

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ALTIN NANOPARTİKÜLLERE DAYALI ENZİM İÇERMEYEN
GLİKOZ SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Filiz ÇELİK

KASIM 2015

Kimya Anabilim Dalında Filiz ÇELİK tarafından hazırlanan ALTIN NANOPARTİKÜLLERE DAYALI ENZİM İÇERMEYEN GLİKOZ SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Zeki ÖKTEM
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Doç. Dr. Hakan ÇİFTÇİ
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Zeki ÖKTEM

Doç.Dr. Hakan ÇİFTÇİ

Yrd.Doç.Dr. Erol ALVER

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

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

ALTIN NANOPARTİKÜLLERE DAYALI ENZİM İÇERMEYEN GLİKOZ SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

ÇELİK, Filiz

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Hakan ÇİFTÇİ

Kasım 2015, 65 Sayfa

Bu çalışmada enzim içermeyen yeni bir glikoz sensör geliştirilmiştir. Tez çalışmaları kapsamında altın nanopartiküller indirgeyici özellikte olan kitosan polimeri yardımıyla sentezlenmiş ve sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Karakterize edilen altın nanopartiküller kullanılarak potansiyometrik glikoz ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Altın nanopartiküller yüzeyleri glikoza duyarlı değişik moleküler ajanlarla (4-merkaptofenil boronik asit ve 1-dekantiol) modifiye edilmiştir. Modifiye edilmiş altın nanopartiküller glikoz ölçümünün yapılacağı elektrot yüzeyine immobilize edilmiş ve modifiye edilmiş elektrot potansiyometrik yöntemle glikoz ölçümlerinde kullanılmıştır. Glikoz ölçümleri için en iyi çalışma koşulları belirlenmiştir.

Hazırlanan enzimsiz sensörün glikoz ölçümü için doğrusal çalışma aralığı 5-30 mM, en düşük tayin sınırı ise 0.5 mM olarak bulunmuştur. Hazırlanan sensörün en az 6 defa kullanılabileceği ve 30 gün beklenildiğinde glikoz cevabında yaklaşık % 10.97 azalma olduğu belirlenmiştir. Glikoz ölçümlerine girişim etkisi yapabilecek moleküllerin etkisi araştırılmış ve kan serumunda kullanılabilirliği test edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Glikoz sensör, altın nanopartikül, modifiye elektrot, potansiyometrik yöntem

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF NON-ENZYMATIC GLUCOSE SENSOR BASED ON GOLD NANOPARTICLES

ÇELİK, Filiz

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry, M.Sc.Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hakan ÇİFTÇİ

November 2015, 65 pages

In this study, a new non-enzymatic glucose sensor was developed based on gold nanoparticles were synthesized by using chitosan. Synthesized gold nanoparticles were characterized and carried out glucose measurement by potentiometric method.

Gold nanoparticle surface was modified by 4-mercaptophenylboronic acid and 1-decanethiole. Modified nanoparticles were immobilized on electrode surface. The modified electrode was used on glucose determination by potentiometric methods and optimum conditions were determined for glucose measurement.

The linear calibration graphs were obtained in the concentration range of 5-30 mM glucose and the detection limit was found to be 0.5 mM. The reusability of the sensor was found to be as 6 and the stability of the

sensor was investigated. After 30 days, 10.97% of initial glucose response of the modified electrode was decreased. The effect of possible interferences to the glucose response of the sensor in biological and real (blood) samples were also investigated.

Key Words: Glucose sensor, gold nanoparticle, modified electrode, potentiometric method



TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarım sũresince tecrũbeleriyle çalıŐmalarıma ıŐık tutan, daima akademik çalışma azmi ve kararlılığı veren, çalıŐmalarım boyunca engin bilgi ve tecrũbelerini esirgemeyen, gerçek anlamda bilimin ne olduğunu ve nasıl yapılması gerektiğini gũsteren değerli hocam Sayın Doç. Dr. Hakan ÇİFTÇİ' ye,

Laboratuvar ortamında her zaman ilgi ve hoŐgũrũleriyle bana destek olan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Zeki ktem' e, Doç. Dr. AyŐegũl lkũ METİN' e, Yrd.Doç. Dr. Erol ALVER' e,

Hiçbir fedakrlıktan kaçınmadan beni bugũnlere getiren, hayatım boyunca beni maddi, manevi destekleyen ve sũrekli arkamda gũlerini hissettiğim, benim bu noktaya gelmemde bũyũk pay sahibi olan anneme ve babama, sabır ve desteklerinden dolayı abime ve kardeŐime sonsuz teŐekkũrlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Sensörler	3
1.2. Elektrokimyasal Sensörler	5
1.2.1. Potansiyometrik Sensörler	5
1.2.2. Amperometrik Sensörler	6
1.2.3. Voltametrik Sensörler	7
1.2.4. Alan Etkili Sensörler	7
1.3. Sensörlerin Temel Bileşenleri	7
1.3.1. Tanıyıcı Tabaka	8
1.3.2. Çevirici	8
1.3.3. Elektronik Bölüm	8
1.4. Sensörlerin Performansını Etkileyen Faktörler	10
1.4.1. Çalışma Aralığı	10
1.4.2. Duyarlık	10
1.4.3. Tekrarlanabilirlik	11
1.4.4. Cevap Zamanı	11

1.4.5. Seçicilik	12
1.4.6. Kararlılık	12
1.4.7. Sensör Ömrü	13
1.5. Nanomateryaller Ve Sensörlerde Kullanım Olanakları	13
1.6. Çalışmanın Amacı	17
2. MATERYAL VE YÖNTEM	19
2.1. Kimyasallar	19
2.2. Cihazlar	19
2.2.1. Elektrokimyasal Analiz Cihazı	19
2.2.2. Hücre ve elektrotlar	20
2.2.3. pH metre	20
2.2.4. Mikro pipet.....	20
2.2.5. Saf su	20
2.2.6. Santrifüj.....	21
2.2.7. Ultrasonik banyo.....	21
2.2.8. UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi	21
2.2.9. Zeta Potansiyel ölçümleri	21
2.3. Kullanılan Çözeltiler	21
2.3.1. Borik asit/borat tampon çözeltisi.....	21
2.3.2. Glikoz çözeltisi.....	22
2.3.3. Kitosan çözeltisi.....	22
2.3.4. Altın (III) klorür çözeltisi	22
2.3.5. Altın nanopartikül eldesi	22
2.3.6. Merkaptofenil boronik asit (MFB) çözeltisi	22
2.3.7. Merkaptofenil boronik asit- Dekantiyol çözeltisi	22
2.3.8. Altın nanopartikül modifikasyonu.....	23

