



**H₂O₂ TAYİNİ İÇİN NANOPARTİKÜLLERE DAYANAN
AMPEROMETRİK SENSÖR VE BİYOSENSÖR
GELİŞTİRİLMESİ**

Kubilay TUNCA

Yüksek Lisans

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Funda ÖZTÜRK

İkinci Danışman: Doç. Dr. Pınar Esra ERDEN

2020

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**H₂O₂ TAYİNİ İÇİN NANOPARTİKÜLLERE DAYANAN
AMPEROMETRİK SENSÖR VE BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ**

Kubilay TUNCA

KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Doç. Dr. Funda ÖZTÜRK
İkinci Danışman: Doç. Dr. Pınar Esra ERDEN

TEKİRDAĞ-2020

Her hakkı saklıdır.



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 eksiksiz biçimde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Kubilay TUNCA



Bu tez Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi tarafından NKUBAP.01.GA.19.202
numaralı proje ile desteklenmiştir.

Doç. Dr. Funda ÖZTÜRK'ün danışmanlığında ve Doç. Dr. Pınar Esra ERDEN'in 2. danışmanlığında, Kubilay TUNCA tarafından hazırlanan "H₂O₂ Tayini İçin Nanopartiküllere Dayanan Amperometrik Sensör ve Biyosensör Geliştirilmesi" başlıklı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından 17.01.2020 tarihinde Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK *İmza:*

Üye : Prof. Dr. Erol ERÇAĞ *İmza:*

Üye : Doç. Dr. Hakan KANDEMİR *İmza:*

Üye : Doç. Dr. Pınar Esra ERDEN (II. D) *İmza:*

Üye : Doç. Dr. Funda ÖZTÜRK *İmza:*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Doç.Dr. Bahar UYMAZ
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

H₂O₂ TAYİNİ İÇİN NANOPARTİKÜLLERE DAYANAN AMPEROMETRİK SENSÖR VE BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Kubilay TUNCA

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Funda ÖZTÜRK

İkinci Danışman: Doç. Dr. Pınar Esra ERDEN

Bu tez çalışması kapsamında hidrojen peroksit (H₂O₂) tayini için çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT), çinko oksit nanopartikül (ZnONP) ve Prusya mavisi (PB) veya horseradish peroksidaz (HRP) enzimi ile modifiye edilmiş camı karbon elektrotlara (GCE) dayanan enzimli ve enzimsiz sensörler hazırlandı. Çalışmada, kullanılan modifikasyon malzemelerinin optimum miktarları belirlenerek elektrot yüzey bileşiminin optimizasyonu gerçekleştirildi. Hazırlanan elektrotların elektrokimyasal davranışları dönüşümlü voltametri (CV) yöntemi kullanılarak incelendi, optimizasyon çalışmaları ve performans faktörlerinin belirlenmesinde ise kronoamperometri (CA) yönteminden yararlanıldı. Modifiye elektrotların optimum çalışma şartları ve performans parametreleri belirlendi. Elektrotların gerçek numunelerde H₂O₂ tayininde kullanılabilirliği de araştırıldı. Ayrıca hazırlanan enzimli ve enzimsiz elektrotların bileşimine iyonik sıvı (IL) olarak 1-bütül-3-metilimidazoltetrafloroborat katılarak bu maddenin elektrot performansı üzerine etkileri çalışıldı. Çalışmada IL'nin hem enzimli hem de enzimsiz elektrotların analitik performansını önemli ölçüde arttırdığı sonucuna ulaşıldı. Çalışma kapsamında hazırlanan elektrotlardan H₂O₂ tayini için en iyi performansı gösteren IL/HRP-MWCNT-ZnONP/GCE için doğrusal çalışma aralığı $9,99 \times 10^{-8}$ – $7,55 \times 10^{-4}$ M ve duyarlılık $17,53 \mu\text{A}/\text{Mm}$ olarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Amperometrik enzim elektrot, Karbon nanotüp, Çinko oksit nanopartikül, Hidrojen peroksit, İyonik sıvı, Prusya mavisi

2020, 66 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

DEVELOPMENT OF NANOPARTICLE BASED AMPEROMETRIC SENSOR AND
BIOSENSOR FOR H₂O₂ DETERMINATION

Kubilay TUNCA

Tekirdağ Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Funda ÖZTÜRK

Second Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Pınar Esra ERDEN

In the scope of this thesis, enzymatic and non enzymatic sensors based on multiwalled carbon nanotube (MWCNT), zinc oxide nanoparticle (ZnONP) and Prussian blue (PB) or horseradish peroxidase (HRP) enzyme modified glassy carbon electrodes (GCE) were prepared for the determination of hydrogen peroxide (H₂O₂). Optimum amount of modification materials were determined and optimization of electrode surface composition was performed. Electrochemical behaviors of the fabricated electrodes were investigated by using cyclic voltammetry method and chronoamperometry method was used for the optimization studies and to determine the performance factors. The usability of electrodes for the determination of H₂O₂ in real samples was also investigated. In addition, 1-Butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate used as the ionic liquid (IL) was added to the composition of the enzymatic and non-enzymatic electrodes and its effect on electrode performance was studied. In this study, it was concluded that ionic liquid significantly increased the performance of both enzymatic and non-enzymatic electrodes. Among the proposed electrodes best performance for H₂O₂ was obtained with IL/HRP-MWCNT-ZnONP/GCE and a linear working range of $9,99 \times 10^{-8}$ – $7,55 \times 10^{-4}$ M and sensitivity of 17,53 μ A/Mm was obtained for this electrode.

Keywords: Amperometric enzyme electrode, Carbon nanotube, Zinc oxide nanoparticle, Hydrogen peroxide, Ionic liquid, Prussian blue

2020, 66 pages

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGE DİZİNİ	vi
ŞEKİL DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
TEŞEKKÜR	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyosensörler	2
1.1.1. Biyosensörlerin sınıflandırılması	3
1.1.2. Biyosensörlerin performans faktörleri	7
1.1.3. Biyosensörlerin uygulama alanları.....	8
1.2. Hidrojen peroksit ve tayin yöntemleri	10
1.3. Karbon Nanotüpler	12
1.4. Metal Oksit Nanopartiküller	13
1.5. İyonik Sıvıların Biyosensörde Kullanımı	13
2. KAYNAK ÖZETLERİ	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	18
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Elektrotlar	18
3.2. Kullanılan Kimyasallar	19
3.3. Kullanılan Çözeltiler.....	20
3.3.1. Jelatin çözeltisi	20
3.3.2. Glutaraldehit çözeltisi	20
3.3.3. Nafyon çözeltisi	20
3.3.4. Hidrojen peroksit çözeltisi	20
3.3.5. Fosfat tamponu çözeltisi	20
3.3.6. Redoks probu çözeltisi	21
3.3.7. Diğer çözeltiler.....	21
3.3.8. HRP çözeltisi.....	21
3.3.9. PB çözeltisi.....	21

3.4. GCE Yüzeyinin Temizlenmesi	21
3.5. Modifiye Edilmiş Elektrotların Hazırlanması.....	21
3.5.1. HRP/MWCNT-ZnONP/GCE.....	22
3.5.2. PB/MWCNT-ZnONP/GCE.....	22
3.5.3. HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE.....	22
3.5.4. IL/PB-MWCNT-ZnONP/GCE	23
3.6. Modifiye Elektrotların Yüzey Bileşimi Optimizasyonu	23
3.6.1. MWCNT miktarı.....	23
3.6.2. ZnONP miktarı.....	24
3.6.3. PB miktarı	24
3.6.4. HRP miktarı	24
3.6.5. IL miktarı	24
3.7. Modifiye Elektrotların Yüzey Morfolojisinin Belirlenmesi	25
3.8. Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi	25
3.8.1. Dönüşümlü voltametri.....	25
3.9. Çalışma Koşullarının Optimizasyonu.....	25
3.9.1. Çalışma potansiyeli	25
3.9.2. Tampon pH'sı.....	25
3.10. Performans Faktörlerinin Belirlenmesi.....	26
3.10.1. Doğrusal çalışma aralığı ve duyarlılık	26
3.10.2. Gözlenebilme sınırı ve alt tayin sınırı	26
3.10.3. Cevap süresi	26
3.10.4. Tekrar üretilebilirlik ve Tekrar kullanılabilirlik.....	26
3.10.5. Uzun dönem kararlılığı	27
3.10.6. Girişim çalışması.....	27
3.10.7 Gerçek numune çalışması	27
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	28
4.1. Modifiye Elektrotların Yüzey Bileşimi Optimizasyonu	28
4.1.1. MWCNT miktarı.....	28
4.1.2. ZnONP miktarı.....	29
4.1.3. PB miktarı	30
4.1.4. HRP miktarı	31
4.1.5. IL miktarı	32

4.2. Taramalı Elektron Mikroskobu Çalışması	33
4.3. Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal Karakterizasyonu	34
4.4. Modifiye Elektrotların Optimum Çalışma Koşulları	36
4.4.1. Çalışma potansiyeli	36
4.4.2. pH	37
4.5. Elektrotların Performans Faktörleri	38
4.5.1. Doğrusal çalışma aralığı ve duyarlılık	38
4.5.2. Gözlenebilme ve alt tayin sınırı	41
4.5.3. Cevap süresi	41
4.5.4. Tekrar üretilebilirlik ve Tekrar kullanılabilirlik	42
4.5.5. Ömür	43
4.5.6. Girişim etkisi	44
4.6. Gerçek numune analizi	45
4.7. Sonuçlar	46
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	57

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 3. 1. Kullanılan kimyasal maddeler, saflık dereceleri ve markaları	19
Çizelge 4.2. Modifiye elektrotların cevabına girişim yapabilecek türlerin etkisi	45
Çizelge 4.3. Hidrojen peroksit tayini için PB modifiye elektrotlar ile oksijenli su numunesinde standart katma yöntemi kullanılarak elde edilen geri kazanım sonuçları.....	46
Çizelge 4.4. H ₂ O ₂ tayini için HRP modifiye elektrotlar ile oksijenli su numunesinde standart katma yöntemi kullanılarak elde edilen geri kazanım sonuçları	46



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 3. 1. (a) Elektrokimyasal analiz sistemi, (b) C3 hücre standı.....	18
Şekil 3.2. Modifiye elektrotların hazırlanma basamakları	23
Şekil 4.1. PB/MWCNT-ZnONP/GCE cevabı üzerine MWCNT miktarının etkisi (0,05 M, pH 6,5 fosfat tamponu, -0,10 V, oda sıcaklığı)	29
Şekil 4.2. PB/MWCNT-ZnONP/GCE cevabı üzerine ZnONP miktarının etkisi (0,05 M, pH 6,5 fosfat taponu, -0,10 V, oda sıcaklığı)	30
Şekil 4.3. PB/MWCNT-ZnONP/GCE cevabı üzerine PB miktarının etkisi (0,05 M, pH 6,5 fosfat tamponu, -0,10 V, oda sıcaklığı)	31
Şekil 4.4. HRP/MWCNT-ZnONP/GCE cevabı üzerine HRP miktarının etkisi (0,05 M, pH 6,5 fosfat tamponu, -0,10 V, oda sıcaklığı)	32
Şekil 4.5. IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE cevabı üzerine IL miktarının etkisi (0,05 M, pH 6,5, -0,10 V, oda sıcaklığı)	33
Şekil 4.6. (a) MWCNT/GCE, (b) MWCNT-ZnONP/GCE, (c) HRP/MWCNT-ZnONP/GCE ve (d) PB/MWCNT-ZnONP/GCE elektrotlarının SEM görüntüleri	33
Şekil 4.7. Dönüşümlü voltamogramlar: (a) GCE, (b) MWCNT-ZnONP/GCE (c) PB/MWCNT-ZnONP/GCE ve (d) IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE (0,10 M KCl içeren 5,0 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks probunda, 100 mV s ⁻¹)	35
Şekil 4.8. Dönüşümlü voltamogramlar: (a) HRP/MWCNT-ZnONP/GCE, (b) HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE (c) GCE ve (d) MWCNT-ZnONP/GCE (0,10 M KCl içeren 5,0 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks probunda, 100 mV s ⁻¹)	36
Şekil 4.9. PB/MWCNT-ZnONP/GCE'un cevabı üzerine çalışma potansiyelinin etkisi (0,05 M, pH 6,5 fosfat tamponu, -0,10 V, oda sıcaklığı).....	37
Şekil 4.10. HRP/MWCNT-ZnONP/GCE cevabı üzerine pH'nın etkisi (0,05 M, pH 6,5 fosfat tamponu, -0,10 V, oda sıcaklığı)	38
Şekil 4.11. PB/MWCNT-ZnONP/GCE'nin H ₂ O ₂ derişimine cevabı (a) Akım–zaman grafiği, (b) Akım farkı–derişim grafiği (N=3) ve (0,05 M pH 6,5 fosfat tamponu, -0,10 V, oda sıcaklığı)	39
Şekil 4.12. IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE'nin H ₂ O ₂ derişimine cevabı (a) Akım–zaman grafiği, (b) Akım farkı–derişim grafiği (N=3) ve (0,05 M pH 6,5 fosfat tamponu, -0,10 V, oda sıcaklığı)	40
Şekil 4.13. HRP/MWCNT-ZnONP/GCE'nin H ₂ O ₂ derişimine cevabı (a) Akım–zaman grafiği, (b) Akım farkı–derişim grafiği (N=3) ve (0,05 M pH 6,5 fosfat tamponu, -0,10 V, oda sıcaklığı)	40
Şekil 4.14. HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE'nin H ₂ O ₂ derişimine cevabı (a) Akım–zaman grafiği, (b) Akım farkı–derişim grafiği (N=3) ve (0,05 M pH 6,5 fosfat tamponu, -0,10 V, oda sıcaklığı).....	41
Şekil 4.15. a:IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE b:IL/HRP/MWCNT-ZnONP/GCE'nin ömrü (H ₂ O ₂ : 91 µM; 0,05 M pH 6,5 fosfat tamponu, -0,10 V, oda sıcaklığı).....	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

CV	: Dönüşümlü voltametri
EIS	: Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GCE	: Camsı karbon elektrot
HRP	: Horseradish peroksidaz
IL	: İyonik sıvı
MWCNT	: Çok duvarlı karbon nanotüp
mM	: Milimolar
PB	: Prusya mavisi
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SWCNT	: Tek duvarlı karbon nanotüp
ZnONP	: Çinko oksit nanopartikül
μ A	: Mikroamper
M	: Molar
mL	: Mililitre
L	: Litre
g	: Gram
mg	: Miligram
μ L	: Mikrolitre
μ	: Mikro
NP	: Nanopartikül

TEŞEKKÜR

Bu araştırma konusunu yüksek lisans tezi olarak öneren ve çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren ve bana büyük emeği geçen saygı değer hocalarım Doç. Dr. Funda ÖZTÜRK' e ve Doç. Dr. Pınar Esra ERDEN'e teşekkür ederim.

Ocak 2020

Kubilay TUNCA



1. GİRİŞ

H_2O_2 gıda endüstrisi ile klinik, çevresel ve farmöstatik analizler açısından önemli bir maddedir. Bu nedenle H_2O_2 tayini için hızlı, güvenilir, doğru, pratik ve ucuz yöntemler geliştirilmesi gerekir. Amperometrik sensör veya biyosensörler H_2O_2 tayini için iyi birer alternatiftir ve günümüzde H_2O_2 'in tayini için geliştirilmiş pek çok sensör ve biyosensör rapor edilmiştir [1, 2].

Biyosensörler, enzim, nükleik asit, doku, mikroorganizma, antikor gibi biyoaktif bir tanıma elementinin, elektrokimyasal, kalorimetrik, optik ya da piezoelektrik bir dönüştürücü ile birleştirilmesi ile oluşturulan ve biyolojik olayların ölçülebilir sinyallere dönüştürülmesini sağlayan analitik cihazlardır [3]. Biyosensörler, çevresel ve klinik analizler, gıda endüstrisinde kalite ve proses kontrol, ilaç analizleri ve biyoteknoloji gibi pek çok alanda kullanılmaktadır [4]. Günümüzde en yaygın kullanılan biyosensörler yüksek duyarlılık ve seçicilik, düşük gözlenebilme sınırı, basitlik ve hızlı cevap verme gibi üstün özellikler gösteren enzim temelli amperometrik elektrotlardır. Amperometri, belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümüne dayanır. Amperometrik biyosensörlerin çalışma prensibi, uygulanan potansiyelde, elektroaktif türlerin çalışma elektrodunda yükseltgenmesi veya indirgenmesi sonucu oluşan akımın ölçülerek analiz edilecek türlerin miktarlarının belirlenmesine dayanır. Amperometrik biyosensör hazırlanmasında en önemli aşamalardan biri biyosensörün performansını arttırmak amacıyla elektrot yüzeylerinin modifiye edilmesidir. Son yıllarda yapılan elektrot modifikasyonu çalışmalarında nanomalzemelerin sıklıkla kullanıldığı göze çarpmaktadır [5].

Karbon nanotüpler geniş yüzey alanı, yüksek elektriksel iletkenlik, kimyasal kararlılık, mekanik dayanım gibi benzersiz özellikleri sebebiyle biyosensör geliştirme çalışmalarında yaygın biçimde kullanılmaktadır. Bu özellikler, yapımında karbon nanotüp kullanılan biyosensörlerin geleneksel katı elektrotlara dayanan biyosensörler ile karşılaştırıldığında daha iyi performans göstermesine neden olmaktadır [6]. Biyosensör geliştirme çalışmalarında kullanılan bir diğer nanomalzeme ise, metal oksit nanopartiküllerdir. Bu nanopartiküllerin, geniş yüzey hacim oranı, yüksek katalitik etki, yüksek yüzey reaksiyon aktivitesi gibi özellikleri nedeniyle biyosensörlerin cevap zamanı, doğrusal aralık, gözlenebilme sınırı ve kararlılık gibi performans özelliklerini geliştirdiği rapor edilmiştir [7].

Bu çalışmada H_2O_2 tayini için MWCNT, ZnONP ve PB ya da HRP enzimi ile modifiye edilmiş GCE'lere dayanan amperometri esaslı sensör ve biyosensörler

geliştirilmiştir. Çalışmada ayrıca, söz konusu elektrotların bileşimine IL olarak 1-bütül-3-metilimidazoltetrafloroborat eklenmiş ve IL'nin sensör ve biyosensörlerin performansına etkileri araştırılmıştır. Geliştirilen sensör ve biyosensörlerin optimum elektrot bileşimi ve optimum çalışma koşulları belirlenmiş, bu optimum şartlar altında sensör ve biyosensörlerin analitik performans faktörleri araştırılmış, söz konusu sensör ve biyosensörlerin gerçek numunelerde uygulanabilirliği dezenfektan numunelerinde H₂O₂ tayini ile gösterilmiştir.

1.1.Biyosensörler

Biyosensörler, analiz edilmek istenen madde ile seçimli olarak etkileşime giren biyoaktif bir bileşenin (biyoreseptör), bu etkileşimleri ölçülebilir elektronik sinyallere çeviren bir dönüştürücü (transduser) ile birleştirilmesi ile oluşan analitik sistemlerdir [3]. Biyosensörlerde biyoaktif bileşen olarak enzimler, antikorlar, nükleik asitler, dokular, organeller, hücreler ve mikroorganizmalar gibi biyolojik malzemeler yaygın olarak kullanılmaktadır. Analiz edilmek istenen madde ve biyoreseptör arasındaki etkileşimi ölçülebilir bir sinyale çeviren dönüştürücüler ise, elektrokimyasal, optik, kalorimetrik ve piezoelektrik olmak üzere dört ana grupta toplanabilir [8].

Biyosensör tarihi 1962 yılında Clark ve Lyons tarafından glukoz oksidaz enziminin O₂ elektrodu ile kombine edilerek kanın glukoz düzeyinin ölçülmesi ile başlar [9]. Bu ilk biyosensör örneğinde biyolojik sıvıda bulunan glukoz ve O₂ elektrot etrafındaki membranı geçerek elektrot yüzeyine ulaştığında glukoz, glukoz oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyonla glukonik aside dönüşür ve bu sırada O₂ tüketilir. Biyolojik sıvıda bulunan glukoz tükendiğinde O₂ elektrodu ile reaksiyon sonundaki çözünmüş O₂ miktarı belirlenir. Başlangıçtaki O₂ miktarı ve reaksiyon sonundaki O₂ miktarı arasındaki farktan numunedeki glukoz miktarı hesaplanır. Clark ve Lyons'un keşfi ile başlayan biyosensör araştırmaları yıllar içinde giderek artmış ve günümüzde biyosensörler biyomedikal uygulamalar, gıda endüstrisi, savunma sanayi, çevresel izleme, biyoteknoloji gibi pek çok alanda sıklıkla kullanılan sistemler haline gelmiştir.

1.1.1. Biyosensörlerin sınıflandırılması

1.1.1.1. Biyoreseptöre göre yapılan sınıflandırma

Biyoreseptörler hedef analit ile seçici olarak etkileşime giren ve hedef analite yüksek afinite ve özgünlük gösteren biyolojik moleküllerdir. Biyosensörler, kullanılan biyoreseptör türüne göre aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir:

- **Enzim biyosensörleri**

Spesifik kimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapısında biyolojik moleküller olan enzimler biyosensörlerde en yaygın kullanılan biyoreseptörlerdir. Enzimin spesifik olarak kimyasal dönüşümünü katalizlediği reaktife enzimin substratı denir ve enzim substratına karşı yüksek seçicilik gösterir [10]. Enzim biyosensörlerinde biyotanıma elementi olarak kullanılan enzimler, elektrokimyasal, piezoelektrik ya da optik bir dönüştürücü üzerine immobilize edilerek kullanılır [11]. Enzim immobilizasyonunda amaç, enzimi defalarca kullanılabilir şekilde ve katalitik aktivitesini koruyarak belirli bir yere fiziksel olarak hapsedmek veya hareketini sınırlandırmaktır [12]. Serbest enzimlerle karşılaştırıldığında immobilize enzimler (i) enzimin tekrar kullanılabilmesi ve bu sayede üretim maliyetinin düşmesi, (ii) yüksek sıcaklık, asidik/bazik pH gibi ortam koşullarına daha dayanıklı olmaları, (iii) enzimin ürünlerden kolaylıkla ayrılabilmesi, (iv) enzimin ortamdan uzaklaştırılıp reaksiyonun hızla durdurulabilmesi ve (v) sürekli sistemlerde çalışabilme imkânı vermesi gibi birçok avantaja sahiptir. Fiziksel adsorpsiyon, tutuklama, mikrokapsülleme, kovalent bağlama ve çapraz bağlama enzim immobilizasyonu için yaygın kullanılan yöntemlerdir [13]. Enzim biyosensörlerine, glukoz tayini için glukoz oksidazın, glutamat tayini için glutamat oksidazın, laktat tayini için laktat dehidrogenazın ve H₂O₂ tayini için HRP'nin kullanıldığı biyosensörler örnek verilebilir [11].

