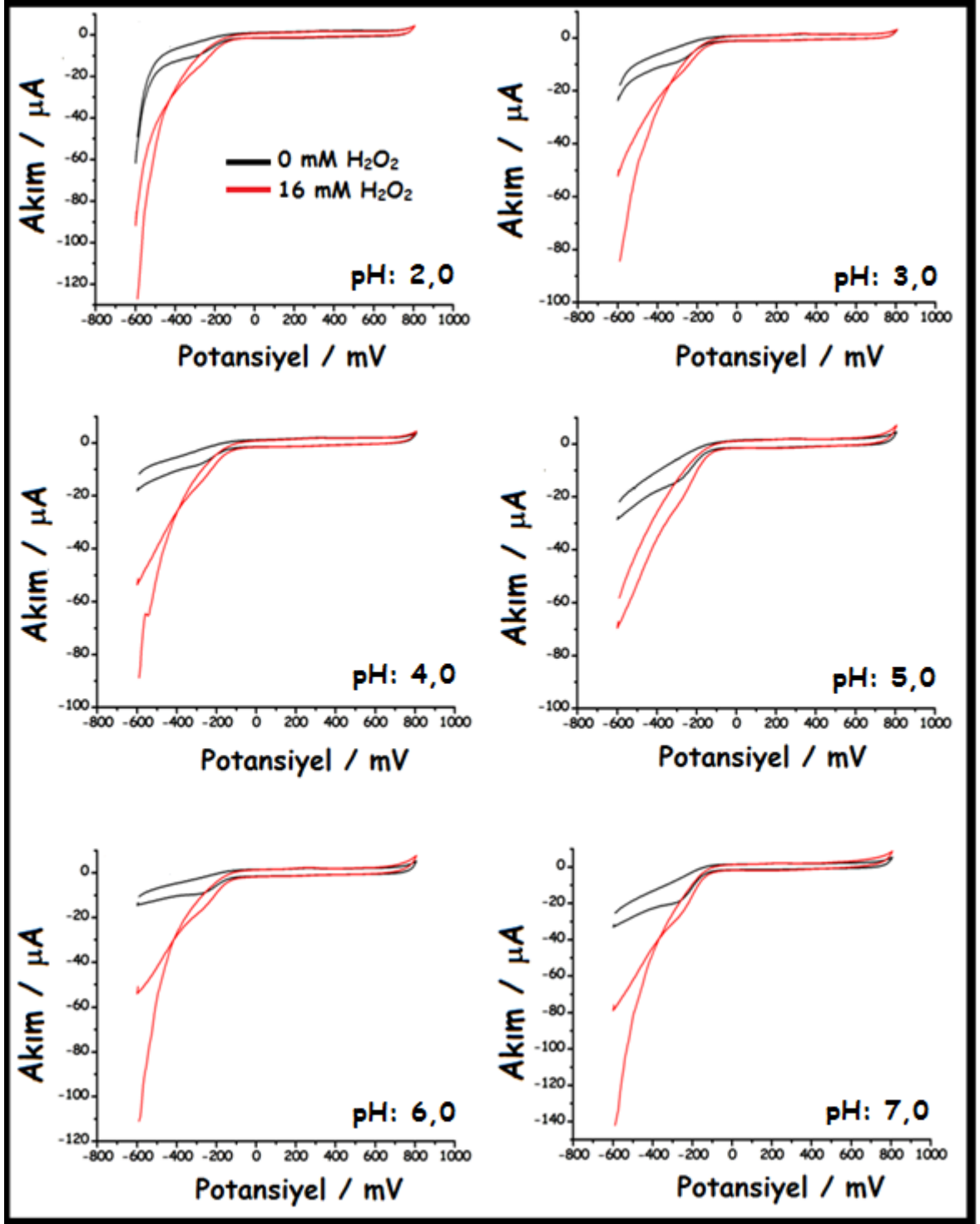
Şekil 4.7 C'de ise her iki elektrodun (p.PGE ve Au/p.PGE) XRD spektrumları verilmiştir. Yalın ve koşullandırılmış elektrodun (p.PGE) spektrumu incelendiğinde, $44,74^\circ$ ve $54,79^\circ$ olarak 2θ açısında kalem uçlarındaki grafitik karbona ait olan iki önemli pikin gözlemlendiği ve bu piklerin C (1 0 1) ile C (0 0 4) şeklinde grafitin iki farklı yüzey kübik kristal (face cubic crystal, fcc) yapısına ait olduğu tespit edilmiş ve literatür bilgileriyle desteklenmiştir (Vishnu ve ark., 2018). Elektrot yüzeyine AuNP biriktirildiğinde ise p.PGE spektrumundan farklı olarak $38,3^\circ$ olarak 2θ açısında Au (1 1 1)'in yüzey kübik kristal (face cubic crystal, fcc) yapısına ait bir kırınım piki görünmüş olup, bu pikin literatürde verilen değerlerle uyum içerisinde olduğu belirlenmiştir (Sneha ve ark., 2010; Verma ve ark., 2011). Yalın ve AuNP biriktirilmiş p.PGE'lerin yüzey morfolojilerini aydınlatmak üzere yapılan SEM, EDX ve XRD analiz sonuçları, AuNP'lerin başarılı bir şekilde p.PGE yüzeyine modifikasyonunun gerçekleştiğini göstermektedir. Elektrokimyasal ve yüzey morfolojisi incelenen ve elektrokimyasal biriktirme esnasında 40 döngü sayısının kullanılmasıyla elde edilen Au/p.PGE, H_2O_2 'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine daha kararlı yanıtlar verdiği için bundan sonraki çalışmalarda bu elektrodun (Au/p.PGE olarak) kullanılmasına karar verilmiştir.



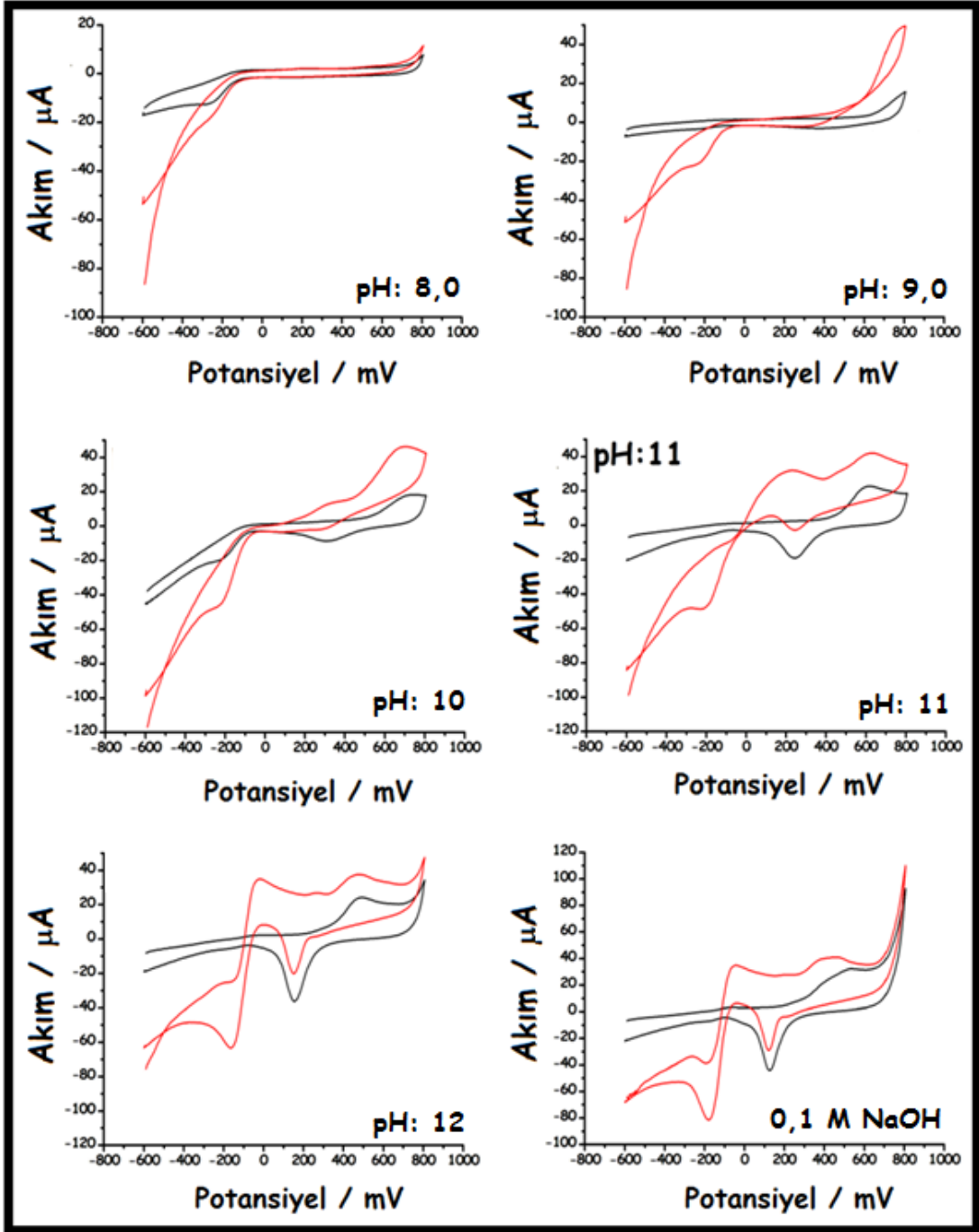
Şekil 4.7. p.PGE'nin (A) ve elektrokimyasal biriktirme esnasında 40 döngü ile elde edilen Au/p.PGE'nin (B) EDX ve p.PGE (siyah) ve Au/p.PGE'nin (turuncu) (C) XRD spektrumu

4.1.1.4. Au/p.PGE’de H₂O₂’nin Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi

Optimizasyon çalışmalarının ilk aşamasında H₂O₂’nin elektrokimyasal davranışına destek elektrolit pH’sının etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, elektrokimyasal biriktirme esnasında 40 döngü sayısı ile elde edilen Au/p.PGE’nin pH’sı 2,0 ile 12 aralığında değişen BRBS’de ve 0,1 M NaOH çözeltisinde 16 mM H₂O₂’nin CV’leri kaydedilmiştir (Şekil 4.8). Voltammogramlar incelendiğinde, pH 2,0 ile 8,0 arasında H₂O₂’nin yükseltgenmesine ait herhangi bir akımın oluşmadığı, indirgenmede ise özellikle asidik bölgelerde (pH 2,0 ile 6,0 arasında) H₂ çıkışının daha çok egemen olduğu ve H₂O₂’nin indirgenmesinin bu aşırı indirgenme akımı altında bastırıldığı görülmektedir. H₂O₂’nin yükseltgenme ve indirgenmesinin pH 9,0’dan sonra net olarak gözlemlendiği ancak özellikle yükseltgenmenin oldukça pozitif potansiyelde (yaklaşık 750 mV) olduğu tespit edilmiştir. pH’nın 9,0’dan sonra bazik bölgeye doğru değişmesiyle H₂O₂’nin yükseltgenmesine ait piklerin daha da belirginleştiği Şekil 4.8’den görülmektedir. Örneğin 0,1 M NaOH ortamında H₂O₂’nin yükseltgenme ve indirgenme pikleri, yaklaşık -50 mV ve -200 mV potansiyellere kaydığı görülmüştür. Bu verilere göre, Au/p.PGE’nin bazik ortamda H₂O₂’nin yükseltgenmesine ve indirgenmesine oldukça iyi bir elektrokatalitik etkinlik gösterdiği ve H₂O₂’nin redoks tepkimelerini daha da kolaylaştırdığı sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak, en iyi elektrokatalitik etkinin gözlemlendiği destek elektrolit ortamının 0,1 M NaOH destek çözeltisi olduğu belirlenmiş ve bundan sonraki çalışmalarda bu destek çözeltinin kullanılmasına karar verilmiştir.

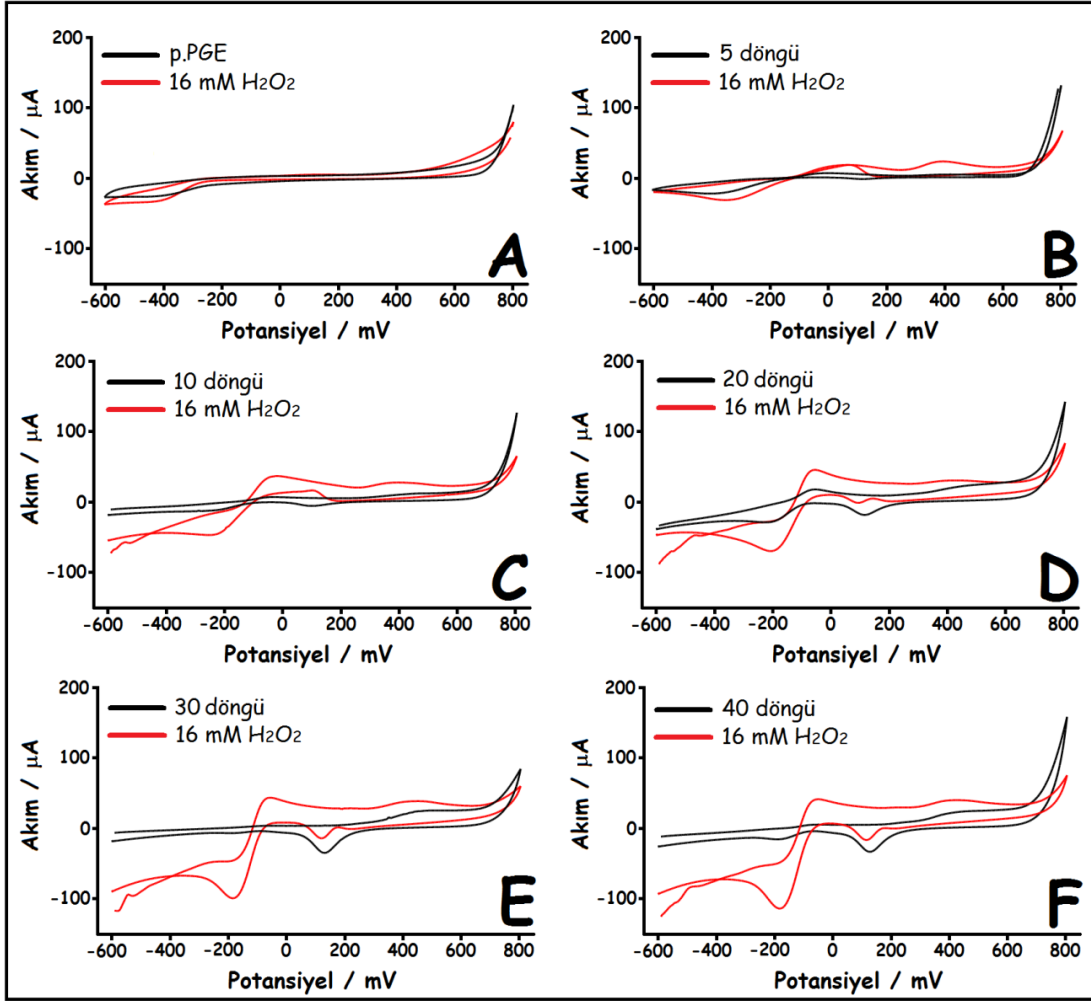


Şekil 4.8. Au/p.PGE'nin pH'sı 2,0 ile 12 arasında değişen BRBS ve 0,1 M NaOH çözeltisinde (siyah voltammogramlar), 16 mM H₂O₂ varlığında (kırmızı voltammogramlar) kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50 mV/s)



Şekil 4.8'in devamı

Çalışmaların ikinci kısmında ise Au^{3+} 'nın p.PGE'de farklı döngü sayılarında CV'lerinin kaydedilmesiyle hazırlanan Au/p.PGE'lerin 16 mM H_2O_2 içeren 0,10 M NaOH ortamında CV'leri kaydedilerek, elektrobiriktirme esnasında kullanılan döngü sayısı optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Hem p.PGE hem de elektrobiriktirme esnasında farklı döngü sayılarının kullanılmasıyla hazırlanan Au/p.PGE için kaydedilen CV'ler Şekil 4.9'da verilmiştir.

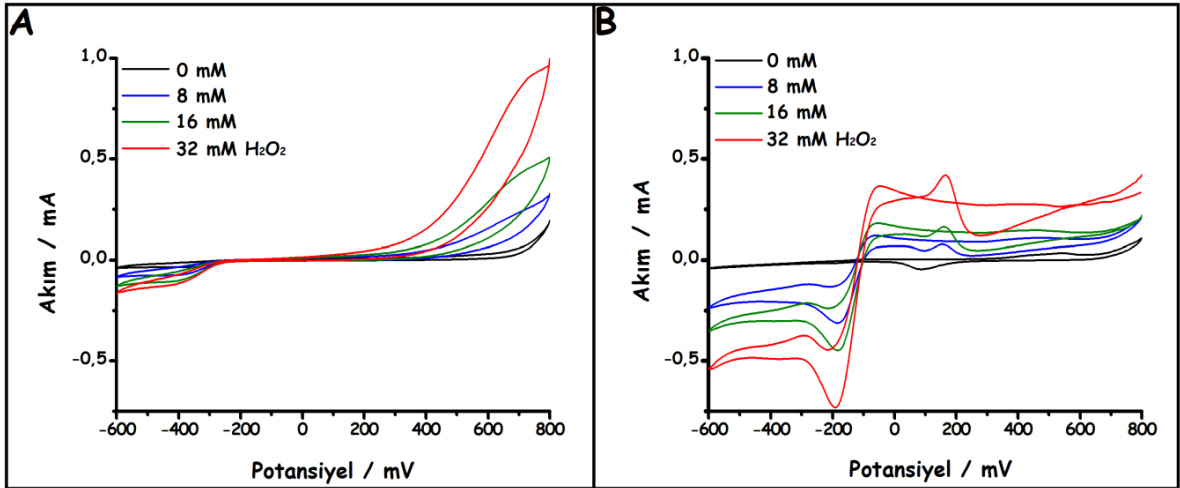


Şekil 4.9. p.PGE (A) ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayılarında (5 (B), 10 (C), 20 (D), 30 (E) ve 40 (F)) hazırlanan Au/p.PGE'lerin 0,10 M KCl içeren 0,10 M NaOH çözeltisinde (siyah voltammogramlar) ve 16 mM (kırmızı voltammogramlar) H_2O_2 varlığında kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50mV/s)

Yalın ve koşullandırılmış elektrotta (p.PGE), H_2O_2 'nin yükseltgenmesi, çok yüksek pozitif potansiyelerde (yaklaşık 600-700 mV'larda), indirgenmesi ise -400 mV'da çok az da olsa gözlenmiştir (Şekil 4.9 A). Yalın p.PGE yüzeyine Au nanoparçacık biriktirildiğinde ise H_2O_2 'nin yükseltgenme ve indirgenmenin daha net olarak pik şeklinde gözlendiği ve bu piklerin biriktirme esnasındaki döngü sayısına bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir. Örneğin, 5 döngü sayısı ile elde edilen Au/p.PGE'de H_2O_2 'nin bir kısmı +400 mV bir kısmı ise +100 mV'da yükseltgenmiş ve indirgenmesi ise -300 mV'lara kaymıştır. Döngü sayısının artmasıyla da bu pikler daha pozitif ve negatife kaymakla birlikte ilgili piklerin şiddetinde de önemli artışlar gözlenmiştir (Şekil 4.9 B-F). Bu durumun iyi iletkenlik özelliklerine sahip olan AuNP'lerin elektrokatalitik etkisi sebebiyle, yalın elektrotta aşırı

potansiyelerde görülen H_2O_2 'ye ait yükseltgenme ve indirgenme piklerinin sırasıyla daha negatif ve daha pozitif kaydırması ve pik akımında ciddi artışlara neden olması ile açıklanabilmektedir. Döngü sayısının 30 ve 40 olduğunda elde edilen Au/p.PGE'lerde H_2O_2 'nin yükseltgenmesine ve indirgenmesine alınan yanıtların diğer döngülerde elde edilen elektrotlara göre oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9 E ve F). Her ne kadar bu iki elektrotta H_2O_2 'nin yükseltgenmesine ve indirgenmesine ait piklerin yüksekliği birbirine oldukça yakın ise de, 30 döngü sayısı ile elde edilen elektrodun yüzey etkinliğini daha hızlı yitireceği ve bu durumun modifiye elektrodun tekrarlanabilirlik ve kararlılık parametrelerini olumsuz etkileyebileceği olasılığı göz önünde bulundurularak, bundan sonraki çalışmalarda 40 döngü sayısı ile elde edilen Au/p.PGE'nin kullanılmasına karar verilmiştir.

Bir sonraki adımda, optimize edilen destek elektrolit ortamında (0,1 M KCl içeren 0,1 M NaOH destek çözeltisi) hem p.PGE hem de Au/p.PGE'de H_2O_2 'nin artan derişimine (0, 8, 16 ve 32 mM) bağlı olarak CV'leri kaydedilmiştir (Şekil 4.10). Kaydedilen CV'lerden de görüldüğü gibi p.PGE'de (Şekil 4.10 A) H_2O_2 'nin indirgenmesi ve yükseltgenmesine ait pikler sırası ile yaklaşık -400 mV ve + 700 mV'da gözlenmiş ve H_2O_2 'nin derişiminin artmasıyla da pik akımları orantısal olarak artmıştır. Au/p.PGE'de (Şekil 4.10 B) ise daha önce de belirtildiği gibi yükseltgenme piki daha negatife (-50 mV) indirgenme piki ise daha pozitif (-200 mV) kaymış ve H_2O_2 'nin derişiminin artmasıyla da bu piklerin aynı potansiyel değerlerinde derişime bağlı olarak arttığı gözlenmiştir.



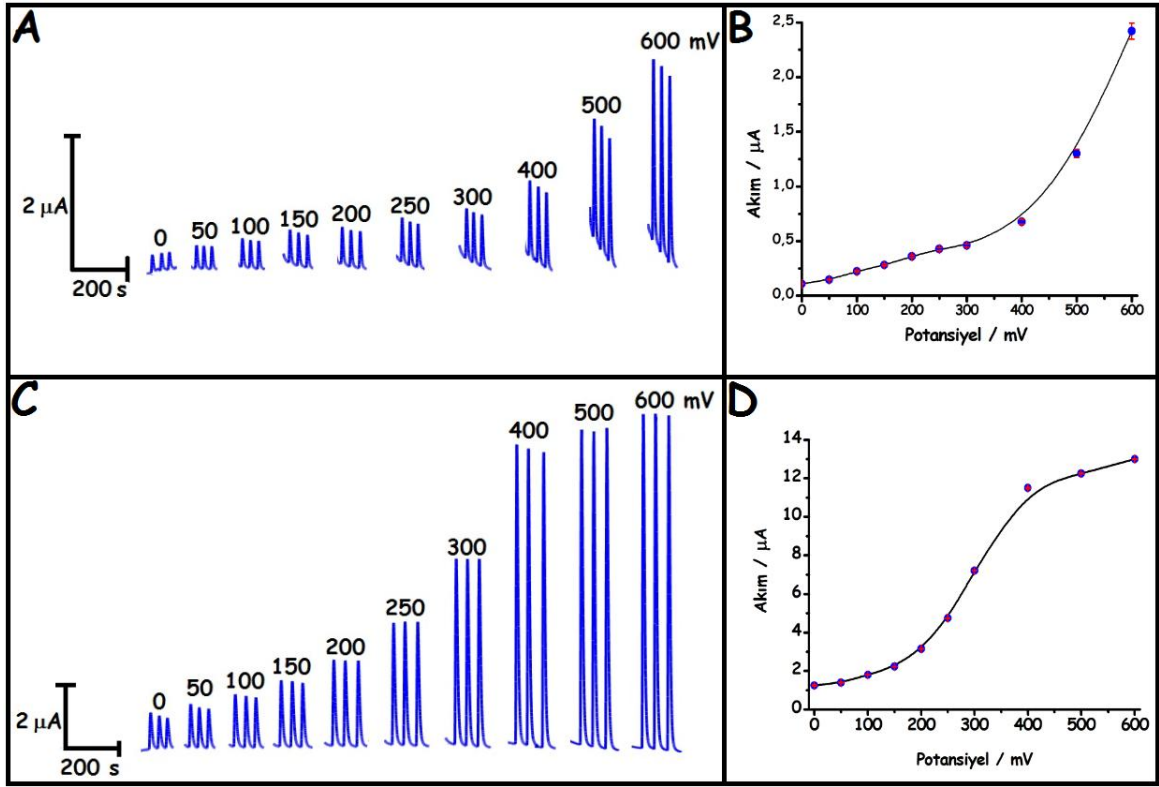
Şekil 4.10. A) p.PGE ve B) Au/p.PGE'nin 0,1 M KCl içeren 0,1 M NaOH destek çözeltisinde artan H_2O_2 derişimine (0, 8, 16 ve 32 mM) bağlı olarak kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50mV/s)

4.1.1.5. Au/p.PGE ile FIA Sisteminde Gerçekleştirilen Çalışmalar

FIA sisteminde H_2O_2 'nin Au/p.PGE'de elektrokatalitik yükseltgenmesine bağlı amperometrik sensörünü geliştirmek için deneysel çalışmalar kısmında bahsedilen, daha önceki çalışmalarda kullanılan ve ilk defa PGE için tasarlanan akış hücresi kullanıldı. FI amperometrik çalışmalara, en uygun şartları belirlemek amacıyla, uygulanacak potansiyel ve akış çözeltisinin sisteme gönderilme hızı gibi parametrelerin optimize edilmesiyle başlanmıştır. Daha sonra optimize edilen koşullar altında FI amperometrik H_2O_2 sensörüne ait analitiksel parametreleri (doğrusal derişim aralığı, duyarlık, gözlenebilme sınırı vb.) belirleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.1.1.5.1. Uygulama Potansiyelinin Belirlenmesi

Au/p.PGE'de H_2O_2 'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine bağlı FI amperometrik çalışmalarda uygulanacak potansiyeli belirlemek için farklı anodik uygulama potansiyellerinde (0; 50; 100; 150; 200; 250; 300; 400; 500; 600 mV) hem p.PGE'nin hem de Au/p.PGE'nin 100 μ M H_2O_2 'ye verdiği yanıtlar, amperomogramları kaydedilerek izlenmiştir. Her iki elektrot kullanılarak belirli koşullar altında 100 μ M H_2O_2 'nin üç ardışık enjeksiyonuyla kaydedilen FI amperomogramları ve bu amperomogramlardaki verilerden elde edilen akım-potansiyel değişim grafikleri Şekil 4.11'de verilmiştir. Şekil 4.11 A ve Şekil 4.11 B'de görüldüğü gibi yalın ve koşullandırılmış elektrotta (p.PGE), uygulama potansiyelinin 0 mV'dan 300 mV'a kadar değişmesiyle H_2O_2 'nin yükseltgenmesine ait piklerin giderek çok az da olsa arttığı ve gözlenen bu artışın 400 mV ile 600 mV arasında daha da belirginleştiği tespit edilmiştir. Au/p.PGE'de ise uygulama potansiyelinin 0 ile 300 mV arasında değişmesiyle elde edilen pik akımlarının p.PGE'ye göre oldukça belirgin olduğu ve 400 – 600 mV uygulama potansiyelleri arasında ise hemen hemen sabitlenerek değiştiği gözlenmiştir (Şekil 4.11 C ve Şekil 4.11 D). Ayrıca her iki elektrot için +300 mV uygulama potansiyelinde H_2O_2 'nin yükseltgenmesine verdikleri akımsal yanıtlar karşılaştırıldığında, modifiye elektrot ile alınan akım değerinin yalın elektroda göre yaklaşık 16 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Her ne kadar Au/p.PGE'de +400 mV ve sonrasında en yüksek akım değerleri elde edilmiş ise de, yüksek potansiyelerde biyolojik açıdan çeşitli girişimci bileşiklerin (AA, DA vs.) girişim etkilerinin yoğun olmasından ve +300 mV'da Au/p.PGE'de elde edilen yanıtın p.PGE'ye göre oldukça fazla olmasından dolayı, bundan sonraki çalışmalarda +300 mV uygulama potansiyelinin optimum değer olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

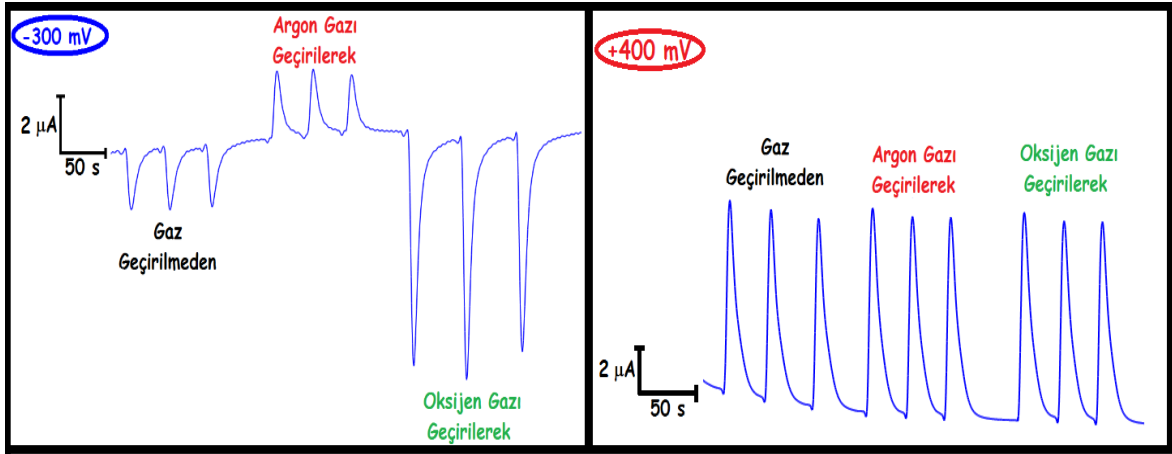


Şekil 4.11. p.PGE (A ve B) ve Au/p.PGE'nin (C ve D) farklı uygulama potansiyel değerlerinde 100 μM H_2O_2 'nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (A ve C) (Taşıyıcı çözelti: Ar ile doyurulmuş 1,0 M KCl ihtiva eden 0,1 M NaOH çözeltisi; akış hızı: 2,0 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: 100 μL ; kolon uzunluğu: 10 cm) ve bu amperomogramlardan elde edilen akım-potansiyel değişim grafikleri (B ve D)

Au/p.PGE'de H_2O_2 'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine yönelik çalışmalarla birlikte elektrokatalitik indirgenmesine bağlı olarak da elektrokimyasal sensörünün tasarlanabileceği bir önceki kısımda kaydedilen CV'lerden görülmektedir. Dolayısıyla FIA sisteminde -300 mV potansiyel değerinde yine 100 μM H_2O_2 'nin enjeksiyonuyla elde edilen katodik pik akım değerleri incelenmiş ve ortamdaki O_2 'nin H_2O_2 'nin indirgenme akımını etkilediği tespit edilmiştir. Şekil 4.12 A'da -300 mV'da kaydedilen FI amperomogramlardan görüldüğü gibi, hava atmosferi ortamında 100 μM H_2O_2 'de katodik pikin gözlemlendiği, Ar geçirildiğinde ise piklerin anodik yöne kaydığı ve son olarak O_2 ile doyurulduğunda piklerin katodik yönde önemli derecede arttığı tespit edilmiştir. Bu durum, O_2 ve H_2O_2 'nin indirgenmesinin -300 mV'ta yarışmalı olarak gerçekleştiğini göstermekte olup, alınan sonuçlar CV verileriyle uyumlu görünmektedir (Şekil 4.10 B).

O_2 'nin H_2O_2 'nin yükseltgenme pik akımına etkisini gözlemlemek için benzer şekilde

+400 mV uygulama potansiyelinde H_2O_2 'nin yükseltgenmesine ait FI amperogramları kaydedilmiştir. Şekil 4.12 B'de görüldüğü gibi +400 mV'da tekrarlanan enjeksiyonlar sonucunda H_2O_2 'nin yükseltgenmesine ait pik akımlarının hava atmosferi, Ar ve O_2 ile doyurulmuş ortamlarda değişmediği gibi oldukça kararlı yanıtlar alınmıştır. Elde edilen bu sonuçlara göre, Au/p.PGE kullanılarak enzimatik olmayan yoldan elektrokimyasal H_2O_2 sensörü çalışmalarına H_2O_2 'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi üzerinden devam edilmesine karar verilmiştir.

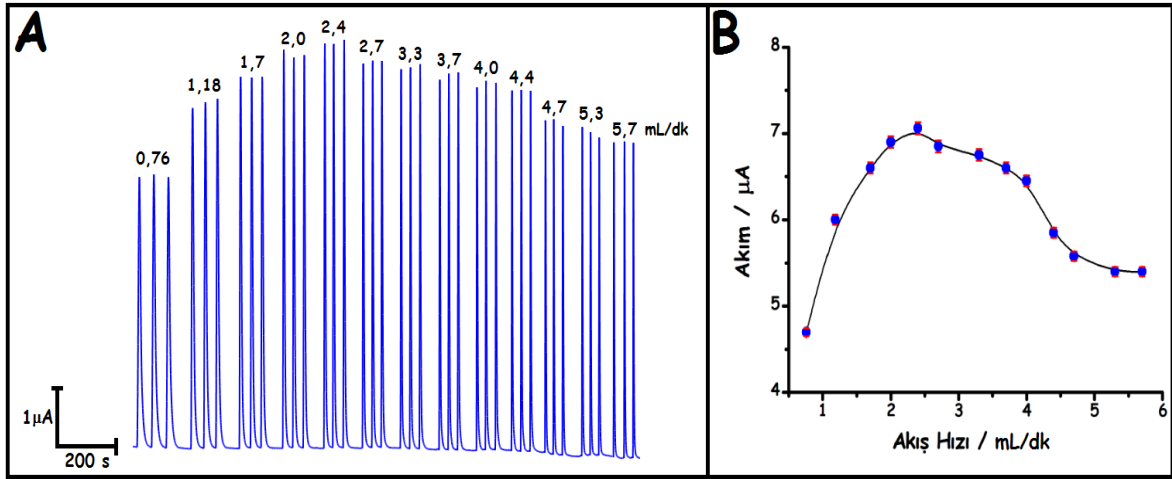


Şekil 4.12. Au/p.PGE kullanılarak -300 mV (A) ve +400 mV (B) uygulama potansiyellerinde hava atmosferi, Ar ve O_2 ile ayrı ayrı doyurulmuş akış çözeltisi ortamında 100 μM H_2O_2 'nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperogramları (Taşıyıcı çözelti: Ar ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren 0,10 M NaOH; akış hızı 2,0 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: 100 μL ; kolon uzunluğu: 10 cm)

4.1.1.5.2. Taşıyıcı Çözeltinin Akış Hızının Belirlenmesi

FIA sisteminde çalışılacak en uygun potansiyelin belirlenmesinin ardından, birim zamandaki akış hacminin değişimiyle, H_2O_2 'nin elektrokatalitik yükseltgenme pik akımının nasıl değiştiği incelenerek en uygun akış hızı belirlenmiştir. Bu amaçla, Au/p.PGE'de Ar ile doyurulmuş akış çözeltisinde hazırlanmış 100 μM H_2O_2 çözeltisi, farklı akış hızlarında (0,76; 1,18; 1,7; 2,0; 2,4; 2,7; 3,3; 3,7; 4,0; 4,7; 5,3 ve 5,7 mL/dk) FIA sistemine enjekte edilmiş ve amperogramları kaydedilmiştir (Şekil 4.13 A). Bu amperogramlardan elde edilen verilerden pik akımı-akış hızı değişim grafiği çizilmiş ve Şekil 4.13 B'de verilmiştir. Şekil 4.13 A ve B'de görüldüğü üzere, Au/p.PGE'nin 100 μM H_2O_2 'ye verdiği elektrokatalitik yükseltgenme yanıtı 0,76 mL/dk'dan başlayarak 2,4 mL/dk'ya kadar belirgin bir artış göstermiş, 2,4 mL/dk akış hızından itibaren ise akım

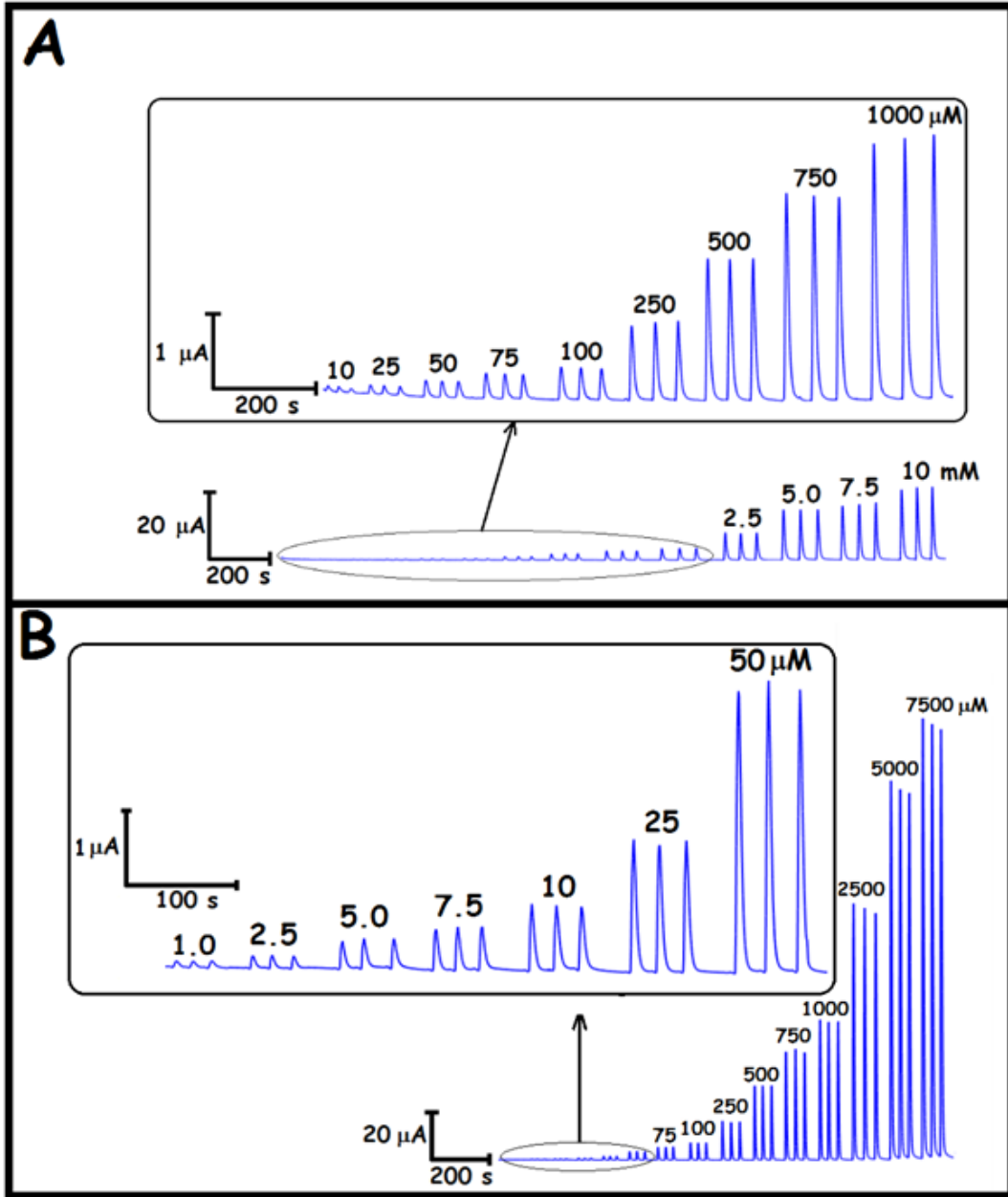
gittikçe azalmış ve 4,7 – 5,7 mL/dk akış hızları aralığında sabitlenmiştir. Akış hızının yükselmesiyle gözlenen belirgin azalışın nedeninin, taşıyıcı çözeltinin sisteme gönderilme hızı arttıkça H₂O₂ ile elektrot arasında gerçekleşen elektrokatalitik yükseltgenme tepkimesine yeterince zaman tanınmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre, en yüksek akım değerinin elde edildiği 2,4 mL/dk akış hızı, optimum akış hızı olarak belirlenmiş ve bundan sonraki çalışmalarda bu akış hızı değerinin kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.13. Au/p.PGE'nin farklı akış hızlarında 100 μM H₂O₂'nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (A) (Uygulama potansiyeli: +300 mV; taşıyıcı çözelti: Ar ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren 0,10 M NaOH çözeltisi; örnek kolonunun hacmi: 100 μL; kolon uzunluğu: 10 cm) ve bu amperomogramlardan elde edilen akım-akış hızı değişim grafiği (B)

4.1.1.5.3. Analitiksel Parametrelerin Belirlenmesi

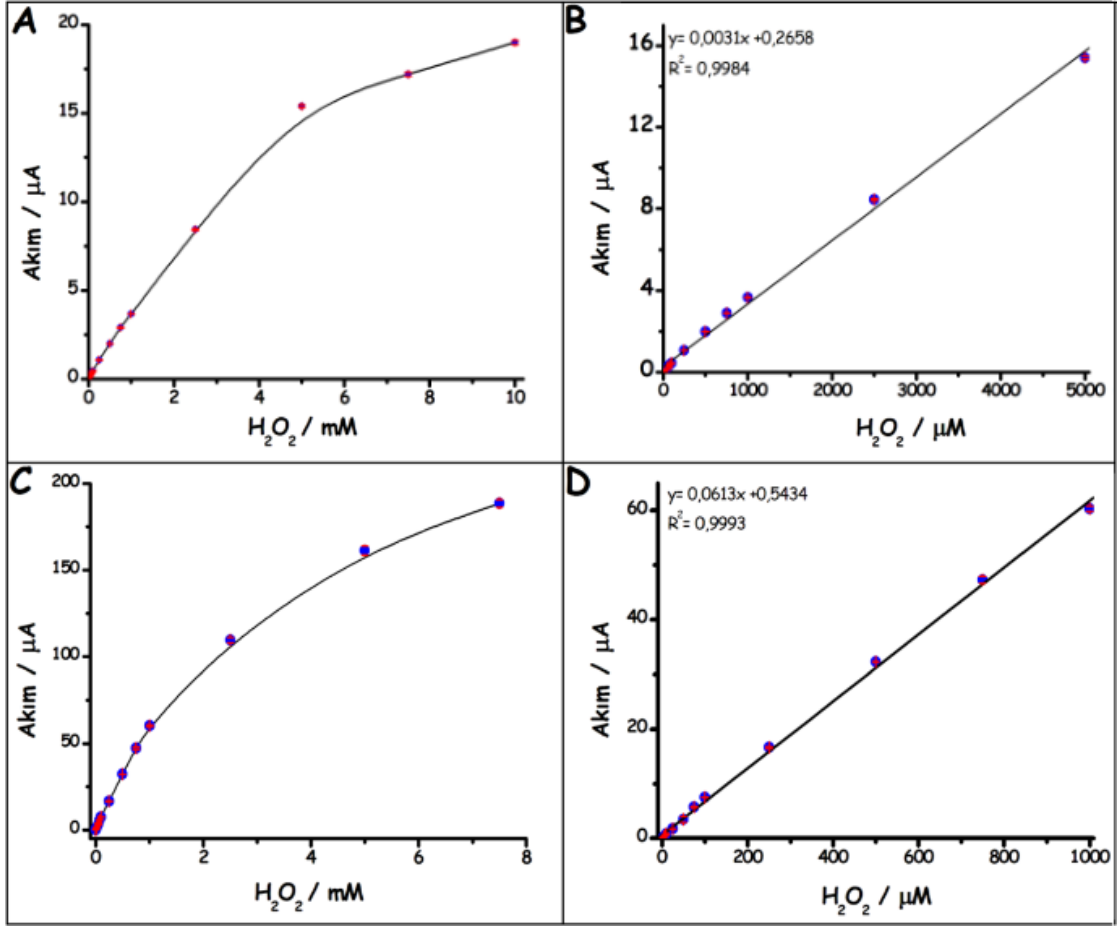
Bir önceki kısımda optimize edilen +300 mV uygulama potansiyeli ve 2,4 mL/dk akış hızı değerleri kullanılarak hem p.PGE hem de Au/p.PGE'nin artan H₂O₂ derişimine bağlı olarak amperomogramları kaydedilmiş (Şekil 4.14) ve kaydedilen bu amperomogramlar ile elektrokimyasal sensörün doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı gibi analitiksel parametreler belirlenmiştir.



Şekil 4.14. p.PGE (A) ve Au/p.PGE'nin (B) artan H₂O₂ derişimine bağlı olarak FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Uygulama potansiyeli: +300 mV; akış hızı 2,4 mL/dk; taşıyıcı çözelti: Ar ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren 0,10 M NaOH çözeltisi; örnek kolonunun hacmi: 100 μL; kolon uzunluğu: 10 cm)

p.PGE'de H₂O₂'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine ait sinyalin görüldüğü en küçük derişim 10,0 μM iken, Au/p.PGE kullanıldığında ise sinyalin net olarak görüldüğü derişim 1,0 μM'a kadar düşmektedir (Şekil 4.14). FIA sisteminde kaydedilen amperomogramlardan da görüldüğü üzere, hem p.PGE hem de Au/p.PGE'de artan H₂O₂ derişimine bağlı olarak oluşan pikler artmış, ancak Au/p.PGE'deki piklerin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu amperomogramlardan pik akım değerleri hesaplanarak, hem

akım-derişim grafiği hem de kalibrasyon grafiği her iki elektrot için elde edilmiştir (Şekil 4.15). Kalibrasyon eğrisinden p.PGE ve Au/p.PGE için doğrusallık ilişkisi incelenmiş, elde edilen veriler ışığında modifiye elektrot ile daha duyar yanıt alındığı, H₂O₂'nin yükseltgenmesine verdiği amperometrik yanıtın oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.15 B ve D).



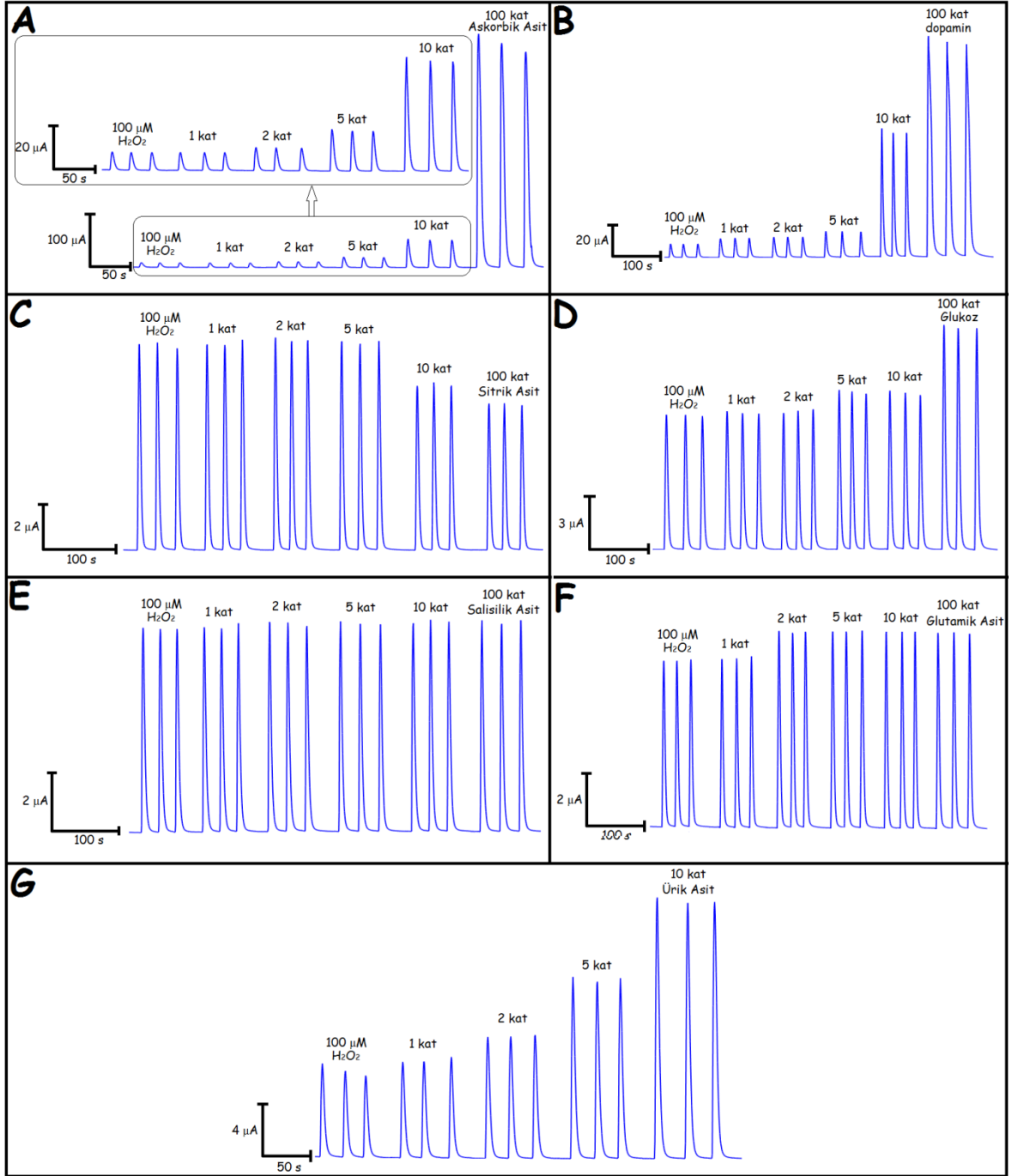
Şekil 4.15. p.PGE (A ve B) ve Au/p.PGE'nin (C ve D) artan H₂O₂ derişimlerine (A için 10,0 µM – 10,0 mM ve C için 1,0 µM – 7,5 mM H₂O₂) verdiği yanıtlara ait akım-derişim grafiği (A ve C) ve elde edilen kalibrasyon grafikleri (B için 10,0 µM – 5,0 mM H₂O₂ aralığında, $I(\mu A) = 0,0031 C(\mu M) + 0,2658$ ve $R^2 = 0,9984$ ve D için 1,0 µM – 1000 µM H₂O₂ aralığında $I(\mu A) = 0,0613 C(\mu M) + 0,5434$ ve $R^2 = 0,9993$)

Yalın ve koşullandırılmış PGE ile doğrusal yanıt alınan derişim aralığı 10,0 µM – 5000 µM H₂O₂ olarak bulunmuş olup, doğru denklemi ve korelasyon katsayısı sırası ile $I(\mu A) = 0,0031 C(\mu M) + 0,2658$ ve $R^2 = 0,9984$ olarak bulunmuştur. Au/p.PGE kullanıldığında ise doğrusal yanıt 1,0 µM – 1000 µM H₂O₂ olarak kaydedilmiş ve doğru denklemi ve korelasyon katsayısı sırası ile $I(\mu A) = 0,0613 C(\mu M) + 0,5434$ ve $R^2 = 0,9993$ olarak

hesaplanmıştır. Yalın ve modifiye PGE için kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğim değerlerinin birbirine oranı ($m_{\text{modifiye}}/m_{\text{yalın}}$) yaklaşık 20 olup, 20 kat daha duyar olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca Au/PGE'de H_2O_2 'nin sinyalinin net olarak görüldüğü en küçük derişiminin ($1,0 \mu\text{M}$) sisteme en az 10 kez enjekte edilmesi ile kaydedilen FI amperomogramlardan pik akımları ve pik ortalamasına ait standart sapma değeri hesaplanmıştır. Standart sapmanın eğime oranının 3 katı ($3S_b/m$) alınarak gözlenebilme sınırı (limit of detection, LOD) değeri $0,29 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ve standart sapmanın eğime oranının 10 katı ($10S_b/m$) alınarak tayin sınırı (Limit of Quantification, LOQ) değeri $0,97 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ olarak hesaplanmıştır. Au/p.PGE kullanılarak geliştirilen FI amperometrik H_2O_2 sensörüne ait duyarlık, Au/p.PGE için elde edilen kalibrasyon eğrisinin doğru denklemindeki eğim değerinin p.PGE'nin teorik olarak bulunan yüzey alanına ($1,0 \text{ cm}$ için $0,159 \text{ cm}^2$) oranlanmasıyla hesaplanmış ve $386 \mu\text{A mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ($m_{\text{modifiye}}/0,159 \text{ cm}^2$) olarak bulunmuştur.

4.1.1.5.4. Au/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Sensörün Seçiciliğinin İncelenmesi

Au/p.PGE kullanılarak FIA sisteminde geliştirilen amperometrik H_2O_2 sensörünün seçiciliğini test etmek amacıyla, H_2O_2 'nin elektrokatalitik yükseltgenmesini etkileyebilme potansiyeli yüksek olan bazı girişimci maddeler (AA, DA, GL, SA, SAL, GLA ve ÜA) kullanılmıştır. Bu amaçla, farklı derişimlerde (0; 0,10; 0,20; 0,50; 1,0 ve 10 mM) girişimci molekül içeren $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ hazırlanarak, FIA sistemine enjekte edilmiş ve optimize edilen koşullarda herbir girişimci molekül için ayrı ayrı amperomogramları kaydedilmiştir (Şekil 4.16). Böylece, $100,0 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ derişimi baz alınarak 1:0, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 ve 1:100 oranlarında H_2O_2 :girişimci çözeltileri için elde edilen FI amperomogramlardan pik akımları hesaplanmış ve veriler değerlendirilerek standart sapmaları ile birlikte herbir girişimci molekül için % değişimler tablo halinde Çizelge 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.16. Au/p.PGE'de 100 μM H_2O_2 göre artan oranlarda girişimci molekül (AA (A), DA (B), SA (C), GL (D), SAL (E), GLA (F) ve ÜA (G)) içeren çözeltilerin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramlar (Şekil 4.13'de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)

Çizelge 4.2. Her biri 100 µM sabit H₂O₂ içeren 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 ve 1:100 oranındaki girişimcilerin Au/p.PGE’de H₂O₂’nin yükseltgenme pik akımına gösterdikleri değişimler (n=3)

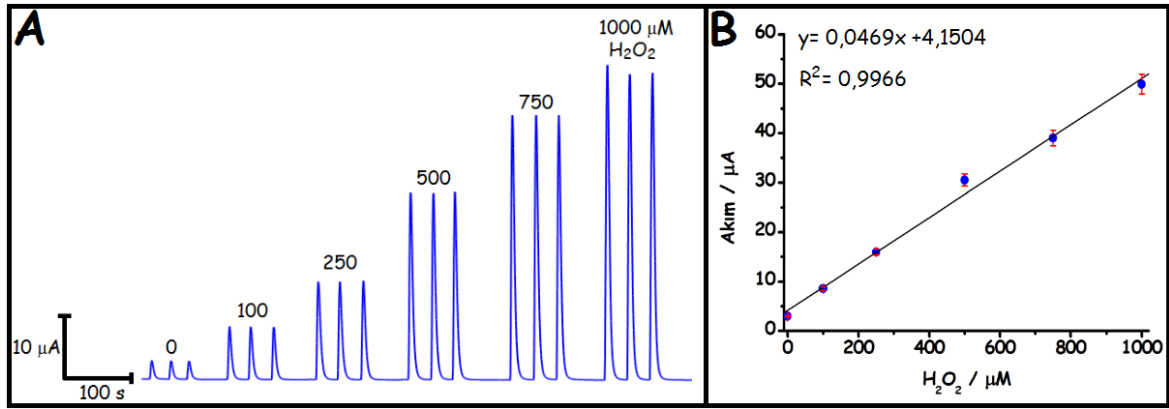
H ₂ O ₂ ’nin Yükseltgenme Pik Akımındaki Değişimler (%)					
Girişimci Molekül	Glukoz:Girişimci oranı				
	1:1	1:2	1:5	1:10	1:100
AA	+0,79 ±0,01	+28,6 ±0,14	+127 ±0,49	+522,0 ±1,14	+4917 ±17,0
DA	+49,0 ±0,14	+58,1 ±0,05	+103 ±0,21	+909 ±1,42	+1502 ±3,64
ÜA	+11,7 ±0,17	+40,4 ±0,04	+106 ±0,20	+196 ±0,23	-
SA	+0,89 ±0,12	+1,3 ±0,07	+2,5 ±0,09	-20,1 ±0,04	-28,9 ±0,05
GL	+2,7 ±0,07	+4,6 ±0,02	+12,5 ±0,07	+13,1 ±0,12	+59,5 ±0,17
SAL	+0,78 ±0,08	+1,2 ±0,10	+1,3 ±0,08	+2,0 ±0,07	+2,2 ±0,09
GLA	+4,7 ±0,02	+12,1 ±0,03	+12,2 ±0,10	+13,3 ±0,03	+13,0 ±0,08

Çizelge 4.2’deki sonuçlar göz önüne alındığında, 1:1 oranında AA ve ÜA’nın, 1:5 oranında SA’nın, 1:10 oranında GL’nin, 1:100 oranında GLA ve SAL’nin, H₂O₂’nin elektrokatalitik yükseltgenme akımına kayda değer bir etkisi görülmemiştir. H₂O₂’ye eşdeğer katları incelendiğinde DA haricinde diğer girişimcilerin elektrokatalitik yükseltgenme pik akımı etkisinin çok az olduğu görülmüştür. Elektrokimyasal sensör ve biyosensör tasarımında girişimci varlığında, H₂O₂’nin indirgenme/yükseltgenme pik akımına ~% 10 civarındaki değişimin sensörün seçiciliği açısından kabul edilebilir olduğu genel olarak bilinmektedir. Girişim çalışmalarından elde edilen sonuçlar ile birlikte bu durum dikkate alındığında, DA içermeyen örneklerde Au/p.PGE kullanılarak H₂O₂’nin seçici olarak tayininin gerçekleştirilebileceği düşünülmektedir.

4.1.1.5.5. Au/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan H₂O₂ Sensörünün Gerçek Örneğe Uygulanması

Saç boyaları, dezenfektanlar, ilaçlar ve diş macunları belli oranlarda H₂O₂ içerirler. Fakat yüksek dozajlarda insan sağlığı için zararlı olabilmektedir. Bu amaçla Au/p.PGE kullanılarak geliştirilen FI ampeometrik H₂O₂ sensörü, medikal uygulamalarda sıklıkla kullanılan BİKAR marka % 3 H₂O₂ içeren bir antiseptik çözeltilisine uygulanarak test

edilmiştir. Bu amaçla 1,0 mL antiseptik çözelti, 1/10000 oranında taşıyıcı çözelti (1,0 M KCl içeren 0,1 M NaOH) ile seyreltilmiş ve seyreltik örnek içerisinde 0, 100, 250, 500, 750 ve 1000 μM H_2O_2 içerecek şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve her bir çözeltinin FIA sistemine enjeksiyonuyla amperomogramları daha önce optimize edilen koşullar altında kaydedilmiştir (Şekil 4.17 A). Kaydedilen amperomogramlardan pik akımları hesaplanmış ve bu örnek için standart katma grafiği çizilmiş ve Şekil 4.17 B’de verilmiştir. Standart katma grafiğinden gerekli hesaplamalar yapılarak, antiseptik çözelti içerisindeki H_2O_2 0,884 M olarak bulunmuştur.



Şekil 4.17. A) Seyreltik örnek (1/10000 seyreltik) ve bu örnekte 100, 250, 500, 750 ve 1000 μM H_2O_2 içerecek şekilde hazırlanan standart çözeltilerinin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.13’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında) ve B) Elde edilen standart katma grafiği ($I(\mu\text{A}) = 0,0469 C(\mu\text{M}) + 4,1504$ ve $R^2 = 0,9966$)

Geliştirilen FI amperometrik H_2O_2 sensöründen elde edilen sonuçları karşılaştırmak amacıyla, literatürde bilinen ve H_2O_2 tayininde sıkça kullanılan permanganometrik titrasyon metodu kullanılarak da oksijenli suyun H_2O_2 içeriği analiz edilmiştir. Bu amaçla, oksijenli su örneği, önceden ayarlanmış KMnO_4 çözeltisiyle titre edilmiştir. Her iki metot ile sonuçlar bir tablo halinde verilmiştir (Çizelge 4.3). Sonuçlar incelendiğinde, FI amperometrik yöntem kullanılarak daha doğru ve duyar sonuçlar elde edildiği görülmüş ve tasarlanan sensörün H_2O_2 içeren örneklere başarıyla uygulanabileceği kanıtlanmıştır. Ayrıca, elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak Student t-testi ve önerilen yöntem ile permanganometrik titrasyon yöntemi arasındaki karşılaştırma varyans oranı, F-testi ile değerlendirildi. Boş ve alternatif hipotezler t testi için $H_0: X_{\text{ort}} = \mu$ ve $H_A: X_{\text{ort}} \neq \mu$ olarak tanımlanır, (X_{ort} ve μ sırasıyla ortalama ve gerçek veya kabul edilen değerlerdir).

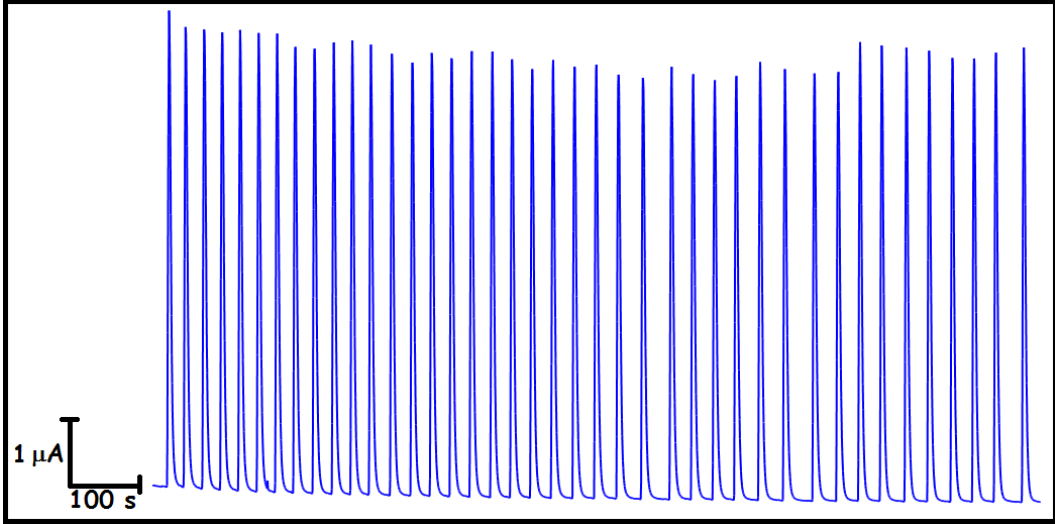
Çizelge 4.3. Antiseptik çözeltide tayin edilen H₂O₂'ye ait analiz sonuçları (n=5)

Antiseptik Çözeltideki Hesaplanan H ₂ O ₂ (% 3) Derişimi	Bulunan H ₂ O ₂ derişimi	
	Au/p.PGE kullanılarak FI Amperometrik Metod	Permanganometrik Titrasyon
0,882 M	0,884 M ±0,007 t _{den} : 0,64 (P: 0,05; 4)	0,876 M ±0,016 t _{den} : 0,84 (P: 0,05; 4)
	F _{den} : 5,22 (P: 0,05; 4)	
t _{kritik} : 2,78 (P: 0,05, 4), F _{kritik} : 6,39 (P: 0,05, 4, 4) (Douglas ve ark., 1988)		

Önerilen elektrot kullanılarak antiseptik çözelti için t_{den} 0,64 olarak bulunmuştur; bunlar, 4 serbestlik derecesi için % 95 güven derecesinde t_{kritik} değerden (2,78) daha küçüktür (Douglas ve ark., 1988). Böylece sıfır hipotezi kabul edilebilir ve X_{ort} ve μ arasında % 95 güven düzeyinde anlamlı bir fark olmadığı söylenebilir. Buna ek olarak, null ve alternatif hipotezler F testi için H₀: s²_A = s²_B ve H_A: s²_A ≠ s²_B olarak tanımlanmıştır (sırasıyla s²_A ve s²_B, önerilen ve permanganometrik yöntemlerin varyanslarıdır). F_{den}, 5,22, F_{kritik} değerinin (P = 0,05, 4, 4) 6,39'dan daha az olduğu bulunmuştur (Douglas ve ark. 1988). Dolayısıyla, sıfır hipotezi kabul edilebilir ve F testleri, her iki örnek için de iki yöntemin standart sapmaları arasında önemli bir fark olmadığını göstermiştir.

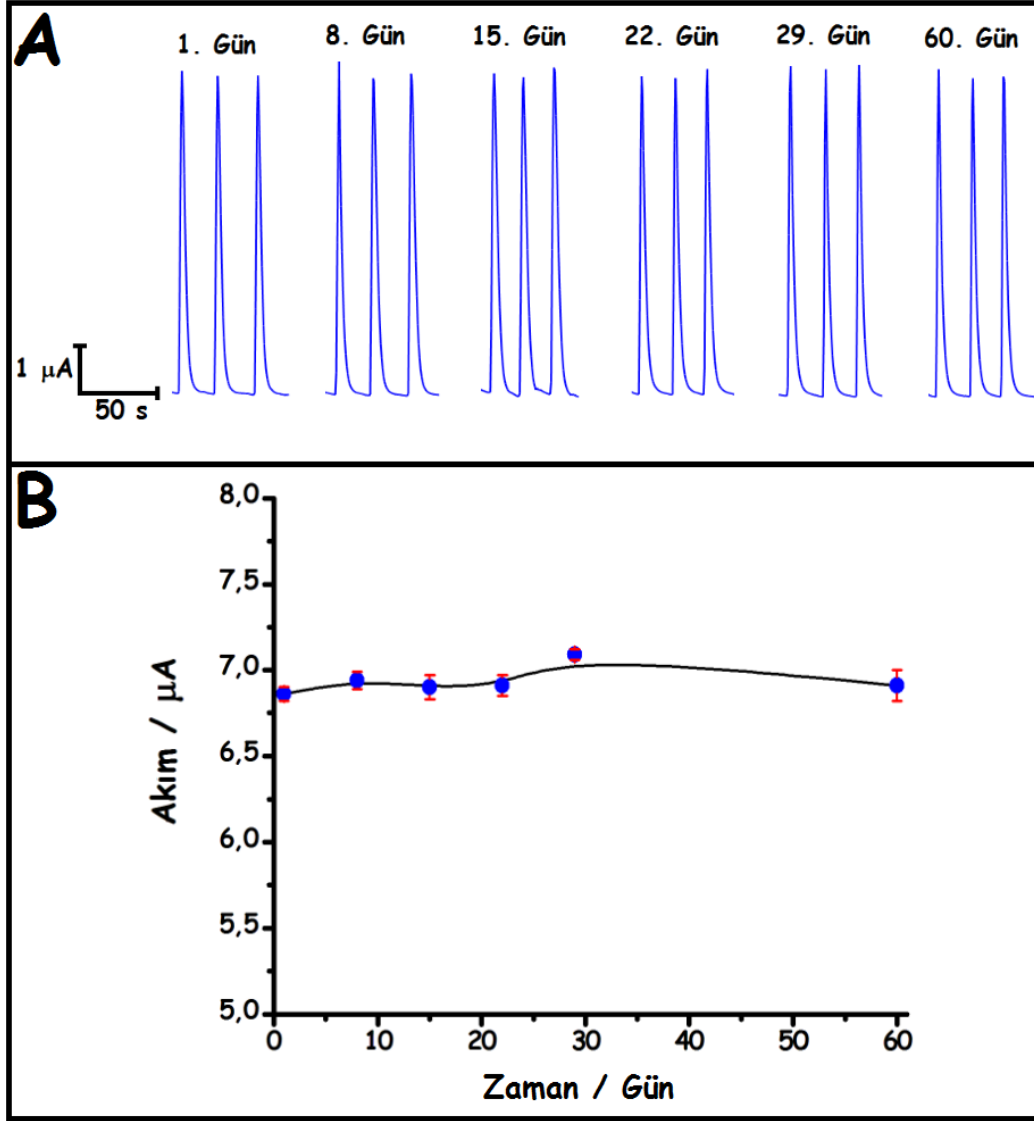
4.1.1.5.6. Au/p.PGE'nin Tekrarlanabilirliğinin ve Kararlılığının Test Edilmesi

Tasarlanan sensör, gerçek örneğe başarıyla uygulandıktan elektrodun tekrarlanabilirliği ve kararlılığı test edilmiştir. Bu amaçla H₂O₂ sensörünün yüzey aktifliği, H₂O₂ çözeltisinin sisteme tekrarlanan enjeksiyonları yapılarak test edilmiştir. 100 μM H₂O₂ çözeltisinin 41 kez ortama enjeksiyon edilmesi ile elde edilen amperogramlardan görüldüğü üzere pik akımlarında kayda değer bir değişim (7,00 ±0,21 μA ya da % ±3,0 bağıl standart sapması, RSD) gözlenmemiştir (Şekil 4.18). Sonuç olarak, elektrodun yüzey etkinliği ve tekrarlanabilirliği oldukça yüksek olup, H₂O₂ çözeltisinin her enjeksiyonunda kararlı yanıtlar vermiştir.



Şekil 4.18. Au/p.PGE’de 100 µM H₂O₂ çözeltisinin ardışık 41 kez enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.13’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)

Ayrıca Au/p.PGE’nin günler arası kararlılığı da araştırılmış olup, bu amaçla 100 µM H₂O₂ çözeltisinin sisteme günler arası üçer kez enjeksiyon edilmesiyle FIA sisteminde kaydedilen amperomogramlar Şekil 4.19 A’da verilmiştir. Amperomogramlardan, pik akım değerleri hesaplanarak akımın zamana (gün) bağlı değişim grafiği elde edilmiştir (Şekil 4.19 B). Amperomogramlar ve akım-zaman grafiği incelendiğinde, Au/p.PGE’nin 100 µM H₂O₂’ye verdiği günler arası yanıtların birbirine oldukça yakın olduğu görülmekte olup, günler arasında H₂O₂’ye kararlı amperometrik yanıtlar alınmıştır. Kararlı yanıtların, yüzeye kaplanan AuNP’lerin üstün fiziksel ve mekanik özelliklerinden ileri geldiği düşünülmektedir. Sonuç olarak, H₂O₂’nin FI amperometrik tayini için tasarlanan Au/p.PGE’nin kararlılığının oldukça yüksek olduğu görülmektedir.



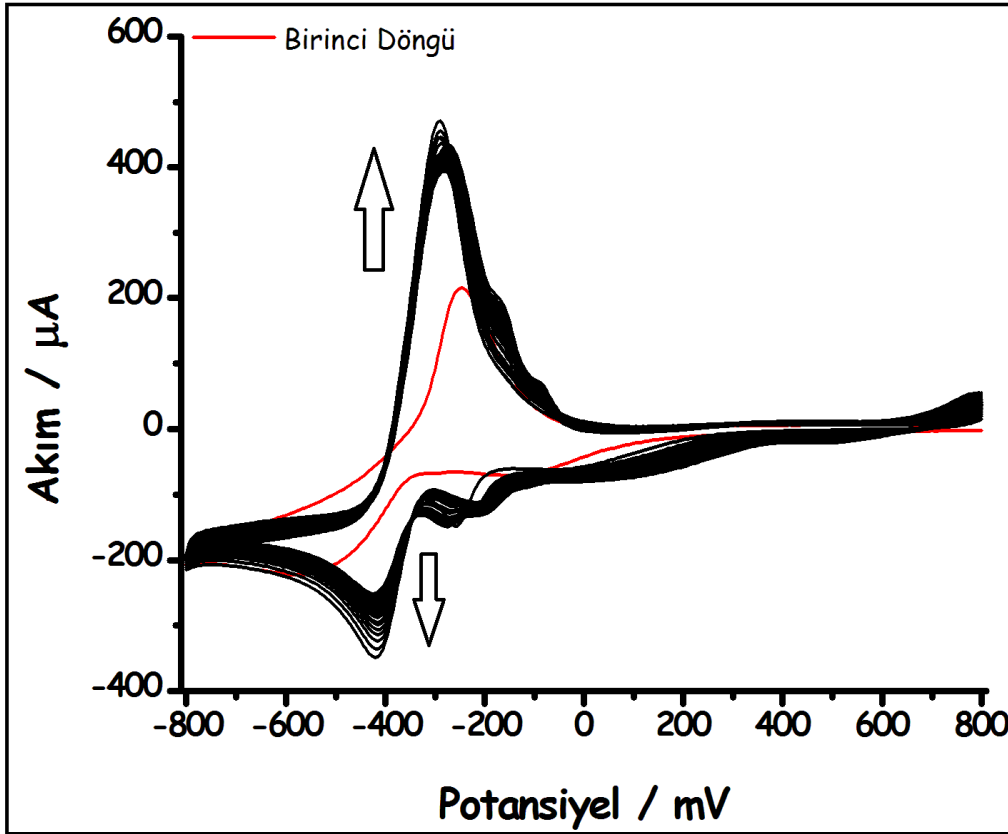
Şekil 4.19. A) Au/p.PGE’de 100 μM H_2O_2 çözeltisinin günler arası üçer kez enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları ve B) akımın zamana (gün) bağlı değişimi (Şekil 4.13’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)

4.1.2. Pt/p.PGE ile Gerçekleştirilen Çalışmalar

4.1.2.1. PtNP’lerin p.PGE Yüzeyine Elektrokimyasal Biriktirilmesi

Yalın ve koşullandırılmış elektrot (p.PGE) yüzeyine, deneysel prosedürde bahsedildiği gibi H_2PtCl_6 ’nın farklı döngü sayılarında (5, 10, 20, 30, 40 ve 50 döngü) CV’leri kaydedilerek elektrokimyasal indirgenmesi yoluyla Pt nanoparçacıklar biriktirilmiştir. 30 döngü sayısı kullanılarak elde edilen CV, Şekil 4.20’de verilmiştir. Bu voltammogramın ilk döngüsünde -260 mV’da anodik bir pik ve -500 mV’da katodik bir pik gözlenmiş ve ikinci döngüde bu pikler sırasıyla -290 ve -420 mV’a kaymış ve döngü sayısının artmasıyla da bu piklerin akımları giderek artmıştır. Bunun dışında döngü

sayısının artmasıyla anodik bölgede -80 ve -155 mV'da, katodik bölgede ise -200 ve -285 mV'da yeni pikler gözlenmiştir. Voltammogramda döngü sayısının artmasıyla gözlenen bu değişiklikler, PtNP'lerin p.PGE yüzeyinde elektrokimyasal olarak biriktirildiğini yansıtmaktadır. Voltammogramlar incelendiğinde, -290 mV'ta ve -420 mV'ta görülen piklere ait redoks tepkimeleri sırasıyla $\text{PtCl}_6^{2-} \rightarrow \text{PtCl}_4^{2-}$ 'ye (I) ve $\text{PtCl}_4^{2-} \rightarrow \text{Pt}^0$ 'a (II) şeklinde olduğu literatürde bahsedildiği gibi indirgenmenin basamaklar halinde gerçekleştiği belirlenmiştir (Wang ve Lin, 2005; Anik ve ark., 2016).