2.4. Modifiye elektrot hazırlanması.....	23
2.5. Potansiyometrik Ölçümler.....	23
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	25
3.1. Altın Nanopartikül Sentezi	25
3.2. Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	26
3.3. Altın Nanopartikül Kitosan Kompozit Yüzeyinin Modifikasyonu.....	31
3.4. Elektrot Modifikasyonu.....	33
3.5. Ch/AuNp Nanokompozitin Enzimsiz Glikoz Sensör Olarak Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi.....	35
3.6. Glikoz Tayini İçin Hazırlanan Enzimsiz Sensörde Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi.....	41
3.6.1. Altın nanopartiküllerin Elektrot Yüzeyindeki Optimum Film Kalınlığının Belirlenmesi.....	41
3.6.2. Optimum pH Değerinin Belirlenmesi.....	42
3.6.3. Ch/AuNp Modifikasyonunda (MFB/DT) Molar Oranının Belirlenmesi.....	43
3.6.4. Modifiye Ch/AuNp Hazırlanmasında Etkileşim Süresinin Belirlenmesi.....	44
3.7. Sensörün Tekrarlanabilirliğinin İncelenmesi.....	48
3.8. Sensörün Raf Ömrünün Belirlenmesi	49
3.9. Girişim Etkisinin İncelenmesi	50
3.10. Biyolojik Sıvıda (Kanda) Glikoz Tayini	53
4. SONUÇLAR	55
KAYNAKLAR	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Sensör şematik gösterimi.....	5
1.2. Biyolojik sistemlerle aynı boyutlardaki nanomateryaller	16
3.1. Sentezlenen altın nanopartikül (Ch/AuNp) çözeltisi	25
3.2. Ch/AuNp ait UV-vis spektrumu	26
3.3. FTIR spektrumu a) Kitosan, b) kitosan kaplı altın nanopartikül (Ch/AuNp).....	28
3.4. Ch/AuNp ait TEM görüntüsü	29
3.5. Ch/AuNp ait partikül büyüklüğü dağılımı	30
3.6. Ch/AuNp ile modifiye edilmiş Ch/AuNp-MFB UV-vis spektrumu	31
3.7. Ch/AuNp ile modifiye edilmiş Ch/AuNp-MFB-DT UV-vis spektrumu ..	32
3.8. Ch/AuNp-MFB-DT ile modifiye elektrot hazırlanması.....	33
3.9. a) Camsı karbon, b) Ch/AuNp-MFB-DT ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyine ait SEM görüntüsü	34
3.10. Modifiye elektrotun enzimsiz potansiyometrik glikoz ölçümlerinden elde edilen potansiyogram	35
3.11. Boronik asit ile glikoz etkileşim reaksiyonu.	36
3.12. a) 10 dak., b) 20 dak. bekleme sürelerinde elde edilen nanopartiküllere ait görüntü.....	37
3.13 Farklı bekleme sürelerinde elde edilen Ch/AuNp kullanımı ile potansiyometrik glikoz ölçümleri.	38
3.14. Ch/AuNp yüzeyinin MFB ve MFB-DT modifikasyonuna ilişkin glikoz ölçüm sonuçları.....	39

3.15. MFB ve DT ile modifiye edilmiş Ch/AuNp (Ch/AuNp-MFB-DT) şematik gösterimi	40
3.16. Elektrot yüzeyindeki nanopartikül miktarının glikoz cevabına etkisi ..	41
3.17. Farklı pH değerlerinde yapılan potansiyometrik glikoz ölçümleri.....	43
3.18. MFB/DT molar oranının glikoz cevabına etkisi.....	44
3.19. Ch/AuNp ile MFB/DT etkileşim süresinin glikoz ölçümüne etkisi.....	45
3.20. Optimum şartlarda glikoz derişimiyle açık devre potansiyel değişimi	46
3.21. Optimum çalışma koşullarına ait kalibrasyon grafiği	46
3.22. Düşük glikoz derişiminde sensörün glikoz cevabı	47
3.23. Düşük glikoz derişimine ait kalibrasyon grafiği.....	48
3.24. Sensörün bekleme süresiyle glikoz cevabının değişimi	50
3.25. Glikoz ölçümlerine girişim yapabilecek moleküllerin etkisi	52
3.26. İnterferans molekülleri içeren ve içermeyen ortamda glikoz ölçümleri.....	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

Sayfa

1.1. Çeşitli çevirici kombinasyonları	9
3.1. Tekrarlanabilirlik denemelerine ilişkin bulgular	49
3.2. Serum örneklerindeki glikoz sonuçlarının karşılaştırılması	54



1. GİRİŞ

Glikoz; yüksek polar yapılı, suda kolayca çözünebilen, tek zincirli veya halkalı yapıda bulunabilen 6 karbonlu bir monosakkarittir [1].

Glikoz, gelişmiş canlı organizmaların yaşamı için en önemli karbonhidratlardan biridir. Hücrelerin enerji kaynağı olmasının yanı sıra proteinlerin üretiminde ve lipid metabolizmasında kullanılan bir şekerdir. Sağlıklı bir insanın kanındaki glikoz derişimi 4.4-6.6 mM olmalıdır [2].

Şeker hastalığı, vücudun kendisi için gerekli olan insülini yeteri kadar üretememesi veya var olan insülini gerektiği gibi kullanamaması sonucu ortaya çıkan ilerleyici bir metabolizma hastalığıdır. Bu hastalıkta kandaki şeker miktarı normalden oldukça fazladır. Yemeklerden sonra kandaki glikoz miktarı artar. Sağlıklı kişilerde artan glikoz çok hızlı bir şekilde normal seviyelerine iner. Şeker hastalarında ise insülin yokluğu veya azlığı nedeni ile bu işlev gerçekleşemez. Glikoz hücre içine taşınamaz ve şeker kanda birikmeye başlar [3-7].