- **Nükleik asit biyosensörleri**

DNA, kromozomları oluşturan ve insanda ve diğer çoğu canlıda genetik kodu taşıyan moleküldür. DNA yapısındaki bilgiler, adenin (A), guanin (G), sitozin (C) ve timin (T) bazlarından oluşan bir kod olarak saklanır. Bu bazlar birbirleriyle A ile T ve C ile G şeklinde eşleşerek DNA'nın temel birimleri olan ve baz çifti olarak adlandırılan yapıları oluşturur. Her bir baz bir şeker molekülü ve bir fosfat molekülü ile birleşerek nükleotidleri oluşturur. Nükleotidler, A – T ve C – G etkileşimi ile çift sarmal denilen bir spiral oluşturan iki uzun

şerit halinde düzenlenmiştir [10]. DNA, biyosensörlerde biyoreseptör olarak da kullanılabilir. Bu tip biyosensörlerde bütün bir DNA zinciri değil, polimeraz zincir reaksiyonu yoluyla DNA amplifikasyonu ile sentezlenen ve DNA probu olarak adlandırılan 20–30 bazlık kısa DNA parçaları kullanılır. DNA biyosensörlerinin çalışma prensibi dönüştürücü yüzeyine immobilize edilmiş tek zincirli DNA probu ile belirlenmek istenen hastalığı ya da bir bakteri veya virüsün patojenitesini temsil eden bir tek zincirli hedef DNA parçasının hibridizasyonu ve bu hibridizasyon sonucu oluşan çift zincirli DNA'nın sebep olduğu sinyalin elektrokimyasal, optik ya da piezoelektrik bir dönüştürücü ile belirlenmesine dayanır. Nükleik asit biyosensörlerinde ayrıca aptamer adı verilen ve belirli biyomoleküllerle etkileşime girme yeteneklerine göre seçilen sentetik oligonükleotit dizileri de kullanılabilir. Bu tip biyosensörler, genetik bozuklukların tayini ve genetiği değiştirilmiş organizmalarla elde edilen ürünlerin belirlenmesi gibi amaçlar için kullanılabilirler [14,15].

- **İmmünosensörler**

Biyoreseptör, antikor olarak bilinen immüoglobulinlerin kullanıldığı biyosensörlerdir. Antikorlar, organizmaya giren yabancı bileşiklere (antijen) karşı bağışıklık sistemi tarafından üretilen protein yapılarıdır. Toksinler, bakteriler, virüsler, yabancı kan hücreleri gibi pek çok madde antijen olarak davranabilir ve organizmaya girdiğinde antikor oluşumuna neden olur. Antikorlar antijeni spesifik olarak bağlar ve bu etkileşim immünosensörlerin çalışma prensibini oluşturur. Tayin edilmek istenen madde için spesifik bir antikor olması durumunda bu madde immünosensörler kullanılarak yüksek bir seçicilik ile tayin edilebilir. Antikorların uygun dönüştürücü ile birleştirilmesi ile ilaç, virüs, bakteri, pestisit gibi maddelerin tayini için immünosensörler geliştirilebilir [16, 17]

- **Mikroorganizma temelli biyosensörler**

Biyoreseptör olarak mikroorganizmaların kullanıldığı biyosensörlerdir [18]. Mikroorganizma temelli biyosensörler, mikroorganizmaların belirlenecek analiti enzimleriyle metabolize etmesi ve solunum aktivitesinin çözünmüş oksijen elektrodu gibi bir dönüştürücü ile ölçülmesi esasına göre çalışır. Bu amaçla, oksijen elektrodunun membranına biyoaktif tabaka immobilize edilir. Reaksiyon kabına substrat ilavesinin ardından, enzimatik reaksiyon başlar. Bu sırada reaksiyon kabındaki çözünmüş oksijenin tüketilmesiyle çözünmüş oksijen miktarında azalma gözlenir. Biyosensörün ölçüm ilkesi çözünmüş oksijen miktarındaki azalmanın ölçümüne dayanır [19, 20]. Mikroorganizma esaslı biyosensörler; çevresel

analizlerde (BOD, ağır metal, pestisit, toksisite, organik kirleticiler vb.), gıda analizlerinde (glukoz, laktat, galaktoz, lizin, kafein, etanol, uçucu alkol vb.), klinik analizlerde (üre, penisilin, glukoz, epinefrin, patojen vb.) yaygın biçimde kullanılır [18].

1.1.1.2. Dönüştürücüye göre yapılan sınıflandırma

Biyosensörler dönüştürücü türüne göre de sınıflandırılabilirler. Dönüştürücü türüne göre biyosensörler elektrokimyasal, optik, kalorimetrik ve piezoelektrik esaslı olarak aşağıda ayrıntıları verilen dört ana grupta incelenebilir [21]:

- **Elektrokimyasal biyosensörler**

Elektrokimyasal biyosensörler analit ve biyoreseptör arasındaki etkileşimi akım, iletkenlik, potansiyel gibi elektrokimyasal bir sinyale çeviren cihazlar olup en yaygın geliştirilen biyosensör grubunu oluşturur. Bu tip biyosensörler, dedektör sistemi tarafından ölçülen elektrokimyasal özelliğe göre, amperometrik, potansiyometrik, impedimetrik ve kondüktometrik olarak sınıflandırılır. Potansiyometrik sistemlerde elektrokimyasal bir hücreden akım geçmediği durumda çalışma elektrodu ile referans elektrot arasındaki potansiyel farkın ölçümünden; kondüktometrik sistemlerde biyokimyasal reaksiyon sonucunda çözeltide oluşan iletkenliğin ölçümünden, impedimetrik biyosensörlerde elektrot çözelti arayüzeyinde elektron aktarımına karşı olan direncin ölçülmesinden ve amperometrik biyosensörlerde sabit bir potansiyelde akım şiddetinin ölçümünden yararlanılır [22, 23].

Enzim temelli elektrokimyasal biyosensörler, bir enzimatik reaksiyonla üretilen ya da tükenen bir elektroaktif tür tarafından üretilen bir elektrik sinyalinin tespitine dayanır. Enzimler, hedeflenen substratları için mükemmel seçicilik göstermeleri ve yüksek katalitik aktiviteye sahip olmalarından dolayı ideal biyolojik tanıma molekülleridir. Ancak, enzimler zaman içinde aktivitelerini kaybettiklerinden biyosensörlerin en kısa ömürlü bileşenidir ve biyosensörün ömrünü belirlerler. Amperometrik biyosensörlerde, enzim tabakası bir elektroaktif türün üretimini veya tükenmesini katalizlerken çalışma elektroduna elektroaktif türlerin redoks reaksiyonunu tetikleyen bir potansiyel uygulanır ve bunun sonucu bir sinyal üretilir. Oluşan bu elektrik sinyali numunedeki analit derişimi ile ilişkilidir [24].

Elektrokimyasal biyosensörlerde elektroaktif moleküller farklı potansiyelerde yükseltgenip indirgenebildiğinden iyi bir seçicilik gözlenir. Bu tip biyosensörlerin, yüksek duyarlılık, kullanım kolaylığı, düşük maliyet, düşük gözlenebilme sınırı ve hızlı cevap gibi

pek çok avantajıda vardır. Elektrokimyasal biyosensörler aynı zamanda minyatürleştirilmeyede uyumludur ve ölçümler numunenin bulanıklığından ve renginden bağımsızdır. Tüm bu üstünlüklerine rağmen, enzim temelli elektrokimyasal biyosensörlerin dezavantajları da vardır. Örneğin; bu biyosensörleri geliştirmedeki ana zorluk, enzim ve elektrot yüzeyi arasındaki çoğu zaman yetersiz olan elektron transferi probleminin üstesinden gelmektir. Bu durum genellikle redoks aktif bölgesinin enzimin derinliklerine gömülü olması ve enzimin hızlı ve verimli elektron transferi için elektrot yüzeyine göre kendisini uygun yönde yönlendirememesinden kaynaklanır. Yapılan çalışmalarda elektrokimyasal biyosensörlerle ilişkili; spesifik olmayan bağlanma, bazı durumlarda elektrot kirlenmesi nedeni ile gerçek numunelerde yeterince işlev görememe veya karmaşık bir numune matriksindeki analitler için zayıf seçicilik gibi sakıncalar olduğu da rapor edilmiştir [24].

- **Optik biyosensörler**

Optik biyosensörler, biyokimyasal bir reaksiyon sonucu absorplanan ya da yayılan ışının ölçümünü esas alırlar. Bu tip biyosensörler ile hedef analitin belirlenmesinde kemilüminesans, absorbans, fosferesans, fototermal teknikler, yüzey plazmon rezonans, toplam iç yansıma ve polarizasyon gibi bir dizi teknik kullanılabilir. Optik biyosensörler ölçümlerin hızlı ve tekrarlanabilir olması gibi pekçok avantaja sahiptir [21].

- **Piezoelektrik biyosensörler**

Piezoelektrik kuvars kristallerinin kristal yüzeyindeki kütle değişiminden etkilenme özelliklerinden yararlanılarak piezoelektrik esaslı biyosensörler geliştirilmiştir. Bu tip biyosensörlerde, biyoreseptörle kaplanmış kristal yüzeyde hedef analitin absorpsiyonu sonucu karakteristik rezonans frekansındaki farklanma belirlenerek piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan numunenin kütlelerinin ölçümü gerçekleştirilir. Hedef analitin kristal yüzeyde absorpsiyonu sonucu kristal kütlesi artar ve temel osilasyon frekansında değişim meydana gelir [21].

- **Kalorimetrik biyosensörler**

Çoğu biyokimyasal reaksiyona bir ısı absorpsiyonu ya da üretimi eşlik eder. Kalorimetrik biyosensörlerin çalışma prensibi bir biyokimyasal bir olay sonucunda meydana gelen ısı değişimlerinin hassas bir termistör kullanılarak belirlenmesi ve bu değişimlerden yararlanarak substrat derişiminin tayin edilmesine dayanır [21].

1.1.2. Biyosensörlerin performans faktörleri

Biyosensörlerin kullanım amaçlarına uygun olduğuna karar vermek için birtakım performans faktörlerine sahip olduğunun ayrıntılı bir şekilde belirlenmesi gerekir [23].

- **Kalibrasyon ve duyarlılık**

Duyarlılık analit derişimdeki bir birimlik değişim için biyosensör cevabının zamanla değişimi olarak tanımlanır. İdeal olan bir biyosensörün duyarlılığı biyosensörün ömrü boyunca sabit olmasıdır. Biyosensörün duyarlılığı analizi hedeflenen maddenin derişimi bilinen standart çözeltilerinden farklı derişimlerde ölçümler alınıp kalibrasyon grafiği çizilerek ve bu kalibrasyon grafiğinin eğimi hesaplanarak kolayca belirlenebilir [23].

- **Kararlılık ve ömür**

Kararlılık belirli bir süre içerisinde yapılan farklı ölçümlerle biyosensörün duyarlılığı ve kalibrasyon aralığındaki değişimi belirten bir kalite ölçüm değeridir. Biyosensörün ömrünün belirlenmesine kararlılıktan yararlanılır. Biyosensörün ömrünün ve kararlılığının yüksek olması aynı materyal ile çok sayıda ölçüm alınabileceğini gösterir. Bu durum maliyeti ve iş gücünü önemli ölçüde azaltır. Biyosensörlerin ömrü saklama ve çalışma koşullarına bakılarak başlıca iki durumda incelenebilir. İdeal koşullar altında kullanılmadan saklanan ve sürekli kullanım halinde olan biyosensörlerin ömürleri birbirinden farklı olur. Biyolojik materyal içeren biyosensörlerin kararlılığı kullanılan materyalin saflık düzeyi, kaynağı ve immobilizasyon yöntemi gibi parametrelere bağlılık gösterir [23].

- **Tayin aralığı ve gözlenebilme sınırı**

Gözlenebilme sınırı biyosensörün algılayabileceği en düşük analit derişimini ifade eder. Tayin sınırından başlayarak farklı derişimlerde alınan ölçümlerle çizilen kalibrasyon grafiğindeki derişime karşı biyosensör cevabının doğrusallık izlediği aralığa doğrusal tayin aralığı denir. Doğrusal tayin aralığı ve gözlenebilme sınırı, analiz yapılan ortamın sıcaklığı, pH, çalışma potansiyeli ve girişim yapan türlerin varlığı gibi biyosensör cevabını etkileyen parametrelerden doğrudan etkilenir [23].

- **Cevap süresi**

Cevap süresi analizi yapılacak maddenin biyosensör yüzeyine temas ettiği andan cevabın dengeye geldiği ana kadar geçen süre olarak tanımlanır. Biyosensörün cevap

süresinin çok sayıda numunenin analizinin yapılabilmesi için oldukça kısa olması beklenir. Cevap süresi kütle aktarımını etkileyen difüzyon, elektriksel göç ve etkili karıştırma olayları iyileştirilerek daha kısa olması sağlanabilir [23].

- **Seçicilik**

Biyosensörde istenilen önemli bir husus da biyosensörün sadece analizi yapılmak istenilen maddeye cevap vermesi, cevabın ortamda bulunan diğer türlerden etkilenmemesidir [23]. Biyosensörün yüzeyinde gerçekleşen reaksiyonun substrat veya ürünleri ile girişim yapan maddelerin analit çözeltisinde bulunması biyosensörün cevabının hatalı olmasına yol açar. Bu problem hataya sebep olan türlerin bir ön işlem ile uzaklaştırılması veya sadece analizi istenen maddeye duyarlı biyosensörler kullanılması ile giderilebilir [25]. Elektrotlar sadece tek bir iyonduyarlı değildir. Bir maddeyi tayin etmek için kullanılan elektrot başka maddelere de duyarlı olabilir. Duyarlı olunan maddelerin varlığı elektrot performansını önemli ölçüde zayıflatır. Seçicilik ilk olarak hidrojen ve sodyum iyonlarına duyarlılık gösteren cam elektrot için Nicolsky tarafından kullanılmıştır [26].

- **Tekrarlanabilirlik**

Aynı koşullar altında ve aynı materyaller ile hazırlanan biyosensörlerin birbirine çok yakın cevaplar vermesi bu biyosensörün tekrarlanabilirliğini gösterir. Enzim kullanılarak yapılan biyosensörlerde enzimin saflık düzeyi, kararlılığı ve aktivitesi tekrarlanabilir sonuçlar alınması için önem taşır. Ancak özellikleri çok iyi bilinen enzimler kullanılmış olsa bile koşullarda farklılıklar meydana gelebilir. Bundan dolayı hazırlanan biyosensörde tekrarlanabilirlik çalışmalarının yapılması gerekir [23].

1.1.3. Biyosensörlerin uygulama alanları

Biyolojik sistemin seçiciliğini ve fiziksel sistemin duyarlılığını birleştiren biyosensörler, gıda analizleri, çevresel izleme, klinik tanı ve analizler, kalite kontrol, ilaç geliştirme çalışmaları, kriminal analizler, endüstriyel proses kontrolleri, ilaç üretimi, biyolojik silah ajanlarının tespiti gibi çok sayıda farklı uygulama alanı bulmuştur [20].

Biyomedikal uygulamalar en fazla biyosensör araştırmasının yapıldığı alandır. Bu alanda glukoz, ürik asit, ksantin, laktik asit, kreatin ve kreatinin, kolesterol, kolin, üre, oksalat, glutamat ve klinik öneme sahip daha pek çok madde için biyosensörler geliştirilmiştir. Enfeksiyon hastalıklarının, kardiyak belirteçlerin, virüslerin, inflamatuvar hastalıkların,

kanser belirteçlerinin ve nörodejeneratif hastalıklarının tayinine yönelik biyosensörler de rapor edilmiştir. Biyomedikal alanda ticari olarak ilk üretilen biyosensör ise günümüzde diyabet hastaları tarafından sıklıkla kullanılan ve hastalara kan glukoz seviyelerini kendi kendilerine analiz etme imkânı sunan glukoz biyosensörüdür [27, 28]. Bu biyosensör sayesinde diyabet hastaları hastaneye gitmeden evde pratik ve ucuz glukoz tayini yapabilmektedir.

Proses ve kalite kontrolü için hızlı, güvenilir, ucuz yöntemlere ihtiyaç duyulan gıda endüstrisi için biyosensörler iyi bir alternatiftir. Şekerler, alkoller, amino asitler, çeşniler ve tatlandırıcılar gibi önemli analitlerin dışında biyosensörlerin gıda endüstrisinde uygulamaları kontaminantların tayini üzerine de yoğunlaşmıştır. Bu alanda polifenoller, biyojenik aminler, laktat, lizin, ksantin, hipoksantin, inosin, glukoz, etanol, kolesterol gibi maddeler, karbohidratlar, vitaminler, antibiyotik kalıntıları, pestisitler, toksinler ve gıda kaynaklı patojenlerin tayinine yönelik pek çok biyosensör rapor edilmiştir [29, 30].

Günümüzde kirleticilerin sayısının giderek artması, çevre kirliliği kontrolü ve erken uyarı konusundaki artan yasal düzenlemelere olan talebi karşılamak için kesin, yerinde ölçüm yapabilen, hassas, spesifik, hızlı ve kullanımı kolay, yenilikçi analitik cihazların geliştirilmesini gerektirmektedir ve biyosensörler bu amaçla kullanılacak önemli cihazlardır. Çevresel analizler açısından büyük önemi olan ağır metaller, nitrat, aromatik aminler, fenoller, pestisitler, doğal ve yapay hormon kalıntıları, antibiyotikler, poliklorlanmış bifeniller, poliaramatik hidrokarbonlar, linear alkilbenzen sülfonatlar, bisfenol A, toksinler ve benzeri maddelerin analizi için farklı tipte pek çok biyosensör rapor edilmiştir. Ayrıca sularda rutin olarak uygulanan biyolojik oksijen ihtiyacı (BOD) analizleri için geliştirilmiş biyosensörler de mevcuttur [31, 32].

Tüm bu uygulamalar açısından biyosensörler spektrometri ve kromatografi gibi zaman alıcı, karmaşık, zahmetli, yüksek maliyetli ve uygulanması için uzman personele ihtiyaç duyulan klasik analiz yöntemleri ile karşılaştırıldığında kullanım kolaylığı, hızlı cevap, düşük maliyet, yüksek duyarlılık, minyatürleştirmeye uygunluk ve numune analizinde genellikle karmaşık ön ayırma basamaklarına ihtiyaç duyulmaması gibi üstünlüklere sahiptir [30].

Tüm bu üstünlüklerine karşın biyosensörlerin karmaşık matrislerde yaygın olarak bulunan ve bozucu etki yapan türlerden etkilenme, biyoreseptör ömrünün sınırlı olması, düşük

kararlılık, in-vivo analizlerde kullanım için biyouyumluluk gibi geliştirilmesi gereken yönleri de vardır [20].

1.2. Hidrojen peroksit ve tayin yöntemleri

Hidrojen peroksit (H_2O_2), kâğıt beyazlatma, dezenfekte ve sterilizasyon, gıda işleme gibi endüstriyel proseslerde ve farmöstatik uygulamalarda yaygın biçimde kullanılır [2]. H_2O_2 reaktif oksijen türlerinin esas bileşenlerinden birisidir ve Alzheimer, Parkinson ve diğer nörolojik hastalıkların ilerlemesinde önemi olan oksidatif stresin bir belirteçidir [33]. H_2O_2 ayrıca, glukoz oksidaz, ksantin oksidaz, laktat oksidaz gibi pek çok oksidaz enzimi katalizli reaksiyonun yan ürünüdür [2]. Bu nedenle klinik kontrol, gıda endüstrisi, çevresel izleme gibi pek çok alanda H_2O_2 'in doğru, hızlı, güvenilir, ucuz ve pratik bir şekilde tayininin önemi büyüktür.

H_2O_2 tayini için kromatografi, spektrofotometri, kemilüminesans, elektrokimya, titrimetri, floresans gibi analitik teknikler kullanılmaktadır. Bu teknikler içinde elektrokimyasal teknikler yüksek duyarlılık, basitlik, hızlı cevap, kullanım kolaylığı ve uzman personel gerektirmeme, anında ve yerinde ölçüme uygun olma, seçicilik ve düşük maliyet gibi özellikleri nedeniyle öne çıkmaktadır. Bu üstün özellikleri nedeniyle elektrokimyasal teknikler H_2O_2 sensör ve biyosensörlerinin geliştirilmesinde yaygın biçimde kullanılmaktadır [34, 35].

Elektrokimyasal H_2O_2 sensörleri enzimatik ve enzimatik olmayanlar şeklinde iki grupta incelenebilir. Enzimatik H_2O_2 sensörleri düşük gözlenebilme sınırı, yüksek duyarlılık ve iyi seçicilik gibi üstünlüklere sahiptir. Ancak, enzim sensörlerinin enzim immobilizasyon yöntemlerinin zahmetli olması, enzimlerin yüksek maliyeti, enzim aktivitesinin çevre koşullarına bağlı olması ve enzim aktivitesindeki düşüşün sensör ömrünü kısaltması gibi dezavantajları vardır. Enzim içermeyen H_2O_2 biyosensörlerinin ise basitlik, düşük maliyet, yüksek kararlılık ve hızlı cevap gibi üstünlükleri vardır [36, 37].

H_2O_2 'in elektrokimyasal yöntemle belirlenmesi maddenin elektrot yüzeyinde yükseltgenmesi ya da indirgenmesine dayanılarak yapılabilir. Geleneksel katı elektrotlarda H_2O_2 'in yükseltgenmesi oldukça yüksek potansiyelerde gerçekleşir. Cevap mekanizması H_2O_2 'in yükseltgenmesine dayanan sensörlerde en büyük problem gerçek numunelerde bulunabilecek askorbik asit, ürik asit gibi diğer elektroaktif türlerin uygulanan yüksek potansiyelde yükseltgenerek ölçümlere girişim yapması yani sensörün seçiciliğini azaltması

ihtimalidir. Günümüzde yapılan biyosensör araştırmalarının temel amaçlarından birisi de yukarıda açıklanan girişim etkilerini en aza indirmek için yüksek uygulama potansiyelini düşürmektir [38, 39]. Bu amaçla H₂O₂ indirgenmesini katalizleyen peroksidaz enzimini [40, 34] ya da Prusya mavisi gibi yapay peroksidaz özelliği gösteren bir madde kullanarak H₂O₂'in düşük potansiyelerde indirgenmesini sağlamak [41] yaygın kullanılan yöntemlerdir.