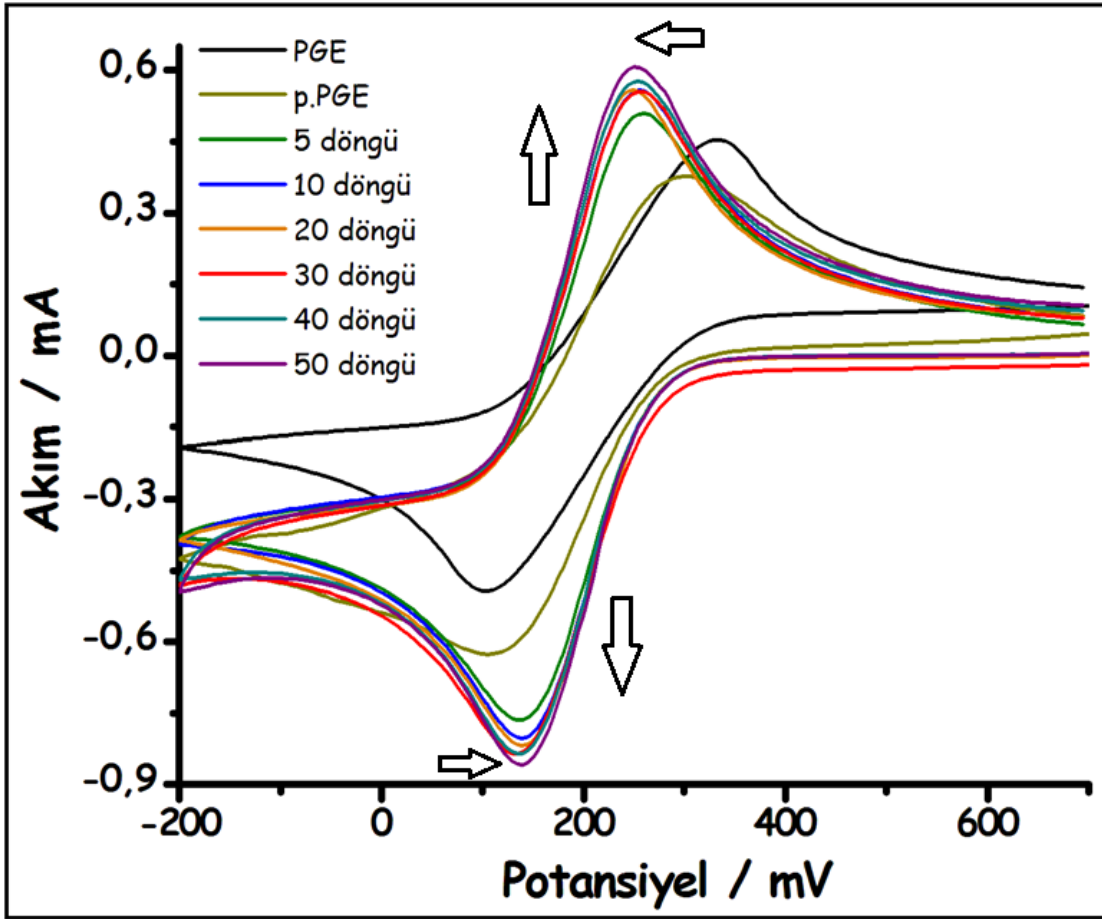


Şekil 4.20. p.PGE'nin 1,0 mM H_2PtCl_6 içeren Ar ile doyurulmuş 0,10 M KCl'de ardışık 30 döngü ile kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50 mV/s)

4.1.2.2. Pt/p.PGE'lerin Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

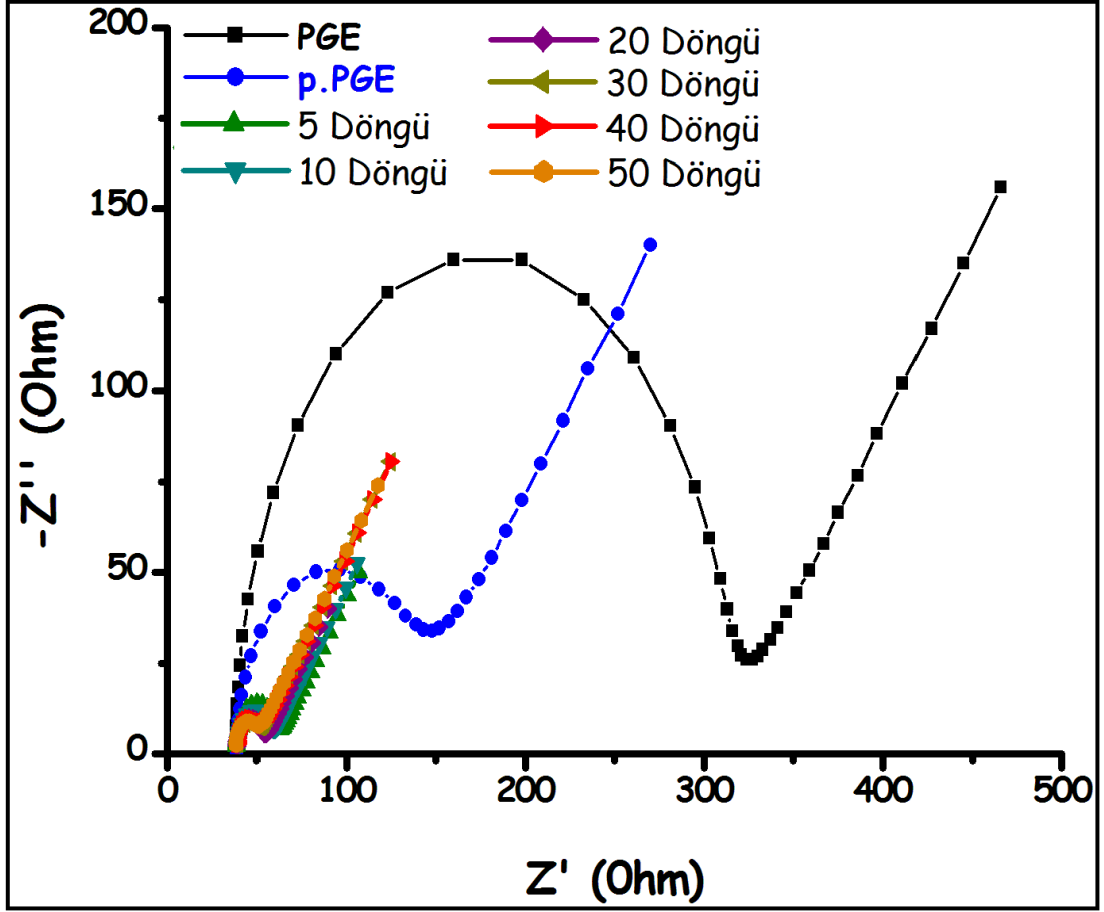
Au/p.PGE'de olduğu gibi, elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayılı CV'lerin kaydedilmesiyle elde edilen Pt/p.PGE'lerin de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks probu ortamında hem CV'leri hem de impedans eğrileri kaydedilmiştir. Elde edilen CV'ler Şekil 4.21'de verilmiştir. Döngü sayısının artmasıyla elde edilen elektrotlarda Pt yoğunluğu arttığından $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çiftine ait piklerin potansiyellerinde kayma ve pik akımlarında artış gözlenmiştir. Ancak 30 döngü sayısından sonraki pik akım

yüksekliklerinde çok önemli değişiklikler olmamıştır. Farklı döngü sayılarında hazırlanan herbir modifiye elektrot için anodik ve katodik pike ait potansiyel ve akım değerleri Çizelge 4.4’de verilmiştir. Pik akımlarının döngü sayısı ile artmasının nedeni ise yüzeye biriken Pt yoğunluğunun artmasına ve yüzeye kaplanan PtNP’lerin iletken özelliğine bağlanmıştır.



Şekil 4.21. PGE, p.PGE ve elektrobiriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Pt/p.PGE’lerin 0,01 M $K_3[Fe(CN)_6]$, 0,01 M $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 0,1 M KCl destek çözeltisinde kaydedilen CV’leri (Tarama hızı: 50 mV/s)

Pt/p.PGE’lerin Şekil 4.3’deki devre modeline göre kaydedilen impedans eğrileri ise Şekil 4.22’de verilmiştir. Au/p.PGE’ye benzer şekilde elektrokimyasal biriktirme esnasında kullanılan döngü sayısının artmasıyla R_{et} değerleri azalmış ve iletkenlik biriken Pt yoğunluğundan dolayı artmıştır. Yalnız PGE ile birlikte herbir elektrot için elde edilen R_{et} değerleri Çizelge 4.4’de verilmiştir.



Şekil 4.22. PGE, p.PGE ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Pt/p.PGE'lerin 0,01 M $K_3[Fe(CN)_6]$, 0,01 M $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 0,1 M KCl destek çözeltisinde kaydedilen impedans eğrileri (Uygulanan frekans aralığı: 100000 Hz – 0,1 Hz; uygulanan potansiyel: +170 mV; sinüsodiyal sinyal: 5 mV)

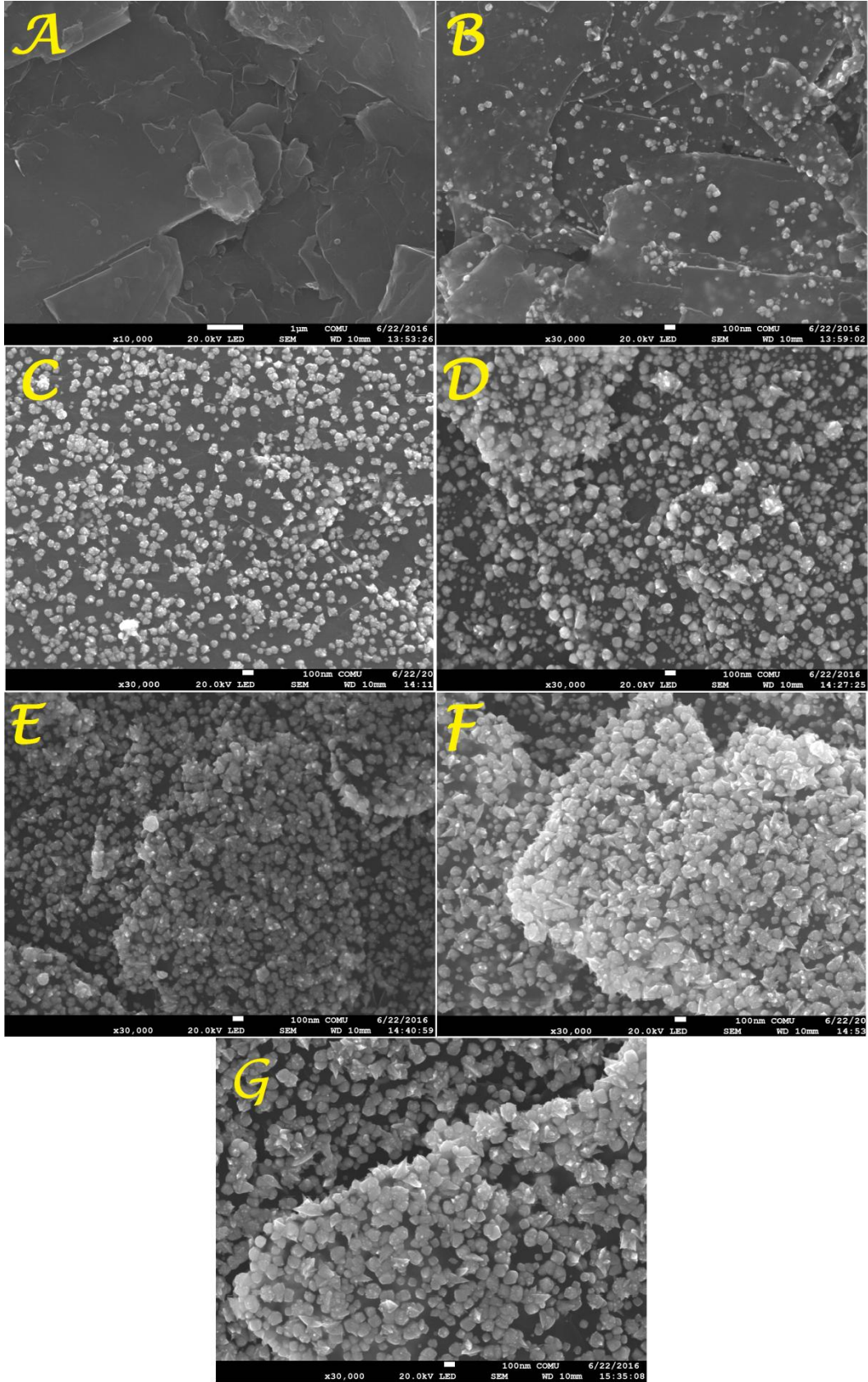
Çizelge 4.4. Yalın PGE, p.PGE ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Pt/p.PGE'lerin $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks probu ortamında kaydedilen impedans eğrileri ve CV'lerinden çıkarılan veriler (n=3)

Elektrot	E_a (mV)	E_k (mV)	ΔE_p (mV)	I_{pa} (μA)	I_{pk} (μA)	R_{et} (Ohm)
PGE	335	100	235	$470 \pm 1,0$	$443 \pm 2,4$	$285 \pm 6,4$
p.PGE	305	105	200	$519 \pm 5,2$	$445 \pm 2,4$	$114 \pm 0,6$
Pt/p.PGE /5 Döngü	255	135	120	$679 \pm 2,5$	$622 \pm 5,4$	$37 \pm 0,7$
Pt/p.PGE /10 Döngü	255	135	120	$719 \pm 3,3$	$654 \pm 5,8$	$32 \pm 0,3$
Pt/p.PGE /20 Döngü	255	135	120	$731 \pm 1,9$	$661 \pm 1,0$	$31 \pm 0,5$
Pt/p.PGE /30 Döngü	255	135	120	$738 \pm 5,4$	$681 \pm 6,1$	$22 \pm 0,3$
Pt/p.PGE /40 Döngü	255	135	120	$742 \pm 1,6$	$685 \pm 2,6$	$19 \pm 0,3$
Pt/p.PGE /50 Döngü	255	135	120	$745 \pm 3,1$	$703 \pm 2,5$	$17 \pm 1,0$

4.1.2.3. Pt/p.PGE'lerin Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesi

Elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayılı CV'lerin kaydedilmesiyle hazırlanan Pt/p.PGE'lerin, p.PGE ile birlikte kaydedilen SEM görüntüleri Şekil 4.23'de verilmiştir. Döngü sayısının artmasıyla yüzeyde küresel biçimde biriken PtNP'lerin yoğunluğunun arttığı SEM görüntülerinden görülmektedir. Daha önceki bölümde redoks probu ortamında kaydedilen CV'ler ve impedans eğrilerinden elde edilen verilerin SEM görüntüleri ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

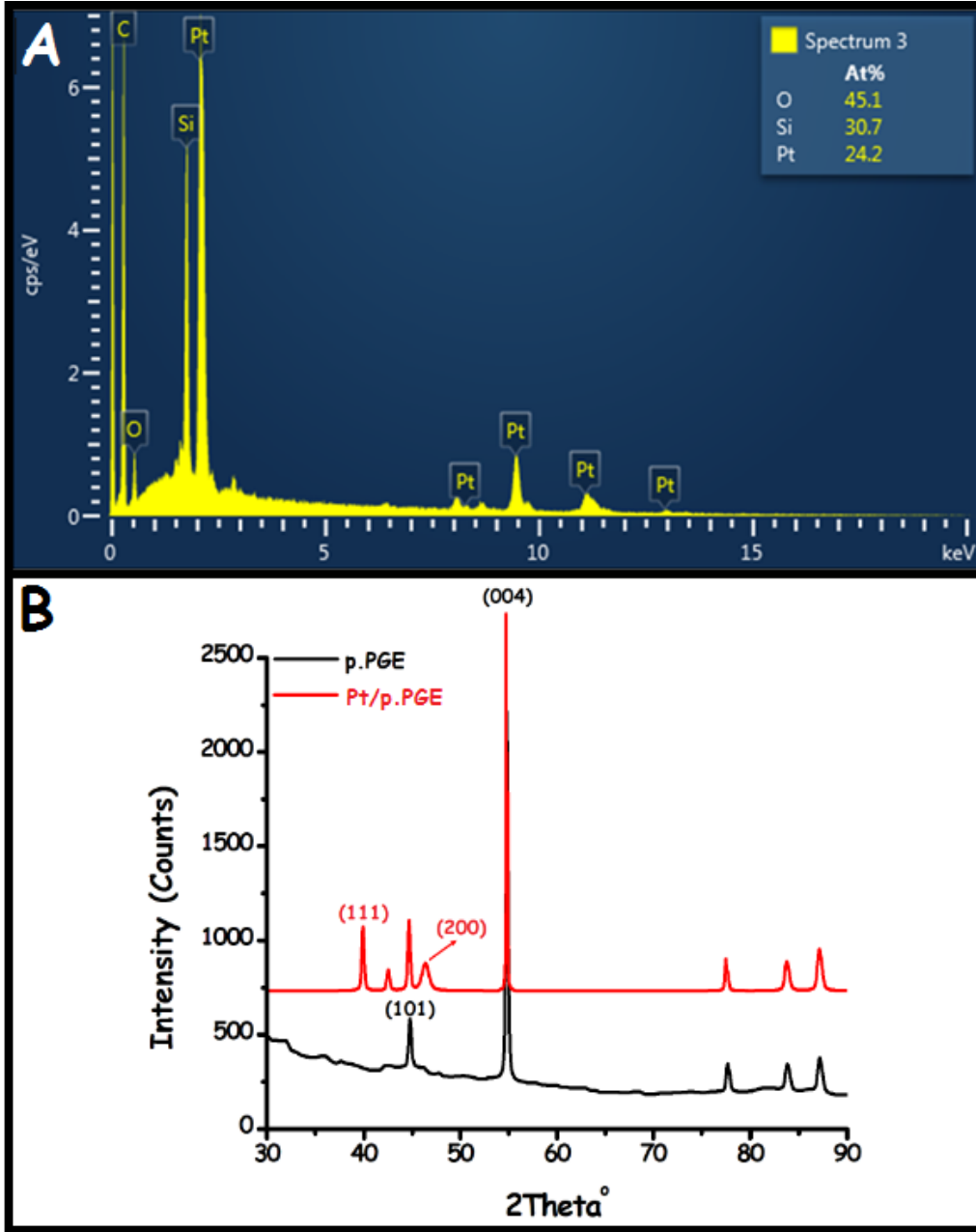




Şekil 4.23. p.PGE (A, 1 μm x10000) ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayısının kullanımıyla elde edilen PtNP modifiye elektrotların SEM görüntüleri: B) 5, C) 10, D) 20, E) 30, F) 40 ve G) 50 döngü, 1 μm x30000)

Elektrokimyasal biriktirme esnasında 30 döngü ile elde edilen Pt/p.PGE'nin EDX spektrumu ve bu elektrot ile birlikte p.PGE'nin XRD spektrumları Şekil 4.24'de verilmiştir. EDX spektrumunda görüldüğü gibi Pt/p.PGE için Pt % 24,2, O % 45,1 ve Si % 30,7 bulunmuş (Şekil 4.24 A) ve Si ile O'nin muhtemelen PGE'deki kilden kaynaklandığı, diğer bir olasılık ise Pt'nin PtO olarak biriktiği sonucuna varılmıştır. p.PGE ve Pt/p.PGE'nin XRD spektrumları (Şekil 4.24 B) karşılaştırıldığında ise modifiye elektrodun spektrumunda 2θ değeri olarak $40,0^\circ$ ve $46,45^\circ$ 'de konumlanmış piklerin Pt (1 1 1) ve Pt (2 0 0) yüzey kübik kristal (face cubic crystal, fcc) yapılarına ait olduğu belirlenmiş olup, literatürde verilen değerlerle uyum içerisinde (Sen ve Ark., 2014). Gerçekleştirilen tüm bu analiz sonuçları, PtNP'lerin başarılı bir şekilde p.PGE yüzeyine biriktiğini göstermektedir.



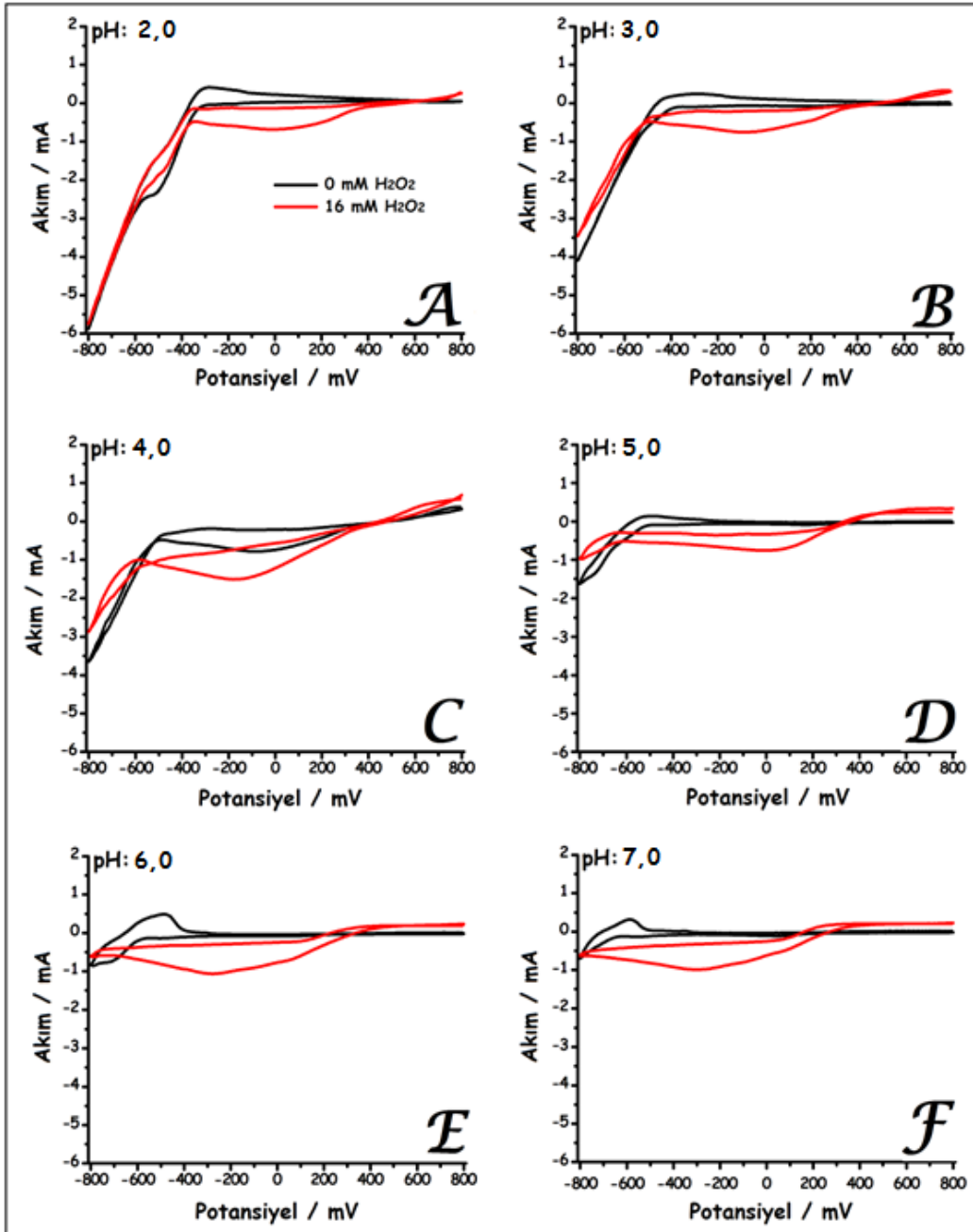


Şekil 4.24. Elektrokimyasal biriktirme esnasında 30 döngü ile elde edilen Pt/p.PGE'nin (A) EDX ve p.PGE (siyah) ve Pt/p.PGE'nin (kırmızı) (B) XRD spektrumları

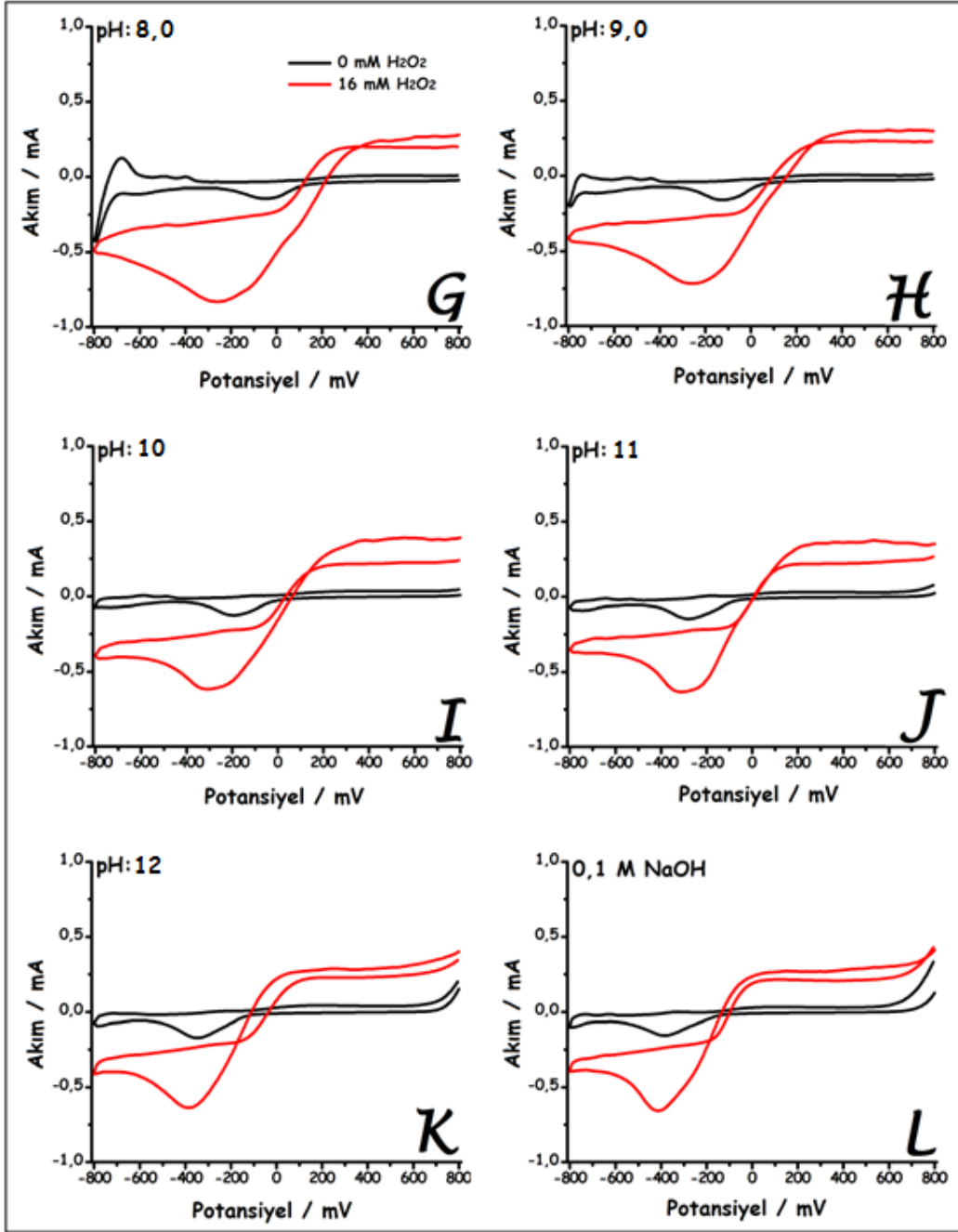
4.1.2.4. Pt/p.PGE'de H_2O_2 'nin Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi

Au/p.PGE'de olduğu gibi bu elektrotla da optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlk optimizasyonda, elektrokimyasal biriktirme esnasında 30 döngü ile hazırlanan Pt/p.PGE kullanılarak farklı pH ortamlarında H_2O_2 'nin CV'leri kaydedilmiş ve pH optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.25'de görüldüğü gibi asidik pH değerlerinde H_2O_2 'nin anodik ve katodik piklerinin çok belirgin gözlenmediği, bu piklerin Au/p.PGE'de olduğu gibi bazik bölgelerde daha belirginleştiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla bundan

sonraki çalışmalarda 0,1 M NaOH'in destek elektrolit olarak kullanılmasına karar verilmiştir.



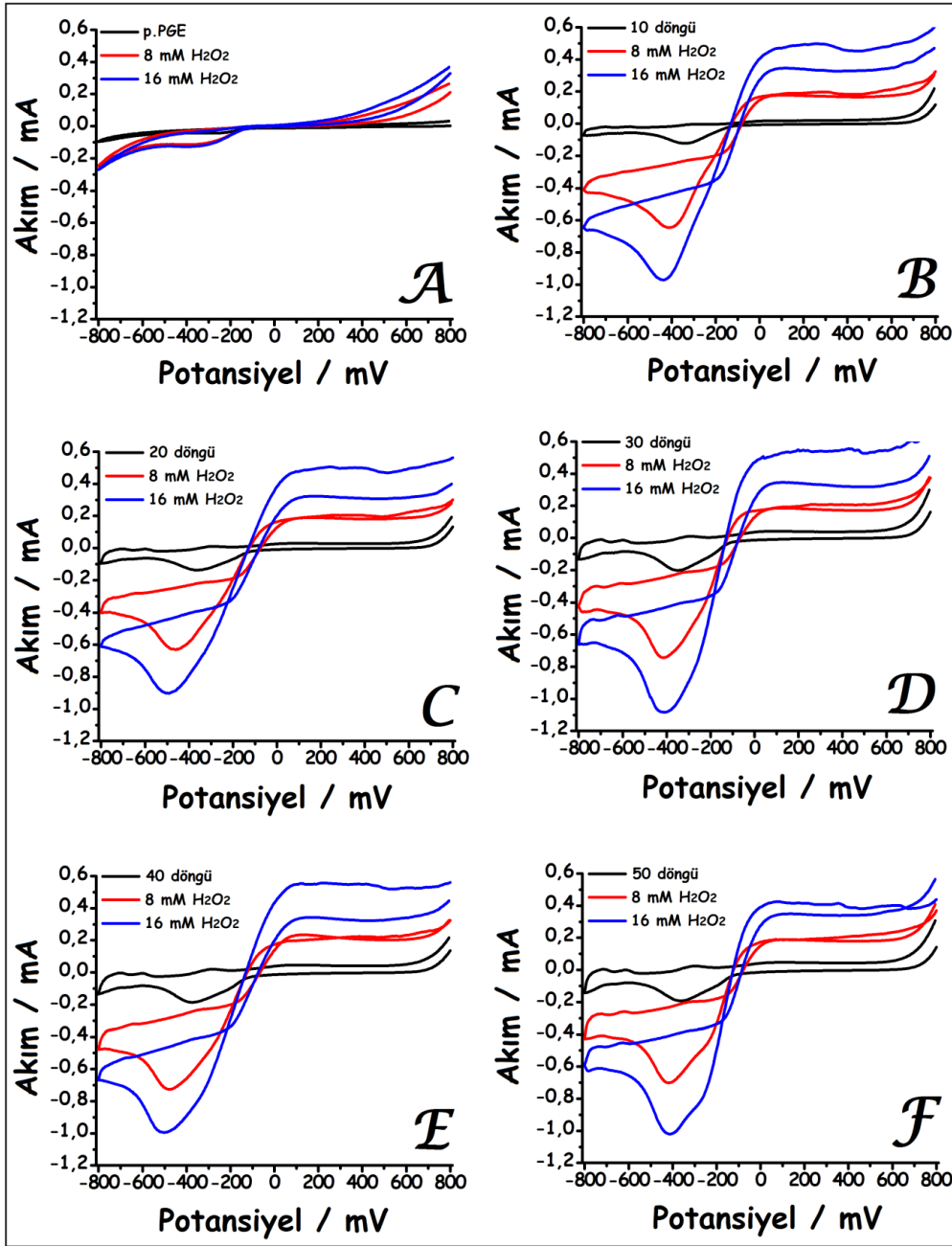
Şekil 4.25. Pt/p.PGE'nin pH'sı 2 ile 12 arasında değişen BRBS'de ve 0,1 M NaOH çözeltisinde (siyah voltammogramlar), 16 mM H₂O₂ varlığında (kırmızı voltammogramlar) kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50 mV/s)



Şekil 4.25'in devamı

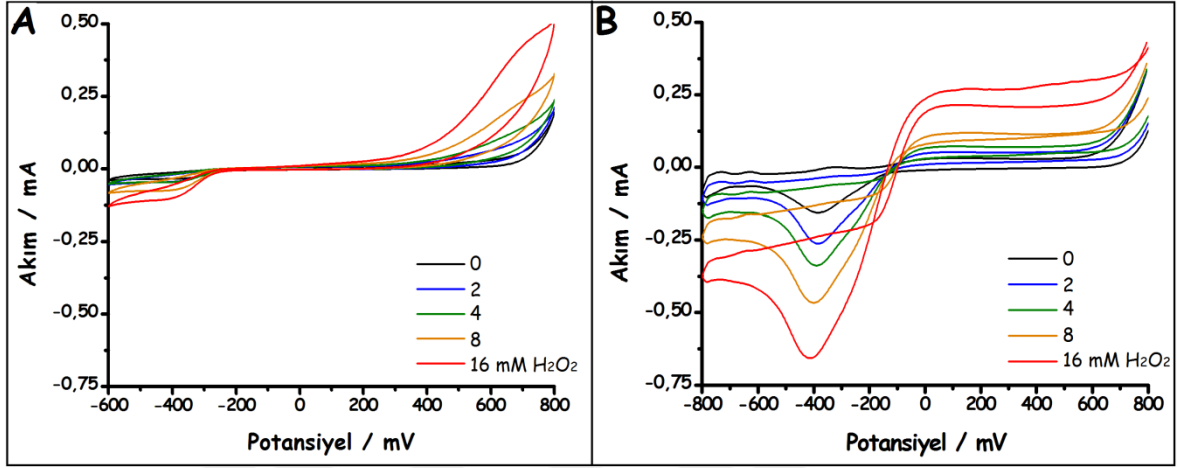
Bir sonraki aşamada elektrokimyasal biriktirme esnasındaki döngü sayısına göre elde edilen Pt/p.PGE'lerin H_2O_2 içeren 0,1 M NaOH ortamındaki CV'leri kaydedilmiş (Şekil 4.26) ve döngü sayısı optimize edilmiştir. Yalın ve koşullandırılmış elektrotta H_2O_2 'nin indirgenme pikleri ve yükseltgenme pikleri sırasıyla -400 ve +700 mV'da gözlenmiş (Şekil 4.26 A), H_2O_2 'nin ortamdaki derişimi arttıkça katodik pik akımının şiddetinde değişme olmamakla birlikte, anodik pik akımında az da olsa bir artış gözlenmiştir. Diğer taraftan, döngü sayısına bağlı kaydedilen Pt/PGE'lerin CV'lerinde ise H_2O_2 'ye ait anodik pik 0

mV'a kadar kaymış ve pik akımı oldukça artmıştır. Katodik pik potansiyelinde ise bir değişme olmamakla birlikte pik akımında önemli derecede bir artış gözlenmiştir. Bu değişimler 30 döngüye kadar devam etmiş ve bu döngüden sonra çok fazla değişmemiştir. Dolayısıyla bundan sonraki çalışmalarda 30 döngü sayısı ile elde edilen Pt/p.PGE'lerin kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.26. p.PGE (A) ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayılarında (10 (B), 20 (C), 30 (D), 40 (E) ve 50 (F)) hazırlanan Pt/p.PGE'lerin, 0,10 M KCl içeren 0,10 M NaOH çözeltisinde (siyah voltammogramlar), 8 mM (kırmızı voltammogramlar) ve 16 mM (mavi voltammogramlar) H₂O₂ varlığında kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50mV/s)

Yalın ve koşullandırılmış (p.PGE) ve elektrokimyasal biriktirme esnasında 30 döngü ile elde edilmiş Pt/p.PGE'nin 0,10 M KCl içeren 0,10 M NaOH çözeltisinde artan H₂O₂ derişimine bağı CV'leri de kaydedilmiş ve Şekil 4.27'de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi H₂O₂'nin derişiminin artmasıyla Pt/p.PGE'de sırasıyla -400 ve 0 mV'da gözlenen katodik ve anodik piklerin orantısal olarak arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.27. A) p.PGE ve B) Pt/p.PGE'nin 0,1 M KCl içeren 0,1 M NaOH destek çözeltisinde artan H₂O₂ derişimine (0, 2, 4, 8, ve 16 mM) bağı olarak kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50 mV/s)

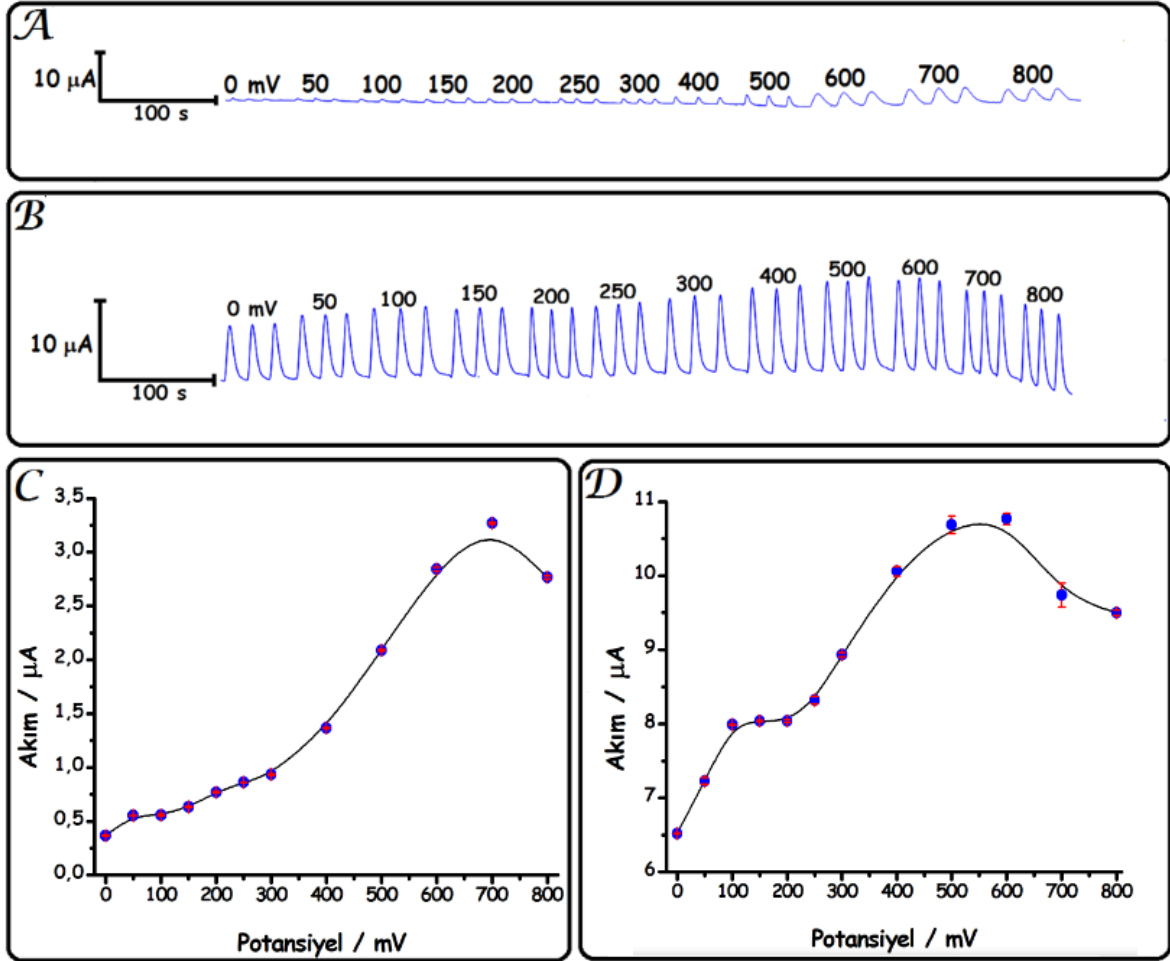
4.1.2.5. Pt/p.PGE ile FIA Sisteminde Gerçekleştirilen Çalışmalar

Au/pPGE'de olduğu gibi hem uygulama potansiyeli hem de akış hızı Pt/p.PGE için optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmalarından sonra analitiksel parametrelerin belirlenmesi, seçicilik, gerçek örnek uygulamaları ve kararlık çalışmaları bu elektrot için gerçekleştirilmiştir.

4.1.2.5.1. Uygulama Potansiyelinin Belirlenmesi

Hem p.PGE hem de Pt/p.PGE'de 100 μ M H₂O₂'nin FIA sistemine enjeksiyonuyla farklı uygulama potansiyellerinde kaydedilen amperogramlar ve uygulama potansiyeline karşı akım grafikleri Şekil 4.28'de verilmiştir. Pt/p.PGE'de, tüm potansiyelerde p.PGE'ye göre daha yüksek akımlar elde edilmiştir. Her ne kadar Pt/p.PGE'de 500-600 mV gibi yüksek potansiyel değerlerinde H₂O₂'nin yükseltgenmesine ait maksimum akım elde edilse de, + 100 mV uygulama potansiyeli olarak seçilmiştir. Çünkü akım 0 mV'dan 100 mV'a kadar orantılı artmış ve daha sonra 250 mV'a kadar sabit kalmış ve daha sonrasında yine orantısal artmıştır. Ayrıca yüksek uygulama

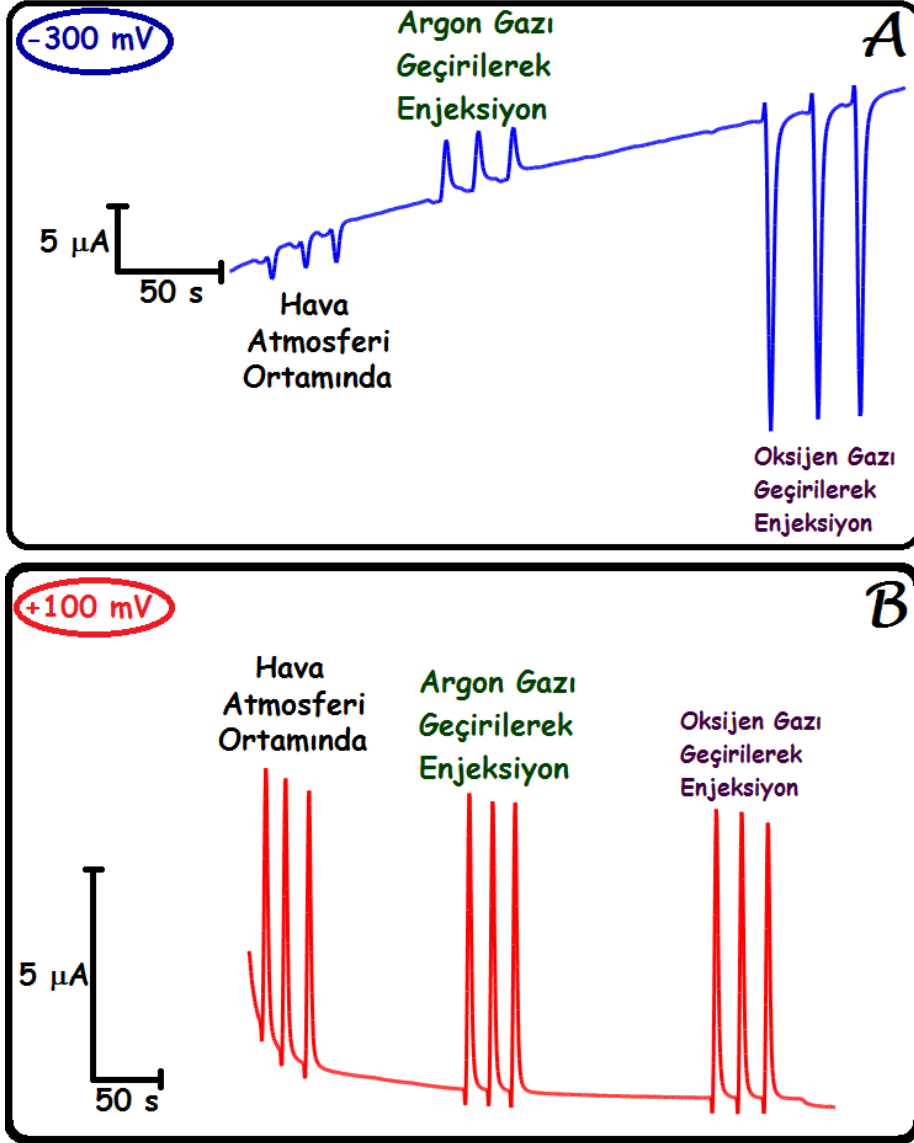
potansiyellerinde, biyolojik açıdan önemli bileşiklerin (DA, AA vb.), analitin amperometrik yanıtına olası girişim etkileri ve zemin akımının artması da söz konusudur. Buna ilâveten +100 mV uygulama potansiyelinde her iki elektrodun verdiği akımlar birbirine oranlandığında, Pt/p.PGE'nin p.PGE'ye göre yaklaşık 14 kat daha yüksek amperometrik yanıt verdiği görülmektedir.



Şekil 4.28. p.PGE (A ve C) ve Pt/p.PGE'nin (B ve D) farklı uygulama potansiyel değerlerinde $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 'nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (A ve B) (Taşıyıcı çözelti: Ar ile doyurulmuş $1,0 \text{ M}$ KCl ihtiva eden $0,1 \text{ M}$ NaOH çözeltisi; akış hızı: $2,0 \text{ mL/dk}$; örnek kolonunun hacmi: $100 \mu\text{L}$; kolon uzunluğu: 10 cm) ve bu amperomogramlardan elde edilen akım-potansiyel değişim grafikleri (C ve D)

Au/p.PGE'de olduğu gibi H_2O_2 'nin Pt/p.PGE'de elektrokatalitik indirgenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, hava atmosferi altında, O_2 ve Ar ile doyurulmuş ortamlarda, -300 mV uygulama potansiyelinde $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 'nin

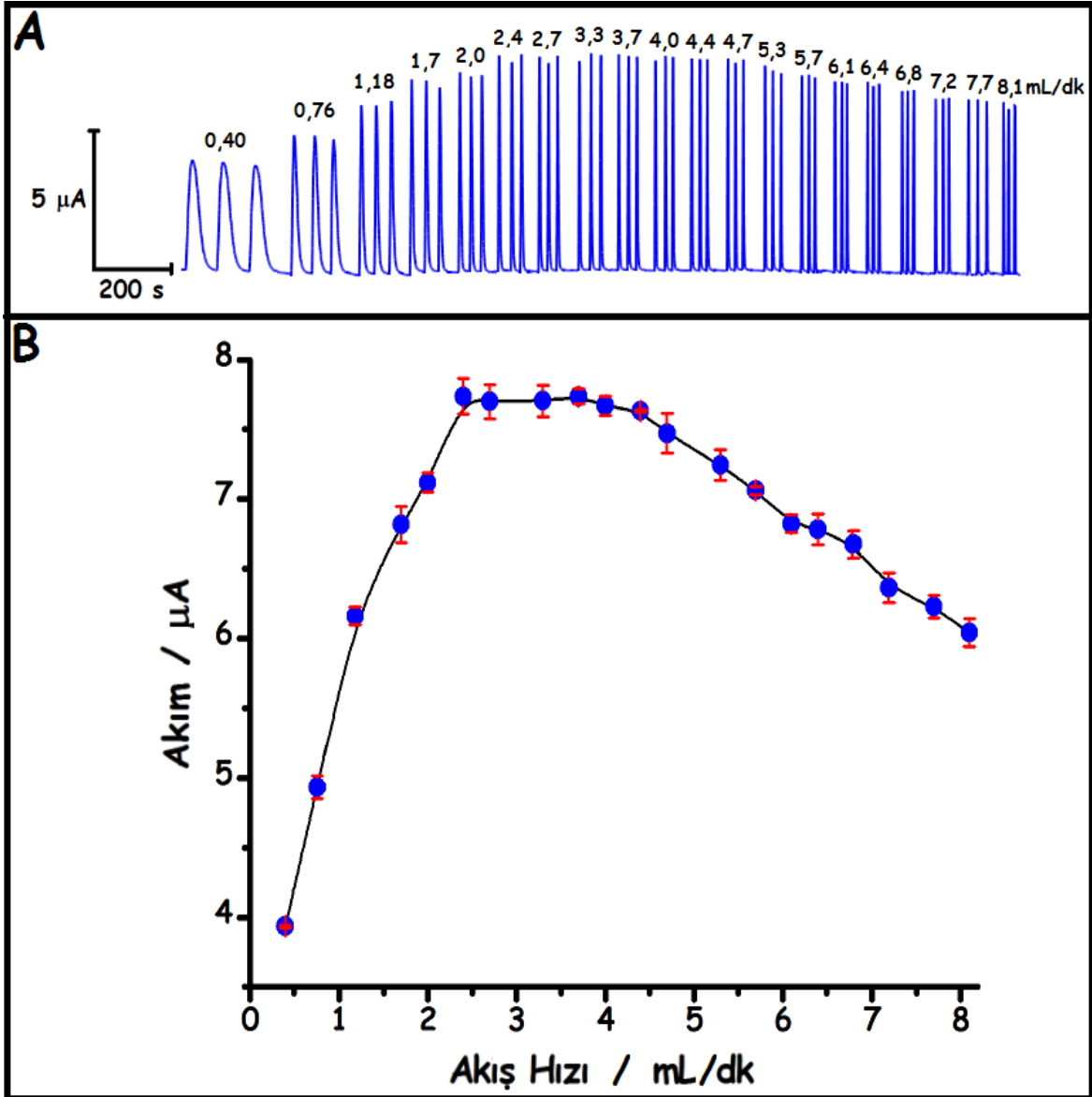
enjeksiyonuyla FI amperomogramlar kaydedilmiş ve Şekil 4.29 A'da verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi, bu elektrot kullanımında da O_2 'nin, H_2O_2 'nin indirgenmesine etki ettiği, ancak +100 mV'da kaydedilen amperomogramlara (Şekil 4.29 B) göre yükseltgenmeye O_2 'nin herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla, Pt/p.PGE'de de H_2O_2 'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine bağlı olarak FIA çalışmalarına devam edilmiştir.



Şekil 4.29. Pt/p.PGE kullanılarak -300 mV (A) ve +100 mV (B) uygulama potansiyellerinde hava atmosferi, Ar ve O_2 ile ayrı ayrı doyurulmuş akış çözeltisi ortamında 100 μM H_2O_2 'nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Taşıyıcı çözelti: Ar ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren 0,10 M NaOH; akış hızı: 2,0 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: 100 μL ; kolon uzunluğu: 10 cm)

4.1.2.5.2. Taşıyıcı Çözeltinin Akış Hızının Belirlenmesi

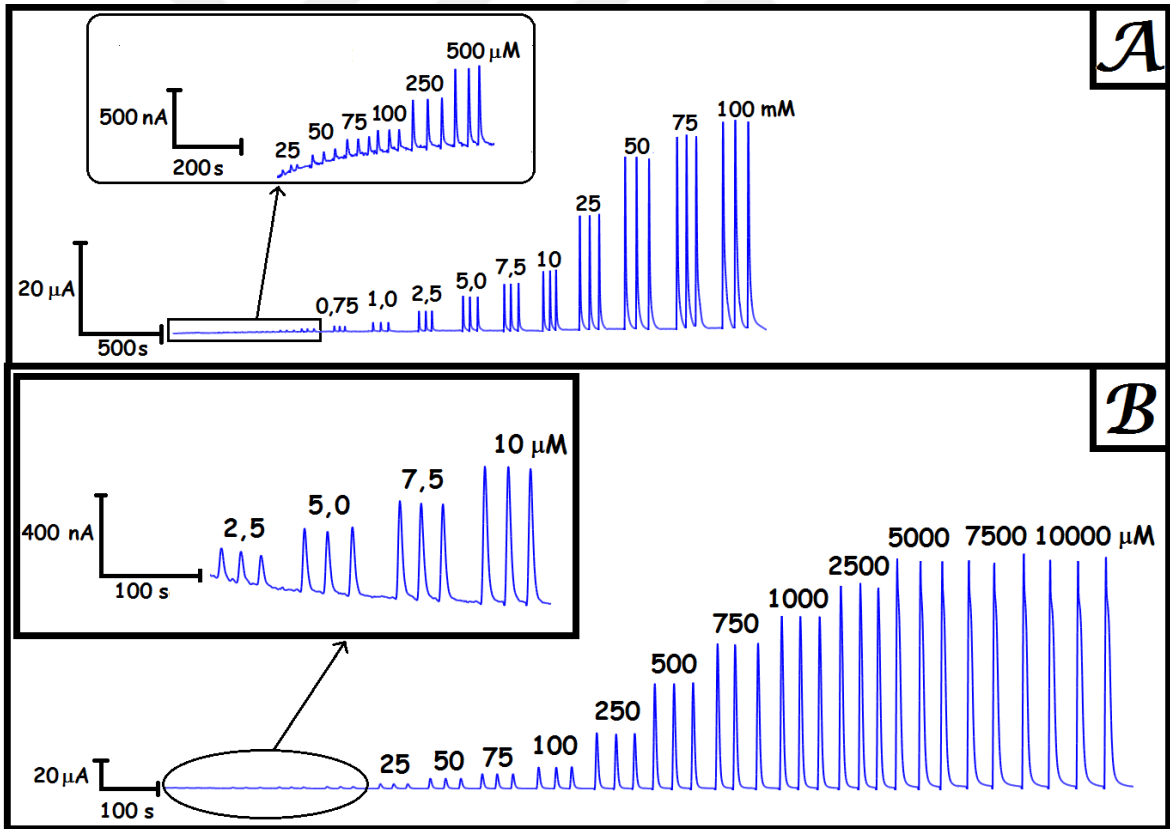
Şekil 4.30 ise Pt/p.PGE’de 100 μM H_2O_2 ’nin FIA sisteminde farklı akış hızlarında kaydedilen amperomogramları ve akış hızına bağlı akım grafiğini göstermektedir. Şekillerden görüldüğü gibi H_2O_2 ’nin elektrokatalitik yükseltgenmesine en iyi amperometrik yanıtın alındığı akış hızı 2,4 mL/dk olarak belirlenmiş olup, sonraki çalışmalara bu akış hızı değeri kullanılarak devam edilmiştir.



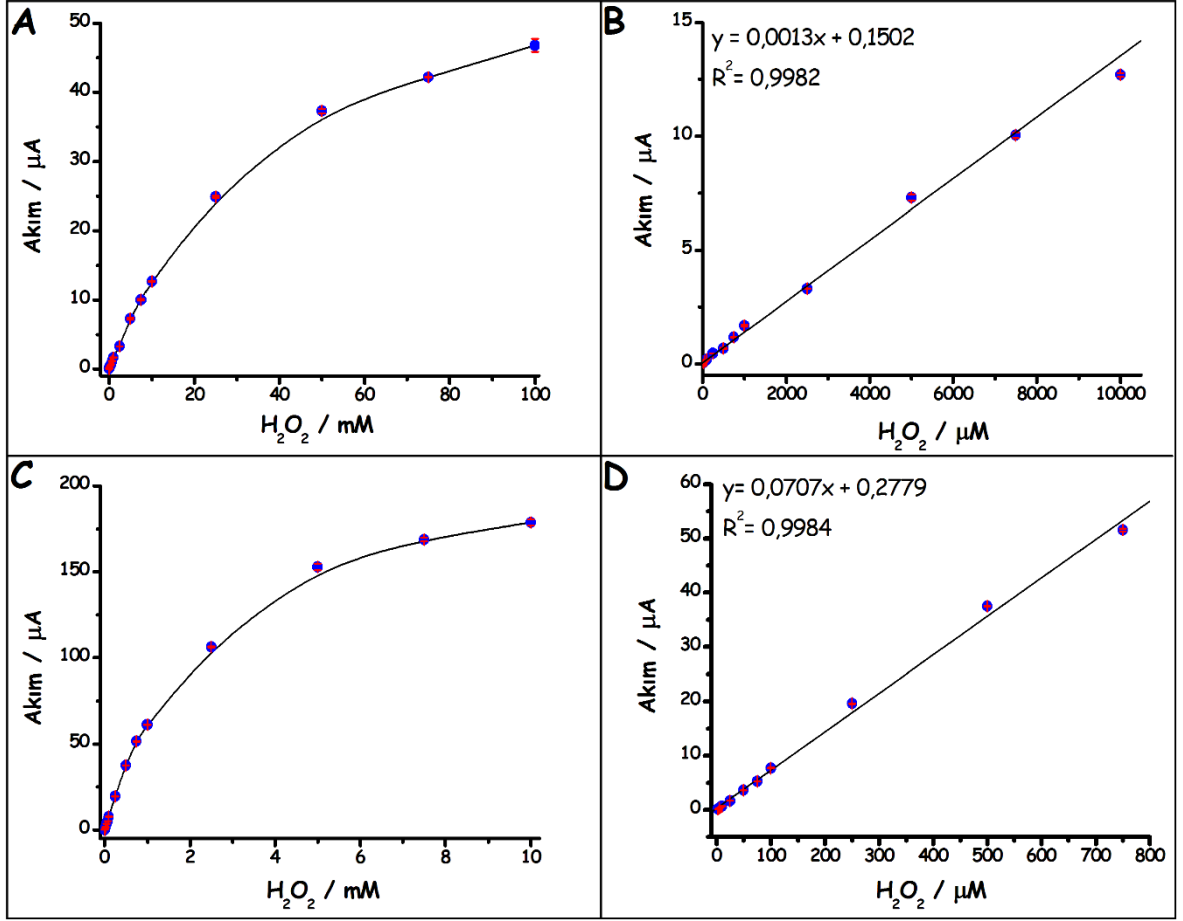
Şekil 4.30. Pt/p.PGE’nin farklı akış hızlarında 100 μM H_2O_2 ’nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (A) (Uygulama potansiyeli: +100 mV; taşıyıcı çözelti: Ar ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren 0,10 M NaOH; örnek kolonunun hacmi: 100 μL ; kolon uzunluğu: 10 cm) ve bu amperomogramlardan elde edilen akım-akış hızı değişim grafiği (B)

4.1.2.5.3. Analitiksel Parametrelerin Belirlenmesi

Hem p.PGE hem de Pt/p.PGE'nin optimize edilen koşullar altında (+100 mV uygulama potansiyelinde ve 2,4 mL/dk akış hızında) artan H₂O₂ derişimine bağlı FI amperomogramları Şekil 4.31'de ve bu amperomogramlardan elde edilen akım-derişim grafikleri ve kalibrasyon eğrileri Şekil 4.32'de verilmiştir. Yalın ve koşullandırılmış (p.PGE) elektrotta doğrusal aralık 25,0 µM – 10,0 mM H₂O₂ olarak ($I(\mu A) = 0,0013 C(\mu M) + 0,1502$; $R^2 = 0,9982$), Pt/p.PGE'de 2,5 µM – 750,0 µM ($I(\mu A) = 0,0707 C(\mu M) + 0,2779$; $R^2 = 0,9984$) olarak bulunmuştur. Doğru denklemlerindeki eğimler oranlandığında ($m_{\text{modifiye}}/m_{\text{yalın}}$) Pt/p.PGE'nin p.PGE'ye göre yaklaşık 54 kat daha duyar olduğu tespit edilmiştir. Pt/PGE'de H₂O₂'nin sinyalinin net olarak görüldüğü en küçük derişiminin (2,5 µM) sisteme en az 10 kez enjekte edilmesi ile kaydedilen FI amperomogramlardan elde edilen pik akımlarına göre LOD 0,73 µM H₂O₂, LOQ 2,43 µM H₂O₂ ve duyarlık 445 µA mM⁻¹ cm⁻² olarak hesaplanmıştır.



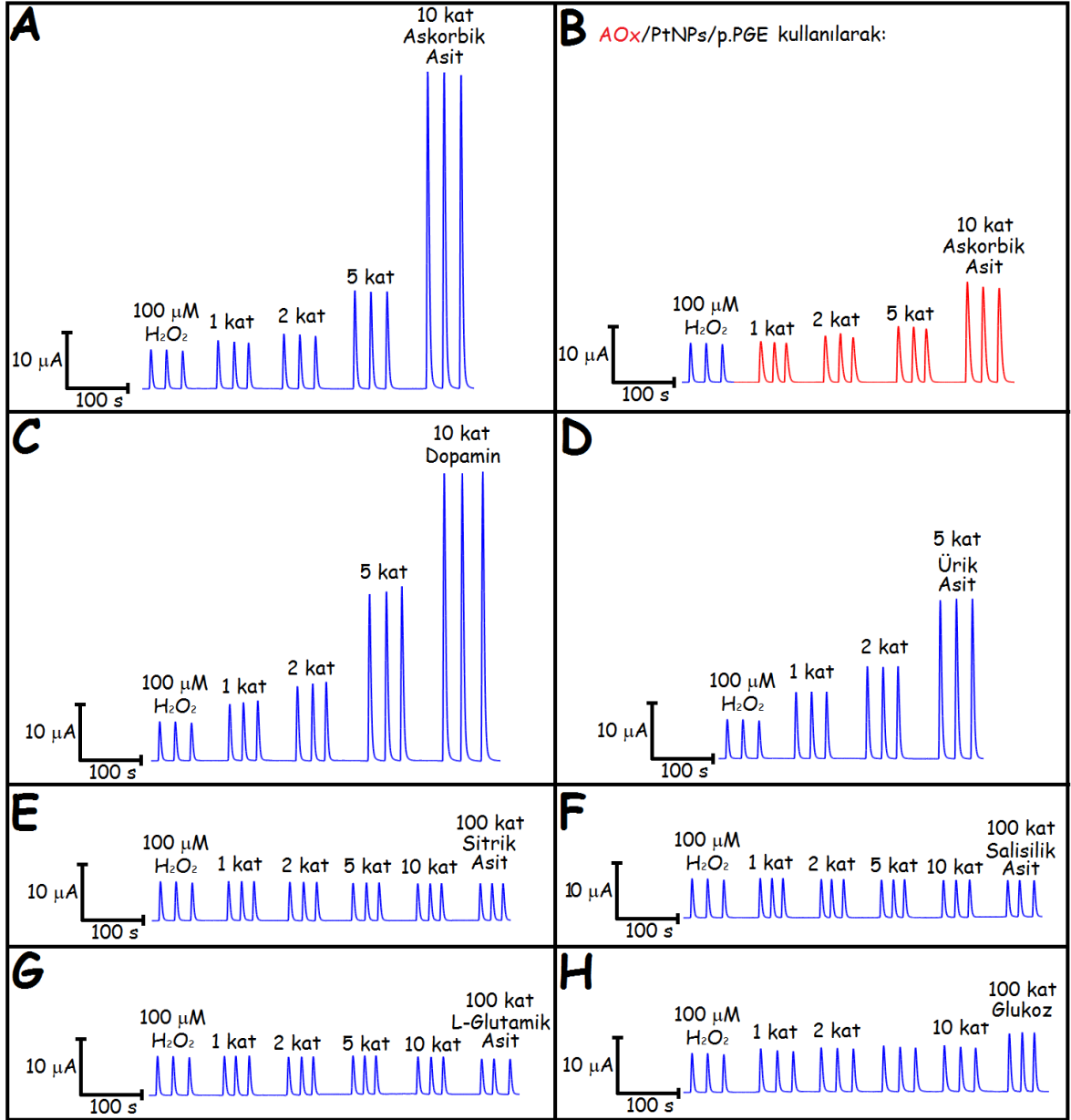
Şekil 4.31. p.PGE (A) ve Pt/p.PGE'nin (B) artan H₂O₂ derişimine bağlı olarak FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Uygulama potansiyeli: +100 mV; akış hızı 2,4 mL/dk; taşıyıcı çözelti: Ar ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren 0,10 M NaOH; örnek kolonunun hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm)



Şekil 4.32. p.PGE (A ve B) ve Pt/p.PGE'nin (C ve D) artan H_2O_2 derişimlerine (A için 25,0 μM – 100,0 mM ve C için 2,5 μM – 10 mM H_2O_2)) verdiği yanıtla ait akım-derişim grafiği (A ve C) ve elde edilen kalibrasyon grafikleri (B için 25,0 μM – 10,0 mM H_2O_2 aralığında, $I(\mu A) = 0,0013 C(\mu M) + 0,1502$ ve $R^2 = 0,9982$ ve D için 2,5 μM – 750 μM H_2O_2 aralığında $I(\mu A) = 0,0707 C(\mu M) + 0,2779$ ve $R^2 = 0,9984$)

4.1.2.5.4. Pt/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Sensörün Seçiciliğinin İncelenmesi

Pt/p.PGE için de farklı H_2O_2 (100 μM):girişimci molekül (AA, DA, GL, SA, SAL, GLA ve ÜA) oranlarında hazırlanan (1:0, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 ve 1:100) çözeltilerin optimize edilen koşullarda FI amperomogramları kaydedilmiş ve girişim etkileri değerlendirilmiştir. Herbir girişimci molekül için ayrı ayrı kaydedilen amperomogramlar Şekil 4.33'de verilmiştir. Çizelge 4.5'de ise herbir girişimci molekül için % değişimler, standart sapmaları ile birlikte verilmiştir.



Şekil 4.33. Pt/p.PGE’de 100 μM H₂O₂’ye göre artan oranlarda girişimci molekül (AA (A), AA (AOx/Pt/p.PGE kullanıldığında, B), DA (C), ÜA (D), SA (E), SAL (F), GLA (G) ve GL (H)) içeren çözeltilerin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramlar (Şekil 4.30’da kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)

Amperomogramlar (Şekil 4.33) ve bu amperomogramlardan elde edilen veriler (Çizelge 4.5) incelendiğinde, H₂O₂’ye göre 1:100 oranında SA, SAL, GLA’nın ve 1:10 oranında GL’nin H₂O₂’nin yükseltgenme akımına etkisinin pozitif girişim yönünde çok az olduğu ve bu girişimin de tüm oranlarda %10 civarında olmasından dolayı dikkate alınacak değerde olmadığı sonucuna varılmıştır. Fakat, eşdeğer derişimlerdeki AA, DA ve ÜA, H₂O₂’nin yükseltgenme pik akımını arttırdığı ve ciddi bir girişim etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5. Herbiri 100 µM sabit H₂O₂ içeren 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 ve 1:100 oranındaki girişimcilerin Pt/p.PGE’de H₂O₂’nin yükseltgenme pik akımına gösterdikleri değişimler (n=3)

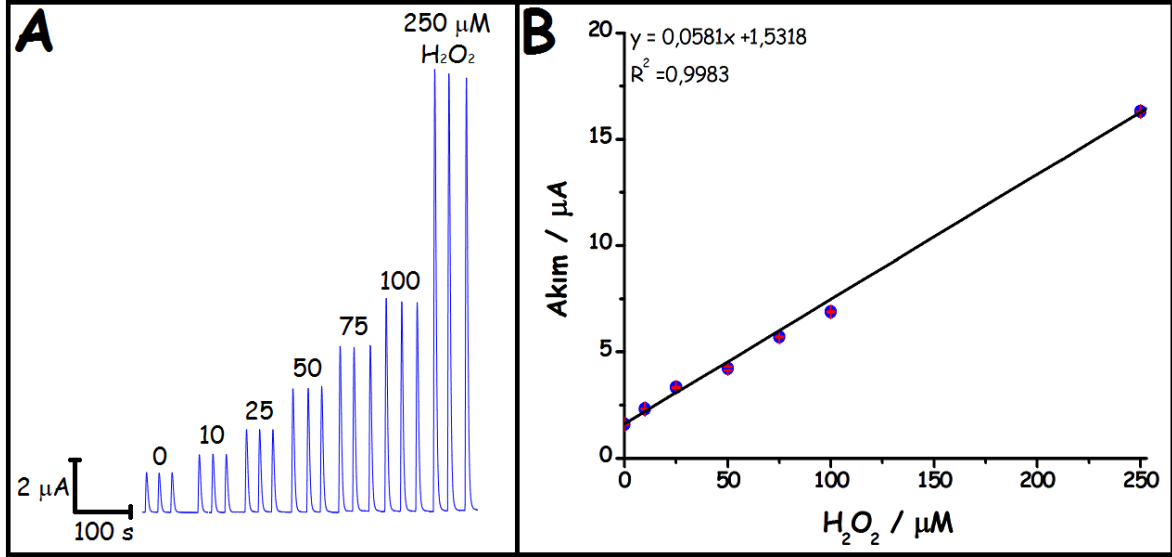
H ₂ O ₂ ’nin Yükseltgenme Pik Akımındaki Değişimler (%)					
Girişimci Molekül	Glukoz:Girişimci oranı				
	1:1	1:2	1:5	1:10	1:100
AA	+16,1 ±0,04	+33,5 ±0,03	+151,8 ±0,04	+696,4 ±0,22	-
AA (AOx)	2,14 ±0,13	+24,0 ±0,29	+40,0 ±0,21	+145,4 ±0,49	-
DA	+48,3 ±0,13	+96,0 ±0,31	+329,2 ±0,07	+622,1 ±0,18	-
ÜA	+68,2 ±0,07	+133,6 ±0,05	+303,3 ±0,06	-	-
SA	-1,18 ±0,16	-7,66 ±0,03	-8,67 ±0,08	-9,34 ±0,08	-11,8 ±0,08
SAL	-1,13 ±0,06	-4,88 ±0,06	-7,73 ±0,05	-9,70 ±0,05	-10,2 ±0,05
GLA	-1,05 ±0,16	-6,83 ±0,11	-6,85 ±0,19	-10,2 ±0,07	-12,6 ±0,05
GL	+0,56 ±0,12	+5,91 ±0,12	+7,47 ±0,01	+8,94 ±0,14	+50,2 ±0,10

AA varlığından kaynaklı girişim etkisini azaltmak adına Pt/p.PGE yüzeyine AOx enzimi immobilize edilerek bu girişimci varlığında girişim testi tekrarlanmış ve özellikle eşdeğer derişim oranındaki girişim etkisinde ciddi bir azalma gözlenmiştir. Bu azalma, AA’nın O₂ varlığında elektrot yüzeyindeki AOx ile enzimatik tepkimeye girerek yükseltgen formuna (dehidro askorbata) dönüşerek önyükseltgenmesinden kaynaklanmaktadır. Böylece H₂O₂’nin yükseltgenme akımına arttırıcı yönde etki eden AA’nın girişimi, önemli düzeyde giderilmiştir. Girişim çalışmalarından, DA, AA ve ÜA içermeyen örneklerde Pt/p.PGE kullanılarak H₂O₂’nin FIA’da seçici olarak tayin edilebileceği sonucuna varılmıştır.

4.1.2.5.5. Pt/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Sensörün H₂O₂ İçeren Bir Örneğe Uygulanması

Kozmetik mağazalarında kolayca bulunabilen bir saç oksidasyon kremindeki (Wella Koleston, % 9 H₂O₂) H₂O₂ içeriği analiz edilmiş ve böylece tasarlanan elektrokimyasal sensörün gerçek örneklere uygulanabilirliği test edilmiştir. Bu amaçla 0, 10, 25, 50, 75, 100 ve 250 µM H₂O₂ olacak şekilde standart içeren 1/100000 oranında taşıyıcı çözelti ile

seyreltilmiş örnek çözeltilerinin FIA sistemine enjeksiyonuyla amperomogramları daha önce optimize edilen koşullar altında kaydedilmiş (Şekil 4.34 A) ve standart katma grafiği Şekil 4.34 B’de verilmiştir.



Şekil 4.34. A) Seyreltik örnek (1/100000 seyreltik) ve bu örnekte 10, 25, 50, 75, 100 ve 250 µM H₂O₂ içerecek şekilde hazırlanan standart çözeltilerinin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.30’da kullanılan optimize edilmiş koşullar altında) B) Elde edilen standart katma grafiği ($I(\mu\text{A}) = 0,0581 C(\mu\text{M}) + 1,5318$ ve $R^2 = 0,9983$)

Ayrıca Au/p.PGE’de olduğu gibi örnekteki H₂O₂ içeriği permanganometrik titrasyon metodu kullanılarak da analiz edilmiştir. Her iki metottan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6’da verilmiştir.

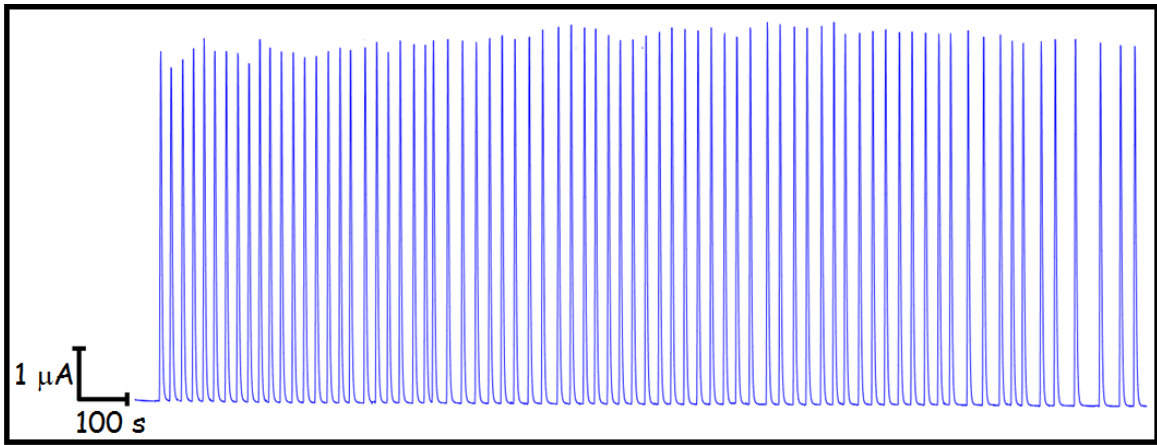
Çizelge 4.6. Saç Oksidasyon Kreminde tayin edilen H₂O₂’ye ait analiz sonuçları (n=5)

Saç Oksidasyon Kreminde Hesaplanan H ₂ O ₂ (% 9) Derişimi	Bulunan H ₂ O ₂ derişimi	
	Pt/p.PGE kullanılarak FI Amperometrik Metod	Permanganometrik Titrasyon
2,65 M	2,70 M ±0,05 $t_{\text{den}}: 2,24$ (P: 0,05, 4)	2,61 M ±0,04 $t_{\text{den}}: 2,24$ (P: 0,05, 4)
	$F_{\text{den}}: 5,22$ (P: 0,05; 4)	
$t_{\text{kritik}}: 2,78$ (P: 0,05, 4), $F_{\text{kritik}}: 6,39$ (P: 0,05, 4, 4) (Douglas ve ark., 1988)		

Au/p.PGE’de olduğu gibi bu elektrot için de elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Pt/p.PGE kullanılarak saç oksidasyon kremi için iki yöntemle de t_{den} 2,24 olarak bulunmuş olup, bunlar, 4 serbestlik derecesi için % 95 güven derecesinde t_{kritik} değerden (2,78) (Douglas ve ark., 1988) daha küçük olmasından dolayı X_{ort} ve μ arasında % 95 güven seviyesinde ciddi bir farkın olmadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, önerilen metot ile permanganometrik titrasyon metodunun varyansları oranlanmasıyla bulunan $F_{den} = 1,56$, F_{kritik} değerinin ($P = 0,05$, 4, 4) 6,39’dan (Douglas ve ark., 1988) daha küçük olmasından dolayı her iki örnek için de iki yöntemin standart sapmaları arasında önemli bir farkın olmadığı anlaşılmaktadır.