Glikoz, özellikle beyin ve kırmızı kan hücreleri için ana enerji kaynağıdır. Önemli hücresel fonksiyonların gerçekleşmesi için gerekli olan enerjiyi sağlamak için hücreler tarafından kullanılır. Eğer kan glikoz düzeyi çok düşük olursa (hipoglisemi) hücreler fonksiyonlarını yerine getiremez ve bu durum baş ağrısı, zihin karışıklığı, sinirlilik, havale ve daha ileri düzeylerde koma ile sonuçlanabilir. Kandaki glikoz seviyesinin çok fazla artması (hiperglisemi) ise gözlerin, böbreklerin, sinirlerin ve kan damarlarının tahribatına sebep olur [8-10].

Glikozun kandaki derişiminin yüksek olması günümüzde sıkça karşılaşılan bir hastalık olan diyabete yol açar [11].

Şeker hastalığı (diabetes mellitus), dünyada yaklaşık 200 milyon insanın etkilendiği bir hastalıktır. Bu hastalığın komplikasyonları, kandaki glikozun sıkı bir takibi ile büyük oranda azaltılabilmektedir. Bu nedenle, milyonlarca diyabet hastası, kandaki glikoz miktarını günlük olarak ölçmektedir. Bu durum glikozu, klinik teşhiste en yaygın test edilen analit yapmıştır [12].

Deri altı dokularında glikoz derişimini sürekli bir değerlendirmeye tabi tutabilmek ve kandaki glikoz seviyesini belirleyebilmek amacıyla duyarlı, seçici, güvenilir ve düşük maliyetli glikoz sensörü üretimi giderek artmaktadır [13].

Günümüzde kandaki glikozun kantitatif tayini halen aktif araştırma konularından biridir ve geniş ilgi görmektedir [14]. Glikoz miktarının tespitinde spektroskopik [15,16] ve elektrokimyasal [17] yöntemler kullanılmaktadır. Elektrokimyasal yöntemlerin basitliği glikozun tayini için çok avantajlı yaklaşımlar sağlamaktadır.

Glikoz tayini, HPLC ve gaz-sıvı kromatografisi gibi cihazlarla yapılmasına rağmen glikoz sensörleri daha ucuz, hızlı ve kolay tayin imkanı sunar. Özellikle diyabetli hastaların kan şekeri seviyesinin hızlı ve güvenilir bir şekilde ölçülmesi için glikoz sensörlerinden faydalanılır [18].

Günümüze kadar glikozun tayini için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan ilki Clark ve Lyons tarafından geliştirilen amperometrik glikoz biyosensörüdür ve literatürde tanımlanan ilk enzim elektrot olma özelliğini taşır. Bu sensör, glikozun oksijen (O₂) varlığında glikoz oksidaz (GO_x)

tarafından glikonik asite yükseltgenmesi ile elektrokimyasal hücre içinde derişimi azalan O₂'nin tayini esasına dayanır [19].

1.1. Sensörler

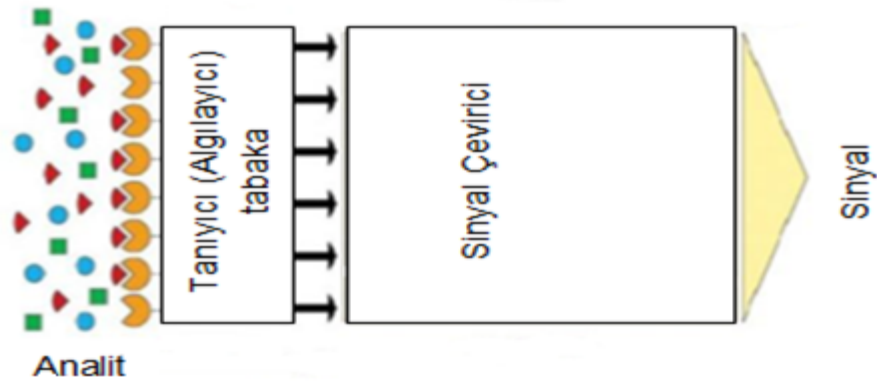
Teknolojinin gelişmesi sonucu artan ihtiyaçların karşılanabilmesi için sensör bilimine olan ilgi sürekli artmaktadır. Sensörlerin geliştirilmesi ve üretimi konusunda araştırma ve çalışmaların yapıp yeni teknolojilerle birleştirilerek istenilen özelliklerde yeni sensörlerin üretimi hem ihtiyaçların karşılanması hem de ülkenin dışa bağımlılığının azaltılması konusunda çok önemlidir.

Sensörler, fizik, kimya, biyoloji, mühendislik, tıp gibi bilim dalları aracılığıyla, maddelerin seçicilik özellikleri ve elektronik tekniklerin birleştirilmesiyle geliştirilen aygıtlardır. Sensörler bütün bir yapı içerisinde belirli bir bileşen, bileşenlerin tespiti ve miktarlarının belirlenebilmesi için kullanılırlar. Sensörler, algılayıcı madde (analit) ve çeviriciden (transducer) oluşan bir sistemdir. Ölçümü yapılacak nicelikler seçimli bir şekilde analit (algılayıcı madde) ile fiziksel veya kimyasal olarak etkileşime girerler. Genellikle ince bir film tabakası şeklinde olan analitin fiziksel, kimyasal veya yapısal parametrelerinde bu etkileşim sonucu bir değişim meydana gelir. Analitte meydana gelen bu değişim çevirici aracılığıyla genellikle elektriksel sinyale dönüştürülür.

İdeal bir sensörde aranılan karakteristik özellikler; sensörün hassasiyeti, seçiciliği yani sadece algılanmak istenen maddeye duyarlı olup diğer maddelerden etkilenmemesi, dinamik cevap yani algılanmak istenen

maddenin derişimindeki değişikliğe hızlı cevap vermesi, çok düşük derişimdeki maddelerin algılanması, sensörün uzun süre kullanılabilmesi, tekrar kullanılabilirliğinin fazla olması, düşük maliyetli ve küçük boyutlarda olması gibi özellikleri sayılabilir [20].