Horseradish peroksidaz (EC 1.11.1.7) (HRP) turp kökünden ekstrakte edilen ve H₂O₂'in indirgenmesini katalizleyen bir enzimdir. HRP enzimi, demir (III) ve protoporphirin IX (genellikle hem grubu olarak adlandırılan) farklı türde metal merkezleri ve iki kalsiyum atomu içerir. Her iki grupta enzimin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü için önemlidir [42]. HRP içeren biyosensörler kullanıldığında, H₂O₂'nin düşük potansiyelerde tayinini gerçekleştirerek girişim etkileri azaltmak mümkündür. H₂O₂ tayini için HPR'nin karbon nonotüpler [43], metal/metal oksit nanopartiküller [44, 40], grafen ve türevleri [45, 34], polimer [46], karbon pasta [47] gibi farklı modifikasyon malzemelerle beraber kullanıldığı çeşitli elektrokimyasal biyosensörler geliştirilmiştir. Ancak, biyolojik makromoleküller olan enzimler denatürasyon sonucu aktivitelerini kaybedebildiklerinden biyosensörlerin uzun dönem kullanımda tam kararlılık göstermemesine yol açarlar [48].

Analitik uygulamalar için en yaygın kullanılan medyatörlerden biri olan PB, ((Fe^{III}[Fe^{II}(CN)₆]₃)) son yıllarda sensör ve biyosensör alanında da geniş bir kullanım alanı bulmuştur. PB'nun H₂O₂ indirgenmesini katalizlemesi, klinik, çevre ve gıda analizleri için çok sayıda oksidaz enzimi temelli biyosensörün geliştirilmesini sağlamıştır [49]. PB'nin tamamen indirgenmiş hali olan Prusya beyazı hem oksijenin hem de H₂O₂'in indirgenmesini katalizler. İlgili yarı dalga potansiyelleri çok farklı olduğundan H₂O₂'in indirgenmeye dayalı tayini oksijen varlığında bile gerçekleştirilebilir. PB'nin Berlin yeşili olarak adlandırılan tamamen yükseltgenmiş hali ise H₂O₂'in yükseltgenmesini katalizler ve PB modifiye bir elektrot ile H₂O₂'in yükseltgenmesine dayanılarak tayin edilmesi de mümkün olur [50]. PB, H₂O₂'in indirgenmesini katalizlemesi nedeni ile yapay peroksidaz olarak da adlandırılmaktadır. PB ile modifiye edilmiş bir elektrot kullanılarak, H₂O₂'i Ag/AgCl'ye karşı yaklaşık 0,0 V potansiyelde tayin etmek mümkündür. Bu durum özellikle, H₂O₂'nin yüksek potansiyelerde tayin edilmesi durumunda yükseltgenerek girişim etkisi gösteren maddelerin etkisini azaltmak açısından büyük öneme sahiptir. HRP biyosensör uygulamalarında pek çok oksidaz enzimi ile bir arada kullanılarak analizlerin düşük potansiyelerde gerçekleştirilmesini de sağlar. Ayrıca,

inorganik yapısı ve düşük maliyeti PB'yi modifiye biyosensörlerin oluşturulmasında HRP'den daha uygun bir alternatif yapar [51, 41].

1.3. Karbon Nanotüpler

Karbon nanotüpler (CNT), sp^2 -hibritleşmesi yapmış karbon atomlarının iyi düzenlenmiş silindirlerinden yapılmış nanomalzemelerdir ve tek duvarlı karbon nanotüplerde (SWCNT) olduğu gibi nano boyutta bir tüp haline yuvarlanmış bir grafen tabakası veya MWCNT'lerde olduğu gibi bir SWCNT'nin çekirdeği etrafına yerleşmiş ilave grafen tüpleri olarak tanımlanabilirler [52].

CNT'ler 1991 yılında Iijima tarafından keşiflerinden bu yana yoğun bir şekilde araştırılmıştır [53]. Bu yoğun ilgi, CNT'lerin dikkat çekici elektriksel, kimyasal, mekanik ve yapısal özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Bu özellikler CNT'lerin nanoteknoloji, elektronik, optik, malzeme bilimi gibi alanlarda pek çok uygulamada kullanılmasını sağlamıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, CNT'lerin geniş yüzey alanı, yüksek kimyasal kararlılık, mekanik dayanım, hızlı elektron transfer kinetikleri gibi avantajlarından dolayı biyoanalitik araştırmalarda da başarı ile kullanılabileceğini göstermiştir. Bu çalışmalarda, CNT'lerin önemli biyomoleküllerin elektrokimyasal reaktivitesini artırabileceğini ve proteinlerin elektron transfer reaksiyonlarını destekleyebileceği, CNT ile modifiye edilmiş elektrotların, nükleik asitler gibi önemli biyomolekülleri biriktirmek ve yüzey kirlenme etkilerini hafifletmek için kullanılabilmesi gösterilmiştir [54, 6].

CNT'ler amperometrik enzim elektrotlarından DNA hibridizasyon biyosensörlerine kadar uzanan çok çeşitli elektrokimyasal biyosensör geliştirme çalışmalarında da yaygın bir şekilde kullanılmıştır [6, 55]. CNT'lere dayanan biyosensörlerin analitik performansı, altın, platin, gümüş, camsı karbon gibi geleneksel katı elektrotlara dayanan biyosensörlerin performansı ile karşılaştırıldığında CNT temelli biyosensörlerin daha yüksek duyarlılıklara ve daha düşük gözlenebilme sınırlarına sahip olduğu görülmektedir [56]. Son zamanlarda yapılan amperometrik biyosensör geliştirme çalışmalarının pek çoğunda CNT'lerin metal veya metal oksit nanopartiküller, grafen ve türevleri gibi farklı nanomalzemeler ile oluşturduğu kompozitler kullanılarak yapılan modifikasyonlar ile biyosensör performansının artırılmasını amaçlanmaktadır [34, 40].

1.4. Metal Oksit Nanopartiküller

Biyosensör geliştirme çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir diğer nanomalzeme ise metal oksit nanopartiküllerdir (MONP). Bu maddelerde tıpkı CNT'ler gibi üstün fiziksel ve kimyasal özellikler gösterirler. MONP'ler biyomoleküllerin istenen yönelme, daha iyi bir konformasyon ve yüksek biyolojik aktivite ile immobilizasyonu için etkin bir yüzey sağlar ve bu durumda daha iyi algılama karakteristikleri elde edilebilir. Çinko oksit (ZnO), demir oksit (Fe_3O_4), kobalt oksit (Co_3O_4), nikel oksit (NiO), titanyum oksit (TiO_2), kalay oksit (SnO_2) biyosensörlerde yaygın kullanılan MONP'lerdendir. MONP'ler, büyük yüzey/hacim oranı, güçlü adsorpsiyon kabiliyeti, gelişmiş elektron aktarım kinetikleri ve katalitik özellikler gösterir. Bu özellikler, biyomolekül immobilizasyonunda birim parçacık kütlesi başına düşen biyomolekülleri arttırmak için de kullanılabilir [57]. Nanotüpler, nanopartiküller, nonofiberler, nanofilmler, nanotabakalar, nanoteller, nanoküreler gibi pek çok farklı şekilde olabilen ZnO nanoyapılar yüksek elektron hareketliliği, toksik olmama, yüksek yüzey alanı, iyi kimyasal ve termal kararlılık gibi özellikleri sebebi ile biyosensörlerde geniş uygulama alanı bulmuştur [58].

1.5. İyonik Sıvıların Biyosensörde Kullanımı

Erimiş tuzlar olarak da adlandırılan iyonik sıvılar, düşük erime noktasına ($<100\text{ }^\circ\text{C}$), düşük yanıcılığa, yüksek iyonik iletkenliğe ve geniş bir elektrokimyasal pencereye sahip organik tuzlardır. Ayrıca iyonik sıvılar, minimum buhar basıncı ile yüksek termal kararlılığa sahiptirler ve bazı polimerler ve mineraller dahil olmak üzere çok çeşitli organik ve inorganik bileşiklerde çözülebilirler. Anyonu değiştirerek iyonik sıvı polimerlerin çözünürlüğünü değiştirme olasılığı, onları biyosensörler için enzimatik immobilizasyon sistemleri olarak özellikle çekici kılar. İyonik sıvıların temel yapısı *N*, *N*-dialkil sübstitüye imidazolyum iyonları gibi bir asimetrik heterosiklik katyon ve tetrafloroborat ya da hekzaflorofosfat gibi küçük bir anyondan oluşur. Temelde iyonlardan oluştuğu için iyonik sıvılar mükemmel bir elektriksel iletkenlik gösterir. Son yıllarda iyonik sıvıların kullanıldığı pek çok yüksek performanslı biyosensör geliştirilmiştir [59, 60].

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Zhu ve ark (2014); H₂O₂'in enzimatik olmayan tayini için IL'nin PB-CNT modifiye perde baskılı elektroda dop edilmesi ile bir sensör hazırlamışlardır. Bu amaçla, ticari grafit temelli mürekkebe IL olarak kullanılan 1-butil-3-metilimidazol tetrafluroborat dop edilmesi ile ve bu mürekkebin elektrot yüzeyine baskılanması ile hazırlanan perde baskılı elektrot yüzeyi sentezlenmiş kübik yapılı PB-MWCNT hibridi ve Nafyon ile kaplanmıştır. Çalışmada hazırlanan sensörün özelliklerine IL'nin etkisi CV ve CA yöntemleri kullanılarak belirlenmiş ve IL'nin sensörün performansına önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir. Optimum çalışma koşulları altında sensörün H₂O₂'e 5–1645 µM aralığında 0,436 mA cm⁻² mM⁻¹ duyarlılık ve 0,35 µM (S/N=3) gözlenebilme sınırı ile cevap verdiği, iyonik sıvı dop edilmiş sensörün yüksek bir seçicilik, iyi bir tekrarlanabilirlik ve uzun bir kararlılık gösterdiği rapor edilmiştir [61].

Zhou ve ark (2010) tarafından yapılan çalışmada grafen ve HRP kitosana birlikte immobilize edilmiş ve GCE elektrot bu kompozit ile modifiye edilmiştir. Hazırlanan modifiye elektrot yüzeyine altın nanopartiküllerin biriktirilmesi ile H₂O₂ biyosensörü hazırlanmıştır. Dönüşümlü voltametri çalışması elektrotta HRP'nin doğrudan elektron transferinin gerçekleştiğini göstermiş ve biyosensör H₂O₂'in elektrokatalitik indirgenmesine karşı mükemmel bir performans sergilemiştir. Hazırlanan biyosensörün çalışma potansiyeli olan -0,30 V'da H₂O₂'e yüksek bir duyarlılıkla cevap verdiği, biyosensörün cevap süresinin 3 s'den az olduğu, doğrusal çalışma aralığının 5,0×10⁻⁶ M–5,13×10⁻³ M ve gözlenebilme sınırının 1,7×10⁻⁶ M (S/N=3) olduğu belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca biyosensörün iyi bir tekrar üretilebilirlik ve uzun dönem kararlılığı gösterdiği de rapor edilmiştir [45].

Palanisamy ve ark. (2012) H₂O₂'in enzimsiz tayini için indirgenmiş grafen oksit ve çinko oksit nanokompoziti ile modifiye edilmiş GCE kullanarak amperometrik bir sensör hazırlamışlardır. Bu amaçla kullanılan grafen Hummers metodu ile sentezlenmiş, grafen çözeltisi GCE yüzeyine damlatılıp elektrot kurutulduktan sonra elektrot (ZnNO₃)₂·6H₂O ve KNO₃ çözeltisi içeren elektrokimyasal hücreye daldırılmış ve (0) – (-1,50) V aralığında 50 mVs⁻¹ tarama hızında 30 ardışık dönüşümlü voltomogram alınarak grafen oksitin indirgenmesi ve grafen oksit modifiye elektrot yüzeyinde ZnONP'lerin oluşması sağlanmıştır. Hazırlanan sensörün çalışma potansiyeli olarak seçilen -0,38 V'da H₂O₂ için mükemmel bir analitik performans gösterdiği bulunmuş, sensör için doğrusal çalışma aralığının 1,0 – 22,48

μM , duyarlılığının $13,49 \text{ A M}^{-1}\text{cm}^{-2}$ ve cevap süresinin 5 s'den daha az olduğu rapor edilmiştir. Sensörün iyi bir operasyonel ve depolama kararlılığına sahip olduğu ve askorbik asit, dopamin ve ürik asite karşı seçiciliğinin de yüksek olduğu belirtilmiştir [62].

Xu ve ark. (2014) MWCNT'ler ile modifiye edilmiş GCE yüzeyine tetraetoksi silikon sol jel film kullanarak HRP enzimini immobilize etmiş ve bir üçüncü nesil H_2O_2 biyosensörü hazırlamışlardır. Çalışmada MWCNT'lerin HRP ve elektrot yüzeyi arasında doğrudan elektron transferine büyük katkı sağladığı belirtilmiştir. Kullanılan sol jel filmin ise HRP için uyumlu bir mikro çevre sağladığı ve enzimin elektrot yüzeyinden uzaklaşmasını engellediği bulunmuştur. Hazırlanan biyosensör ile $+0,30 \text{ V}$ 'da H_2O_2 için doğrusal çalışma aralığı $70 \mu\text{M} - 3 \text{ mM}$, gözlenebilme sınırı $14 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Biyosensörün cevap süresi 5 s olarak belirlenmiştir. Biyosensörün 60 gün sonunda başlangıç aktivitesinin %95'ini gösterdiği belirtilmiştir [63].

Hua ve ark. (2011) altın elektrodu HRP enzimi ve polyanilin/karboksilli çok duvarlı karbon nanotüp (PAn/MWCNTCOOH) nanokompoziti ile modifiye ederek bir H_2O_2 biyosensörü hazırlamışlardır. Nanokompozitin karakterizasyonu FTIR ve SEM yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada negatif yüklü PAn/MWCNTCOOH kompoziti ve pozitif yüklü HRP enzimi arasındaki etkileşimin biyosensörün H_2O_2 için çok yüksek bir duyarlılık göstermesine katkıda bulunduğu ve CV ölçümlerinde artmış elektrokimyasal katalitik akım oluşturduğu rapor edilmiştir. Hazırlanan HRP/PAn/MWCNTCOOH/Au elektrodu $-0,35 \text{ V}$ 'da H_2O_2 'e $86 \mu\text{M}-10 \text{ mM}$ aralığında doğrusal cevap göstermiştir. Biyosensörün duyarlılığı $194,9 \mu\text{A mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ cevap süresi 2,9 s olarak bulunmuştur. Biyosensörün yüksek kararlılık ve iyi bir tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik gösterdiği de belirtilmiştir. 40 günlük depolama sonrasında HRP/PAn/MWCNTCOOH/Au elektrodu başlangıç aktivitesinin %88'ini göstermiştir [64].

Xu ve ark. (2011) MWCNT'ler ile modifiye edilmiş GCE'ye HRP enzimin glutaraldehit ve sığır serum albümini kullanılarak çapraz bağlama yöntemi ile immobilize edilmesi ile üçüncü nesil bir H_2O_2 biyosensörü hazırlamışlardır. Yapılan SEM çalışması sonucunda HRP enziminin nanotüplerin yüzeylerinde dağıldığı ve nanotüplerin enzim immobilizasyonu için iyi bir destek olduğu bulunmuştur. Biyosensör ile H_2O_2 için 2 s gibi kısa bir cevap süresi elde edilmiştir. Biyosensörün $-0,40 \text{ V}$ 'da H_2O_2 için doğrusal çalışma aralığı $9,5 \text{ mM}-0,95 \mu\text{M}$; gözlenebilme sınırı $0,4 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Biyosensör 20 ardışık ölçüm sonrası %2,8'lik bir bağıl standart sapma göstermiş ve bu nedenle

tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğu görülmüştür. Biyosensörün uzun dönem kararlılığı araştırılmış ve 10 gün sonunda biyosensör cevabındaki değişimin %5'den daha az olduğu bulunmuştur. Yüksek uzun dönem kararlılığı glutaraldehit ile HRP enzimi ve çok duvarlı karbon nanotüpler ile HRP arasındaki kuvvetli etkileşimlere bağlanmıştır [65].

Zhang ve ark (2011) (3-merkaptopropil)-trimetoksisilan polimeri ile modifiye edilmiş altın elektrot yüzeyine PB'nin elektrobiriktirilmesi ile bir H₂O₂ sensörü hazırlamışlardır. Elektrodun karakterizasyonu CV ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi teknikleri ile araştırılmıştır ve sensörün H₂O₂ indirgenmesine önemli bir katalitik aktivite gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca polimer-PB modifiye elektrodun çift tabaka 2d-yapısının geniş yüzey hacim oranı H₂O₂ sensörüne kararlılık ve yüksek duyarlılık kazandırdığı sonucuna varılmıştır. Geliştirilen sensör ile H₂O₂ için doğrusal aralık $2,09 \times 10^{-6}$ – $2,09 \times 10^{-4}$ M, gözlenebilme sınırı $1,89 \times 10^{-6}$ M olarak belirtilmiştir. Hazırlanan sensörün yüksek bir duyarlılık ve iyi bir seçicilik gösterdiği ve 10 mM'lık sabit H₂O₂ derişiminde tekrarlanan beş ölçüm için bağıl standart sapmanın %4,5 olduğu bulunmuştur. Sensörün uygulanabilirliği musluk suyunda H₂O₂ tayini yapılarak araştırılmış ve %100'e yakın geri kazanımlar elde edilmiştir [66].

Ping ve ark. (2010) tarafından bakır oksit nanopartiküller ile modifiye edilmiş karbon iyonik sıvı pasta elektrotta H₂O₂'in direk elektrokatalitik indirgenmesi araştırılmıştır. Elektrot grafit tozun, bakır oksit nanopartiküller ve iyonik sıvı olarak kullanılan n-oktilpiridinyum hekzaflorofosfatın karıştırılması ile elde edilmiştir. İyonik sıvının iyi iletkenliği ve nanopartiküllerin yüksek katalitik aktivitesi elektroda H₂O₂ tayini için üstün özellikler kazandırdığı belirtilmiştir. H₂O₂ için doğrusal aralık 1,0 µM–2,5 mM aralığında olup gözlenebilme sınırı 0,5 µM ve duyarlılık $392,99 \mu\text{AmM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ olarak verilmiştir. Elektrodun ayrıca, iyi bir kararlılık, yüksek duyarlılık, seçicilik ve tekrarlanabilirlik, hızlı cevap zamanı, hazırlama kolaylığı gibi özellikler gösterdiği, aynı şekilde hazırlanan altı elektrodun sabit H₂O₂ derişiminde bağıl standart sapmasının %5,3 olduğu ve 100 gün sonunda elektrodun başlangıç aktivitesinin %95'ini koruduğu rapor edilmiştir. Elektrodun analitik uygulanabilirliği, sütte H₂O₂ tayininde araştırılmış ve referans yöntem olarak kullanılan titrimetrik yöntem ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir [67].

Yang ve ark. (2010) tarafından sentezlenen çatal benzeri ZnO nano yapılara dayanan H₂O₂ biyosensörü geliştirilmiştir. ZnO nano yapıların birkaç nano çubuktan oluştuğu, bu nano çubukların ince bir levha temelinden büyüdüğü ve kompleks çoklu çatal benzeri ZnO nano yapıları oluşturmak için birbirlerine paralel olarak sıralandığı SEM çalışmaları sonuçlarında

görülmüştür. Sentezlenen bu ZnO nano yapılar etanolde dağıtılmış ve elde edilen süspansiyon GCE yüzeyinin modifiye edilmesinde kullanılmıştır. Daha sonra elektrot yüzeyine HRP enzimi immobilize edilmiş ve enzimin çözeltiye akmasını engellemek için elektrot yüzeyi kitosan çözeltisi ile kaplanmıştır. Hazırlanan biyosensörün Ag/AgCl elektroda karşı -0,20 V çalışma potansiyelinde H₂O₂ için doğrusal çalışma aralığı $5 \times 10^{-5} \text{ M} - 7 \times 10^{-4} \text{ M}$, gözlenebilme sınırı 0,3 µM ve duyarlılığı 201,12 mA M⁻¹, cevap zamanı 3 s olarak rapor edilmiştir [68].

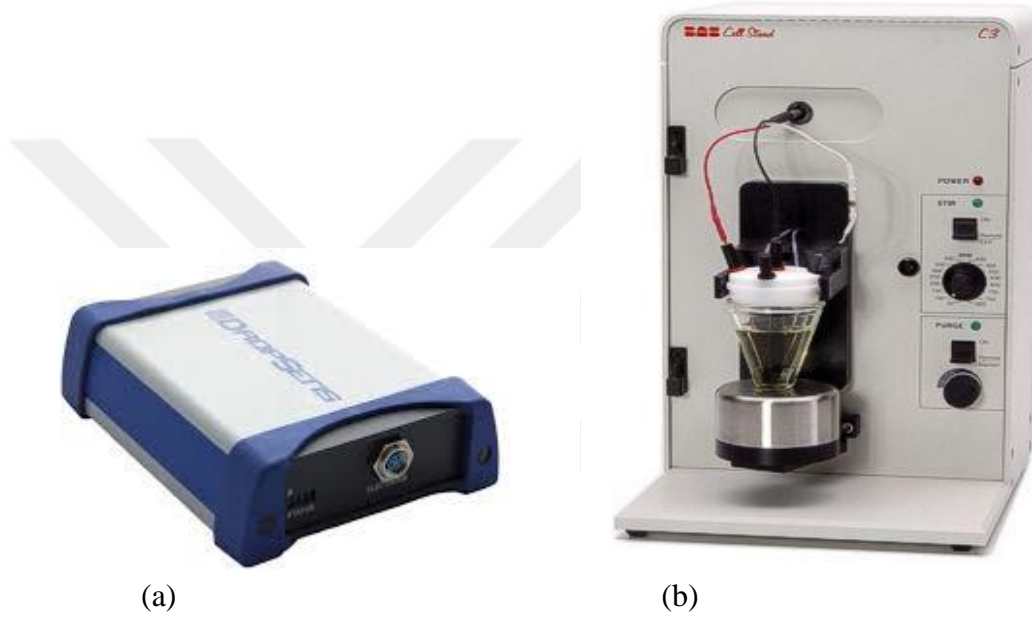
Li ve ark. (2012) amperometrik H₂O₂ tayini için altın nanopartiküller, tiyonin, altın nanopartiküller, MWCNT'ler, kitosan kompozit filmi ile modifiye edilmiş GCE'ye dayanan biyosensör hazırlamışlardır. Bu amaçla, MWCNTs–kitosan kompoziti asetik asit çözeltisinde dağıtılmış, altın nanopartiküller daha sonra bu kompozit içinde sentezlenmiştir. Karışım GCE yüzeyine damlatılmış ve tiyonin elektropolimerizasyon ile kompozit üzerinde biriktirilmiştir. Son olarak altın nanopartiküller ve HRP karışımı kovalent bağlama yöntemi ile modifiye elektrot üzerine yerleştirilmiştir. Biyosensörün Ag/AgCl elektroda karşı -0,23 V potansiyelde pH 6,0 fosfat tampionunda H₂O₂ için $5,0 \times 10^{-7} \text{ M} - 1,5 \times 10^{-3} \text{ M}$ doğrusal çalışma aralığına sahip olduğu ve gözlenebilme sınırının $3,75 \times 10^{-8} \text{ M}$ olduğu belirtilmiştir. Çalışmada ayrıca, aynı yolla üretilen 10 modifiye GCE elektrodun %3,95'lik bağıl standart sapma ile iyi bir tekrar üretilebilirlik gösterdiği ve seçiciliğinin yüksek olduğu da rapor edilmiştir [69].