4.1.2.5.6. Pt/p.PGE’nin Tekrarlanabilirliğinin ve Kararlılığının Test Edilmesi

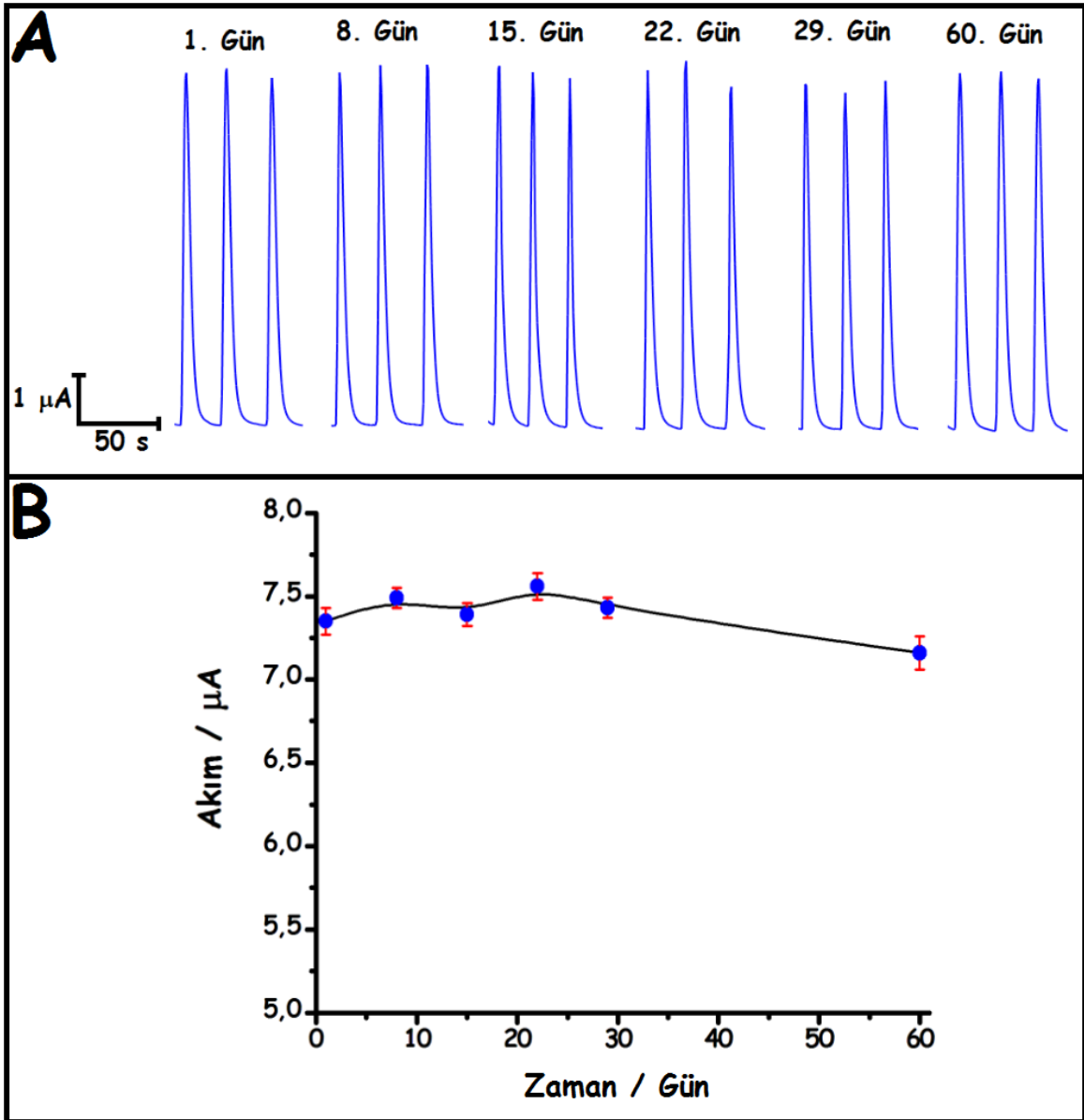
Au/p.PGE’de olduğu gibi Pt/p.PGE’nin de tekrarlanabilirliği ve kararlılığı test edilmiştir. 100 μM H_2O_2 çözeltisinin ardışık 75 kez enjeksiyonuyla kaydedilen amperomogramlardan görüldüğü üzere pik akımlarında kayda değer bir değişim ($7,24 \pm 0,30 \mu\text{A}$ ya da $\pm \% 2,32 \text{ RSD}$) gözlenmemiştir (Şekil 4.35). Sonuç olarak, elektrodun yüzey etkinliği ve tekrarlanabilirliği oldukça yüksek olup, H_2O_2 çözeltisinin her enjeksiyonunda kararlı yanıtlar vermiştir.



Şekil 4.35. Pt/p.PGE’de 100 μM H_2O_2 çözeltisinin sisteme ardışık 75 kez enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.30’da kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)

Ayrıca Pt/p.PGE’nin günler arası kararlık testi içinse 100 μM H_2O_2 çözeltisinin sisteme günler arası üçer kez enjeksiyon edilmiş ve FIA sisteminde kaydedilen amperomogramlar Şekil 4.36 A’da verilmiştir. Amperomogramlardan, pik akım değerleri hesaplanarak

akımın zamana (gün) bağılı değişim grafiği elde edilmiştir (Şekil 4.36 B). Amperomogramlar ve akım-zaman grafiği incelendiğinde, Au/p.PGE’de olduğu gibi Pt/p.PGE’nin 100 μM H_2O_2 ’ye verdiği günler arası yanıtların birbirine oldukça yakın olup, günler arasında H_2O_2 ’ye kararlı amperometrik yanıtlar alınmıştır. Yüzeze kaplanan Pt nanoparçacıkların iyi fiziksel ve mekanik özelliklerinden dolayı kararlı yanıtların alındığı düşünülmektedir. Sonuç olarak, H_2O_2 ’nin FI amperometrik tayini için tasarlanan Pt/p.PGE’nin kararlılığının oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

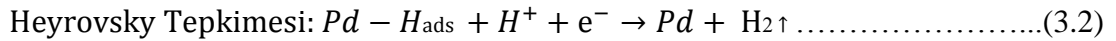
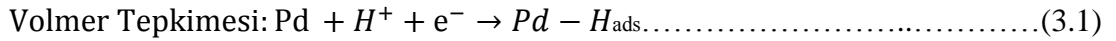


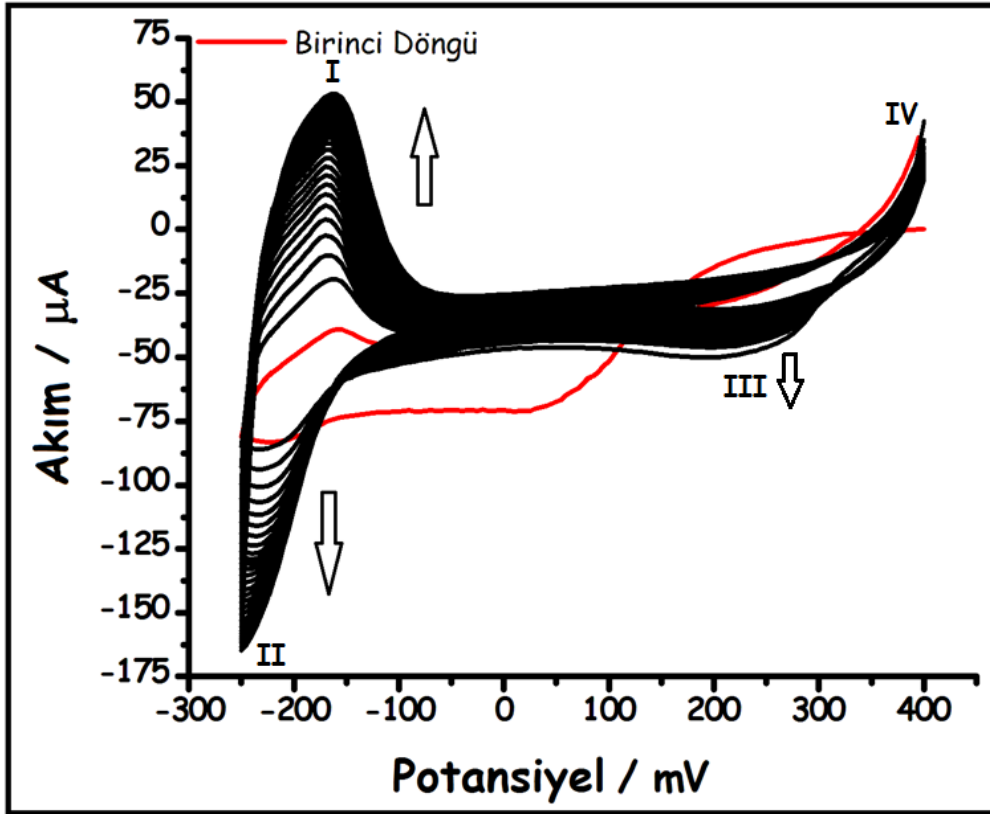
Şekil 4.36. A) Pt/p.PGE’de 100 μM H_2O_2 çözeltisinin günler arası üçer kez enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları ve B) akımın zamana (gün) bağılı değişimi (Şekil 4.30’da kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)

4.1.3. Pd/p.PGE ile Gerçekleştirilen Çalışmalar

4.1.3.1. PdNP'lerin p.PGE Yüzeyine Elektrokimyasal Biriktirilmesi

Yalın ve koşullandırılmış elektrot (p.PGE) yüzeyine, deneysel prosedürde bahsedilen yöntem ile PdCl₂'nin farklı döngü sayılarında (5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 döngü) CV'leri kaydedilerek elektrokimyasal indirgenmesi yoluyla Pd nanoparçacıklar biriktirilmiştir. 30 döngü sayısı kullanılarak elde edilen CV Şekil 4.37'de verilmiştir. Voltammogramın ilk döngüsünde -160 mV'da anodik bir pik, -220 mV ve 50 mV'da katodik iki pik gözlenmiş ve ikinci döngüde anodik pikin potansiyeli çok belirgin değişmemiş olup, bahsedilen katodik pikler ise sırasıyla -250 ve +220 mV'a kaymış ve döngü sayısının artmasıyla da bu piklerin akımları giderek artmıştır. -250 mV ile -100 mV arasında görülen katodik ve anodik pikler sırasıyla hidrojenin adsorbsiyonuna/oluşumuna (II) ve desorbsiyonuna (sıyırılmasına, I), +250 mV'ta (III) gözlenen katodik pik ise, anodik yönde +300 mV'tan sonra (IV) yüzeyde oluşan muhtemel PdO'nun indirgenmesine ait olduğu belirlenmiş olup, literatürler ile uyum içerisindedir (Şekil 4.37) (Zhou ve ark., 2011; Rasouli ve ark., 2016; Perini ve ark., 2014). PdNP'lerin elektrobiriktirilmesinde meydana gelen muhtemel tepkimeler literatürdeki gibi aşağıdaki şekilde verilmiştir. Voltammogramda döngü sayısının artmasıyla gözlenen bu değişiklikler, PdNP'lerin p.PGE yüzeyinde elektrokimyasal olarak biriktirildiğini yansıtmaktadır.

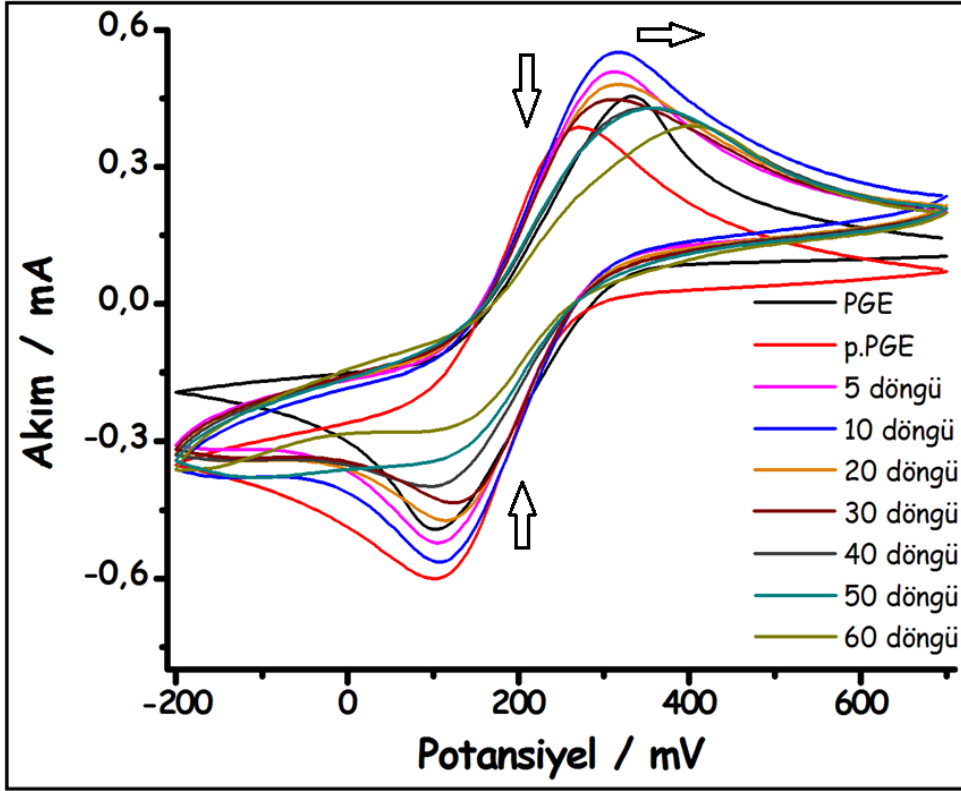




Şekil 4.37. p.PGE'nin 1,0 mM PdCl₂ içeren Ar ile doyurulmuş 0,10 M KCl'de ardışık 30 döngü ile kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 25 mV/s)

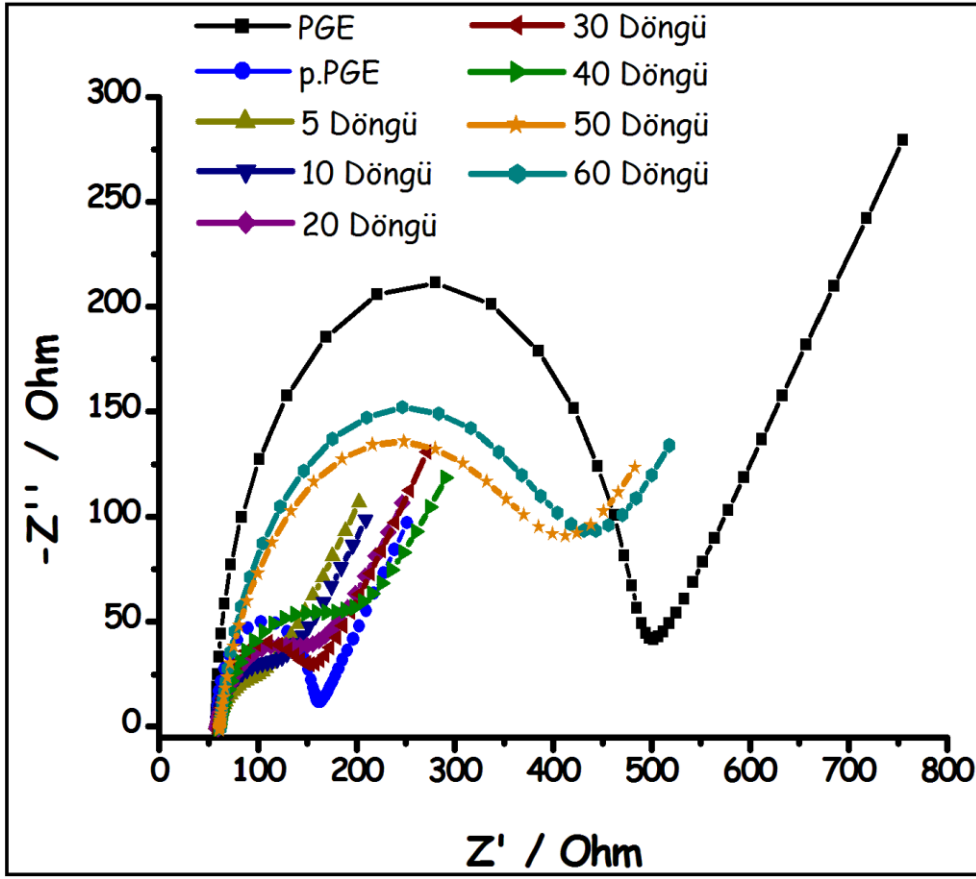
4.1.3.2. Pd/p.PGE'lerin Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

Au/p.PGE'de ve Pt/p.PGE'de olduğu gibi, elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayılı CV'lerin kaydedilmesiyle elde edilen Pd/p.PGE'lerin de Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks probu ortamında hem CV'leri hem de impedans eğrileri kaydedilmiş ve sırasıyla Şekil 4.38 ve 4.39'da verilmiştir. CV'lerde döngü sayısının artmasıyla elde edilen elektrotlarda Pd yoğunluğu artmasına bağlı olarak Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks çiftine ait piklerin potansiyellerinde kayma ve pik akımlarında sürekli azalma görülmüştür. Döngü sayısının artması ile anodik piklerin potansiyellerinde kaymalar ve akımlarında azalmalar gözlenirken, katodik piklerin ise akımlarında meydana gelen azalmaların dışında potansiyelde kayda değer bir değişme gözlenmemiştir.



Şekil 4.38. PGE, p.PGE ve elektrobiriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Pd/p.PGE'lerin 0,01 M $K_3[Fe(CN)_6]$, 0,01 M $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 0,10 M KCl destek çözeltisinde kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50 mV/s)

Şekil 4.39'daki impedans eğrileri ve Çizelge 4.7'de verilen R_{et} değerlerine göre, Au/p.PGE ve Pt/p.PGE'de elde edilen sonuçların aksine elektrokimyasal biriktirme esnasında kullanılan döngü sayısının artmasıyla R_{et} değerleri artmış ve iletkenlik biriken Pd yoğunluğundan dolayı azalmıştır. Pd döngü sayısının artmasına bağlı olarak CV'lerde akım ve aynı zamanda impedans eğrilerindeki R_{et} değerlerinin azalma nedeni, PdNP'lerin pPGE yüzeyinde homojen olarak dağılması (film şeklinde kaplanması) yerine yığılmsal (aglomerasyon) olarak birikmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Böylece p.PGE ile $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks probu arasındaki elektron transferi zorlaşmaktadır.



Şekil 4.39. PGE, p.PGE ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Pd/p.PGE'lerin 0,01 M $K_3[Fe(CN)_6]$, 0,01 M $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 0,10 M KCl destek çözeltisinde kaydedilen impedans eğrileri (Uygulanan frekans aralığı: 10^5 Hz – 10^{-1} Hz; uygulanan potansiyel: +170 mV; sinüsodiyal sinyal: 5 mV)

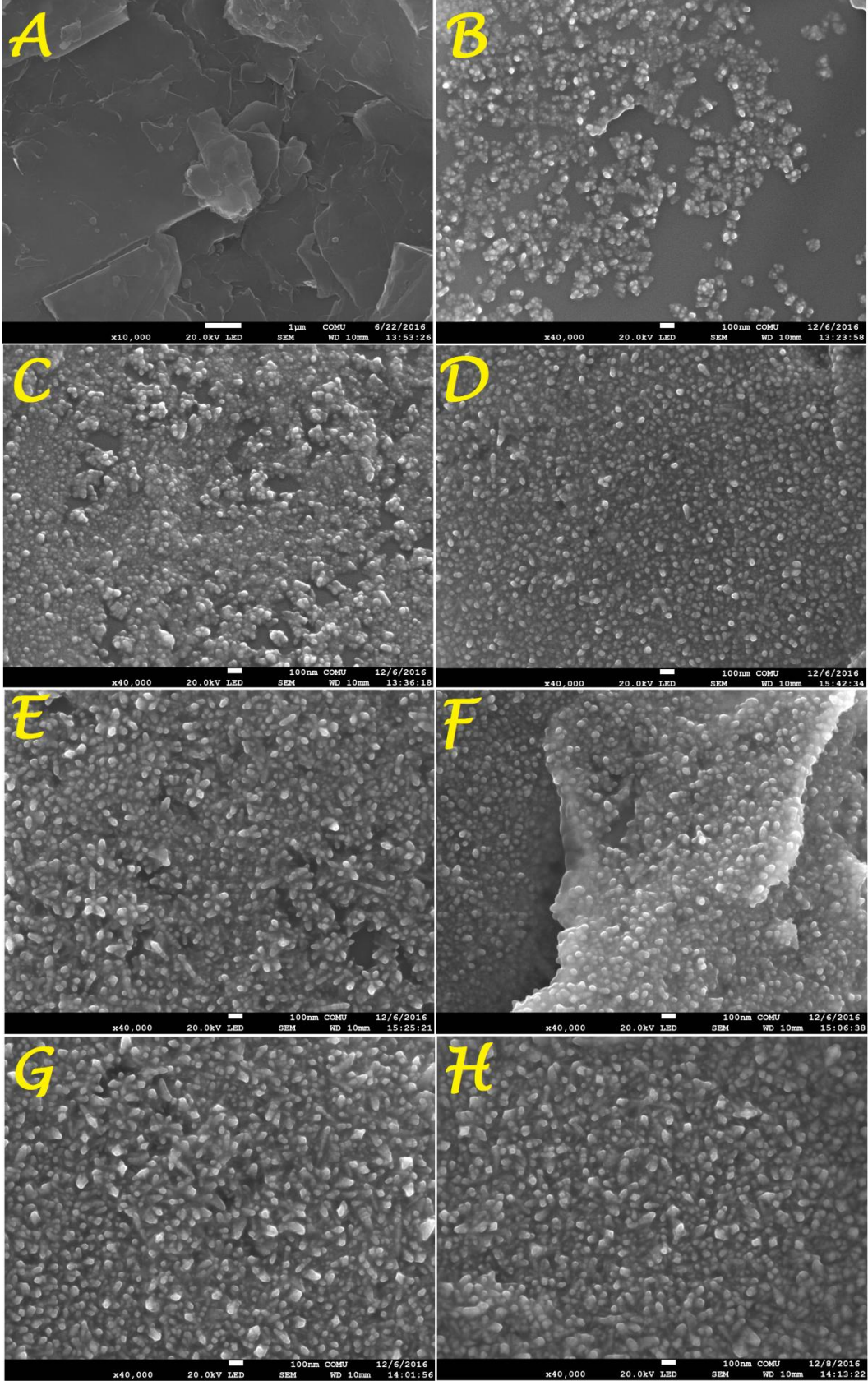
Çizelge 4.7. Yalın PGE, p.PGE ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Pd/p.PGE'lerin $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks probu ortamında kaydedilen impedans eğrileri ve CV'lerinden çıkarılan veriler (n=3)

Elektrot	E_a (mV)	E_k (mV)	ΔE_p (mV)	I_{pa} (μA)	I_{pk} (μA)	R_{et} (ohm)
PGE	335	100	235	$470 \pm 1,0$	$443 \pm 2,4$	$285 \pm 6,4$
p.PGE	305	105	200	$519 \pm 5,2$	$445 \pm 2,4$	$114 \pm 0,6$
Pd/p.PGE/ 5 Döngü	313	107	206	$514 \pm 7,0$	$450 \pm 6,0$	$46 \pm 1,2$
Pd/p.PGE/ 10 Döngü	317	107	210	$549 \pm 7,5$	$472 \pm 9,3$	$70 \pm 3,0$
Pd/p.PGE/ 20 Döngü	317	115	202	$473 \pm 7,0$	$395 \pm 1,6$	$90 \pm 2,5$
Pd/p.PGE/ 30 Döngü	315	125	190	$441 \pm 2,6$	$362 \pm 2,5$	$98 \pm 4,3$
Pd/p.PGE/ 40 Döngü	352	115	237	$400 \pm 2,9$	$300 \pm 2,5$	$130 \pm 2,2$
Pd/p.PGE/ 50 Döngü	353	120	233	$404 \pm 2,5$	$234 \pm 6,1$	$355 \pm 1,9$
Pd/p.PGE/ 60 Döngü	410	120	290	$330 \pm 4,5$	$160 \pm 9,5$	$380 \pm 2,3$

4.1.3.3. Pd/p.PGE'lerin Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesi

Elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayılı CV'lerin kaydedilmesiyle hazırlanan Pd/p.PGE'lerin, p.PGE ile birlikte kaydedilen SEM görüntüleri Şekil 4.40'da verilmiştir. Döngü sayısının artmasıyla yüzeyde biriken PdNP'lerin yoğunluğunun arttığı SEM görüntülerinden görülmektedir. Bir önceki bölümde redoks probu ortamında kaydedilen CV'ler ve impedans eğrilerinden elde edilen verilerin SEM görüntüleri ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

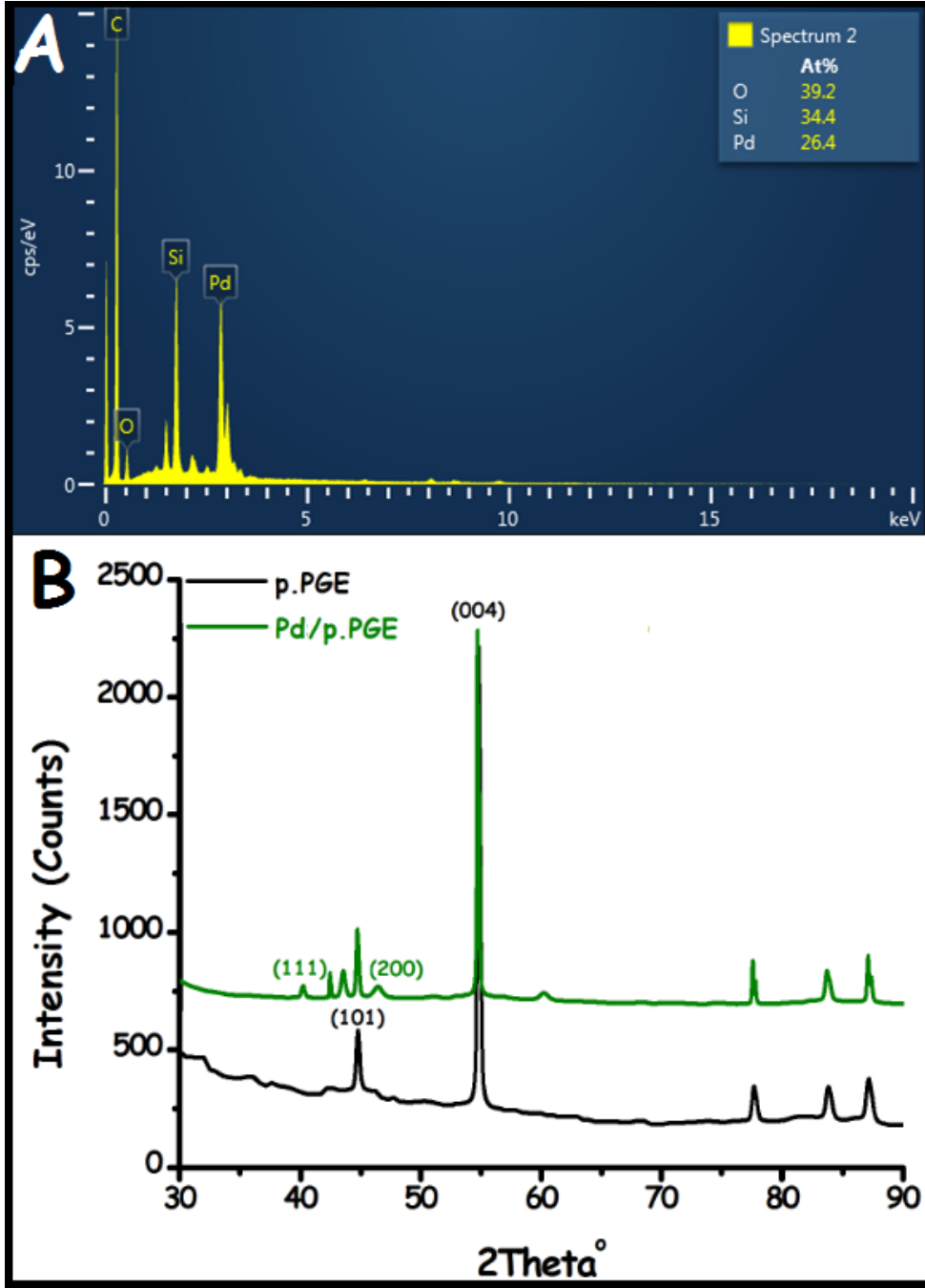




Şekil 4.40. p.PGE (A, 1 μm x10000) ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayısının kullanımıyla elde edilen PdNP modifiye elektrotların SEM görüntüleri: B) 5, C) 10, D) 20, E) 30, F) 40, G) 50 ve H) 60 döngü, 100 nm x40000

Elektrokimyasal biriktirme esnasında 30 döngü ile elde edilen Pd/p.PGE'nin EDX spektrumu ve bu elektrot ile birlikte p.PGE'nin XRD spektrumları Şekil 4.41'de verilmiştir. EDX spektrumunda görüldüğü gibi Pd/p.PGE için Pd % 26,4, O % 39,2 ve Si % 34,4 bulunmuş (Şekil 4.41 A) ve Si ile O'nin muhtemelen PGE'deki kilden kaynaklandığı, O için diğer bir olasılığın ise Pd'nin PdO olarak biriktiği sonucuna varılmıştır. p.PGE ve Pd/p.PGE'nin XRD spektrumları (Şekil 4.41 B) karşılaştırıldığında ise modifiye elektrodun spektrumunda 2θ değeri olarak $40,09^\circ$ ve $46,36^\circ$ 'de gözlenen piklerin Pd (1 1 1) ve Pd (2 0 0)'nin yüzey kübik kristal (face cubic crystal, fcc) yapılarına ait olduğu belirlenmiş olup, literatürde verilen değerlerle uyum içerisindedir (Zhang ve ark., 2016c). Gerçekleştirilen tüm bu analiz sonuçları, PdNP'lerin başarılı bir şekilde p.PGE yüzeyine biriktiğini göstermektedir.





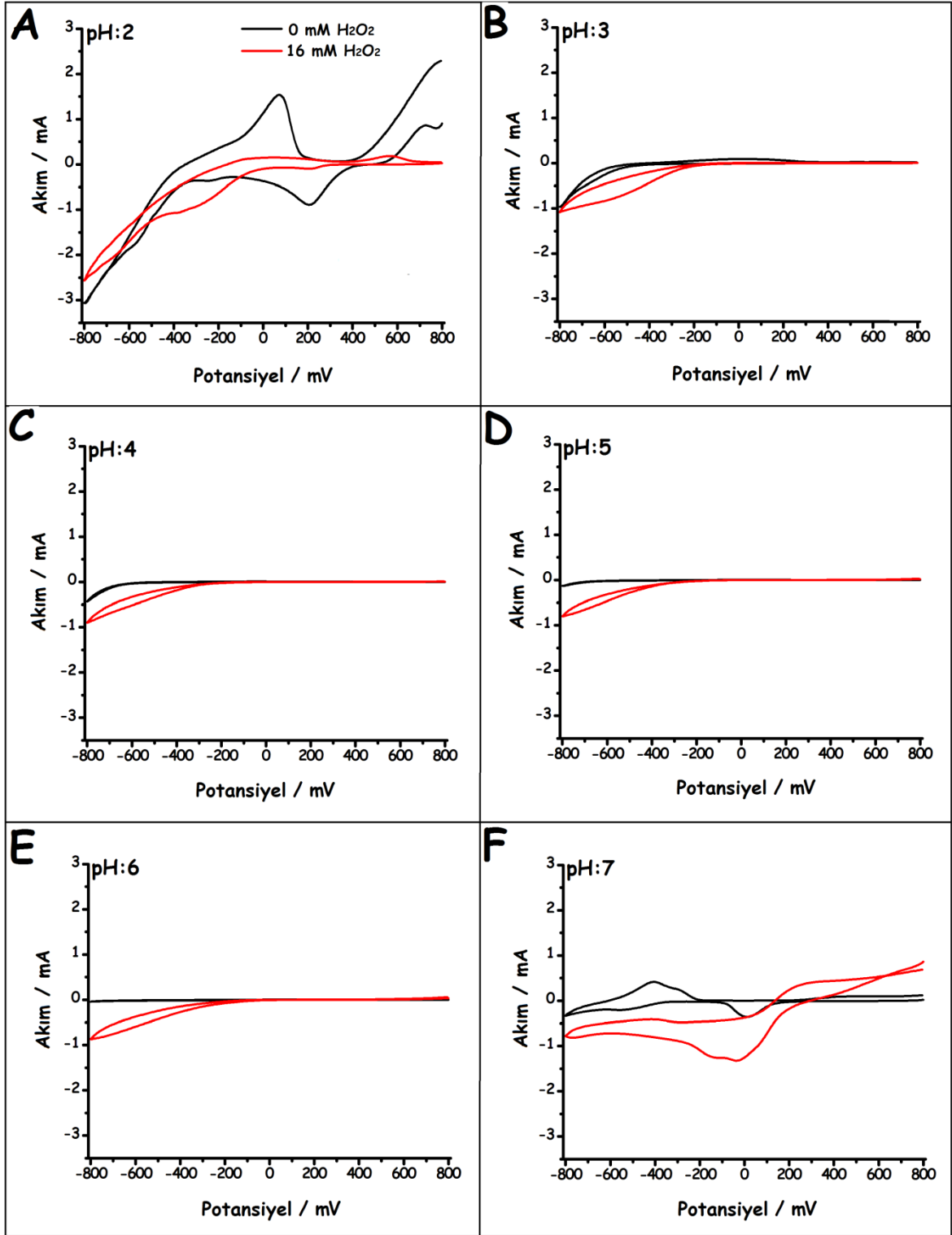
Şekil 4.41. Elektrokimyasal biriktirme esnasında 30 döngü ile elde edilen Pd/p.PGE'nin (A) EDX ve p.PGE (siyah) ve Pd/p.PGE'nin (yeşil) (B) XRD spektrumu

4.1.3.4. Pd/p.PGE'de H_2O_2 'nin Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi

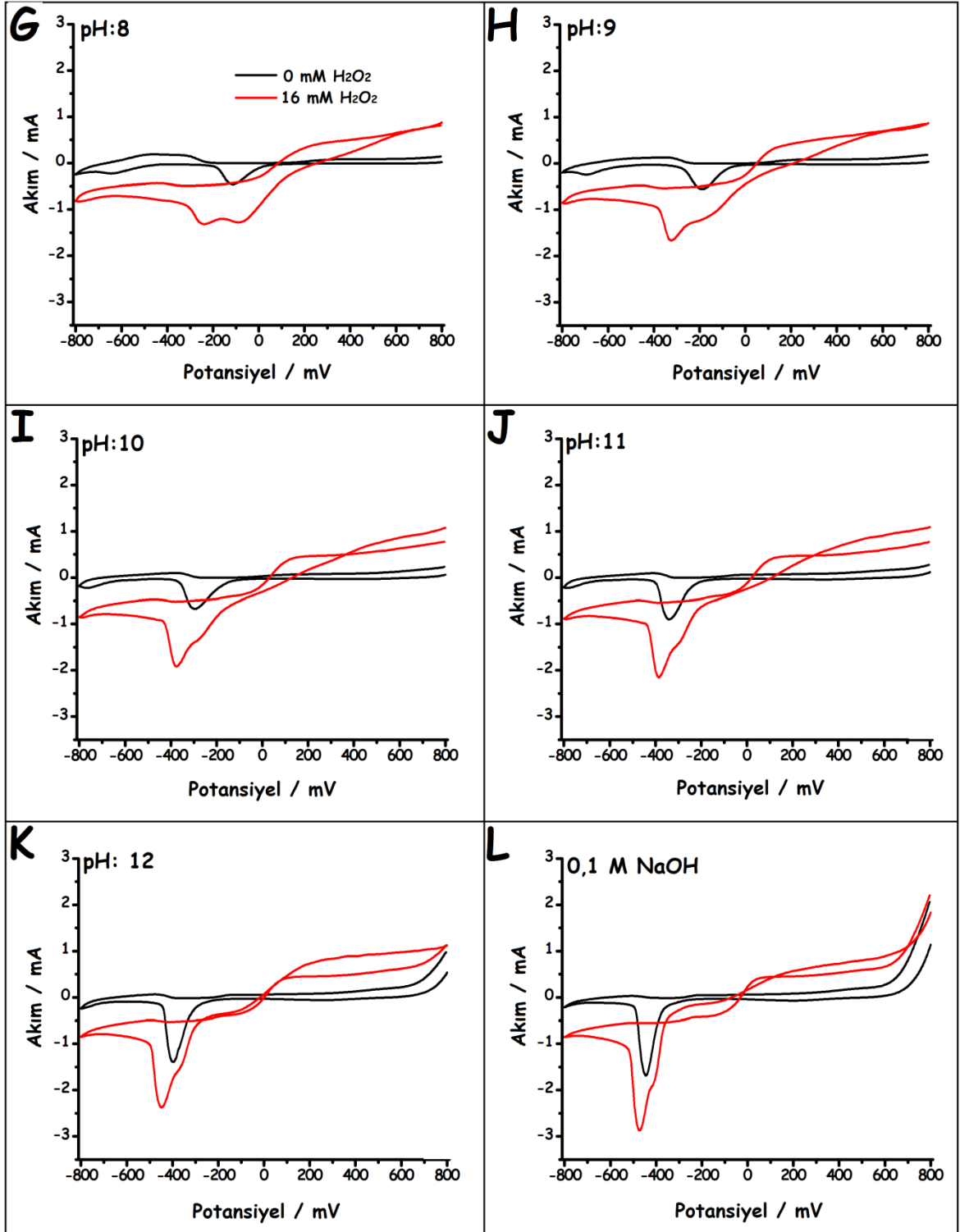
30 döngü ile hazırlanan Pd/p.PGE kullanılarak ilk aşamada farklı pH ortamlarında H_2O_2 'nin CV'leri kaydedilmiş ve pH optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.42'de görüldüğü gibi asidik pH'larda (3,0 – 6,0) H_2O_2 'nin katodik piklerinin oldukça negatif potansiyelerde belirdiği, anodik piklerin gözlenmediği, bu piklerin Au/p.PGE ve Pt/p.PGE'de olduğu gibi bazik bölgelerde daha belirginleştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.42).

Özetle, destek çözelti ortamının pH'sının artması ile H_2O_2 'nin indirgenmesine ve yükseltgenmesine ait pikler daha negatif bölgeye kaymış ve anodik ve katodik pik yükseklikleri belirgin olarak artmıştır. Şekil 4.42 L'den görüldüğü üzere H_2O_2 'nin indirgenmesine en iyi yanıtın 0,10 M NaOH ortamında alındığı görülmektedir. Fakat gerek Au/p.PGE kullanılarak gerekse Pt/p.PGE kullanılarak yapılan elektrokimyasal H_2O_2 sensörü çalışmalarında yüksek pH'ta çalışılması (0,1 M NaOH), gerçekleştirilmesi düşünülen olası biyosensör çalışmalarında fizyolojik pH'nın (pH 7,0) kullanılması ve Pd/p.PGE pH 7,0'de H_2O_2 'ye iyi yanıtlar alınması gibi sebeplerden ötürü, sonraki çalışmalarda 0,10 M KCl içeren pH 7,0 PBS'nin destek elektrolit olarak kullanılmasına karar verilmiştir.





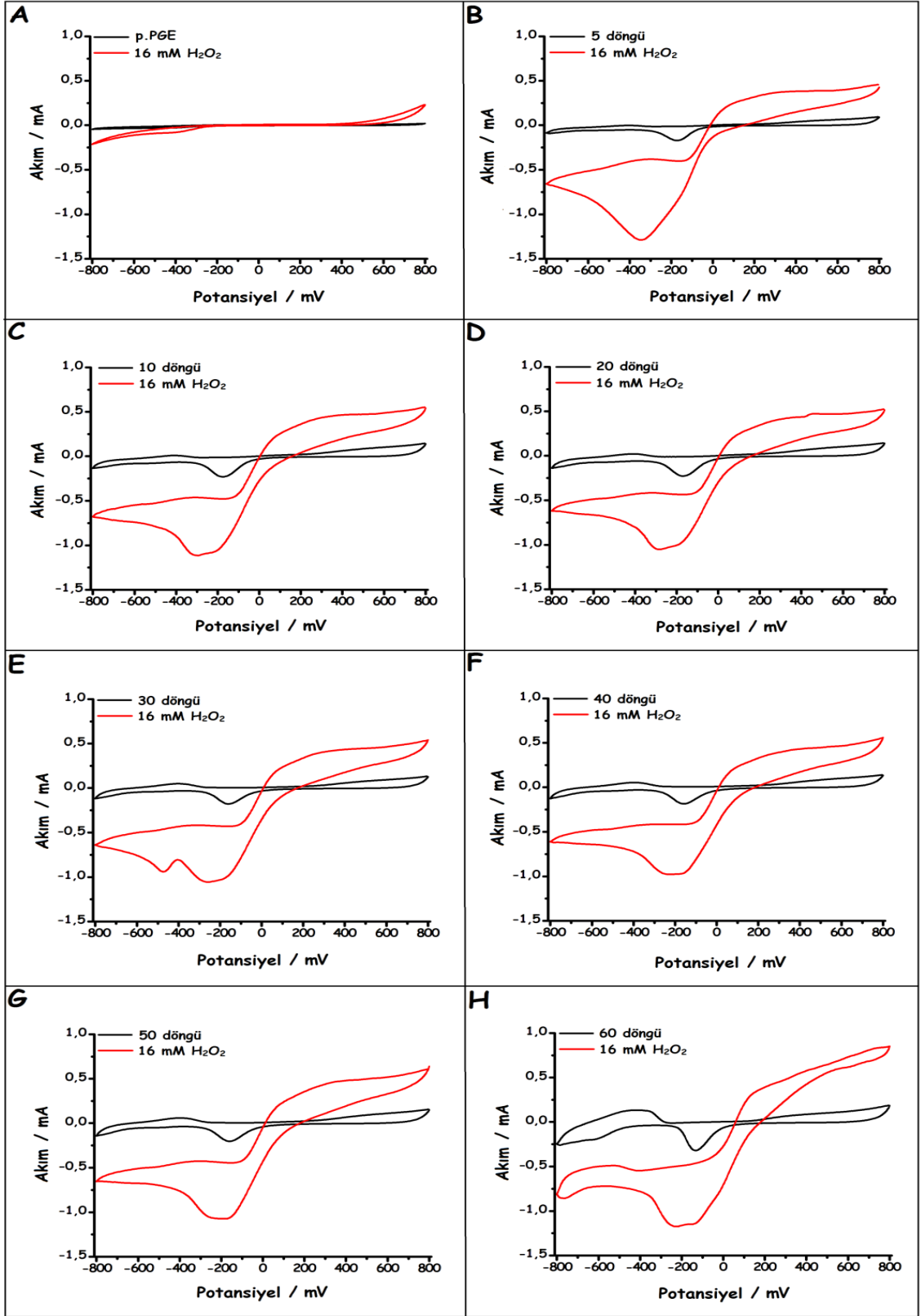
Şekil 4.42. Pd/p.PGE'nin pH'sı 2 ile 12 arasında değişen BRBS'de ve 0,10 M NaOH çözeltisinde (siyah voltammogramlar), 16 mM H₂O₂ varlığında (kırmızı voltammogramlar) kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50 mV/s)



Şekil. 4.42'nin devamı

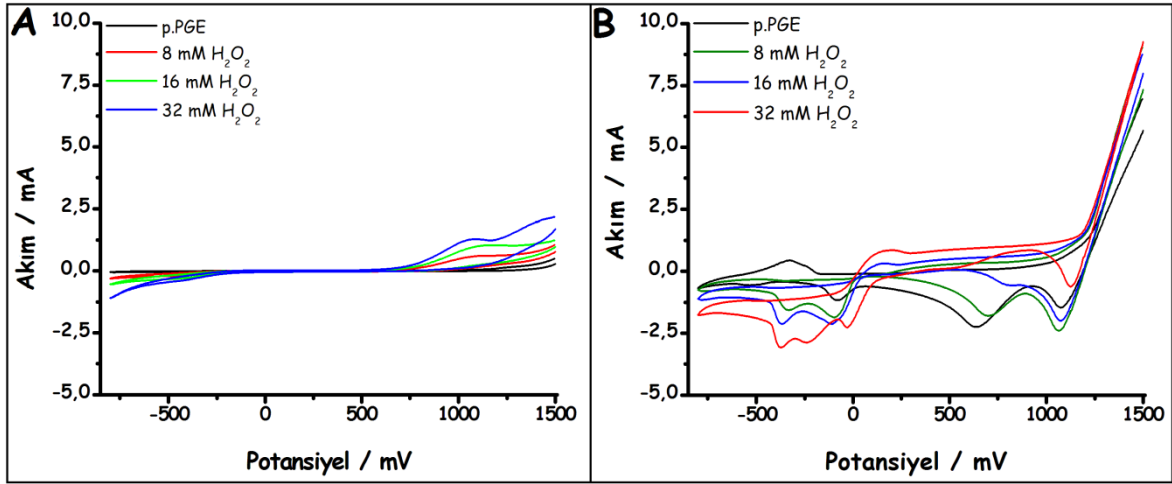
Au/p.PGE ve Pt/p.PGE'de olduğu gibi Pd/p.PGE için de döngü sayısı optimizasyonu gerçekleştirilmiş ve bu amaçla, elektrokimyasal biriktirme esnasındaki döngü sayısına göre elde edilen Pd/p.PGE'lerin 0,10 M KCl içeren pH 9,0 BRBS ortamındaki H_2O_2 'nin CV'leri kaydedilmiştir (Şekil 4.43). p.PGE'de H_2O_2 'nin indirgenme pikleri ve

yükseltgenme pikleri sırasıyla -700 ve +700 mV'da olmak üzere aşırı potansiyelerde gözlenmiştir (Şekil 4.43 A). Diğer taraftan, döngü sayısına bağlı kaydedilen Pd/PGE'lerin CV'lerinde ise H₂O₂'ye ait anodik pik 100 mV'a kadar kaymış ve pik akımı p.PGE'ye göre oldukça artmakla birlikte 5 ile 60 döngü arasında ise anodik akım nerdeyse değişmemiştir (Şekil 4.43 B-H). Diğer taraftan p.PGE'de -700 mV'da görülen H₂O₂'ye ait indirgenme piki, 5. döngü ile -450 mV'da şiddetli olarak belirginleşmiş ve 10. döngüden 60. döngüye kadar az da olsa pik şiddetlerinde azalmalar görülmekle birlikte daha pozitif potansiyellere kaymıştır. İlgili azalmaların, döngü sayısının artması ile PdNP'lerin p.PGE üzerine film şeklinde birikmesi yerine yığınsal olarak birikmesinden kaynaklandığı ve bu durumun elektrodun yanıtında azalmaya sebep olduğu düşünülmektedir. 5 döngülü elektrot ile H₂O₂'nin indirgenmesine en yüksek yanıt alınmış olsa da, bu elektrodun yüzey etkinliğini daha hızlı yitireceği ve bu durumun modifiye elektrodun tekrarlanabilirlik ve kararlılık parametrelerini olumsuz etkileyebileceği olasılığı göz önüne alındığından, bundan sonraki çalışmalarda 30 döngü sayısı ile elde edilen Pd/p.PGE'nin kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.43. p.PGE (A) ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayılarında (5 (B), 10 (C), 20 (D), 30 (E), 40 (F), 50 (G) ve 60 (H)) hazırlanan Pd/p.PGE'lerin, 0,10 M KCl içeren pH 9,0 BRBS'de (siyah voltammogramlar), 16 mM (kırmızı voltammogramlar) H_2O_2 varlığında kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50 mV/s)

p.PGE ve elektrokimyasal biriktirme esnasında 30 döngü ile elde edilmiş Pd/p.PGE'nin 0,10 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 PBS'de artan H₂O₂ derişimine bağı CV'leri de kaydedilmiş ve Şekil 4.44'de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi H₂O₂'nin derişiminin artmasıyla Pd/p.PGE'de sırasıyla -400 ve 0 mV'da gözlenen katodik ve anodik piklerin orantısal olarak arttığı tespit edilmiştir.



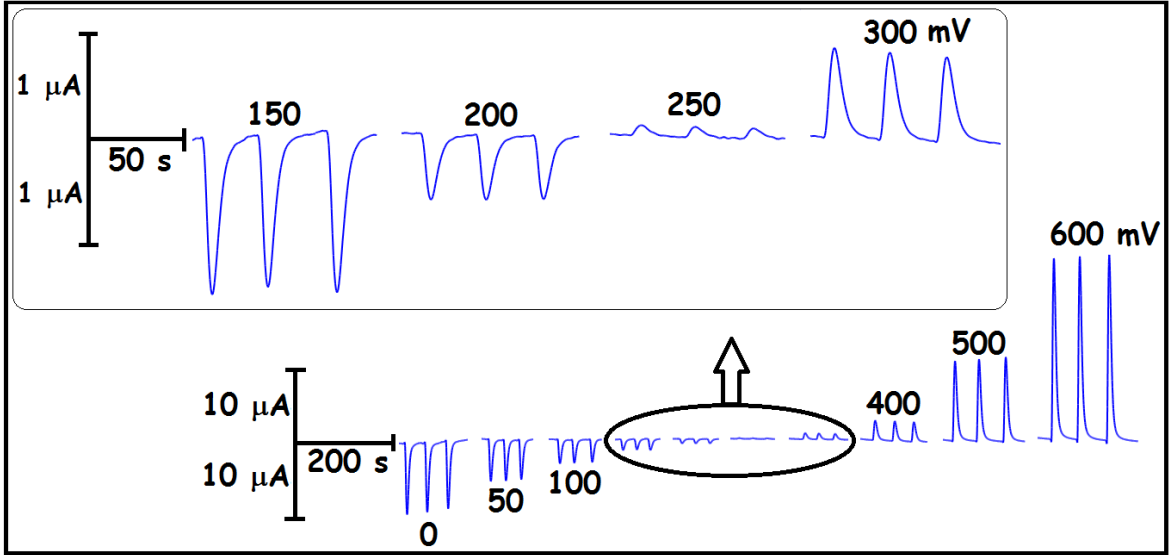
Şekil 4.44. A) p.PGE ve B) Pd/p.PGE'nin 0,1 M KCl içeren 0,1 M pH 7,0 PBS'de artan H₂O₂ derişimine (0, 8, 16 ve 32 mM) bağı olarak kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50 mV/s)

4.1.3.5. Pd/p.PGE ile FIA Sisteminde Gerçekleştirilen Çalışmalar

FIA sisteminde Au/pPGE ve Pt/p.PGE kullanılarak gerçekleştirilen tüm çalışmalar, Pd/p.PGE için de tekrarlanmıştır. Ancak, bu elektrot için H₂O₂'nin indirgenmesine bağı olarak amperometrik sensör çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

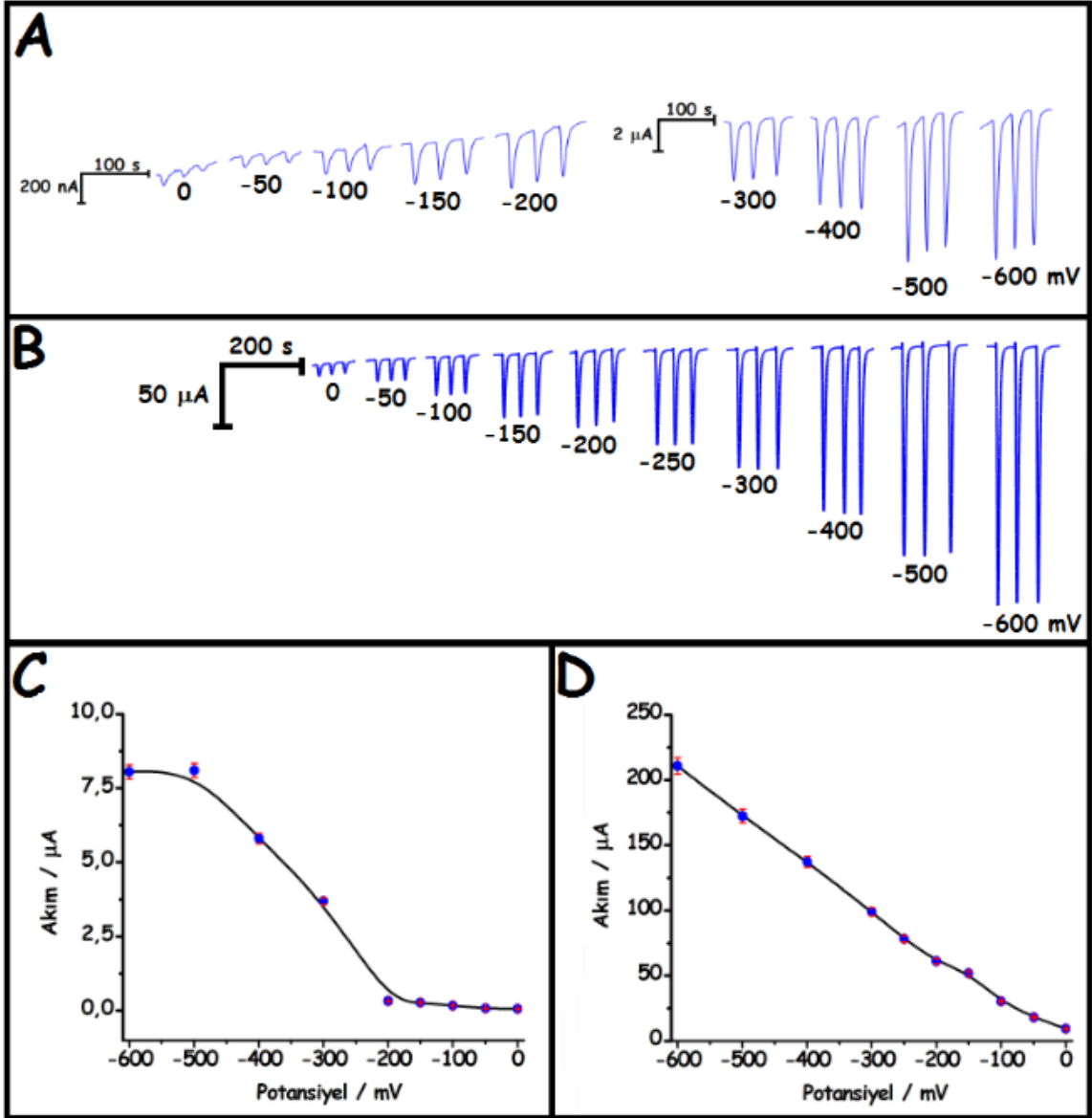
4.1.3.5.1. Uygulama Potansiyelinin Belirlenmesi

Pd/p.PGE'de 2,5 mM H₂O₂'nin FIA sistemine enjeksiyonuyla farklı anodik uygulama potansiyellerinde kaydedilen amperomogramlar Şekil 4.45'de verilmiştir. Anodik bölgede 0 ile 200 mV potansiyel aralığında katodik pikler görülmekle birlikte bu aralıkta uygulama potansiyeli arttıkça katodik piklerin şiddeti giderek azalmıştır. H₂O₂'ye ait anodik pik +250 mV'tan itibaren zayıf olarak görülmeye başlamıştır. Uygulama potansiyeli arttıkça anodik piklere ait akımsal yanıtın +600 mV'a kadar giderek arttığı görülmüştür. H₂O₂'nin yükseltgenmesinin aşırı gerilim gerektirmesi ve biyolojik olarak aktif bileşiklerin olası girişim etkisi gösterme olasılığı nedenlerinden dolayı, anodik pik yerine katodik pikin izlenerek H₂O₂ sensörünün geliştirilmesine karar verilmiştir.



Şekil 4.45. Pd/p.PGE'nin farklı uygulama potansiyel değerlerinde 2,5 mM H₂O₂'nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl ihtiva eden 0,10 M pH 7,0 PBS; akış hızı: 2,0 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: 100 μL; kolon uzunluğu: 10 cm)

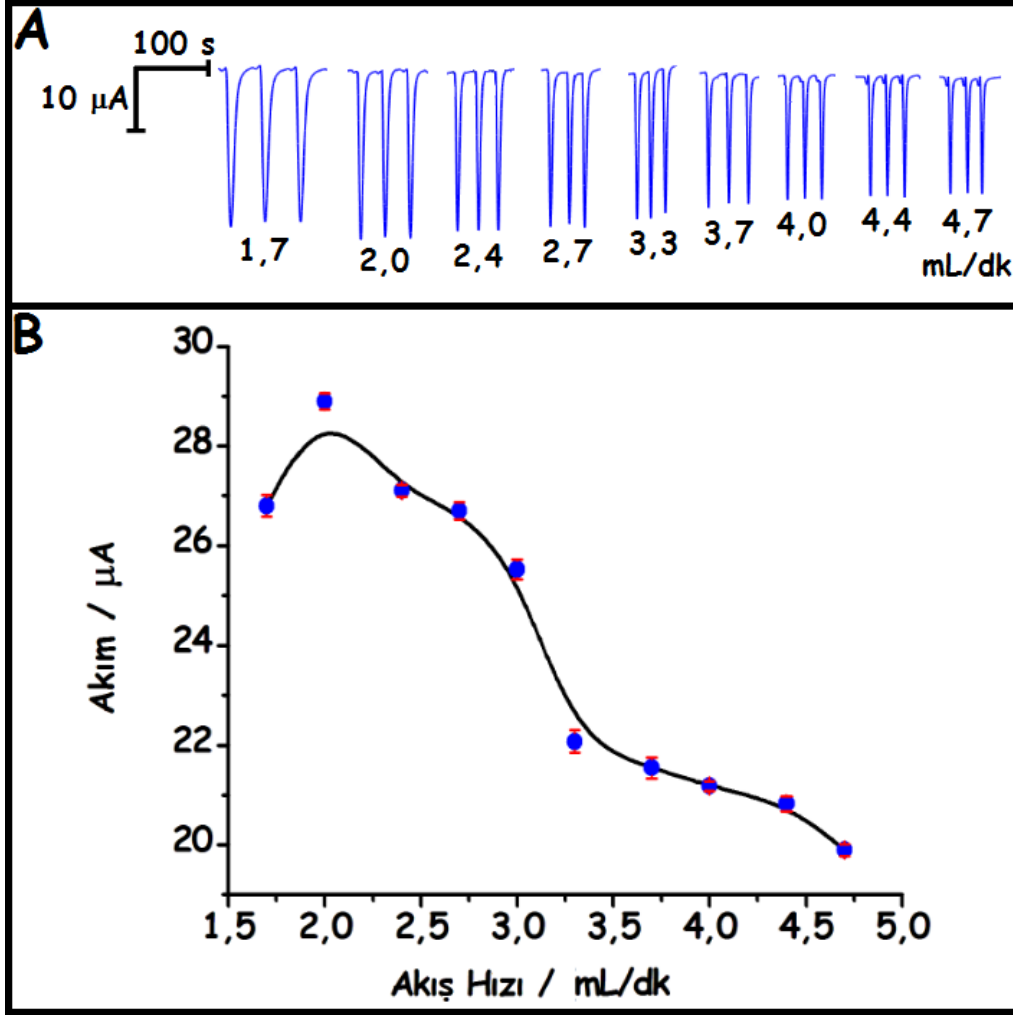
Benzer şekilde, hem p.PGE hem de Pd/p.PGE için farklı katodik uygulama potansiyellerinin, H₂O₂'nin amperometrik yanıtına etkileri incelenmiş ve iki elektrot için 2,5 mM H₂O₂'nin FIA sistemine enjeksiyonuyla farklı katodik uygulama potansiyellerinde kaydedilen amperomogramlar Şekil 4.46'da verilmiştir. p.PGE'de H₂O₂'nin indirgenmesine ait amperometrik yanıtın 0 mV ile -200 mV arasında sabitlenmiş, uygulanan potansiyelin -200 mV'tan -500 mV'a kadar kademeli olarak azaltılmasıyla büyük artış göstermiş ve -500 mV ile -600 mV arasında tekrar sabitlenmiştir (Şekil 4.46 A ve C). Modifiye elektrotta ise 0 mV'tan -600 mV'a kadar amperometrik yanıt orantısal olarak artmış, her bir uygulama potansiyelinde p.PGE'ye kıyasla daha yüksek amperometrik yanıtlar alındığı görülmektedir (Şekil 4.46 B ve D). Aşırı negatif potansiyelerde oksijenin indirgenmesinin H₂O₂'nin indirgenmesi üzerine girişim etkisinin çok yoğun olması, bu durumun sensörün seçiciliğini ve duyarlılığını etkilemesi ve -100 mV uygulama potansiyelinde p.PGE'ye göre oldukça yüksek yanıt alınmasından dolayı sonraki çalışmalara -100 mV uygulama potansiyeli kullanılarak devam edilmiştir.



Şekil 4.46. p.PGE (A ve C) ve Pd/p.PGE'nin (B ve D) farklı uygulama potansiyel değerlerinde 2,5 mM H₂O₂'nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (A ve B) (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 PBS; akış hızı: 2,0 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: 100 μL; kolon uzunluğu: 10 cm) ve bu amperomogramlardan elde edilen akım-potansiyel değişim grafikleri (C ve D)

4.1.3.5.2. Taşıyıcı Çözeltinin Akış Hızının Belirlenmesi

Şekil 4.47'de ise Pd/p.PGE'de 2,5 mM H₂O₂'nin FIA sisteminde farklı akış hızlarında kaydedilen amperomogramları ve akış hızına bağlı akım grafiğini göstermektedir. Şekillerden görüldüğü gibi H₂O₂'nin elektrokatalitik indirgenmesine en iyi amperometrik yanıtın alındığı akış hızı 2,0 mL/dk olarak belirlenmiş olup, sonraki çalışmalara bu akış hızı değeri kullanılarak devam edilmiştir.

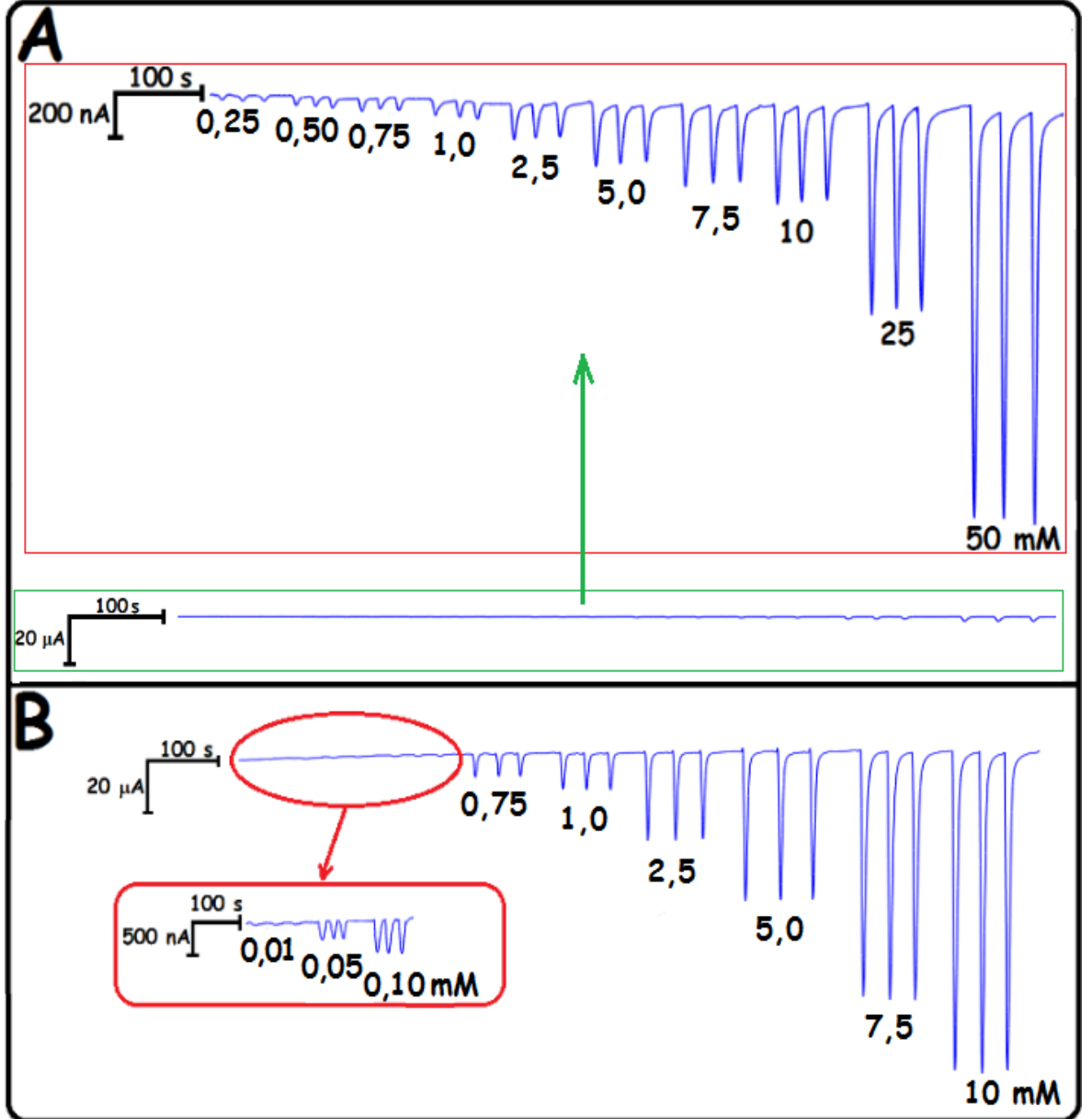


Şekil 4.47. Pd/p.PGE'nin farklı akış hızlarında 2,5 mM H₂O₂'nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (A) (Uygulama potansiyeli: -100 mV; taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren 0,1 M pH 7,0 PBS; örnek kolonunun hacmi: 100 μL; kolon uzunluğu: 10 cm) ve bu amperomogramlardan elde edilen akım-akış hızı değişim grafiği (B)

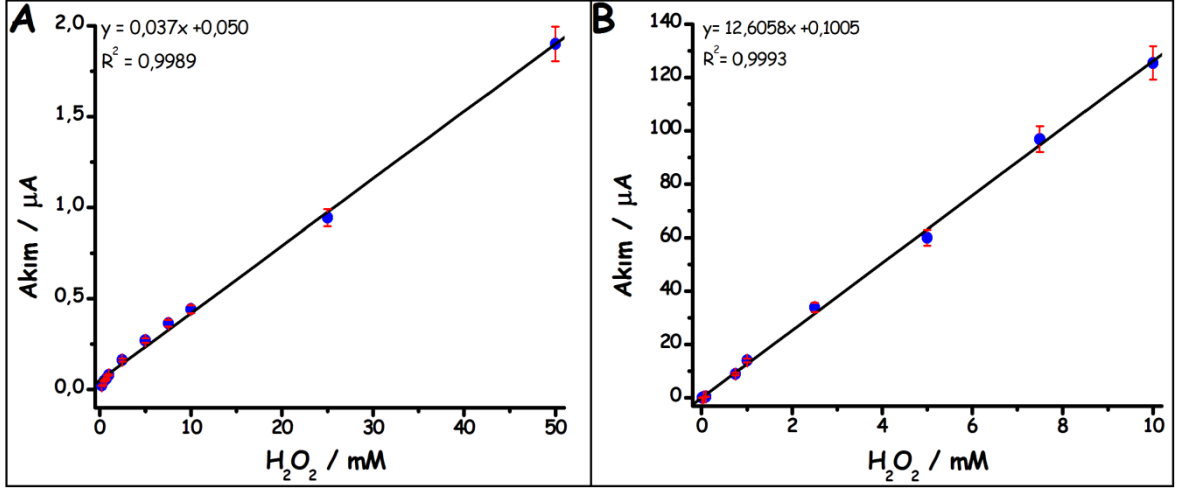
4.1.3.5.3. Analitiksel Parametrelerin Belirlenmesi

Hem p.PGE hem de Pd/p.PGE'nin optimize edilen koşullar altında (-100 mV uygulama potansiyelinde ve 2,0 mL/dk akış hızında) artan H₂O₂ derişimine bağlı FI amperomogramları Şekil 4.48'de ve bu amperomogramlardan elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 4.49'da verilmiştir. Yalın ve koşullandırılmış (p.PGE) elektrotta doğrusal aralık 0,25 mM – 50,0 mM H₂O₂ olup ($I(\mu A) = 0,037 C(mM) + 0,050$; $R^2 = 0,9989$), Pd/p.PGE'de 0,01 mM – 10 mM ($I(\mu A) = 12,6058 C(mM) + 0,1005$; $R^2 = 0,9993$) olarak bulunmuştur. Doğru denklemlerindeki eğimler oranlandığında ($m_{\text{modifiye}}/m_{\text{yalın}}$) Pd/p.PGE'nin p.PGE'ye göre yaklaşık 340 kat daha duyar olduğu tespit edilmiştir.

Pd/PGE'de H_2O_2 'nin sinyalinin net olarak görüldüğü en küçük derişiminin (0,01 mM) sisteme en az 10 kez enjekte edilmesi ile kaydedilen FI amperomogramlardan elde edilen pik akımlarına göre LOD $3,0 \mu M H_2O_2$, LOQ $10 \mu M H_2O_2$ ve duyarlık $79,28 \mu A mM^{-1} cm^{-2}$ olarak hesaplanmıştır.



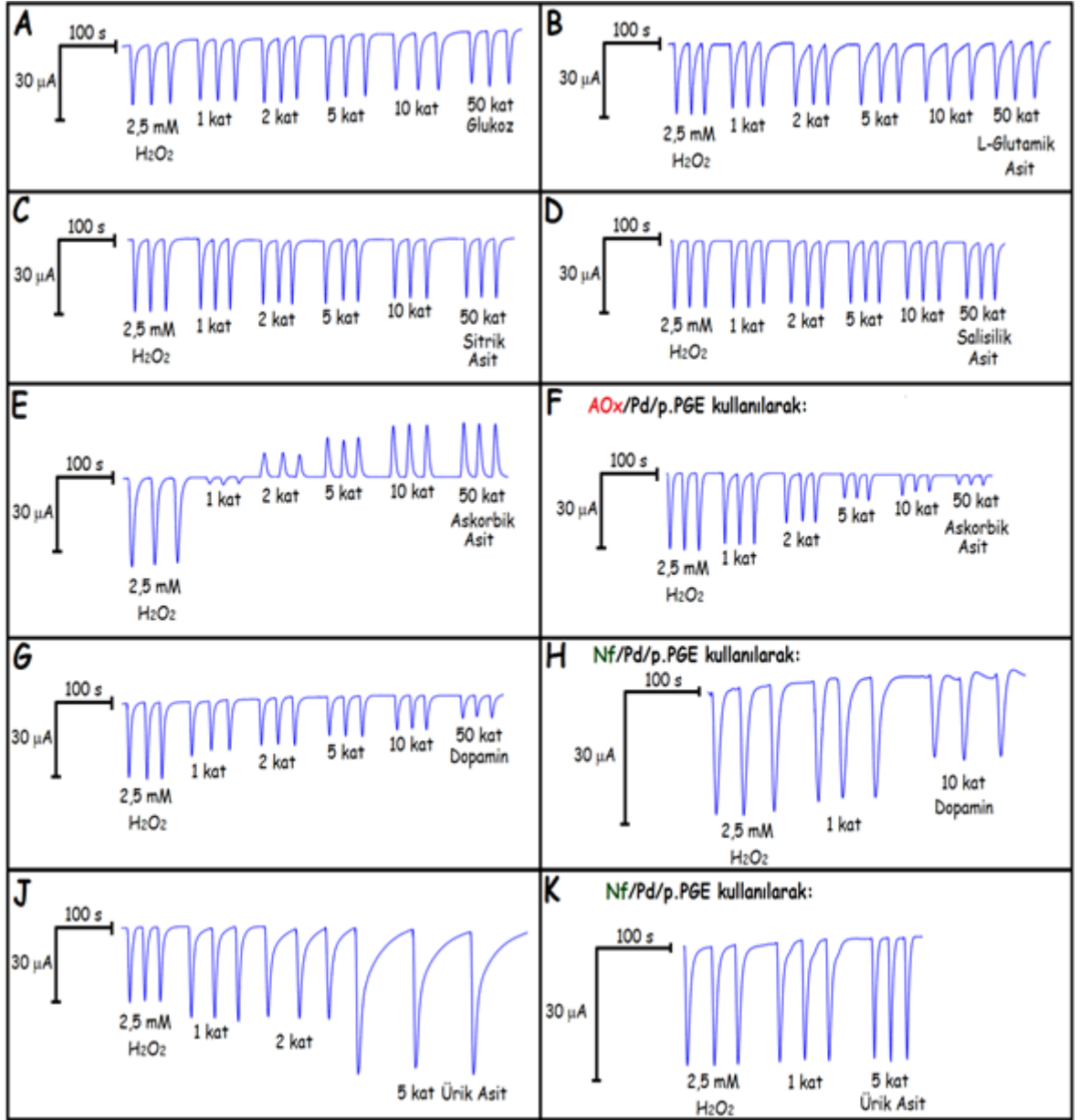
Şekil 4.48. p.PGE (A) ve Pd/p.PGE'nin (B) artan H_2O_2 derişimine bağı olarak FIA'da kaydedilen amperomogramları (Uygulama potansiyeli: -100 mV; akış hızı 2,0 mL/dk; taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 PBS; örnek kolonunun hacmi: 100 μL ; kolon uzunluğu: 10 cm)



Şekil 4.49. p.PGE (A) ve Pd/p.PGE'nin (B) artan H₂O₂ derişimlerine verdiği yanıtlara ait kalibrasyon grafikleri (A için 0,25 mM – 50 mM aralığında, $I(\mu A) = 0,037 C(mM) + 0,050$; $R^2 = 0,9989$ ve B için 0,01 mM – 10 mM H₂O₂ aralığında, $I(\mu A) = 12,6058 C(mM) + 0,1005$; $R^2 = 0,9993$)

4.1.3.5.4. Pd/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Sensörün Seçiciliğinin İncelenmesi

Pd/p.PGE için de farklı H₂O₂ (2,5 mM):girişimci molekül (GL, GLA, SA, SAL, AA, DA ve ÜA) oranlarında hazırlanan (1:0, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 ve 1:50) çözeltilerin optimize edilen koşullarda FI amperomogramları kaydedilmiş ve girişim etkileri değerlendirilmiştir. Her bir girişimci molekül için ayrı ayrı kaydedilen amperomogramlar Şekil 4.50'de verilmiştir. Çizelge 4.8'de ise herbir girişimci molekül için % değişimler, standart sapmaları ile birlikte verilmiştir.