Sensör sistemlerinde ideal özelliklerin sağlanabilmesi algılayıcı sensör maddesine bağlı olduğu için çalışmalar bu konu üzerinde yoğunlaşmıştır. Gelişen yarı iletken teknolojisi ile sensörlerde istenilen üstün özelliklerin sağlanabileceği düşünülmüş bu nedenle son zamanlarda yarı iletken malzemelerin algılayıcı sensör maddesi olarak kullanımı artmış ve sensörlerin gelişiminde olumlu katkılar sağlanmıştır [21]. Bir sensör grubu olan yarı iletken sensörlerin çalışma prensipleri algılayıcı yarı iletken oksit maddelerin analit ile etkileşmesiyle elektriksel özelliklerindeki değişim esasına göreler. Bu algılama biçimi yarı iletken maddedeki serbest elektronlar ile analitin etkileşimi şeklindedir. Bu etkileşmenin sonucunda yarı iletken maddenin direnci ve elektriksel iletkenliğindeki değişim analit ile ilgili sonuçları verir. Seçiciliğinin çok iyi olmaması ise dezavantajdır. Yarı iletkenlerin sensör uygulamalarındaki kullanımları sadece yarı iletken sensör tipi ile sınırlı kalmayıp diğer çoğu sensör çeşitlerinin uygulamalarında da çokça kullanılmaktadır. Günümüzde analit olarak metal oksit yarı iletken yapıların ilgi çekmektedir [22]. Sensörlerin şematik gösterimi şekil 1.1.' de gösterilmiştir [23].



Şekil 1. 1. Sensörlerin şematik gösterimi

1.2. Elektrokimyasal Sensörler

Elektrokimyasal sensörler yaygın olarak potansiyometrik, amperometrik, voltametrik ve alan etkili sensörlerdir.

1.2.1. Potansiyometrik Sensörler

Bir karşılaştırma elektrodu ve uygun bir çalışma elektrodu ile oluşturulan bir elektrokimyasal hücrede ölçülen gerilim değerleri yardımı ile hücre çözeltisindeki türlerin nicel analizine potansiyometri denir. Çalışma elektrodu, çözeltideki türlerden bazılarını seçimlilik gösteren ve iç kısımda bir başka karşılaştırma elektrodu ile nicel analizi yapılacak türün belli derişimdeki çözeltisi bulunan ve bir membran ile analizi yapılacak çözeltiden ayrılmış bir elektrottur.

Analizi yapılacak çözeltiye daldırılan bu elektrot ile aynı çözeltiyle temasta olan bir karşılaştırma elektrodu arasında oluşan gerilim değeri ile analizi yapılan türün derişimi arasında logaritmik ilişki vardır. İçte ve dışta

bulunan çözeltilerde analizi yapılacak türün derişimi açısından bir fark varsa membranın iç yüzeyi ve dış yüzeyi arasında bir gerilim farkı oluşur. Bu gerilim farkının değeri analizi yapılan türe ve derişimine bağılı olduğu gibi, membranın cinsine ve çözeltideki diğer bileşenlerin cins ve miktarlarına bağılıdır.

Potansiyometrik sensörlerde kullanılan temel sensörler pH ya da tek değerlikli iyonlara duyarlı cam elektrotlar, anyon ya da katyonlara duyarlı iyon seçimli elektrotlar ve karbondioksit ya da amonyağa duyarlı gaz elektrotlardır. Potansiyometrik sensörlerin duyarlı, dayanıklı, karalı olması ve hızlı cevap üretmesi istenir [24].

1.2.2. Amperometrik Sensörler

Amperometrik sensörler genel anlamda akım şiddetinin ölçümünü temel almaktadır. Akım siddeti, çalışma elektrotunda yükseltgenen veya indirgenen elektroaktif türlerin derişiminin bir fonksiyonudur. Referans elektrot olarak görev yapan ikinci bir elektrot vasıtasıyla akım şiddetinden analiz edilecek türlerin derişimlerinin belirlenmesinde yararlanır. Bu sistem ile dolaylı ölçüm alınması bir dezavantaj olsa da yüksek hassasiyet göstermeleri büyük bir avantajdır.

1.2.3. Voltametrik Sensörler

Mikrobiyolojik reaksiyonlar, genellikle iletkenlik ve kapasitansta artma, empedansta azalmaya sebep olmaktadır. Buna dayanarak rezistans, kapasitans, iletkenlik ya da empedanstaki değişimin ölçümünü esas alan sensörler bu grupta yer almaktadır.

1.2.4. Alan Etkili Sensörler

Alan etkili transistörler (FET) gerilim kontrollü yarı iletken devre elemanıdır. FET ile elektriksel iletim; yüzey voltajı, yükü ve performansından etkilenir. Bu özellikleri dolayısıyla ölçüm ortamından sürekli alınan sinyalin takibine izin veren FET, elektrokimyasal tabanlı sensörlerin oluşumunda kullanılır. Metal oksit yarı iletken alan etki transistörlerini (MOSFET) ya da iyon duyar alan etki transistörlerini (ISFET) esas alan enzim sensörleri, enzim ile alan etki transistörlerinin birleştirilmesini ifade edecek şekilde enzim alan etki transistörleri (ENFET) olarak adlandırılırlar [25].

1.3. Sensörlerin Temel Bileşenleri

Sensörler, tanıyıcı (algılayıcı) tabaka, çevirici ve elektronik bölüm olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır.

1.3.1. Tanıyıcı (Algılayıcı) Tabaka

Tayin edilecek analit ile seçici ve tersinir olarak reaksiyona giren ve analit derişimi ile orantılı sinyaller üreten ajanlar tanıyıcı tabakayı oluşturmaktadır. Tanıyıcı ajan kendi spesifik olduğu ajanı tanıyıp onunla etkileşime girmektedir. Bu etkileşim sonucunda çevirici sistemin algılayabileceği sinyali üretmektedir. Sensörün yapılandırılmasında en önemli nokta, tanıma işleminin hassaslığı ve hedef kimyasala spesifik olmasıdır.