Keihana ve Sajjadi (2014) PB ve CNT'ler ile modifiye edilmiş ve PB, CNT ve IL ile modifiye edilmiş GCE'ler hazırlamış ve IL varlığının PB/CNT elektrodun elektrokimyasal özelliklerini iyileştirdiğini rapor etmişlerdir. Bu amaçla, GCE yüzeyleri ilk olarak CNT ya da IL/CNT kompoziti ile modifiye edilmiş, PB bu yüzeylere elektrobiriktirme yolu ile kaplanmıştır. Çalışmada IL varlığında PB'nun birikme etkinliğinin 1,8 kat arttığı bulunmuştur. IL içeren elektrodun içermeyenle karşılaştırıldığında H₂O₂ indirgenmesine daha yüksek duyarlılık gösterdiği bulunmuş ve bu elektrot için duyarlılık $185,90 \mu\text{A mM}^{-1}\text{cm}^{-2}$, gözlenebilme sınırı 0,49 µM ve doğrusal çalışma aralığı $4,9 \times 10^{-4} - 7,0 \times 10^{-1} \text{ mM}$ olarak rapor edilmiştir [70].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Elektrotlar

CV ve CA çalışmaları Dropsens marka elektrokimyasal analiz sistemi ve BASi marka hücre standı kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 3.1). Elektrokimyasal çalışmalarda, çalışma elektrodu, karşıt elektrot ve referans elektrot olarak sırasıyla camsı karbon elektrot (GCE) (BASi MF-2012); Pt tel (BASi MW-1032) ve Ag/AgCl elektrot (BASi MF-2052) kullanıldı.



Şekil 3. 1. (a) Elektrokimyasal analiz sistemi, (b) C3 hücre standı

Kimyasal maddelerin tartılmasında 0,1 mg duyarlığa sahip Ohaus PA214C marka analitik terazi kullanıldı. Çözeltilerin pH'ları Ohaus Starter 2100 marka pH metre ve Ohaus ST210 marka kombine cam pH elektrodu yardımıyla ayarlandı. pH metre cihazının kalibrasyonu VWR Prolabo Chemicals marka pH 4,01 ve pH 10,01 kalibrasyon çözeltileri ile yapıldı. Çözeltilerin hazırlanmasında Purelab Option Q DV 25 marka saf su cihazından elde edilen saf su kullanıldı. Karışımların ve çözeltilerin homojen hale getirilmesinde Wisd MSH-20D marka manyetik karıştırıcı, İsolab marka ultrasonik banyo ve Four E'S marka vorteksten yararlanıldı. Çözelti ilaveleri Axygen marka değişik hacimlerde mikro pipetler ile yapıldı.

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar, saflık dereceleri ve markaları Çizelge 3.1.'de verildi.

Çizelge 3. 1. Kullanılan kimyasal maddeler, saflık dereceleri ve markaları

Kimyasal madde	Saflık derecesi	Marka
Askorbik asit	≥%99	Sigma-Aldrich
Çinko oksit nanopartikül		Aldrich
Disodyum hidrojenfosfat-2-hidrat	%98,5-101	Sigma-Aldrich
Etanol	%99,8	Sigma-Aldrich
Glukoz	≥%99,5	Fluka
Glutaraldehit	%25	Sigma
Glutamik asit	>%99	Merck
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	%34,5-36,5	Sigma-Aldrich
Hidroklorik asit (HCl)	%30-31	Sigma-Aldrich
Horseradish peroksidaz (HRP)		Sigma
Jelatin (Type B)		Sigma
Potasyum klorür	%99,0–100,5	Merck
Lityum karbonat (Li ₂ CO ₃)	%99,0	Sigma-Aldrich
MWCNT	%95	Cheaptubes
Nafyon	%5	Aldrich
Okzalik asit	Saf	Riedel-de Haën
Sodyum hidroksit	%98-100,5	Sigma-Aldrich
Sodyum dihidrojenfosfat	≥ 99,0	Fluka
Ürik asit	≥ 99,0	Sigma
1-bütül-3-metilimidazoltetrafloroborat	≥ 98,5	Sigma
Potasyum hekzasiyanoferrat (III)	%99	Sigma-Aldrich
Potasyum hekzasiyanoferrat (II) trihidrat	≥%99,5	Sigma-Aldrich

Çizelge 3.1.(devam)

Prusya mavisi		Sigma
Sodyum klorür	≥ %99,0	Merck
Üre	≥%99,5	Sigma-Aldrich

3.3. Kullanılan Çözeltiler

3.3.1. Jelatin çözeltisi

2 mg jelatin tartıldı ve 10,0 mL saf su eklenerek yaklaşık 40 °C’de ısıtıcıli manyetik karıştırıcı yardımıyla dağıtıldı. Çözelti 30 dakika ultrasonik banyoda tutularak homojen hale gelmesi sağlandı. Çözelti kullanılmadığı zamanlarda buzdolabında +4°C’ta saklandı.

3.3.2. Glutaraldehit çözeltisi

%2,5’lik glutaraldehit çözeltisi hazırlamak amacıyla %25’lik glutaraldehit çözeltisinden 2 mL alınarak saf su ile 20 mL’ye seyreltilti.

3.3.3. Nafyon çözeltisi

%0,025’lik nafyon çözeltisi hazırlamak amacıyla, %5’lik Nafyon çözeltisinden 5 µL alınıp hacimce %50 alkol-su karışımı ile seyreltilti. Çözelti kullanılmadığında buzdolabında +4°C’ta saklandı.

3.3.4. Hidrojen peroksit çözeltisi

H₂O₂ çözeltisinden uygun miktarda alınarak derişimi yaklaşık 0,010 M olacak şekilde 100,0 mL stok çözelti hazırlandı. H₂O₂ çözeltisi deneylerden önce taze olarak hazırlandı.

3.3.5. Fosfat tamponu çözeltisi

Sodyum dihidrojenfosfat ve sodyum monohidrojenfosfat-2-hidrattan tartılan uygun miktarlar saf suda çözülerek derişimi 0,05 M olan fosfat tamponu çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan fosfat tamponunun pH’sı 0,10 M NaOH ve 0,10 M HCl kullanılarak istenilen değere ayarlandı. Tampon çözeltiler kullanılmadıklarında+4°C’ta buzdolabında saklandı.

3.3.6. Redoks probu çözeltisi

Potasyum hekzasiyanoferrat (III) ($K_3[Fe(CN)_6]$) ve potasyum hekzasiyanoferrat (II) ($K_4[Fe(CN)_6]$)'den çözeltideki derişimleri 0,05 M; KCl'den ise derişimi 0,10 M olacak şekilde uygun miktarlar tartıldı ve ölçülü balonda saf suyla istenen hacme tamamlandı.

3.3.7. Diğer çözeltiler

Askorbik asit, glukoz, glutamik asit, oksalik asit, üre, ürik asit ve sodyum klorürün 0,010 M'lık stok çözeltileri, bu maddelerin uygun miktarlarının saf suda çözülmesiyle hazırlandı. Ürik asidin 0,010 M'lık stok çözeltisi ise uygun miktarda madde tartılarak üzerine gerekli miktarda Li_2CO_3 ve saf su ilave edilmesiyle hazırlandı.

3.3.8. HRP çözeltisi

10,0 mg HRP enzimi tartılarak 1 mL fosfat tamponunda (pH 6,5) çözüldü ve 2530 U/mL olan enzim çözeltisi elde edildi. HRP çözeltisi kullanılmadı zamanlarda buzdolabında $+4^{\circ}C$ 'de saklandı.

3.3.9. PB çözeltisi

10,0 mg PB tartılarak 1 mL fosfat tamponunda (pH 6,5) çözüldü ve derişimi $10,0 \text{ mg mL}^{-1}$ olan PB çözeltisi elde edildi. PB çözeltisi kullanılmadığında buzdolabında $+4^{\circ}C$ 'de saklandı.

3.4. GCE Yüzeyinin Temizlenmesi

GCE yüzeylerinin temizlenmesinde BASi firmasından temin edilen temizleme kitleri (MF-2060) kullanıldı. Bu amaçla, temizleme pedine $0,05 \mu\text{m}$ boyutunda alümina içeren süspansiyondan birkaç damla damlatıldı ve elektrot yüzeyi mekanik olarak temizlendi. Temizlenen elektrot yüzeyi alümina kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla saf su ile yıkandı, ultrasonik banyoda etil alkol çözeltisi içerisinde 5 dakika bekletildi ve oda sıcaklığında kurutuldu.

3.5. Modifiye Edilmiş Elektrotların Hazırlanması

Tez çalışmasında GCE yüzeyi dört farklı şekilde modifiye edilerek aşağıda belirtilen elektrotlar hazırlandı. Modifiye elektrotların hazırlanma basamakları Şekil 3.2'de gösterildi.

3.5.1. HRP/MWCNT-ZnONP/GCE

1,0 mg MWCNT ve 2,0 mg ZnONP 1 mL jelatin çözeltisinde dağıtıldı ve karışım ultrasonik banyoda 2 saat tutularak homojen hale gelmesi sağlandı. Bu karışım GCE yüzeyine damlatılmadan önce 5 dakika vortekste karıştırıldı ve karışımdan alınan 10,0 µL temizlenmiş GCE yüzeyine damlatıldı. Elektrot oda sıcaklığında kurutuldu ve üzerine 7,5 µL HRP çözeltisi damlatıldı. Enzim ile modifiye edilen elektrot buzdolabında +4 °C'ta kurutuldu. Kurutulan elektrot yüzeyi 10 dakika %2,5'lik glutaraldehit buharına tutuldu ve sonrasında yüzey 3,0 µL %0,025'lik nafyon çözeltisi ile kaplandı ve kuruması için oda sıcaklığında bekletildi. Hazırlanan biyosensör yüzeyi immobilize olmamış enzimin uzaklaşması için 0,05 M pH 6,5 fosfat tamponu ile yıkandı ve elektrot kullanılmadığında buzdolabında +4 °C'ta saklandı.

3.5.2. PB/MWCNT-ZnONP/GCE

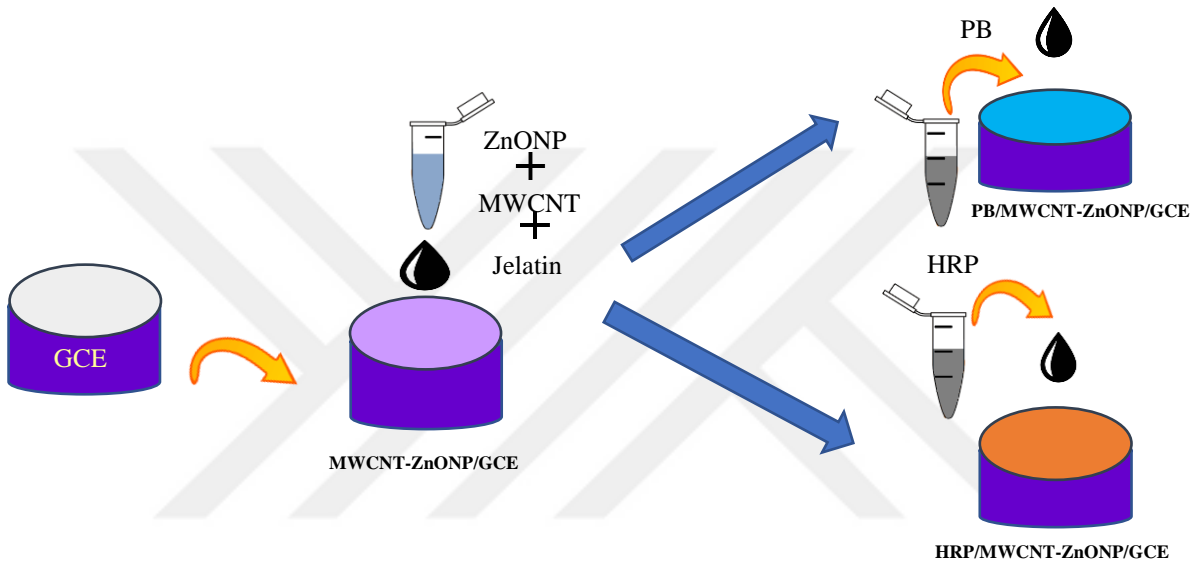
Bölüm 3.5.1'de anlatıldığı gibi hazırlanan ve 1,0 mg mL⁻¹ MWCNT ve 2,0 mg mL⁻¹ ZnONP içeren jelatin çözeltisinden 10 µL alınarak temizlenmiş GCE yüzeyine damlatıldı ve elektrot yüzeyi oda sıcaklığında kurutuldu. MWCNT ve ZnONP ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyine 10 µL PB çözeltisi damlatıldı ve oda sıcaklığında kuruması için bekletildi. Elektrot yüzeyi son olarak %0,025'lik nafyon çözeltisi ile kaplandı, oda sıcaklığında kurutuldu ve 0,05 M pH 6,5 fosfat tamponu ile yıkandı. Elektrot kullanılmadığında buzdolabında +4 °C'ta saklandı.

3.5.3. HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE

Bölüm 3.5.1'de anlatıldığı gibi hazırlanan MWCNT-ZnONP-Jelatin çözeltisinden 10 µL alındı ve temizlenmiş GCE yüzeyine damaltılarak oda sıcaklığında kuruması için beklendi. Kurutulmuş elektrot yüzeyine %5,0'lik IL çözeltisinden 3,0 µL damlatıldı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Daha sonra elektrot yüzeyine Bölüm 3.5.1'de anlatıldığı şekilde HRP enziminin immobilizasyonu gerçekleştirildi. Son olarak elektrot yüzeyi 3,0 µL %0,025'lik nafyon çözeltisi ile kaplandı ve kuruması için oda sıcaklığında bekletildi. Hazırlanan biyosensör yüzeyi 0,05 M pH 6,5 fosfat tamponu ile yıkandı ve kullanılmadığında buzdolabında +4 °C'ta saklandı.

3.5.4. IL/PB-MWCNT-ZnONP/GCE

Bölüm 3.5.2’de belirtildiği gibi hazırlanan MWCNT-ZnONP-Jelatin çözeltisinden 10 μL temizlenmiş GCE yüzeyine damlatıldı ve elektrodun oda sıcaklığında kuruması sağlandı. Sonrasında elektrot yüzeyine 10 μL PB çözeltisi damlatıldı ve kuruması için oda sıcaklığında bekletildi. Kuruyan elektrot yüzeyine %5,0 lik iyonik sıvı çözeltisinden 3,0 μL damlatılarak oda sıcaklığında kurutuldu. Daha sonra elektrot yüzeyi %0,025’lik nafyon çözeltisi ile kaplandı, oda sıcaklığında kurutuldu ve 0,05 M pH 6,5 fosfat tamponu ile yıkandı. Elektrot kullanılmadığında buzdolabında +4 $^{\circ}\text{C}$ ’ta saklandı.



Şekil 3.2. Modifiye elektrotların hazırlanma basamakları

3.6. Modifiye Elektrotların Yüzey Bileşimi Optimizasyonu

Elektrot modifikasyonunda kullanılan bileşenlerin optimum miktarlarını belirleyebilmek için her bir bileşenin miktarları belirli aralıklarda değiştirilerek Bölüm 3.5’de anlatıldığı gibi bir seri elektrot hazırlandı. Bu çalışmada bir bileşenin miktarı değiştirilirken modifikasyonda kullanılan diğer tüm bileşenlerin miktarları sabit tutuldu ve tek seferde tek değişken yöntemi ile optimizasyon gerçekleştirildi. Bu şekilde hazırlanan modifiye elektrotların H_2O_2 duyarlılıkları belirlendi ve bu duyarlılık değerlerinden yararlanılarak optimum madde miktarları belirlendi.

3.6.1. MWCNT miktarı

Optimum MWCNT miktarını belirlemek amacı ile MWCNT-ZnONP-jelatin çözeltisi içindeki ZnONP miktarı sabit tutulurken MWCNT miktarı 0,5; 1,0; 1,5 ve 2,0 mg mL^{-1} olacak

şekilde değiştirildi ve dört tane farklı PB/MWCNT-ZnONP/GCE hazırlandı. Bu elektrotların H₂O₂ duyarlılığı kronoamperometrik yöntem ile belirlendi ve en yüksek duyarlılığın gözlemlendiği MWCNT miktarı optimum olarak seçildi.

3.6.2. ZnONP miktarı

ZnONP miktarını optimize etmek amacı ile MWCNT miktarı belirlenen optimum değerde sabit tutularak MWCNT-ZnONP-jelatin çözeltisi içindeki ZnONP miktarı 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 ve 3,0 mg mL⁻¹ olacak şekilde değiştirildi ve altı tane farklı PB/MWCNT-ZnONP/GCE hazırlandı. Bu elektrotların H₂O₂ duyarlılığı kronoamperometrik yöntem ile belirlendi ve en yüksek duyarlılığın gözlemlendiği ZnONP miktarı optimum olarak seçildi.

3.6.3. PB miktarı

Elektrot yüzeyindeki PB miktarını optimize etmek amacı ile MWCNT ve ZnONP miktarları belirlenen optimum değerde sabit tutuldu ve PB miktarı 5,0, 10,0, 15,0 ve 20,0 mg mL⁻¹ olacak şekilde değiştirilerek dört farklı PB/MWCNT-ZnONP/GCE hazırlandı. Bu elektrotlardan en yüksek H₂O₂ duyarlılığının gözlemlendiği Prusya mavisi miktarı optimum olarak belirlendi.

3.6.4. HRP miktarı

HRP/MWCNT-ZnONP/GCE yüzeyine immobilize edilen HRP miktarı 12,6; 18,9; 25,3; 31,6 ve 37,9 U olacak şekilde değiştirilerek Bölüm 3.5.1’de anlatıldığı şekilde enzim elektrotlar hazırlandı. Hazırlanan her bir elektrodun -0,10 V’da H₂O₂ duyarlılığı belirlendi ve en yüksek duyarlılığın gözlemlendiği HRP miktarı optimumum enzim miktarı olarak belirlendi.

3.6.5. IL miktarı

PB/MWCNT-ZnONP/GCE bileşimindeki IL miktarını optimize etmek amacıyla Bölüm 3.5.2’de anlatıldığı gibi hazırlanan IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE bileşimindeki %5,0’lik IL çözeltisi miktarı 3,0 µL, 5,0 µL, 10,0 µL olacak şekilde değiştirilerek üç farklı IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE hazırlandı. Bu elektrotlardan en yüksek H₂O₂ duyarlılığının elde edildiği IL hacmi optimum olarak belirlendi.

3.7. Modifiye Elektrotların Yüzey Morfolojisinin Belirlenmesi

Elektrot modifikasyonunda kullanılan her bir bileşenin yüzey morfolojisini nasıl etkilediği taramalı elektron mikroskobu (SEM) tekniği kullanılarak incelendi. Görüntülerin elde edilmesinde Evo serisi Carl Zeiss marka elektron mikroskobu kullanıldı.

3.8. Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi

Bölüm 3.5’de anlatıldığı gibi hazırlanan modifiye elektrotların elektrokimyasal davranışlarının belirlenmesi çalışmaları aşağıda anlatıldığı biçimde yapıldı.

3.8.1. Dönüşümlü voltametri

Her bir elektrodun dönüşümlü voltamogramları 0,10 KCl içeren 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks probunda 100 mVs^{-1} tarama hızında kaydedildi ve elde edilen voltamogramlar grafiğe geçirilerek elde edilen akımlardan yararlanılarak modifikasyon malzemelerinin elektrokimyasal davranış üzerine etkisi incelendi.

3.9. Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

3.9.1. Çalışma potansiyeli

En uygun çalışma potansiyelinin belirlenmesi için, PB/MWCNT-ZnONP/GCE 10 mL pH’sı 6,5 olan 0,05 M fosfat tamponunda dengeye getirildikten sonra çözeltiye stok H_2O_2 çözeltisinden belli miktarlarda ilave yapılarak modifiye elektrotların H_2O_2 duyarlılığı CA yöntemi (-0,10) – (+0,10) V aralığında değişen çeşitli potansiyellerde belirlendi ve en yüksek duyarlılığın gözlemlendiği potansiyel optimum çalışma potansiyeli olarak seçildi.

3.9.2. Tampon pH’sı

HRP/MWCNT-ZnONP/GCE cevabına tampon pH’sının etkisini belirlemek amacıyla 0,05 M fosfat tamponunun pH’sı 5,0-9,0 aralığında 0,5 pH birimi değiştirilerek bir seri fosfat tamponu hazırlandı. Modifiye elektrotun farklı pH’larda H_2O_2 cevabı belirlenerek en yüksek duyarlılığın gözlemlendiği pH optimum olarak seçildi.

3.10. Performans Faktörlerinin Belirlenmesi

3.10.1. Doğrusal çalışma aralığı ve duyarlılık

Bölüm 3.5’de anlatıldığı gibi optimum bileşimde hazırlanan modifiye elektrotların doğrusal çalışma aralığının belirlenmesi amacıyla, elektrokimyasal hücreye 10 mL pH’sı 6,5 olan 0,05 M fosfat tamponu ilave edildi. Elektrotların belirli potansiyelde bekletilerek kararlı hale gelmesi sağlandı ve denge akımı kaydedildi. Çözeltiye stok H₂O₂ çözeltisinden belli miktarlarda ilave yapılarak kronoamperometrik akım-zaman (*i-t*) grafikleri çizildi. Her bir ilaveden sonra elde edilen akımdan denge akımının çıkarılması ile hesaplanan akım farkları H₂O₂ derişimine karşı grafiğe geçirildi. Çizilen kalibrasyon eğrilerinden doğrusal kısımlarından modifiye elektrotların doğrusal çalışma aralığı ve eğiminden de elektrotların duyarlılıkları belirlendi.