Şekil 4.50. Pd/p.PGE’de 2,5 mM H₂O₂ göre artan oranlarda girişimci molekül (GL (A), GLA (B), SA (C), SAL (D), AA (E), AA (AOx/Pd/p.PGE kullanıldığında, F), DA (G), DA (Nf/Pd/p.PGE kullanıldığında, H), ÜA (J) ve ÜA (Nf/Pd/p.PGE kullanıldığında, K) içeren çözeltilerin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperogramlar (Şekil 4.47’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)

Akım-zaman eğrileri (Şekil 4.50) ve bu eğrilerden elde edilen veriler (Çizelge 4.8) incelendiğinde, H₂O₂’ye göre 5 kat GL ve SAL’nin eşdeğer (1:1) oranda GLA ve SA’nın, H₂O₂’nin indirgenme akımına etkisinin çok az olduğu ve bu girişimin de tüm oranlarda % 10 seviyelerinde olmasından dolayı dikkate alınacak değerde olmadığı sonucuna varılmıştır.

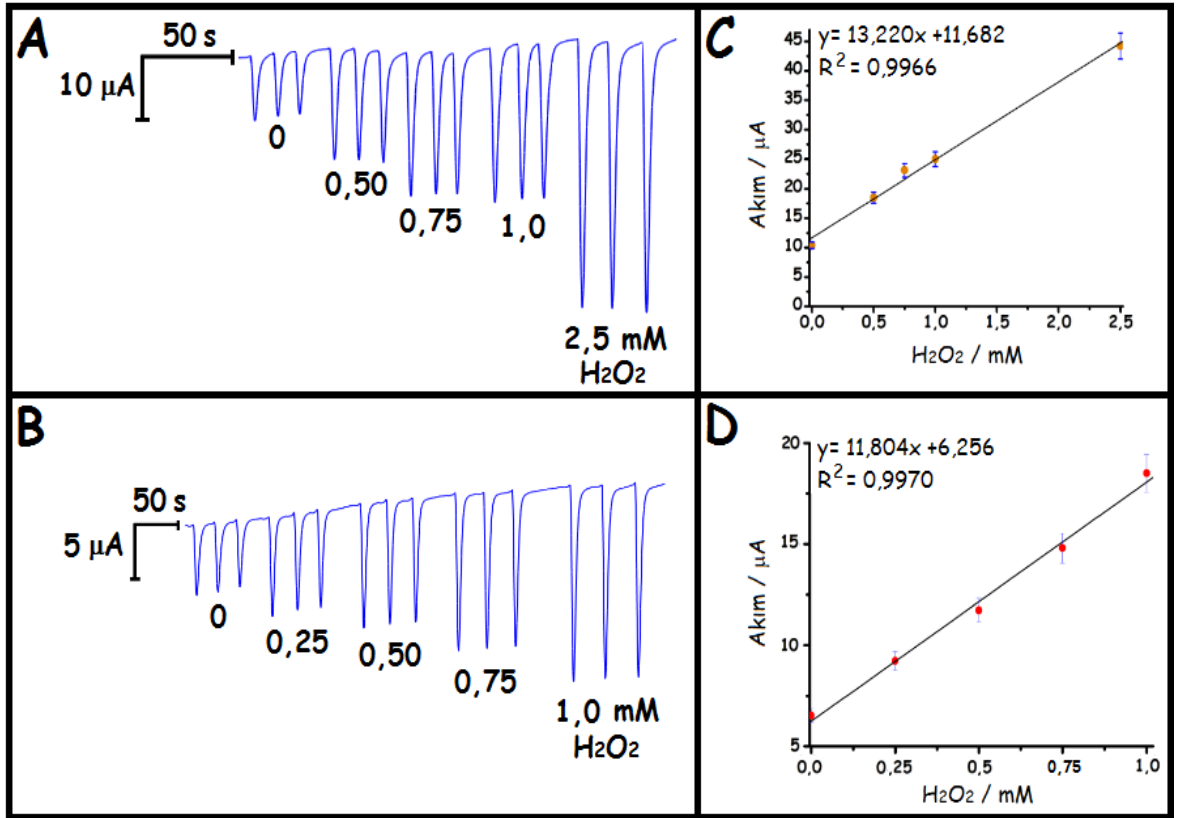
Çizelge 4.8 Her biri 2,5 mM sabit H₂O₂ içeren 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 ve 1:50 oranındaki girişimcilerin Pd/p.PGE’de H₂O₂’nin indirgenme pik akımına gösterdikleri değişimler (n=3)

H ₂ O ₂ ’nin İndirgenme Pik Akımındaki Değişimler (%)					
Girişimci Molekül	Glukoz:Girişimci oranı				
	1:1	1:2	1:5	1:10	1:100
GL	-6,9 ±0,38	-7,0 ±0,42	-7,2 ±0,17	-13,4 ±0,21	-13,5 ±0,45
GLA	-8,3 ±0,14	-12,4 ±0,11	-15,8 ±0,17	-17,8 ±0,15	-19,1 ±0,16
SA	-4,15 ±0,38	-15,4 ±0,33	-18,2 ±0,27	-20,2 ±0,03	-26,4 ±0,24
SAL	-5,1 ±0,46	-6,7 ±0,29	-10,3 ±0,30	-15,3 ±0,32	-18,4 ±0,30
AA	-91,9 ±0,05	-124,5 ±0,05	-148,5 ±0,19	-162,9 ±0,08	-163,5 ±0,08
AA (AOx)	-12,1 ±0,21	-36,3 ±0,29	-67,1 ±0,15	-74,9 ±0,45	-89,4 ±0,06
DA	-31,8 ±0,23	-38,6 ±0,19	-47,1 ±0,25	-62,9 ±0,18	-74,8 ±0,20
DA (Nf)	-8,1 ±0,12	-	-	-40,1 ±0,29	-
ÜA	+24,2 ±0,16	+25,8 ±0,24	+101 ±0,40	-	-
ÜA (Nf)	+1,54 ±0,12	-	+4,64 ±0,22	-	-

Diğer taraftan, eşdeğer derişimdeki AA ve DA’nın H₂O₂’nin indirgenme pik akımını azalttığı ve eşdeğer derişimdeki ÜA’nın H₂O₂’nin indirgenme pik akımını arttırdığı ve ciddi bir girişim etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. AA varlığından kaynaklı girişim etkisini azaltmak adına Pt/p.PGE’de olduğu gibi Pd/p.PGE yüzeyine AOx enzimi immobilize edilerek bu girişimci varlığında girişim testi tekrarlanmış ve özellikle eşdeğer derişim oranındaki girişim etkisinde ciddi bir azalma gözlenmiştir. Bu azalma, AA’nın O₂ varlığında elektrot yüzeyindeki AOx ile enzimatik tepkimeye girerek dehidro askorbata önyükseltgenmesinden kaynaklanmaktadır. Böylece H₂O₂’nin indirgenme akımını azaltıcı yönde etki eden AA’nın girişimi, önemli düzeyde giderilmiştir. Diğer taraftan, DA ve ÜA’dan kaynaklı girişim etkilerini gidermek için Pd/p.PGE yüzeyi nasyon (Nf) ile modifiye edilmiş ve DA ve ÜA’dan kaynaklı girişim etkileri eşdeğer oranda önemli ölçüde giderilmiştir. Nasyon yapısal olarak negatif yüklü olmasından dolayı, DA ve ÜA gibi negatif yüklü bileşikler bloke ederek elektrot yüzeyine yaklaşmasını engellediği ve etkisini azalttığı düşünülmektedir (Shin ve ark., 2018). Gerçekleştirilen girişim çalışmalarından, DA, AA ve ÜA içermeyen örneklerde Pd/p.PGE kullanılarak H₂O₂’nin FIA sisteminde seçici olarak tayin edilebileceği sonucuna varılmıştır.

4.1.3.5.5. Pd/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Sensörün H₂O₂ İçeren Örneklerle Uygulanması

Eczanelerde bulunabilen bir antiseptik çözeltideki (BIKAR Oksijenli Su, % 3 H₂O₂) ve kozmetik mağazalarında bulunabilen bir saç oksidasyon kremindeki (Wella Koleston, % 9 H₂O₂) H₂O₂ içerikleri analiz edilmiş ve böylece tasarlanan elektrokimyasal sensörün gerçek örneklerle uygulanabilirliği test edilmiştir. Bu amaçla, antiseptik çözelti için 0, 0,50, 0,75, 1,0 ve 2,5 mM H₂O₂ olacak şekilde standart içeren 1/1000 oranında taşıyıcı çözelti ile seyreltilmiş örnek çözeltileri ve saç ağartıcı krem için 0, 0,25, 0,50, 0,75 ve 1,0 mM H₂O₂ olacak şekilde standart içeren 1/5000 oranında taşıyıcı çözelti ile seyreltilmiş örnek çözeltileri FIA sistemine enjeksiyonuyla amperomogramları daha önce optimize edilen koşullar altında ayrı ayrı kaydedilmiş (Şekil 4.51 A ve B) ve standart katma grafikleri Şekil 4.51 C ve D’de verilmiştir.



Şekil 4.51. Antiseptik çözelti (1/1000 seyreltik) (A) ve saç ağartıcı krem (1/5000 seyreltik) (B) için hazırlanan standart çözeltilerinin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramlar ve elde edilen standart katma grafikleri (C için $I(\mu\text{A}) = 13,220 C(\text{mM}) + 11,682$ ve $R^2 = 0,9966$ ve D için $I(\mu\text{A}) = 11,804 C(\text{mM}) + 6,256$ ve $R^2 = 0,9970$) (Şekil 4.47’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)

Permanganometrik titrasyon metodu ile birlikte her iki metottan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9’da verilmiştir.

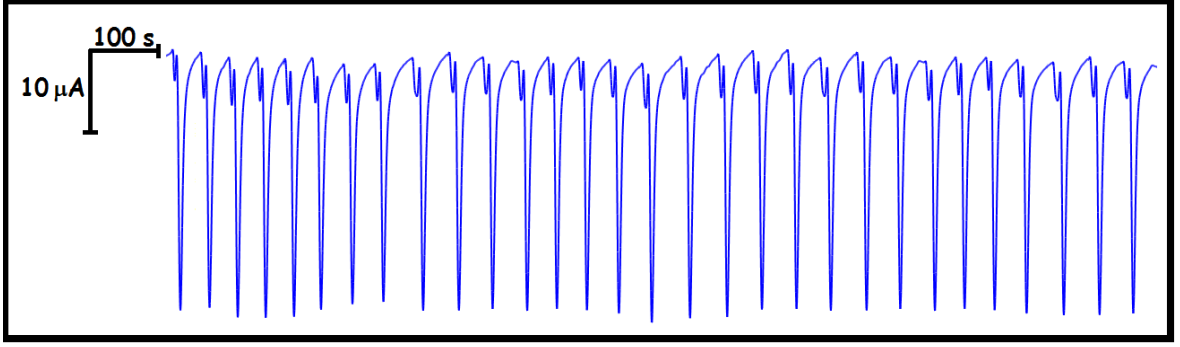
Çizelge 4.9. Antiseptik Çözeltide ve Saç Oksidasyon Kreminde tayin edilen H₂O₂’ye ait analiz sonuçları (n=5)

Örnek	Örneklerde Hesaplanan H ₂ O ₂ Derişimi	Bulunan H ₂ O ₂ derişimi	
		Pd/p.PGE kullanılarak FI Amperometrik Metod	Permanganometrik Titrasyon
Antiseptik Çözelti (% 3 H ₂ O ₂)	0,882 M	0,887 M ±0,015 t _{den} : 0,75 (P: 0,05, 4)	0,876 M ±0,016 t _{den} : 0,84 (P: 0,05, 4)
		F _{den} : 1,14 (P: 0,05, 4)	
Saç Oksidasyon Kremi (% 9 H ₂ O ₂)	2,65 M	2,64 M ±0,05 t _{den} : 0,45 (P: 0,05, 4)	2,61 M ±0,04 t: 2,24 (P: 0,05, 4)
		F _{den} : 1,56 (P: 0,05, 4)	
t _{kritik} : 2,78 (P: 0,05, 4), F _{kritik} : 6,39 (P: 0,05, 4, 4) (Douglas ve ark., 1988)			

Yapılan t-testinde 1 ve 2 numuneleri için 0,75 ve 0,45 olarak hesaplanan t_{den} değerleri 4 serbestlik derecesi için t_{kritik} değerden (2,78) (Douglas ve diğerleri, 1988) daha az olmasından dolayı X_{ort} ve μ arasında % 95 güven düzeyinde anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür. F-testi için iki yöntemin varyansları oranlandığında sırasıyla 1. ve 2. örnekler için hesaplanan F_{den-1}= 1,14 ve F_{den-2}=1,56 değerlerinin F_{kritik}= 6,39 (Douglas ve ark. 1988) değerinden daha az olmasından ötürü, yöntemlerin standart sapmaları arasındaki farkın ciddi seviyelerde olmadığı belirlenmiştir.

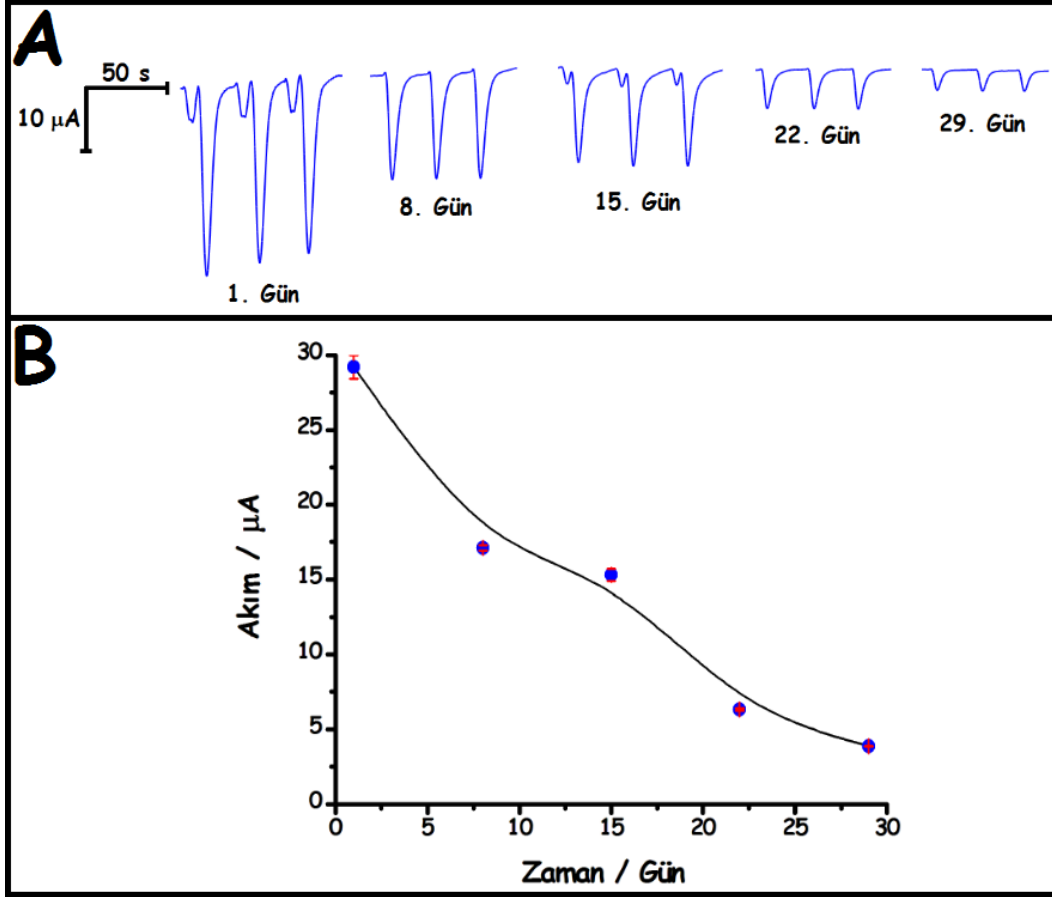
4.1.3.5.6. Pd/p.PGE’nin Tekrarlanabilirliğinin ve Kararlılığının Test Edilmesi

Au/p.PGE ve Pt/p.PGE’de olduğu gibi Pd/p.PGE’nin de tekrarlanabilirliği ve kararlılığı incelenmiştir. Elde edilen amperomogramlardan görüldüğü üzere pik akımlarında kayda değer bir değişim (30 ±0,30 μA ya da ± % 2,4 RSD) gözlenmemiştir (Şekil 4.52). Sonuç olarak, elektrodun yüzey etkinliği ve tekrarlanabilirliği oldukça yüksek olup, H₂O₂ çözeltisinin her enjeksiyonunda kararlı yanıtlar alınmıştır.



Şekil 4.52. Pd/p.PGE’de 2,5 mM H₂O₂ çözeltisinin sisteme ardışık 30 kez enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperogramları (Şekil 4.47’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)

Ayrıca, Pd/p.PGE’nin günler arası kararlılığını testi etmek için 2,5 mM H₂O₂ çözeltisinin sisteme günler arası üçer kez enjeksiyon edilmiş ve FIA sisteminde kaydedilen amperogramları ve pik akım değerleri hesaplanarak akımın zamana (gün) bağlı değişim grafiği Şekil 4.53 A ve B’de verilmiştir. Amperogramlar ve akım-zaman grafiği incelendiğinde, Au/p.PGE ve Pt/p.PGE’de görülen sonuçların tersine günler arasında H₂O₂’ye kararlı amperometrik yanıtlar alınamamıştır. Pd/p.PGE’nin kararlı olmaması ile birlikte elektrodun, gün içinde kullanıma uygun olduğu görülmektedir.



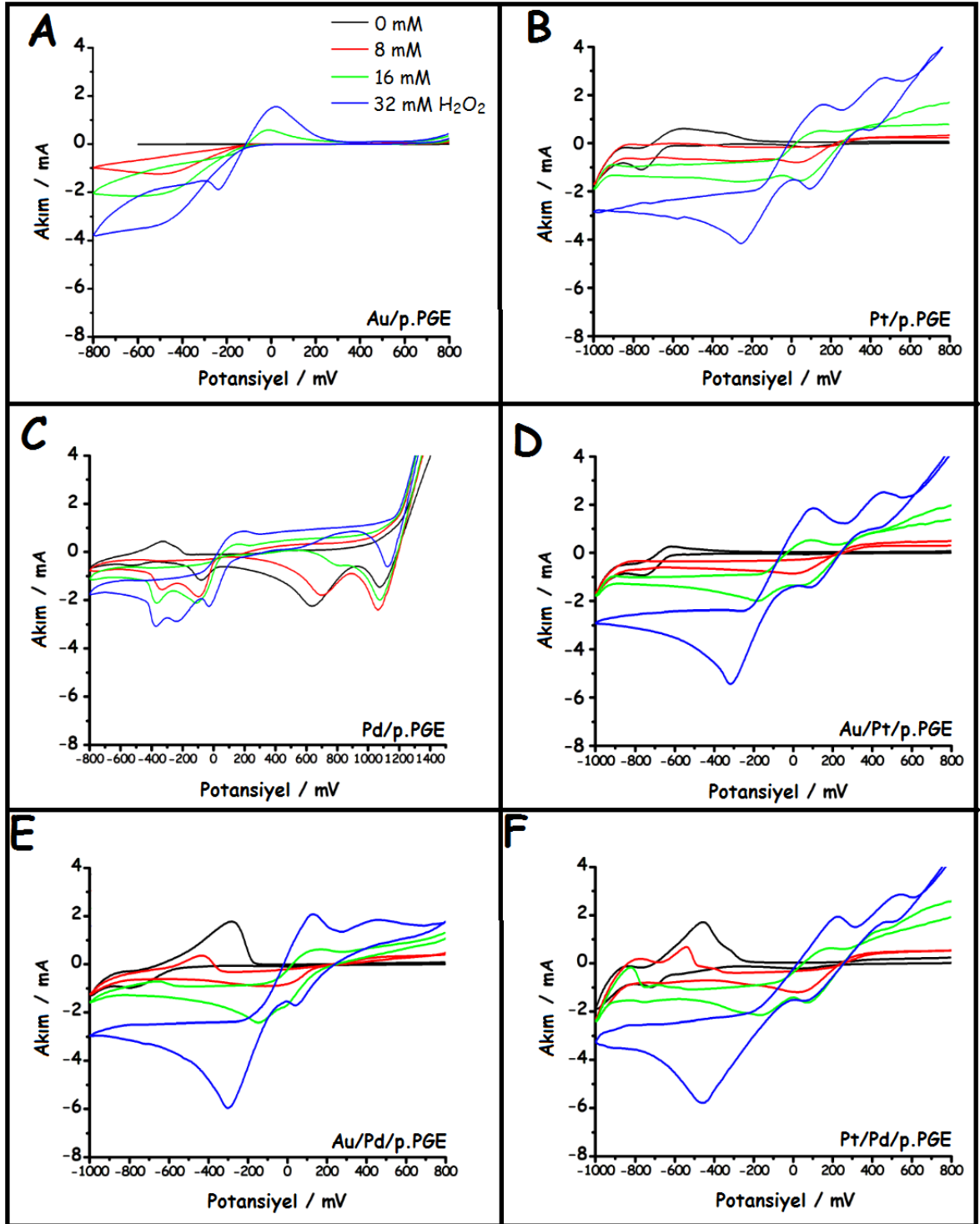
Şekil 4.53. A) Pd/p.PGE’de 2,5 mM H₂O₂ çözeltisinin günler arası üçer kez enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları ve B) akımın zamana (gün) bağlı değişimi (Şekil 4.47’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)

4.1.4. Bimetalik Nanoparçacık Modifiye p.PGE ile Gerçekleştirilen Çalışmalar

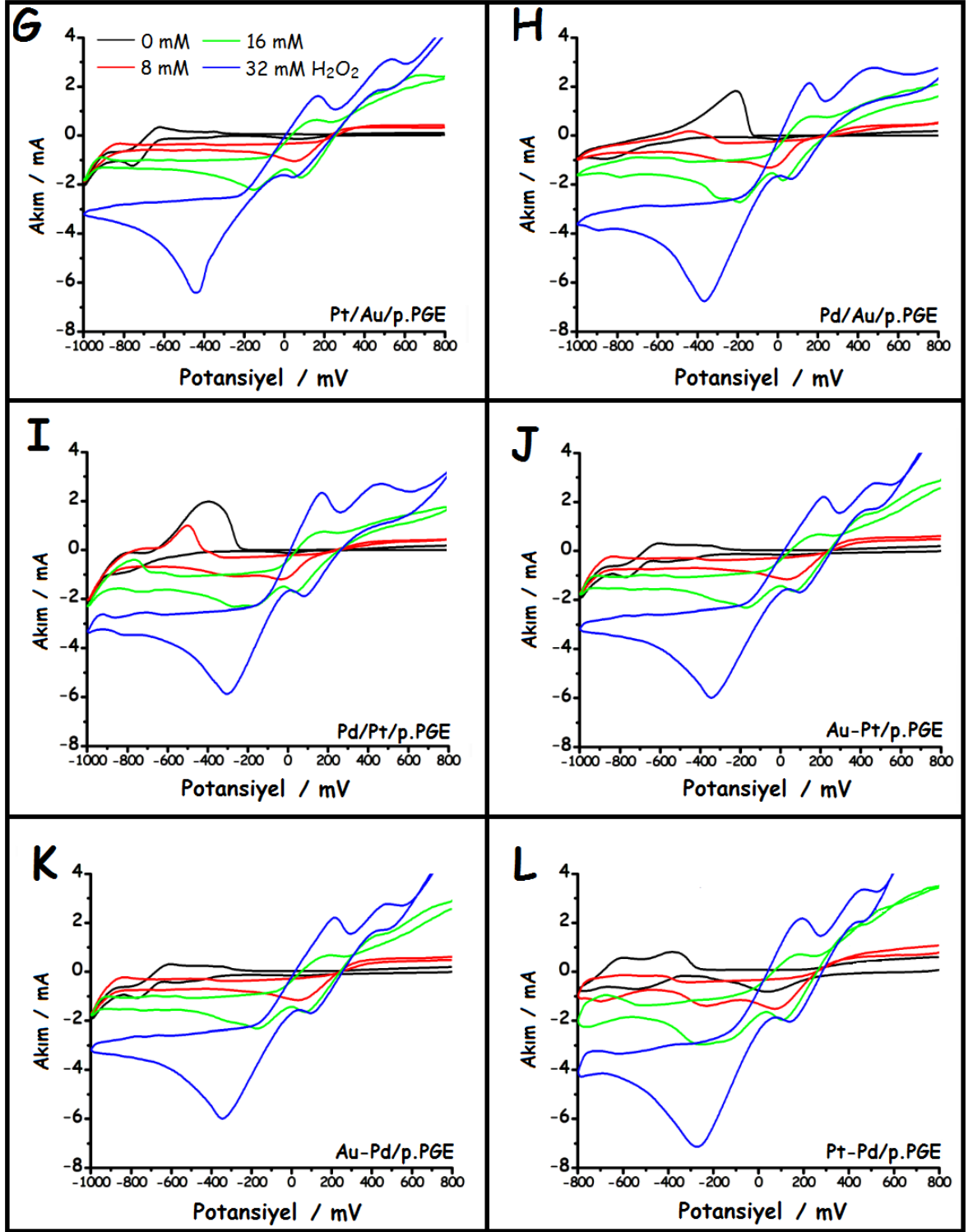
4.1.4.1. Bimetalik Nanoparçacık Modifiye p.PGE’lerin H₂O₂’ye Elektrokatalitik Yanıtının İncelenmesi

Metal içeren çözeltilerin (HAuCl₄, H₂PtCl₆ ve PdCl₂) CV’leri kaydedilerek bimetalik nanoparçacıklar p.PGE’ye hem ardışık (Metal₂ /Metal₁) ve hem de eşzamanlı (Metal₁-Metal₂) elektrokimyasal olarak biriktirilmiştir. Metal ve bimetalik nanoparçacık modifiye p.PGE’lerin 0,1 M pH 7,0 PBS’de artan H₂O₂ derişimine (0, 8, 16 ve 32 mM) bağlı kaydedilen CV’leri sırasıyla Şekil 4.54’de verilmiştir. p.PGE’de H₂O₂’nin indirgenme pikleri ve yükseltgenme pikleri pH 7,0 PBS’de sırasıyla -700 ve +1000 mV’da olmak üzere aşırı potansiyellerde gözlenmiştir (Şekil 4.44 A). p.PGE yüzeyi monometalik ve bimetalik nanoparçacıklarla modifiye edilerek kullanıldığında, H₂O₂’ye ait yükseltgenme ve indirgenme pikleri sırasıyla daha negatif ve daha pozitif potansiyellere kaymış ve pik şiddetleri artmıştır. Monometalik nanoparçacık modifiye elektrotlar ile kıyaslandığında,

bimetalik nanoparçacık modifiye elektrotların H_2O_2 'ye verdikleri yanıtların (özellikle indirgenmesine) monometalik türlerine göre oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.54 D-L). Bimetalik nanoparçacık modifiye p.PGE'lerle alınan yüksek yanıtların, H_2O_2 'nin indirgenmesine ve yükseltgenmesine gösterdikleri sinerjistik etkilerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca bimetalik nanoparçacık modifiye p.PGE'lerin 32 mM H_2O_2 'ye verdikleri yanıtlar kendi aralarında kıyaslandığında, H_2O_2 'nin bir kısmı +100 mV bir kısmı ise +400 mV'da yükseltgenmiş ve akım değerlerinde ciddi bir değişim olmamıştır. Diğer taraftan H_2O_2 'nin indirgenme pikleri incelendiğinde, pik potansiyellerinin metal nanoparçacık türlerine ve biriktirme sıralarına göre -250 mV ile -450 mV arasında değişkenlik gösterdiği görülmektedir. H_2O_2 'nin indirgenmesine en iyi yanıtın p.PGE yüzüne eş zamanlı biriktirilen Pt-Pd/p.PGE ile alındığı görülmekte olup, diğer monometalik ve bimetalik türlerine göre katodik pik daha pozitifte (-277 mV) kaymıştır (Şekil 4.54 L). Sonuç olarak, H_2O_2 'nin indirgenmesine en iyi elektrokatalitik etkinin ve yanıtın gözlemlendiği bimetal modifiye elektrot Pt-Pd/p.PGE olarak belirlenmiş ve bu elektrodun elektrokimyasal H_2O_2 sensör çalışmalarında kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.54. Au/p.PGE (A), Pt/p.PGE (B), Pd/p.PGE (C), Au/Pt/p.PGE (D), Au/Pd/p.PGE (E), Pt/Pd/p.PGE (F), Pt/Au/p.PGE (G), Pd/Au/p.PGE (H), Pd/Pt/p.PGE (I), Au-Pt/p.PGE (J), Au-Pd/p.PGE (K) ve Pt-Pd/p.PGE'nin (L) 0,10 M pH 7,0 PBS'de (siyah voltammogramlar), 8 mM (kırmızı voltammogramlar), 16 mM (yeşil voltammogramlar), 32 mM (mavi voltammogramlar) H_2O_2 varlığında kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50 mV/s)

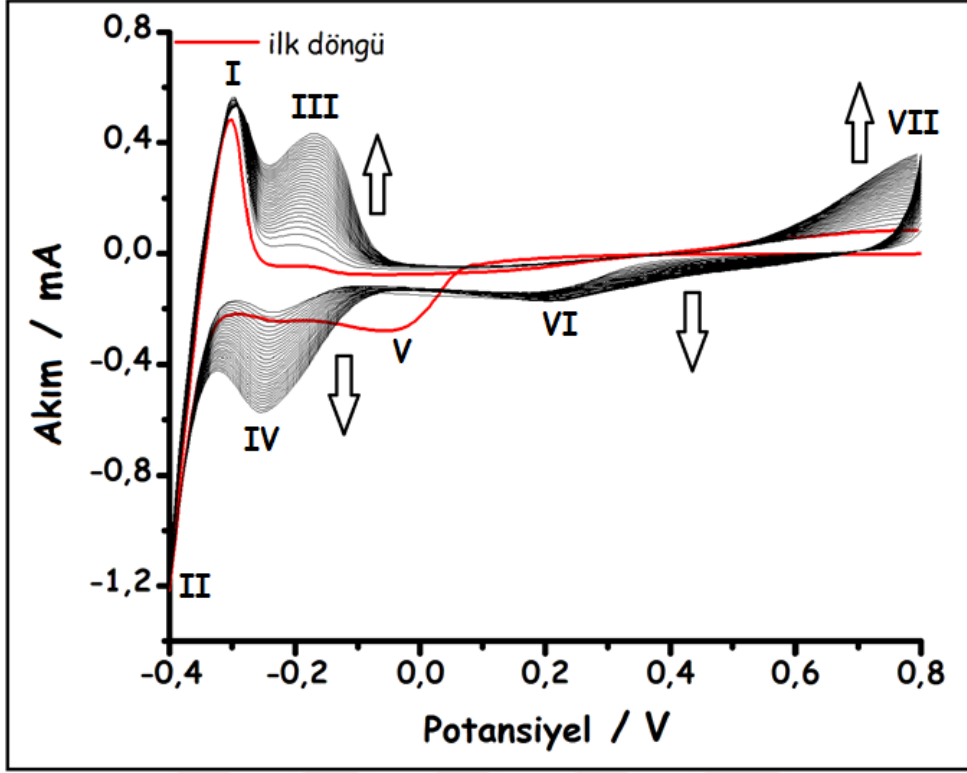


Şekil 4.54'ün devamı

4.1.4.2. Bimetalik (Pt-Pd) Nanoparçacıkların p.PGE Yüzeyine Eşzamanlı Biriktirilmesi

Bimetalik nanoparçacıkların (Pt-Pd) p.PGE yüzeyine eş zamanlı biriktirilmesi amacıyla 0,1 M KCl içerisinde 1 mM H₂PtCl₆ ve 1 mM PdCl₂ içeren biriktirme

çözeltisinin 30 döngü sayısında CV'leri kaydedilmiştir (Şekil 4.55). Böylece, elektrokimyasal indirgenme yoluyla Pt ve Pd nanoparçacıklar p.PGE yüzeyinde eş zamanlı biriktirilmiştir. Voltammogramın ilk döngüsünde (kırmızı ile gösterilen voltammogram) -300 mV (pik şeklinde, I) ve -400 mV'ta (artan akım şeklinde, II) indirgenmeye ait redoks tepkimeleri daha önce monometalik Pt'nin biriktirilmesinde bahsedildiği gibi sırasıyla $PtCl_6^{2-} \rightarrow PtCl_4^{2-}$ (II) ve $PtCl_4^{2-} \rightarrow Pt^0$ (I) indirgenme basamaklarına ait olduğu belirlenmiştir (Wang ve Lin, 2005; Anik ve ark., 2016). Ayrıca yine ilk döngüde -240 mV ile -200 mV'ta görülen çok küçük piklerin literatürde belirtildiği gibi sırasıyla Pd'nin hidrojenin adsorbsiyonuna/oluşumuna ve desorbsiyonuna (sıyrılmasına) ait olduğu belirlenmiştir (Zhou ve ark., 2011; Rasouli ve ark., 2016; Perini ve ark., 2014). Döngü sayısı arttıkça Pd'a ait gözlenen bu küçük pikler sırasıyla -165 mV (III) ve -250 mV (IV) potansiyellerine kaymış ve pik akımlarında artmalar gözlenmiştir. Ayrıca ilk döngüde -55 mV'ta gözlenen katodik pik (V), 2. döngüyle birlikte +215 mV'a (VI) kaymakla birlikte her döngüde pik şiddetinde artışlar görülmüştür. V. ve VI. pikler ile birlikte, +800 mV'da belirgin bir şekilde gözlenen pik (VII) metal oksitlerin oluştuğuna işaret etmektedir (Zhou ve ark., 2011; Rasouli ve ark., 2016; Perini ve ark., 2014). Her döngüde pik akımlarının artması ve pik konumlarındaki kaymalar, yüzeye Pt ve Pd nanoparçacıklarının p.PGE yüzeyinde eş zamanlı biriktiğini göstermektedir.

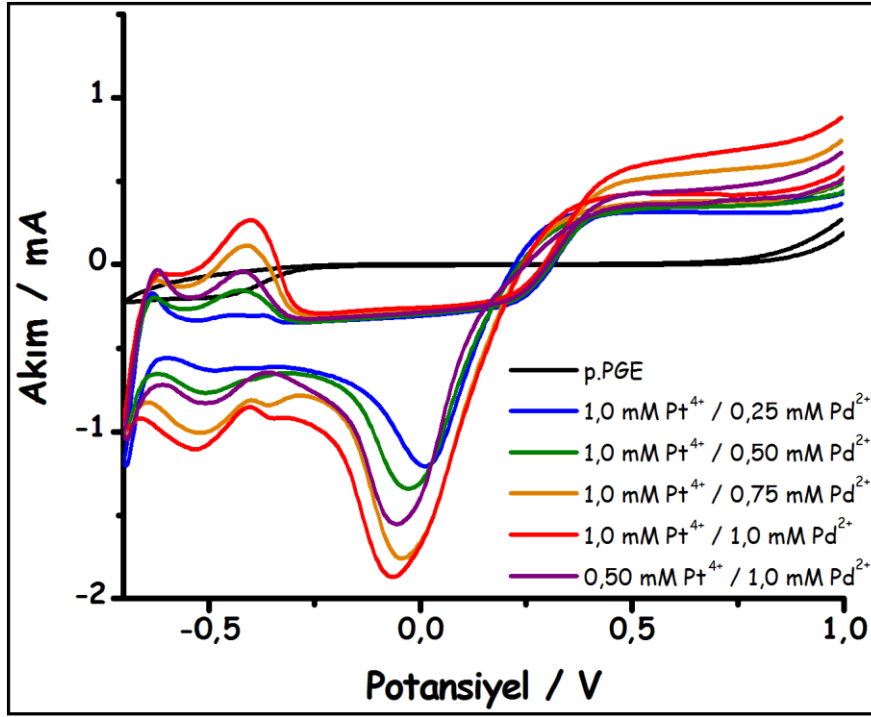


Şekil 4.55. p.PGE'nin 1,0 mM H_2PtCl_6 ve 1,0 mM $PdCl_2$ içeren Ar ile doyurulmuş 0,10 M KCl'de ardışık 30 döngü ile kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50 mV/s)

4.1.4.3. Pt-Pd/p.PGE'lerin Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

Metallerin eş zamanlı biriktirilmesi esnasında kullanılan metal iyonları derişimlerinin optimizasyonu, elde edilen Pt-Pd/p.PGE'lerin H_2O_2 'nin elektrokimyasal yanıtına etkisi incelenerek gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, farklı Pt^{4+}/Pd^{2+} derişimleri (1,0/0,25 mM; 1,0/0,50 mM; 1,0/0,75 mM; 1,0/1,0 mM; 0,50/1,0 mM) içerecek şekilde hazırlanan çözeltilerin CV'leri kaydedilerek ayrı ayrı Pt-Pd/p.PGE'ler hazırlanmış ve hazırlanan modifiye elektrotlarda 0,10 M pH 7,0 PBS ortamında 8 mM H_2O_2 'nin CV'leri kaydedilmiştir (Şekil 4.56). CV'ler incelendiğinde, Pt^{4+} derişimi sabit tutulup, Pd^{2+} derişimi arttırıldıkça H_2O_2 'nin indirgenme pikleri 0'dan 84 mV'ta doğru kaymış ve pik şiddetinde artışlar görülmüştür. Yükseltgenme piklerinin potansiyelinde (385 mV) ise ciddi bir değişim gözlenmemekle birlikte, Pd^{2+} oranının artmasıyla pik şiddetinin yine arttığı görülmektedir. Diğer taraftan, Pt^{4+} derişimi düşürölüp (0,50 mM), Pd^{2+} derişimi arttııkça (1,0 mM) H_2O_2 'nin yükseltgenmesine ve indirgenmesine yanıtların düştüğü görülmektedir. Pd/p.PGE'de olduğu gibi bu durumun, bimetalik nanoparçacıkların p.PGE yüzeyine eşzamanlı biriktirilmesi esnasında PdNP'lerin yığınsal olarak birikmesinden ileri geldiği ve bu nedenle H_2O_2 'nin yükseltgenmesine ve indirgenmesine olan yanıtları azalttığı

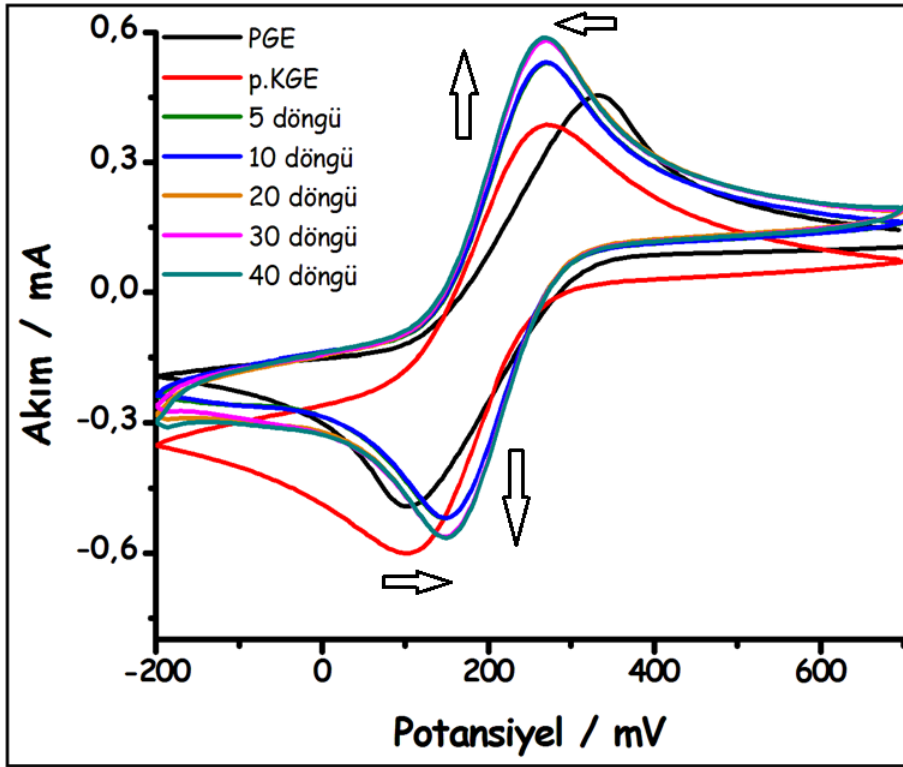
düşünülmektedir. Sonuç olarak, H_2O_2 'nin indirgenmesine ve yükseltgenmesine en iyi elektrokimyasal yanıtın, eşdeğer derişimlerde (Pt^{4+}/Pd^{2+} : 1,0/1,0 mM) hazırlanan metal çözeltisi ile hazırlanan Pt-Pd/p.PGE ile alındığı görülmüş ve sonraki çalışmalara eşdeğer derişimlerde (1,0 mM) H_2PtCl_6 ve $PdCl_2$ içeren metal çözeltisinden hazırlanan Pt-Pd/p.PGE'ler kullanılarak devam edilmiştir.



Şekil 4.56. Değişen Pt^{4+}/Pd^{2+} derişimlerinde (mavi: 1,0/0,25; yeşil: 1,0/0,50; turuncu: 1,0/0,75; kırmızı: 1,0/1,0 ve mor: 0,50/1,0 mM) hazırlanan Pt-Pd/p.PGE'lerle birlikte p.PGE'nin (siyah) 8 mM H_2O_2 ve 0,10 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 PBS'de kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50 mV/s)

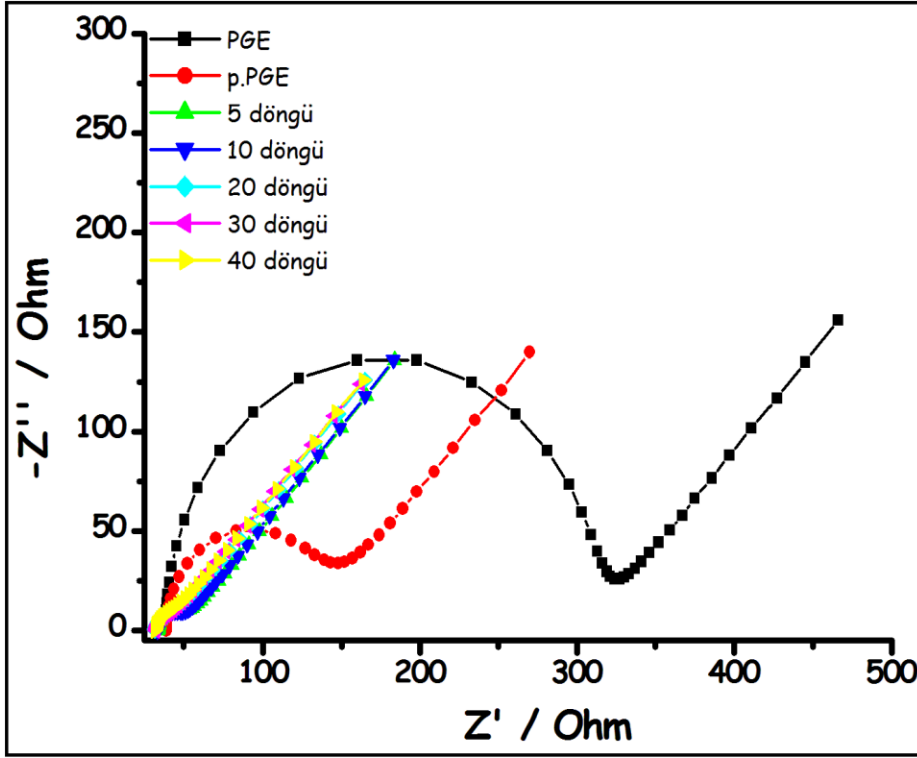
Monometalik nanoparçacık modifiye p.PGE'lerde olduğu gibi, elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayılı CV'lerin kaydedilmesiyle elde edilen Pt-Pd/p.PGE'lerin de $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks probu ortamında hem CV'leri hem de impedans eğrileri kaydedilmiştir. Elde edilen CV'ler Şekil 4.57'de verilmiştir. Döngü sayısının artmasıyla elde edilen elektrotlarda Pt-Pd yoğunluğu arttığından $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks çiftine ait piklerin potansiyellerinde kayma ve pik akımlarında artış gözlenmiştir. Ancak 30 döngü sayısından sonraki pik akım yüksekliklerinde çok önemli değişiklikler olmamıştır. Farklı döngü sayılarında hazırlanan herbir modifiye elektrot için anodik ve katodik pike ait potansiyel ve akım değerleri Çizelge 4.10'da verilmiştir. Pik akımlarının döngü sayısı ile

artmasının nedeni ise yüzeye eşzamanlı biriken Pt ve Pd yoğunluğunun artmasına ve bu nanoparçacıkların birlikte gösterdikleri sinerjistik etkiye bağlanmıştır.



Şekil 4.57. PGE, p.PGE ve elektrobiriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Pt-Pd/p.PGE'lerin 0,01 M $K_3[Fe(CN)_6]$, 0,01 M $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 0,10 M KCl destek çözeltisinde kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 50 mV/s)

Pt-Pd/p.PGE'lerin Şekil 4.3'deki devre modeline göre kaydedilen impedans eğrileri ise Şekil 4.58'de verilmiştir. Elektrokimyasal biriktirme esnasında kullanılan döngü sayısının artmasıyla R_{et} değerleri azalmış, özellikle 20. ve 40. döngüler arasında bu değerler neredeyse sabitlenmiştir. Dolayısıyla iletkenlik biriken Pt-Pd yoğunluğundan dolayı artmıştır. Yalnız PGE ile birlikte herbir elektrot için elde edilen R_{et} değerleri Çizelge 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.58. PGE, p.PGE ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Pt-Pd/p.PGE'lerin 0,01 M $K_3[Fe(CN)_6]$, 0,01 M $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 0,10 M KCl destek çözeltisinde kaydedilen impedans eğrileri (Uygulanan frekans aralığı: 10^5 Hz – 10^{-1} Hz; uygulanan potansiyel: +170 mV; sinüsodiyal sinyal: 5 mV)

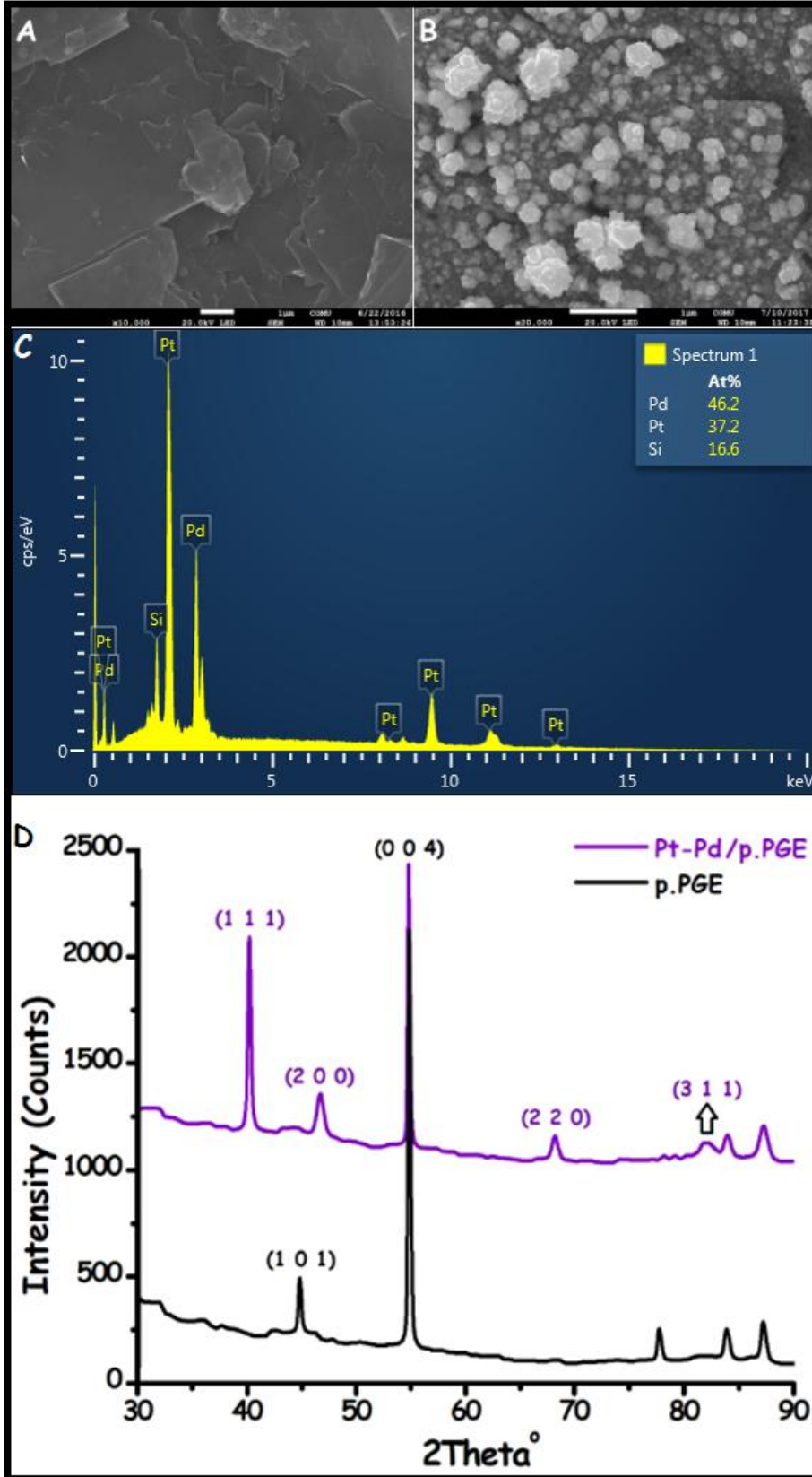
Çizelge 4.10. Yalın PGE, p.PGE ve elektrokimyasal biriktirme esnasında farklı döngü sayıları kullanılarak elde edilen Pt-Pd/p.PGE'lerin $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks probu ortamında kaydedilen impedans eğrileri ve CV'lerinden çıkarılan veriler (n=3)

Elektrot	E_a (mV)	E_k (mV)	ΔE_p (mV)	I_{pa} (μA)	I_{pk} (μA)	R_{et} (ohm)
PGE	335	100	235	$470 \pm 1,0$	$443 \pm 2,4$	$285 \pm 6,4$
p.PGE	305	105	200	$519 \pm 5,2$	$445 \pm 2,4$	$114 \pm 0,6$
Pt-Pd/p.PGE/ 5 Döngü	270	150	120	$540 \pm 6,9$	$456 \pm 4,1$	$47 \pm 0,4$
Pt-Pd/p.PGE/ 10 Döngü	270	150	120	$546 \pm 6,6$	$458 \pm 8,2$	$45 \pm 0,5$
Pt-Pd/p.PGE/ 20 Döngü	270	150	120	$586 \pm 4,9$	$478 \pm 5,4$	$13 \pm 0,2$
Pt-Pd/p.PGE/ 30 Döngü	270	150	120	$591 \pm 5,1$	$510 \pm 8,9$	$10 \pm 0,1$
Pt-Pd/p.PGE/ 40 Döngü	270	150	120	$596 \pm 1,1$	$518 \pm 4,1$	$9,0 \pm 0,2$

4.1.4.4. Pt-Pd/p.PGE'nin Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesi

Elektrokimyasal biriktirme esnasında ardışık 30 döngü ile CV'lerin kaydedilmesiyle hazırlanan Pt-Pd/p.PGE'nin, p.PGE ile birlikte kaydedilen SEM görüntüleri Şekil 4.59'da verilmiştir. p.PGE'nin tabakalar şeklindeki düz yüzeyine (Şekil 4.59 A), Pt-Pd bimetalik nanoparçacıkların p.PGE yüzeyine kristal tanecikler şeklinde biriktiği SEM

görüntülerinden anlaşılmaktadır (Şekil 4.59 B). Bir önceki bölümde redoks probu ortamında kaydedilen CV'ler ve impedans eğrilerinden elde edilen verilerin SEM görüntüleri ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Elektrokimyasal biriktirme esnasında 30 döngü ile elde edilen Pt-Pd/p.PGE'nin EDX spektrumu ve bu elektrot ile birlikte p.PGE'nin XRD spektrumları Şekil 4.59 C ve D'de verilmiştir. EDX spektrumunda görüldüğü gibi Pt-Pd/p.PGE için Pt % 37,2, Pd % 46,2 ve Si % 16,6 bulunmuştur (Şekil 4.59 C). p.PGE ve Pt-Pd/p.PGE'nin XRD spektrumları (Şekil 4.59 D) karşılaştırıldığında ise p.PGE'den farklı olarak modifiye elektrodun XRD spektrasında $40,09^\circ$ ve $46,36^\circ$ 'da konumlanan yayılım piklerinin Pt ve Pd'nin her ikisi için de (1 1 1) ve (2 0 0) kübik kristal yapılarından kaynaklandığı tespit edilmiştir. Ayrıca, $68,23^\circ$ ve $82,00^\circ$ 'da farklılık arz eden yayılım piklerinin literatürde belirtildiği gibi sırasıyla Pd (2 2 0) ve Pt (3 1 1)'nin kübik kristal yapılarına ait olduğu belirlenmiştir (Sen ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2016c). Yüzey morfoloji çalışmalarında elde edilen tüm sonuçlar, Pt ve Pd nanoparçacıklarının p.PGE yüzeyine eş zamanlı olarak biriktiğini göstermektedir.



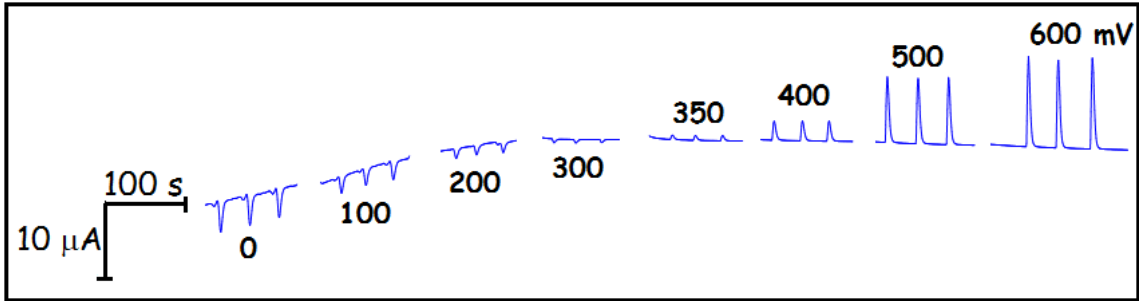
Şekil 4.59. A) p.PGE (1 μm x5000) ve B) elektrokimyasal biriktirme esnasında ardışık 30 döngü ile elde edilen Pt-Pd/p.PGE'nin (100 nm x40000) SEM görüntüleri, C) Pt-Pd/p.PGE'nin EDX ve D) p.PGE (siyah) ile Pt-Pd/p.PGE'nin (mor) XRD spektrumları

4.1.4.5. Pt-Pd/p.PGE ile FIA Sisteminde Gerçekleştirilen Çalışmalar

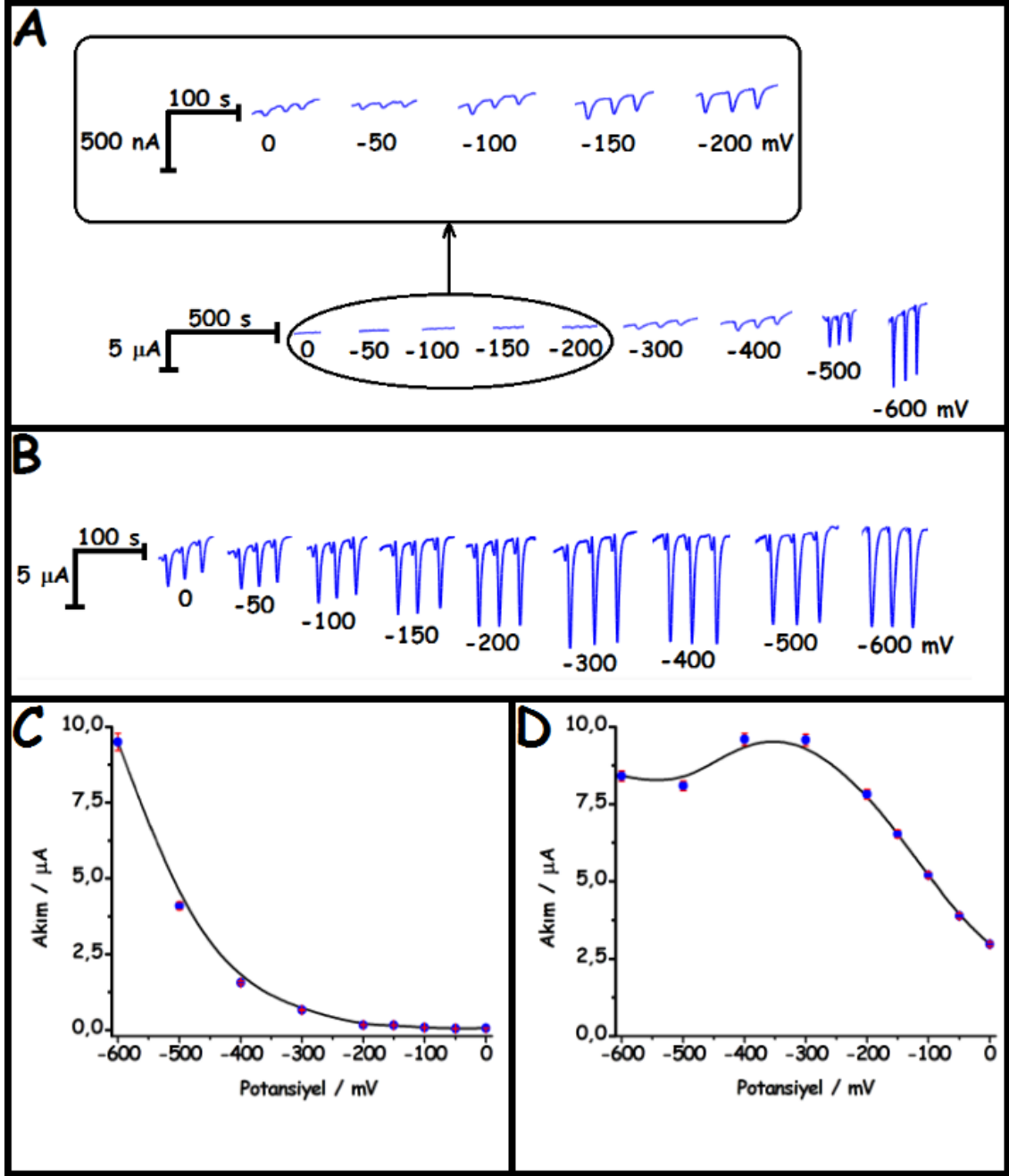
FIA sisteminde Pd/p.PGE’de olduğu gibi bu elektrot için H_2O_2 ’nin indirgenmesine bağlı olarak amperometrik sensör çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.1.4.5.1. Uygulama Potansiyelinin Belirlenmesi

Pt-Pd/p.PGE’de $100 \mu M$ H_2O_2 ’nin FIA sistemine enjeksiyonuyla farklı anodik uygulama potansiyellerinde kaydedilen amperomogramları Şekil 4.60’da verilmiştir. p.PGE ile birlikte Pt-Pd/p.PGE’nin farklı katodik uygulama potansiyellerinde $100 \mu M$ H_2O_2 ’nin FIA sistemine enjeksiyonuyla kaydedilen amperomogramları ve her iki elektrot için elde edilen potansiyel akım grafikleri ise Şekil 4.61’de verilmiştir. Şekil 4.61 A ve C’de görüldüğü gibi p.PGE’de uygulama potansiyeli 0 mV’tan -200 mV’a değişikçe H_2O_2 ’nin indirgenmesine ait çok küçük pikler görülmüş ve -300 mV’tan itibaren daha belirgin gözlenen piklerin şiddeti -600 mV’a doğru gidildikçe ciddi oranlarda artmıştır. Modifiye elektrotta ise 0 mV’tan -300 mV’a kadar amperometrik yanıt orantısal olarak artmış, -300 mV ile -400 mV aralığında sabitlenmiş ve -600 mV’a kadar küçük de olsa azalmalar görülmüştür (Şekil 4.61 B ve D). Aşırı negatif potansiyellerde oksijenin indirgenmesinin, H_2O_2 ’nin indirgenmesi üzerine pozitif girişim etkisinin çok yoğun olması, bu durumun sensörün seçiciliğini ve duyarlılığını etkilemesi ve -100 mV uygulama potansiyelinde p.PGE’ye göre oldukça yüksek yanıt alınmasından dolayı sonraki çalışmalara -100 mV uygulama potansiyeli kullanılarak devam edilmiştir.



Şekil 4.60. Pt-Pd/p.PGE’nin farklı anodik uygulama potansiyel değerlerinde $100 \mu M$ H_2O_2 ’nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 PBS; akış hızı: 2,0 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: $100 \mu L$; kolon uzunluğu: 10 cm)

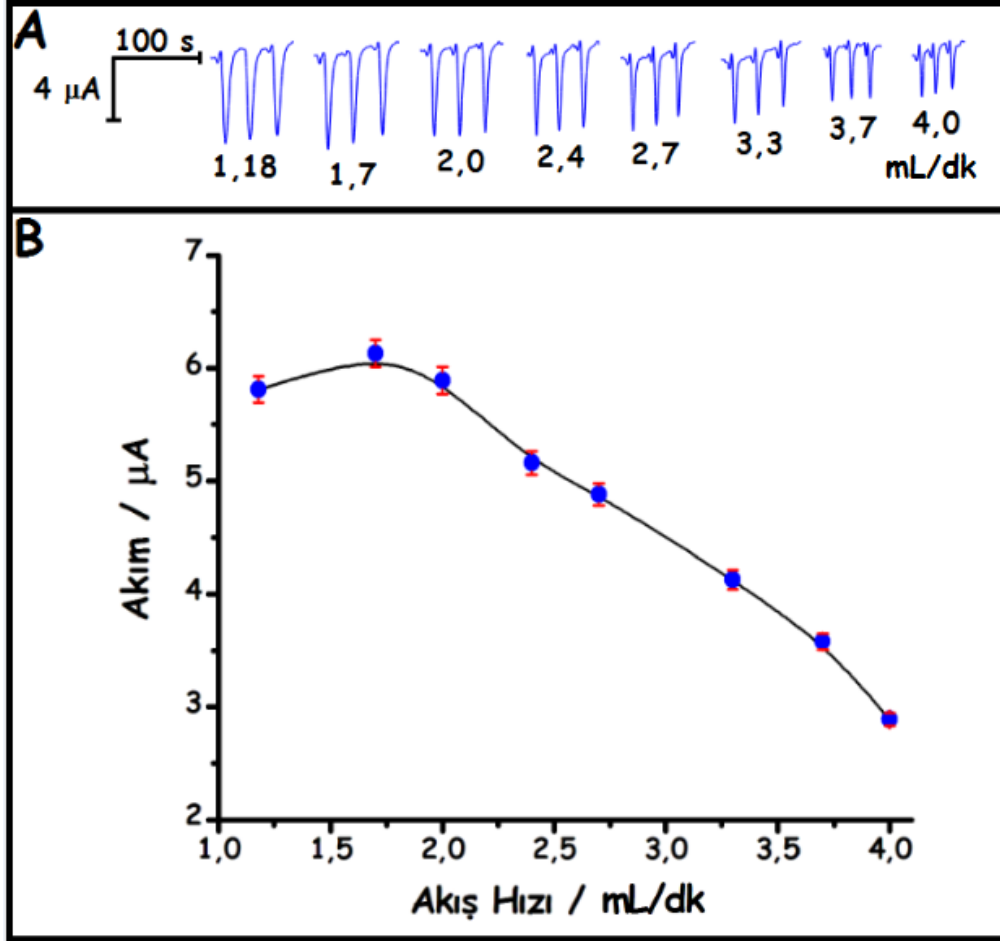


Şekil 4.61. p.PGE (A ve C) ve Pt-Pd/p.PGE'nin (B ve D) farklı uygulama potansiyel değerlerinde 100 μM H_2O_2 'nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (A ve B) (Taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 PBS; akış hızı: 2,0 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: 100 μL ; kolon uzunluğu: 10 cm) ve bu amperomogramlardan elde edilen akım-potansiyel değişim grafikleri (C ve D)

4.1.4.5.2. Taşıyıcı Çözeltinin Akış Hızının Belirlenmesi

Şekil 4.62'de Pt-Pd/p.PGE'de 100 μM H_2O_2 'nin FIA sisteminde farklı akış hızlarında kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.62 A) ve akış hızına bağlı akım grafiği

(Şekil 4.62 B) verilmiştir. Şekillerden görüldüğü gibi H₂O₂'nin elektrokatalitik indirgenmesine en iyi amperometrik yanıtın alındığı akış hızı 1,7 mL/dk olarak belirlenmiş ve sonraki çalışmalara bu akış hızı değeri kullanılarak devam edilmiştir.



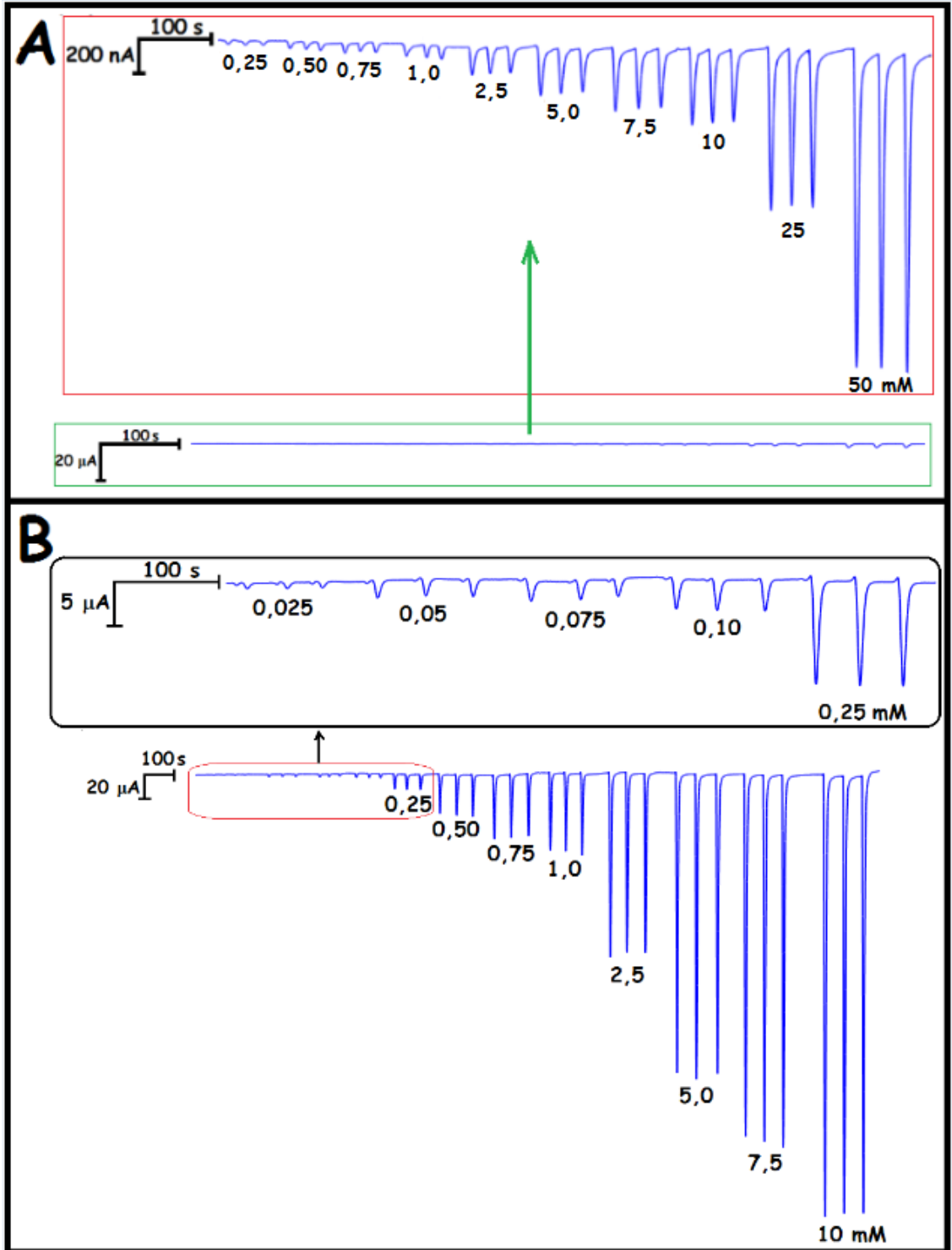
Şekil 4.62. Pt-Pd/p.PGE'nin farklı akış hızlarında 100 µM H₂O₂'nin 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA'da kaydedilen amperomogramları (A) (Uygulama potansiyeli: -100 mV; taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 PBS; akış hızı: 2,0 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm) ve bu amperomogramlardan elde edilen akım-akış hızı değişim grafiği (B)

4.1.4.5.3. Analitiksel Parametrelerin Belirlenmesi

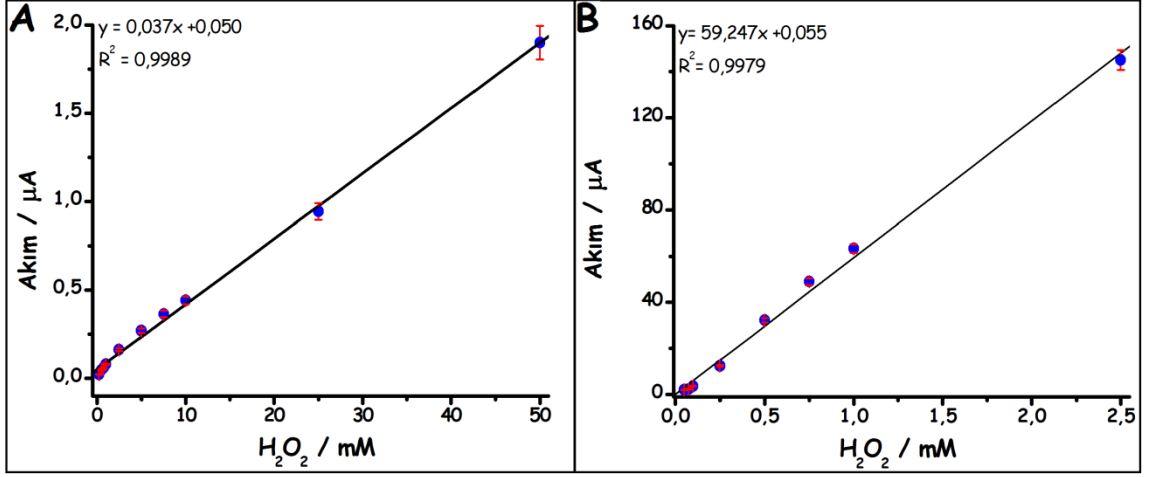
Hem p.PGE hem de Pt-Pd/p.PGE'nin optimize edilen koşullar altında (-100 mV uygulama potansiyelinde ve 1,7 mL/dk akış hızında) artan H₂O₂ derişimine bağlı FI amperomogramları Şekil 4.63'de ve bu amperomogramlardan elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 4.64'de verilmiştir. Yalın ve koşullandırılmış (p.PGE) elektrotta doğrusal aralık 0,25 mM – 50,0 mM H₂O₂ olup ($I(\mu\text{A}) = 0,037 C(\text{mM}) + 0,050$; $R^2 = 0,9989$), Pt-Pd/p.PGE'de 0,025 mM – 2,5 mM ($I(\mu\text{A}) = 59,247 C(\text{mM}) + 0,055$; $R^2 = 0,9979$) olarak

bulunmuştur. Doğru denklemlerindeki eğimler oranlandığında ($m_{\text{modifiye}}/m_{\text{yalın}}$) Pt-Pd/p.PGE'nin p.PGE'ye göre yaklaşık 1600 kat daha duyar olduğu tespit edilmiştir. Pt-Pd/PGE'de H_2O_2 'nin sinyalinin net olarak görüldüğü en küçük derişiminin (0,025 mM) sisteme en az 10 kez enjekte edilmesi ile kaydedilen FI amperomogramlardan elde edilen pik akımlarına göre LOD 5,7 μM H_2O_2 , LOQ 19,1 μM H_2O_2 ve duyarlık 372,62 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ olarak hesaplanmıştır.