1.3.2. Çevirici

Çeviriciler, analit ile ajan etkileşmesi sonucu oluşan biyokimyasal sinyali fiziksel sinyale dönüştürmektedir. Bir sensörde en önemli bileşen tanıyıcı tabakadır. Diğer taraftan oluşan sinyal seviyesi veya sinyal gürültü oranı bir önem taşıyorsa, bu durumda kritik bileşen elektronik ya da fiziksel çevirici olmaktadır [26,27]. Ajan ve çeviricinin birçok kombinasyonu mümkün olmasına karşın minimum süre ve minimum maliyette maksimum fiziksel sinyal oluşturabilecek kombinasyonu seçmek amaçlanmaktadır.

1.3.3. Elektronik Bölüm

Çevirici tarafından oluşturulan sinyallerin görüntülenmesi veya depolanması amacıyla kullanılan bölümdür. Oluşan fiziksel sinyal herhangi bir işlem yapılmaksızın uygun bir ekranda görüntülenebildiği gibi sinyaller veri aktarım kartları ile bilgisayar ortamına aktarılarak istenilen çevrimler,

hesaplamalar ve görüntülemeler yapılabilir [28]. Çeviriciler (transduserler), reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler [29]. Çeşitli çevirici kombinasyonları çizelge 1.1.' de verilmiştir [30].

Çizelge 1.1. Çeşitli çevirici kombinasyonları

Çevirici (transduser) Sistemi	Ölçüm Modu	Tipik Uygulamaları
İyon Seçici Elektrot	Potansiyometrik	Biyolojik ortamdaki iyonlar, Enzim elektrot
Gaz Algılayıcı Elektrot	Potansiyometrik	Gazlar, enzimler, Organeller Hücre ya da doku elektrotları
Alan Etkili Transistörler	Potansiyometrik	İyonlar, Gazlar, Analitler
Işınsal Elektronik ve Fiber-Optik Aygıtlar	Optiksel	pH, Enzimler
Isıldirençler	Kalorimetrik	Enzim, Organel, Gazlar, Antibiyotikler, Vitaminler

1.4. Sensörlerin Performansını Etkileyen Faktörler

Sensör cevabının karakterize edilmesi herhangi bir analitik yöntemde olduğu gibi önemlidir. Kullanılan yöntemin amacına bağlı olarak gereken performans kriterleri değerlendirilmelidir [31].

1.4.1. Çalışma Aralığı

Bir sensörün doğrusal çalışma aralığı analit derişimine karşı cevap değişiminin grafiğe geğirilmesi ile elde edilir ve belirli bir analit derişimine kadar doğrusaldır. Bu çalışma aralığı tayin edilebilen en düşük derişimden (tayin sınırı), kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan sapma gösterdiği (doğrusallık sınırı) derişimine kadar olan aralığı kapsar.

1.4.2. Duyarlık

Duyarlık sensörün kalibrasyon eğrisindeki doğrusal çalışma aralığında tanımlanır. Sensörün büyüklüğü, ölçüm ortamına doğru kimyasal türün kütle aktarım hızı gibi faktörler duyarlığa etki etmektedir. Sensörlerin kullanılan substratlar dışında potansiyel girişim yapan maddelerden etkilenmemesi istenir.

1.4.3. Tekrarlanabilirlik

Herhangi bir analitik yöntemde olduğu gibi sensörlerle yapılan ölçümlerde de tekrarlanabilirlik önemlidir. Tekrarlanabilirlik belirli bir zaman dilimi içinde gerçekleştirilen bir seri deney verisinin kendi aralarındaki uyum derecesini göstermektedir [32]. Tekrarlanabilirlik, aynı zamanda rastgele veya belirsiz hataların bir ölçüsüdür [33]. Sensör sistemlerinde yapılan tayinlerde beklenen tekrarlanabilirlik %5-10'dur [34].

1.4.4. Cevap Zamanı

Sensörlerin büyük bir hızla yaygınlaşmasının en önemli nedenlerinden biri, pratik bir işlemlerle kısa sürede sonuç alınabilmesidir. Cevap zamanı ile kastedilen, sensörün, analizlenecek maddenin reaksiyon ortamına giriş yaptığı andan itibaren ölçüm düzeneğinden sonucun okunduğu ana kadar geçen zamandır. Sensörün cevap zamanını etkileyen başlıca unsurlar, çözeltinin karıştırma hızı, substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, optimum pH ve sıcaklıktır [35].

Sensörler için cevap zamanı genel olarak birkaç saniye ile birkaç dakika arasında değişir. 10 dakika gibi bir süre, oldukça uzun kabul edilebilir [34].

1.4.5. Seçicilik

Bir analitik yöntemin seçiciliği, numune matriksinde bulunan diğer türlerden etkilenmeden tayin edebilme özelliğidir. Sensörlerdeki aktif bileşen spesifik, kararlı, sadece analit derişimine duyarlı olmalı ve diğer kimyasal türlerden etkilenmemelidir. Aktif bileşenin spesifik olması girişim yapabilecek türleri içeren karmaşık içerikli ölçüm ortamlarında detaylı ön işlem yapılmaksızın analize imkan verir. Seçicilik ayrıca analitle aynı derişime sahip girişim yapan türün cevap akımlarının oranı olarak da ifade edilmektedir [36].

1.4.6. Kararlılık

Sensör ile yapılan bir dizi ölçüm sonucunda molekülün aktivitesindeki değişim sonucu çıkış sinyalindeki değişimin toplam ölçüm sayısı ile ya da gün sayısı ile ifade edilmesiyle sensörün kararlılık ömrü belirlenmektedir. Bir sensörün gün içinde ardı sıra yapılan ölçümlerde başlangıç aktivitesini ne kadar koruduğunun ölçüsü kullanım kararlılığını, belirli gün aralıklarında ölçümü ile de depolama kararlılığı bulunur. Elektrot kararlılığının yüksek olması ideal sensörler için gereklidir. Aktif bileşenin kararlı olması ise çok sayıda analize imkan vereceği için sensörün ekonomik olmasına zemin hazırlar. Kararlılık, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına, elektrodun geometrisine, sensör hazırlama yöntemine ve dönüştürücüye bağlıdır. Ayrıca; pH, sıcaklık, tampon çözelti bileşimi, O₂ derişimi gibi çalışma ortamı şartları da kararlılığı etkileyen faktörlerdir [32].