3.10.2. Gözlenebilme sınırı ve alt tayin sınırı

Gözlenebilme sınırını (LOD) ve alt tayin sınırını (LOQ) belirlemek için, optimum çalışma şartlarında, doğrusal çalışma aralığının en alt noktasındaki H₂O₂ derişiminin akım cevabı on kez ölçülüp ölçüm sonuçlarının standart sapması (*s*) hesaplandı. Elektrot ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin eğimi (*m*) (elektrot duyarlılığı) ve bu standart sapma yardımıyla $LOD=3s/m$ ve $LOQ=10s/m$ eşitlikleri ile gözlenebilme ve alt tayin sınırı hesaplandı.

3.10.3. Cevap süresi

Hazırlanan modifiye elektrotların cevap süresi, kronoamperometrik yöntemle elde edilen *i-t* grafikleri yardımıyla belirlendi. Bu amaçla elektrot için kararlı hal akımı elde edildikten sonra elektrokimyasal hücreye H₂O₂ ilave edildi ve akım cevabının tekrar kararlı hale gelmesi için geçen süre kaydedildi. Bu sürenin %95’i hesaplandı ve cevap süresi olarak belirlendi.

3.10.4. Tekrar üretilebilirlik ve Tekrar kullanılabilirlik

Bölüm 3.5’de anlatıldığı gibi hazırlanan modifiye elektrotların tekrar üretilebilirliklerini belirlemek amacıyla, aynı şekilde 3 tane farklı elektrot hazırlandı ve her bir elektrot ile optimum çalışma koşulları kullanılarak kalibrasyon eğrileri oluşturuldu ve bu elektrotların H₂O₂ duyarlılıkları belirlendi. Çizilen kalibrasyon eğrilerinin eğimlerinin bağlı standart sapmalarından yararlanılarak modifiye elektrotların tekrar üretilebilirlikleri incelendi.

Hazırlanan tek bir elektrot ile çok sayıda analiz yapılabilmesi enzim elektrotlar için önemli bir parametredir. Bu amaçla bölüm 3.5’de anlatıldığı gibi hazırlanan modifiye elektrotlarla optimum çalışma koşullarında aynı elektrot kullanılarak aynı gün içinde yirmi kez art arda sabit derişimde H₂O₂ eklenerek analiz yapıldı. Eklenen H₂O₂ derişimine aynı elektrotun her bir ölçümdeki akım cevapları kullanılarak bağıl standart sapma hesaplandı ve modifiye elektrotların tekrar kullanılabilirlikleri incelendi.

3.10.5. Uzun dönem kararlılığı

Bölüm 3.5’de anlatıldığı gibi hazırlanan modifiye elektrotların uzun dönem kararlılığını belirlemek için, aynı tip elektrotların H₂O₂’e cevabı, sabit H₂O₂ derişiminde farklı günlerde ölçülerek elde edilen akım farkları kaydedildi. Birinci gün okunan akım farkı değeri 100 kabul edilerek ölçüm süresince modifiye elektrotların duyarlılığındaki % derişimler ve uzun dönem kararlılıkları belirlendi. Elektrotlar her ölçüm sonrasında 0,05 M pH 6,5 fosfat tamponuyla yıkandı ve ölçümler arasında buzdolabında +4 °C’ta saklandı.

3.10.6. Girişim çalışması

Belirlenen optimum çalışma şartlarında, elektrotlar tampon çözelti içinde kararlı hal akımına ulaştıktan sonra çözeltiliye önce H₂O₂ ilave edilip akım cevabı kaydedildi. Daha sonra çözeltiliye art arda elektrot cevabı üzerinde girişim etkisi olabileceği düşünölen askorbik asit, glukoz, ürik asit, üre, glutamik asit, okzalik asit ve sodyum klorür çözeltilerinden uygun miktarlarda ilave edilerek cevap akımları kaydedildi. Elektrodun H₂O₂’e verdiği cevapta bir derişim olup olmadığı görmek amacıyla en son olarak çözeltiliye başlangıçtaki H₂O₂ miktarı kadar H₂O₂ eklendi. Çizilen *i-t* grafiklerinden yararlanılarak her bir türün akım cevabına katkısı hesaplandı.

3.10.7 Gerçek numune çalışması

Modifiye elektrotların gerçek numunelerde uygulanabilirliğini göstermek için eczaneden temin edilen oksijenli su numunesinden belli bir kısım alınarak pH’sı 6,5 olan 0,05 M 10 mL fosfat tamponuna eklendi ve akım değeri ölçüldü. Elektrokimyasal hücreye art arda stok H₂O₂ çözeltilerinden eklemeler yapılarak standart katma eğrileri çizildi. Elde edilen bu eğrilerden oksijenli su numunesindeki H₂O₂ miktarı hesaplandı. Oksijenli su numunesinde beyan edilen H₂O₂ derişimi ile modifiye elektrot ile elde edilen değer karşılaştırılarak yüzde geri kazanım hesaplandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, H₂O₂ tayini için MWCNT, ZnONP ve PB veya HRP enzimi ile modifiye edilmiş GCE'lere dayanan enzimli (HRP/MWCNT-ZnONP/GCE) ve enzimsiz (PB/MWCNT-ZnONP/GCE) elektrotların hazırlanması amaçlandı. Çalışmada ayrıca, hazırlanan enzimli ve enzimsiz elektrotların bileşimine IL olarak kullanılan 1-bütül-3-metilimidazoltetrafloroborat katılarak bu maddenin elektrot performansı üzerine etkileri çalışıldı. Elektrotların hazırlanması aşamasında modifikasyonda kullanılan maddelerin miktarı optimize edilerek bu elektrotların optimum çalışma pH'sı ve çalışma potansiyeli belirlendi. Optimum bileşimde hazırlanan tüm elektrotların optimum çalışma koşulları altında analitik performansı belirlendi. Son olarak, modifiye elektrotların cevabına gerçek numunelerde yaygın bulunan türlerin etkisi incelendi ve elektrotların gerçek numunelerde H₂O₂ tayininde kullanılabilirliği gösterildi. Tüm bu çalışmalar sonucunda elde edilen veriler değerlendirilerek aşağıda ayrıntılı bir şekilde verildi.

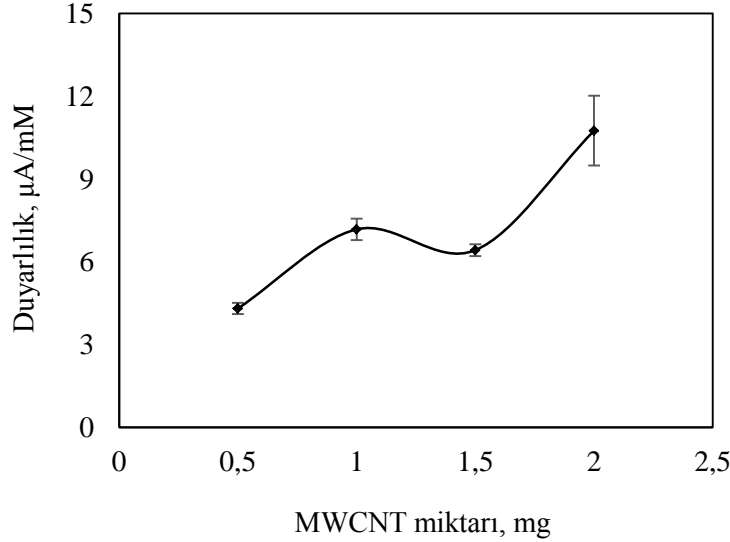
4.1. Modifiye Elektrotların Yüzey Bileşimi Optimizasyonu

Modifikasyonda kullanılan maddelerin miktarının modifiye elektrotların cevabına etkisi büyüktür. Bu nedenle modifiye elektrotlar hazırlanırken bu maddelerin miktarlarının optimize edilmesi gerekir. Bu çalışmada, (i) HRP/MWCNT-ZnONP/GCE, (ii) PB/MWCNT-ZnONP/GCE, (iii) HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE ve (iv) IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE elektrotları hazırlandığından, bu elektrot yüzeylerini modifiye etmek için kullanılan MWCNT, ZnONP, PB, HRP ve IL miktarları optimize edildi. Optimizasyon çalışmasında bir bileşenin miktarı değiştirilirken diğer bileşenlerin miktarı sabit tutuldu. Elektrot bileşimindeki her bir maddenin optimizasyon çalışmaları, elde edilen bulgular ve yapılan irdelemeler aşağıda ayrıntılı bir şekilde verildi.

4.1.1. MWCNT miktarı

Bölüm 3.5.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan PB/MWCNT-ZnONP/GCE elektrotlarda PB miktarı 10,0 mg mL⁻¹ ve ZnONP miktarı 1,0 mg mL⁻¹ olacak şekilde sabit tutularak ve MWCNT 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg mL⁻¹ şeklinde değiştirilerek dört farklı modifiye enzimsiz elektrot hazırlandı. Bu elektrotların 0,05 M pH 6,5 fosfat tamponunda ve -0,10 V'da H₂O₂ ilavelerine karşı cevapları belirlendi. MWCNT miktarının sensör cevabı üzerine etkisi Şekil 4.1'de gösterildi. Çalışmada en yüksek duyarlılık 2,0 mg mL⁻¹ MWCNT kullanılarak elde

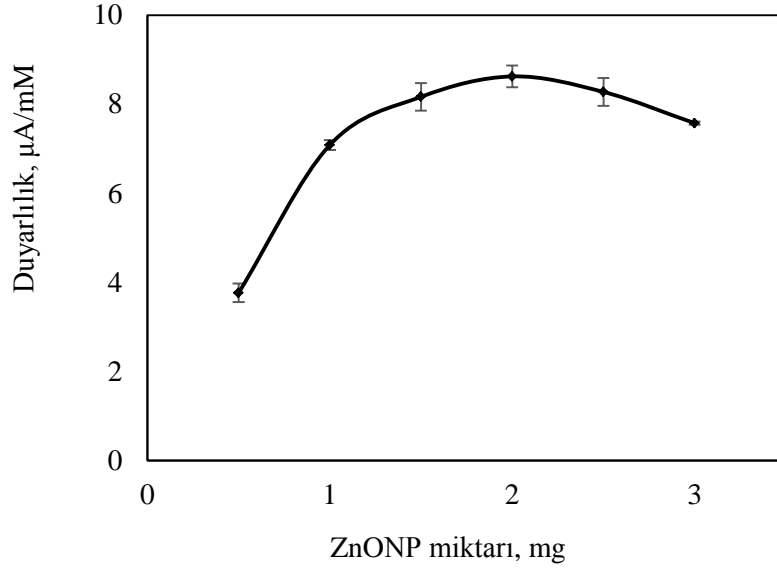
edilmesine rağmen bu elektrotlardan alınan cevapların kararsız olmasından ve en kararlı cevapların 1,0 mg mL⁻¹ MWCNT miktarı kullanıldığında elde edilmesinden dolayı optimum değer 1,0 mg mL⁻¹ olarak belirlendi.



Şekil 4.1. PB/MWCNT-ZnONP/GCE cevabı üzerine MWCNT miktarının etkisi (0,05 M, pH 6,5 fosfat tamponu, -0,10 V, oda sıcaklığı)

4.1.2. ZnONP miktarı

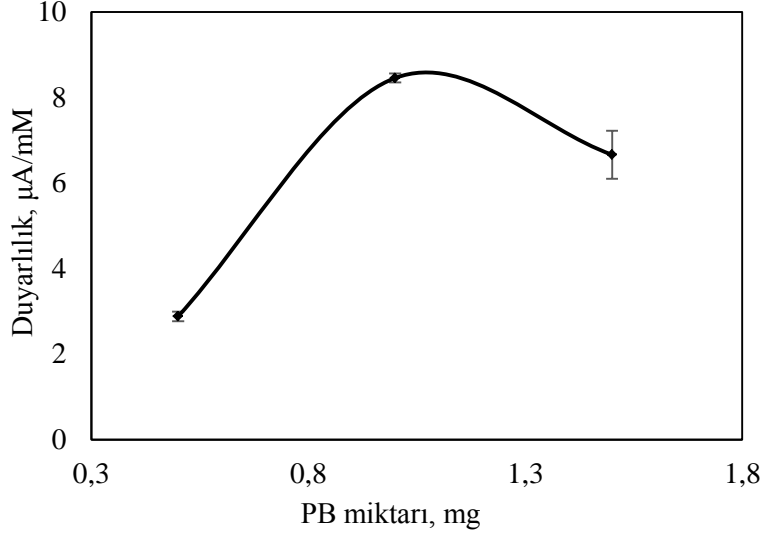
Bölüm 3.5.2’de açıklandığı gibi hazırlanan PB/MWCNT-ZnONP/GCE elektrotlarda optimum ZnONP miktarını belirlemek amacıyla Bölüm 3.6.2’de belirtildiği şekilde diğer bileşenlerin miktarları sabit tutularak ve ZnONP miktarı 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mg mL⁻¹ olacak şekilde değiştirilerek altı farklı modifiye enzimsiz elektrot hazırlandı. Hazırlanan bu elektrotların, 0,05 M pH 6,5 fosfat tamponunda ve -0,10 V potansiyel değerinde H₂O₂ ilavelerine karşı cevapları belirlendi. ZnONP miktarının sensör cevabı üzerine etkisi Şekil 4.2’de gösterildi. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek duyarlılığın gözlemlendiği 2 mg mL⁻¹ optimum ZnONP miktarı olarak belirlendi. (Şekil 4.2.). 2 mg mL⁻¹’den daha yüksek ZnONP miktarlarında duyarlılıkta gözlenen düşüş artan nanopartikül miktarı ile kalınlaşan elektrot yüzeyinden substratın difüzyonunun zorlaşmasından kaynaklanabilir [34].



Şekil 4.2. PB/MWCNT-ZnONP/GCE cevabı üzerine ZnONP miktarının etkisi (0,05 M, pH 6,5 fosfat taponu, -0,10 V, oda sıcaklığı)

4.1.3. PB miktarı

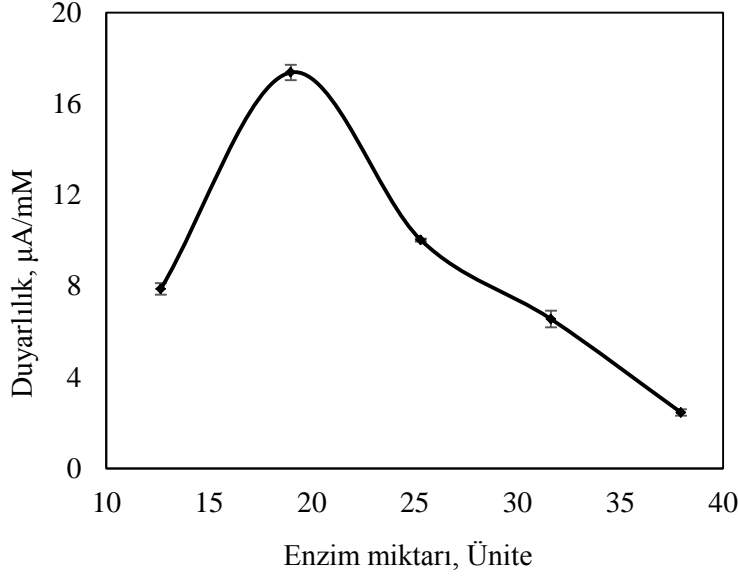
PB miktarının enzimsiz elektrodun duyarlılığına etkisini incelemek için bölüm 3.6.3 de belirtildiği gibi elektrot yüzeyinde bulunan diğer bileşenlerin miktarı optimum değerlerde sabit tutulurken PB miktarı 5; 10; 15; 20 mg mL⁻¹ olacak şekilde değiştirilerek Bölüm 3.5.2'de belirtildiği gibi dört farklı enzimsiz elektrot hazırlandı. 0,05 M pH 6,5 fosfat tamponunda sabit potansiyelde bekletilen enzimsiz elektrotlar için kararlı hal akımı elde edildikten sonra 0,010 M stok H₂O₂ çözeltisinden elektrokimyasal hücreye uygun hacimlerde ilaveler yapılarak akım cevapları ölçüldü ve kalibrasyon grafikleri oluşturuldu. Elde edilen kalibrasyon grafiklerinden her bir elektrot için H₂O₂ duyarlılıkları elde edildi ve bu duyarlılıklar PB miktarına karşı grafiğe geçirildi. En yüksek duyarlılığın elde edildiği 10 mg mL⁻¹ optimum PB miktarı olarak belirlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. PB/MWCNT-ZnONP/GCE cevabı üzerine PB miktarının etkisi (0,05 M, pH 6,5 fosfat tamponu, -0,10 V, oda sıcaklığı)

4.1.4. HRP miktarı

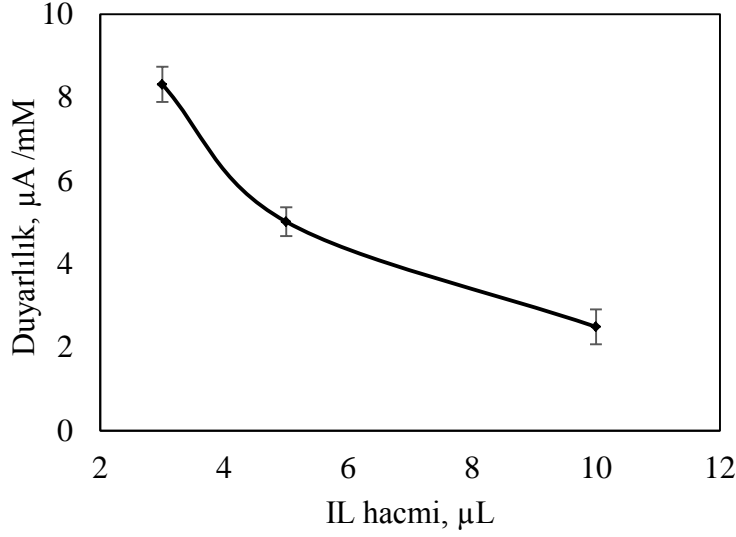
Bölüm 3.5.1’de belirtildiği gibi hazırlanan enzim elektrot yüzeyine immobilize edilen enzim miktarının elektrot duyarlılığına etkisini incelemek için, Bölüm 3.6.4’de anlatıldığı gibi diğer bileşenler belirlenen optimum değerlerde sabit tutularak 12,6; 18,9; 25,3; 31,6 ve 37,9 U HRP içeren enzim elektrotlar hazırlandı ve her bir elektrot 0,05 M pH 6,5 fosfat tamponu içerisinde -0,10 V potansiyelde kararlı hal akımları elde edilene kadar bekletildi. H_2O_2 ’nin 0,010 M’lik stok çözeltisinden belirli hacimler hücreye ilave edilerek, elde edilen amperometrik cevaplar kaydedildi. Derişim değerlerine karşı bulunan akım değerleri grafiğe geçirilerek elde edilen kalibrasyon grafiklerinin eğimleri karşılaştırıldı. HRP miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi Şekil 4.4’de verildi. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek duyarlılık 18,9 U HRP immobilize edilen biyosensör ile elde edildi ve bu miktar optimum enzim miktarı olarak seçildi. Şekil incelendiğinde 18,9 U’den fazla enzim miktarlarında duyarlılıkta önemli bir düşüş olduğu görüldü; enzimler protein yapılı makromoleküller olduğundan elektrot yüzeyinde çok fazla miktarda bulunması durumunda bariyer etkisi yaparak H_2O_2 ’in elektrot yüzeyine ulaşmasını güçleştireceği için elektrot cevabı üzerinde olumsuz etki yapabileceği ve düşüşün bundan kaynaklanabileceği düşünüldü. Literatür incelendiğinde yüksek miktarlarda enzim immobilizasyonu sonucu benzer davranışın gözlemlendiği çalışmalar mevcuttur [34, 71, 72].



Şekil 4.4. HRP/MWCNT-ZnONP/GCE cevabı üzerine HRP miktarının etkisi (0,05 M, pH 6,5 fosfat tamponu, -0,10 V, oda sıcaklığı)

4.1.5. IL miktarı

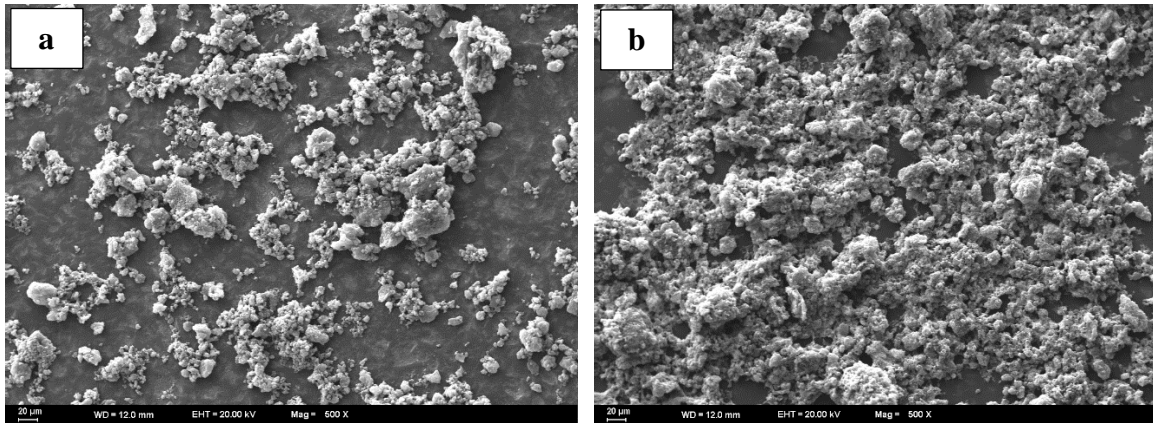
Bölüm 3.5.2’de belirtildiği gibi hazırlanan PB/MWCNT-ZnONP/GCE’un cevabı üzerine IL miktarının etkisini belirlemek için Bölüm 3.6.5’de belirtildiği gibi IL’in %5,0’lik çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan IL çözeltisinden 3,0 µL, 5,0 µL ve 10 µL elektrot bileşimine katılarak IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE hazırlandı. 0,05 M pH 6,5 fosfat tamponunda sabit potansiyelde bekletilen elektrotlar için kararlı hal akımı elde edildikten sonra 0,01 M stok H₂O₂ çözeltisinden elektrokimyasal hücreye uygun hacimlerde ilaveler yapılarak akım cevapları ölçüldü ve kalibrasyon grafikleri oluşturuldu. Elde edilen kalibrasyon grafiklerinden her bir elektrot için H₂O₂ duyarlılıkları belirlendi ve bu duyarlılıklar IL miktarına karşı grafiğe geçirildi. Çalışmada en yüksek duyarlılığın elde edildiği 3 µL optimum IL hacmi olarak belirlendi. (Şekil 4.5).