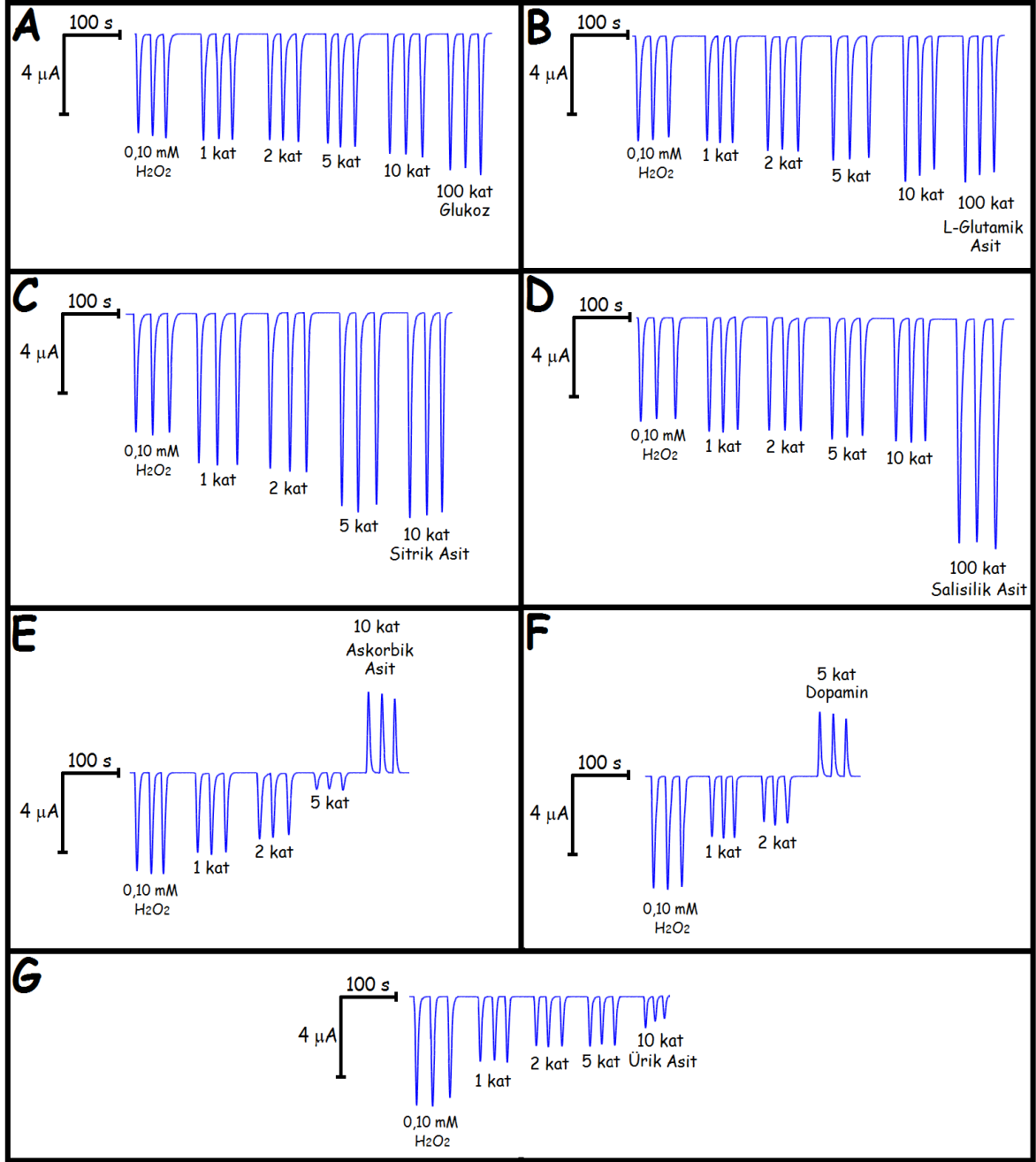
Şekil 4.63. p.PGE (A) ve Pt-Pd/p.PGE'nin (B) artan H_2O_2 derişimine bağlı olarak FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Uygulama potansiyeli: -100 mV; akış hızı 1,7 mL/dk; taşıyıcı çözelti: 1,0 M KCl içeren 0,10 M pH 7,0 PBS; örnek kolonunun hacmi: 100 μ L; kolon uzunluğu: 10 cm)



Şekil 4.64. p.PGE (A) ve Pt-Pd/p.PGE'nin (B) artan H_2O_2 derişimlerine verdiği yanıtla ait kalibrasyon grafikleri (A için 0,25 mM – 50 mM aralığında, $I(\mu\text{A}) = 0,037 C(\text{mM}) + 0,050$; $R^2 = 0,9989$ ve B için 0,025 mM – 2,5 mM H_2O_2 aralığında, $I(\mu\text{A}) = 59,247 C(\text{mM}) + 0,055$ ve $R^2 = 0,9979$)

4.1.4.5.4. Pt-Pd/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Sensörün Seçiciliğinin İncelenmesi

Pt-Pd/p.PGE için de farklı H_2O_2 (100 μM):girişimci molekül (GL, GLA, SA, SAL, AA, DA ve ÜA) oranlarında hazırlanan (1:0, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 ve 1:100) çözeltilerin Şekil 4.62'de optimize edilen koşullarda FI amperomogramları kaydedilmiş ve girişim etkileri değerlendirilmiştir. Her bir girişimci molekül için ayrı ayrı kaydedilen amperomogramlar Şekil 4.65'de verilmiştir. Çizelge 4.11'de ise her bir girişimci molekül için % değişimler, standart sapmaları ile birlikte verilmiştir.



Şekil 4.65. Pt-Pd/p.PGE’de 100 μM H_2O_2 göre artan oranlarda girişimci molekül (GL (A), GLA (B), SA (C), SAL (D), AA (E), DA (F) ve ÜA (G)) içeren çözeltilerin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramlar (Şekil 4.62’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)

Akım-zaman eğrileri (Şekil 4.65) ve bu eğrilerden elde edilen veriler (Çizelge 4.11) incelendiğinde, H_2O_2 ’ye göre 5 kat GL, 2 kat GLA ve SAL’nin, H_2O_2 ’nin indirgenme akımına etkisinin çok az olduğu ve bu girişimin de tüm oranlarda %10 seviyelerinde olmasından dolayı dikkate alınacak değerde olmadığı sonucuna varılmıştır.

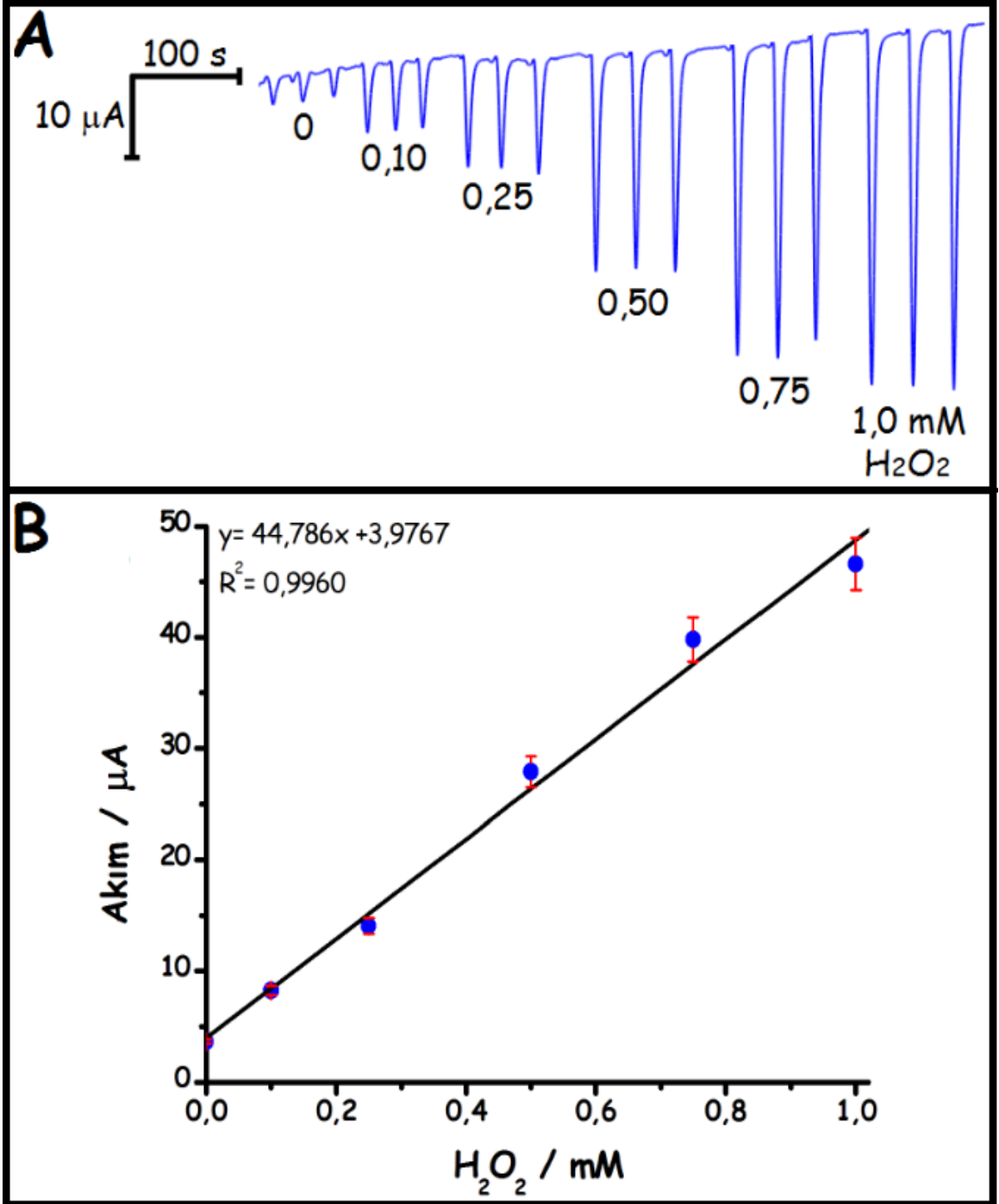
Çizelge 4.11. Herbiri 100 µM sabit H₂O₂ içeren 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 ve 1:100 oranındaki girişimcilerin Pt-Pd/p.PGE’de H₂O₂’nin indirgenme pik akımına gösterdikleri değişimler (n=3)

H ₂ O ₂ ’nin İndirgenme Pik Akımındaki Değişimler (%)					
Girişimci Molekül	Glukoz:Girişimci oranı				
	1:1	1:2	1:5	1:10	1:100
GL	+3,29 ±0,22	+6,37 ±0,83	+8,1 ±0,92	+21,6 ±0,31	+33,1 ±4,2
GLA	+1,2 ±0,82	+7,52 ±0,74	+17,6 ±0,82	+34,1 ±2,0	+35,2 ±0,18
SA	+26,4 ±0,46	+29,2 ±0,57	+55,8 ±1,1	+62,4 ±0,71	-
SAL	+10,2 ±0,30	+10,8 ±0,15	20,1 ±0,20	+22,3 ±0,15	+124,7 ±0,21
AA	-23,2 ±0,27	-36,9 ±1,82	-84,8 ±2,4	-185,8 ±3,2	-
DA	-49,6 ±0,20	-57,1 ±0,19	-148 ±0,28	-	-
ÜA	-40,6 ±0,10	-51,5 ±0,10	-53,9 ±0,10	-74,5 ±0,28	-

Diğer taraftan eşdeğer derişimde SA H₂O₂’nin indirgenme pik akımını arttırırken, eşdeğer derişimlerdeki AA, DA ve ÜA’nın ise H₂O₂’nin indirgenme pik akımını azalttığı ve bu moleküllerin H₂O₂’nin elektrokatalitik indirgenme akımı üzerine ciddi girişim etkileri gösterdikleri tespit edilmiştir. Sonuç olarak, Pt-Pd/p.PGE’nin seçiciliğinin oldukça zayıf olduğu ve ancak SA, DA, AA ve ÜA içermeyen örneklerde H₂O₂’nin FIA’da seçici olarak tayinine imkân sağlayabileceği sonucuna varılmıştır.

4.1.4.5.5. Pt-Pd/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Sensörün H₂O₂ İçeren Örneklere Uygulanması

Tasarlanan Pt-Pd/p.PGE, H₂O₂ içeren bir antiseptik çözeltiliye (BİKAR, % 3 H₂O₂) uygulanarak test edilmiştir. Bu amaçla 1,0 mL antiseptik çözeltili, 1/10000 oranında taşıyıcı çözeltili ile seyreltilmiş ve seyreltik örnek içerisinde 0; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75 ve 1,0 mM H₂O₂ içerecek şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve her bir çözeltilinin FIA sistemine enjeksiyonuyla amperomogramları daha önce optimize edilen koşullar altında kaydedilmiştir (Şekil 4.66 A). Kaydedilen amperomogramlardan pik akımları hesaplanmış ve bu örnek için standart katma grafiği çizilmiş ve Şekil 4.66 B’de verilmiştir. Standart katma grafiğinden gerekli hesaplamalar yapılarak, antiseptik çözeltili içerisindeki H₂O₂ 0,884 M olarak bulunmuştur.



Şekil 4.66. A) Seyreltik örnek (1/10000 seyreltik) ve bu örnekte 0,10, 0,25, 0,50, 0,75 ve 1,0 mM H_2O_2 içerecek şekilde hazırlanan standart çözeltilerinin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.62’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında) ve B) Elde edilen standart katma grafiği ($I(\mu\text{A}) = 44,786 C(\text{mM}) + 3,9767$ ve $R^2 = 0,9960$)

Permanganometrik titrasyon metodu ile birlikte her iki metottan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.12’de verilmiştir.

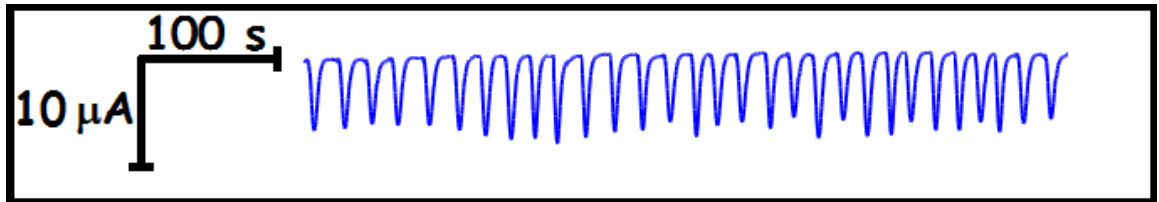
Çizelge 4.12. Antiseptik Çözeltide tayin edilen H₂O₂'ye ait analiz sonuçları (n=5)

Antiseptik Çözeltideki Hesaplanan H ₂ O ₂ (% 3) Derişimi	Bulunan H ₂ O ₂ derişimi	
	Pt-Pd/p.PGE kullanılarak FI Amperometrik Metod	Permanganometrik Titrasyon
0,882 M	0,888 M ±0,010	0,876 M ±0,016
	t _{den} : 1,34 (P: 0,05, 4)	t _{den} : 0,84 (P: 0,05, 4)
	F _{den} : 2,56 (P: 0,05, 4)	
t _{kritik} : 2,78 (P: 0,05, 4), F _{kritik} : 6,39 (P: 0,05, 4, 4) (Douglas ve ark., 1988)		

İstatistiksel olarak yapılan t-testi ve F-testi ile değerlendirildiğinde, önerilen yöntem ile antiseptik çözelti için bulunan t_{den} 1,34 değeri 4 serbestlik derecesi için % 95 güven derecesinde t_{kritik} değerden (2,78) (Douglas ve ark., 1988) daha küçük olduğundan X_{ort} ve μ arasında % 95 güven düzeyinde önemsenecek bir farkın olmadığı ve her iki yöntemin varyansları oranının (F_{den}: 2,56), F_{kritik}: 6,39'dan (P = 0,05, 4, 4) (Douglas ve ark., 1988) küçük olmasından dolayı, yöntemlerin standart sapmaları arasındaki farkın ciddiye alınacak seviyelerde olmadığı belirlenmiştir.

4.1.4.5.6. Pt-Pd/p.PGE'nin Tekrarlanabilirliğinin ve Kararlılığının Test Edilmesi

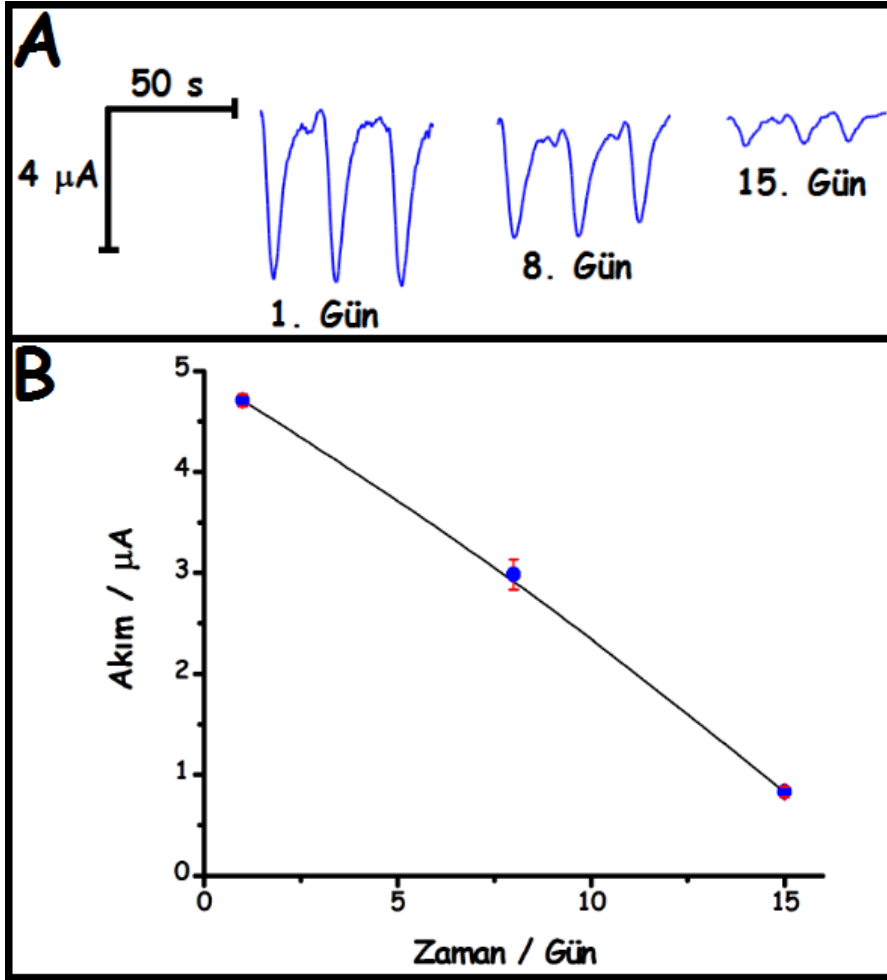
Pd/p.PGE'de olduğu gibi Pt-Pd/p.PGE'nin de tekrarlanabilirliği ve kararlılığı incelenmiştir. Elde edilen amperomogramlardan görüldüğü üzere pik akımlarında kayda değer bir değişim (5,04 ±0,42 μA ya da ± % 8,3 RSD) gözlenmemiş (Şekil 4.67) ve elektrodun yüzey etkinliği ve tekrarlanabilirliğinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür.



Şekil 4.67. Pt-Pd/p.PGE'de 100 μM H₂O₂ çözeltisinin sisteme ardışık 30 kez enjeksiyonuyla FIA'da kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.62'de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)

100 μM H₂O₂ çözeltisinin sisteme günler arası üçer kez enjeksiyon edilmiş ve FIA'da kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.68 A) ve akımın zamana (gün) bağlı

değişim grafiği (Şekil 4.68 B) incelendiğinde Pt-Pd/p.PGE'nin günler arası yüzey aktifliğini ciddi oranlarda azaldığı gözlenmiştir. Dolayısıyla, H₂O₂'ye günler arası kararlı amperometrik yanıtlar alınmadığı tespit edilmiş ve sonuç olarak elektrodun, gün içinde kullanıma uygun olduğu görülmüştür.

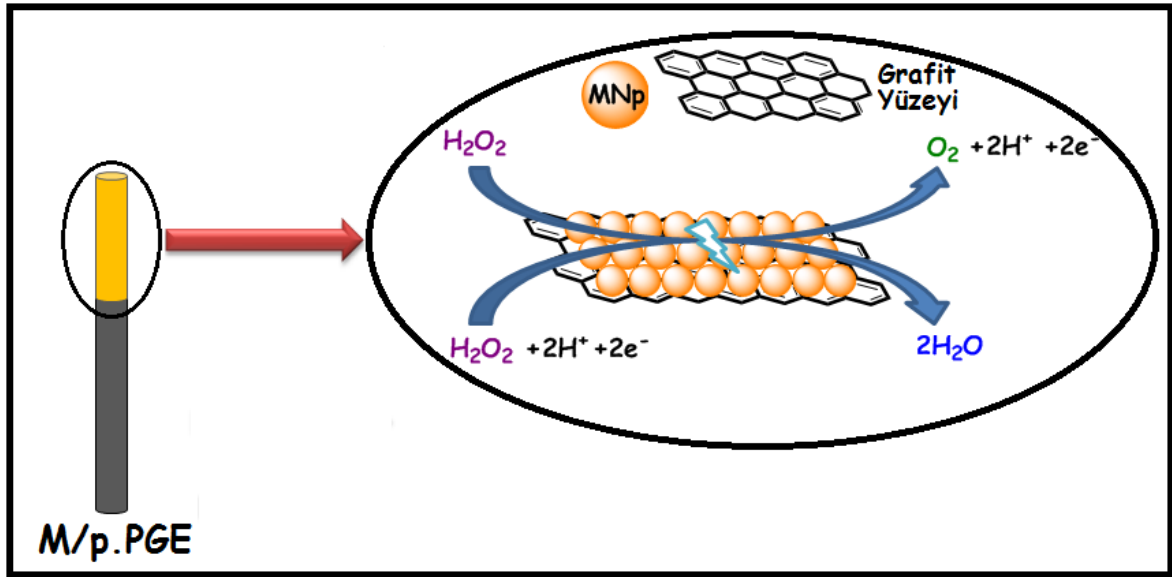


Şekil 4.68. A) Pt-Pd/p.PGE'de 100 μM H₂O₂ çözeltisinin günler arası üçer kez enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları ve B) akımın zamana (gün) bağlı değişimi (Şekil 4.62'de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)

4.2. H₂O₂'nin Enzimsiz Redoks Tepkimelerinin Mekanizmaları

H₂O₂'nin elektrokatalitik yükseltgenmesine (Au/p.PGE ve Pt/p.PGE için) ve indirgenmesine (Pt/p.PGE ve Pt-Pd/p.PGE için) ilişkin gerçekleşen tersinir redoks tepkimelerine ait temsili bir gösterim Şekil 4.69'da verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi metalik ve bimetalik nanoparçacık modifiye p.PGE yüzeyinde iki farklı katalizlenen tepkimelerin birinde destek elektrolit ortamına verilen H₂O₂, 2H⁺ ve 2e⁻ vererek O₂'ye yükseltgenmektedir. Diğer bir tepkimede ise H₂O₂, 2H⁺ ve 2e⁻ alarak H₂O'ya indirgenmesi

gerçekleşmektedir. Bu bağlamda, p.PGE yüzeyine modifiye edilen metalik ve bimetalik nanoparçacıklar, elektrokatalitik etkinliklerinden dolayı H_2O_2 'nin elektrokimyasal indirgenme ve yükseltgenme tepkimelerini sırasıyla daha pozitif ve daha negatifte kaydırarak yalın (p.PGE) elektrotta tersinmez olan redoks tepkimelerinin tersinir olarak gerçekleşmesini sağlamıştır. H_2O_2 'nin enzimsiz tayininde kullanılan Au/p.PGE, Pt/p.PGE, Pd/p.PGE ve Pt-Pd/p.PGE'nin H_2O_2 'ye verdikleri tersinir yanıtlara ilişkin CV'leri de bu durumu destekler niteliktedir.



Şekil 4.69. Metalik ve bimetalik nanoparçacık modifiye p.PGE yüzeyinde gerçekleşen redoks tepkimelerine için temsili bir gösterim

4.3. Tasarlanan Amperometrik H_2O_2 Sensörlerinin Literatürdeki Benzer Çalışmalar ile Karşılaştırılması

Tasarlanan amperometrik H_2O_2 sensörlerinin analitiksel performansları, çalışma elektrodunun türü, uygulama potansiyeli, doğrusal yanıt aralığı, LOD ve duyarlılık gibi çeşitli parametreler üzerinden literatürdeki benzer çalışmalar ile kıyaslanmıştır (Çizelge 4.13). Genel olarak, AuNP, PtNP ve PdNP gibi metal nanoparçacıklar ve bunların hibrit türleriyle (bimetalik nanoparçacık) modifiye edilmiş GCE'ler elektrokimyasal H_2O_2 sensörü yapımında başarıyla kullanılmıştır. Buna rağmen, GCE genellikle pahalı olmasının yanı sıra sensör uygulamalarında düşük tekrarlanabilirliğe sahip olması ve her kullanımdan sonra zorlu yüzey parlatma ve temizleme basamakları gerektirmesi gibi dezavantajları içermektedir. PGE ise GCE ve Au elektrotlara göre ucuz, kolay bulunabilir olması, tek kullanımlık özelliğinden dolayı zorlu temizleme basamaklarını içermemesi ve iyi

tekrarlanabilirliğe sahip olmasından ötürü tasarlanan sensörün maliyeti açısından bir avantaj oluşturduğu görülmektedir (Han ve ark., 2015; Chen ve ark., 2012; Li ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2016b; Zhang ve ark., 2016c; Zhang ve ark., 2016d; Lu ve ark., 2013; Liu ve ark., 2016; Chakraborty ve Raj, 2009; Franchini ve ark., 2008). Literatürler incelendiğinde PGE kullanılarak H_2O_2 'nin enzimsiz elektrokimyasal tayinine ilişkin sınırlı sayıda çalışma bulunduğu görülmektedir (Kawde ve ark., 2015; Aziz ve Kawde, 2013; Chaisuksant ve ark., 2016; Kamyabi ve Hajari, 2017; Zhang ve Zheng, 2015). Diğer taraftan, H_2O_2 'nin enzimsiz tayinine yönelik, FIA gibi hızlı ve rutin çalışmalara olanak sağlayan yararlı bir yöntemin GCE, SPCE ve Au elektrot ile birleştirilerek gerçekleştirildiği çalışmalar bulunmasına rağmen (Chakraborty ve Raj, 2009; Reanpang ve ark., 2015; Franchini ve ark., 2008), bu elektrotlar içerisinde üstün avantajlara sahip PGE'nin FIA ile birlikte H_2O_2 'nin enzimsiz tayini için kullanıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. FI sistemde gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan aşırı potansiyellerin, amperometrik H_2O_2 sensörlerin seçiciliği açısından bir dezavantaj oluşturduğu düşünülmektedir (Chakraborty ve Raj, 2009; Reanpang ve ark., 2015; Franchini ve ark., 2008). Buradan sonraki kısımda, tasarlanan her bir amperometrik H_2O_2 sensörünün literatürdeki benzer çalışmalar ile analitiksel performansları ayrı ayrı karşılaştırılarak incelenmiştir.

1- Au/p.PGE: Amperometrik sensörlerde çalışma potansiyeli önemli bir kriterdir, çünkü aşırı yüksek potansiyellerde AA, DA ve ÜA gibi biyolojik açıdan önemli moleküller yükseltgenerek H_2O_2 'nin yanıtını yükseltmesi yoluyla pozitif girişim etkisi yapabilir. Bununla birlikte aşırı düşük potansiyellerde çalışılması, çözünmüş O_2 'nin indirgenmesi H_2O_2 'nin indirgenme pik akımını artırarak pozitif girişim etkisine neden olabilir. Bahsedilen girişim etkilerinin sensörün seçiciliğini ve doğruluğunu olumsuz etkilemesi sebebiyle amperometrik sensör tasarımında aşırı yüksek ve aşırı düşük potansiyellerde çalışılması çoğu zaman tercih edilmemektedir. Girişim etkileri göz önüne alındığında, tez çalışmasında Au/p.PGE kullanılarak tasarlanan sensörün H_2O_2 'nin yükseltgenmesi üzerine yapılan birçok çalışmaya göre daha düşük bir yükseltgenme potansiyelinde çalışmasına imkân sağladığı görülmektedir (Han ve ark., 2015; Kawde ve ark., 2015; Aziz ve Kawde, 2013; Chakraborty ve Raj, 2009; Franchini ve ark., 2008). Au/p.PGE ile birçok çalışmaya nazaran H_2O_2 'ye daha geniş bir doğrusal yanıt aralığı elde edilmiştir (Chen ve ark., 2012; Li ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2016c; Kawde ve ark., 2015; Aziz ve Kawde, 2013; Franchini ve ark., 2008). Bulunan LOD değerinin ise, diğer birçok çalışmada elde edilen LOD değerlerine göre oldukça düşük olduğu ayrıca not edilmiştir (Han ve ark., 2015; Chen

ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2016c; Lu ve ark., 2013; Liu ve ark., 2016; Kawde ve ark., 2015; Aziz ve Kawde, 2013; Reanpang ve ark., 2015). Au/p.PGE, birkaç çalışmayla kıyaslandığında H_2O_2 'nin algılanmasına daha yüksek bir duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir (Han ve ark., 2015; Chen ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2016b; Lu ve ark., 2013; Kawde ve ark., 2015).

2- Pt/p.PGE: H_2O_2 'nin yükseltgenmesine dayalı tasarlanan Pt/p.PGE'de literatürde PtNP modifiye elektrotlarla gerçekleştirilen birçok amperometrik H_2O_2 sensörlerine göre oldukça düşük bir çalışma potansiyeli (Han ve ark., 2015; Chen ve ark., 2012; Kawde ve ark., 2015; Aziz ve Kawde, 2013; Chakraborty ve Raj, 2009; Franchini ve ark., 2008) ve daha geniş bir doğrusal yanıt aralığı sunmaktadır (Chen ve ark., 2012; Li ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2016c; Kawde ve ark., 2015; Aziz ve Kawde, 2013; Franchini ve ark., 2008). Pt/p.PGE kullanıldığında elde edilen LOD değeri, yapılan birkaç çalışmadan daha düşük olduğu bulunmuştur (Han ve ark., 2015; Chen ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2016c; Liu ve ark., 2016; Kawde ve ark., 2015; Aziz ve Kawde, 2013; Reanpang ve ark., 2015). Tasarlanan sensörün duyarlılığının yapılan birçok çalışmadan daha iyi olduğu da görülmektedir (Han ve ark., 2015; Chen ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2016b; Lu ve ark., 2013; Kawde ve ark., 2015).

3- Pd/p.PGE: H_2O_2 'nin indirgenmesine yönelik amperometrik sensör tasarımında aşırı negatif potansiyellerde O_2 'nin indirgenerek H_2O_2 'nin indirgenmesine pozitif girişim etkisi yaptığı bilinmekle birlikte, daha yüksek potansiyellerde çalışılması genellikle sensörün seçicilik ve doğruluk parametrelerinin geliştirilmesi adına büyük avantaj teşkil etmektedir. Bu doğrultuda, H_2O_2 'nin indirgenmesine yönelik yapılan çalışmalar dikkate alındığında Pd/p.PGE ile negatif bölgede diğer çalışmalara göre oldukça yüksek bir potansiyelde çalışılmıştır (Lu ve ark., 2013; Liu ve ark., 2016; Aziz ve Kawde, 2013; Reanpang ve ark., 2015). Ayrıca kullanılan elektrot ile H_2O_2 'nin tayini, birçok çalışmaya göre daha geniş doğrusal yanıt aralığında gerçekleştirilmiştir (Han ve ark., 2015; Chen ve ark., 2012; Li ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2016b; Zhang ve ark., 2016c; Zhang ve ark., 2016d; Lu ve ark., 2013; Chakraborty ve Raj, 2009; Franchini ve ark., 2008; Kawde ve ark., 2015; Aziz ve Kawde, 2013; Reanpang ve ark., 2015; Franchini ve ark., 2008). H_2O_2 'nin tayinine yönelik elde edilen LOD değerinin, literatürde yer alan bazı çalışmalarda elde edilen LOD değerlerine göre oldukça düşük olduğu da dikkat çekmektedir (Han ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2016c; Kawde ve ark., 2015; Reanpang ve ark., 2015). Pd/p.PGE kullanılarak önerilen metodun literatürde rapor edilen birkaç metoda göre daha yüksek bir duyarlılığa sahip olduğu da görülmüştür (Chen ve ark., 2012;

Chakraborty ve Raj, 2009).

4- Pt-Pd/p.PGE: Bir önceki kısımda anlatılan bilgiler dikkate alındığında, H_2O_2 'nin indirgenmesine yönelik tasarlanan Pt-Pd/p.PGE'nin kullanılması ile diğer çalışmalara göre oldukça yüksek bir potansiyelde çalışılmasına imkân sağladığı görülmektedir (Lu ve ark., 2013; Liu ve ark., 2016; Aziz ve Kawde, 2013; Reanpang ve ark., 2015). Pt-Pd/p.PGE ile H_2O_2 'nin indirgenmesine oldukça geniş bir aralıkta doğrusal yanıt alındığı da ayrıca not edilmiştir (Chen ve ark., 2012; Li ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2016b; Zhang ve ark., 2016c; Zhang ve ark., 2016d; Kawde ve ark., 2015; Aziz ve Kawde, 2013; Reanpang ve ark., 2015; Franchini ve ark., 2008). Ayrıca literatürdeki benzer çalışmalar ile kıyaslandığında, Pt-Pd/p.PGE kullanıldığında daha düşük bir LOD değeri elde edilmiştir (Zhang ve ark., 2016c; Reanpang ve ark., 2015). Ayrıca, H_2O_2 'nin algılanmasına yönelik Pt-Pd/p.PGE'nin gösterdiği duyarlılığın da literatürdeki çalışmalardan elde edilen birçok amperometrik H_2O_2 sensöründen daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır (Han ve ark., 2015; Chen ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2016b; Lu ve ark., 2013; Kawde ve ark., 2015; Chakraborty ve Raj, 2009).

Çizelge 4.13. Tasarılan amperometrik H₂O₂ sensörlerinin literatürdeki benzer çalışmalar ile kıyaslanması

Çalışma Elektrodu	Metot	Analitin Davranışı	Uygulama Potansiyeli (mV)	Doğrusal Aralık (µM)	LOD (µM)	Duyarlılık	Kaynak
AuM (M = Pd, Rh, Pt)/GCE	Amperometri	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+350	0 – 2000	3,26	1444,68 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	(Han ve ark., 2015)
			+250	0 – 3000	0,10	195,27 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	
PtIr ya da PtPd /Nf/MWCNT/GCE	Amperometri	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+250	2,5 – 75 (PtIr)	2,5 (PtIr)	58,8 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	(Chen ve ark., 2012)
				2,5 – 125 (PtPd)	1,2 (PtPd)	414,8 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	
Pt@AuNPs/GCE	Amperometri	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+80	1,0 – 450	0,18	Belirtilmemiş	(Li ve ark., 2013)
Au@C@Pt/GCE	Amperometri	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	0	9,0 – 1860	0,18	144,7 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	(Zhang ve ark., 2016b)
Pd core-PtNDs/PDDA-rGO/GCE	Amperometri	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+18	5,0 – 500	27	672,7 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	(Zhang ve ark., 2016)
rGO/Pt-AgNPs /GCE	Amperometri	H ₂ O ₂ 'nin İndirgenmesi	-50	5,0 – 1500	0,04	699,6 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	(Zhang ve ark., 2016)
PtAu/G-CNTs/GCE	Amperometri	H ₂ O ₂ 'nin İndirgenmesi	-470	2,0 – 8561	0,60	313,4 µA mM ⁻¹ cm ⁻²	(Lu ve ark., 2013)
Ag@Pt-grafen nanokompozit/GCE	Amperometri	H ₂ O ₂ 'nin İndirgenmesi	-350	5,0 – 12400	0,90	Belirtilmemiş	(Liu ve ark., 2016)
Pt/PDDA/GCE	FI Amperometri	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+500	5,0x10 ⁻⁴ – 4,0x10 ³	5,0x10 ⁻⁴	9,15 µA mM ⁻¹	(Chakraborty ve Raj, 2009)
Pd-CNT/SPCE	FI Amperometri	H ₂ O ₂ 'nin İndirgenmesi	-300	100 – 1000	20	Belirtilmemiş	(Reanpang ve ark., 2015)
Pt/Au Elektrot	FI Amperometri	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+600	1,0 – 100	0,29	Belirtilmemiş	(Franchini ve ark., 2008)

C: karbon, Chit: kitosan, G: Grafen, PDDA: poli(dialildi metil amonyum klorür), MWCNTs: çok duvarlı karbon nanotüpler, NDs: nano dendritler, rGO: indirgenmiş grafen oksit, SCE: doymun kalomel elektrot, t-GO: tiyollenmiş grafen oksit.

Çizelge 4.13'ün devamı

Çalışma Elektrodu	Metot	Analitin Davranışı	Uygulama Potansiyeli (mV)	Doğrusal Aralık (μM)	LOD (μM)	Duyarlılık	Kaynak
PtNP-PGE	Amperometri	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+500	10 – 110	3,6	0,37 A mM ⁻¹ cm ⁻²	(Kawde ve ark., 2015)
PdNP-PGE	Amperometri	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+800	10 – 50	0,045	Belirtilmemiş	(Aziz ve Kawde, 2013)
		H ₂ O ₂ 'nin İndirgenmesi	-250	10 – 140	1,0	Belirtilmemiş	
MnO ₂ -PGE	Amperometri	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+500	0,015 – 4,06	8,0	Belirtilmemiş	(Chaisuksant ve ark., 2016)
CuO/PGE	DPV	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	-	5,0 – 1600	0,21	4,75 $\mu\text{A mM}^{-1}$	(Kamyabi ve Hajari, 2017)
Ag/FeOOH/PGE	Amperometri	H ₂ O ₂ 'nin İndirgenmesi	-200	30 – 15000	22,8	8,07 $\mu\text{A mM}^{-1}$ cm ⁻²	(Zhang ve Zheng, 2015)
Au/p.PGE	FI Amperometri	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+300	1,0 – 1000	0,29	386 $\mu\text{A mM}^{-1}$ cm ⁻²	Bu Çalışma
Pt/p.PGE	FI Amperometri	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+100	2,5 – 750	0,73	445 $\mu\text{A mM}^{-1}$ cm ⁻²	Bu Çalışma
Pd/p.PGE	FI Amperometri	H ₂ O ₂ 'nin İndirgenmesi	-100	10 – 10000	3,0	79,28 $\mu\text{A mM}^{-1}$ cm ⁻²	Bu Çalışma
Pt-Pd/p.PGE	FI Amperometri	H ₂ O ₂ 'nin İndirgenmesi	-100	25 – 2500	5,7	372,6 $\mu\text{A mM}^{-1}$ cm ⁻²	Bu Çalışma

4.4. Metalik/Bimetalik Nanoparçacık Modifiye PGE Kullanılarak Glukoz Oksidaz (GOx) Enzimine Dayalı Biyosensör Çalışmaları

4.4.1. GOx İmmobilizasyonu ve Tasarlanan Biyosensöre ait Döngüsel Voltammetrik Çalışmalar

Enzim immobilizasyonu, kitosan (CT) kullanılarak Bölüm 3’de bahsedilen deneysel prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, p.PGE, Au/p.PGE, Pd/p.PGE, Pt/p.PGE ve Pt-Pd/p.PGE’ler, % 0,5’lik CT çözeltisinde hazırlanan 20 mg/mL GOx içerisinde +4 °C’de 1 saat süreyle bekletilmiş ve ardından +4 °C’de 15 dk süreyle kurularak GOx immobilize elektrotlar hazırlanmıştır. Glukozun enzim temelli elektrokimyasal biyosensör çalışmaları, hazırlanan tüm enzim modifiye elektrotlarla birlikte enzimsiz (sadece CT’li) elektrotların glukoz ortamında CV’leri kaydedilerek gerçekleştirilmiştir. Farklı metal ve bimetalik nanoparçacıklar biriktirilmiş PGE’lerin elektrokimyasal özellikleri ve yüzey morfolojisi ise glukozu en iyi yanıt veren elektrot belirlendikten sonra gerçekleştirilmiştir.

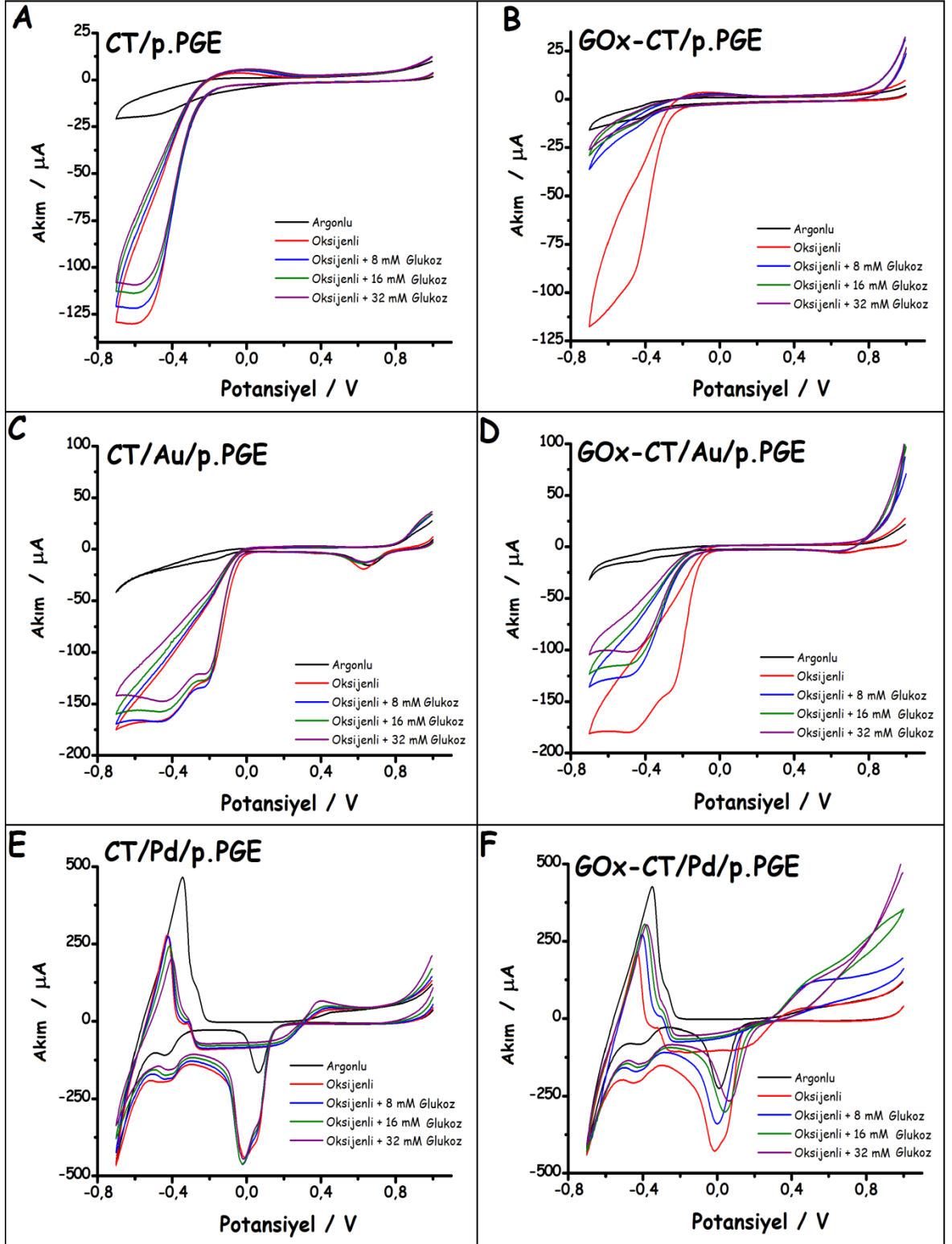
CV çalışmalarına, sadece CT modifiye (enzimsiz) ve GOx immobilize edilmiş p.PGE, Au/p.PGE ve Pd/p.PGE’lerin pH 6,0 BRBS’de, glukozun CV’leri kaydedilerek başlanılmıştır. Herbir elektrodun sırasıyla glukoz yokken Ar ve O₂ ile doyurulmuş ve farklı derişimlerde glukoz içeren O₂ ile doyurulmuş destek elektrolit ortamındaki CV’leri Şekil 4.70’de verilmiştir. CT/p.PGE’nin Ar ile doyurulmuş pH 6,0 BRBS’de kaydedilen CV’sinde herhangi bir pik gözlenmezken, O₂ ile doyurulduğunda ise -600 mV’da O₂’nin indirgenmesinden dolayı şiddetli bir pik gözlenmiştir (Şekil 4.70 A). O₂ ile doyurulmuş destek elektrolit ortamına artan derişimlerde glukoz eklendiğinde ise O₂’nin pik akımında eklenen glukoz derişimine bağlı çok az da olsa bir azalma gözlenmiştir. Bu azalışın nedeni ise destek çözeltide doymuş O₂’nin giderek atmosfer ortamına geçiş yaptığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bunun dışında glukozun yükseltgenmesine ait herhangi bir anodik pik de gözlenmemiştir. Enzim immobilize p.PGE’nin (GOx-CT/p.PGE) Ar ile doyurulmuş pH 6,0 BRBS’de kaydedilen CV’sinde (Şekil 4.70 B) ise GOx’un FAD/FADH₂ redoks çiftine ait anodik ve katodik piklerin sırasıyla -370 mV ve -440 mV’da çok az da olsa gözlendiği tespit edilmiştir. Ortam O₂ ile doyurulduğunda ise -440 mV’daki katodik pik, O₂’nin indirgenmesinden dolayı önemli düzeyde artmış ancak anodik pikte bir değişme gözlenmemiştir (Şekil 4.70 A). Bu olay, GOx immobilize PGE’de O₂’nin elektrokatalitik indirgenmesini yansıtmaktadır. O₂ ile doyurulmuş destek elektrolit ortamına artan derişimlerde glukoz eklendiğinde ise O₂’nin pik akımında ilk eklenen glukoz derişiminde (8 mM glukoz) CT/p.PGE’ye kıyasla önemli düzeyde azalma gözlenmiştir (Şekil 4.70 B). Glukoz derişiminin arttırılmasıyla da bu katodik pik daha da

azalmıştır. Çünkü p.PGE yüzeyindeki GOx, O₂ varlığında glukoz ile enzimatik tepkimeye girerek, enzimin FAD grubu FADH₂'ye indirgenir ve glukoz ise glukanolaktona yükseltgenir. Enzimatik tepkime sonucunda ortamdaki O₂ ise glukoz derişimine bağılı olarak tükenir ve yine glukoz derişimine bağılı olarak H₂O₂ oluşur. Dolayısıyla, O₂'nin katodik pikindeki azalma, glukoz ilavesine bağılı olarak O₂ derişiminin azalmasından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, yaklaşık +900 mV'da enzimatik tepkime sonucu oluşan H₂O₂'nin yükseltgenme pikinin gözlendiğı ve artan glukoz derişimine bağılı olarak da arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.70 B). Gerek glukoz ilavesiyle O₂'nin katodik pikindeki azalmanın enzimsiz elektroda göre oldukça fazla olması ve gerekse H₂O₂'nin yükseltgenmesine ait pikin CT/p.PGE'de gözlenmeyip GOx-CT/p.PGE'de gözlenmesi, p.PGE yüzeyine CT yoluyla enzimin başarılı bir şekilde immobilize edildiğini yansıtmaktadır.

Au/p.PGE için kaydedilen CV'ler incelendiğinde, CT/p.PGE'den farklı olarak Au/p.PGE'de de O₂'nin indirgenmesinin gözlendiğı ancak -300 ve -400 mV'da iki aşamada gerçekleştiğı ve glukoz ilavesiyle bu indirgenme pikinin çok az azaldığı ve aynı zamanda glukozun da enzimsiz olarak yaklaşık +900 mV'larda yükseltlendiğı gözlenmiştir (Şekil 4.70 C). Bununla birlikte, GOx-CT/Au/p.PGE'de ise O₂ indirgenmesinin yine -300 ve -400 mV'da gözlendiğı ve artan glukoz ilavesiyle bu indirgenmenin orantısal olarak azaldığı ve enzimatik tepkime sonucu oluşan H₂O₂'nin yine +900 mV'da yükseltlendiğı, bu yükseltgenme akımının ortamdaki glukoz derişiminin artmasıyla arttığı ve GOx-CT/p.PGE'ye göre pik akımının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.70 D). Sonuç olarak, enzimli Au/p.PGE'de beklenildiğı gibi oksijen tüketimine bağılı olarak oksijenin indirgenme pik akımındaki azalma, aynı elektrodun enzimsiz formuna göre çok daha fazla olup, bu durumun Au/p.PGE yüzeyine GOx'un başarıyla immobilize edildiğini göstermektedir. Ancak, her ne kadar GOx-CT/p.PGE'ye göre aynı derişimdeki glukozu daha yüksek akımlar elde edilmiş olsa da oluşan H₂O₂'nin GOx-CT/p.PGE'de olduğu gibi çok yüksek potansiyelde yükseltgenmesi (+900 mV) nedenlerinden dolayı, GOx-CT/Au/p.PGE ile glukoz biyosensörünün tasarlanmasının çok anlamlı olmadığına karar verilmiştir.

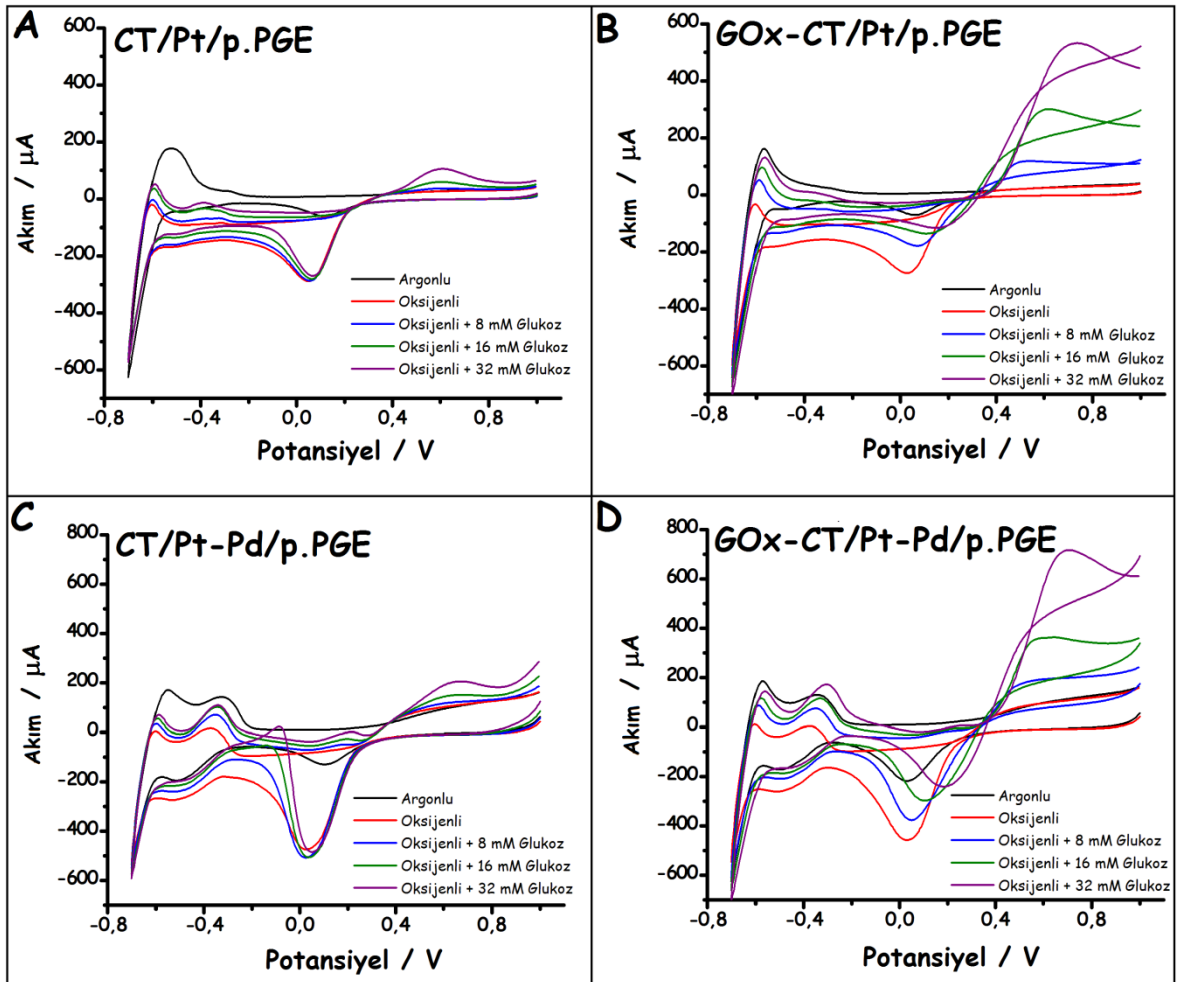
Diğer bir metal nanoparçacık olan Pd modifiye elektrotlarla da benzer çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Enzim immobilize edilmemiş (CT/Pd/p.PGE) ve edilmiş (GOx-CT/Pd/p.PGE) elektrotların CV'leri sırasıyla Şekil 4.70 E ve F'de verilmiştir. CT/Pd/p.PGE'nin Ar ile doyurulmuş destek elektrolitteki CV'sinde, Pd'a ait piklerin gözlendiğı ve O₂ ile doyurulduğunda O₂'nin indirgenme pikinin -20 ve +50 mV'da iki

aşamada indirgenmediği ve ortama glukoz ilave edildiğinde O_2 'nin indirgenme pikinde çok fazla bir değişiklik gözlenmediği, ancak glukozun enzimsiz olarak +400 mV'da yükseltildiği ve pikin glukoz derişimiyle çok az da olsa arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.70 E). GOx-CT/Pd/p.PGE'de ise O_2 'nin indirgenmesi yine benzer şekilde -20 ve +50 mV'da gözlenmiş ve bu pik artan glukoz derişimiyle orantılı olarak enzimatik tepkime sonucu tüketildiğinden azalmıştır (Şekil 4.70 E). Dolayısıyla O_2 'nin bu elektrottaki indirgenmesi GOx-CT/p.PGE'ye göre önemli düzeyde daha pozitif kaymıştır. Asıl önemli farklılık enzimatik tepkime sonucu oluşan H_2O_2 'nin yükseltgenmesinde gözlenmiştir. H_2O_2 'nin yükseltgenmesi daha belirgin olarak CT/Pd/p.PGE'de olduğu gibi +400 mV'da gözlenmiş, ancak bu yükseltgenme 8 mM glukoz varlığında CT/Pd/p.PGE'ye göre biraz daha yüksek olduğu görülmekle beraber, 16 mM ve 32 mM glukoz varlığında çok fazla değişim gözlenmemiştir. Bunun dışında H_2O_2 'nin bir kısmı da yine oldukça pozitif potansiyelerde (+ 800 mV civarı) yükseltgenmiştir. Tüm bu nedenlerden ve daha sonraki bölümlerde bahsedileceği gibi Pt ve Pt-Pd modifiye elektrotların yanıtlarının daha iyi olmasından dolayı, GOx immobilize edilmiş Pd modifiye p.PGE ile de biyosensör tasarımının uygun olmadığına karar verilmiştir.



Şekil 4.70. A) CT/p.PGE, B) GOx-CT/p.PGE, C) CT/Au/p.PGE, D) GOx-CT/Au/p.PGE, E) CT/Pd/p.PGE, ve F) GOx-CT/Pd/p.PGE'nin, sırasıyla Ar (siyah), O₂ (kırmızı) ile doyurulmuş pH 6,0 BRBS ortamında ve 8 mM (mavi), 16 mM (Yeşil) ve 32 mM glukoz (mor) içeren O₂ ile doyurulmuş destek elektrolitte kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 20 mV/s)

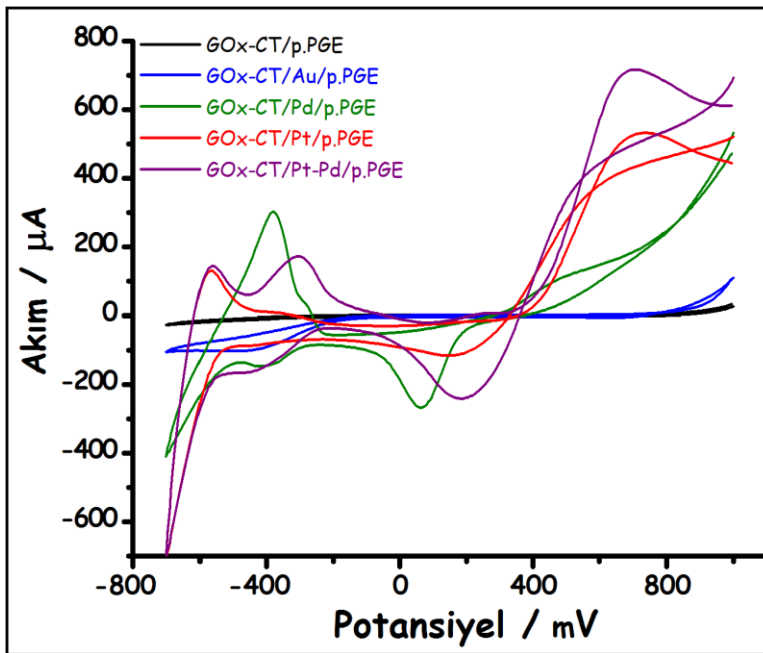
Enzimsiz (CT'li) ve enzim immobilize edilmiş (GOx-CT'li) Pt/p.PGE ve Pt-Pd/p.PGE'lerin aynı koşullarda CV'leri ise Şekil 4.71'de verilmiştir. CT/Pt/p.PGE'de yine Ar ile doyurulmuş pH 6,0 BRBS'de kaydedilen CV'sinde Pt'ye ait pikler gözlenmiş, O₂ ile doyurulduğunda ise O₂'nin indirgenme piki yaklaşık +100 mV'da gözlenmiştir. O₂'li ortamda glukoz ilâve edildiğinde ise O₂'nin indirgenme pikinde önemli bir değişiklik olmazken, glukozun enzimsiz olarak yükseltgenmesi yaklaşık +550 mV'da gözlenmiş ve glukoz derişimiyle de orantılı olarak artmıştır (4.71 A). Benzer CV'ler CT/Pt-Pd/p.PGE için de elde edilmiştir (Şekil 4.71 C).



Şekil 4.71. A) CT/Pt/p.PGE, B) GOx-CT/Pt/p.PGE, C) CT/Pt-Pd/p.PGE ve D) GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin, sırasıyla Ar (siyah), O₂ (kırmızı) ile doyurulmuş pH 6,0 BRBS ortamında ve 8 mM (mavi), 16 mM (Yeşil) ve 32 mM glukoz (mor) içeren O₂ ile doyurulmuş destek elektrolitte kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 20 mV/s)

GOx-CT/Pt/p.PGE'de ise +25 mV'ta gözlenen O₂ indirgenme piki, artan glukoz derişimine bağlı olarak azalmış ve daha pozitif bölgeye doğru kaymıştır. Ayrıca, artan

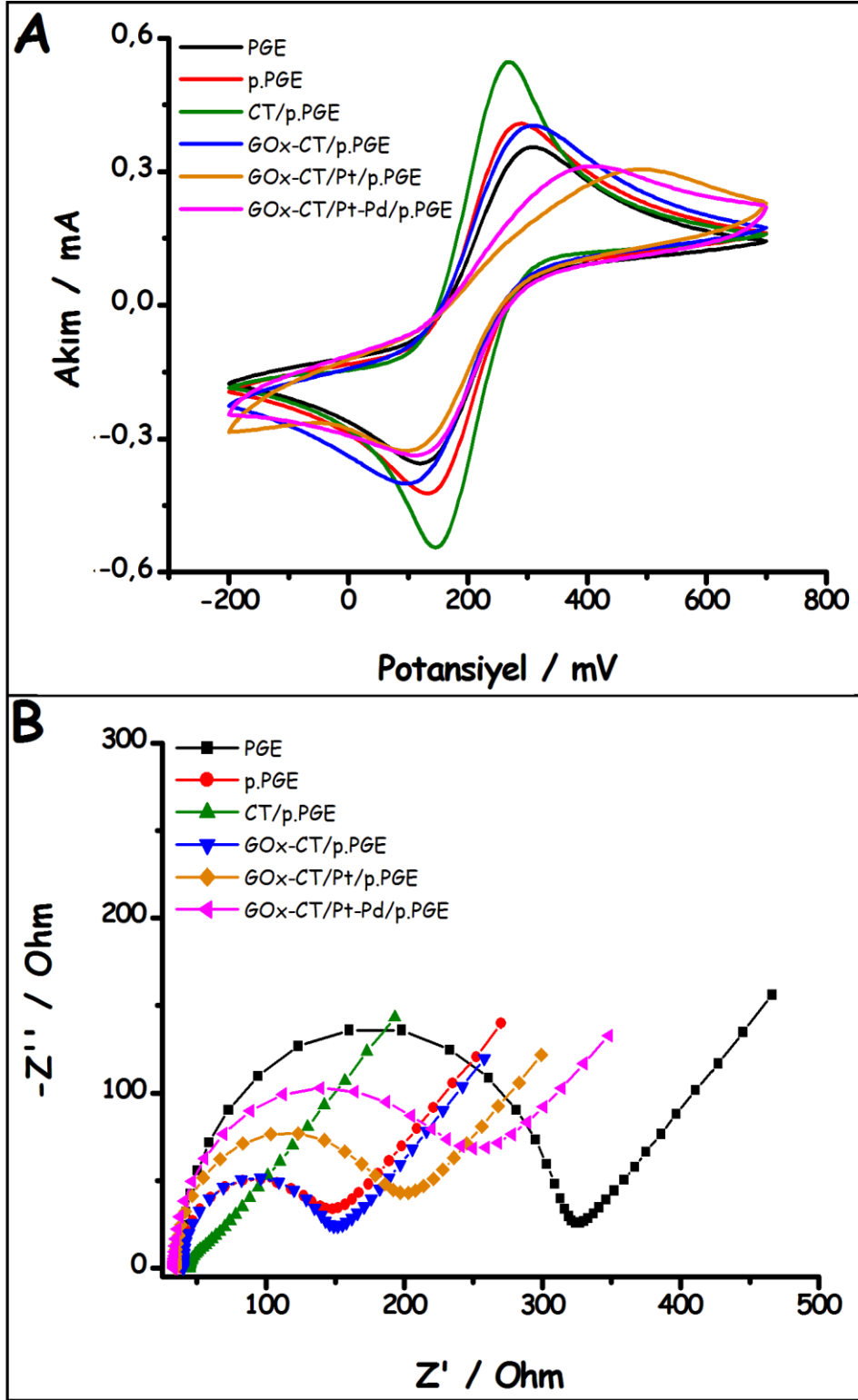
glukoz derişimine bağlı olarak enzimatik tepkime sonucu oluşan H_2O_2 'nin yükseltgenme piki 8 mM glukoz için yaklaşık +500 mV'ta belirgin bir şekilde gözlenmiş ve artan glukoz derişimiyle birlikte pik akımı artarak pozitif bölgeye doğru (+750 mV'ta kadar) kaymıştır (şekil 4.71 B). GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin glukoz ortamındaki CV'leri, GOx-CT/Pt/p.PGE'de elde edilen CV'lere oldukça benzer olduğu şekil 4.71 D'de görölmektedir. Ancak H_2O_2 'nin bu elektrottaki yükseltgenmesine ait pikleri GOx-CT/Pt/p.PGE'ye göre daha yüksek ve belirgin bir şekilde gözlenmiştir. Enzim immobilize edilmiş tüm elektrotların yanıtlarını birarada değerlendirmek için GOx-CT/p.PGE, GOx-CT/Au/p.PGE, GOx-CT/Pd/p.PGE, GOx-CT/Pt/p.PGE ve GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin O_2 doyurulmuş pH 6,0 BRBS'de ve 32 mM glukoz ortamında kaydedilen CV'leri şekil 4.72'de verilmiştir. Voltammogramlar incelendiğinde, diğer elektrotlara göre GOx-CT/Pt/p.PGE ve GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin enzimatik tepkime sonucu oluşan H_2O_2 'nin yükseltgenmesine iyi bir elektrokatalitik etkinlik gösterdiği ve pik akımının diğer elektrotlara göre oldukça yüksek olduğu görölmektedir. Ayrıca bu iki elektrodun yanıtları karşılaştırıldığında GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'de alınan yanıtın GOx-CT/Pt/p.PGE'ye göre oldukça yüksek olduğu görölmekle beraber, bu durumun bimetalik nanoparçacık modifiye elektrodun sinerjistik etkisinden kaynaklandığı düşünölmektedir. Dolayısıyla bundan sonraki FIA sisteminde amperometrik glukoz biyosensörü tasarımına ilişkin çalışmalara bu iki elektrot kullanılarak devam edilmiştir.



şekil 4.72. GOx immobilize elektrotların O_2 ile doyurulmuş pH 6,0 BRBS'de 32 mM glukoz ortamında kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 20 mV/s)

4.4.2. GOx İmmobilize Edilmiş Pt ve Pt-Pd Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

Bir önceki kısımda glukozu en iyi yanıt veren elektrotlar olarak belirlenen Pt ve Pt-Pd modifiye p.PGE'lerin elektrokimyasal özellikleri daha önceki kısımlarda olduğu gibi 0,01 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks probu ortamında CV ve impedans eğrileri kaydedilerek gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.73). Daha önceki bölümlerde yalın PGE ile p.PGE'nin hem CV hem de impedans eğrileri tartışılmıştı. Burada enzim modifiye elektrotlarla birlikte göstermek adına bir kez daha Şekil 4.73'de gösterilmiştir. p.PGE yüzeyine GOx immobilize edildiğinde kaydedilen CV'de ve impedans eğrisinde p.PGE'ye göre çok önemli bir değişme gözlenmemiştir. Özellikle impedans verileri değerlendirildiğinde p.PGE'nin direnci 114 ohm iken GOx-CT/p.PGE'nin ise 121 ohm'a çıkmıştır. Bu durum pozitif yüklü CT'nin redoks probu ile elektrostatik çekmeden dolayı bir yandan direnci azaltması ve diğer yandan oldukça karmaşık ve kompleks bir molekül olan GOx'un, redoks probunun elektron transferini engelleyen bir bariyer görevi görmesinden dolayı direnci azaltması olayının bir arada meydana gelmesiyle açıklanabilir. CT modifiye p.PGE'de kaydedilen CV'lerde anodik ve katodik pik potansiyellerinin oldukça yüksek olması ve bu elektrotta elde edilen R_{et} değerinin 10 ohm civarında çıkması bu yorumu desteklemektedir. Benzer şekilde Pt/p.PGE ve Pt-Pd/p.PGE'nin R_{et} değeri 23 ve 10 ohm iken, GOx immobilize edildiğinde sırasıyla 177 ve 211 ohm olmuştur. Bu sonuçlar, GOx'un Pt ve özellikle Pt-Pd olduğunda p.PGE yüzeyine daha fazla immobilize edildiğini yansıtmaktadır. Bir önceki bölümde glukoz ortamında kaydedilen CV'lerde, enzimatik tepkime sonucu oluşan H_2O_2 'nin yükseltgenme pikinin diğer elektrotlara göre yüksek olması bu sonucu desteklemektedir. Sonuç olarak, Pt ve Pt-Pd gibi nanoparçacıkların iletkenlik özelliklerinin yalın elektrotlara göre yüksek olması ve CT'nin pozitif yüklü olması, impedans eğrilerinin direncini azaltmaktadır. Bunun yanında, GOx'un iletken özelliği iyi olmayıp, sahip olduğu protein katmanı elektrot yüzeyinde bariyer etkisi göstererek $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çifti ile elektrot arasındaki elektron transferini zorlaştırdığından dolayı, GOx immobilizasyonu direnç değerlerini arttırmaktadır. Kaydedilen CV ve impedans eğrilerinden elde edilen veriler Çizelge 4.14'de verilmiştir. Bu çizelgeye ve yapılan yorumlara göre GOx enzimi ilgili elektrot yüzeylerine CT yoluyla başarılı bir şekilde immobilize edilmiştir.



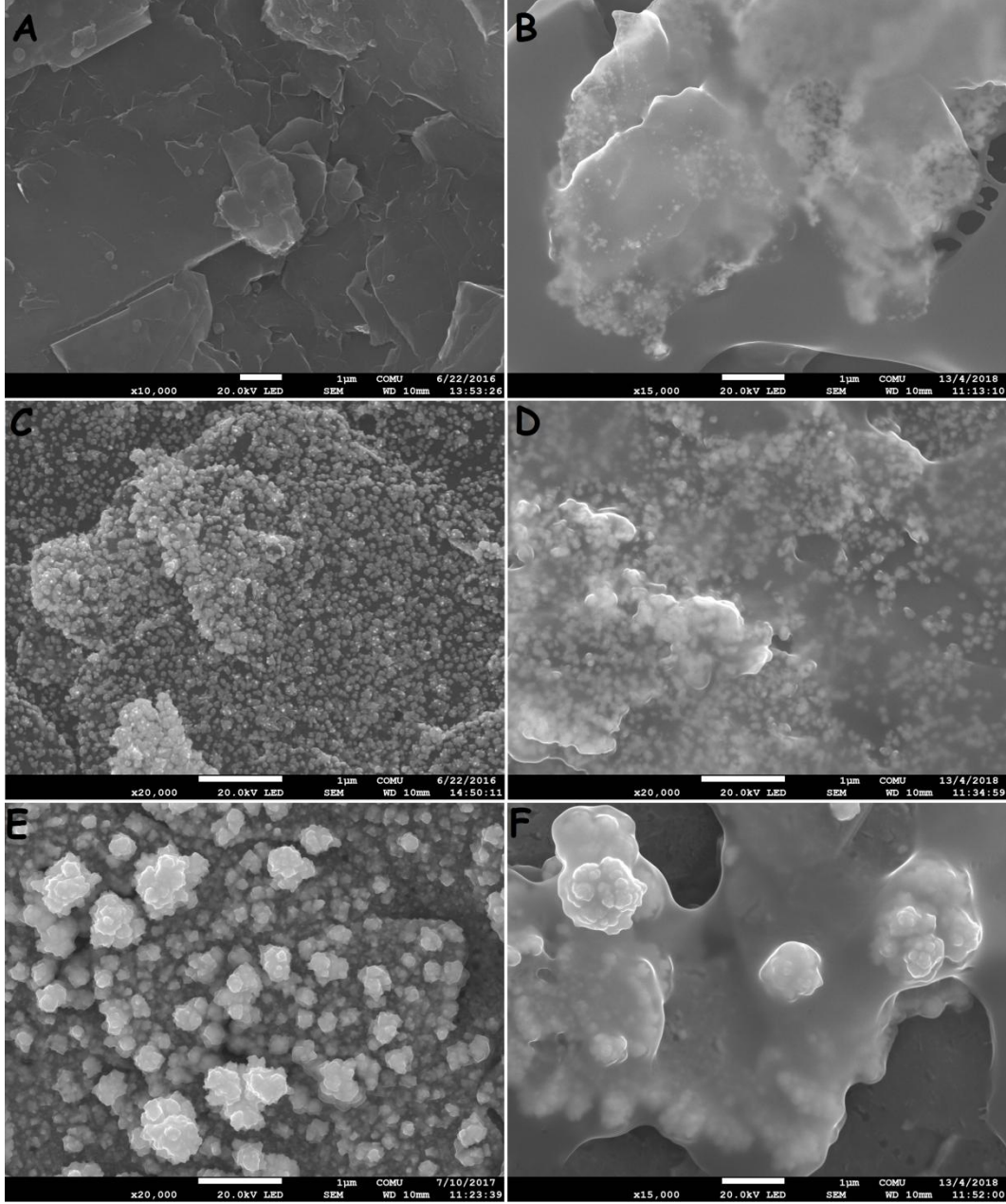
Şekil 4.73. p.PGE, p.PGE, CT/p.PGE, GOx-CT/p.PGE, GOx-CT/Pt/p.PGE ve GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin 0,01 M $K_3[Fe(CN)_6]$, 0,01 M $K_4[Fe(CN)_6]$ içeren 0,10 M KCl destek çözeltisinde 50 mV/s tarama hızında kaydedilen CV'leri (A) ve 10^5 Hz – 10^{-1} Hz frekans aralığında kaydedilen impedans eğrileri (B)

Çizelge 4.14. PGE, p.PGE, GOx-CT/p.PGE, Pt/p.PGE, GOx-CT/Pt/p.PGE, Pt-Pd/p.PGE ve GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE için CV ve impedans grafiklerinden elde edilen potansiyel, pik akımları ve direnç değerlerinin standart sapmaları ile tablosu (n=3)

Elektrot	E_a (mV)	E_k (mV)	ΔE_p (mV)	I_{pa} (μ A)	I_{pk} (μ A)	R_{ct} (ohm)
PGE	335	100	235	470 \pm 1,0	443 \pm 2,4	285 \pm 6,4
p.PGE	305	105	200	519 \pm 5,2	445 \pm 2,4	114 \pm 0,6
CT/p.PGE	270	145	125	579 \pm 0,5	541 \pm 1,7	10 \pm 2,9
GOx-CT/p.PGE	310	95	215	403 \pm 1,6	347 \pm 6,6	112 \pm 5,7
Pt/p.PGE	255	135	120	738 \pm 5,4	681 \pm 6,1	22 \pm 0,3
GOx-CT/Pt/p.PGE	465	100	365	189 \pm 7,3	215 \pm 11,2	177 \pm 6,5
Pt-Pd/p.PGE	270	150	120	591 \pm 5,1	510 \pm 8,9	10 \pm 0,1
GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE	390	115	275	236 \pm 9,7	272 \pm 6,8	211 \pm 4,9

4.4.3. Enzim İmmobilize Elektrotların Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesi

Enzim immobilize elektrotların yüzey morfolojileri daha önceki bölümlerde gerçekleştirildiği her bir elektrodun SEM görüntülerinin kaydedilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Her ne kadar daha önceki bölümlerde p.PGE, Pt/p.PGE ve Pt-Pd/p.PGE'lerin SEM görüntüleri verilmişse de, bu bölümde GOx enzimi modifiye edildikten sonraki SEM görüntüleriyle karşılaştırmak amacıyla bir kez daha Şekil 4.74'de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi her bir elektrot yüzeyine GOx immobilize edildiğinde, GOx'un jelimsi bir görüntü şeklinde yüzeye tutunduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla, SEM görüntüleri GOx'un elektrotların yüzeyine başarılı bir şekilde immobilize edildiğini göstermektedir.