1.4.7. Sensör Ömrü

Sensörlerin ömrü, saklama ve çalışma koşulları açısından başlıca iki durumda incelenir. Doğal olarak kullanılmadan ideal koşullarda saklandığındaki ömrü ile sürekli çalışma koşullarındaki ömrü farklı olacaktır. Bu nedenle, hazırlanan bir sensör ile rutin uygulamalara geçmeden önce, operasyonel ve depolama kararlılıklarının spesifik olarak belirlenmesi gerekir. Sensör ömrünü etkileyen en önemli faktör, aktif bileşenin aktivitesindeki azalmadır.

1.5. Nanomateryaller ve Sensörlerde Kullanım Olanakları

Nanoteknoloji; günümüzde bilim ve teknoloji alanındaki önemli bir disiplindir [37]. Nanoteknoloji 100 nm'den daha küçük boyutlardaki sistem ve cihazların oluşturulması, çalışması ve kullanımını amaçlar [38]. Sensörlerin geliştirilmesinde nanoteknolojinin önemi gün geçtikçe artmaktadır. Sensörlerin duyarlılıkları ve diğer özellikleri, nanomateryallerin kullanılmasıyla iyileştirilebilmektedir [39]. Geliştirilen nanomateryaller biyolojik sistemlerdeki yapıların boyutlarına benzer büyüklüktedir. Nanomateryaller; bazı özelliklerinden dolayı sensör uygulamalarında ilgi çekici moleküller olmuşlardır. Özellikler:

- 1) Küçük boyut (1–100 nm) ve buna bağlı olarak yüzey/hacim oranının büyük olması,
- 2) Boyut, kompozisyon ve şekille ilişkilendirilen fiziksel özelliklerin kimyasal olarak modifiye edilebilmesi,

- 3) Hedef molekülleri bağlama özelliklerinin farklı olması,
- 4) Yapısal sağlamlık.

Nanoteknoloji, nano boyuttaki malzemelerin, aletlerin ve sistemlerin metrenin milyarda biri büyüklüğünde tarif edildiği, üretildiği, uygulamaya sokulduğu bir bilim dalıdır [40]. Bu bilim dalı sadece minyatürleşme demek değil, aynı zamanda atom ve moleküllerle oynanarak nanomalzeme ve nanosistemlerin özelliklerinin kontrol edilmesidir [41]. 100 nm'nin altındaki (özellikle 10 nm'nin altındaki) bir sistemde, yüksek esneklik, termal ve optik özelliklerinde dikkate değer değişiklikler, yüksek reaktivite ve katalitik aktivite, daha hızlı elektron/iyon transferi gibi özellikler gözlenir [42].

Nanomateriyaller, biyomoleküllerle birlikte birçok biyoanalitik uygulamada kullanılmaktadır. Nanomateriyallerin elektroanalizlerde kullanılmalarının sağladığı bazı avantajlar şunlardır: Elektrot yüzeyine immobilize edilmeleri büyük yüzey alanı ve düzgün iletkenlik sağlar, moleküler ve biyomoleküler analitlerin duyarlı elektrokimyasal tayinine imkan tanır. Ayrıca, nanopartiküller analitlerin elektrokimyasal tayininde sinyali artıran etkili işaretleyicilerdir. Metal nanopartiküllerin iletkenlik özellikleri, kontrollü elektrokimyasal fonksiyonları ile biyomateriyal yapılarının tasarlanmasına olanak sağlar [43].

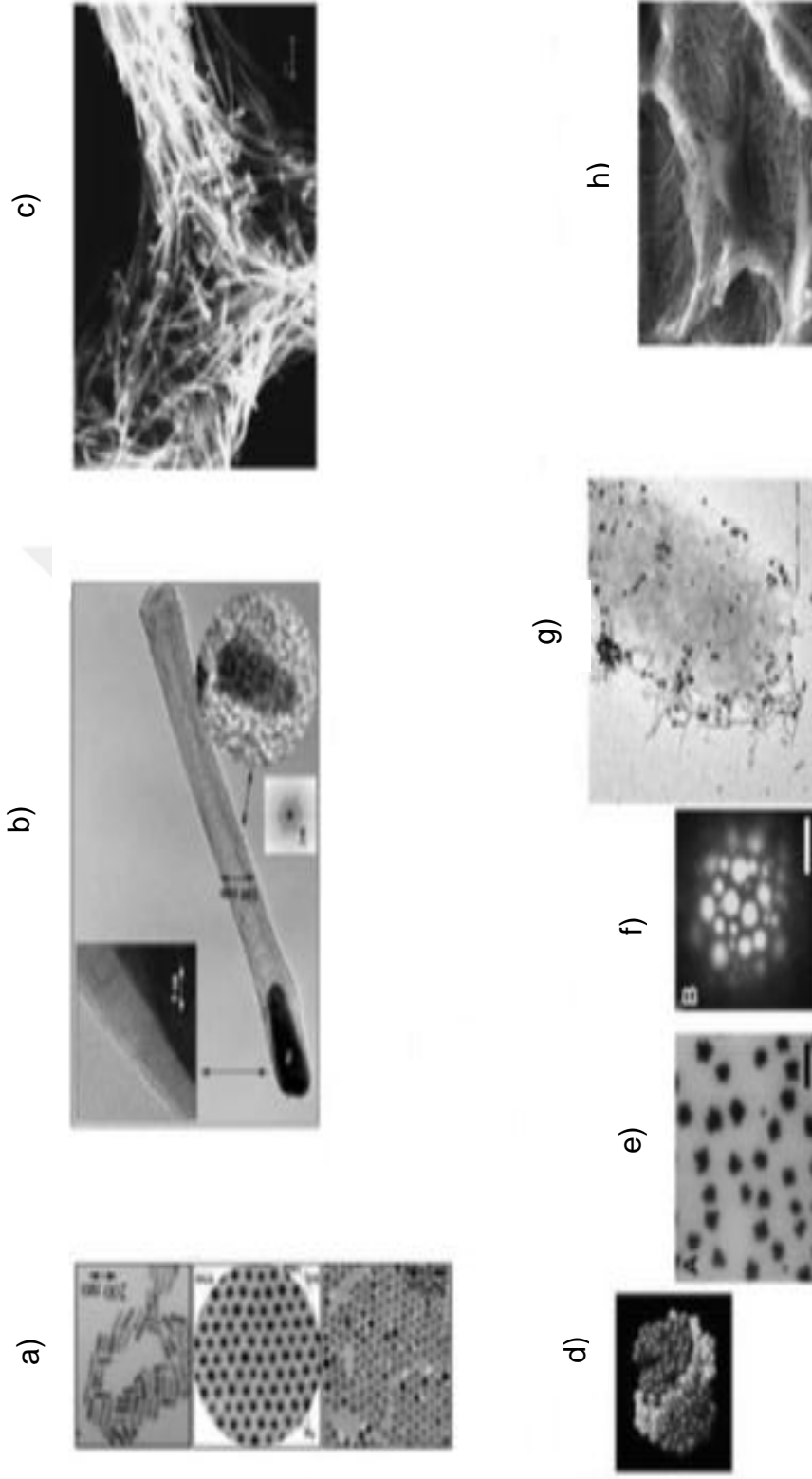
Altın nanopartiküller (AuNp) ise diğer metal nanopartiküller arasında en sıklıkla kullanılan nanopartiküllerdir [44]. Altın nanopartiküller özellikle nanobiyoteknoloji alanında uzun yıllardır kullanılmaktadır. DNA analizlerinde ise son yıllarda önem kazanmıştır [45].