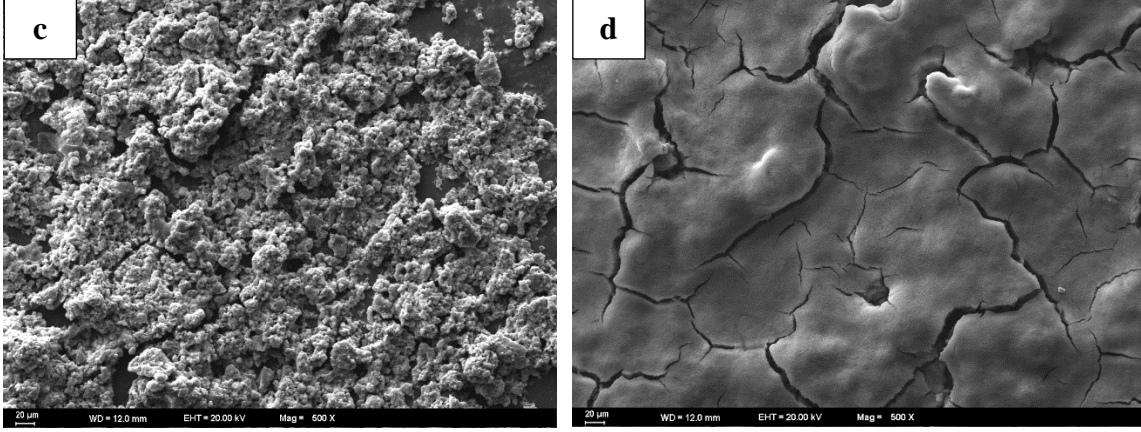
Şekil 4.5. IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE cevabı üzerine IL miktarının etkisi (0,05 M, pH 6,5, -0,10 V, oda sıcaklığı)

4.2. Taramalı Elektron Mikroskobu Çalışması

Modifikasyonda kullanılan maddelerin yüzey morfolojisini nasıl etkilediğini göstermek amacıyla, (a) MWCNT/GCE, (b) MWCNT-ZnONP/GCE, (c) HRP/MWCNT-ZnONP/GCE ve (d) PB/MWCNT-ZnONP/GCE elektrotlarının SEM görüntüleri çekildi ve Şekil 4.6'da verildi. SEM görüntüleri incelendiğinde her bir yüzey modifikasyonu sonrasında yüzey morfolojisinin değiştiği ve Şekil 4.6 görüntü c'de elde edilen gözenekli yapının enzim immobilizasyonu için son derece uygun bir ortam sağladığı sonucuna varıldı.



Şekil 4.6. (a) MWCNT/GCE, (b) MWCNT-ZnONP/GCE, (c) HRP/MWCNT-ZnONP/GCE ve (d) PB/MWCNT-ZnONP/GCE elektrotlarının SEM görüntüleri



Şekil 4.6. (devam)

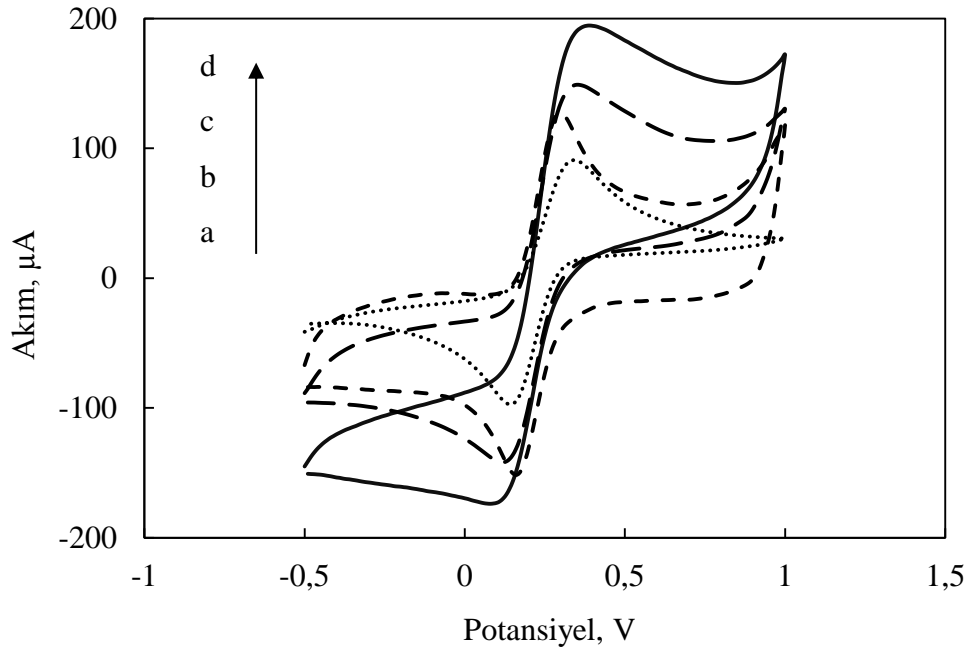
4.3. Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal Karakterizasyonu

H_2O_2 in amperometrik tayini için enzimli ve enzimsiz elektrot hazırlanmasında, GCE yüzeyinin modifikasyonunda kullanılan MWCNT, ZnONP, PB, HRP ve IL'in ayrı ayrı ve bir arada iken gösterdikleri elektrokimyasal davranışları belirlemek amacıyla, her bir elektrodun redoks probunda kaydedilen dönüşümlü voltamogramlarından yararlanıldı. Elde edilen sonuçlar ve yorumları aşağıda verildi.

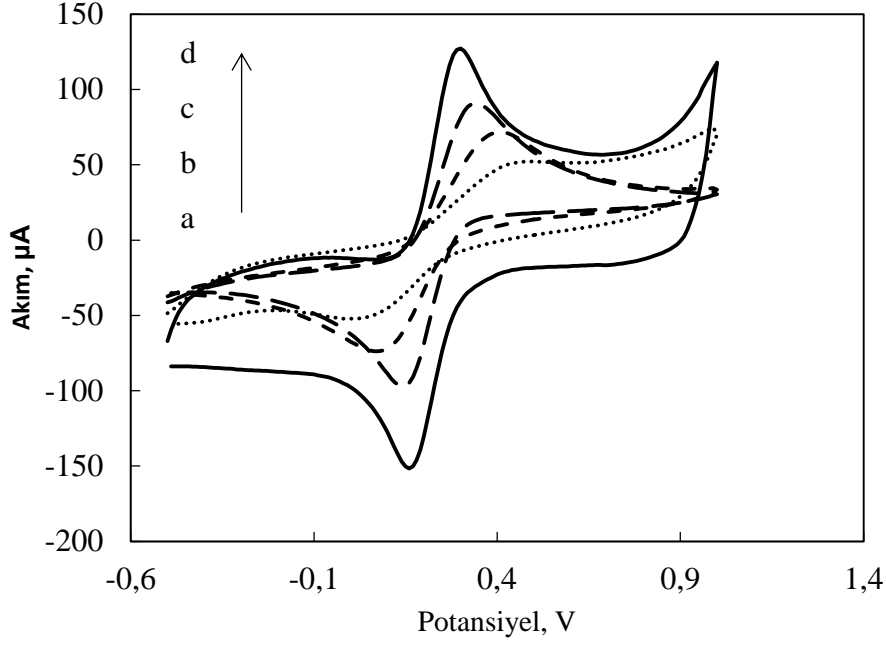
4.3.1. Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

GCE ile optimum MWCNT, ZnONP, PB, HRP ve IL miktarları ile hazırlanmış olan PB/MWCNT-ZnONP/GCE, IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE, HRP/MWCNT-ZnONP/GCE ve HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE'lerin dönüşümlü voltamogramları 100 mV s^{-1} tarama hızında $0,10 \text{ M KCl}$ içeren $5,0 \text{ mM Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ redoks probunda kaydedildi ve Şekil 4.7 - 4.8'de verildi. Şekil 4.7 incelendiğinde, MWCNT-ZnONP, PB/MWCNT-ZnONP ve IL/PB/MWCNT-ZnONP ile modifiye edilmiş GCE'lerin pik akımları modifiye edilmemiş GCE'nin pik akımından oldukça büyük olduğu görüldü. Pik akımının bu şekilde arttırması, elektrodun yüzey alanının ve iletkenliğinin dolayısıyla elektron aktarım hızının arttırmasından kaynaklandığını düşündürdü. Ayrıca, IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE ile elde edilen voltamogramdaki pik akımının sade GCE'nin voltamogramı ile elde edilen akımı ile karşılaştırıldığında görülen belirgin artış söz konusu malzemeler bir arada olduğunda ortaya çıkan sinerjik etkiden kaynaklandığı şeklinde yorumlanabilir. Bu sonuçlara göre MWCNT-ZnONP, PB ve IL'nin enzimli ve enzimsiz elektrotların hazırlanmasında ayrı ayrı iyi birer modifikasyon malzemesi olduğu sonucuna varıldı.

Şekil 4.8 incelendiğinde MWCNT-ZnO/GCE'nin üzerine bölüm 3.5.1'de belirtildiği şekilde enzim immobilize edildiği zaman elde edilen voltamogramlarda akımın oldukça düştüğü görüldü. Bu durumun enzimin elektrot yüzeyini bariyer görevi görerek kapatmasından ve elektron aktarımını yavaşlatmasından kaynaklandığı düşünüldü. Enzimin üzerine IL ilavesi ile pik akımının fark edilir şekilde arttığı görüldü. Bu da IL'nin elektrot yüzeyinde iletkenliği artırarak elektron transferini hızlandırdığının bir göstergesidir. Bu sonuç, IL'nin enzimli elektrotlar için de uygun bir modifikasyon malzemesi olduğunu düşündürdü.



Şekil 4.7. Dönüşümlü voltamogramlar: (a) GCE, (b) MWCNT-ZnONP/GCE (c) PB/MWCNT-ZnONP/GCE ve (d) IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE (0,10 M KCl içeren 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks probunda, 100 mV s^{-1})



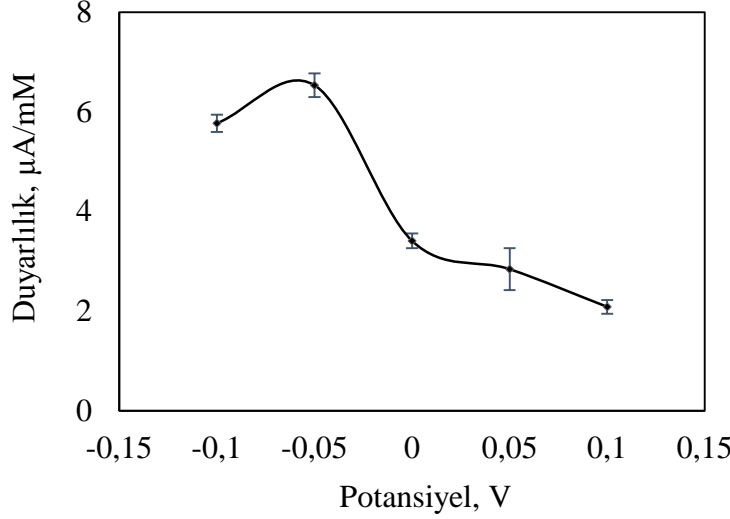
Şekil 4.8. Dönüşümlü voltamogramlar: (a) HRP/MWCNT-ZnONP/GCE, (b) HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE (c) GCE ve (d) MWCNT-ZnONP/GCE (0,10 M KCl içeren 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks probunda, 100 mV s^{-1})

4.4. Modifiye Elektrotların Optimum Çalışma Koşulları

Tampon pH'sı ve çalışma potansiyeli elektrokimyasal elektrotların analitik performanslarına etki eden en önemli faktörlerdendir. Çalışmada bu iki faktörün optimizasyonu aşağıda anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

4.4.1. Çalışma potansiyeli

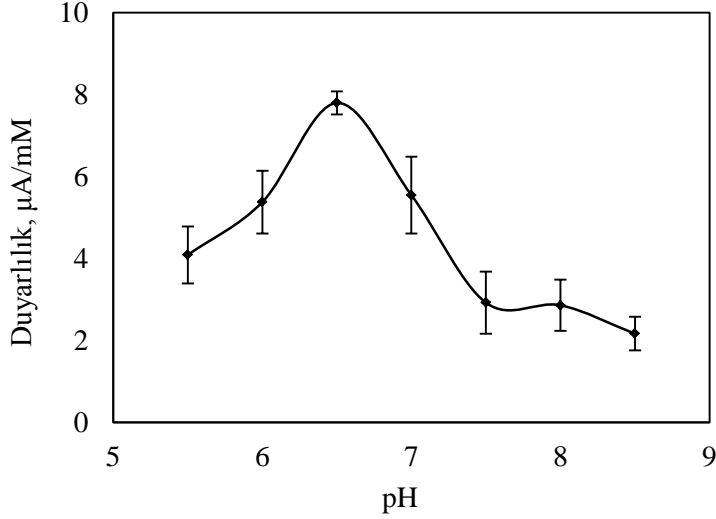
Bölüm 3.5.2'de belirtildiği gibi hazırlanan PB/MWCNT-ZnONP/GCE elektrodun optimum çalışma potansiyelinin belirlenmesi için Bölüm 3.9.1'de anlatıldığı gibi elektrodun 0,05 M pH 6,5 fosfat tampon çözeltisinde -0,10 V; -0,05 V; 0,0 V; 0,05 V ve 0,10 V potansiyel değerlerinde $9,9 \times 10^{-5}$ – $1,0 \times 10^{-3}$ M derişim aralığında altı farklı derişimde H_2O_2 ilavesi yapılarak kalibrasyon eğrileri çizildi. Bu kalibrasyon eğrilerinden elde edilen duyarlılıklar potansiyel değerlerine karşı grafiğe geçirildi ve Şekil 4.9'de verildi. Şekil incelendiğinde en yüksek duyarlılığın -0,05 V potansiyel değerinde elde edildiği görüldü. Ancak, bu potansiyel değerinde yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçların kararlı olmamasından dolayı kararlı sonuçların ve yüksek bir duyarlılığın elde edildiği -0,10 V değeri çalışma potansiyel olarak seçildi.



Şekil 4.9. PB/MWCNT-ZnONP/GCE'un cevabı üzerine çalışma potansiyelinin etkisi (0,05 M, pH 6,5 fosfat tamponu, -0,10 V, oda sıcaklığı)

4.4.2. pH

Tampon pH'sının HRP/MWCNT-ZnONP/GCE'nin amperometrik cevap üzerine etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3.5.1'de belirtildiği gibi hazırlanan elektrot Bölüm 3.9.2'de belirtildiği gibi farklı pH değerlerinde hazırlanan 0,05 M fosfat tamponları içinde Ag/AgCl'e karşı -0,10 V potansiyelde kararlı hal akımı elde edilene kadar bekletildi. Elektrokimyasal hücreye 0,01 M stok H₂O₂ çözeltisinden belirli hacimlerde eklemeler yapılarak, amperometrik cevaplar kaydedildi. Elde edilen akım cevapları derişime karşı grafiğe geçirilerek çizilen kalibrasyon grafiklerinin duyarlılıkları pH değerlerine karşı grafiğe geçirilerek Şekil 4.10'da verildi. Şekilde de görüldüğü gibi en yüksek duyarlılığın elde edildiği pH 6,5 değeri optimum pH değeri olarak belirlendi. Literatürde HRP temelli H₂O₂ biyosensörleri için yapılan bazı çalışmalarda optimum bulunan pH değerleri çalışmamızda elde edilen değer ile uyum içindedir [73-76]. Ayrıca, serbest HRP'nin optimum pH değeri olarak rapor edilmiş olan pH 7,0 değeri ile karşılaştırıldığında yapılan modifikasyonun enzimin optimum pH değeri üzerinde çok büyük bir etkisi olmadığı görülmüştür [34].



Şekil 4.10. HRP/MWCNT-ZnONP/GCE cevabı üzerine pH'nın etkisi (0,05 M, pH 6,5 fosfat tamponu, -0,10 V, oda sıcaklığı)

4.5. Elektrotların Performans Faktörleri

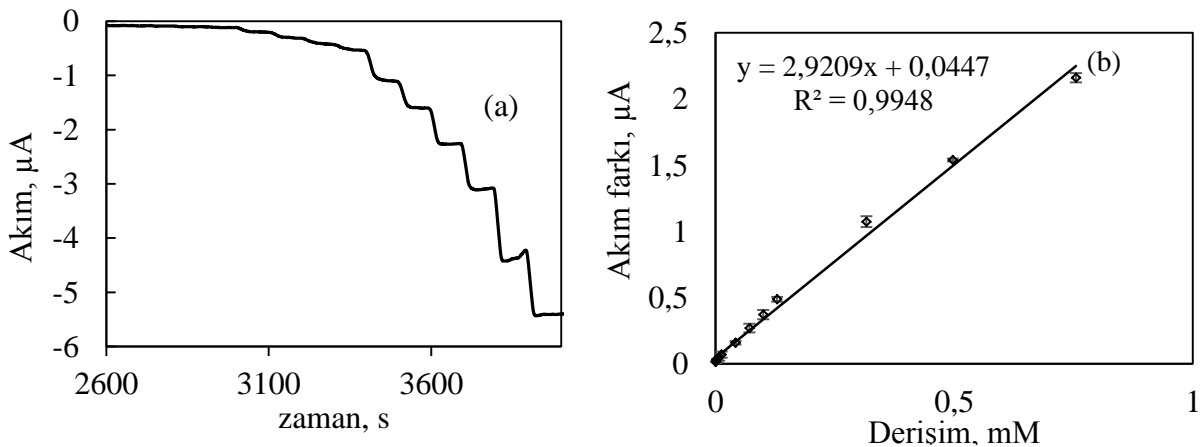
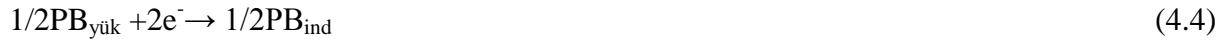
Optimum bileşimi ve çalışma koşulları belirlenen PB/MWCNT-ZnONP/GCE ve HRP/MWCNT-ZnONP/GCE elektrotların analitik performans faktörleri incelendi ve sonuçları ile ilgili yorumları aşağıda verildi. Çalışmada ayrıca, iyonik sıvının elektrot performansına etkisi incelemek amacı ile Bölüm 3.5.3 ve bölüm 3.5.4'de belirtildiği gibi hazırlanan IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE ve IL/HRP/MWCNT-ZnONP/GCE elektrotların performans faktörleri de iyonik sıvı içermeyen enzimli ve enzimsiz elektrotlar için belirlenen optimum koşullarda araştırıldı ve bulunan sonuçlar aşağıda verildi.

4.5.1. Doğrusal çalışma aralığı ve duyarlılık

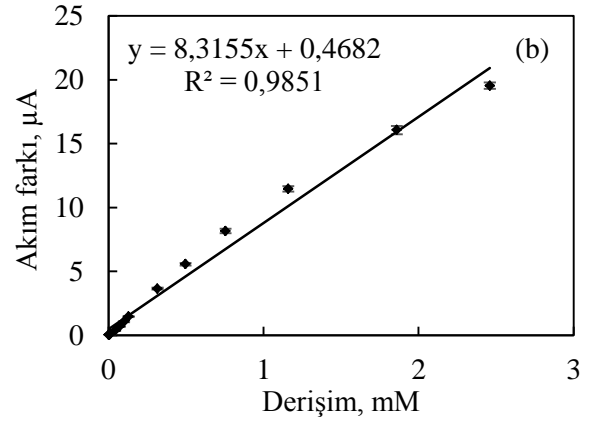
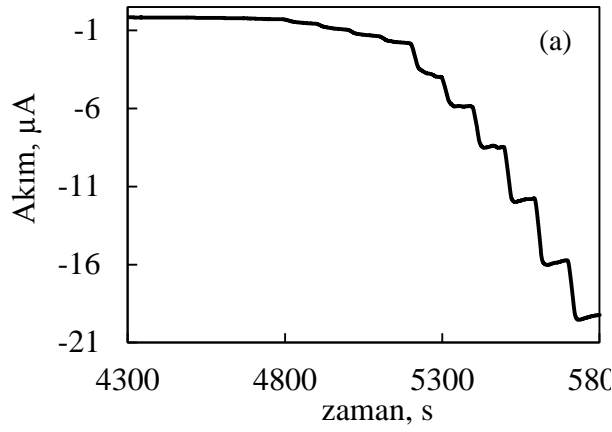
Çalışmada hazırlanan dört farklı modifiye elektrodun (PB/MWCNT-ZnONP/GCE, HRP/MWCNT-ZnONP/GCE, IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE ve IL/HRP/MWCNT-ZnONP/GCE) H_2O_2 cevabı, Bölüm 3.10'da açıklandığı gibi belirlendi. Bu amaçla, kronoamperometrik yöntem ile art arda yapılan H_2O_2 eklemelerinden sonra akım cevapları ölçüldü ve *i-t* grafikleri elde edildi. Her bir ilaveden sonra elde edilen akım farkları derişime karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.11-Şekil 4.14). Akım farkı derişim grafiklerinden yararlanılarak her bir modifiye elektrota ait doğrusal çalışma aralığı ve duyarlık değerleri belirlendi. Yapılan çalışmalar sonrasında PB/MWCNT-ZnONP/GCE için doğrusal çalışma aralığı $4,84 \times 10^{-6} - 7,55 \times 10^{-4}$ M; IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE için $1,88 \times 10^{-6} - 2,46 \times 10^{-3}$ M; HRP/MWCNT-ZnONP/GCE için $9,99 \times 10^{-8} - 1,29 \times 10^{-4}$ M; HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE

için $9,99 \times 10^{-8} - 7,55 \times 10^{-4}$ M olarak belirlendi. Elde edilen doğrusal çalışma aralıkları incelendiğinde, IL'nin PB veya HRP ile modifiye edilmiş elektrotların çalışma aralığını genişlettiği gözlemlendi. Ayrıca, HRP temelli biyosensörün çalışma aralığının PB temelli sensör ile kıyaslandığında daha geniş olduğu da bulundu. PB/MWCNT-ZnONP/GCE, IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE, HRP/MWCNT-ZnONP/GCE ve HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE için duyarlılıklar sırasıyla 2,92; 8,31; 13,93 ve 17,15 $\mu\text{A mM}^{-1}$ olarak belirlendi. Bu duyarlılık değerleri incelendiğinde hem enzimli hem de enzimsiz elektrotların duyarlılıklarının iyonik sıvı varlığında arttığı gözlemlendi. Bu durumun IL'nin yüksek iletkenliğinden kaynaklandığı düşünüldü.