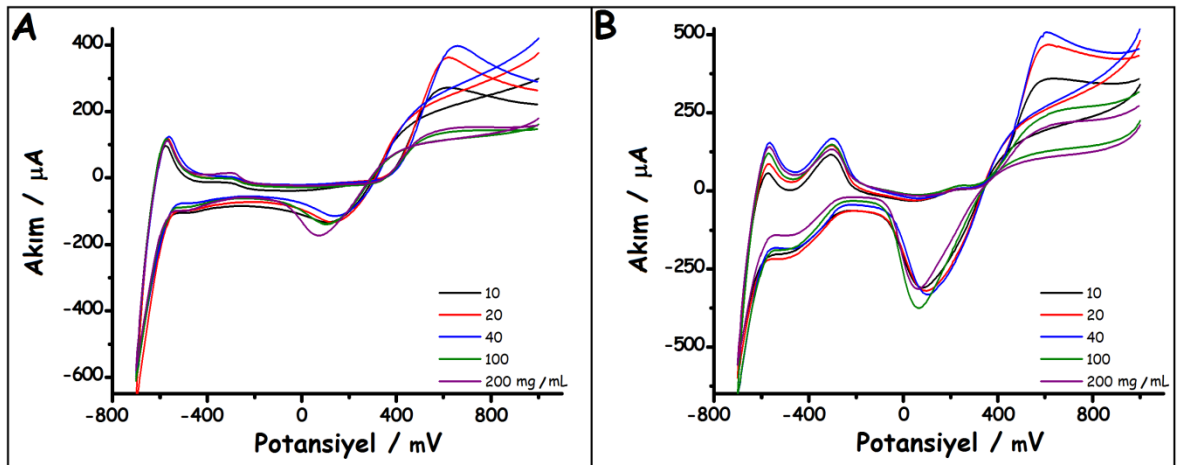
Şekil 4.74. A) p.PGE, B) GOx-CT/p.PGE, C) Pt/p.PGE, D) GOx-CT/Pt/p.PGE, E) Pt-Pd/p.PGE ve F) GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'ye ait SEM görüntüleri (1 μm x15000-20000)

4.4.4. Elektrokimyasal Glukoz Biyosensörü Tasarımında Döngüsel Voltammetri Yöntemiyle Optimizasyon Çalışmaları

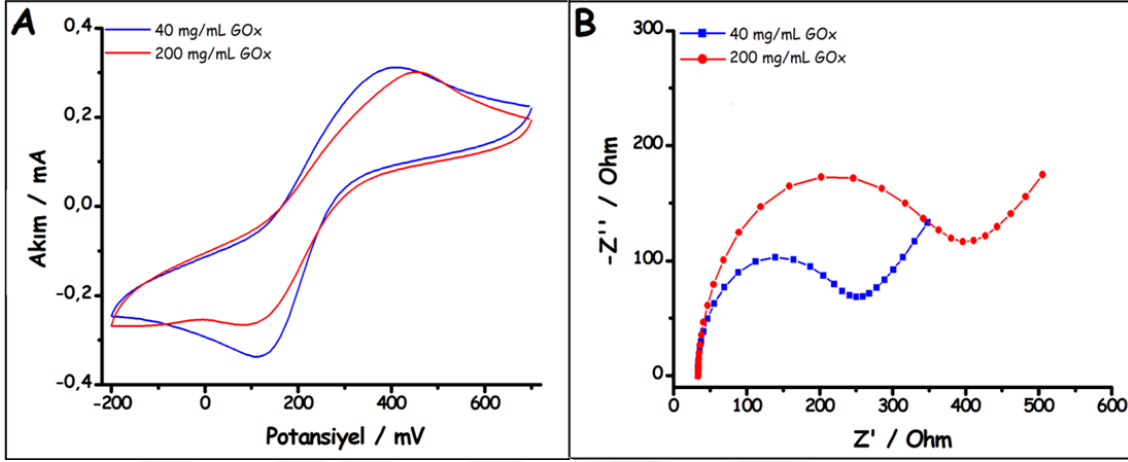
FIA sisteminde glukoz biyosensörü çalışmalarına başlamadan önce, kullanılacak iki elektrot için (GOx-CT/Pt/p.PGE ve GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE) immobilize edilen GOx derişimi ve biyosensörün gerçekleştirildiği destek elektrolit pH'sının optimizasyon çalışmaları CV tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.4.4.1. İmmobilizasyon Esnasında Kullanılacak GOx Derişiminin Optimizasyonu

Glukoz biyosensörü için en iyi yanıtın alındığı GOx miktarının belirlenmesi amacıyla farklı derişimlerde GOx çözeltileri içerisine daldırılarak hazırlanmış GOx-CT/Pt/p.PGE ve GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'lerin O₂ ile doyurulmuş pH 6,0 BRBS'de 16 mM glukoz ortamındaki CV'leri kaydedilmiştir. Her iki elektrot için ayrı ayrı kaydedilen CV'ler Şekil 4.75'de verilmiştir. Voltammogramlar incelendiğinde 10 ile 40 mg/mL enzim derişimi aralığında hazırlanan elektrotlardan her ikisinde de glukozu alan yanıt (enzimatik tepkime sonucu oluşan H₂O₂'nin yükseltgenme akımı) artma eğilimi göstermiştir. 100 ve 200 mg/mL'de ise H₂O₂'nin yükseltgenme akımında önemli düzeyde azalma gözlenmiştir. Bu azalışın nedeni, çok yüksek derişimde GOx'un kullanılmasıyla elektrot yüzeyinde immobilize edilen enzimin miktarı ve protein katmanının kalınlığının artmasına ve dolayısıyla da oldukça kompleks olan enzim molekülünden dolayı direncin artmasına bağlanabilir. Bu olayı desteklemek için 200 mg/mL GOx çözeltilisine daldırılarak hazırlanmış GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin de redoks probu ortamında hem CV hem de impedans eğrileri kaydedilmiş ve daha önce 40 mg/mL GOx'da hazırlanan elektrotla birlikte Şekil 4.76'da verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi hem CV'deki anodik ve katodik pik akımı yüksek enzim derişiminde artmış hem de daha önce Çizelge 4.15'de 40 mg/mL GOx'da hazırlanan elektrot için verilen R_{et} değerinin 211 ohm'dan 360 ohm'a kadar çıktığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla yüksek enzim derişimiyle hazırlanan elektrotta, yüzey ile analit arasındaki elektron transferinin zorlaştığı düşünülmektedir. Glukoz biyosensörü için en yüksek yanıtın alındığı GOx çözeltilisi derişimi, 40 mg/mL olarak tercih edilmiştir. Sonuç olarak her iki elektrot için 40 mg/mL enzim derişimi kullanılarak diğer optimizasyon çalışmasına geçilmiştir.



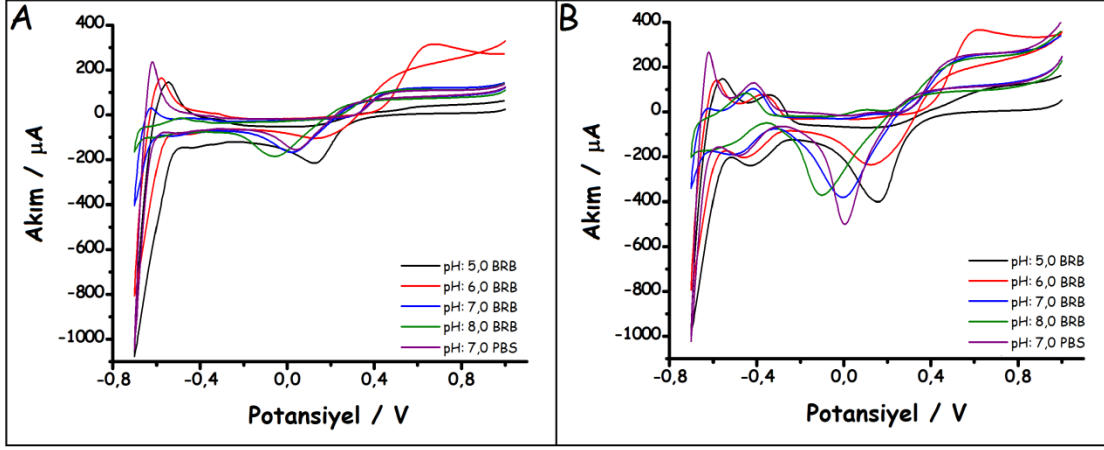
Şekil 4.75. % 0,5 CT içeren farklı derişimlerdeki (10, 20, 40, 100 ve 200 mg/mL) GOx çözeltilerine daldırılarak hazırlanmış A) GOx-CT/Pt/p.PGE ve B) GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin 16 mM glukoz içeren O₂ ile doyurulmuş pH 6,0 BRBS'de, 20 mV/s tarama hızında kaydedilen CV'leri



Şekil 4.76. Farklı derişimli enzim çözeltilerine (mavi: 40 ve kırmızı: 200 mg/mL GOx) daldırılarak hazırlanan GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin 0,01 M K₃[Fe(CN)₆], 0,01 M K₄[Fe(CN)₆] içeren 0,10 M KCl destek çözeltilisinde 50 mV/s tarama hızında kaydedilen CV'leri (A) ve 10⁵ Hz – 10⁻¹ Hz frekans aralığında kaydedilen impedans eğrileri (B)

4.4.4.2. Glukoz Biyosensöründe Destek Elektrolit pH'sının Optimizasyonu

İmmobilizasyon esnasında kullanılan GOx derişiminin belirlenmesinden sonra, destek elektrolitin pH değişiminin glukozun enzimatik yanıtına etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, 40 mg/mL enzim derişimi kullanılarak hazırlanan her iki elektrodun O₂ ile doyurulmuş pH'sı 5,0 ile 8,0 arasında değişen BRBS ve pH 7,0 PBS destek çözeltilerinde 16 mM glukoz ortamında kaydedilen CV'ler Şekil 4.77'de verilmiştir. Voltammogramlar incelendiğinde, her iki elektrot için pH 5,0 BRBS ortamının daha asidik olmasından dolayı enzimin aktivitesini azalttığı ve bu durumun glukozu olan yanıtı düşürdüğü şeklinde yorumlanmaktadır. pH 7,0 ve 8,0'de ise enzim aktivitesini yitirmemekle birlikte, pH 6,0'da alınan yanıtı göre düşük yanıtlar alınmıştır. Ayrıca her iki elektrot için pH 6,0 BRBS'de alınan yanıtın en yüksek olduğu voltammogramlardan açıkça görünmektedir. Sonuç olarak her iki elektrot için en uygun destek elektrolitin pH 6,0 BRBS olduğu görülmüş ve diğer çalışmalara bu pH değerine sahip destek elektrolit çözeltisi ile devam edilmiştir.

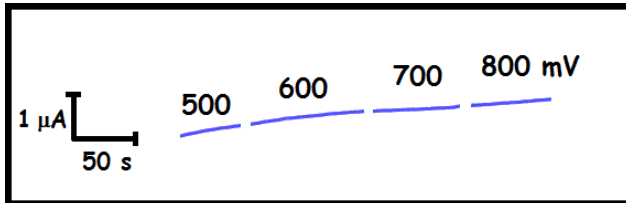


Şekil 4.77. % 0,5 CT içeren 40 mg/mL GOx çözeltilerine daldırılarak hazırlanmış A) GOx-CT/Pt/p.PGE ve B) GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin 16 mM glukoz içeren O₂ ile doyurulmuş farklı pH'lardaki BRBS'de ve pH 7,0 PBS'de kaydedilen CV'leri (Tarama hızı: 20 mV/s)

4.4.5. GOx-CT/Pt/p.PGE Kullanılarak FIA'da Glukoz Biyosensörü Çalışmaları

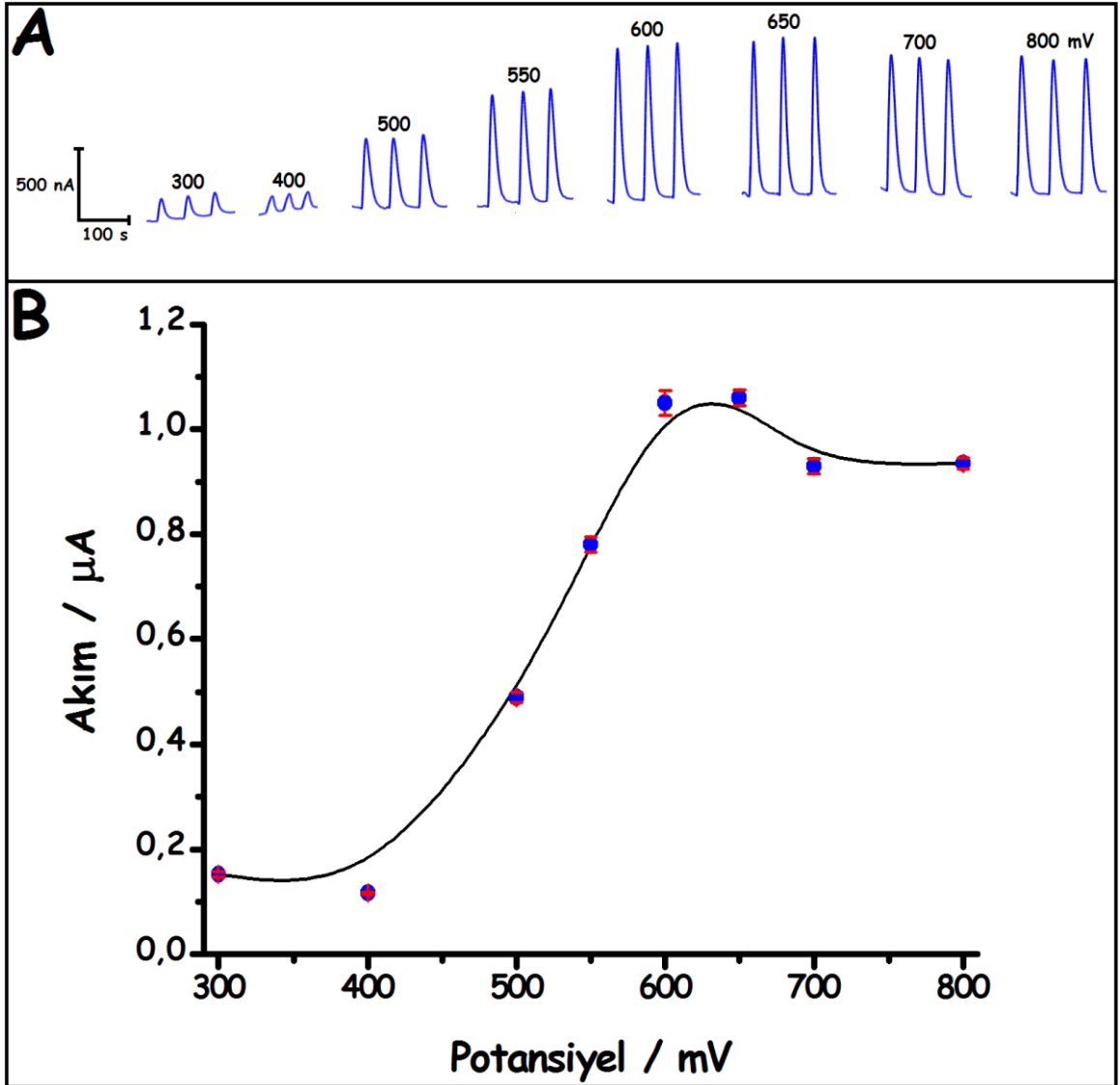
4.4.5.1. Uygulama Potansiyelinin Belirlenmesi

FIA sisteminde gerçekleştirilen çalışmanın ilk kısmında, glukozun enzimatik tepkimesi sonucu oluşan H₂O₂'nin yükseltgenmesi izlenerek amperometrik glukoz biyosensörü tasarlanmıştır. Bu amaçla, en uygun uygulama potansiyelini belirlemek amacıyla farklı anodik uygulama potansiyellerinde GOx-CT/p.PGE ve GOx-CT/Pt/p.PGE'nin 1,0 mM glukoz ortamındaki amperometrik yanıtları incelenmiştir. GOx-CT/p.PGE'nin, FIA'da 1,0 mM glukozun farklı potansiyellerde enjeksiyonuyla kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.78) incelendiğinde +800 mV'da dahi herhangi bir pik elde edilmemiştir. Çünkü daha önce Şekil 4.70 B'de gösterdiği gibi elektroaktif olan H₂O₂, GOx-CT/PGE'de çok yüksek potansiyel değerlerinde (+900 mV) yükseltgenmektedir. Dolayısıyla beklenildiği gibi metal nanopartikül içermeyen enzim immobilize p.PGE için çalışılan tüm potansiyellerde herhangi bir pik gözlenmemiştir.



Şekil 4.78. GOx-CT/p.PGE'nin farklı anodik çalışma potansiyellerinde 1,0 mM glukozun 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Taşıyıcı çözelti: O₂ ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren pH 6,0 BRBS; akış hızı 1,25 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: 100 µL; kolon uzunluğu: 10 cm)

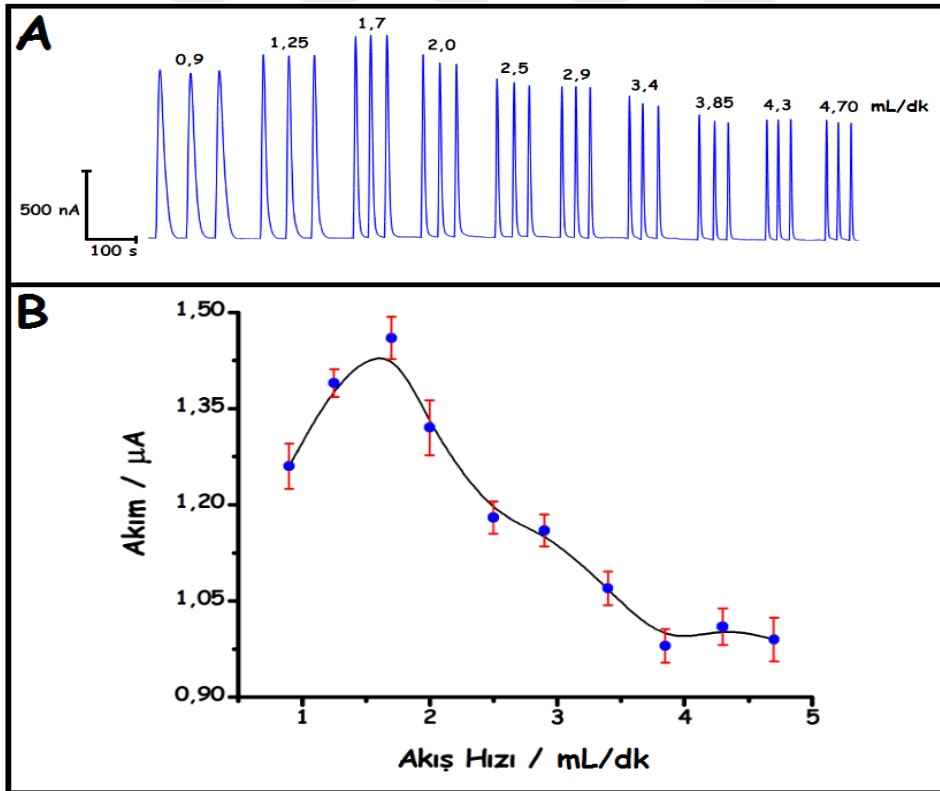
GOx-CT/Pt/p.PGE için kaydedilen amperomogramlar ve akım-potansiyel değişim grafiği ise Şekil 4.79’da verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi glukoz derişimine bağılı olarak enzimatik tepkime sonucu oluşan H_2O_2 ’nin yükseltgenme pikinin +300 - +600 mV potansiyel aralığında potansiyel artışıyla arttığı ve +600 - +800 mV potansiyel aralığında ise hemen hemen sabit kaldığı görülmektedir (Şekil 4.79). Akım-potansiyel grafiklerinden elde edilen sonuçlar göz önüne alınarak akımın sabitlendiği ilk potansiyel olan +600 mV GOx-CT/Pt/p.PGE için en uygun uygulama potansiyeli olarak seçilmiştir.



Şekil 4.79. A) GOx-CT/Pt/p.PGE’nin farklı anodik çalışma potansiyellerinde 1,0 mM glukozun 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Taşıyıcı çözelti: O_2 ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren pH 6,0 BRBS; akış hızı 1,25 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: 100 μL ; kolon uzunluğu: 10 cm) ve B) bu amperomogramlardan elde edilen akım-potansiyel değişim grafiği

4.4.5.2. Taşıyıcı Çözeltinin Akış Hızının Belirlenmesi

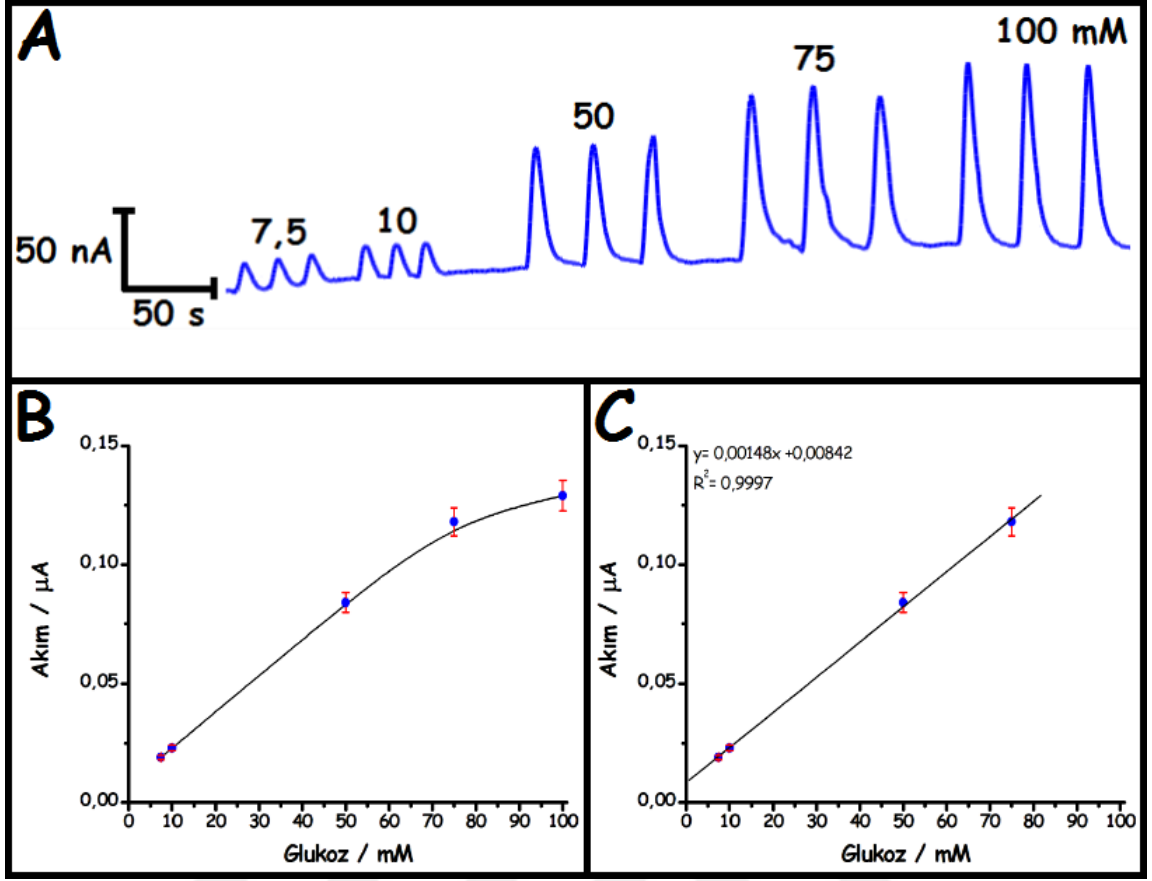
FIA sisteminde uygulama potansiyelinin belirlenmesinin ardından, akış hızı değişiminin enzimatik tepkime sonucu oluşan H_2O_2 'nin yükseltgenme pik akımına etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, GOx-CT/Pt/p.PGE'nin +600 mV çalışma potansiyelinde ve artan akış hızlarında (0,9; 1,25; 1,7; 2,0; 2,5; 2,9; 3,4; 3,85; 4,3 ve 4,7 mL/dk) FIA sisteminde 1,0 mM glukozun enjeksiyonuyla kaydedilen amperomogramları ve akım-akış hızı değişim grafiği Şekil 4.80'de verilmiştir. Amperomogramlar ve akım-akış hızı değişim grafikleri (Şekil 4.80 B) incelendiğinde, FIA'da amperometrik glukoz biyosensörü için en iyi yanıtın 1,7 mL/dk akış hızında alındığı görülmüştür. 1,7 mL/dk akış hızından sonra akımın azalması ise çok yüksek akış hızlarında glukoz ile GOx-CT/Pt/p.PGE arasındaki gerçekleşen enzimatik tepkimeye yeterli sürenin tanınmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle GOx-CT/Pt/p.PGE'de amperometrik glukoz biyosensör çalışmalarına 1,7 mL/dk akış hızı kullanılarak devam edilmiştir.



Şekil 4.80. A) GOx-CT/Pt/p.PGE'nin farklı akış hızlarında 1,0 mM glukozun 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Uygulama potansiyeli: +600 mV; taşıyıcı çözelti: O_2 ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren pH 6,0 BRBS; örnek kolonunun hacmi: 100 μ L; kolon uzunluğu: 10 cm) ve B) bu amperomogramlardan elde edilen akım-akış hızı değişim grafiği

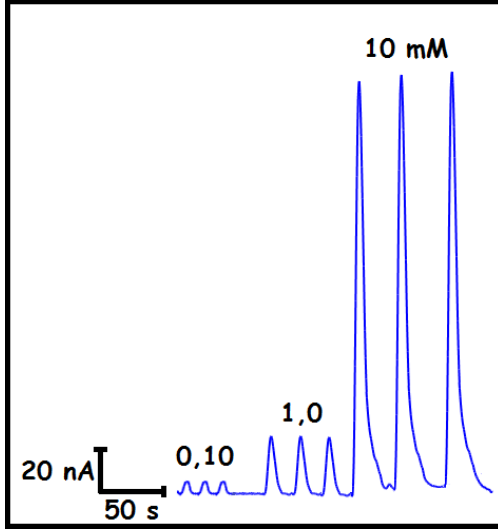
4.4.5.3. GOx-CT/Pt/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Glukoz Biyosensörünün Analitiksel Parametrelerinin Belirlenmesi

Tasarlanan glukoz biyosensörünün analitiksel parametrelerini belirlemek için hem GOx-CT/p.PGE hem de GOx-CT/Pt/p.PGE'nin optimize edilen koşullar altında glukozun farklı derişimlerine verdikleri amperometrik yanıtlar FIA sisteminde incelenmiştir. GOx-CT/p.PGE, Pt/p.PGE ve GOx-CT/Pt/p.PGE'nin artan glukoz derişimine bağı FIA'da kaydedilen amperomogramları Şekil 4.81, 4.82 ve 4.83 A'da, GOx-CT/p.PGE ve GOx-CT/Pt/p.PGE için elde edilen akım-derişim ve kalibrasyon grafikleri ise sırasıyla Şekil 4.81 B ve C ve 4.84 A ve B'de verilmiştir. GOx-CT/p.PGE'nin +600 mV'da kaydedilen amperomogramlarında artan glukozun derişimine bağı olarak enzimatik tepkime sonucu oluşan H₂O₂'nin yükseltgenme pik akımının arttığı ancak çok yüksek derişimlerde (7,5 - 100 mM arası) yanıt verdiği tespit edilmiştir. Çünkü Şekil 4.70 B'de kaydedilen CV'de de bahsedildiği gibi Pt nanoparçacık içermeyen GOx-CT/p.PGE'de H₂O₂ çok yüksek potansiyel değerlerinde (+ 900 mV) yükseltgenmektedir. Dolayısıyla daha negatif olan +600 mV'da seyreltik glukoz çözeltileri için bu piklerin gözlenmemesi ve oldukça derişik çözeltilerde gözlenmesi beklenen bir durumdur.



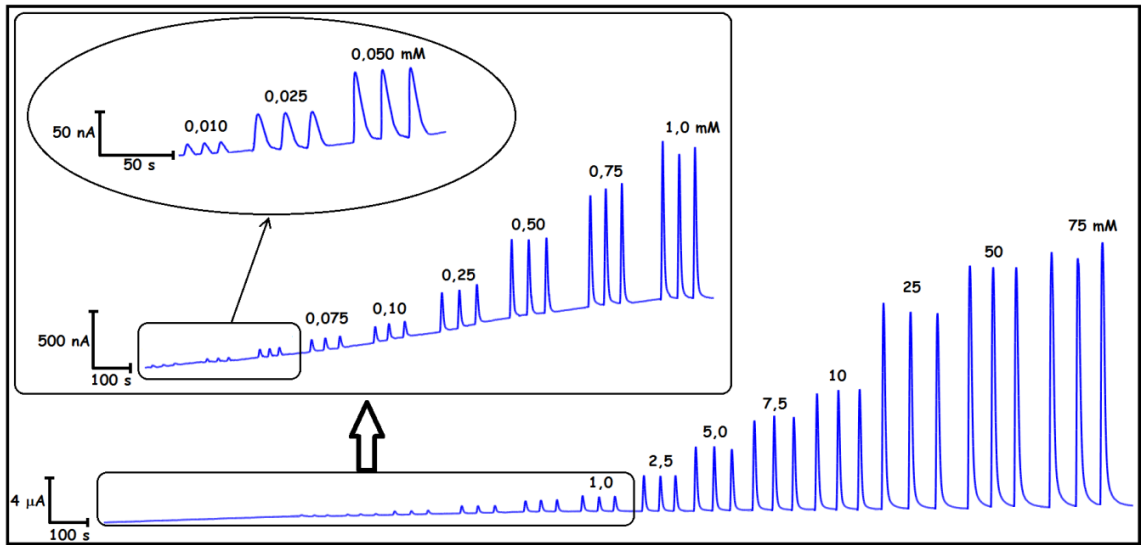
Şekil 4.81. A) GOx-CT/p.PGE'nin artan glukoz derişimine bağı olarak FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Uygulama potansiyeli: +600 mV; taşıyıcı çözelti: O₂ ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren pH 6,0 BRBS çözeltisi; örnek kolonunun hacmi: 100 μL ; kolon uzunluğu: 10 cm), B) akım-zaman eğrilerinden elde edilen akım-derişim grafiği ve C) doğrusal yanıt alınan derişimler için kalibrasyon grafiği (7,5 – 75 mM glukoz; $I(\mu\text{A}) = 0,00148 C(\text{mM}) + 0,00842$; $R^2 = 0,9997$)

Benzer şekilde enzim immobilize edilmemiş metal modifiye elektrot için de (Pt/p.PGE) artan glukoz derişimine bağı optimum koşullar altında kaydedilen amperomogramlarda da çok yüksek glukoz derişimi için pik akımları elde edilmiştir (Şekil 4.82). Bu sonuç, Pt/p.PGE'de glukozun enzimatik tepkime olmadan da yükseltendiğini göstermektedir. Şekil 4.71 A'da Pt/p.PGE için kaydedilen CV'lerde +600 mV'larda glukozla ait çok az da olsa bir yükseltgenme pikinin gözlenmesi bu sonuç ile uyumludur.

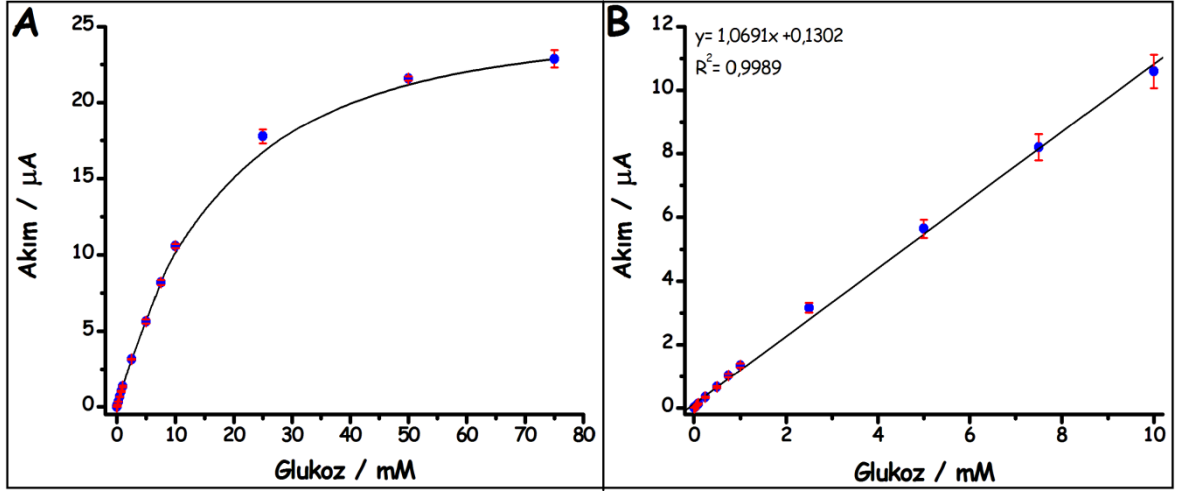


Şekil 4.82. Pt/p.PGE'nin artan glukoz derişimine bağlı olarak FIA'da kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.80'de belirtilen koşullar altında)

Son olarak GOx-CT/Pt/p.PGE için kaydedilen amperomogramlardan görüldüğü gibi (Şekil 4.83) çok düşük derişimlerde (0,010 mM) dahi glukozu ait akım elde edildiği ve bu akımın glukoz derişiminin artmasıyla orantısal olarak arttığı tespit edilmiştir. Oysaki enzimsiz Pt/p.PGE için FI amperometrik yanıtın başladığı derişim 0,10 mM glukoz olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.82). Şekil 4.84'de ise GOx-CT/Pt/p.PGE için kaydedilen amperomogramların değerlendirmesi sonucu elde edilen akım-derişim ve kalibrasyon grafikleri verilmiştir.



Şekil 4.83. GOx-CT/Pt/p.PGE'nin artan glukoz derişimine (0,010 mM – 75 mM) bağlı olarak FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.80'de belirtilen koşullar altında)



Şekil 4.84. GOx-CT/Pt/p.PGE'nin artan glukoz derişimlerine (0,010 – 75 mM) verdiği yanıtlara ait akım-derişim grafiği (A) ve elde edilen kalibrasyon grafiği (B) (0,010 – 10 mM glukoz; $I(\mu A) = 1,0691 C(mM) + 0,1302$; $R^2 = 0,9989$)

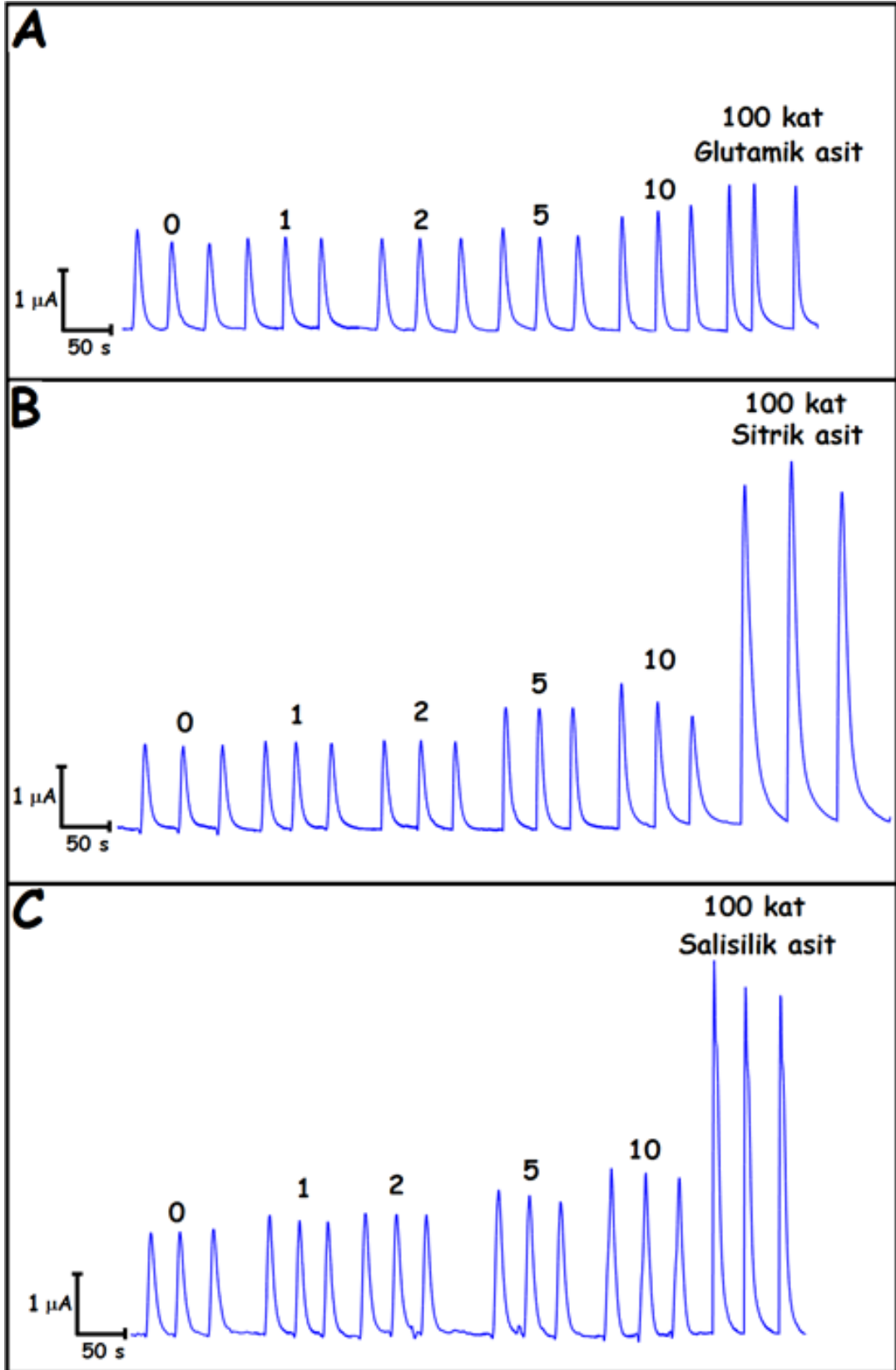
Elde edilen tüm sonuçlar incelendiğinde, en düşük pik akımının elde edildiği glukoz derişimi GOx/p.PGE, Pt/p.PGE ve GOx-CT/Pt/p.PGE'de sırasıyla 7,5, 0,10 ve 0,010 mM olduğu, GOx-CT/Pt/p.PGE'de elde edilen pik akımlarının GOx/p.PGE ve Pt/p.PGE'ye göre oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Örneğin, Pt/p.PGE ve GOx-CT/Pt/p.PGE'nin 1,0 mM glukoz derişimine amperometrik yanıtları karşılaştırıldığında, enzimli elektrot ile yaklaşık 55 kat daha yüksek yanıt alınmıştır. Ayrıca GOx-CT/p.PGE ile GOx-CT/Pt/p.PGE'nin kalibrasyon grafiklerindeki doğru eğimleri oranlandığında GOx-CT/Pt/p.PGE kullanılarak tasarlanan FI amperometrik glukoz biyosensörünün GOx-CT/p.PGE'ye göre 722 kat daha duyar olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 10 µM glukozun sisteme en az 10 kez enjekte edilmesiyle hesaplanan standart sapma değeri (s) ve kalibrasyon doğrusunun eğiminden (m) faydalanarak LOD ve LOQ hesaplanmıştır. Buna göre LOD ve LOQ sırasıyla 3,1 µM (3s/m) ve 10,3 µM (10s/m) olarak bulunmuştur. Ayrıca modifiye elektrodun aktif yüzey alanına ait duyarlılık ise $6,72 \mu A mM^{-1} cm^{-2}$ olarak hesaplanmıştır.

4.4.5.4. GOx-CT/Pt/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Glukoz Biyosensörünün Seçiciliğinin İncelenmesi

Tasarlanan glukoz biyosensörüne olası girişim yapabilecek bazı moleküllerin (GLA, SA, SAL, AA, ÜA ve DA) girişim etkileri, belirli derişimdeki glukozla bağlı enzimatik tepkime sonucu oluşan H_2O_2 'nin FIA sisteminde yükseltgenme pik akımı izlenerek

incelenmiştir. Bu amaçla, glukoz (1,0 mM):girişimci molekül oranı 1:0, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 ve 1:100 olan çözeltiler hazırlanmış ve optimize edilen koşullarda FI amperomogramları kaydedilmiş ve girişim etkileri değerlendirilmiştir. Öncelikle GLA, SA ve SAL'nin enzimatik tepkime sonucu oluşan H₂O₂'nin yükseltgenme pik akımına olası etkileri test edilmiştir. Bu girişimci moleküller için kaydedilen amperomogramlar Şekil 4.85'de ve elde edilen sonuçlar ise Çizelge 4.15'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, herbir girişimcinin glukoz biyosensörüne pozitif etki gösterdiği ve oran arttıkça bu etkinin arttığı tespit edilmiştir. Ancak 5 kat GLA, 2 kat SA ve eşdeğer derişimde SAL'nin etkilerinin %10'nun altında ya da %10'a yakın olmasından dolayı bu oranlardaki girişim etkisi tolere edilebilir düzeyde olduğu değerlendirilmiştir.





Şekil 4.85. GOx-CT/Pt/p.PGE’de 1,0 mM glukozu göre artan oranlarda girişimci molekül (GLA (A), SA(B) ve SAL (C)) içeren çözeltilerin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramlar (Şekil 4.80’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)

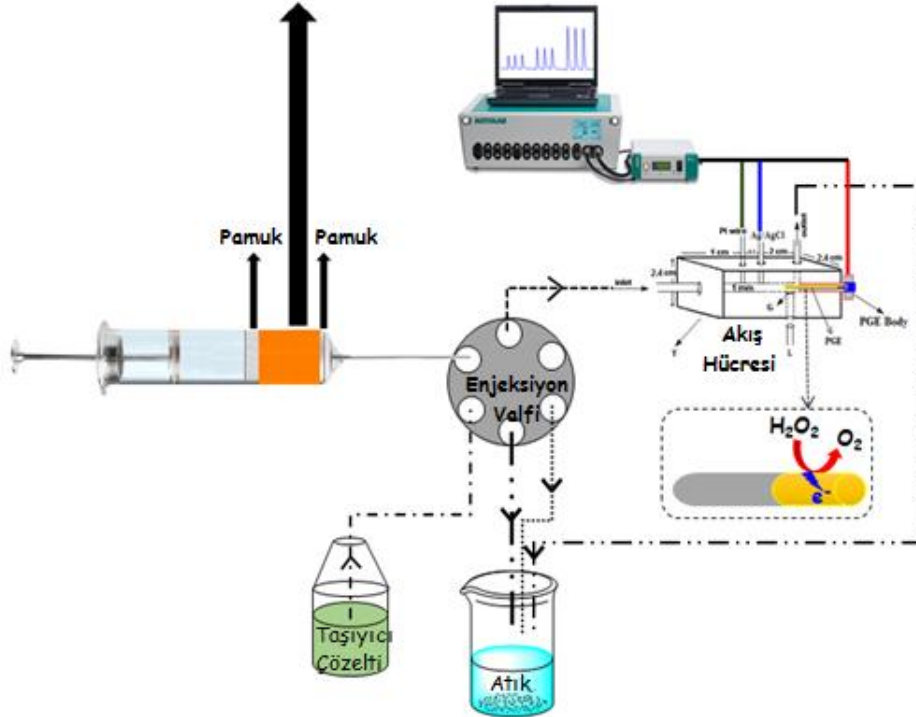
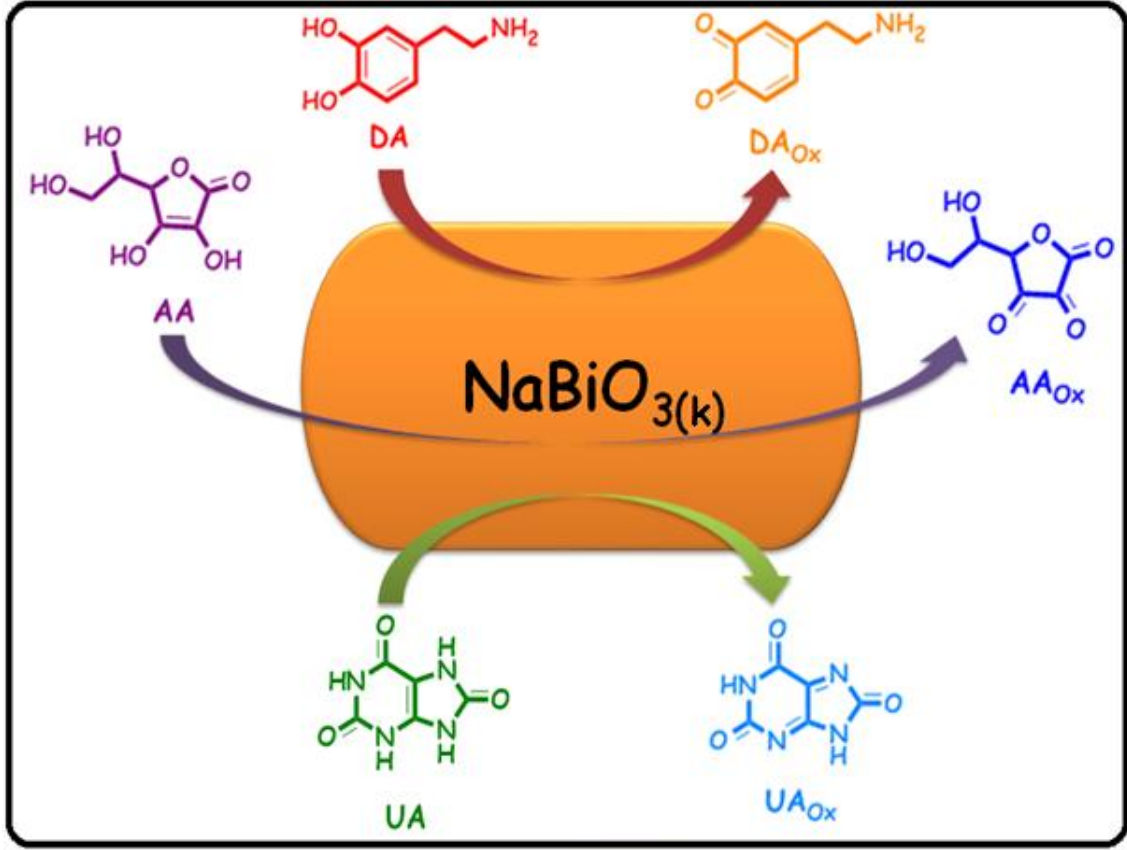
Çizelge 4.15. Her biri 1,0 mM sabit glukoz içeren 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 ve 1:100 oranındaki girişimcilerin GOx-CT/Pt/p.PGE'de glukozla bağlı enzimatik tepkime sonucu oluşan H₂O₂'nin yükseltgenme pik akımına gösterdikleri değişimler (n=3)

Glukoza bağlı enzimatik tepkime sonucu oluşan H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenme Pik Akımındaki Değişimler (%)					
Girişimci Molekül	Glukoz:Girişimci oranı				
	1:1	1:2	1:5	1:10	1:100
GLA	2,0 ±0,02	3,7 ±0,003	8,7 ±0,01	29,9 ±0,003	84 ±0,02
SA	3,6 ±0,003	4,9 ±0,005	45,3 ±0,002	47,8 ±0,06	319 ±0,05
SAL	12,1 ±0,005	18,6 ±0,003	39,5 ±0,02	63,1 ±0,02	276 ±0,07

Bu girişimciler dışında AA, ÜA ve DA gibi olası girişimcilerin de tasarlanan glukoz biyosensörüne etkileri test edilmiştir. Genellikle bu girişimciler aşırı potansiyelerde (yaklaşık +500 mV ve üzeri) yükseltgenerek, enzimatik tepkime sonucu oluşan H₂O₂'nin yükseltgenme pik akımına pozitif girişim etkisi gösterirler ve tasarlanan biyosensörün seçiciliğini zayıflatırlar. Literatürde glukoz biyosensöründe bu tür girişimcilerin farklı yollarla giderildiğine dair çalışmalar mevcuttur. Bunlardan biri ferrosen gibi redoks mediyatörlerin kullanılması (Fatoni ve ark., 2013), diğer bir yaklaşım ise enzim modifiye elektrodun elektropolimerik bir film (Ayenimo ve Adejou, 2017) ya da Nafion gibi bir yarı geçirgen ve seçici membran ile kaplanmasıdır (Shin ve ark., 2018). Ancak uygun mediyatör sayısının çok az olması, aynı elektrot yüzeyine mediyatörle birlikte enzimin kaplanması H₂O₂ ile birlikte girişimci moleküllerinde bu mediyatörlerle elektrokatalitik tepkimeye girmesi mediyatör temelli elektrotların dezavantajlarını oluşturmaktadır. Yarı geçirgen bir membranda ise membranın gözenek boyutu, kararlılığını ve değişmezliğini kontrol etmek oldukça zordur. Ayrıca yarı geçirgen membranlar substratın da elektrot yüzeyine difüzyonunu kısmen engelleyebildiğinden tasarlanan biyosensörün duyarlılığını düşürebilmektedir (Jia ve ark., 2010; Liang ve ark., 2017; Xu ve ark., 2004). Diğer bir yaklaşımda ise elektrot yüzeyinde katı ve çözünmeyen bir önyükseltgeyici kullanılmıştır, böylece elektrot yüzeyine varan girişimci moleküller önceden yükseltgendiğinden enzimatik tepkimeyle oluşan H₂O₂'nin elektron transferine girişim etkileri minimize edilmiş olur (Shin ve ark., 2001; Choi ve ark., 2002; Cui ve ark., 2000; Xu ve ark., 2004; Zhang ve Wang, 2002). Bu amaçla PbO₂, MnO₂, CeO₂ gibi çözünmeyen katı maddeler oksidaz enzimiyle birlikte elektrot yüzeyine tutturulmuş ve AA, DA ve ÜA'nın girişim etkileri giderilmiştir. Ancak bu yaklaşımda ise katı çözünmeyen güçlü oksidantlar immobilize enzim tabakasından kolaylıkla ayrılabilir ve enzimatik tepkime sonucu oluşan H₂O₂'yi de yükseltgeyebilir. Bu dezavantajları gidermek için kimi işlemler literatürde yapılmıştır (Xu ve ark., 2004). Bu tez çalışmasında ise yine bir önyükseltgeyici olan

NaBiO₃ kullanılmıştır. NaBiO₃'ın önemli bir önyükseltgeyici olduğu bilinmesine rağmen elektrokimyasal enzim temelli biyosensörde girişim gidermede kullanılmamış ve ilk defa bu tez kapsamında kullanılmıştır. Ayrıca bu tezde diğer çalışmalarda olduğu gibi bu önyükseltgeyici elektrot yüzeyine modifiye edilmemiş, FIA sisteminde kullanılan enjektörün içerisine yerleştirilmiştir. Böylece, ilgili girişimcilerin girişim etkilerini gidermek amacı ile suda çözünmeyen ön-oksitleyicinin belirli bir miktarı (NaBiO₃, E^o= 1,6 V) enjektör içine yerleştirilerek, olası girişimcilerin akış hücresindeki elektrot yüzeyine ulaşmadan önce enjektör içinde yükseltgenmiş formlarına dönüşmesi sağlanmış ve bu girişimcilerin etkilerinin giderilmesi planlanmıştır. Girişim gidermeye ilişkin tüm aşamaları içeren şematik bir gösterim Şekil 4.86'da verilmiştir.

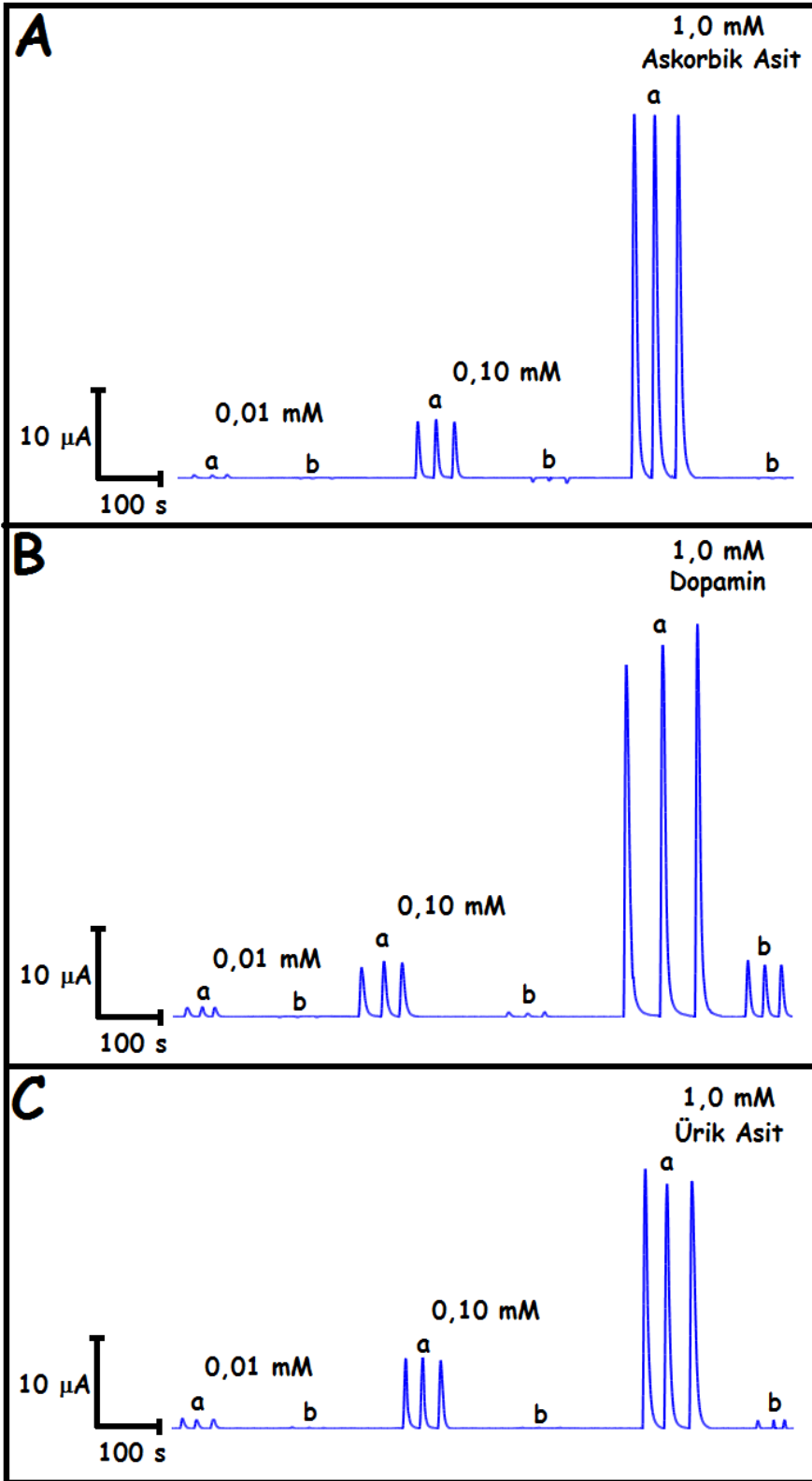




Şekil 4.86. Girişim etkisi gösteren AA, DA ve ÜA'nın NaBiO_3 doldurulmuş enjektör ile ön yükseltgenmelerinin ve FIA sisteminde glukoz biyosensörünün şematik gösterimi

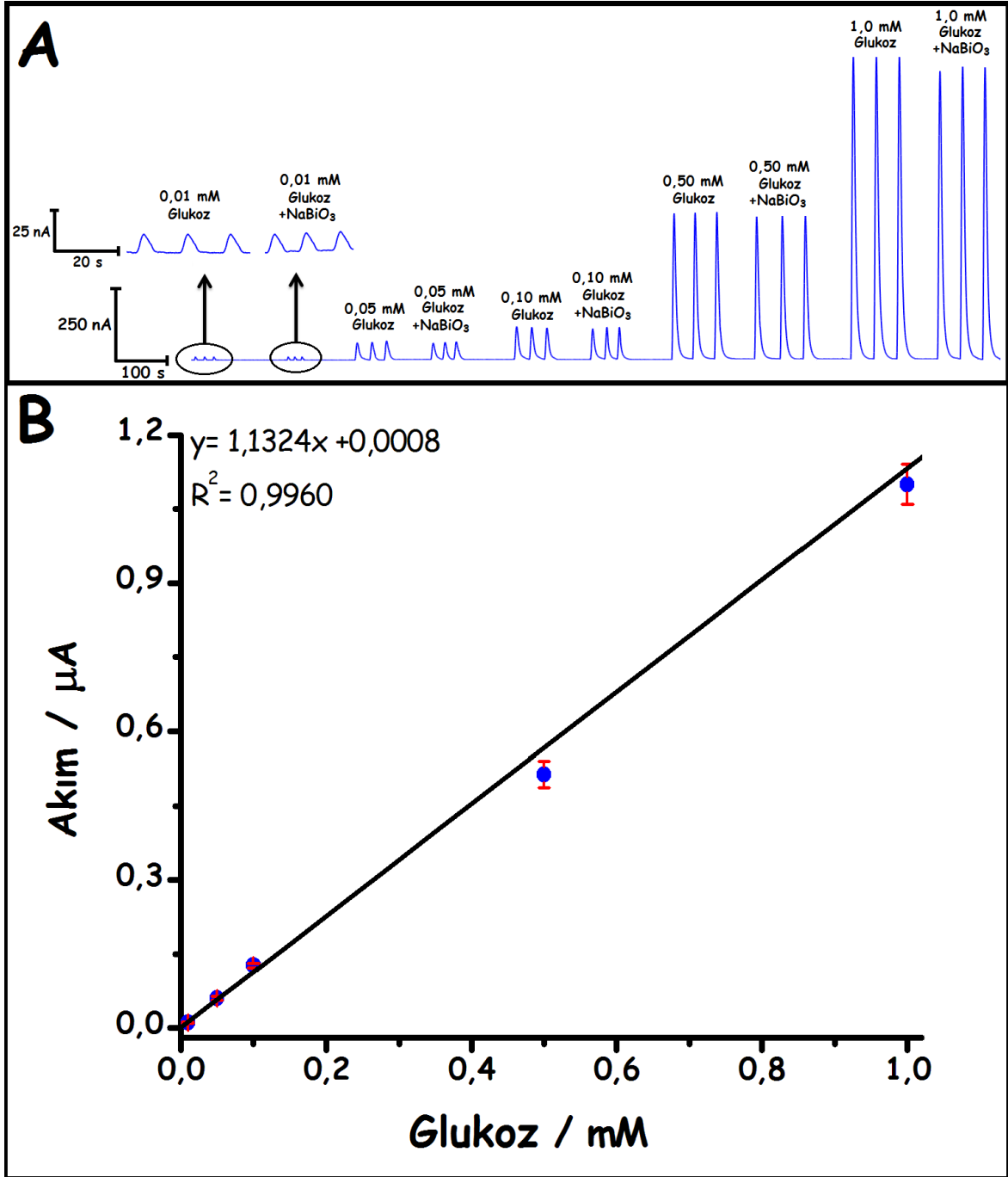
Girişim giderme çalışmalarına başlamadan önce, her bir girişimci molekülün farklı derişimlerinde hazırlanan çözeltileri önce boş ve daha sonra NaBiO_3 doldurulmuş

enjektörle FIA sistemine enjekte edilmiştir. Böylece glukoz içermeyen girişimci çözeltilerin GOx-CT/Pt/p.PGE'de yükseltgenme akımlarının önyükseltgeyiciyle giderilip giderilmediği incelenmiştir. Bu amaçla, ayrı ayrı hazırlanmış AA, DA ve ÜA'nın üç farklı derişimlerini (0,01; 0,10 ve 1,0 mM) içeren çözeltilerin sırasıyla boş ve 1,0 gr NaBiO₃ ile doldurulmuş bir enjektör kullanılarak FIA sisteminde kaydedilen amperogramları Şekil 4.87'de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi, NaBiO₃ içermeyen enjektör kullanıldığında, tüm girişimcilerin sisteme enjeksiyonuyla oldukça yüksek yükseltgenme pik akımları gözlenmiştir. NaBiO₃ kullanıldığında ise özellikle AA ve ÜA'nın yükseltgenme pik akımlarının en yüksek derişimlerde (1,0 mM) bile önemli ölçüde azaltıldığı görülmektedir. DA'nın yükseltgenme pik akımı önemli düzeyde azaltılmış ancak özellikle 1,0 mM gibi yüksek derişimde tam giderilememiştir. Sonuç olarak, suda çözünmeyen bir ön-oksitleyici olan NaBiO₃'ün ilgili girişimcileri akış hücresinde elektrot yüzeyine ulaşmadan önce enjektörde yükseltgeyerek onları elektroaktif olmayan türlerine (yükseltgenmiş formlarına) dönüştürdüğü tespit edilmiştir.



Şekil 4.87. Üç farklı derişimde taşıyıcı çözelti içerisinde hazırlanmış AA (A), DA (B) ve ÜA (C)'nin boş (a) ve NaBiO₃ doldurulmuş enjektör (b) ile FIA sistemine enjeksiyonuyla GOx-CT/Pt/p.PGE'de kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.80'de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)

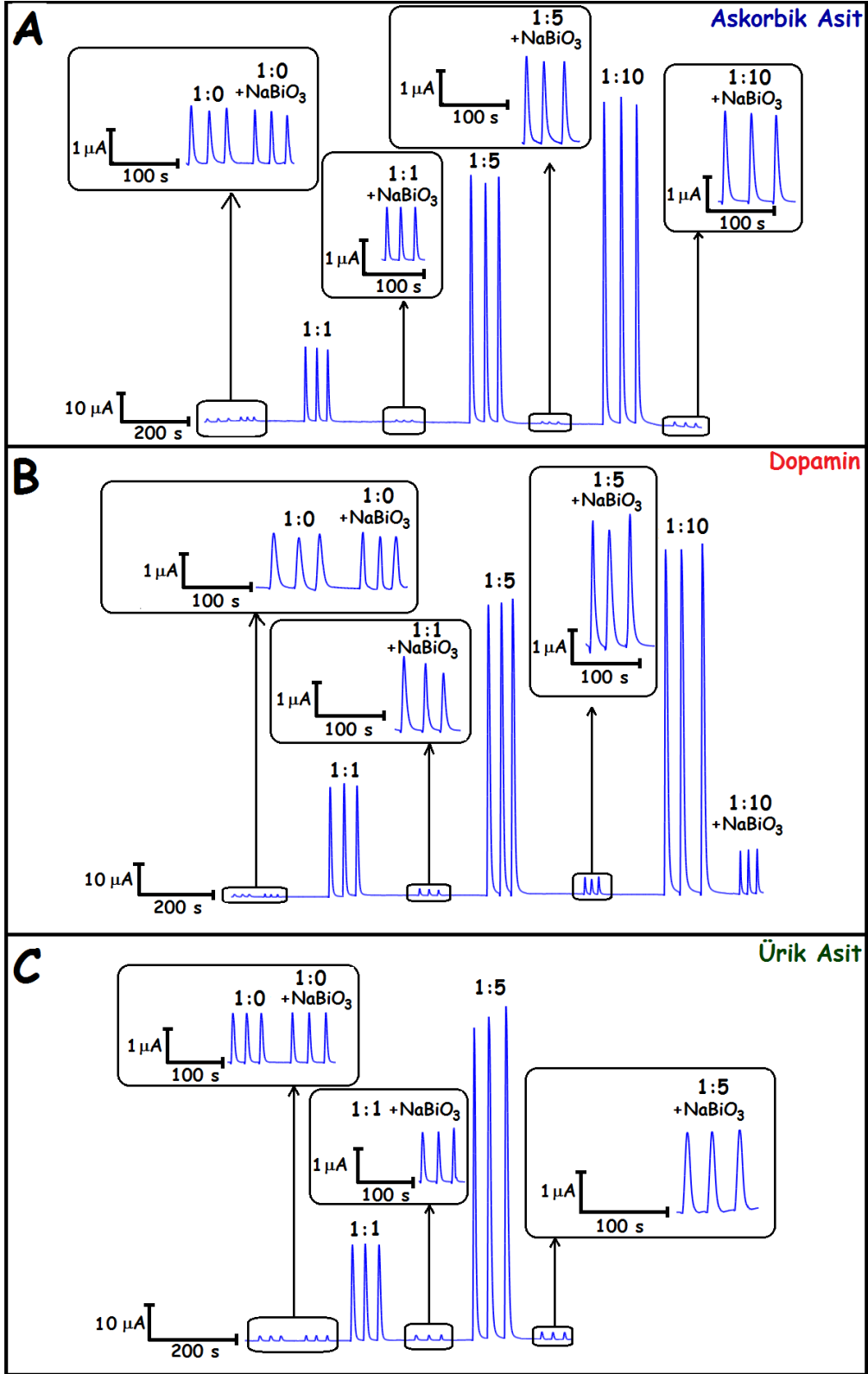
Glukoz ile birlikte bu girişimcileri birarada içeren çözeltilerin FIA sistemine geçmeden önce, önyükseltgecinin glukozla bağlı enzimatik tepkime sonucu oluşan H_2O_2 'nin yükseltgenme akımına etki edip etmediği incelenmiştir. Bu amaçla artan derişimlerde taşıyıcı çözelti içerisinde hazırlanan glukoz çözeltileri hem $NaBiO_3$ içermeyen (boş) hem de içeren enjektörle sisteme enjekte edilmiş ve $GOx-CT/Pt/p.PGE$ 'deki FI amperomogramları kaydedilmiş ve Şekil 4.88 A'da verilmiştir. Farklı derişimlerdeki (0,01, 0,05, 0,10, 0,50 ve 1,0 mM) glukoz çözeltilerinin $NaBiO_3$ içeren ve içermeyen enjektör ile FI sistemine verildiğinde yükseltgenme pik akımlarında önemli bir değişiklik görülmemiştir (Şekil 4.88 A). Dolayısıyla $NaBiO_3$ 'ın enjeksiyon esnasında enjektörden geçen glukozu yükseltgemediği ve elektrot yüzeyine taşınan glukozun enzimatik tepkimeye girmesine bir engel oluşturmadığı ve oluşan H_2O_2 'ye de bir etki etmediği sonucuna varılmıştır. Ayrıca glukozla ait kalibrasyon grafiği de elde edilen verilerden çizilmiş ve Şekil 4.88 B'de verilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafiğinin eğimi ($1,13 \mu A/mM$) daha önce $NaBiO_3$ içermeyen enjektörle ile kaydedilen ve Şekil 4.84 B'de gösterilen kalibrasyon grafiğinin eğimine ($1,07 \mu A/mM$) oldukça yakın bulunmuştur. Tüm bu sonuçlar $NaBiO_3$ önyükseltgeycisinin, $GOx-CT/Pt/p.PGE$ kullanılarak FIA sisteminde tasarlanan glukoz biyosensörüne etki etmediğini göstermektedir.



Şekil 4.88. A) Farklı derişimlerde taşıyıcı çözelti içerisinde hazırlanmış glukoz çözeltilerinin boş (a) ve NaBiO₃ doldurulmuş enjektör (b) ile FIA sistemine enjeksiyonuyla GOx-CT/Pt/p.PGE’de kaydedilen amperomogramları ve B) elde edilen kalibrasyon grafiği ($I(\mu A) = 1,1324 C(mM) + 0,0008$ ve $R^2 = 0,9960$)

Girişim çalışmasının son adımında ise glukozun seçici olarak tayinini kanıtlamak amacıyla, ilgili girişimcilerin kan serumundaki derişiminden (AA ve DA için 0,20 mM ve ÜA için 1,0 mM) daha yüksek derişimlerde 1,0 mM glukoz içeren farklı oranlardaki

çözeltileri hazırlanmış ve NaBiO₃ içeren ve içermeyen enjektör kullanılarak optimize edilen koşullar altında FI analizi gerçekleştirilmiştir. Glukoz(1,0 mM):girişimci molekül oranı 1:0, 1:1, 1:5 ve 1:10 olan çözeltilerin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperogramları Şekil 4.89'da verilmiştir. Çizelge 4.16'da verilen sonuçlar incelendiğinde, glukozu göre AA, DA ve ÜA'nın eş derişimleri (1,0 mM) varlığındaki girişim etkilerinin, H₂O₂'nin enzimsiz yükseltgenmesi üzerine yapılan çalışmalarda gösterdikleri girişim etkilerinden oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum, enzimli çalışmada uygulanan potansiyelin (+600 mV) enzimsiz çalışmalara göre yüksek olması ve glukozun yüksek derişiminin (1,0 mM) kullanılmasıyla ilişkilendirilmektedir. NaBiO₃ enjektör kullanılarak girişimciler FIA sistemine verildiğinde girişimci etkilerinin büyük ölçülerde giderildiği anlaşılmaktadır. Özellikle NaBiO₃ enjektör kullanılarak glukoz:girişimci oranının 1:1 olduğu durumda, AA, ve ÜA'nın girişim etkisinin tamamen giderildiği tespit edilmiştir. DA için ise 1:1 oranında girişim etkisi beklenen seviyeye düşmemesine rağmen girişim etkisinin önemli ölçüde giderildiği görülmektedir. Tüm sonuçlar, NaBiO₃ kullanılarak glukozun AA, DA ve ÜA ortamında 1:1 oranında olduğu durumlarda seçici olarak tayin edilebileceğini göstermektedir.



Şekil 4.89. Glukoza (1,0 mM) göre artan oranlarda girişimci molekül (AA (A), DA (B) ve UA (C)) içeren çözeltilerinin, NaBiO₃ içermeyen ve içeren enjektör kullanılarak FIA sistemine enjeksiyonuyla GOx-CT/Pt/p.PGE’de kaydedilen amperomogramlar (Şekil 4.80’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)

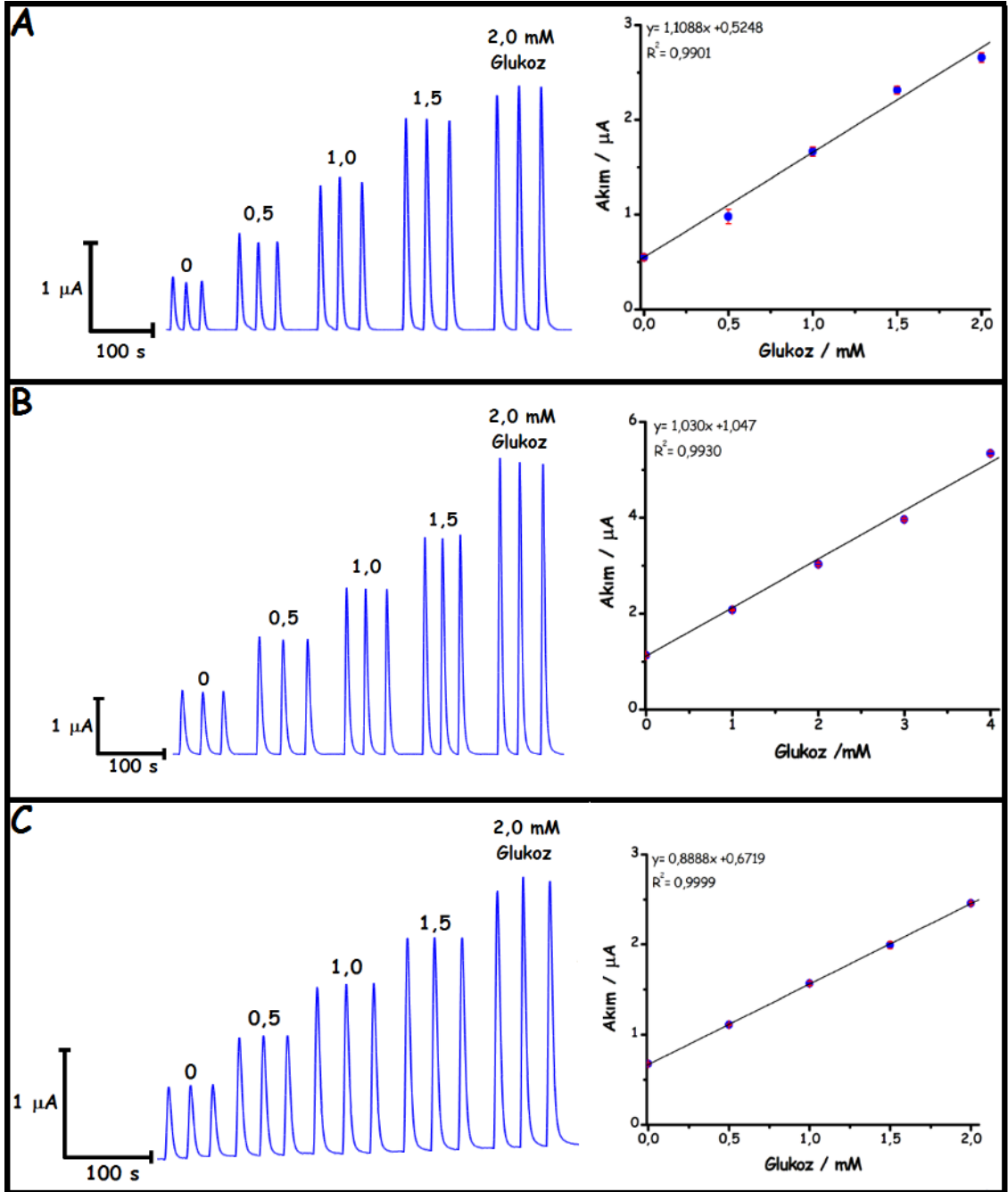
Çizelge 4.16. Her biri 1,0 mM sabit glukoz içeren 1:1, 1:5 ve 1:10 oranındaki girişimcilerin GOx-CT/Pt/p.PGE'de glukozla bağlı enzimatik tepkime sonucu oluşan H₂O₂'nin yükseltgenme pik akımında gösterdikleri değişimler (n=3)

Glukozla bağlı enzimatik tepkime sonucu oluşan H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenme Pik Akımındaki Değişimler (%)						
Girişimci Molekül	Glukoz: Girişimci Oranı					
	1:1	1:1 +NaBiO ₃	1:5	1:5 +NaBiO ₃	1:10	1:10 +NaBiO ₃
AA	2681 ±0,50	0,32±0,50	9341 ±3,45	45,2 ±0,01	12324 ±2,42	54,7 ±0,01
DA	2182 ±1,23	41,3 ±0,01	5842 ±0,96	239 ±0,84	6948 ±1,69	779 ±0,41
ÜA	1788 ±0,25	1,31 ±0,12	6228 ±4,90	38,8 ±0,09	-	-

4.4.5.5. GOx-CT/Pt/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Biyosensörün Glukoz İçeren Örneklerle Uygulanması

Tasarlanan elektrokimyasal glukoz biyosensörünün gerçek örneklerle uygulanabilirliğinin test edilmesi amacıyla, yapay kan serumu, dekstroz serum ve oral glukoz tolerans içeceği olmak üzere üç farklı örnekteki glukoz düzeyleri önerilen yöntemle analiz edilmiştir. Literatürdeki bir yöntemle göre hazırlanan yapay serum (Özcan ve Sezgintürk, 2015), AA, DA ve ÜA içerdiğinden dolayı NaBiO₃ içeren, diğer örneklerde ise NaBiO₃ içermeyen enjektör kullanılarak glukoz analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 1/10 oranında taşıyıcı çözeltisi ile seyreltilmiş yapay kan serumu çözeltilerine 0, 0,5, 1,0 1,5 ve 2,0 mM olacak şekilde standart glukoz eklenmiş ve bu çözeltiler FIA sistemine NaBiO₃ içeren enjektör kullanılarak enjekte edilmiştir. Kaydedilen amperomogramlar, standart katma grafiği ile birlikte Şekil 4.90 A'da verilmiştir.