Son yıllardaki çalışmalarda yeşil kimya konusuna artan bir ilgi olduğu görülmektedir. Bunu gerçekleştirmek için toksik olmayan çevreyle dost ve

yenilenebilir kimyasallar kullanılmaktadır. Atık eliminasyonu ya da minimizasyonu yolunda çalışmalar yapılmaktadır. Bu strateji Altın nanopartikül sentezi amacıyla da kullanılmaya başlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda kitosan ve sükroz gibi karbohidratlar indirgeyici/stabilize edici ajan olarak kullanılmıştır. Altın nanopartikül sentezi için kullanılan ajanların bir diğer grubu ise polimerlerdir. Çünkü homopolimerin ya da blok kopolimerin az bir derişimi ile sitrat gibi bilinen ajanlarla hazırlananlara göre çok daha kararlı nanopartiküller sentezlemek mümkündür.

Altın nanopartiküller iyi bir biyouyumluluğa sahip olmaları ve kendilerine özgü yapısal, elektronik, optik ve katalitik özelliklerinden dolayı biyosensörler, kimyasal sensörler ve elektrokatalizörler için ilgi çekici materyaller olmuştur. Son yıllarda biyosensör, kimyasal sensör hazırlanması gibi çalışmalarda kullanımları yaygınlaşmıştır [46]. Ayrıca AuNp'ler moleküllerin aktivitelerini kaybetmeden immobilizasyonlarının kararlı bir şekilde gerçekleştirilmesinde önemlidir.

Elektrokimyasal enzimatik sensörlerde redoks enzim ile elektrot arasındaki direkt elektron transferini sağlarlar. Bir diğer önemli özellikleri de biyokimyasal reaksiyonlar için anlamı büyük olan H_2O_2 , O_2 ve nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) gibi moleküllerin elektrokatalizini zenginleştirmeleridir [47]. Biyolojik sistemlerle aynı boyutlardaki nanomateryaller Şekil 1.2.' de verilmiştir [48].



Şekil 1.2. Biyolojik sistemlerle aynı boyutlardaki nanomateriyaller { a) AuNp (çap:37 nm), b) karbon nanotüpler (CNT; çap: 200 nm), c) CNT demetleri, d) DNA, e) akciğer sürfaktant vezikülü, f) lipozomlar, g) CNT ve AuNp vasıtasıyla transfekte edilmiş gram negatif

1.6. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada glikoza duyarlı enzim içermeyen yeni bir potansiyometrik sensör geliştirilmiştir. Tez çalışmaları kapsamında altın nanopartiküller indirgeyici özellikte olan bir polimer yardımıyla termal yöntemle sentezlenmiştir ve bu nanopartiküllerin yüzeyleri farklı moleküler ajanlarla modifiye edilmiştir. Modifiye edilmiş altın nanopartiküller kullanılarak yeni bir modifiye edilmiş camı karbon elektrot hazırlanmıştır ve bu elektrotlar potansiyometrik yöntemle glikoz belirlenmesinde kullanılmıştır. Bu amaçla Au^{+3} iyonları kitosan ile indirgenerek altın nanopartiküller elde edilmiştir ve nanopartiküllerin yüzeyleri 1-dekantiyol (DT) ve 4-merkaptofenil boronik asit (MFB) ile modifiye edilerek camı karbon elektrot üzerine immobilize edilmiştir. Hazırlanan bu modifiye elektrotun glikoz tayininde kullanılabilmesi için en iyi çalışma koşulları araştırılmıştır. Biyolojik sıvılarda olabilecek muhtemel girişimlerin etkileri incelenmiş ve hazırlanan bu modifiye elektrotla biyolojik sıvıda (kanda) glikoz tayini yapılmıştır.

Enzimatik sensörlerin en ciddi problemi; pH sıcaklık, substrat derişimi vb. etkenler tarafından kolayca etkilenecek enzim aktivitesinin yok olmasıdır. Ayrıca yüksek maliyette olmaları da enzimler için bir dezavantajdır. Endüstriyel ve klinik uygulamalar için daha ideal sensörler geliştirmek için araştırmaların çoğu enzim içermeyen sensörler üzerine yoğunlaşmıştır. Bu sensörler çok kararlı ve enzimatik biyoaktivite içermez. Bu nedenle bu çalışmada glikoz sensörün enzimsiz hazırlanması ve potansiyometrik tayini açısından diğer çalışmalardan farklıdır.

Literatürde enzim içermeyen potansiyometrik glikoz sensörler ile ilgili az sayıda çalışma mevcuttur. Yapılan çalışmada altın nanopartikül destekli yeni bir enzimsiz glikoz sensör geliştirilmiştir ve glikoza karşı olan cevabı incelenmiştir. Ayrıca çalışmanın literatürde az sayıda olan enzimsiz glikoz sensörler için bir alternatif oluşturacağı düşünülmektedir.