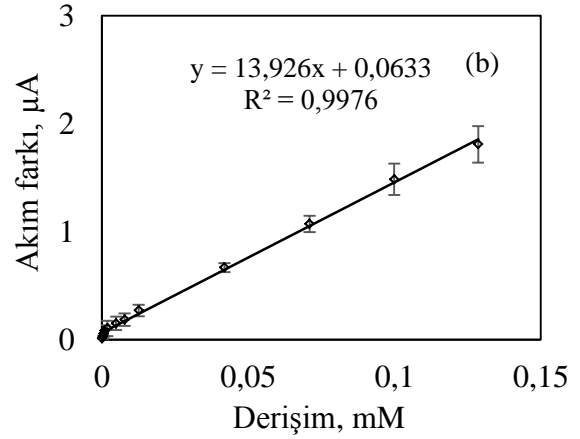
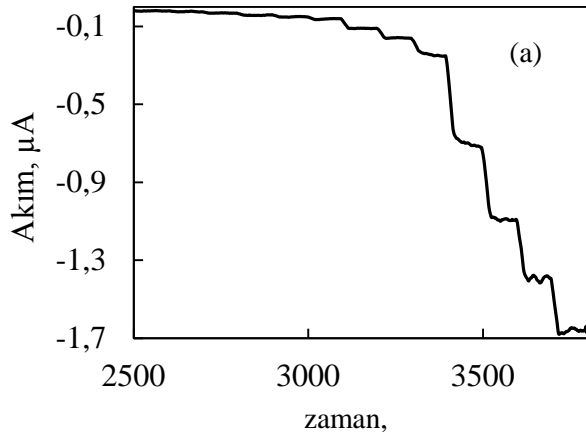
Çalışmada hazırlanan enzim elektrodun cevap mekanizması Eşitlik 4.1 ve 4.2'de verildi. Bu eşitliklere göre HRP enzimi H_2O_2 'in indirgenmesini katalizlemekte ve elektrot yüzeyinde tekrar indirgenmektedir. PB ile modifiye edilmiş elektrodun cevap mekanizması ise Eşitlik 4.3 ve 4.4'de verildi. Bu durumda PB'nin H_2O_2 'in indirgenmesi için yapay bir peroksidaz olarak görev yaptığı düşünüldü.



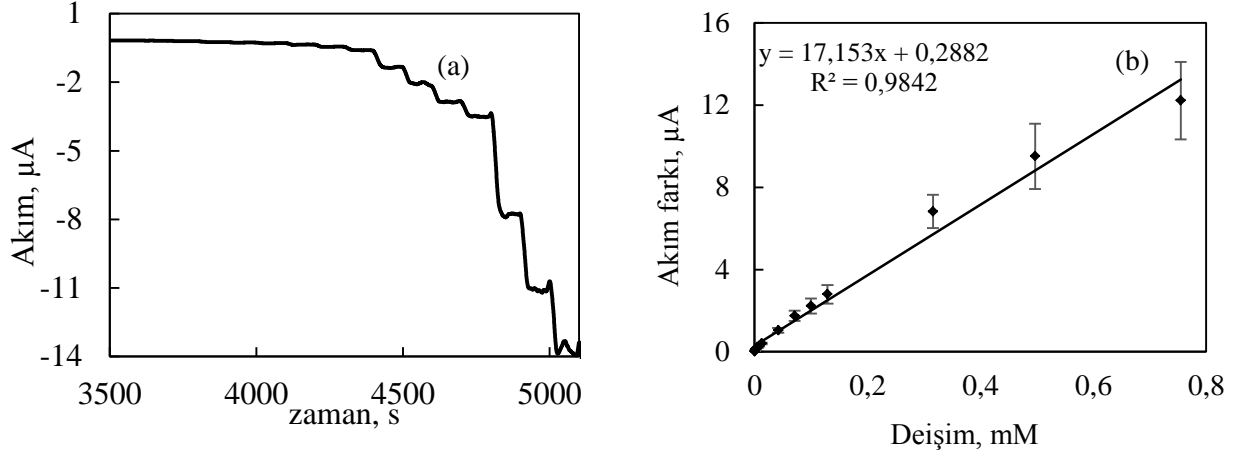
Şekil 4.11. PB/MWCNT-ZnONP/GCE'nin H_2O_2 derişimine cevabı (a) Akım–zaman grafiği, (b) Akım farkı–derişim grafiği ($N=3$) ve (0,05 M pH 6,5 fosfat tamponu, -0,10 V, oda sıcaklığı)



Şekil 4.12. IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE'nin H_2O_2 derişimine cevabı (a) Akım–zaman grafiği, (b) Akım farkı–derişim grafiği ($N=3$) ve (0,05 M pH 6,5 fosfat tamponu, -0,10 V, oda sıcaklığı)



Şekil 4.13. HRP/MWCNT-ZnONP/GCE'nin H_2O_2 derişimine cevabı (a) Akım–zaman grafiği, (b) Akım farkı–derişim grafiği ($N=3$) ve (0,05 M pH 6,5 fosfat tamponu, -0,10 V, oda sıcaklığı)



Şekil 4.14. HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE'nin H_2O_2 derişimine cevabı (a) Akım–zaman grafiği, (b) Akım farkı–derişim grafiği ($N=3$) ve (0,05 M pH 6,5 fosfat tamponu, -0,10 V, oda sıcaklığı)

4.5.2. Gözlenebilme ve alt tayin sınırı

Çalışmada hazırlanan dört farklı modifiye elektrodun gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) değerleri optimum çalışma koşullarında, Bölüm 3.10.2'de anlatıldığı gibi, belirlendi. Bu amaçla, her bir elektrot ile elde edilen kalibrasyon grafiklerinin en alt noktasındaki H_2O_2 derişiminde (PB/MWCNT-ZnONP/GCE için $4,86 \times 10^{-6}$ M; IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE için $1,88 \times 10^{-6}$ M; HRP/MWCNT-ZnONP/GCE ve HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE için $9,99 \times 10^{-8}$ M) 10 kez art arda ölçüm yapılması sonucu elde edilen akım farkı değerlerinin standart sapması (s) hesaplandı ve kalibrasyon grafiğinden bulunan eğimden (m) yararlanılarak $3s/m$ kriterinden de LOD; $10s/m$ kriterinden LOQ hesaplandı [77-78]. Yapılan çalışmalar sonrasında LOD ve LOQ değerleri sırasıyla PB/MWCNT-ZnONP/GCE için $2,02 \times 10^{-7}$ M, $6,74 \times 10^{-7}$ M IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE için $1,50 \times 10^{-7}$ M, $5,01 \times 10^{-7}$ M, HRP/MWCNT-ZnONP/GCE için $2,72 \times 10^{-8}$ M; $9,08 \times 10^{-8}$ M ve HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE için $1,37 \times 10^{-8}$ M; $4,60 \times 10^{-8}$ M olarak belirlendi. Elde edilen gözlenebilme sınırları karşılaştırıldığında en düşük gözlenebilme sınırının HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE ile elde edildiği ve iyonik sıvı varlığının modifiye elektrodun gözlenebilme sınırının düşürülmesine olumlu etki yaptığı gözlemlendi.

4.5.3. Cevap süresi

Amperometrik çalışmalarda, modifiye elektrotlar için cevap süresi oldukça önemlidir ve ideal bir elektrodun kısa sürede analizi yapılacak maddeye cevap vermesi istenir. Cevap

süresinin belirlenmesi için, Bölüm 3.10.3'te anlatıldığı gibi, çalışmada kullanılan PB/MWCNT-ZnONP/GCE; IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE, HRP/MWCNT-ZnONP/GCE ve HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE elektrotlara ait kalibrasyon eğrilerinin oluşturulmasında kullanılan $i-t$ grafiklerinden yararlanıldı. Çözeltiye yapılan her H_2O_2 ilavesinden sonra her bir elektrodun kararlı hal akımına ulaşılması için gerekli süre ölçüldü ve bu sürenin %95'ine ulaşıldığındaki değerden cevap süresinin ortalama olarak 30 s'den küçük olduğu bulundu.

Literatürde H_2O_2 'nin amperometrik tayini için geliştirilen elektrotlar için 30 saniyeden az olmak üzere farklı cevap süreleri rapor edilen çalışmalar [79-82] vardır. Bu değerler ile karşılaştırıldığında, çalışmamızda elde edilen cevap süresinin pek çok çalışmada belirtilen cevap süreleri ile kıyaslanabilir olduğu görüldü.

4.5.4. Tekrar üretilebilirlik ve Tekrar kullanılabilirlik

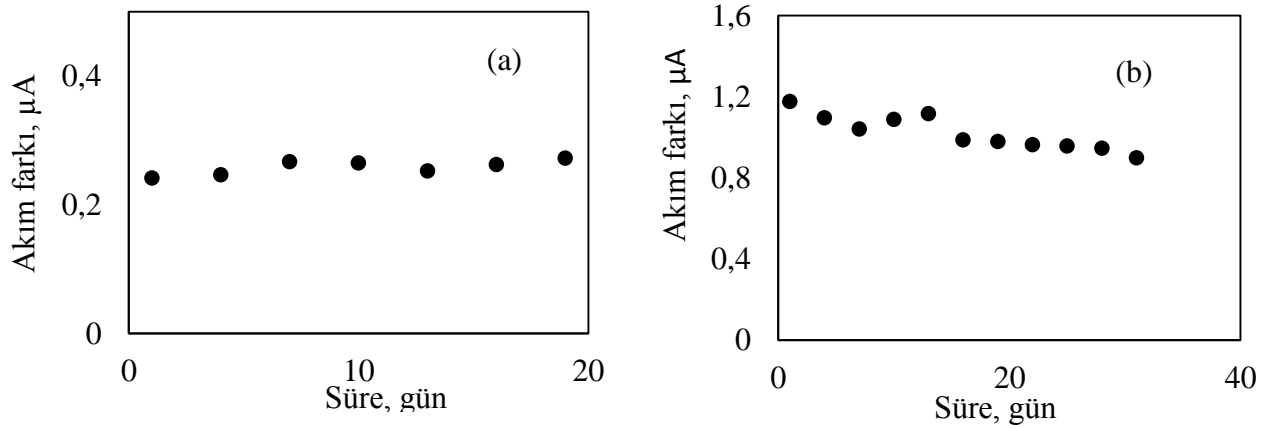
Bölüm 3.5'de anlatıldığı gibi hazırlanan elektrotların rutin analizlerde kullanılabilme durumu düşünülerek PB/MWCNT-ZnONP/GCE; IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE, HRP/MWCNT-ZnONP/GCE ve HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE'lerin her birinden optimum bileşimde üçer elektrot aynı yolla hazırlandı ve Bölüm 3.10.5'da anlatıldığı gibi, her bir elektrotun H_2O_2 cevabı ölçüldü. Elde edilen akım farkları kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrilerinin duyarlıklarından hesaplanan yüzde bağıl standart sapma (%BSS) değerleri sırasıyla %5,77; %5,68; %6,42 ve %8,50 olarak bulundu. Bu sonuçlar çalışmada hazırlanan elektrotların tekrar üretilebilirliğinin kabul edilebilir seviyede olduğunu gösterdi.

Bölüm 3.5'de anlatıldığı gibi optimum şartlarda PB/MWCNT-ZnONP/GCE; IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE, HRP/MWCNT-ZnONP/GCE ve HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE hazırlandı ve Bölüm 3.10.5'da anlatıldığı gibi aynı gün içerisinde aynı elektrot kullanılarak yirmi ölçüm alındı ve bu ölçümlerin yüzde bağıl standart sapması (%BSS) sırasıyla %6,80; %3,63; %5,85 ve %5,05 olarak bulundu. Sonuçlar aynı elektrot kullanılarak elde edilen sonuçların birbirine yakın olduğunu ve elektrotların tekrarlanabilirliğinin iyi olduğunu gösterdi.

Tekrar üretilebilirlik ve tekrar kullanılabilirlik için elde edilen bağıl standart sapma değerleri, bu çalışmada hazırlanan elektrotlarda kullanılan PB, IL, MWCNT ve ZnONP'nin elektrotların tekrarlanabilir sonuçlar elde edilecek şekilde üretilebilmesinde uygun malzemeler olduğu şeklinde değerlendirildi.

4.5.5. Ömür

Enzimli ve enzimsiz elektrotların duyarlıklarını kullanım sıklığı ile nasıl değiştiğini belirlemek için, Bölüm 3.15.7’de anlatıldığı gibi, optimum çalışma koşullarında farklı günlerde aynı IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE ve IL/HRP/MWCNT-ZnONP/GCE’lerin sabit H₂O₂ derişiminde akım cevabı ölçüldü ve zamana karşı akım cevabı grafiğe geçirildi (Şekil 4.15). Şekil 4.15 incelendiğinde, IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE elektrotun onsekiz gün sonunda aktivite kaybı olmadığı, HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE elektrotta aktivite kaybının bir ay sonunda %23 olduğu görüldü. Bu süre sonunda enzim elektrodun başlangıç aktivitesinin %77 korumasının enzimli elektrot için kullanılan modifikasyon malzemelerinin enzim immobilizasyonu için uygun bir mikroçevre yaratmasından kaynaklandığı düşünülebilir. HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE aktivitesindeki 23’lük kayıp ise HRP enziminin zamanla aktivitesinin bir kısmını yitirmesi ile açıklanabilir. Literatürde H₂O₂ tayininde kullanılan enzimli ve enzimsiz elektrotlar için başlangıç aktivitesinde; 35 gün sonunda %5 kayıp [80], 5 gün sonunda önemli ölçüde kayıp [81], 7 gün sonunda %4 kayıp [82], 3 hafta sonunda %16 kayıp [83], 1 hafta sonunda %1,1 kayıp [84], 1 ay sonunda %6 kayıp [85] ve 25 gün sonunda %30 kayıp [86] olan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır.



Şekil 4.15. a:IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE b:IL/HRP/MWCNT-ZnONP/GCE’nin ömrü (H₂O₂: 91 µM; 0,05 M pH 6,5 fosfat tamponu, -0,10 V, oda sıcaklığı)

Çalışmada hazırlanan tüm elektrotların analitik performans faktörleri Çizelge 4.1.’de verildi.

Çizelge 4.1. Modifiye elektrotların performans faktörleri

Performans Faktörü	PB/MWCNT-ZnONP/GCE	IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE	HRP/MWCNT-ZnONP/GCE	HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE
Doğrusal aralık (M)	$4,84 \times 10^{-6}$ – $7,55 \times 10^{-4}$	$1,88 \times 10^{-6}$ – $2,46 \times 10^{-3}$	$9,99 \times 10^{-8}$ – $1,29 \times 10^{-4}$	$9,99 \times 10^{-8}$ – $7,55 \times 10^{-4}$
LOD (M)	$2,02 \times 10^{-7}$	$1,50 \times 10^{-7}$	$2,72 \times 10^{-8}$ M	$1,37 \times 10^{-8}$
LOQ (M)	$6,74 \times 10^{-7}$	$5,01 \times 10^{-7}$	$9,08 \times 10^{-8}$ M	$4,60 \times 10^{-8}$
Duyarlılık $\mu\text{A mM}^{-1}$	2,92	8,31	13,93	17,15
Tekrar üretilebilirlik %	5,77	5,68	6,42	8,50
Tekrar kullanılabilirlik %	6,80	3,63	5,85	5,05
Ömür		18 gün sonunda kayıp yok		30 gün sonunda %23 kayıp

4.5.6. Girişim etkisi

Gerçek numunelerde bulunan ve tayin edilmek istenen analit ile aynı potansiyelde yükseltgenerek ya da indirgenerek ölçüm sonuçlarına girişim etkisi yapan maddelerin etkisinin belirlenmesi önemlidir. Bu nedenle, çalışmada hazırlanan PB/MWCNT-ZnONP/GCE, IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE, HRP/MWCNT-ZnONP/GCE ve HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE'lerin cevabına askorbik asit, glukoz, ürik asit, sodyum klorür, üre, oksalik asit, glutamik asitin etkisi Bölüm 3.11'de anlatıldığı şekilde belirlendi. Bu amaçla, kararlı hale gelen elektrotların bulunduğu elektrokimyasal hücreye ilk olarak H_2O_2 ve sonrasında diğer girişimciler her birinin derişimi $9,9 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde ard arda ilave edildi. Çalışmada çizilen *i-t* grafiklerinden yararlanılarak incelenen her bir türün H_2O_2 'in akım cevabına katkısı hesaplandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2'de verildi. Çizelge incelendiğinde, askorbik asit, glutamik asit ve ürik asitin PB/MWCNT-ZnONP/GCE cevabına sırasıyla %6,6; %9,2 ve %6,2 girişim etkisi yaptığı görüldü. Bunun dışında tüm elektrotlarda incelenen türlerin girişim etkisinin %5'in altında olduğu görüldü. Elektrotların yüksek seçiciliğe sahip olmasının çalışmada kullanılan -0,10 V'luk düşük potansiyelden ve elektrotların üzerine kaplanan nafyon tabakasının girişim etkisini azaltıcı etkisinden kaynaklandığı düşünöldü.

Çizelge 4.2. Modifiye elektrotların cevabına girişim yapabilecek türlerin etkisi

GİRİŞİM YAPAN TÜR	% GİRİŞİM			
	PB/MWCNT-ZnONP/GCE	IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE	HRP/MWCNT-ZnONP/GCE	HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE
Sodyum klorür	4,9	2,1	4,7	-0,6
Glikoz	2,0	0,1	2,2	-3,1
Üre	0,4	1,2	1,7	-0,9
Oksalik asit	1,1	0,5	1	-0,3
Askorbik asit	-6,6	1,8	0,8	1,1
Glutamik asit	-9,2	3,2	-2,8	-4,4
Ürik asit	-6,2	0,7	2,4	-2,9

4.6. Gerçek numune analizi

Çalışmada hazırlanan dört farklı tip elektrodun gerçek numunelerde H_2O_2 tayininde kullanılabilirliği araştırıldı. Gerçek numune olarak eczaneden temin edilen ve içerdiği H_2O_2 miktarı belli olan oksijenli su numunesi kullanıldı. Bu numunede H_2O_2 tayini, Bölüm 3.12’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Bu amaçla, optimum bileşimde hazırlanan ve dengeye getirilen PB/MWCNT-ZnONP/GCE, IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE, HRP/MWCNT-ZnONP/GCE ve HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE’lerin bulunduğu ortama oksijenli su numunesinden ilave edildi ve -0,10 V’da akım farkları ölçüldü. Elektrokimyasal hücreye stok H_2O_2 çözeltsinden ilaveler yapılarak akım farkları kaydedildi ve standart katma grafikleri oluşturuldu. Bu yöntem ile her bir elektrot ile oksijenli su örneğindeki H_2O_2 üç defa tayin edildi ve bu ölçümün standart sapma değerleri hesaplandı. Modifiye elektrotlar kullanılarak elde edilen sonuçlar ve hesaplanan %geri kazanım (%GK) değerleri, Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4’te verildi. Çizelgeler incelendiğinde, çalışmada hazırlana tüm elektrotlar ile oksijenli su numunesinde H_2O_2 tayini için %100’e yakın sonuçlar elde edildiği görüldü. Bu sonuçlar çalışmada hazırlanan sensör ve biyosensörlerin gerçek numunelerde H_2O_2 tayini için literatürdeki diğer yöntemlere alternatif olarak kullanılabilceğini gösterdi.

Çizelge 4.3. Hidrojen peroksit tayini için PB modifiye elektrotlar ile oksijenli su numunesinde standart katma yöntemi kullanılarak elde edilen geri kazanım sonuçları

Oksijenli su H ₂ O ₂ , mg/L	PB/MWCNT-ZnONP/GCE		IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE	
	Bulunan H ₂ O ₂ , mg/L	% GK	Bulunan H ₂ O ₂ , mg/L	% GK
30	30,77	102,6	31,2	104
	30,68	102,3	31,8	106
	30,64	102,1	29	96,7
Ortalama % GK	30,69±0,07	102,3±0,25	30,67±1,47	102,2±4,89

Çizelge 4.4. H₂O₂ tayini için HRP modifiye elektrotlar ile oksijenli su numunesinde standart katma yöntemi kullanılarak elde edilen geri kazanım sonuçları

Oksijenli su H ₂ O ₂ , mg/L	HRP/MWCNT-ZnONP/GCE		HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE	
	Bulunan H ₂ O ₂ , mg/L	% GK	Bulunan H ₂ O ₂ , mg/L	% GK
30	30,09	100,3	30,3	101
	29,44	98,1	29,51	98,4
	31,29	104,3	29,56	98,5
Ortalama % GK	30,27±0,94	100,9±3,14	29,79±0,44	99,3±1,47

4.7. Sonuçlar

Bu tez çalışmasında H₂O₂'in amperometrik tayini için, MWCNT, ZnONP ve PB veya HRP ile modifiye edilmiş enzimli ve enzimsiz elektrotlar hazırlandı. Ayrıca, bu iki elektrodun bileşimine iyonik sıvı eklenmesi ile iki adet daha enzimli ve enzimsiz elektrot hazırlandı. Hazırlanan bu dört modifiye elektrot ile H₂O₂ tayini için elde edilen sonuçlar aşağıda kısaca özetlendi.

- PB/MWCNT-ZnONP/GCE: Geniş bir derişim aralığında ($4,84 \times 10^{-6}$ – $7,55 \times 10^{-4}$ M), düşük gözlenebilme sınırı ($2,02 \times 10^{-7}$ M) ile ve iyi bir duyarlılıkla ($2,92 \mu\text{A mM}^{-1}$) cevap vermektedir. Elektrot yüksek bir tekrar üretilebilirliğe (BSS=%5,77) sahiptir.