Tasarlanan biyosensörün diğer uygulamalarında ise, her biri sırasıyla 1/250 ve 1/2000 oranında seyreltilmiş dekstroz serum ve oral glukoz tolerans içeceği çözeltilerine ayrı ayrı 0, 0,5, 1,0 1,5 ve 2,0 mM içerecek şekilde glukoz ilâve edilmiş ve bu çözeltiler FIA sistemine NaBiO₃ içermeyen enjektör kullanılarak enjekte edilmiştir. Elde edilen amperomogramlar ve ilgili standart katma grafikleri Şekil 4.90 B ve C'de verilmiştir.



Şekil 4.90. Taşıyıcı çözelti ile seyreltilmiş yapay kan serumu (1/10) (A), dekstroz serum (1/250) (B), oral glukoz test içeceği (1/2000) (C) ve bu seyreltik örneklerde 0, 0,5, 1,0 1,5 ve 2,0 mM glukoz içerecek şekilde hazırlanan standart çözeltilerinin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperogramları (Şekil 4.80’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında, A için NaBiO₃’lı, B ve C için NaBiO₃’sız enjektör kullanılmıştır) ve elde edilen standart katma grafikleri

Standart katma grafiklerinden her bir örnekteki glukoz değerleri hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.17’de verilmiştir.

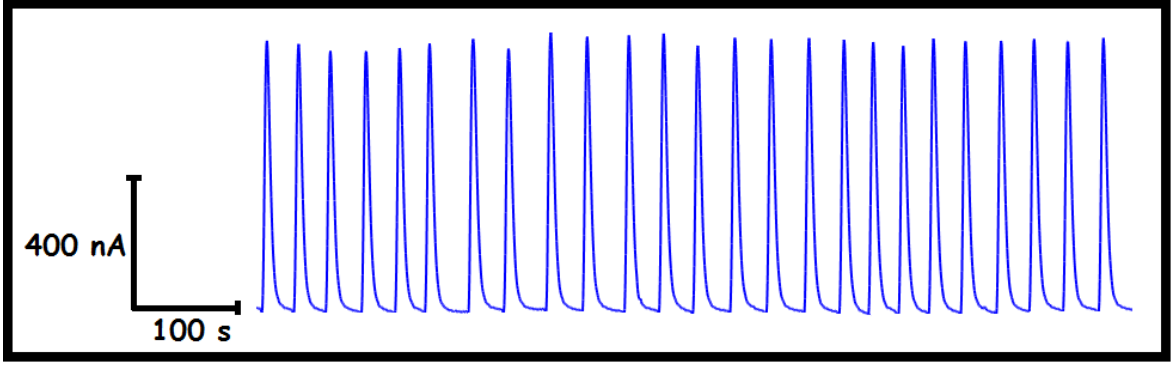
Çizelge 4.17. GOx-CT/Pt/p.PGE kullanılarak tasarlanan FI amperometrik glukoz biyosensörünün farklı örneklere uygulanması ile elde edilen sonuçlar (n=3)

Örnek	Örneklerde Hesaplanan Glukoz Derişimi	FI Standart Katma Metodu ile Bulunan Sonuç
Yapay Kan	4,77 mM	4,73 mM \pm 0,07 t_{den} : 0,99 (P: 0,05, 2)
Dekstroz Serumu	252,5 mM	254,3 mM \pm 1,77 t_{den} : 1,76 (P: 0,05, 2)
Glukoz Tolerans Test İçeceği	1514 mM	1512,7 mM \pm 2,50 t_{den} : 0,90, (P: 0,05, 2)
t_{kritik} : 4,30 (P: 0,05, 2) (Douglas ve ark., 1988)		

Sonuçlar incelendiğinde, tasarlanan biyosensörün üç farklı örneğe uygulanması ile yüksek doğrulukta sonuçların alındığı görülmekte olup, tasarlanan biyosensörün glukoz içeren örneklere başarıyla uygulanabileceği kanıtlanmıştır. Her üç örnek için elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak student t-testi ile değerlendirilmiş ve önerilen elektrot kullanılarak yapay kan serumu, dekstroz serum ve oral glukoz tolerans içeceği için t_{den} değerleri sırasıyla 0,99, 1,76 ve 0,90 olarak bulunmuştur. Bunlar, 2 serbestlik derecesi için % 95 güven derecesinde t_{kritik} değerden (4,30) daha küçüktür (Douglas ve ark., 1988). Böylece sıfır hipotezi kabul edilebilir ve X_{ort} ve μ arasında % 95 güven düzeyinde anlamlı bir fark olmadığı söylenebilir.

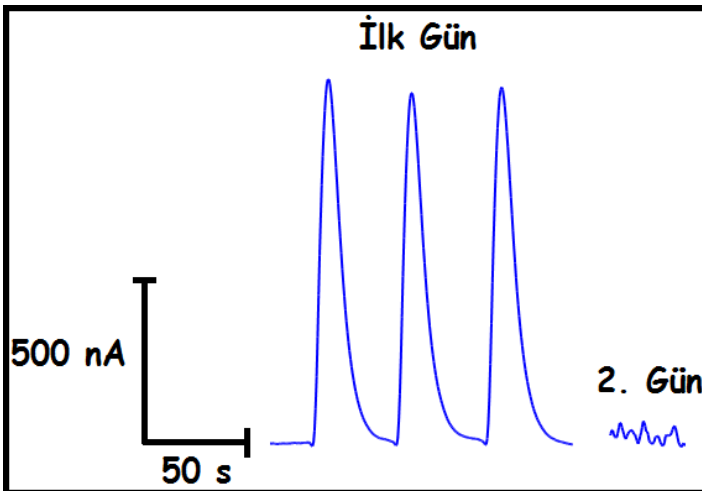
4.4.5.6. GOx-CT/Pt/p.PGE'nin Tekrarlanabilirliğinin ve Kararlılığının Test Edilmesi

Tasarlanan glukoz biyosensörünün tekrarlanabilirliği, 1,0 mM glukoz çözeltisinin optimum koşullar altında FIA sistemine 30 ardışık enjeksiyonuyla test edilmiştir. FIA sisteminde kaydedilen amperomogramlardan (Şekil 4.91) görüldüğü üzere, glukozun ardışık olarak enjeksiyonuyla pik akımlarında kayda değer bir değişim gözlenmemiştir. Pik akımlarından, ortalama değer %RSD değerı sırasıyla $0,844 \pm 0,012 \mu A$ ve % 1,42 olarak hesaplanmıştır. Oldukça düşük bir RSD değerinin elde edilmesi tasarlanan glukoz biyosensörünün gün içinde tekrarlanabilirliğinin oldukça iyi olduğunu yansıtmaktadır.



Şekil 4.91. GOx-CT/Pt/p.PGE’de 1,0 mM glukoz çözeltisinin ardışık 30 kez enjeksiyonuyla FIA’da kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.80’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)

Tasarlanan biyosensörün kararlılığını test etmek için ise GOx-CT/Pt/p.PGE’de 1,0 mM glukoz çözeltisinin FIA sisteminde günler arası amperomogramları kaydedilmiş ve Şekil 4.92’de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi ilk gün glukoz için beklenen akımlar elde edilirken, bir gün boyunca +4 °C’de buzdolabında bekletilen elektrodun tekrar kullanımıyla glukozu herhangi bir yanıt vermediği tespit edilmiştir. Dolayısıyla Pt/p.PGE yüzeyindeki GOx, aktivitesini sonraki gün yitirdiği sonucuna varılmıştır. Her ne kadar GOx-CT/Pt/p.PGE kullanılarak tasarlanan glukoz biyosensörünün günler arası kararlılığı iyi olmasa da, PGE’nin tek kullanımlı olmasından ötürü kullan at mantığıyla bu kararlılık probleminin tolere edilebileceği söylenebilir.



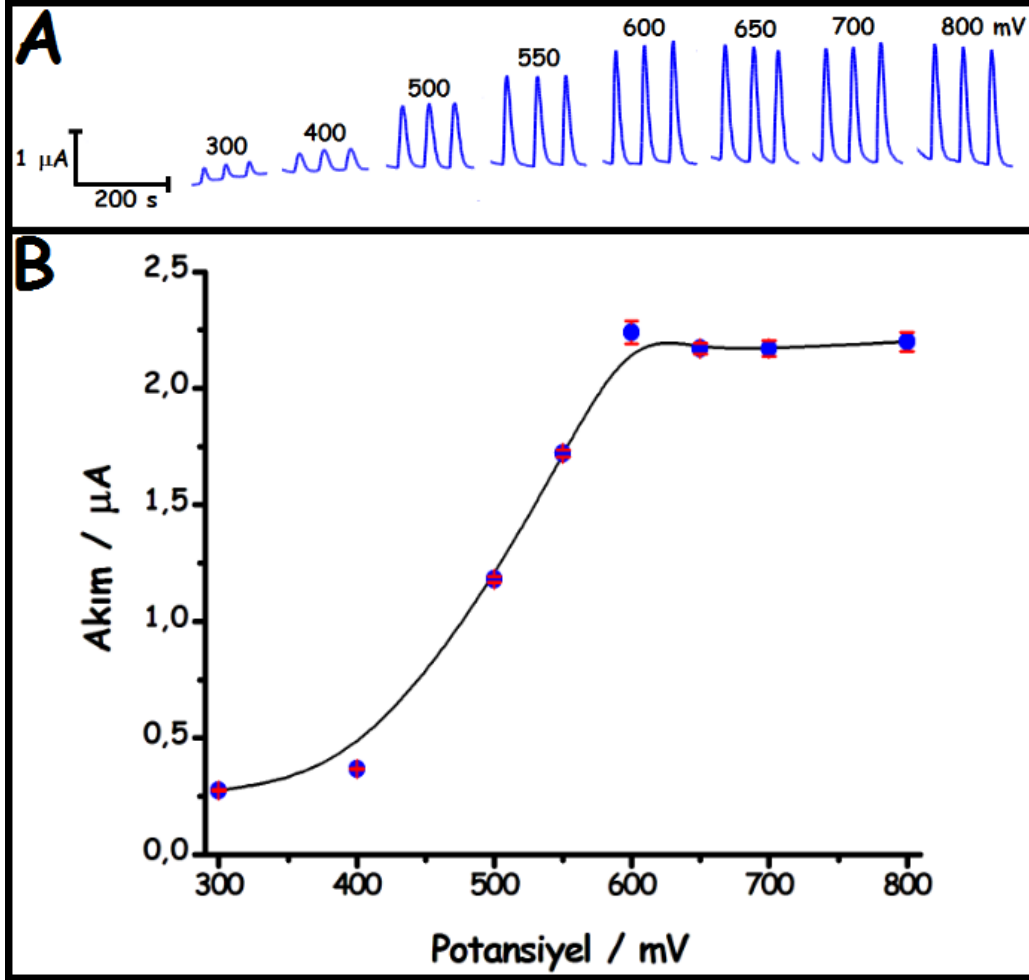
Şekil 4.92. GOx-CT/Pt/p.PGE’de 1,0 mM glukoz çözeltisinin arda arda 1. ve 2. gün enjeksiyonuyla FIA’da kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.80’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)

4.4.6. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE Kullanılarak FIA Sisteminde Glukoz Biyosensörü Çalışmaları

Bir önceki kısımda sadece monometalik (Pt) modifiye p.PGE kullanılarak FIA sisteminde amperometrik glukoz biyosensörü ile ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu kısımda ise daha öncede belirlendiği gibi glukozu en iyi yanıt veren Pt-Pd bimetal modifiye p.PGE kullanılarak FIA sisteminde benzer işlemler tekrarlanmıştır. Dolayısıyla bu kısımda yorumdan ziyade daha çok şekiller üzerinde durulmuştur.

4.4.6.1. Uygulama Potansiyelinin Belirlenmesi

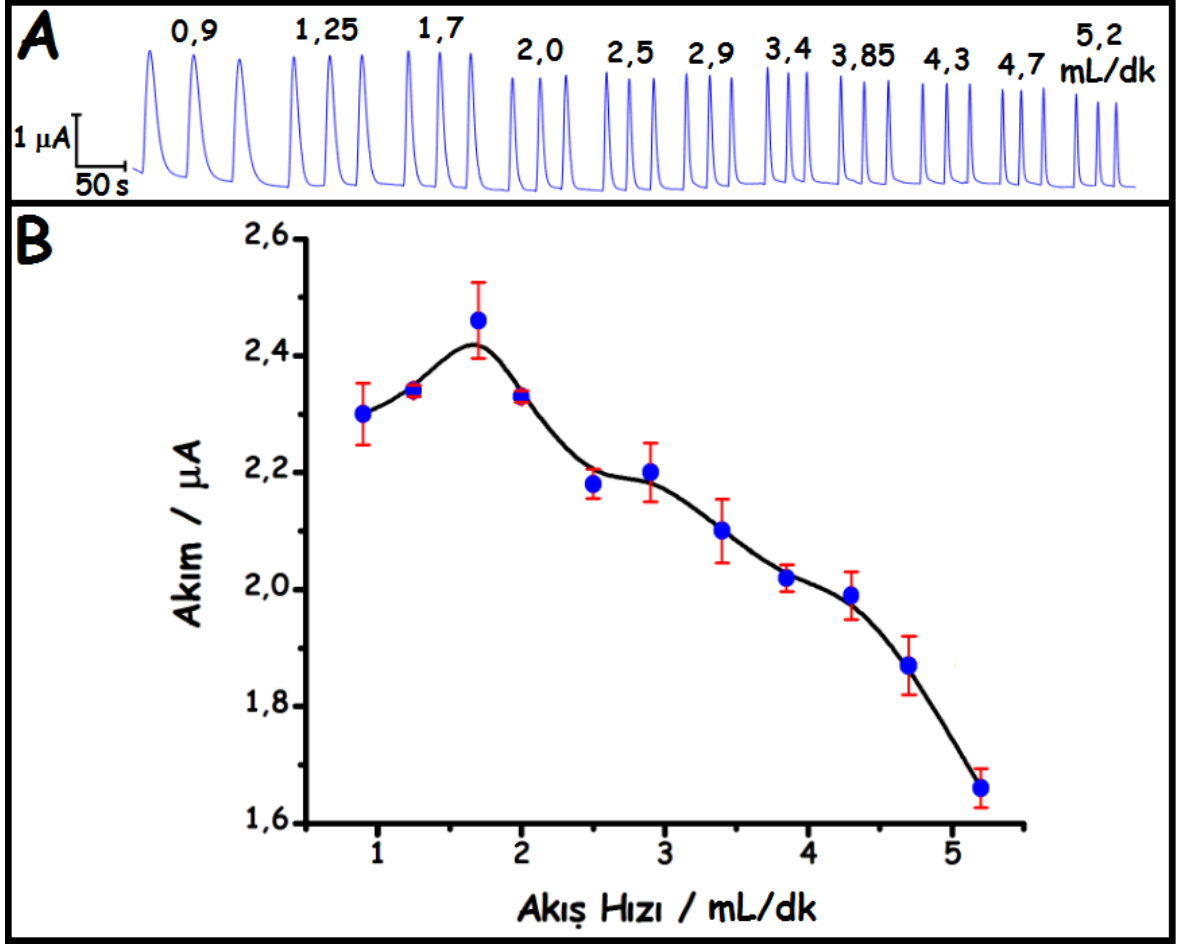
Daha önceki bölümlerde Şekil 4.78’de gösterildiği gibi GOx-CT/p.PGE’de glukoz biyosensörüne +800 mV uygulama potansiyelinin de dahi amperometrik yanıt alınmadığı vurgulanmıştır. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE’nin 1,0 mM glukoz için farklı potansiyelerde kaydedilen FI amperogramları ve akım-potansiyel değişim grafikleri Şekil 4.93’de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi en uygun potansiyel değeri bu elektrotta +600 mV olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.93. A) GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin farklı anodik çalışma potansiyellerinde 1,0 mM glukozun 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Taşıyıcı çözelti: O₂ ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren pH 6,0 BRBS; akış hızı 1,25 mL/dk; örnek kolonunun hacmi: 100 μL ; kolon uzunluğu: 10 cm) ve B) bu amperomogramlardan elde edilen akım-potansiyel değişim grafiği

4.4.6.2. Taşıyıcı Çözeltinin Akış Hızının Belirlenmesi

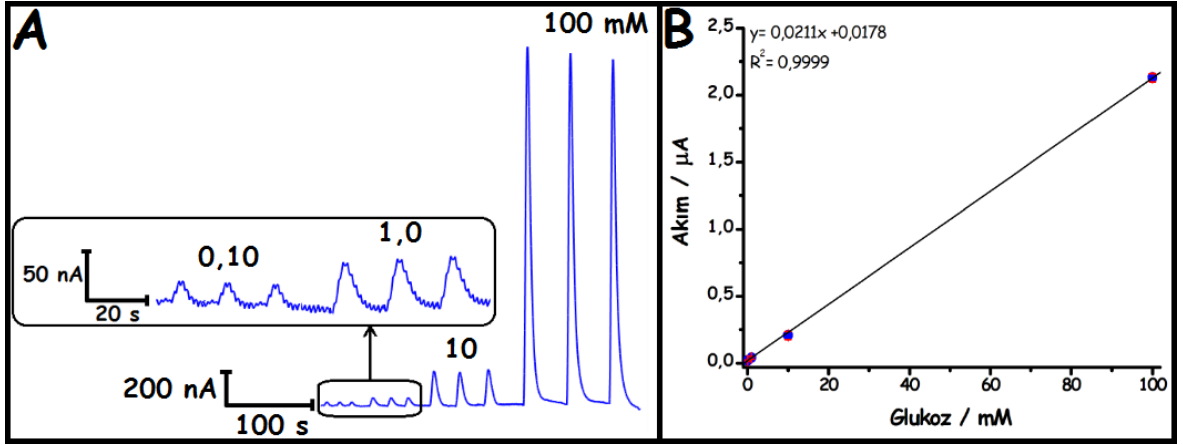
Optimum akış hızını belirlemek amacıyla, GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE kullanılarak 1,0 mM glukozun +600 mV çalışma potansiyelinde artan akış hızına bağlı amperomogramları kaydedilmiş ve akım-akış hızı değişim grafiği ile birlikte Şekil 4.94'de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE kullanılarak FIA sisteminde analizde glukoz biyosensörü için en uygun akış hızı 1,7 mL/dk olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.94. A) GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin farklı akış hızlarında 1,0 mM glukozun 3 ardışık enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Uygulama potansiyeli: +600 mV; taşıyıcı çözelti: O₂ ile doyurulmuş 1,0 M KCl içeren pH 6,0 BRBS; örnek kolonunun hacmi: 100 μL ; kolon uzunluğu: 10 cm) ve B) bu amperomogramlardan elde edilen akım-akış hızı değişim grafiği

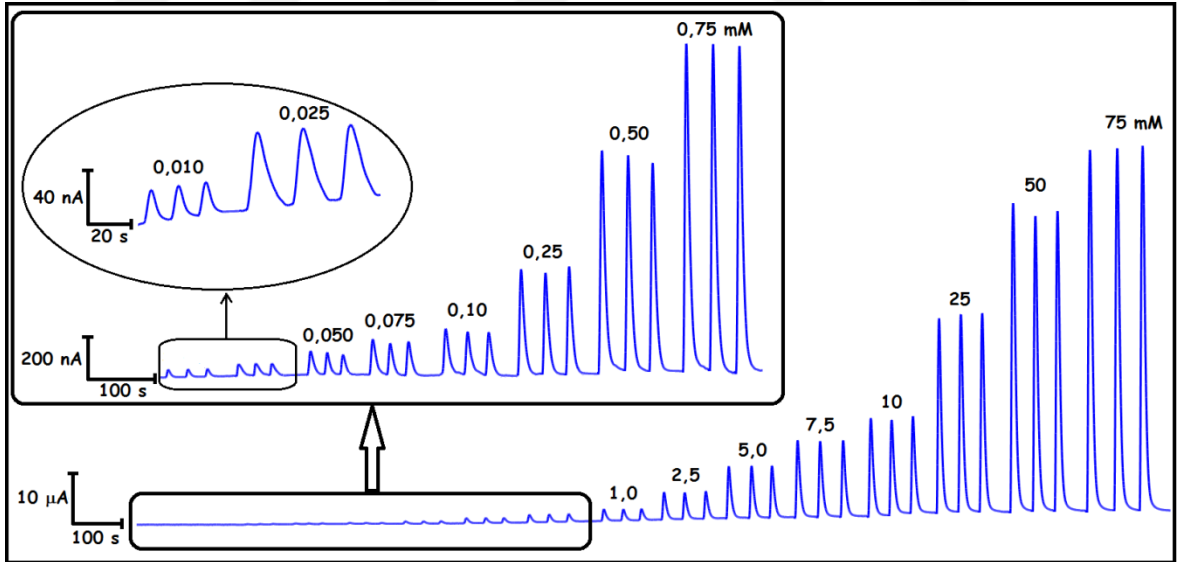
4.4.6.3. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Glukoz Biyosensörünün Analitiksel Parametrelerinin Belirlenmesi

Daha önceki bölümde metal ve bimetal nanoparçacık içermeyen ancak enzim immobilize edilmiş elektrodun (GOx-CT/p.PGE) artan glukoz derişimine bağlı amperomogramı Şekil 4.81'de verilmiş ve glukozun çok yüksek derişimlerde yanıt verdiği tespit edilmişti. Pt/p.PGE'de (Şekil 4.82) olduğu gibi enzim immobilize edilmemiş Pt-Pd/p.PGE'nin de optimize edilen koşullarda artan glukoz derişimine bağlı amperomogramları kaydedilmiş ve kalibrasyon grafiği ile birlikte Şekil 4.95'de verilmiştir. Bu elektrot ile de GOx-CT/p.PGE ve Pt/p.PGE'de olduğu gibi enzimsiz olarak glukozun yükseltgenmesine yüksek derişimlerde yanıt alındığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.95. Pt-Pd/p.PGE'nin artan glukoz derişimine bağlı olarak FIA'da kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.94'de belirtilen koşullar altında)

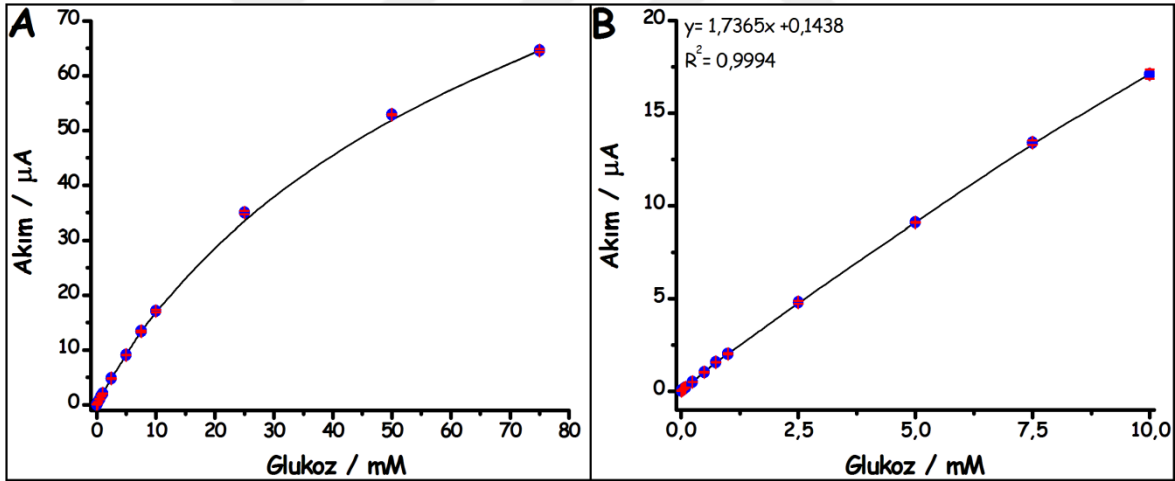
Optimize edilen koşullarda, GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin FIA sisteminde artan glukoz derişimine bağlı kaydedilen amperomogramları ise Şekil 4.96'da verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi çok küçük derişimlerde (0,010 mM) glukozu yanıt alındığı ve enzimatik tepkime sonucu oluşan H_2O_2 'nin yükseltgenme pik akımlarının artan glukoz derişimiyle arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.96. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin artan glukoz derişimine (0,010 mM – 75 mM) bağlı olarak FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.94'de belirtilen koşullar altında)

Glukoz derişimine bağlı akım grafiği ile birlikte kalibrasyon grafiği GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE için de elde edilmiş ve Şekil 4.97'de verilmiştir. Kalibrasyon grafiğinden görüldüğü gibi

GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE kullanılarak tasarlanan biyosensörün 0,010 ile 10 mM glukoz arasında doğrusal yanıt verdiği tespit edilmiştir. GOx-CT/p.PGE (Şekil 4.81'deki kalibrasyon eğrisi) ile GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin kalibrasyon grafiklerindeki doğru eğimleri oranlandığında GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE ile glukozu 1173 kat daha duyar olduğu belirlenmiştir. Bir önceki kısımda çalışması gerçekleştirilen GOx-CT/Pt/p.PGE (Şekil 4.84'deki kalibrasyon eğrisi) ile GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin kalibrasyon grafiklerindeki doğru eğimleri oranlandığında ise GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin glukoz biyosensörü için monometalik türüne göre yaklaşık 1,6 kat daha duyar olduğu belirlenmiştir. Bu durumu daha önce her iki elektrot için glukoz ortamında kaydedilen CV'ler (Şekil 4.71) de desteklemektedir. Ayrıca, 10 µM glukozun sisteme en az 10 kez enjekte edilmesiyle hesaplanan standart sapma değeri (s) ve kalibrasyon doğrusunun eğiminden (m) faydalanarak LOD ve LOQ hesaplanmıştır. Buna göre LOD ve LOQ sırasıyla 2,36 µM (3s/m) ve 7,87 µM (10s/m) olarak bulunmuştur. Modifiye elektrodun aktif yüzey alanına ait duyarlılık ise 10,92 µA mM⁻¹ cm⁻² olarak hesaplanmıştır.

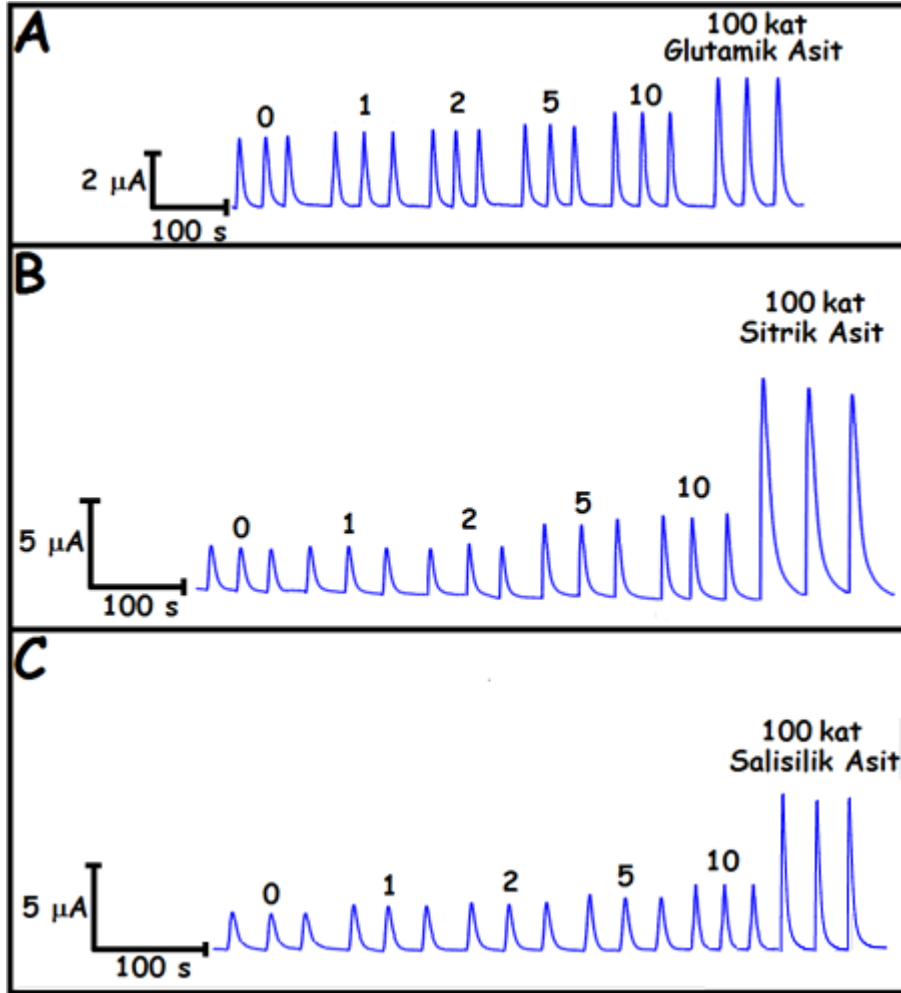


Şekil 4.97. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin artan glukoz derişimlerine (0,010 – 75 mM) verdiği yanıtlara ait akım-derişim grafiği (A) ve elde edilen kalibrasyon grafiği (B) (0,010 – 10 mM Glukoz; $I(\mu A) = 1,7365 C(mM) + 0,1438$; $R^2 = 0,9994$)

4.4.6.4. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Glukoz Biyosensörünün Seçiciliğinin İncelenmesi

Daha önce GOx-CT/Pt/p.PGE kullanılarak seçicilik için kaydedilen tüm amperomogramlar benzer şekilde GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin optimize edilen koşulları altında tekrarlanmıştır. 1,0 mM glukozu göre 1:0; 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 ve 1:100 oranında glukoz:girişimci molekül içeren GLA, SA ve SAL'ye ait amperomogramlar Şekil 4.98'de

ve elde edilen veriler ise Çizelge 4.18’de verilmiştir.



Şekil 4.98. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE’de 1,0 mM glukozu göre artan oranlarda girişimci molekül (GLA (A), SA(B) ve SAL (C)) içeren çözeltilerin enjeksiyonuyla FIA’da kaydedilen amperomogramlar (Şekil 4.94’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)

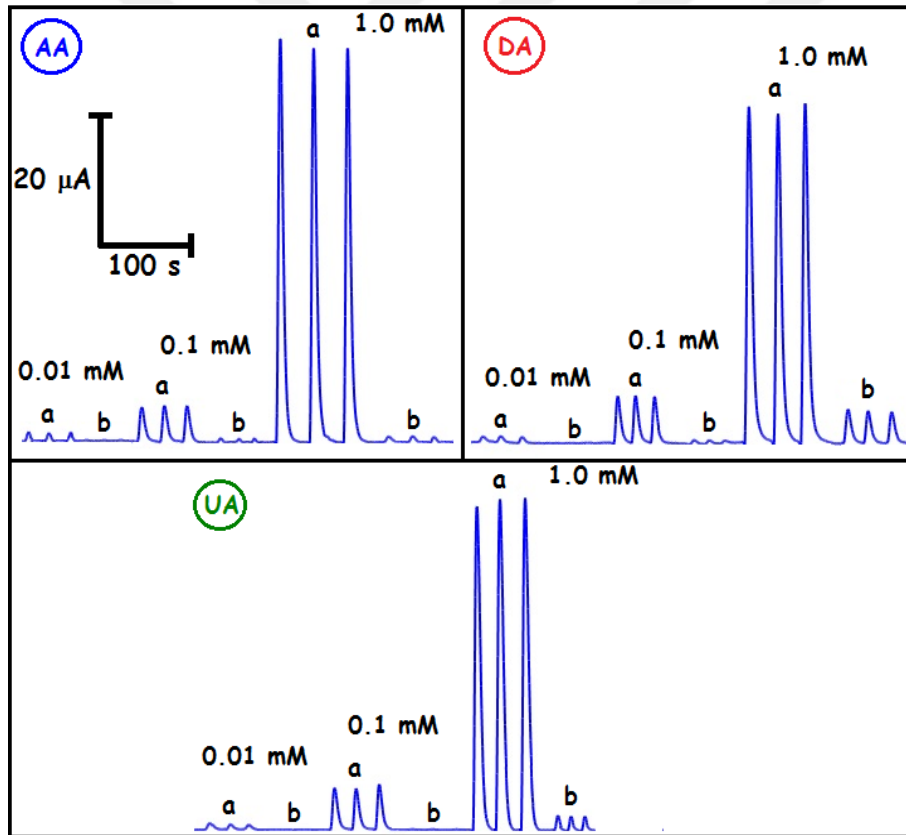
Çizelge 4.18. Her biri 1,0 mM sabit glukoz içeren 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 ve 1:100 oranındaki girişimcilerin GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE’de glukozu bağlı enzimatik tepkime sonucu oluşan H₂O₂’nin yükseltgenme pik akımına gösterdikleri değişimler (n=3)

Glukozu bağlı enzimatik tepkime sonucu oluşan H ₂ O ₂ ’nin Yükseltgenme Pik Akımındaki Değişimler (%)					
Girişimci Molekül	Glukoz:Girişimci oranı				
	1:1	1:2	1:5	1:10	1:100
GLA	3,2 ±0,008	4,5 ±0,004	9,7 ±0,01	28,7 ±0,09	88,5 ±0,03
SA	5,1 ±0,007	5,3 ±0,024	47,4 ±0,04	53,5 ±0,008	365 ±0,041
SAL	16 ±0,008	23,7 ±0,003	36,5 ±0,006	81,6 ±0,014	295 ±0,012

Elde edilen sonuçlardan, herbir girişimcinin glukoz biyosensörüne pozitif etki gösterdiği ve oran arttıkça bu etkinin arttığı tespit edilmiştir. Ancak 5 kat GLA, 2 kat SA ve eşdeğer

derişimde SAL'nin etkilerinin %10'nun altında ya da %10'a yakın olmasından dolayı bu oranlardaki girişim etkisi tolere edilebilir düzeyde olduğu değerlendirilmiştir.

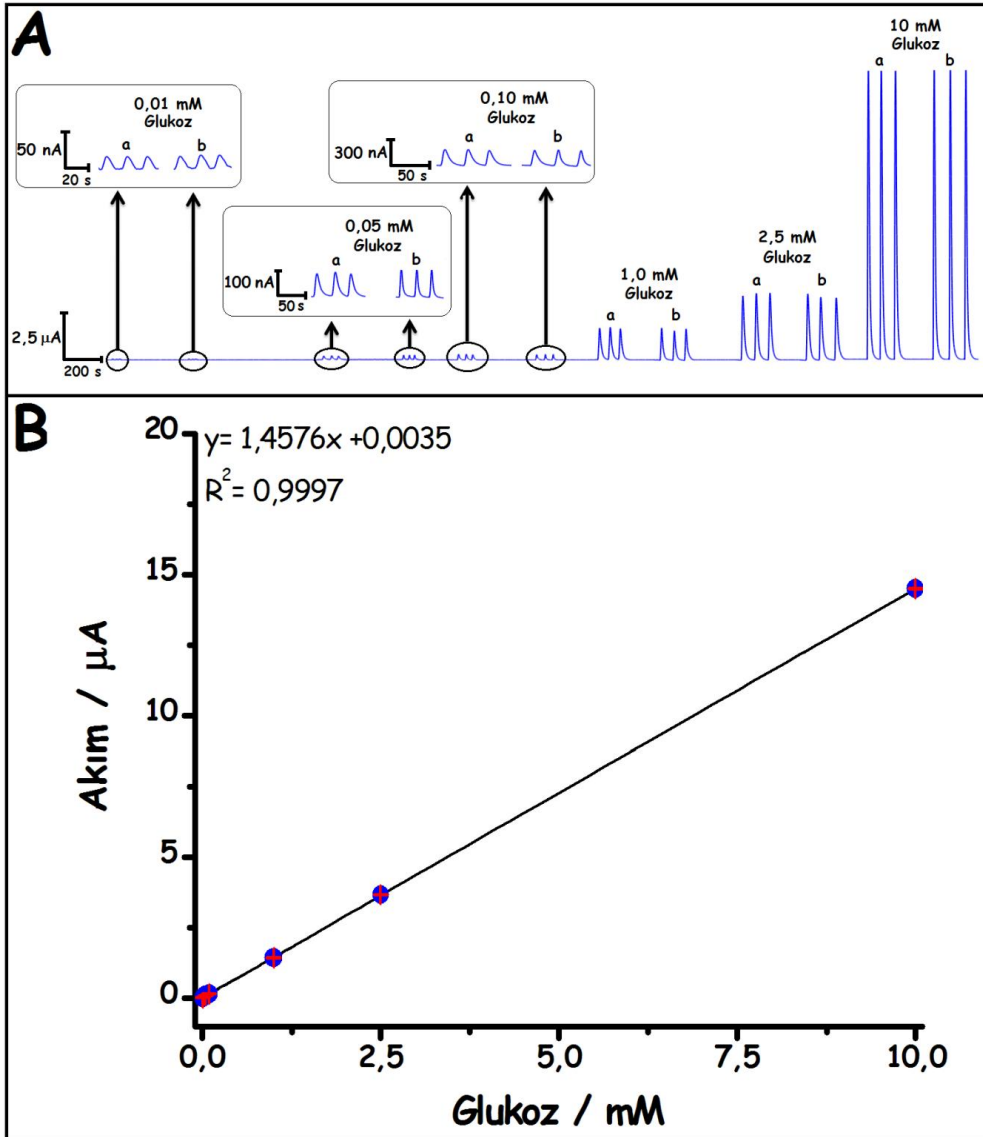
AA, DA ve ÜA'nın GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'de de glukoz biyosensörüne girişim etkisi ve giderilmesi daha önceki kısma benzer şekilde incelenmiştir. Optimize edilen koşullar altında bu elektrot için NaBiO₃ içermeyen ve içeren enjektör kullanılarak taşıyıcı çözelti içinde farklı derişimlerde hazırlanmış AA, DA ve ÜA'nın amperomogramları FIA sisteminde kaydedilmiş ve Şekil 4.99'da verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi çalışılan potansiyelde (+ 600 mV) oldukça yüksek akım veren her üç girişimci molekülün 0,010, 0,10 ve 1,0 mM derişimlerinde NaBiO₃ doldurulmuş enjektör kullanımıyla önyükseltgenerek pik akımlarının tamamen azaltıldığı, hatta AA için en yüksek derişimde (1,0 mM) gözlenen çok büyük akımların bile hemen hemen sıfıra kadar düşürüldüğü, 1,0 mM DA ve ÜA içinse önemli düzeyde azaltıldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.99. Üç farklı derişimde taşıyıcı çözelti içerisinde hazırlanmış AA, DA ve ÜA'nın boş (a) ve NaBiO₃ doldurulmuş enjektör (b) ile FIA sistemine enjeksiyonuyla GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'de kaydedilen amperomogramları

Bu elektrot için de önyükseltgeyicinin glukoz biyosensörüne etki edip etmediği incelenmiştir. Bu amaçla, GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin NaBiO₃ içermeyen ve içeren enjektör

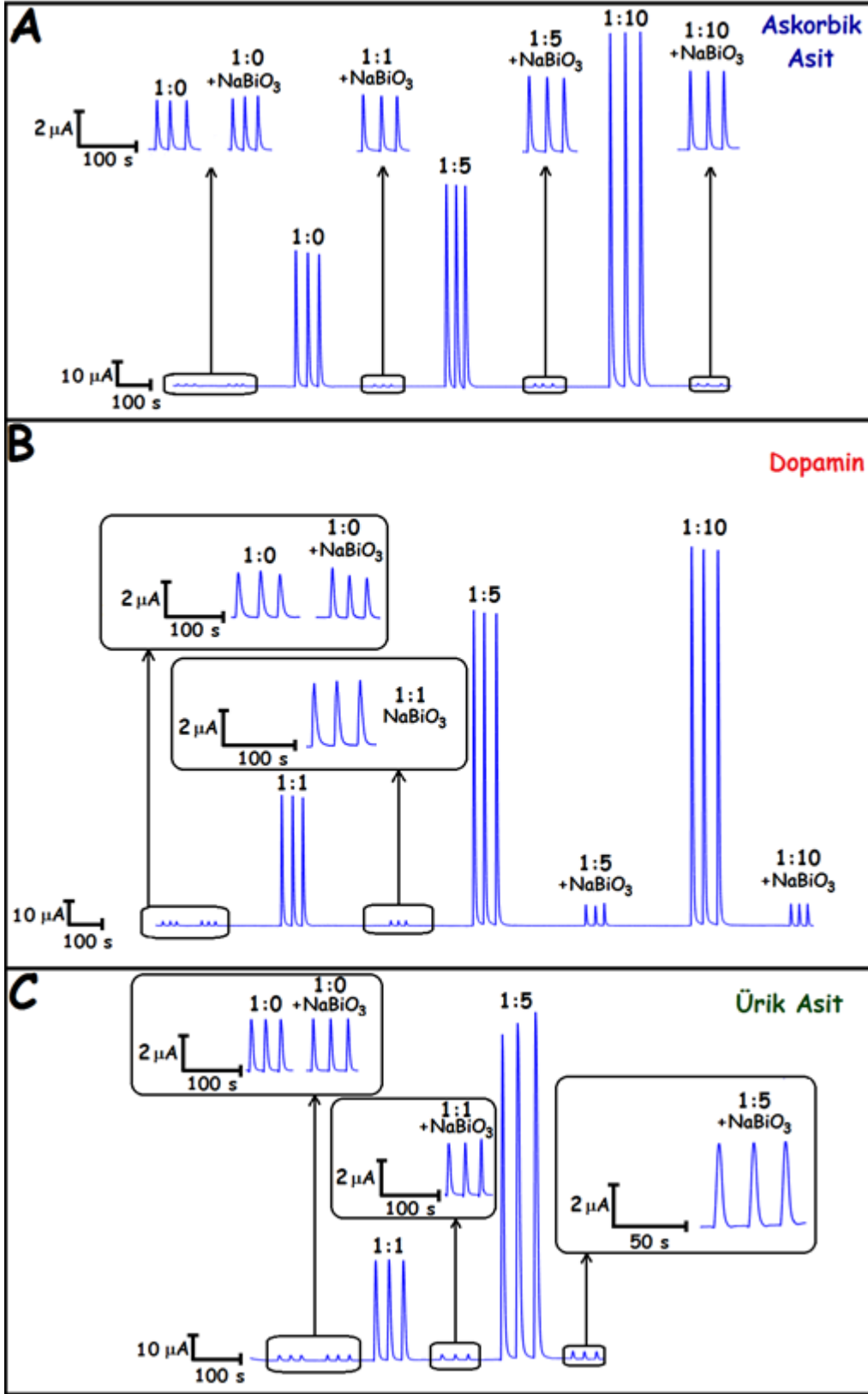
kullanılarak artan glukoz derişimine bağı optimum koşullarda kaydedilen FI amperomogramları Şekil 4.100’de verilmiştir. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE’de olduğu gibi bu elektrot için de NaBiO₃ doldurulmuş enjektörün, glukozu yükseltgemediği ve enzimatik tepkime sonucu oluşan H₂O₂’nin yükseltgenemesine bağlı glukoz biyosensörüne herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca NaBiO₃ kullanılarak tasarlanan glukoz biyosensörüne ait kalibrasyon grafiğinin (Şekil 4.100 B) eğimi ile NaBiO₃ kullanılmadan elde edilen kalibrasyon grafiğinin (Şekil 4.97 B) eğiminin birbirine yakın çıkması da NaBiO₃’ın glukozun yanıtına herhangi bir etkisinin olmadığını yansıtmaktadır.



Şekil 4.100. A) Farklı derişimlerde taşıyıcı çözelti içerisinde hazırlanmış glukoz çözeltilerinin boş (a) ve NaBiO₃ doldurulmuş enjektör (b) ile FIA sistemine enjeksiyonuyla GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE’de kaydedilen amperomogramları ve B) elde edilen kalibrasyon grafiği ($I(\mu A) = 1,4576 C(mM) + 0,0035$, $R^2 = 0,9997$)

Glukozun seçici olarak tayinini kanıtlamak amacıyla, ilgili girişimcilerin kan serumundaki derişiminden (AA ve DA için 0,20 mM ve ÜA için 1,0 mM) daha yüksek bir derişimindeki (1,0 mM) çözeltileri hazırlanmıştır. Herbiri 1,0 mM glukoz ve glukoz derişiminin 1, 5 ve 10 katı AA, DA ve ÜA içeren çözeltiler NaBiO₃ kullanılmadan ve kullanılarak FI sisteme verilerek test edilmiştir. Sonuçlar, akım-zaman grafikleri şeklinde kaydedilmiş (Şekil 4.101) olup, elde edilen sonuçlar tablo şeklinde sunulmuştur (Çizelge 4.19).





Şekil 4.101. Glukoza (1,0 mM) göre artan oranlarda girişimci molekül (AA (A), DA (B) ve UA (C)) içeren çözeltilerinin, NaBiO₃ içermeyen ve içeren enjektör kullanılarak FIA sistemine enjeksiyonuyla GOx-CT/Pt-Pt/p.PGE’de kaydedilen amperomogramlar (Şekil 4.94’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)

Çizelge 4.19. Her biri 1,0 mM sabit glukoz içeren farklı derişimlerdeki AA, DA ve ÜA varlığında glukozla bağı enzimatik tepkimesi sonucu oluşan H₂O₂'nin elektrokatalitik pik akımındaki değişimler (n=3)

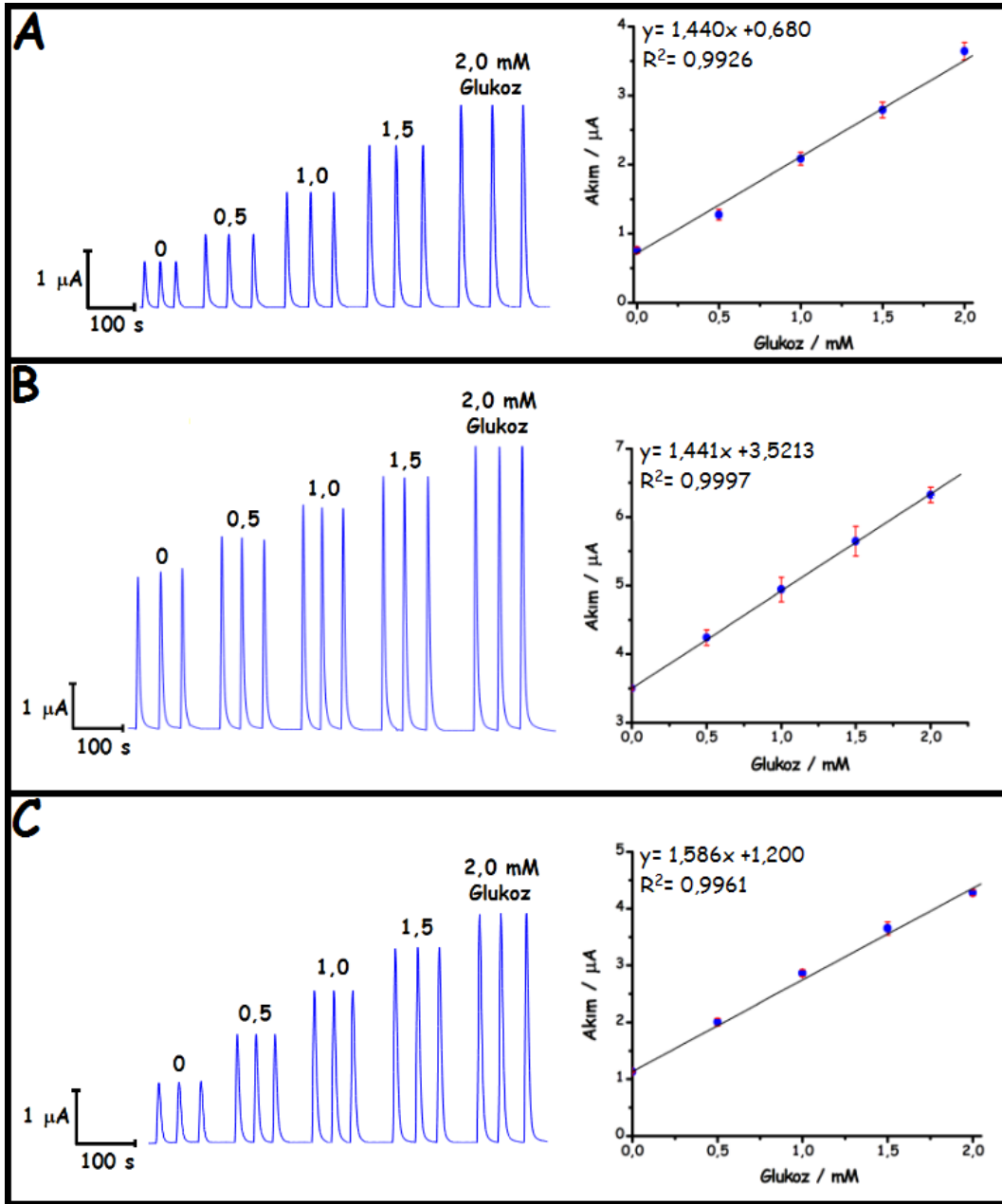
Glukoza bağı enzimatik tepkime sonucu oluşan H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenme Pik Akımındaki Değişimler (%)						
Girişimci Molekül	Glukoz:Girişimci Oranı					
	1:1	1:1 +NaBiO ₃	1:5	1:5 +NaBiO ₃	1:10	1:10 +NaBiO ₃
AA	3100 ±0,08	3,45 ±0,01	10392 ±0,85	67,1 ±0,06	18400 ±7,61	71,0 ±0,04
DA	2410 ±0,02	21,9 ±0,05	5724 ±1,25	345 ±0,78	6898 ±1,25	387 ±0,47
ÜA	1364 ±0,67	12,6 ±0,05	4813 ±3,162	60,1 ±0,04	-	-

Elde edilen sonuçlara bakıldığında, NaBiO₃ enjektör kullanılarak girişimciler FI sisteme verildiğinde girişimci etkilerinin büyük ölçülerde giderildiği anlaşılmaktadır. Ayrıca NaBiO₃ enjektör kullanılarak eşdeğer derişimlerde AA ve ÜA'nın etkisinin giderilebildiği görülmektedir (Çizelge 4.19). DA için eşdeğer derişimde girişim etkisi beklenen seviyeye düşmemesine rağmen girişim etkisinin önemli ölçüde giderildiği görülmektedir. Tüm sonuçlar, DA'nın 1,0 mM ve daha yüksek derişimlerini içermeyen örneklerde glukozun seçici olarak tayin edilebileceğini göstermektedir.

4.4.6.5. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE Kullanılarak Tasarlanan Biyosensörün Glukoz İçeren Örneklere Uygulanması

Tasarlanan elektrokimyasal glukoz biyosensörünün gerçek örneklere uygulanabilirliği, bir önceki kısımda GOx-CT/Pt/p.PGE'deki gibi gerçekleştirilmiş ve yapay kan serumu, dekstroz serum ve oral glukoz tolerans içeceği için kaydedilen amperogramlar standart katma grafiği ile birlikte Şekil 4.102'de verilmiştir. Tüm örneklerde hesaplanan ve önerilen elektrotla elde edilen glukoz değerleri Çizelge 4.20'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, tasarlanan biyosensörün üç farklı örneğin glukoz içeriklerinin tayininde yüksek doğrulukta sonuçların alındığı görülmekte olup, tasarlanan biyosensörün glukoz içeren örneklere başarıyla uygulanabileceği kanıtlanmıştır. Her üç örnek için elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak yine student t-testi ile değerlendirildi. Önerilen elektrot kullanılarak yapay kan serumu, dekstroz serum ve oral glukoz tolerans içeceği için sırasıyla 0,37, 1,86 ve 0,30 olarak bulunan t_{den} değerleri, 2 serbestlik derecesi için % 95 güven derecesinde t_{kritik} değerden (4,30) (Douglas ve ark., 1988) daha küçük

olduğundan dolayı sıfır hipotezi kabul edilebilir ve X_{ort} ve μ arasında % 95 güven seviyesinde ciddi bir farkın olmadığı söylenebilir.



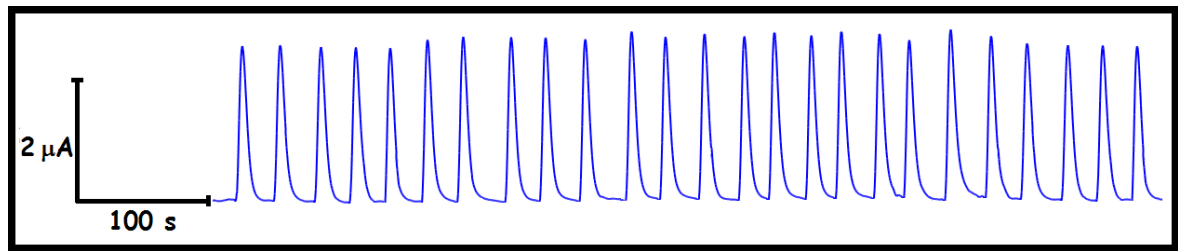
Şekil 4.102. Taşıyıcı çözelti ile seyreltilmiş yapay kan serumu (1/10) (A), dekstroz serum (1/100) (B), oral glukoz test içeceği (1/2000) (C) ve bu seyreltik örneklerde 0, 0,5, 1,0 1,5 ve 2,0 mM glukoz içerecek şekilde hazırlanan standart çözeltilerinin enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperogramları (Şekil 4.94’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında, A için NaBiO_3 ’lı, B ve C için NaBiO_3 ’sız enjektör kullanılmıştır) ve elde edilen standart katma grafikleri

Çizelge 4.20. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE kullanılarak tasarlanan FI amperometrik glukoz biyosensörünün farklı örneklere uygulanması ile elde edilen sonuçlar (n=3)

Örnek	Örneklere Hesaplanan Glukoz Derişimi	FI Standart Katma Metodu ile Bulunan Sonuç
Yapay Kan	4,77 mM	4,74 mM \pm 0,14 t_{den} : 0,37 (P: 0,05, 2)
Dekstroz Serum	252,5 mM	250,3 mM \pm 2,05 t_{den} : 1,86 (P: 0,05, 2)
Glukoz Tolerans Test İçerçeği	1514 mM	1513,3 mM \pm 4,11 t_{den} : 0,30 (P: 0,05, 2)
t_{kritik} : 4,30 (P: 0,05, 2) (Douglas ve ark., 1988)		

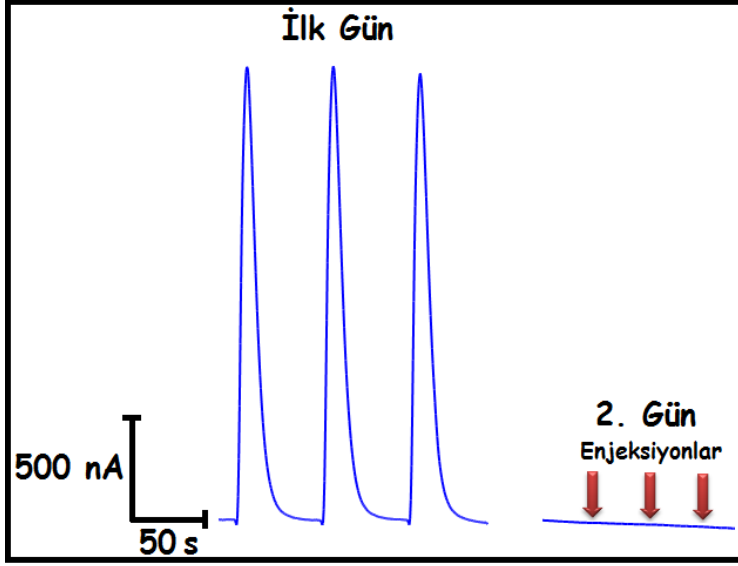
4.4.4.6. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin Tekrarlanabilirliğinin ve Kararlılığının Test Edilmesi

GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'de 1,0 mM glukoz çözeltisinin optimum koşullar altında FIA sistemine 30 ardışık enjeksiyonuyla kaydedilen amperomogramları Şekil 4.103'de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi kararlı pikler elde edilmiştir. Pik akımlarından, ortalama değer ve % RSD değeri sırasıyla 2,57 \pm 0,077 μ A ve % 3,0 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, tasarlanan glukoz biyosensörünün gün içinde tekrarlanabilirliğinin oldukça iyi olduğunu yansıtmaktadır.



Şekil 4.103. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'de 1,0 mM glukoz çözeltisinin ardışık 30 kez enjeksiyonuyla FIA'da kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.94'de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)

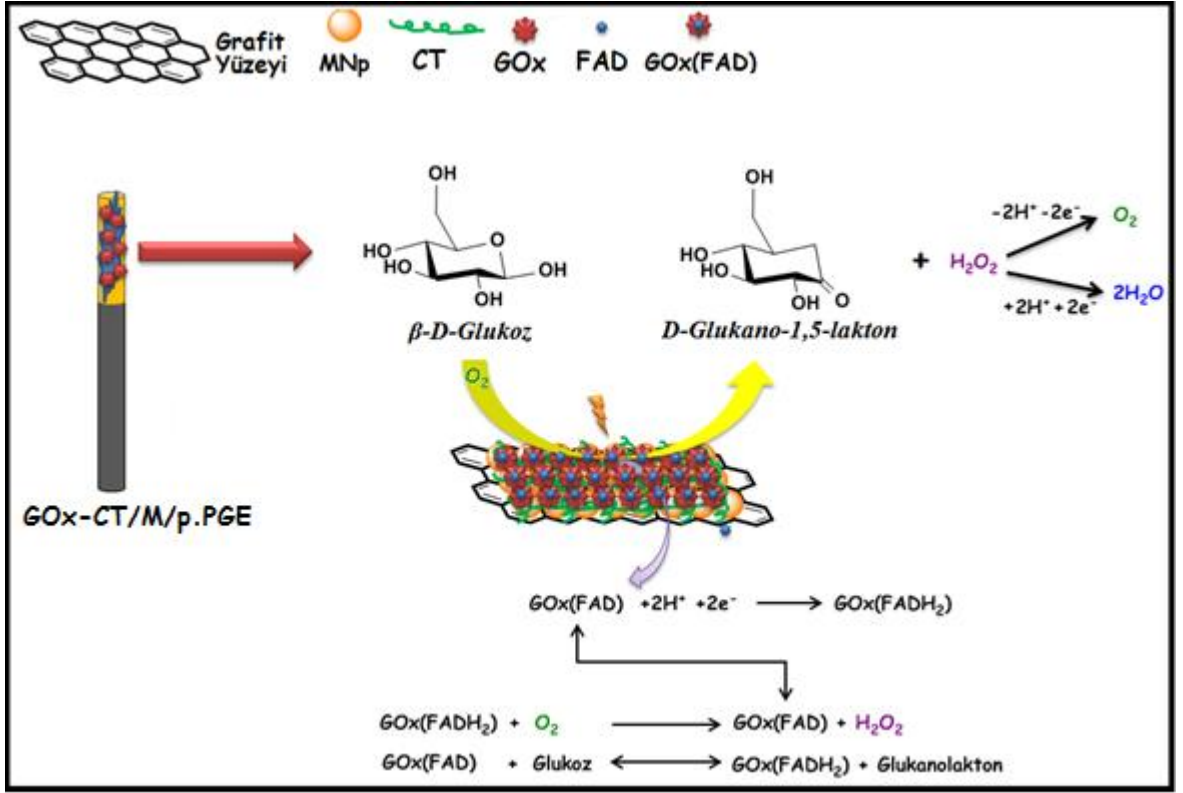
GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'de 1,0 mM glukoz çözeltisinin FIA sisteminde günler arası kaydedilen amperomogramları ise Şekil 4.104'de verilmiştir. GOx-CT/Pt/p.PGE'de olduğu gibi Pt-Pd/p.PGE yüzeyindeki GOx, aktivitesini sonraki gün yitirdiği sonucuna varılmıştır. Her ne kadar GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE kullanılarak tasarlanan glukoz biyosensörünün günler arası kararlılığı iyi olmasa da, PGE'nin tek kullanımlı olmasından ötürü kullan at mantığıyla bu kararlılık probleminin tolere edilebileceği söylenebilir.



Şekil 4.104. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE’de 1,0 mM glukoz çözeltisinin arda arda 1. ve 2. gün enjeksiyonuyla FIA sisteminde kaydedilen amperomogramları (Şekil 4.94’de kullanılan optimize edilmiş koşullar altında)

4.5. Glukozun Enzimatik Redoks Tepkimelerine İlişkin Mekanizmalar

GOx enzim temelli elektrokimyasal biyosensörlerin mekanizmasına ilişkin bir gösterim Şekil 4.105’de verilmiştir. İlk basamakta elektrot yüzeyinde GOx enziminin barındırdığı prostetik (prosthetic) grup FAD (Flavin Adenin Dinükleotit) $2H^+$ ve $2e^-$ olarak indirgenmiş formuna ($FADH_2$)’ye dönüşmekte ve D-Glukozu, D-Glukano-1,5-laktona yükseltmektedir. Ardından $GOx(FADH_2)$ tersinir tepkimesi sonucu ortamdaki O_2 ’ye $2H^+$ ve $2e^-$ vererek, kendisi $GOx(FAD)$ ’ye tekrar dönüşmekle beraber oksijeni ise indirgeyerek H_2O_2 ’ye dönüştürmektedir. Birinci nesil enzim temelli biyosensörlerde $GOx(FAD)$ ’yi rejenere etmek için akseptör ($Med_{yük}$) olarak fizyolojik O_2 kullanılır ve glukozu belirlemek amacıyla enzimatik bir tepkime sürecinde O_2 tüketimi ve H_2O_2 ’nin oluşumu izlenir. O_2 , GOx’un fizyolojik elektron akseptörüdür (alıcısıdır). Genellikle O_2 tüketimini izlemek glukozun nicel tayinini gerçekleştirmek için kullanılırken, H_2O_2 ’nin enzimatik olarak oluşumu, H_2O_2 ’nin hem yükseltgenmesi hem de indirgenmesi ile izlenebilir ve H_2O_2 ’nin anodik yükseltgenmesi, enzimatik döngüyü ilerletmek amacıyla O_2 ’yi tekrar oluşturur/yeniler.



Şekil 4.105. GOx enzim temelli elektrokimyasal biyosensörlerin mekanizmasına ilişkin şematik bir gösterim

4.6. Tasarlanan Amperometrik Glukoz Biyosensörlerinin Literatürdeki Benzer Çalışmalar ile Karşılaştırılması

Tasarlanan amperometrik glukoz biyosensörlerinin analitiksel performansları, çalışma elektrodunun türü, uygulama potansiyeli, doğrusal yanıt aralığı, LOD ve duyarlılık gibi çeşitli parametreler üzerinden literatürdeki benzer çalışmalar ile kıyaslanmıştır (Çizelge 4.21). Genel olarak, metal nanoparçacıklar ve hibrit malzemelerle modifiye edilmiş GCE ve CPE'ler elektrokimyasal glukoz biyosensörü yapımında başarıyla kullanılmıştır. Bu elektrotların daha önce bahsedilen dezavantajları göz önüne alındığında, PGE'nin bu elektrotlara göre ucuz, kolay bulunabilir olması, tek kullanımlık özelliğinden dolayı zorlu temizleme basamaklarını içermemesi ve iyi tekrarlanabilirliğe sahip olmasından ötürü tasarlanan sensörün maliyeti açısından çok avantajlı özelliklere sahip olduğu görülmektedir (Sağlam ve Dilgin, 2017; Amatatongchai ve ark., 2017; Li ve ark., 2013; Yang ve ark., 2016). Literatürler incelendiğinde PGE ve GOx kullanılarak glukozun tayinine ilişkin sınırlı sayıda çalışma bulunduğu görülmektedir (Teanphonkrang ve Schulte, 2017; Vijayaraj ve ark., 2016; Chen ve ark., 1992; Cheng ve ark., 2012; Sehat ve ark., 2014; Sağlam ve ark., 2016). Ayrıca, glukozun enzimatik tayinine yönelik FI yöntem

gibi hızlı, rutin çalışmalara olanak sağlayan yararlı bir yöntemin GCE, CPE ve Au elektrot ile birleştirilerek gerçekleştirildiği çalışmalar bulunmasının yanı sıra (Yang ve ark., 2014; Sağlam ve Dilgin 2017; Amatatongchai ve ark., 2017; Yang ve ark., 2016), çok avantajlı PGE'nin FI metot ile birlikte kullanıldığı çalışmalar oldukça sınırlıdır (Cheng ve ark., 2012; Sağlam ve ark., 2016). Diğer taraftan, metal nanoparçacık, PGE ve FI yönteminin birlikte kullanıldığı bir çalışma bulunmakla birlikte, ilgili çalışmada AuNP kullanılmıştır (Cheng ve ark., 2012). Dolayısıyla tez kapsamında gerçekleştirilen biyosensör çalışmalarında kullanılan Pt ve Pt-Pt nanoparçacıklar ile birlikte PGE kullanılarak FI sistemde gerçekleştirilen herhangi bir çalışmaya rastlanılmaması tasarlanan glukoz biyosensörlere özgünlük kazandırmaktadır. Buradan sonraki kısımda, tasarlanan herbir amperometrik glukoz biyosensörünün literatürdeki benzer çalışmalar ile analitiksel performansları ayrı ayrı karşılaştırılarak incelenmiştir.

1- GOx-CT/Pt/p.PGE: Glukozun GOx ile enzimatik yükseltgenmesi sonucu oluşan H₂O₂'nin yükseltgenmesine yönelik tasarlanan GOx-CT/Pt/p.PGE'nin, çalışma potansiyeli, doğrusal yanıt aralığı, LOD ve duyarlılık gibi çeşitlik analitiksel parametreler üzerinden literatürdeki benzer FI amperometrik çalışmalar ile kıyaslanmıştır (Çizelge 4.21). Aşırı pozitif potansiyellerde girişim etkilerinin yoğun olduğu bilinmesine rağmen, çalışılan potansiyelin (+600 mV) literatürde yayınlanan amperometrik glukoz biyosensörlerinde kullanılan çalışma potansiyellerine nazaran daha yüksek olduğu görülmektedir. Fakat durumun getirdiği dezavantaj, literatürde ilk kez kullanılan bir ön yükseltgeyicinin (NaBiO₃) kullanılması ile neredeyse ortandan kaldırılmıştır. Bu nedenle, GOx-CT/Pt/p.PGE ile enzimatik tepkime sonucu oluşan H₂O₂'nin seçici olarak +600 mV gibi yüksek bir potansiyelde tayinine imkân sağlanmıştır. GOx-CT/Pt/p.PGE ile birçok çalışmaya göre glukozu daha geniş bir derişim aralığında doğrusal yanıt alındığı görülmüştür (Sağlam ve Dilgin, 2017; Mehmeti ve ark., 2017; Teanphonkrang ve Schulte, 2017; Vijayaraj ve ark., 2016; Chen ve ark., 1992; Sehat ve ark., 2014; Sağlam ve ark., 2016). Ayrıca GOx-CT/Pt/p.PGE ile glukozun amperometrik tayininde birkaç çalışmaya göre oldukça düşük bir LOD bulunmuştur (Yang ve ark., 2014; Mehmeti ve ark., 2017; Samphao ve ark., 2015; Amatatongchai ve ark., 2017; Yang ve ark., 2016; Teanphonkrang ve Schulte, 2017; Vijayaraj ve ark., 2016; Cheng ve ark., 2012). GOx-CT/Pt/p.PGE'nin glukozun amperometrik tayine yönelik duyarlılığının da diğer biyosensör çalışmalarına göre oldukça yüksek olduğu görülmektedir (Samphao ve ark., 2015).

2- GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE: GOx-CT/Pt/p.PGE'de olduğu gibi GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'de çalışılan potansiyelin (+600 mV) literatürde yayınlanan amperometrik glukoz

biyosensörlerinde kullanılan çalışma potansiyellerine nazaran daha yüksek olduğu görülmektedir. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE kullanılarak gerçekleştirilen glukoz biyosensör çalışmasında da aşırı pozitif potansiyellerde önemli girişimcilerin etkisi, literatürde ilk kez kullanılan bir ön yükseltgeyicinin (NaBiO₃) kullanılması ile önemsiz boyutlara indirilmiş ve +600 mV gibi yüksek bir potansiyelde çalışılmasının dezavantajı ortadan kaldırılmıştır. GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE ile glukozun doğrusal yanıt aralığı, birçok çalışmaya göre daha geniş bir derişim aralığında olduğu görülmektedir (Sağlam ve Dilgin, 2017; Mehmeti ve ark., 2017; Teanphonkrang ve Schulte, 2017; Vijayaraj ve ark., 2016; Chen ve ark., 1992; Sehat ve ark., 2014; Sağlam ve ark., 2016). Ayrıca, GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE ile glukozun amperometrik tayininde bulunan LOD değeri birkaç çalışmaya göre oldukça düşüktür (Yang ve ark., 2014; Sağlam ve Dilgin, 2017; Mehmeti ve ark., 2017; Samphao ve ark., 2015; Amatatongchai ve ark., 2017; Yang ve ark., 2016; Teanphonkrang ve Schulte, 2017; Vijayaraj ve ark., 2016; Cheng ve ark., 2012; Sağlam ve ark., 2016). GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin duyarlılığının da birkaç biyosensör çalışmasından oldukça yüksek olduğu görülmektedir (Samphao ve ark., 2015; Vijayaraj ve ark., 2016).

Son olarak yapılan literatür araştırmalarına göre, glukozun GOx kullanılarak amperometrik tayine yönelik metal nanoparçacık, PGE ve FIA gibi üç faydalı bileşeni içeren sadece bir çalışma mevcut olup, ilgili çalışmada Au nanoparçacıklar kullanılmıştır (Cheng ve ark., 2012). Fakat, GOx kullanılarak glukozun amperometrik tayine yönelik metal nanoparçacık (Pt), bimetalik nanoparçacık (Pt-Pd), PGE ve FI yöntem gibi üç faydalı bileşeni bir arada içeren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez kapsamında tasarlanan glukoz biyosensör çalışmalarında Pt ve Pt-Pd nanoparçacıkların PGE ile birlikte FIA sisteminde kullanılmasının yanında literatürde ilk kez bir ön oksitleyici (NaBiO₃) kullanılarak girişim etkilerinin önemsiz boyutlara kadar giderilmesi ve literatürde ilk kez PGE için tasarlanan akış hücresinin kullanımı, ilgili çalışmaların özgün yanlarını ortaya koymaktadır.

Çizelge 4.21. Tasarlanan amperometrik glukoz biyosensörlerinin literatürdeki benzer çalışmalar ile kıyaslanması

Çalışma Elektrodu	Metot	Analit	Analitin Davranışı	Ugulama Potansiyeli (mV)	Doğrusal Aralık (μM)	LOD (μM)	Duyarlılık	Kaynak
GOx/ANFE	FI Amperometri	Glukoz	H ₂ O ₂ oluşumu	-100 mV	2000 – 20000	70	1,64 $\mu\text{A mM}^{-1}$	(Yang ve ark., 2014)
GOx/ZnS-CdS /MWCNT/GCE	FI Foto-amperometri	Glukoz	O ₂ tüketimi	-500 mV	10 – 1000	3,0	20,06 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	(Sağlam ve Dilgin, 2017)
GN/FAD/apo-GOx/Nf/SPCE	FI Amperometri	Glukoz	FAD 'nin yükseltgenmesi	+475 mV	50 – 2000	20	Belirtilmemiş	(Mehmeti ve ark., 2017)
Fe ₃ O ₄ @Au/GOx modified SPCE{MnO ₂ }	FI Amperometri	Glukoz	H ₂ O ₂ oluşumu	+360 mV	200 – 9000	13,2	2,52 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	(Samphao ve ark., 2015)
CNTs-PDDA-PtNPs/CPE	FI Amperometri	Glukoz	H ₂ O ₂ oluşumu	+500 mV	100 – 100000	15	0,06 $\mu\text{A s mM}^{-1}$	(Amatongchai ve ark., 2017)
GOx/POM-g-rGO	FI Amperometri	Glukoz	H ₂ O ₂ oluşumu	+20 mV	2000 – 20000	67,9	14,3 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	(Yang ve ark., 2016)
GOx-p.PGE	Amperometri	Glukoz	H ₂ O ₂ oluşumu	+600 mV	100 – 8000	50	20,5 nA mM^{-1}	(Teanphonkrang ve Schulte, 2017)
GOx-rGO/p.PGE	Amperometri	Glukoz	O ₂ Tüketimi	-400 mV	0,01 – 1,0 μM	5,8	9,60 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	(Vijayaraj ve ark., 2016)
GOx/Pt Electroplated-PGE	Amperometri	Glukoz	H ₂ O ₂ oluşumu	+600 mV	0,28 – 33,3 μM	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	(Chen ve ark., 1992)
GOx-Au/PGE	FI Amperometri	Glukoz	H ₂ O ₂ oluşumu	+400 mV	0 – 39000	7,8	2,21 $\mu\text{A mM}^{-1}$	(Cheng ve ark., 2012)
PGE/rGO-GOx	Amperometri	Glukoz	O ₂ Tüketimi	-600 mV	40 – 600 μM	0,61	278,4 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	(Sehat ve ark., 2014)
GOx/CT/ZnS-CdS/PGE	FI Amperometri	Glukoz	O ₂ tüketimi	-500 mV	10 – 1000	3,0	11,5 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	(Sağlam ve ark., 2016)
GOx-CT/Pt/p.PGE	FI Amperometri	Glukoz	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+600 mV	10 – 10000 μM	3,1	6,72 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	Bu Çalışma
GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE	FI Amperometri	Glukoz	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+600 mV	10 – 10000 μM	2,36	10,92 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	Bu Çalışma

ANFE: Au nanotüp film elektrot; Nf: nafyon; PDDA: Poly(dialildimetilamonyum) klorür; POM-g-rGO: polioksometalat ile aşıllı indirgenmiş grafen oksit

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında; i) tek kullanımlı, kolay elde edilebilir, ucuz, bir elektrot olan Kalem Grafit Elektrot (Pencil Graphite Electrode, PGE), ii) sensör ve biyosensör çalışmalarında gerek elektrokatalitik özelliği ve gerekse enzim immobilizasyonunda önemli katkılar sağlayan Au, Pt ve Pd gibi iletken metal nanoparçacıklar (Nanoparticles, NPs) ve bunların bimetalik formları ve iii) son olarak sürdürülebilir, hızlı yanıt ve küçük ölçeklerde örnek tüketimi sağlayan Akışa Enjeksiyon Analizi (FIA, Flow Injection Analysis, FIA) gibi üç avantajlı bileşen bir arada kullanılarak amperometrik H_2O_2 sensörü ve oksidaz enzimine dayalı glukoz biyosensör tasarımı amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, bu tez çalışması sırasıyla aşağıdaki temel adımlardan oluşmuştur:

1. Au, Pt, Pd metal ve Pt-Pd bimetalik nanoparçacık modifiye PGE hazırlanması ve bu elektrotların elektrokimyasal özelliklerinin ve yüzey morfolojilerinin incelenmesi,
2. Metal (Au, Pt ve Pd) ve bimetal (Pt-Pd) nanoparçacık modifiye PGE'lerle H_2O_2 'nin elektrokatalitik indirgenme ya da yükseltgenme çalışmalarının gerçekleştirilmesi,
3. Metal (Pt) ve bimetal (Pt-Pd) nanoparçacık modifiye PGE yüzeyine GOx enzimi immobilize ederek oksidaz enzimine dayalı elektrokimyasal glukoz biyosensörünün tasarlanması,
4. Daha önceden 112T375 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında PGE için ilk kez tasarlanan ve Şekil 3.2'de gösterilen yeni akış hücresi ile birlikte metal ya da bimetalik nanoparçacık modifiye PGE'ler kullanarak, hem enzimatik olmayan elektrokimyasal H_2O_2 sensörünün ve hem de oksidaz (Ox) enzimine dayalı elektrokimyasal glukoz biyosensörünün ilk defa FIA sisteminde gerçekleştirilmesi,
5. Son olarak glukoz biosensör çalışmalarında genelde girişim etkisi gösterdiği bilinen AA, DA ve ÜA'nin girişim etkilerinin giderilmesinde ilk defa $NaBiO_3$ 'ün bir önyükseltgen olarak kullanılması ve literatürden farklı olarak bu önyükseltgenin elektrot yüzeyinde değilde enjektörde kullanılarak FIA sistemine entegre edilmesi.