- IL/PB/MWCNT-ZnONP/GCE: Geniş bir derişim aralığında ($1,88 \times 10^{-6}$ – $2,46 \times 10^{-3}$ M), düşük gözlenebilme sınırı ($1,50 \times 10^{-7}$ M) ile ve iyi bir duyarlılıkla ($8,31 \mu\text{A mM}^{-1}$) cevap vermektedir. Elektrot yüksek bir tekrar üretilebilirliğe (BSS=%5,68) sahiptir.
- HRP/MWCNT-ZnONP/GCE: Çok geniş bir derişim aralığında ($9,99 \times 10^{-8}$ – $1,29 \times 10^{-4}$ M), düşük gözlenebilme sınırı ($2,72 \times 10^{-8}$ M) ile ve yüksek bir duyarlılıkla ($13,93 \mu\text{A mM}^{-1}$) cevap vermektedir. Elektrot uygun bir tekrar üretilebilirliğe (BSS=%6,42) sahiptir.
- HRP/IL/MWCNT-ZnONP/GCE: Çok geniş bir derişim aralığında ($9,99 \times 10^{-8}$ – $7,55 \times 10^{-4}$ M), düşük gözlenebilme sınırı ($1,37 \times 10^{-8}$ M) ile ve yüksek bir duyarlılıkla ($17,15 \mu\text{A mM}^{-1}$) cevap vermektedir. Elektrot kabul edilebilir bir tekrar üretilebilirliğe (BSS=%8,50) sahiptir.

Çalışmada elektrot bileşimine iyonik sıvı eklenmesinin elektrotların doğrusal çalışma aralığını genişlettiği, gözlenebilme sınırını düşürdüğü ve duyarlılığı önemli ölçüde arttırdığı belirlendi. Hazırlanan elektrotlarla -0,10 V gibi düşük bir potansiyelde çalışılması nedeniyle elektrotların gerçek numunelerde bulunan ve girişim etkisi yapan pek çok türe karşı duyarlı olmaması geliştirilen elektrotların önemli bir üstünlüğüdür. Ayrıca, geliştirilen her dört elektrodun da oksijenli su numunesinde H_2O_2 tayininde başarılı bir şekilde kullanılabilceği gösterildi.

Elde edilen sonuçların, bu çalışmada geliştirilen modifiye elektrotların H_2O_2 tayini için rapor edilmiş diğer amperometrik enzim elektrotlarla kıyaslanabilir üstün özellikler gösterdiği ve bu açıdan, çalışmada elde edilen bulguların literatüre önemli bir katkı yapabileceği düşünüldü.

KAYNAKLAR

- [1] K. Dhara ve D. Mahapatra, “R. Recent advances in electrochemical nonenzymatic hydrogen peroxide sensors based on nanomaterials”: a review. *Journal of Materials Science*, 1-39, 2019.
- [2] S. Chen, R. Yuan, Y. Chai ve F. Hu, “Electrochemical sensing of hydrogen peroxide using metal nanoparticles”: a review. *Microchimica Acta*, 180(1-2), 15-32, 2013.
- [3] N. Verma ve A. Bhardwaj, “Biosensor technology for pesticides”: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(6), 3093-3119, 2015.
- [4] M. N. Velasco-Garcia ve T. Mottram, “Biosensor technology addressing agricultural problems,” *Biosystems Engineering*, 84(1), 1-12, 2003.
- [5] S. V. Dzyadevych, V. N. Arkhypova, A. P. Soldatkin, A. V. El'Skaya, C. Martelet ve N. Jaffrezic-Renault, “Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future,” *Irbm*, 29(2-3), 171-180, 2008.
- [6] J. Wang, “Carbonnanotube based electrochemical biosensors”: A review. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 17(1), 7-14, 2005.
- [7] B. Dalkiran, C. Kaçar, P. E. Erden ve E. Kiliç, “Amperometric xanthine biosensors based on chitosan-Co₃O₄-multiwall carbon nanotube modified glassy carbon electrode,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, 200, 83-91, 2014.
- [8] E. H. Yoo ve Y. S. Lee, “Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice,” *Sensors*, 10; 4558-4576, 2010.
- [9] L. C. Clark Jr ve C. Lyons, “Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery,” *Annals of the New York Academy of sciences*, 102(1), 29-45, 1962.
- [10] F. Pamuk, *Biyokimya*, Gazi Kitapevi, Ankara, 2011.
- [11] P. K. Chu ve X. Liu, “*Biomaterials fabrication and processing handbook*,” CRC press, 2008.
- [12] S. Datta, L. R. Christena ve Y.R.S Rajaram, “Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials,” *3 Biotech*, 3(1), 1-9, 2013.

- [13] A. A. Homaei, R. Sarir, F. Vianello ve R. Stevanato, “Enzyme immobilization: an update,” *Journal of Chemical Biology*, 6(4), 185-205, 2013.
- [14] B. Rafique, M. Iqbal, T. Mehmood ve M. A. Shaheen, “Electrochemical DNA biosensors,” a review. *Sensor Review*, 39(1), 34-50, 2019.
- [15] M. Velasco-Garcia, S. Missailidis. “New trends in aptamer-based electrochemical biosensors,” *Gene Therapy and Molecular Biology*, 13(1) pp. 1–10, 2009.
- [16] A. Pollap ve J. Kochana, “Electrochemical Immunosensors for Antibiotic Detection,” *Biosensors*, 9(2), 61, 2019.
- [17] Y. Li, “Section 2.3 Biosensors, pp. 52-93, of Chapter 2 Hardware, in CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume VI Information Technology,” Edited by CIGR-The International Commission of Agricultural Engineering; Volume Editor, Axel Munack. St. Joseph, Michigan, USA: ASABE. Copyright American Society of Agricultural Engineers. Çevirmenler: Demircioğlu P., Böğrekçi İ., Çeviri Editörleri: Tarhan S., Özgüven, M.M, 2006.
- [18] L. Su, W. Jia, C. Hou ve Y. Lei, “Microbial biosensors,” a review. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 1788-1799, 2011.
- [19] A.N. Reshetilov, P.V. Iliasov ve T.A. Reshetilova. *The Microbial Cell Based Biosensors, Intelligent and Biosensors*, Vernon S. Somerset (Ed.), ISBN: 978-953-7619-58-9, InTech, 2010.
- [20] A. Telefoncu ve A. Kılınç, *Biyosensörler: Metotlar, Uygulamalar ve Son Gelişmeler*, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, Haziran 2012. ISBN:978-605-63194-0-2.
- [21] L. A. Terry, S. F. White ve L. J. Tigwell, “The application of biosensors to fresh produce and the wider food industry,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1309-1316, 2005.
- [22] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös ve E. Reimhult, E. “Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures,” *Sensors*, 8(3), 1400-1458, 2008.
- [23] A. Telefoncu, *Biyosensörler* (Telefoncu A., Ed.) Ege Üniversitesi, İzmir, 1999.
- [24] W. Putzbach ve N. J. Ronkainen, “Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors,” A review. *Sensors*, 13(4), 4811-4840, 2013.

- [25] Ç. Atan “ZnO nanorod temelli glukoz biyosensörü hazırlanması ve kan serumunda glukoz tayininde kullanılması,” *Yükseklisans Tezi*, İstanbul Üniversitesi, 2013.
- [26] S. S. Ozturk ve B. O. Palsson, “Chemical Decomposition of Glutamine In Cell Culture Media: Effect of Media Type, pH, and Serum Concentration,” *Biotechnology Progress* 6(2):121–128, 1990.
- [27] P. Mehrotra, “Biosensors and their applications,” a review, *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(2), 153-159, 2016.
- [28] C. R. Ispas, G. Crivat ve S. Andreescu, “Recent developments in enzyme-based biosensors for biomedical analysis,” *Analytical Letters*, 45(2-3), 168-186, 2012.
- [29] E. B. Bahadır ve M. K. Sezgintürk, “Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and bioterror/biowarfare analyses,” *Analytical Biochemistry*, 478, 107-120, 2015.
- [30] L. Rotariu, F. Lagarde, N. Jaffrezic-Renault ve C. Bala, “ Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants—trends and perspective,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 79, 80-87,2016.
- [31] F. Long, A. Zhu and H. Shi, “Recent advances in optical biosensors for environmental monitoring and early warning,” *Sensors*, 13(10), 13928-13948, 2013.
- [32] S. Rodriguez-Mozaz, M. J. L. de Alda ve D. Barceló, “Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(4), 1025-1041, 2006.
- [33] X. Chen, C. Guo ve J. Kong, “Oxidative stress in neurodegenerative diseases,” *Neural Regeneration Research*, 7(5), 376, 2012.
- [34] D. S. Özdemir, C. Kaçar, B. Dalkıran, S. Küçükkolbaşı, P. E. Erden ve E. Kılıç, “Effect of hexaammineruthenium chloride and/or horseradish peroxidase on the performance of hydrogen peroxide (bio) sensors: a comparative study,” *Journal of Materials Science*, 54(7), 5381-5398, 2019.
- [35] L. Wang, M. Xu, Y. Xie, Y. Song ve L. Wang, “A nonenzymatic electrochemical H₂O₂ sensor based on macroporous carbon/polymer foam/PtNPs electrode,” *Journal of Materials Science*, 53(15), 10946-10954, 2018.

- [36] R. Zhang ve W. Chen, “Recent advances in graphene-based nanomaterials for fabricating electrochemical hydrogen peroxide sensors,” *Biosensors and Bioelectronics*, 89, 249-268, 2017.
- [37] G. Scandurra, A. Arena, C. Ciofi ve G. Saitta, “Electrical characterization and hydrogen peroxide sensing properties of gold/nafion: polypyrrole/MWCNTs electrochemical devices,” *Sensors*, 13(3), 3878-3888, 2013.
- [38] M. A. Kamyabi ve N. Hajari, “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, 2017
- [39] J. Benedet, D. Lu, K. Cizek, J. La Belle ve J. Wang, “Amperometric sensing of hydrogen peroxide vapor for security screening,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(2), 371-376, 2009.
- [40] C. Kaçar, B. Dalkiran, P. E. Erden ve E. Kiliç, “An amperometric hydrogen peroxide biosensor based on Co_3O_4 nanoparticles and multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode,” *Applied Surface Science*, 311, 139-146, 2014.
- [41] A. A. Karyakin ve E. E. Karyakina, “Prussian Blue-based artificial peroxidase as a transducer for hydrogen peroxide detection. Application to biosensors,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, 57(1-3), 268-273, 1999.
- [42] N. C. Veitch, “Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme,” *Phytochemistry*, 65(3), 249-259, 2004.
- [43] J. Z. Xu, J. J. Zhu, Q. Wu, Z. Hu ve H. Y. Chen, “An amperometric biosensor based on the coimmobilization of horseradish peroxidase and methylene blue on a carbon nanotubes modified electrode,” *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 15(3), 219-224, 2003.
- [44] H. Yin, S. Ai, W. Shi ve L. Zhu, “A novel hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized on gold nanoparticles–silk fibroin modified glassy carbon electrode and direct electrochemistry of horseradish peroxidase,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, 137(2), 747-753, 2009.
- [45] K. Zhou, Y. Zhu, X. Yang, J. Luo, C. Li ve S. Luan, “A novel hydrogen peroxide biosensor based on Au–graphene–HRP–chitosan biocomposites,” *Electrochimica Acta*, 55(9), 3055-3060, 2010.

- [46] Y. T. Kong, M. Boopathi ve Y. B. Shim, “Direct electrochemistry of horseradish peroxidase bonded on a conducting polymer modified glassy carbon electrode,” *Biosensors and Bioelectronics*, 19(3), 227-232, 2003.
- [47] P. D. Sánchez, A. J. M. Ordieres, A. C. García ve P. T. Blanco, “Peroxidase–ferrocene modified carbon paste electrode as an amperometric sensor for the hydrogen peroxide assay,” *Electroanalysis*, 3(4-5), 281-285, 1991.
- [48] G. Rocchitta, A. Spanu, S. Babudieri, G. Latte, G. Madeddu, G. Galleri ve R. Manetti, “Enzyme biosensors for biomedical applications: Strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids,” *Sensors*, 16(6), 780, 2016.
- [49] F. Ricci, A. Amine, G. Palleschi ve D. Moscone, “Prussian Blue based screen printed biosensors with improved characteristics of long-term lifetime and pH stability,” *Biosensors and Bioelectronics*, 18(2-3), 165-174, 2003.
- [50] A. A. Karyakin, O. V. Gitelmacher ve E. E. Karyakina, “Prussian blue-based first-generation biosensor. A sensitive amperometric electrode for glucose,” *Analytical Chemistry*, 67(14), 2419-2423, 1995.
- [51] F. Ricci ve G. Palleschi, “Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes,” *Biosensors and Bioelectronics*, 21(3), 389-407, 2005.
- [52] M. Trojanowicz, “Analytical applications of carbon nanotubes,” a review. *TrAC trends in Analytical Chemistry*, 25(5), 480-489, 2006.
- [53] S. Iijima, “Helical microtubules of graphitic carbon,” *Nature*, 354(6348), 56, 1991.
- [54] W. Yang, K. R. Ratinac, S. P. Ringer, P. Thordarson, J. J. Gooding ve F. Braet, “Carbon nanomaterials in biosensors: should you use nanotubes or graphene,” *Angewandte Chemie International Edition*, 49(12), 2114-2138, 2010.
- [55] P. D. Tam, N. Van Hieu, N. D. Chien, A. T. Le ve M. A. Tuan “DNA sensor development based on multi-wall carbon nanotubes for label-free influenza virus (type A) detection,” *Journal of Immunological Methods*, 350(1-2), 118-124, 2009.
- [56] A. P. Periasamy, Y. J. Chang ve S. M. Chen, “Amperometric glucose sensor based on glucose oxidase immobilized on gelatin-multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode,” *Bioelectrochemistry*, 80(2), 114-120, 2011.

- [57] P. R. Solanki, A. Kaushik, V. V. Agrawal ve B. D. Malhotra, “Nanostructured metal oxide-based biosensors,” *NPG Asia Materials*, 3(1), 17, 2011.
- [58] R. Kumar, O. Al-Dossary, G. Kumar ve A. Umar, “Zinc oxide nanostructures for NO₂ gas–sensor applications,” a review. *Nano-Micro Letters*, 7(2), 97-120, 2015.
- [59] M. S. P. López, D. Mecerreyes, E. López-Cabarcos ve B. López-Ruiz, “Amperometric glucose biosensor based on polymerized ionic liquid microparticles,” *Biosensors and Bioelectronics*, 21(12), 2320-2328, 2006.
- [60] M. M. Musameh, R. T. Kachosangi, L. Xiao, A. Russell ve R. G. Compton, “Ionic liquid-carbon composite glucose biosensor,” *Biosensors and Bioelectronics*, 24(1), 87-92, 2008.
- [61] X. Zhu, X. Niu, H. Zhao ve M. Lan, “Doping ionic liquid into Prussian blue-multiwalled carbon nanotubes modified screen-printed electrode to enhance the nonenzymatic H₂O₂ sensing performance,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, 195, 274-280, 2014.
- [62] S. Palanisamy, S. M. Chen ve R. Sarawathi, “A novel nonenzymatic hydrogen peroxide sensor based on reduced graphene oxide/ZnO composite modified electrode,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, 166, 372-377, 2012.
- [63] S. Xu, X. Zhang, T. Wan ve C. Zhang, “A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase cross-linked to multi-wall carbon nanotubes,” *Microchimica Acta*, 172(1-2), 199-205, 2011.
- [64] M. Y. Hua, Y. C. Lin, R. Y. Tsai, H. C. Chen ve Y. C. Liu, “A hydrogen peroxide sensor based on a horseradish peroxidase/polyaniline/carboxy-functionalized multiwalled carbon nanotube modified gold electrode,” *Electrochimica Acta*, 56(25), 9488-9495, 2011.
- [65] S. X. Xu, J. L. Li, Z. L. Zhou ve C. X. Zhang, C. X. “A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized by sol–gel thin film on a multi-wall carbon nanotube modified electrode,” *Analytical Methods*, 6(16), 6310-6315, 2014.
- [66] Y. Zhang, H. Q. Luo ve N. B. Li, “Hydrogen peroxide sensor based on Prussian blue electrodeposited on (3-mercaptopropyl)-trimethoxysilane polymer-modified gold electrode,” *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(2), 215-221, 2011.

- [67] J. Ping, S. Ru, K. Fan, J. Wu ve Y. Ying, “Copper oxide nanoparticles and ionic liquid modified carbon electrode for the non-enzymatic electrochemical sensing of hydrogen peroxide,” *Microchimica Acta*, 171(1-2), 117-123, 2010.
- [68] Z. Yang, X. Zong, Z. Ye, B. Zhao, Q. Wang ve P. Wang, “The application of complex multiple forklike ZnO nanostructures to rapid and ultrahigh sensitive hydrogen peroxide biosensors,” *Biomaterials*, 31(29), 7534-7541, 2010.
- [69] S. Li, X. Zhu, W. Zhang, G. Xie ve W. Feng, “Hydrogen peroxide biosensor based on gold nanoparticles/thionine/gold nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes–chitosans composite film-modified electrode,” *Applied Surface Science*, 258(7), 2802-2807, 2012.
- [70] A. H. Keihan ve S. Sajjadi, “Improvement of the electrochemical and electrocatalytic behavior of Prussian blue/carbon nanotubes composite via ionic liquid treatment,” *Electrochimica Acta*, 113, 2013.
- [71] B. Dalkıran, P. E. Erden ve E. Kılıç, “Graphene and tricobalt tetraoxide nanoparticles based biosensor for electrochemical glutamate sensing,” *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(2), 340-348, 2017.
- [72] Y. Zhang, R. Yuan, Y. Chai, Y. Xiang, C. Hong ve X. Ran, “An amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of HRP on multi-walled carbon nanotubes/electro-copolymerized nano-Pt-poly (neutral red) composite membrane,” *Biochemical Engineering Journal*, 51(3), 102-109, 2010.
- [73] G. Cunlan, S. Yonghai, W. Hui, L. Peicai, W. Li, S. Lanlan, S. Yujing, L. Zhuang, “Room temperature ionic liquid doped DNA network immobilized horseradish peroxidase biosensor for amperometric determination of hydrogen peroxide,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389:527–532, 2007.
- [74] Z. Huaan, Y. Ruo, C. Yaqin, L. Wenjuan, Z. Yu ve W. Chengyan, “Amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on horseradish peroxidase onto gold nanowires and TiO₂ nanoparticles,” *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34:923–930, 2011.
- [75] Q. Jianying, D. Ying, W. Yong, L. Tongfang ve D. Xueping, “Determination of hydrogen peroxide using a biosensor based on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and horseradish peroxidase with graphene–chitosan composite,” *Micro & Nano Letters*, Vol. 9, Iss. 9, pp. 572–576, 2014.

- [76] P. V. Rodionov, E. A. Alieva, E. A. Sergeeva, I. A. Veselova ve T. N. Shekhovtsova, “Determination of Hydrogen Peroxide and Organic Peroxides in Micellar and Aqueous–Organic Media Using a Spectrophotometric Biosensor Based on Horseradish Peroxidase,” *Analytical Chemistry*, Vol. 71, No. 9, pp. 932–943, 2016.
- [77] M. M. Borisova, B. N. Ivanov, D. V. Vetoshkina, V. Y. Lubimov, T. P. Fedorchuk, I. A. Naydov, M. A. Kozuleva, N. N. Rudenko, L. Dall’Osto, S. Cazzaniga ve R. Bassi, “Long-term acclimatory response to excess excitation energy: evidence for a role of hydrogen peroxide in the regulation of photosystem II antenna size,” *Journal of Experimental Botany*, Vol. 66, No. 22 pp. 7151–7164, 2015.
- [78] C. Kaçar, R. M. Torrente-Rodríguez, M. Pedrero, S. Campuzano, E. Kilic ve J. M. Pingarrón, “Amperometric magnetoimmunoassay for the determination of lipoprotein(a),” *Microchimica Acta*, Volume 182, Issue 7–8, pp 1457–1464, 2015.
- [79] S. Demoustier-Champagne M. Delvaux ve A. Walcarius, “Electrocatalytic H₂O₂ amperometric detection using gold nanotube electrode ensembles,” *Analytica Chimica Acta*, 525. 221–230, 2004.
- [80] A. K. M. Kafi, Q. Wali, R. Jose, T. K. Biswas ve M. M. Yusoff, “A glassy carbon electrode modified with SnO₂ nanofibers, polyaniline and hemoglobin for improved amperometric sensing of hydrogen peroxide,” *Microchimica Acta*, 184:4443–4450, 2017.
- [81] P. Reanpang, S. Themsirimongkon, S. Saipanya, O. Chailapakul ve J. Jakmunee, “Cost-effective flow injection amperometric system with metal nanoparticle loaded carbonnanotube modified screenprinted carbon electrode for sensitive determination of hydrogen peroxide,” *Talanta*, 144:868–874, 2015.
- [82] K . Y. Goud, V. S. Kumar, A. Hayat, G. Catanante, K. V. Gobi ve J. L. Marty, “Polymer scaffold layers of screen-printed electrodes for homogeneous deposition of silver nanoparticles: application to the amperometric detection of hydrogen peroxide,” *Microchimica Acta*, 186:810, 2019.
- [83] L. Zheng, L. Xiong, D. Zheng, Y. Li, Q. Liu, K. Han, W. Liu, K. Tao, S. Yang ve J. Xia, “Bilayer lipid membrane biosensor with enhanced stability for amperometric determination of hydrogen peroxide,” *Talanta*, 85:43–48, 2011.

- [84] J. Ping, J. Wu, K. Fan ve Y. Ying, “An amperometric sensor based on Prussian blue and poly(o-phenylenediamine) modified glassy carbon electrode for the determination of hydrogen peroxide in beverages,” *Food Chemistry*, 126:2005–2009, 2011.
- [85] M. R. Majidi, M. H. Pournaghi-Azar, A. Saadatirad ve E. Alipour, “Simple and Rapid Amperometric Monitoring of Hydrogen Peroxide at Hemoglobin-Modified Pencil Lead Electrode as a Novel Biosensor: Application to the Analysis of Honey Sample, *Food Analytical Methods*, 8:1067-1077, 2015.
- [86] N. C. Sekar, L. Ge, S. A. M. Shaegh, S. Huan Ng ve S. N. Tan, “A mediated turnip tissue paper-based amperometric hydrogen peroxide biosensor,” *Sensors and Actuators, B* 210: 336–342, 2015.



ÖZGEÇMİŞ

Kubilay Tunca 29.10.1990 tarihinde Nevşehir’de doğdu 2004 yılında Suvermez İlköğretim Okulundan mezun oldu, 2008 yılında Derinkuyu Lisesinden mezun oldu, 2015 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümünden mezun oldu. Yüksek lisans eğitimine 2016 yılında Namık Kemal Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Analitik kimya Ana Bilim Dalında başladı. 2018 yılında evlendi.