İlgili amaçlar doğrultusunda gerçekleştirilen tez çalışmasından elde edilen sonuçların özeti aşağıda vurgulanmıştır:

5.1. Metal/Bimetal Nanoparçacık Modifiye PGE'lerin Hazırlanması, Elektrokimyasal ve Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesi ve H₂O₂'ye Elektrokimyasal Yanıtı

Bölüm 3'te verilen Materyal ve Metot kısmında da vurgulandığı üzere, önce PGE'nin ön koşullandırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında elde edilen p.PGE'lerin yüzeyine Au, Pt ve Pd metal ve Pt-Pd bimetalik nanoparçacıklar, CV yöntemi ile p.PGE'lerin yüzeyine elektrokimyasal olarak biriktirilmiştir. Kaydedilen CV'lerde metal iyonlarına ait indirgenme/yükseltgenme piklerinin gözlemlendiği ve döngü sayısının artmasıyla da bu piklerde değişiklik olduğu ve böylece p.PGE yüzeyine metal nanoparçacık modifikasyonlarının başarıyla gerçekleştiği tespit edilmiştir. Elde edilen modifiye elektrotların elektrokimyasal özellikleri, 0,01 M Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks probu ortamında CV'leri ve impedans eğrileri kaydedilerek incelenmiş ve yalın elektrotlar (PGE ve p.PGE) ile karşılaştırılmıştır. PGE yüzeyinin ön koşullandırılması ile oluşan -COOH, -OH gibi fonksiyonel grupların p.PGE ile Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks probu arasında gerçekleşen elektron transfer hızını arttırdığı tespit edilmiştir. Çünkü normal yalın PGE ile karşılaştırıldığında p.PGE'nin CV'de kaydedilen Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks probuna ait indirgenme ve yükseltgenme pik potansiyelleri sırasıyla pozitif ve negatif kaymış, pik akım değerlerinde artış gözlenmiş ve impedans eğrilerinden hesaplanan R_{et} değeri ise 285'den (Yalın PGE) 114 ohm'a (p.PGE) düşmüştür. Koşullandırılmış elektrot (p.PGE) yüzeyine Au, Pt, Pd ve Pt-Pd nanoparçacıklar modifiye edildiğinde ise, CV'de redoks probunun indirgenme ve yükseltgenme pik akımlarında artışın daha da arttığı gözlenmiştir. Optimize edilerek hazırlanan metal ve bimetalik elektrotların R_{et} değerleri ise Au (40 döngü), Pt (30 döngü), Pd (30 döngü) ve Pt-Pd (30 döngü) modifiye p.PGE için sırasıyla 17, 23, 98 ve 10 ohm olarak ölçülmüş ve p.PGE'den oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Metal nanoparçacıkların modifiye edilmesiyle elde edilen R_{et} değerlerinin yalın ve koşullandırılmış elektrotlara göre çok daha düşük olmasının nedeni, metal nanoparçacıkların iyi olan iletkenlik özelliklerine bağlanmıştır. CV ve impedans eğrilerinden elde edilen sonuçlar bir biriyle tutarlı ve uyumlu bulunmuştur. Elektrokimyasal özellikleri incelenen metal/bimetal modifiye elektrotların, yalın ve koşullandırılmış PGE ile birlikte SEM görüntüleri, EDX ve XRD spektrumları kaydedilerek yüzey morfolojileri de incelenmiştir. Özellikle SEM görüntülerine göre metal nanoparçacıkların p.PGE yüzeyine kürecikler halinde yaklaşık 50-100 nm boyutlarında biriktiği net olarak gözlenmiştir. Ayrıca elektrokimyasal biriktirme esnasında metal iyonu ortamında kaydedilen CV'lerin döngü sayısının artmasıyla elektrot yüzeyine biriken metal

yoğunluğunun da arttığı tespit edilmiştir. Bu elektrotlarla H_2O_2 'nin elektrokimyasal davranışı incelenmiş ve H_2O_2 'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi ve indirgenmesine en iyi yanıtı verecek şekilde modifiye elektrot hazırlama esnasındaki döngü sayıları optimize edilmiştir. EDX spektrumlarına göre ise modifiye elektrot yüzeylerinde önemli düzeyde metal oranı (yaklaşık % 20-50 arası) elde edilmiştir. Modifiye elektrotların XRD spektrumlarında ise yine yalın elektrotta görülmeyen ve metal nanoparçacıklara ait yeni piklerin oluştuğu tespit edilmiştir. Gerek elektrokimyasal ve gerekse yüzey karakterizasyon tekniklerinden elde edilen veriler metal nanoparçacıkların p.PGE yüzeyine modifikasyonlarının başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini ortaya koymuştur.

Elektrokimyasal biriktirme esnasındaki döngü sayısının (0 - 60 döngü arası) H_2O_2 'nin yanıtına etkisini incelemek için metal nanoparçacık (Au, Pt ve Pd) biriktirilmiş modifiye elektrotların H_2O_2 'ye elektrokimyasal yanıtları, Au/p.PGE ve Pt/p.PGE için 0,1 M NaOH'te, Pd/p.PGE ve Pt-Pd/p.PGE içinse 0,1 M pH 7,0 PBS'de CV'leri kaydedilerek alınmıştır. H_2O_2 'nin yükseltgenmesine yönelik çalışmalarda en iyi yanıtın 40 döngülü Au/p.PGE ve 30 döngülü Pt/p.PGE ile alındığı görülmüştür. H_2O_2 'nin indirgenmesine yönelik çalışmalarda ise en iyi yanıtların 30 döngü sayısı kullanılarak elde edilen Pd/p.PGE ile alındığı görülmüştür. Bir sonraki basamakta, Au/p.PGE, Pt/p.PGE, Pd/p.PGE ve Pt-Pd/p.PGE'de destek elektrolit pH'sının H_2O_2 'nin elektrokimyasal yanıtına etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, döngü sayısı optimizasyonu sonucu belirlenen metal nanoparçacık modifiye p.PGE'lerin pH'sı 2 ile 12 aralığında değişen BRBS'de ve 0,1 M NaOH çözeltisinde sabit derişimdeki H_2O_2 'nin CV'lerinin kaydedilmesiyle incelenmiştir. Tüm elektrotlar için asidik pH değerlerinde H_2O_2 'nin anodik ve katodik piklerinin çok belirgin gözlenmediği, bu piklerin bazik bölgelerde daha belirginleştiği tespit edilmiş ve çalışmalarda en yüksek 0,1 M NaOH destek çözeltisi ile alındığı görülmüştür. Au/p.PGE ve Pt/p.PGE için 0,1 M NaOH destek çözeltisinin kullanılmasına karar verilmiştir. Diğer taraftan biyosensör çalışmalarında fizyolojik pH'nın önemi ve Pd/p.PGE ve Pt-Pd/p.PGE ile 0,1 M pH 7,0 PBS'de H_2O_2 'nin indirgenmesine yüksek yanıtların alınmasından dolayı Pd/p.PGE ve Pt-Pd/p.PGE için 0,1 M pH 7,0 PBS'nin kullanılmasına karar verilmiştir.

5.2. Metal/Bimetal Nanoparçacık Modifiye Elektrotlar ile H_2O_2 'nin FIA Sisteminde Amperometrik Tayini

Au, Pt, Pd metal nanoparçacık ve Pt-Pd bimetalik nanoparçacık modifiye p.PGE'ler kullanılarak FIA sisteminde amperometrik H_2O_2 sensörü gerçekleştirilmiş ve her bir elektrot için uygulama potansiyeli ve akış hızı parametreleri optimize edilmiştir. Optimize

edilen koşullar altında her bir elektrot için ayrı ayrı artan H_2O_2 derişimine bağlı amperomogramlar kaydedilmiştir. Au ve Pt modifiye p.PGE'de H_2O_2 'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi, Pd ve Pt-Pd için ise H_2O_2 'nin elektrokatalitik indirgenmesi üzerinden gerçekleştirilen FI amperometrik H_2O_2 sensörüne ait analitiksel parametreler (doğrusal yanıt aralığı, duyarlılık, LOD, LOQ) belirlenmiş ve tüm elektrotlar için Çizelge 5.1'de verilmiştir. Ardından her bir amperometrik H_2O_2 sensörünün seçiciliği biyolojik açıdan önemli olan çeşitli girişimcilerin varlığında test edilmiştir. Au/p.PGE ve Pt/p.PGE kullanılarak H_2O_2 'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi üzerine gerçekleştirilen amperometrik sensör çalışmalarında AA, DA ve ÜA aşırı potansiyellerde yükseltgenerek H_2O_2 'ye ait yükseltgenme pik akımına pozitif girişim etkisi gösterdikleri tespit edilmiştir. Diğer taraftan, Pd/p.PGE ve Pt-Pd/p.PGE kullanılarak H_2O_2 'nin elektrokatalitik indirgenmesi üzerine gerçekleştirilen amperometrik sensör çalışmalarında AA, DA ve ÜA aşırı potansiyellerde yükseltgenerek H_2O_2 'ye ait indirgenme pik akımına negatif girişim etkisi gösterdikleri tespit edilmiştir. AA'nın pozitif girişim etkisi elektrot yüzeyine AOX immobilize edilerek giderilebildiği görülmekle birlikte, DA'nın girişim etkisi ise elektrot yüzeyinin indüktif olarak negatif yüklü nasyon membran ile kaplanarak giderilebileceği literatürdeki çalışmalarda belirtilmiştir (Rajkumar ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2013; Aziz ve Kawde, 2013; Karuppiyah ve ark., 2014; Liu ve ark., 2014; Xue ve ark., 2016; Li ve Du, 2017; He ve ark., 2017). Ayrıca tasarlanan ilgili amperometrik H_2O_2 sensörlerinin günlük hayatta sıklıkla kullanılan çeşitli örneklere uygulanabilirliği FI sistemde test edilmiş ve alınan sonuçlar değerlendirilerek sensörlerin performanslarının oldukça yüksek olduğu görülmüş ve ilgili girişimcileri içermeyen örneklere başarıyla uygulanabileceği sonucuna varılmıştır. Son aşamada ise gün içi ve günler arası belirli bir derişimdeki H_2O_2 için kaydedilen amperomogramlara göre FIA sisteminde amperometrik olarak geliştirilen H_2O_2 sensörünün tüm elektrotlar için iyi bir tekrarlanabilirliğe ve kararlılığa sahip olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 5.1. Tasarlanan amperometrik H₂O₂ sensörlerine ait analitiksel parametreler

Elektrot	Analitin Davranışı	Çalışma Potansiyeli (mV)	Doğrusal Aralık (μM)	LOD (μM)	Duyarlılık (μA mM ⁻¹ cm ⁻²)
Au/p.PGE	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+300	1 – 1000	0,29	386
Pt/p.PGE	H ₂ O ₂ 'nin Yükseltgenmesi	+100	2,5 – 750	0,73	445
Pd/p.PGE	H ₂ O ₂ 'nin İndirgenmesi	-100	10 – 10000	3,0	79,28
Pt-Pd/p.PGE	H ₂ O ₂ 'nin İndirgenmesi	-100	25 – 2500	5,7	372,6

5.3. GOx İmmobilize Pt ve Pt-Pd/p.PGE'lerin Hazırlanması, Glukoza Yanıtı ve Elektrokimyasal ve Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesi

Elektrokimyasal glukoz biyosensör çalışmalarında kullanılmak üzere Bölüm 3'de bahsedilen deneysel prosedürlere göre enzimsiz (CT'li) ve enzimli (GOx-CT'li) olarak hazırlanan metalik nanoparçacık p.PGE'ler ile bimetalik nanoparçacık modifiye p.PGE hazırlanmış ve tüm enzimli (GOx-CT'li) ve enzimsiz (CT'li) elektrotların Ar ve O₂ ile doyurulmuş pH 6,0 BRBS'de glukoz yokken ve varken CV'leri kaydedilerek incelenmiştir.

Kaydedilen CV'lerden glukozun O₂ varlığında enzimatik tepkimesi sonucu oluşan H₂O₂'nin GOx-CT/Au/p.PGE'de oldukça yüksek potansiyelde görüldüğü ve O₂'nin indirgenmesinin kararlı olmamasından dolayı bu elektrodun glukoz biyosensör tasarımı için kullanılmamasına karar verilmiştir. GOx-CT/Pd/p.PGE'de ise H₂O₂'nin yükseltgenmesi her ne kadar daha negatife kaysa da (+400 mV), pik yüksekliklerinin Pt ve Pt-Pd elektrotlara göre düşük olmasından dolayı bu elektrodun da kullanılmamasına karar verilmiştir. GOx-CT/Pt/p.PGE ve GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'de ise diğer elektrotlara göre hem glukozun derişimine bağlı enzimatik tepkime sonucu oluşan H₂O₂'nin yükseltgenme pik akımı oldukça yüksek bulunmuş hem de pik potansiyelleri daha negatife kaymıştır (Yaklaşık +550 mV). Bununla birlikte O₂ indirgenme potansiyeli de oldukça pozitifte kaymıştır (0 mV - +100 mV). Tüm bu nedenlerden dolayı FIA sisteminde amperometrik glukoz biyosensör çalışmalarında GOx-CT/Pt/p.PGE ve GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'nin kullanılmasına karar verilmiştir.

FIA sisteminde amperometrik glukoz biyosensör çalışmalarında kullanılmasına karar verilen elektrotların elektrokimyasal özellikleri Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks probu ortamında CV ve impedans eğrilerinin kaydedilmesiyle yapılmıştır. Bu amaçla PGE, p.PGE, CT/p.PGE, Pt/p.PGE, Pt-Pd/p.PGE'nin ve enzimli elektrotların redoks probu çözeltilerindeki CV'leri karşılaştırılmıştır. p.PGE'yüzeyi CT ile modifiye edildiğinde, CT'nin asidik ortamda protonlanmış amino grupları ile Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks probu arasındaki elektrostatik çekim

sebebiyle anodik ve katodik pik akımlarında ciddi artışlar görülmekle birlikte elektron transferi hızlanmıştır. Ayrıca impedans eğrilerinden hesaplanan R_{et} (10 ohm) değerindeki düşme de bu durumu desteklemiştir. p.PGE yüzeyine GOx immobilize edildiğinde enzimin barındırdığı protein katmanı redoks probu ile elektrot arasında bir bariyer gibi davranması, CV'de redoks probuna ait yükseltgenme ve indirgenme pik akımları düşmekle birlikte elektron transfer hızı yavaşlamıştır. Metal (Pt) ve bimetalik (Pt-Pd) nanoparçacık modifiye elektrotlara GOx immobilize edildiğinde yine benzer şekilde redoks probuna asit yükseltgenme ve indirgenme pik akımları düşmüş ve pik potansiyelleri sırasıyla daha pozitif ve daha negatif kayarak elektron transfer hızı yavaşlamıştır. Ayrıca p.PGE (114 ohm), CT/PGE (10 ohm), Pt/p.PGE (22 ohm) ve Pt-Pd/p.PGE (10 ohm) ile karşılaştırıldığında impedans eğrilerinden bulunan R_{et} değerlerindeki (GOx-CT/Pt/p.PGE için 177 ohm ve GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE için 211 ohm) artışlar da yine bu durumu desteklemekle birlikte, enzimin elektrot yüzeylerine başarılı bir şekilde immobilize edildiğini göstermiştir. p.PGE, Pt/p.PGE ve Pt-Pd/p.PGE ile birlikte bu elektrotların enzimli türlerinin SEM görüntüleri kaydedilerek yüzey morfolojileri incelenmiştir. SEM görüntüleri, bu üç elektrodun yüzeyine GOx enziminin jel şeklinde bir tabaka oluşturarak immobilize olduğunu göstermiştir. Elektrokimyasal karakterizasyonlar ve yüzey morfolojileri sonuçları, GOx enziminin Pt/p.PGE ve Pt-Pd/p.PGE yüzeyine başarıyla modifiye edildiğini göstermiştir.

5.4. GOx Immobilize Modifiye Elektrotlar ile Glukozun FIA Sisteminde Amperometrik Tayini

CV ölçümlerinde en uygun elektrotlar olarak belirlenen GOx-CT/Pt/p.PGE ve GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE'ler kullanılarak, glukozun GOx ile O_2 ortamında enzimatik tepkimesi sonucu oluşan H_2O_2 'nin yükseltgenmesine bağlı FIA sisteminde amperometrik glukoz biyosensörü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Uygulama potansiyeli ve akış hızı her iki elektrot için ayrı ayrı optimize edilmiş ve optimize edilen koşullar altında 1,0 M KCl içeren pH 6,0 BRBS taşıyıcı elektroliti kullanılarak artan glukoz derişimine bağlı amperogramlar kaydedilmiştir. Her iki elektrotta H_2O_2 'nin elektrokatalitik yükseltgenmesi üzerinden gerçekleştirilen FI amperometrik glukoz biyosensörüne ait analitiksel parametreler belirlenmiş ve Çizelge 5.2'de verilmiştir.

Çizelge 5.2. Tasarlanan amperometrik glukoz biyosensörlerine ait analitiksel parametreler

Elektrot	Analitin Davranışı	Çalışma Potansiyeli (mV)	Doğrusal Aralık (μM)	LOD (μM)	Duyarlılık ($\mu\text{A mM}^{-1}\text{cm}^{-2}$)
GOx/Pt/p.PGE	H_2O_2 'nin Oluşumu ve Yükseltgenmesi	+600	10 – 10000	3,1	6,72
GOx/Pt-Pd/p.PGE	H_2O_2 'nin Oluşumu ve Yükseltgenmesi	+600	10 – 10000	2,36	10,92

Ardından her iki elektrotta glukoz biyosensörünün seçiciliği biyolojik açıdan önemli olan çeşitli girişimcilerin varlığında test edilmiştir. Akım-zaman grafikleri incelendiğinde AA, DA ve ÜA aşırı potansiyelerde yükseltgenerek enzimatik tepkime sonucu oluşan H_2O_2 'nin yükseltgenme pik akımına pozitif girişim etkisi gösterdikleri tespit edilmiştir. Bir önyükseltgeyici olan NaBiO_3 , bu girişim etkilerinin önemsiz seviyelere düşürülmesi amacıyla literatürde ilk kez bu tez çalışmasında kullanılmıştır. Ayrıca bu tezde, diğer çalışmalardan farklı olarak önyükseltgeyici, elektrot yüzeyine modifiye edilmesi yerine FIA sisteminde kullanılan enjektörün içerisine yerleştirilmiştir. Böylelikle olası girişimcilerin akış hücresindeki elektrot yüzeyine ulaşmadan enjektör içinde ön yükseltgenmesi sağlanarak glukozun +600 mV gibi yüksek bir uygulama potansiyelinde seçici olarak tayin edilebilmesinin önü açılmıştır.

Tasarlanan glukoz biyosensörlerinin gerçek örneklere uygulanabilirliğinin test edilmesi amacıyla, yapay kan serumu, dekstroz serum ve oral glukoz tolerans içeceği olmak üzere üç farklı örneğe uygulanarak biyosensörün gerçek örneklere uygulanabilirliği test edilmiştir. Literatürdeki yöntemlere göre hazırlanan yapay kan serumu, AA, DA ve ÜA içerdiğinden dolayı NaBiO_3 içeren enjektör kullanılmış, diğer örneklerde ise NaBiO_3 içermeyen enjektör kullanılarak bu örneklerdeki glukoz analizi FIA sisteminde optimum koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, tasarlanan biyosensörlerin günlük hayattaki örneklere başarıyla uygulanabileceğini ortaya koymuştur. Son aşamada ise biyosensörlerin glukozu gün içi ve günler arası amperometrik yanıtları akım-zaman grafikleri şeklinde kaydedilerek sırasıyla tekrarlanabilirlikleri ve kararlılıkları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre her iki elektrot (GOx-CT/Pt/p.PGE ve GOx-CT/Pt-Pd/p.PGE) kullanılarak tasarlanan glukoz biyosensörlerin sadece gün içi tekrarlanabilirliklerinin yüksek olduğu ve günler arası kararlılıklarının ise çok düşük olduğu görülmüş fakat kullanılan PGE'nin tek kullanımlı, ucuz, kolay elde edilebilir ve kolay modifiye olması gibi önemli avantajlarından dolayı, tasarlanan bu biyosensörlerdeki kararlılık probleminin tolere edilebileceği ve önemli olmadığı kanatine varılmıştır.

Yapılan literatür araştırmaları, H₂O₂ ve glukozun algılanmasına yönelik yapılan amperometrik sensör/biyosensör çalışmalarına olan ilginin gün geçtikçe farklı elektrotlardan ve modifikasyon malzemelerinden ve farklı metotlardan yararlanmak suretiyle duyarlılık, maliyet ve zaman yönünden geliştirilerek devam ettiğini ortaya koymuştur. Bu doktora tez çalışması, literatürde gerçekleştirilen elektrokimyasal H₂O₂ sensörü ve glukoz biyosensörü çalışmalarına önemli katkılar sağlamakla birlikte, tezin literatürdeki çalışmalardan farkları ve özgün tarafları sıralanacak olursa,

i) Karbon temelli elektrotlar arasında tek kullanımlı, kolay elde edilebilir, ucuz, bir elektrot olan Kalem Grafit Elektrot (Pencil Graphite Electrode, PGE) kullanılmış,

ii) Sensör ve biyosensör çalışmalarında gerek elektrokatalitik özelliği ve gerekse enzim immobilizasyonunda önemli katkılar sağlayan Au, Pt, ve Pd gibi iletken metal ve bimetal nanoparçacıkların PGE yüzeyine modifikasyonları gerçekleştirilmiş,

iii) Sürdürülebilir, hızlı yanıt, küçük ölçeklerde örnek tüketimi sağlayan FIA (Flow Injection Analysis, FIA) gibi üç avantajlı bileşen ilk kez bir araya getirilerek elektrokimyasal sensör ve biyosensörler geliştirilmiş,

iv) FIA sisteminde gerçekleştirilen elektrokimyasal glukoz biyosensör çalışmalarında biyolojik açıdan önemli girişimcilerin giderilmesinde, suda çözünmeyen bir ön oksitleyici olan sodyum bizmutat (NaBiO₃) literatürde ilk kez kullanılmıştır.

KAYNAKLAR

- Akanda M. R., Sohail M., Aziz M. A., Kawde A. N., 2016. Recent Advances in Nanomaterial-Modified Pencil Graphite Electrodes for Electroanalysis. *Electroanalysis*, 28 (3): 408-424.
- Al-Hardan N. H., Abdul Hamid M. A., Shamsudin R., Al-Khalqi E. M., Kar Keng L., Ahmed N. M., 2018. Electrochemical Hydrogen Peroxide Sensor Based on Macroporous Silicon. *Sensors*, 18 (3): 716.
- Alipour E., Majidi M. R., Saadatirad A., Golabi M. S., Alizadeh A. M., 2013. Simultaneous Determination of Dopamine And Uric Acid in Biological Samples On The Pretreated Pencil Graphite Electrode. *Electrochimica Acta*, 91: 36-42.
- Amatatongchai M., Sroysee W., Chairam S., Nacapricha D., 2017. Amperometric Flow Injection Analysis of Glucose Using Immobilized Glucose Oxidase on Nano-Composite Carbon Nanotubes-Platinum Nanoparticles Carbon Paste Electrode. *Talanta*, 166: 420-427.
- Anik Ü., Çubukçu M., Ertaş F. N., 2016. An Effective Electrochemical Biosensing Platform for the Detection of Reduced Glutathione. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 44: 971-977.
- Ayaz S., Dilgin Y., 2017. Flow Injection Amperometric Determination of Hydrazine Based on its Electrocatalytic Oxidation at Pyrocatechol Violet Modified Pencil Graphite Electrode. *Electrochimica Acta*, 258: 1086-1095.
- Ayenimo J. G., Adejou S. B., 2017. Amperometric Detection of Glucose in Fruit Juices with Polypyrrole-Based Biosensor with an Integrated Permselective Layer for Exclusion of Interferences. *Food Chemistry*, 229: 127-135.
- Aziz M. A., Kawde A.-N., 2013. Nanomolar Amperometric Sensing of Hydrogen Peroxide Using a Graphite Pencil Electrode Modified with Palladium Nanoparticles. *Microchimica Acta*, 180 (9-10): 837-843.
- Bagheri S., Amiri I. S., Yousefi A. T., Hamid S. B. A., 2017. Nanocomposites in Electrochemical Sensors. CRC Press, Taylor&Francis Group, 8-8.
- Bartlett P. N., Al-Lolage F. A., 2018. There is No Evidence to Support Literature Claims

- of Direct Electron Transfer (DET) for Native Glucose Oxidase (GOx) at Carbon Nanotubes or Graphene. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 819: 26-37.
- Blaedel W. J., Jenkins R. A., 1975. Study of the Electrochemical Oxidation of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide. *Analytical Chemistry*, 47(8): 1337-1343.
- Buratti S., Scampicchio M., Giovanelli G., Mannino S., 2008. A Low-Cost and Low-Tech Electrochemical Flow System for the Evaluation of Total Phenolic Content and Antioxidant Power of Tea Infusions. *Talanta*, 75: 312-316.
- Chaisuksant R., Chomsook T., Manthong N., Kalcher K., 2016. Low Cost Hydrogen Peroxide Sensor from Manganese Oxides Modified Pencil Graphite Electrode. *Procedia Chemistry*, 20: 81-84.
- Chakraborty S., Raj C. R., 2009. Pt Nanoparticle-Based Highly Sensitive Platform for the Enzyme-Free Amperometric Sensing of H₂O₂. *Biosensors and Bioelectronics*, 24 (11): 3264-3268.
- Chen C. Y., Tamiya E., Ishihara K., Kosugi Y., Su Y. C., Nakabayashi N., Karube I., 1992. A Biocompatible Needle-Type Glucose Sensor Based on Platinum-Electroplated Carbon Electrode. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 36 (3): 211.
- Chen C., Xie Q., Yang D., Xiao H., Fu Y., Tan Y., Yao S., 2013a. Recent Advances in Electrochemical Glucose Biosensors: A Review. *RSC Advances*, 3(14): 4473-4491.
- Chen K. J., Pillai K. C., Rick J., Pan C. J., Wang S. H., Liu C. C., Hwang B. J., 2012b. Bimetallic PtM (M = Pd, Ir) Nanoparticle Decorated Multi-Walled Carbon Nanotube Enzyme-Free, Mediator-Less Amperometric Sensor for H₂O₂. *Biosensors and Bioelectronics*, 33: 120-127.
- Chen S., Yuan R., Chai Y., Hu F., 2013b. Electrochemical Sensing of Hydrogen Peroxide Using Metal Nanoparticles: A Review. *Microchimica Acta*, 180 (1-2): 15-32.
- Chen W., Cai S., Ren Q. Q., Wen W., Zhao Y. D., 2012a. Recent Advances in Electrochemical Sensing for Hydrogen Peroxide: A Review. *Analyst*, 137 (1): 49-58.
- Cheng C., Chang K. C., Pijanowska D. G., 2012. On-Line Flow Injection Analysis Using Gold Particle Modified Carbon Electrode Amperometric Detection for Real-Time Determination of Glucose in Immobilized Enzyme Hydrolysate of Waste Bamboo

- Chopsticks. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 666: 32-41.
- Choi S. H., Lee S. D., Shin J. H., Ha J., Nam H., Cha G. S., 2002. Amperometric Biosensors Employing an Insoluble Oxidant as an Interference-Removing Agent. *Analytica Chimica Acta*, 461: 251-260.
- Clark L. C., Lyons C., 1962. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Annals of the Newyork Academy Sciences*, 102 (1): 29-45.
- Compagnone D., Di Francia G., Di Natale C., Neri G., Seeber R., Tajan, A., 2017. Chemical Sensors and Biosensors in Italy: A Review of the 2015 Literature. *Sensors*, 17: 868-889.
- Cui G., Kim S. J., Choi S. H., Nam H., Cha G. S., 2000. A Disposable Amperometric Sensor Screen Printed on a Nitrocellulose Strip: A Glucose Biosensor Employing Leas Oxide as an Interference-Removing Agent. *Analytical Chemistry*, 72: 1925-1929.
- Devi R., Yadav S., Nehra R., Yadav S., Pundir C., 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 (2): 207-214.
- Dilgin Y., 2015. Kuantum Noktalarla Modifiye Edilmiş Elektrotlar Kullanarak Akışa Enjeksiyon Analiz Sisteminde Fotoelektrokimyasal Sensör Tasarımı, 1001 TÜBİTAK Projesi (Proje No:112T375).
- Dilgin D. G., Ertek B., Dilgin Y., 2018. A Low-Cost, Fast, Disposable and Sensitive Biosensor Study: Flow Injection Analysis of Glucose at Poly-Methylene Blue-Modified Pencil Graphite Electrode. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 15 (6): 1355-1363.
- 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 (3): 990-999.
- Douglas A.S., West D.M., Holler F.J., 1988. *Fundamentals of Analytical Chemistry* (5th Ed.). Sunders Collage Publishing, New York.

- Down M. P., Foster C. W., Ji X., Banks, C. E., 2016. Pencil Drawn Paper Based Supercapacitors. *RSC Advances*, 6: 81130-81141.
- Du J., Yu X., Di J., 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.
- Eggin B.R., 2002. *Chemical Sensors and Biosensors*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, West Sussex. 4-4.
- Emir E., Dilgin, D., 2018. Flow Injection Analysis of Sulfide at a Calmagite Modified Pencil Graphite Electrode. *Analytical Letters*, 51 (1-2): 133-150.
- Ertek B., Akgul C., Dilgin Y., 2016. Photoelectrochemical Glucose Biosensor Based on a Dehydrogenase Enzyme and $\text{NAD}^{(+)}/\text{NADH}$ Redox Couple Using a Quantum Dot Modified Pencil Graphite Electrode. *RSC Advances*, 6 (24): 20058-20066.
- Everything2 Media, 2012. Pencil Lead, from <https://everything2.com/title/Pencil+lead>.
- Fatoni A., Numnuam A., Kanatharana P., Limbut W., Thammakhet C., Travanrungskul P., 2013. A Highly Stable Oxygen-Independent Glucose Biosensor Based on a Chitosan-Albumin Cyrogel Incorporated with Carbon Nanotubes and Ferrocene. *Sensors and Actuators B*, 185: 725-734.
- Foster C. E., Brownson D. A. C., Ruas de Souza A. P., Bernalte E., Iniesta J., Bertotti M., 2016. Pencil it in: Pencil Drawn Electrochemical Sensing Platforms. *Analyst*, 141: 4055-4064.
- Franchini de Abreu R. A., Matos M. A. C., Colombara R., Matos R. C., 2008. Differential Amperometric Determination of Hydrogen Peroxide in Honeys Using Flow-Injection Analysis with Enzymatic Reactor. *Talanta*, 75 (1): 301-306.
- Fruk L., Kuo C. H., Torres E., Niemeyer C. M., 2009. Apoenzyme Reconstitution as a Chemical Tool for Structural Enzymology and Biotechnology. *Angewandte Chemie International Edition*, 48 (9): 1550-1574.
- Gimeno M. P., Mayoral M. C., Andres J. M., 2013. A Potentiometric Titration for H_2O_2 Determination in the Presence of Organic Compounds. *Analytical Methods*, 5 (6): 1510-1514.

- Gorton L., Domínguez E., 2002. Electrocatalytic Oxidation of NAD(P)H at Mediator-Modified Electrodes. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 82 (4): 371-392.
- Gündüz T., 2012. *Kantitatif Analiz Laboratuvar Kitabı (11. Baskı)*. Gazi Kitabevi Tic. Ltd. Şti., Ankara. 178-189.
- Halliwell B., Clement M. V., Long L. H., 2000. Hydrogen Peroxide in the Human Body. *FEBS Letters*, 486: 10-13.
- Hamidi H., Shams E., Yadollahi B., Esfahani F. K., 2009. Fabrication of Carbon Paste Electrode Containing $[\text{PFeW}_{11}\text{O}_{39}]^{4-}$ Polyoxoanion Supported on Modified Amorphous Silica Gel and its Electrocatalytic Activity for H_2O_2 Reduction. *Electrochimica Acta*, 54 (12): 3495-3500.
- Han T., Zhang Y., Xu J., Dong J., Liu C. C., 2015. Monodisperse AuM (M = Pd, Rh, Pt) Bimetallic Nanocrystals for Enhanced Electrochemical Detection of H_2O_2 . *Sensors and Actuators B*, 207: 404–412.
- Hansen E. H., 1996. Principles and Applications of Flow Injection Analysis in Biosensors. *Journal of Molecular Recognition*, 9 (5-6): 316-325.
- He J., Sunarso J., Zhu Y., Zhong Y., Miao J., Zhou W., Shao Z., 2017. High-Performance Non-Enzymatic Perovskite Sensor for Hydrogen Peroxide and Glucose Electrochemical Detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 244: 482-491.
- Jeffery G., Bassett J., Mendham J., Denney R., 1989. *Titrimetric Analysis. Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis (5th Ed.)*. Longman Scientific and Technical, Essex, UK. 370-373.
- Jia W. Z., Wang K., Xia X. H., 2010. Elimination of Electrochemical Interferences in Glucose Biosensors. *Trends in Analytical Chemistry*, 29 (4): 306-3018.
- Kamyabi M. A., Hajari N., 2017. Low Potential and Non-Enzymatic Hydrogen Peroxide Sensor Based on Copper Oxide Nanoparticle on Activated Pencil Graphite Electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28 (5): 808-818.
- Kariuki J. K., 2012. An Electrochemical and Spectroscopic Characterization of Pencil Graphite Electrodes. *Journal of Electrochemical Society*, 159 (9): H747-H751.
- Karuppiyah C., Palanisamy S., Chen S. M., 2014. An Ultrahigh Selective and Sensitive

- Enzyme-Free Hydrogen Peroxide Sensor Based on Palladium Nanoparticles and Nafion-Modified Electrode. *Electrocatalysis*, 5 (2): 177-185.
- Kawde A.-N., Aziz M., Baig N., Temerk Y., 2015. A Facile Fabrication of Platinum Nanoparticle-Modified Graphite Pencil Electrode for Highly Sensitive Detection of Hydrogen Peroxide. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 740: 68-74.
- Lee S. H., Ban J. Y., Oh C. H., Park H. K., Choi S., 2016. A Solvent-Free Microbial-Activated Air Cathode Battery Paper Platform Made with Pencil-Traced Graphite Electrodes. *Scientific Reports*, 6: 28588.
- Li X., Du X., 2017. Molybdenum Disulfide Nanosheets Supported Au-Pd Bimetallic Nanoparticles for Non-Enzymatic Electrochemical Sensing of Hydrogen Peroxide and Glucose. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 239: 536-543.
- Li Y., Lu Q., Wu S., Wang L., Shi X., 2013. Hydrogen Peroxide Sensing Using Ultrathin Platinum Coated Gold Nanoparticles with Core@Shell Structure. *Biosensors and Bioelectronics*, 41: 576–581.
- Liang B., Zhu Q., Fang L., Cao Q., Liang X., Ye X., 2017. An Origami Paper Device for Complete Elimination of Interferents in Enzymatic Electrochemical Biosensors. *Electrochemistry Communications*, 82: 43-46.
- Lima H. R. S., da Silva J. S., de Oliveira Farias E. A., Teixeira P. R. S., Eiras C., 2018. Electrochemical Sensors and Biosensors for the Analysis of Antineoplastic Drugs. *Biosensors and Bioelectronics*, 108: 27-37.
- Liu J., Zhang M., Liu J., Zheng J., 2016. Synthesis of Ag@Pt Core–Shell Nanoparticles Loaded onto Reduced Graphene Oxide and Investigation of its Electrosensing Properties. *Analytical Methods*, 8: 1084–1090.
- Liu Y., Sun G., Jiang C., Zheng X. T., Zheng L., Li C. M., 2014. Highly Sensitive Detection of Hydrogen Peroxide at a Carbon Nanotube Fiber Microelectrode Coated with Palladium Nanoparticles. *Microchimica Acta*, 181 (1-2): 63-70.
- Lu D., Zhang Y., Lin S., Wang L., Wang C., 2013. Synthesis of PtAu Bimetallic Nanoparticles on Graphene–Carbon Nanotube Hybrid Nanomaterials for Nonenzymatic Hydrogen Peroxide Sensor. *Talanta*, 112: 111–116.

- Luo X., Morrin A., Killard A. J., Smyth M. R., 2006. Application of Nanoparticles in Electrochemical Sensors and Biosensors. *Electroanalysis*, 18 (4): 319-326.
- Mahbub P., Zakaria P., Guijt R., Macka M., Dicinoski G., Breadmore M., Nesterenko P. N., 2015. Flow Injection Analysis of Organic Peroxide Explosives Using Acid Degradation and Chemiluminescent Detection of Released Hydrogen Peroxide. *Talanta*, 143: 191-197.
- Martins P. R., Gonçalves Nery Motta A., Nakamura M., Araki K., Angnes L., 2013. Nanostructured Alpha-Nickel Hydroxide Electrodes for High Performance Hydrogen Peroxide Sensing. *Electroanalysis*, 25 (9): 2060-2066.
- Masawat P., Liaeruangrath S., Vaneesorn Y., Liaeruangrath B., 2002. Design and Fabrication of a Low-Cost Flow-Thorough Cell for the Determination of Acetaminophen in Pharmaceutical Formulations by Flow Injection Cyclic Voltammetry. *Talanta*, 58 (6): 1221-1234.
- Matos R. C., Pedrotti J. J., Angnes L., 2001. Flow-Injection System with Enzyme Reactor for Differential Amperometric Determination of Hydrogen Peroxide in Rainwater. *Analytica Chimica Acta*, 441 (1): 73-79.
- Mayer M., Ruzicka J., 1996. Flow Injection Based Renewable Electrochemical Sensor System. *Analytical Chemistry*, 68(21): 3808-3814.
- Mehmeti E., Stanković D. M., Chaiyo S., Zavasnik J., Žagar K., Kalcher K., 2017. Wiring of Glucose Oxidase with Graphene Nanoribbons: An Electrochemical Third Generation Glucose Biosensor. *Microchimica Acta*, 184 (4): 1127-1134.
- Nişli G., Gökçel H. İ., Dursun Z., 2002. Akışkan Sistemler Enjeksiyon (FIA) Tekniği ile Voltammetrik Analizler. *Kimyasal Eser Analiz Yaz Okulu II*, Ed: Henden, E., Gökçel, H.İ., Ertaş, N., İzmir, Sayfa: 175-195.
- North S. H., Lock E. H., 2010. Critical Aspects of Biointerface Design and their Impact on Biosensor Development. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397: 925-933.
- Özcan A., Şahin Y., 2010. Preparation of Selective and Sensitive Electrochemically Treated Pencil Graphite Electrodes for the Determination of Uric Acid in Urine and Blood Serum. *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (11): 2497-2502.

- Özcan A., Şahin Y., 2011. A Novel Approach For the Determination of Paracetamol Based on The Reduction of N-Acetyl-P-Benzoquinoneimine Formed on the Electrochemically Treated Pencil Graphite Electrode. *Analytica Chimica Acta*, 685 (1): 9-14.
- Özcan L., Sahin M., Sahin Y., 2008. Electrochemical Preparation of a Molecularly Imprinted Polypyrrole-Modified Pencil Graphite Electrode for Determination of Ascorbic Acid. *Sensors*, 8 (9): 5792-5805.
- Özcan H.M., Sezgintürk M.K., 2015. Detection of Parathyroid Hormone Using an Electrochemical Impedance Biosensor Based on PAMAM Dendrimers. *Biotechnology Progress*, 31 (3): 815-822.
- Paixao T. R. L. C., Bertotti M., 2008. Ruthenium Oxide Hexacyanoferrate Modified Electrode for Hydrogen Peroxide Detection. *Electroanalysis*, 20 (15): 1671-1677.
- Patolsky F., Weizmann Y., Willner I., 2004. Long-Range Electrical Contacting of Redox Enzymes by SWCNT Connectors. *Angewandte Chemie*, 116 (16): 2165-2169.
- Pei J., Li X. Y., 1999. Electrocatalysis and Flow-Injection Analysis of Hydrogen and Organic Peroxides at CuPtCl₆ Chemically Modified Electrodes. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 11 (16): 1211-1217.
- Perini L., Durante C., Favaro M., Agnoli S., Granozzi G., 2014. Electrocatalysis at Palladium Nanoparticles: Effect of the Support Nitrogen Doping on the Catalytic Activation of Carbon-Halogen Bond. *Applied Catalysis B: Environmental*, 144: 300-307.
- Qian J., Yan S., Xiao Z., 2012. Electrochemical Biosensor Based on CdS Nanostructure Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 366 (1): 130-134.
- Queen Studies Authority, (n.d.). Extended experimental investigation: Electrical conductivity of graphite, from https://www.qcaa.qld.edu.au/downloads/senior/snr_physics_07_sai_electric_conduct_graphite.pdf
- Rajkumar M., Thiagarajan S., Chen S. M., 2011. Electrochemical Fabrication of Rh-Pd Particles and Electrocatalytic Applications. *Journal of Applied Electrochemistry*, 41

(6): 663-668.

- Rasouli H., Tabaian S. H., Rezaei M., 2016. Galvanic Replacement of Electrodeposited Nickel by Palladium and Investigation of the Electrocatalytic Activity of Synthesized Pd/(Ni) for Hydrogen Evolution and Formic acid Oxidation. *RSC Advances*, 6: 22500-22510.
- Reanpang P., Themsirimongkon S., Saipanya S., Chailapakul O., Jakmunee J., 2015. Cost-Effective Flow Injection Amperometric System with Metal Nanoparticle Loaded Carbon Nanotube Modified Screen Printed Carbon Electrode for Sensitive Determination of Hydrogen Peroxide. *Talanta*, 144: 868-874.
- Ronkainen N. J., Halsall H. B., Heineman W. R., 2010. Electrochemical Biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39 (5): 1747-1763.
- Ruzicka J., Hansen E., 1975. Flow injection analyses: Part I. A New Concept of Fast Continuous Flow Analysis. *Analytica Chimica Acta*, 78 (1): 145-157.
- Sağlam Ö., 2016. Kuantum Nokta Modifiye Elektrotlar Kullanılarak Amperometrik Glukoz Biyosensör Tasarımı. Yüksek Lisans Tezi Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Sayfa: 32.
- Sağlam O., Dilgin Y., 2017. Fabrication of Photoelectrochemical Glucose Biosensor in Flow Injection Analysis System using ZnS/CdS-Carbon Nanotube Nanocomposite Electrode. *Electroanalysis*, 29 (5): 1368-1376.
- Sağlam O., Kizilkaya 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.
- Samphao A., Butmee P., Jitcharoen J., Švorc L., Raber G., Kalcher K., 2015. Flow-Injection Amperometric Determination of Glucose using a Biosensor Based on Immobilization of Glucose Oxidase onto Au Seeds Decorated on Core Fe₃O₄ Nanoparticles. *Talanta*, 142: 35-42.
- Schachl K., Alemu H., Kalcher K., Jezkova J., Svancara I., Vytras K., 1997. Flow Injection Determination of Hydrogen Peroxide using a Carbon Paste Electrode Modified with a Manganese Dioxide Film. *Analytical Letters*, 30 (15): 2655-2673.

- 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.
- Sen F., Karatas Y., Gulcan M., Zahmakiran M., 2014. Amylamine Stabilized Platinum (0) Nanoparticles: Active and Reusable Nanocatalyst in the Room Temperature Dehydrogenation of Dimethylamine-Borane. *RSC Advances*, 4 (4): 1526-1531.
- Shavanova K., Bakokina Y., Burkova I., Shteplyuk I., Viter R., Ubelis A., Beni V., Starodub N., Yakimova R., Khranovskyy V., 2016. Application of 2D Non-Graphene Materials and 2D Oxide Nanostructures for Biosensing Technology, 16 (2): 223.
- Shi Q., Diao G., 2011. The Electrocatalytical Reduction of m-Nitrophenol on Palladium Nanoparticles Modified Glassy Carbon Electrodes. *Electrochimica Acta*, 58: 399-405.
- Shin D. H., Kim W., Jun J., Lee J. S., Kim J. H., Jang J., 2018. Highly Selective FET-Type Glucose Sensor Based on Shape-Controlled Palladium Nanoflower-Decorated Graphene. *Sensors and Actuators B*, 264: 216-223.
- Shin J. H., Choi Y. S., Lee H. J., Choi S. H., Ha J., Yoon I. J., Nam H., Cha G. S., 2001. A Planar Amperometric Creatinine Biosensor Employing an Insoluble Oxidizing Agent for Removing Redox-Active Interferences. *Analytical Chemistry*, 73: 5965-5971.
- Sneha K., Sathishkumar M., Kim S., Yun Y. S., 2010. Counter Ions and Temperature Incorporated Tailoring of Biogenic Gold Nanoparticles. *Process Biochemistry*, 45 (9): 1450-1458.
- Solanki P. R., Kaushik A., 2011. Nanostructured Metal Oxide-Based Biosensors. *NPG Asia Materials*, 3: 17-24.
- Tsaplev Y. B., 2012. Chemiluminescence Determination of Hydrogen Peroxide. *Journal of Analytical Chemistry*, 67 (6): 506-514.
- Tavares P. H. C. P., Barberia P. J. S., 2008. Influence of Pencil Lead Hardness on Voltammetric Response of Graphite Reinforcement Carbon Electrodes. *Journal of Applied Electrochemistry*, 38 (6): 827-832.

- Teanphonkrang S., Schulte A., 2017. Automated Quantitative Enzyme Biosensing in 24-Well Microplates. *Analytical Chemistry*, 89 (10): 5261-5269.
- Toghill K. E., Compton R. G., 2010. Electrochemical Non-Enzymatic Glucose Sensors: A Perspective and an Evaluation. *International Journal of Electrochemical Science*, 5 (9): 1246-1301.
- Torrinha Á., Amorim C. G., Montenegro M. C., Araújo A. N., 2018. Biosensing Based on Pencil Graphite Electrodes. *Talanta*, 190: 235-247.
- Trojanowicz M., Kołacińska K., 2016. Recent Advances in Flow Injection Analysis. *Analyst*, 141 (7): 2085-2139.
- Vasicek O., Papezikova I., HyrsI P., 2011. Fluorimetric Determination of Hydrogen Peroxide Production by the Haemocytes of the Wax Moth *Galleria Mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *European Journal of Entomology*, 108 (3): 481-485.
- Verma V. C., Singh S. K., Solanki R., Prakash S., 2011. Biofabrication of Anisotropic Gold Nanotriangles using Extract of Endophytic *Aspergillus Clavatus* as a Dual Functional Reductant and Stabilizer. *Nanoscale Research Letters*, 6 (1): 16.
- Vijayaraj K., Hong S. W., Jin S.-H., Chang S.-C., Park D.-S., 2016. Fabrication of a Novel Disposable Glucose Biosensor using an Electrochemically Reduced Graphene Oxide–Glucose Oxidase Biocomposite. *Analytical Methods*, 8 (38): 6974-6981.
- Vishnu N., Gopalakrishnan A., Badhulika S., 2018. Impact of Intrinsic Iron on Electrochemical Oxidation of Pencil Graphite and its Application as Supercapacitors. *Electrochimica Acta*, 269: 274-281.
- Vishnu N., Kumar A. S., 2015. A Preanodized 6B-Pencil Graphite as an Efficient Electrochemical Sensor for Mono-Phenolic Preservatives (Phenol and Meta-Cresol) in Insulin Formulations. *Analytical Methods*, 7: 1943-1950.
- Wang F., Hu S., 2009. Electrochemical Sensors Based on Metal and Semiconductor Nanoparticles. *Microchimica Acta*, 165 (1-2): 1-22.
- Wang S., Lin X., 2005. Electrodeposition of Pt-Fe(III) Nanoparticle on Glassy Carbon Electrode for Electrochemical Nitric Oxide Sensor. *Electrochimica Acta*, 50: 2887-2891.

- Wang X., Yang T., Feng Y., Jiao K., Li G., 2009a. A Novel Hydrogen Peroxide Biosensor on the Synergistic Effect of Gold-Platinum Alloy Nanoparticles/Polyaniline Nanotube/Chitosan Nanocomposite Membrane. *Electroanalysis*, 21 (7): 819-825.
- Wang J., Kawde A. N., Sahlin E., 2000. Renewable Pencil Electrodes for Highly Sensitive Stripping Potentiometric Measurements of DNA and RNA. *Analyst*, 125 (1): 5-7.
- Wang N., Han Y., Xu Y., Gao C., Cao X., 2015. Detection of H₂O₂ at the Nanomolar Level by Electrode Modified with Ultrathin AuCu Nanowires. *Analytical Chemistry*, 87 (1): 457-463.
- Wang G. L., Xu J. J., Chen H. Y., Fu S. Z., 2009b. Label Free Photoelectrochemical Immunoassay for α -Fetoprotein Detection Based on TiO₂/CdS Hybrid. *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (4): 791-796.
- Wang Y., Xu H., Zhang J., Li G., 2008. Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. *Sensors*, 8 (4): 2043-2081.
- Wen F., Dong Y., Feng L., Wang S., Zhang S., Zhang X., 2011. Horseradish Peroxidase Functionalized Fluorescent Gold Nanoclusters for Hydrogen Peroxide Sensing. *Analytical Chemistry*, 83 (4): 1193-1196.
- Willner I., Heleg-Shabtai V., Blonder R., Katz E., Tao G., Bückmann A. F., Heller A., 1996. Electrical Wiring of Glucose Oxidase by Reconstitution of FAD-Modified Monolayers Assembled onto Au-Electrodes. *Journal of the American Chemical Society*, 118 (42): 10321-10322.
- Xiao Y., Patolsky F., Katz E., Hainfeld J. F., Willner I., 2003. Plugging Into Enzymes: Nanowiring of Redox Enzymes by a Gold Nanoparticle. *Science*, 299 (5614): 1877-1881.
- Xu J. J., Luo X. L., Du Y., Chen H. Y., 2004. Application of MnO₂ Nanoparticles as an Eliminator of Ascorbate Interference to Amperometric Glucose Biosensors. *Electrochemistry Communications*, 6: 1169-1173.
- Xue W., Bo X., Zhou M., Guo L., 2016. Enzymeless Electrochemical Detection of Hydrogen Peroxide at Pd Nanoparticles/Porous Graphene. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 781: 204-211.

- Yang M., Kim D. S., Lee T. J., Lee S. J., Lee K. G., Choi B. G., 2016. Polyoxometalate-Grafted Graphene Nanohybrid for Electrochemical Detection of Hydrogen Peroxide and Glucose. *Journal of Colloid and Interface Science*, 468: 51-56.
- Yang M., Lee K. G., Kim J. W., Lee S. J., Huh Y. S., Choi B. G., 2014. Highly Ordered Gold-Nanotube Films for Flow-Injection Amperometric Glucose Biosensors. *RSC Advances*, 4 (76): 40286-40291.
- Yogeswaran U., Chen S. M., 2008. A Review on the Electrochemical Sensors and Biosensors Composed of Nanowires as Sensing Material. *Sensors*, 8 (1): 290-313.
- Yu J., Liu S., Ju H., 2003. Glucose Sensor for Flow Injection Analysis of Serum Glucose Based on Immobilization of Glucose Oxidase in Titania Sol-Gel Membrane, *Biosensors and Bioelectronics*, 19: 401-409.
- Zayats M., Katz E., Baron R., Willner I., 2005. Reconstitution of Apo-Glucose Dehydrogenase on Pyrroloquinoline Quinone-Functionalized Au Nanoparticles Yields an Electrically Contacted Biocatalyst. *Journal of the American Chemical Society*, 127 (35): 12400-12406.
- Zayats M., Katz E., Willner I., 2002. Electrical Contacting of Glucose Oxidase by Surface-Reconstitution of the Apo-Protein on a Relay-Boronic Acid-FAD Cofactor Monolayer. *Journal of the American Chemical Society*, 124 (10): 2120-2121.
- Zayats M., Willner B., Willner I., 2008. Design of Amperometric Biosensors and Biofuel Cells by the Reconstitution of Electrically Contacted Enzyme Electrodes. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 20 (6): 583-601.
- Zeng X., Zhang Y., Du X., Li Y., Tang W., 2018. A Highly Sensitive Glucose Sensor Based on a Gold Nanoparticles/Polyaniline/Multi-Walled Carbon Nanotubes Composite Modified Glassy Carbon Electrode. *New Journal of Chemistry*, 42: 11944-11953.
- Zhang C., Li L., Ju J., Chen W., 2016a. Electrochemical Sensor Based on Graphene-Supported Tin Oxide Nanoclusters for Nonenzymatic Detection of Hydrogen Peroxide. *Electrochimica Acta*, 210: 181-189.
- Zhang J., Zheng J., 2015. An Enzyme-Free Hydrogen Peroxide Sensor Based on

- Ag/FeOOH Nanocomposites. *Analytical Methods*, 7 (5): 1788-1793.
- Zhang Y., Liu Y., He J., Pang P., Gao Y., Hu Q., 2013. Electrochemical Behavior of Graphene/Nafion/Azure I/Au Nanoparticles Composites Modified Glass Carbon Electrode and its Application as Nonenzymatic Hydrogen Peroxide Sensor. *Electrochimica Acta*, 90: 550-555.
- Zhang Y., Zhang C., Zhang D., Ma M., Wang W., Chen Q., 2016c. Nano-Assemblies Consisting of Pd/Pt Nanodendrites and Poly (Diallyldimethylammonium Chloride)-Coated Reduced Graphene Oxide on Glassy Carbon Electrode for Hydrogen Peroxide Sensors. *Materials Science and Engineering: C*, 58: 1246-1254.
- Zhang Y., Li Y., Jiang Y., Li Y., Li S., 2016b. The Synthesis of Au@C@Pt Core-Double Shell Nanocomposite and its Application in Enzyme-Free Hydrogen Peroxide Sensing. *Applied Surface Science*, 378: 375–383.
- Zhang C., Zhang Y., Du X., Chen Y., Dong W., Han B., Chen Q., 2016d. Facile Fabrication of Pt-Ag Bimetallic Nanoparticles Decorated Reduced Graphene Oxide for Highly Sensitive Non-Enzymatic Hydrogen Peroxide Sensing. *Talanta*, 159: 280–286.
- Zhang C., Wang K., 2002. An Amperometric Glucose Biosensor Incorporating a Permable Pre-Oxidation Layer. *Analytical Letters*, 35 (5): 869-880.
- Zhou R., Zhou W., Zhang H., Du Y., Yang P., Wang C., Xu J., 2011. Facile Template-Free Synthesis of Pine Needle-Like Pd Micro/Nano-Leaves and their Associated Electro-Catalytic Activities Toward Oxidation of Formic Acid. *Nanoscale Research Letters*, 6:381-386.



EKLERİ

Sensitive Flow-Injection Electrochemical Determination of Hydrogen Peroxide at a Palladium Nanoparticle-Modified Pencil Graphite Electrode

Serkan Karakaya and Yusuf Dilgin

Faculty of Arts and Sciences, Department of Chemistry, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

ABSTRACT

A novel flow-injection amperometric method was proposed for the sensitive and enzymeless determination of hydrogen peroxide based on its electrocatalytic reduction at a palladium nanoparticle-modified pretreated pencil graphite electrode in a laboratory-constructed electrochemical flow cell. Cyclic voltammograms of the unmodified and modified electrodes were recorded in pH 7.0 phosphate buffer containing 0.10 M KCl at a scan rate of 50 mV s^{-1} for the investigation of electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at the palladium nanoparticle-modified pretreated pencil graphite electrode. Cyclic voltammograms of the pretreated pencil graphite electrode revealed an irreversible oxidation peak and a weak reduction peak of hydrogen peroxide at $+1100 \text{ mV}$ and -450 mV vs. an Ag/AgCl/KCl saturated reference electrode. However, the reduction of hydrogen peroxide was observed at -100 mV with an increase in current in the cyclic voltammograms of the palladium nanoparticle-modified pretreated pencil graphite electrode compared to the unmodified electrode. These results indicate that the palladium nanoparticle-modified pretreated pencil graphite electrode exhibits efficient electrocatalytic activity for the reduction of hydrogen peroxide. A linear concentration range was obtained between .01 and 10.0 mM hydrogen peroxide with a detection limit of $3.0 \mu\text{M}$ from flow injection amperometric current-time curves recorded in pH 7.0 phosphate buffer at -100 mV and a 2.0 mL min^{-1} flow rate. The novelty of this work relies on its use of a laboratory-constructed flow cell constructed for the pencil graphite electrode using these inexpensive, disposable, and electrochemically reactive modified electrodes for the amperometric determination of hydrogen peroxide in a flow injection analysis system.

ARTICLE HISTORY

Received 5 May 2018

Accepted 6 August 2018

KEYWORDS

Amperometry; flow injection analysis; hydrogen peroxide; palladium nanoparticles; pencil graphite electrode

Flow Injection Amperometric Analysis of H₂O₂ at Platinum Nanoparticles Modified Pencil Graphite Electrode

Serkan Karakaya^{*,[a]} and Yusuf Dilgin^[a]

Abstract: A Pt nanoparticle modified Pencil Graphite Electrode (PGE) was proposed for the electrocatalytic oxidation and non-enzymatic determination of H₂O₂ in Flow Injection Analysis (FIA) system. Platinum nanoparticles (PtNPs) electrochemically deposited on pretreated PGE (p.PGE) surface by recording cyclic voltammograms of 1.0 mM of H₂PtCl₆ solution in 0.10 M KCl at scan rate of 50 mVs⁻¹ for 30 cycles. Cyclic voltammograms show that the oxidation peak potential of H₂O₂ shifts from about +700 mV at bare PGE to +50 mV at PtNPs/p.PGE vs. Ag/AgCl /KCl (sat.). It can be concluded that PtNPs/p.PGE exhibits a good electrocatalytic activity towards

oxidation of H₂O₂. Then, FI amperometric analysis of H₂O₂ was performed under optimized conditions using a new homemade electrochemical flow cell which was constructed for PGE. Linear range was found as 2.5 μM to 750.0 μM H₂O₂ with a detection limit of 0.73 μM (based on S_y/m of 3). As a result, this study shows the first study on the FI amperometric determination of H₂O₂ at PtNPs/p.PGE which exhibits a simple, low cost, commercially available, disposable sensor for H₂O₂ detection. The proposed electrode was successfully applied to determination of H₂O₂ in real sample.

Keywords: Pencil graphite electrode • platinum nanoparticles • hydrogen peroxide • cyclic voltammetry • flow injection analysis

Flow Injection Analysis of H₂O₂ Using Pd Nanoparticles Modified Pencil Graphite Electrode

Serkan Karakaya,¹ and Yusuf Dilgin²

¹, Department of Chemistry, Çanakkale Onsekiz Mart University, Turkey.

A Pd nanoparticle modified Pencil Graphite Electrode (PGE) was proposed for the electrocatalytic oxidation and non-enzymatic determination of H₂O₂ in Flow Injection Analysis (FIA) system. Pd nanoparticles (PdNPs) electrochemically deposited on pretreated PGE (p.PGE) surface by recording cyclic voltammograms of 1.0 mM of PdCl₂ solution in 0.10 M KCl at scan rate of 25 mV/s for 30 cycles. Surface morphologies of p.PGE and modified electrode (PdNPs/p.PGE) were examined by recording their Scanning Electron Microscope (SEM) images which indicate PdNPs were successfully decorated on p.PGE. Electrochemical oxidation of H₂O₂ was investigated by recording cyclic voltammograms of p.PGE and also PdNPs/p.PGE in pH 7.0 Phosphate buffer solution contains 0.10 M KCl at scan rate of 50 mV/s. Cyclic voltammograms show that the peak potential of H₂O₂ oxidation shifts from about +700 mV at bare p.PGE to +150 mV at PdNPs/p.PGE vs. Ag/AgCl /KCl (sat.) electrode. On the other hand reduction peak of H₂O₂ shifts from -450 mV at bare p.PGE to -100 mV at modified electrode. Moreover, the peak currents at PdNPs/p.PGE increases about 10-15 times compared to P.PGE. This result shows that PdNPs/p.PGE exhibits a good electrocatalytic activity towards oxidation and reduction of H₂O₂. Then, FI amperometric analysis of H₂O₂ was performed under optimized conditions using a new homemade electrochemical flow cell which was constructed for PGE. Thus disposable, low cost and simple modified electrode was prepared by electrodeposition of PdNPs onto surface of PGE and the electrochemical H₂O₂ sensor was fabricated dependent on excellent electrocatalytic activity of PdNPs/PGE towards H₂O₂. PdNPs and PtNPs modified PGEs have already been reported for the sensitive, low cost and simple detection of H₂O₂ [1, 2]. However, the novel statement of this study is the using of these useful modified electrodes for detection of H₂O₂ in FIA system using a new home made flow cell which was constructed for PGE. The proposed electrode was successfully applied to determination of H₂O₂ in real samples.

References

- [1] M.A. Aziz, and A.N. Kawde, *Microchim. Acta*, 2013, 180, 837–843.
[2] A.N. Kawde, M. Aziz, N. Baig, and Y. Temerk, *J. Electroanal. Chem.*, 2015, 740, 68–74.

EK 4. Electrochemical Determination of H₂O₂ in Flow Injection Analysis System with Using Platinum Nanoparticles Modified Pencil Graphite Electrode (Tezden Üretilen Uluslararası Poster Bildiri)

10th Aegean Analytical Chemistry Days
29 September – 2 October, 2016, Çanakkale, TURKEY

P2-74

Electrochemical Determination of H₂O₂ in Flow Injection Analysis System with Using Platinum Nanoparticles Modified Pencil Graphite Electrode

Serkan Karakaya^{A,*}, Yusuf Dilgin^B

^A Canakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Science and Arts, Department of Chemistry, Analytical Research Laboratory

^B Canakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Science and Arts, Department of Chemistry

*E-mail: 23karakavaserkan@gmail.com, skarakaya@comu.edu.tr

Hydrogen Peroxide (H₂O₂) is a significant molecule in many fields like food science, chemistry, environmental sciences, pharmaceutical and clinical applications. Also H₂O₂ forms from many enzymatic reactions containing peroxidase enzymes [1]. Moreover its toxic effects are well known in living organisms [2]. Due to these reasons, fast, sensitive and selective detection of H₂O₂ is important in construction of sensors/biosensors. Many methods have been proposed for its determination including spectrometry, titrimetry, and electrochemistry. Among them, electrochemical methods have found great attention because of its high sensitivity, ease of operation, and low cost [3]. Accordingly, researchers are focusing on the new electrocatalysts to decrease the overpotential and increase the kinetics of electron transfer [4]. Among them, metal nanoparticles (Au, Pd, Pt, Ag) have been widely used in increasing electron transfer between electrode surface and substrate because of their high conductive properties, large surface areas and they also show high catalytic activity to many molecules [5, 6].

In this work, Pt nanoparticles modified Pencil Graphite Electrode (PGE) was used for the electrocatalytic oxidation of H₂O₂. For this, Platinum nanoparticles (PtNPs) electrochemically deposited on PGE surface by recording cyclic voltammograms of 1.0 mM of H₂PtCl₆ solution in 0.1 M KCl at scan rate of 50 mV/s with 30 cycles. Surface morphologies of PGE and modified electrodes (PtNPs- PGE) were examined by recording their Scanning Electron Microscope (SEM) images which indicate PtNPs were successfully decorated on PGE. Finally, electrochemical oxidation of H₂O₂ was investigated by recording cyclic voltammograms of PGE and also PtNPs-PGE in 0.1M NaOH solution at scan rate of 50 mV/s. Cyclic voltammograms show that the peak potential of H₂O₂ oxidation shifts from +700-800 mV at bare PGE to +50 mV vs. Ag/AgCl /KCl (sat) at PtNPs-PGE. This result showed that PtNPs-PGE exhibit a good electrocatalytic activity towards oxidation of H₂O₂. Then, electrocatalytic determination of H₂O₂ was performed in Flow Injection Analysis (FIA) system under optimized conditions using a new homemade electrochemical flow cell which was constructed for PGE for the first time. As a result, it can be concluded that this study shows the first study on the amperometric FIA determination of H₂O₂ using PtNPs modified PGE.

Keywords: Hydrogen Peroxide, Pencil Graphite Electrode, Flow Injection Analysis, Platinum Nanoparticles.

References:

1. Md. Abdul Aziz, Abdel-Nasser Kawde *Microchimica Acta* (2013) 180 837-843.
2. Barbara E. Watt, Alex T. Proudfoot, J. Allister Vale *Toxicological Review* (2004) 23 51-57.
3. M. A. Aziz, A. N. Kawde, N. Baig, Y. Temerk *J. Electroanalytical Chemistry* (2015) 740 68-74.
4. L. Challier, F. Gal, G. Carrot, H. Perez, V. Noel *Electrochemistry Communications* (2013) 28 118-121.
5. X. L. Luo, A. Morrin, A. J. Killard, M. R. Smyth *Electroanalysis* (2006) 18 319-326.
6. W. W. Zhao, M. Xiong, X. R. Li, J. J. Xu, H. Y. Chen *Electrochemistry Comm.* (2014) 38 40-43.

Altın Nanoparçacık Modifiye Kalem Grafit Elektrot Kullanılarak H₂O₂'in Akışa Enjeksiyon Analiz Sisteminde Elektrokimyasal Tayini

KARAKAYA S.¹, DİLGİN Y.

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Analitik Kimya Araştırma Laboratuvarı, Çanakkale, Turkey

Hidrojen Peroksit (H₂O₂); gıda bilimi, ilaç teknolojisi, kimya mühendisliği, klinik uygulamalar ve çevre bilimlerinde önemli bir yeri olup; tekstil, temizleme ürünleri, gıda endüstrisi gibi birçok alanda sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca glukoz oksidaz ve laktat oksidaz gibi peroksidaz sınıfı enzimlerin rol aldığı enzimatik reaksiyonlar sonucu yan ürün olarak da oluşabilmektedir. Buna ilaveten H₂O₂'in canlı organizmalara zehirli etkileri de not edilmiştir. Bu sebeple H₂O₂'in algılanması ve buna yönelik sensör/biyosensörlerin geliştirilmesi oldukça önem arz etmektedir. Diğer yandan bu sensörlerin geliştirilmesinde kullanılan elektroanalitik yöntemler, yüksek duyarlılık, kısa cevap süresi, düşük maliyet gibi avantajları nedeniyle diğer spektrofotometrik yöntemlere nazaran daha fazla ilgi çekmektedir. Akışa Enjeksiyon Analizi (FIA) ise rutin analitik tayinler için oldukça sınırlı örnek tüketimi, bir akış hücresi dedektörü içerisinde kısa cevap süresi, analizde kimyasal dönüşümler için online bir sistem olması gibi avantajlara sahiptir. Literatürde birçok sensör ve biyosensör geliştirildiği ve bunların bir kısmının FIA sisteminde gerçekleştirildiği görülmektedir.

Bu çalışmada, ucuz, tek kullanımlık bir elektrot olan kalem grafit elektrot (KGE) 1.45V 'ta 60 sn süreyle kronoamperometrik olarak önkoşullandırılmış (K.KGE) ve K.KGE yüzeyine altın nanoparçacıklar elektrokimyasal modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen modifiye elektrodun (Au-K.KGE) yüzeysel karakterizasyonu SEM görüntüleri alınarak, elektrokimyasal karakterizasyonu ise Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks çifti ortamında döngüsel voltammogramları ve impedans eğrileri alınarak gerçekleştirilmiştir. Ardından Au-K.KGE'un 0,1 M NaOH destek çözeltisinde H₂O₂'e yanıtı döngüsel voltammogramları alınarak incelenmiş ve tasarlanan sensörün nonenzimatik (enzimatik olmayan) elektrokimyasal H₂O₂ sensörü olarak işlev görüp görmediği test edilmiştir. H₂O₂'e yanıt alındıktan sonra, KGE için ilk kez tasarlanan bir akış hücresi kullanılarak FIA sisteminde H₂O₂'e yanıtı amperometrik olarak incelenmiştir. Uygulanan potansiyel, taşıyıcı çözeltinin akış hızı, destek çözeltisinin pH'ı, analitin (H₂O₂) derişimi gibi parametreler optimize edilmiş, H₂O₂'e verdiği yanıt kaydedilerek, gerekli analitiksel parametreler (LOD, LOQ, Kalibrasyon aralığı) not edilmiştir.

skarakaya@comu.edu.tr

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Serkan KARAKAYA

Doğum Yeri: Üsküdar

Doğum Tarihi: 13.12.1985

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı-*Organik Kimya Bilim Dalı*

Doktora Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı-*Analitik Kimya Bilim Dalı*

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) SCI Yayınlar

- 1- Karakaya* S., Dilgin Y., 2018. Sensitive Flow-Injection Electrochemical Determination of Hydrogen Peroxide at a Palladium Nanoparticle-Modified Pencil Graphite Electrode. Analytical Letters, inpress. *(Bu Tez Çalışmasından Üretilen)*
- 2- Karakaya* S., Dilgin Y., 2017. Flow Injection Amperometric Analysis of H₂O₂ at Platinum Nanoparticles Modified Pencil Graphite Electrode. Electroanalysis 29: 1626-1634. *(Bu Tez Çalışmasından Üretilen)*
- 3- Giray Dilgin* D., Karakaya S., 2016. Differential Pulse Voltammetric Determination of Acyclovir in Pharmaceutical Preparations Using a Pencil Graphite Electrode. Material Science and Engineering C: Materials for Biological Applications 63: 570-576.
- 4- Karakaya S., Algi* F., 2014. A Novel Dual Channel Responsive Zinc(II) Probe. Tetrahedron Letters 55: 5555-5559.

b) Bildiriler -Uluslararası –Ulusal

Uluslararası Bildiriler

- 1- Karakaya S., Dilgin* Y., 2017. Flow Injection Analysis of H₂O₂ Using Pd Nanoparticles Modified Pencil Graphite Electrode. First European / 10th German BioSensor Symposium, Berlin, Germany, 20-23March 2017, pp. 217-217. (*Poster, Bu Tez Çalışmasından Üretilen*)
- 2- Karakaya* S., Dilgin Y., 2016. Electrochemical Determination of H₂O₂ in Flow Injection Analysis System with Using at Platinum Nanoparticles Modified Pencil Graphite Electrode. 10th Aegean Analytical Chemistry Days, Çanakkale, Turkey, 29 September- 2 October 2016, pp. 306-306. (*Poster, Bu Tez Çalışmasından Üretilen*)
- 3- Karakaya* S., Algi F., 2014. A New Dual Channel Imaging Probe. COST Action CM1006: European f-Element Chemistry: EUFEN 3, Nürnberg, Germany, 12-15 April 2014, pp. 82-82. (*Poster*)
- 4- Bilmez* M., Karakaya S., Algi F., 2014. Synthesis and Applications of A New Luminescent Macromolecular Material. COST Action CM1006: European f-Element Chemistry: EUFEN 3, Nürnberg, Germany, 12-15 April 2014, pp. 54-54. (*Poster*)
- 5- Karakaya S.* , Algi F., 2013. Syntheses of Metal Complexes of BODIPY-DOTA Dyads. IUPAC 44th World Chemistry Congress, Istanbul, Turkey, 12-16 August 2013, pp. 804-804. (*Poster*)
- 6- Bilmez* M., Karakaya S., Algi F., 2013. Synthesis and Properties of a Novel Supramolecular Luminescent Material. IUPAC 44th World Chemistry Congress, Istanbul, Turkey, 12-16 August 2013, pp. 823-823. (*Poster*)
- 7- Karakaya* S., Algi F., 2014. Synthesis and Properties of Novel BODIPY-DOTA Dyads. COST Action CM1006: European f-Element Chemistry: EUFEN 2, Dublin, Ireland, 15-18 April 2013, pp. 66-66. (*Poster*)
- 8- Karakaya* S., Algi F., 2014. Synthesis and Properties of Novel BODIPY-DOTA Dyads. COST Action CM1006: European f-Element Chemistry: EUFEN 1, Tarragona, Spain, 2-4 April 2012, pp. 80-80. (*Poster*)

Ulusal Bildiriler

- 1- Karakaya* S., Dilgin Y., 2016. Altın Nanoparçacık Modifiye Kalem Grafit Elektrot Kullanılarak H₂O₂'nin Akışa Enjeksiyon Analiz Sisteminde Elektrokimyasal Tayini. 8.

Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Isparta, Türkiye, 30 Mayıs - 3 Haziran 2016, ss. 26-26.

(Sözlü Bildiri, Bu Tez Çalışmasından Üretilen)

2- Giray Dilgin* D., Karakaya S., 2016. Kalem Grafit Elektrot ile Acyclovir'in Voltammetrik Tayini. 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Isparta, Türkiye, 30 Mayıs - 3 Haziran 2016, ss. 71-71. *(Poster)*

c) Katıldığı Projeler

1- "Synthesis, Properties and Applications of Novel Supramolecular Constructs For Lanthanide Metals". European Science Foundation (ESF) European Cooperation in Science and Technology (COST) - Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), AB Destekli Diğer Projeler, 112T668, Araştırmacı, 2015.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Analitik Kimya Anabilim Dalı
Araştırma Görevlisi 2011- Devam Ediyor

İLETİŞİM

E-posta Adresi : 23karakayaserkan@gmail.com, skarakaya@comu.edu.tr