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar aşağıda verilmiştir.

- Altın (III) klorür = %99.99, Sigma Aldrich
- 1- Dekantiyol = %95, Fluka
- 4- Merkaptofenil boronik asit = %90, Sigma Aldrich
- Asetik asit = %100, Sigma Aldrich
- Etil Alkol = %100, Sigma Aldrich
- Askorbik asit = Sigma Aldrich
- Glikoz monohidrat = Sigma Aldrich
- Fruktoz, Galaktoz = Sigma Aldrich
- Borik asit, Ürik asit, Dopamin = Merck
- Kitosan = Düşük molekül ağırlıklı, Sigma Aldrich
- Sodyum hidroksit = Sigma Aldrich

2.2. Cihazlar

2.2.1. Elektrokimyasal Analiz Cihazı

Potansiyometrik ölçme işlemlerinde Gamry Instruments Reference Potentiostat/Galvanostat/ZRA elektrokimyasal analiz cihazı kullanılmıştır.

2.2.2. Hücre ve elektrotlar

Potansiyometrik ölçme işlemlerinde iki elektrotlu ölçme sistemi kullanılmıştır.

- Referans elektrot olarak CHI111 Ag/AgCl elektrot.
- Çalışma elektrodu olarak altın nanopartikül ile kaplanmış CH104 camı karbon elektrot kullanılmıştır.

Potentiostat analiz cihazının kalibrasyonu Gamry Instruments Universal Dummy Cell III marka entegre ile yapıldı.

2.2.3. pH metre

Çözelti pH'larının ölçülmesinde Hanna Instruments HI 2211 pH metre kullanılmıştır.

2.2.4. Mikropipet

Çözeltilerin hazırlanmasında 0.5 – 10 µL, 10 – 100 µL, 100 – 1000 µL aralığında ± 0.05 µL hassasiyeti olan Thermo Scientific marka mikropipetler kullanılmıştır.

2.2.5. Ultra Saf su

Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan ultra saf su MILLIPORE Simplicity System marka saf su cihazından sağlanmıştır.

2.2.6. Santrifüj

Karışımları ayırmak için Hettich Zentrifugen santrifüj cihazı kullanılmıştır.

2.2.7. Ultrasonik banyo

Elektrot temizliği ve partiküllerin homojen dağılmasını sağlamak için kullanılan ultrasonik banyo Bandelin Sonorex markadır.

2.2.8. UV- Görünür Bölge Spektrofotometresi

Altın nanopartiküllerin karakterizasyonu için Perkin Elmer Lambda 25 marka UV-Görünür bölge spektrofotometresi kullanılmıştır.

2.2.9. Zeta Potansiyel Ölçümleri

Hazırlanan altın nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri ve hidrodinamik çapları Malvern Zeta Sizer kullanılarak belirlenmiştir.

2.3. Kullanılan Çözeltiler

2.3.1. Borik asit/borat tampon çözeltisi

Katı borik asitten belli bir miktar tartılıp saf suda çözüldü, hazırlanan çözeltinin pH'sı 0.1 M NaOH ile 9 değerine ayarlandı. Tampon çözelti buzdolabında +4°C'ta saklandı.

2.3.2. Glikoz çözeltisi

Katı glikoz monohidrattan belli bir miktar tartılarak derişimi 0.5 M olacak şekilde 5 mL çözeltisi hazırlandı.

2.3.3. Kitosan çözeltisi

Katı kitosandan 1 g tartılmış ve %2' lik 100 mL asetik asit çözeltisi içinde çözülerek %1 lik kitosan çözeltisi hazırlanmıştır.

2.3.4. Altın (III) klorür çözeltisi

%30'luk altın (III) klorürden 35 µL alınıp 5 mL saf su ile seyreltilerek 10^{-2} M stok altın çözeltisi hazırlanmıştır.

2.3.5. Altın nanopartikül eldesi

Vial içerisine %1'lik 2 mL kitosan çözeltisi, 7 mL saf su konularak su banyosunda kaynama sıcaklığına kadar bekletilmiştir. Kaynama sıcaklığında 1

mL stok altın çözeltisinden eklenmiş ve 15 dk bekleme süresi sonunda şarap kırmızısı bir renk gözlenmiştir. Daha sonra çöken altın nanopartiküller santrifüjlenerek 2 defa su ile yıkanmıştır.

2.3.6. 4-Merkaptofenil boronik asit (MFB) çözeltisi

Katı 4-merkaptofenil boronik asitten belirli bir miktar tartılmış ve 2 mL etanolde çözülerek 20 mM derişimde çözelti hazırlanmıştır.

2.3.7. 4-Merkaptofenil boronik asit ve 1-Dekantiyol çözeltisi (MFB/DT)

Katı 4-merkaptofenil boronik asitten belirli bir miktar tartıldı ve 10 mM olacak şekilde 2 mL etanolde çözülmüştür. Daha sonra üzerine 10 mM olacak şekilde 1-dekantiyolden ilave edilmiş ve homojen çözelti oluşması için 1-2 dakika karıştırıcıda bekletilmiştir ve aynı yol izlenerek farklı derişimlerde merkaptofenil boronik asit ve dekantiyol (MFB/DT) çözeltileri hazırlandı.

2.3.8. Altın nanopartikül modifikasyonu:

Sentezlenen altın nanopartiküller 8000 devir/dakikada santrifüjlenerek ayrılmış 2'şer defa su ve etanol ile yıkanmıştır. Bu AuNp'ler 10 mM DT ve 10 mM MFB içeren 2 mL etanol çözeltisine ilave edilmiş ve 24 saat süreyle 100 devir/dak. hızında çalkalanmıştır. 24 saat sonunda modifiye edilmiş partiküller santrifüjlenerek ayrılmış ve aynı yıkama işlemlerine tabi tutulmuştur.

2.4. Modifiye Elektrot Hazırlanması

Camsı karbon elektrot üzerine modifiye edilmiş altın nanopartikül çözeltisinden 3 µL damlatılıp kurutulmuştur ve bu işlem 5 defa tekrarlanmıştır. Merkaptofenil boronik asit ve dekantiyol karışımı ile modifiye edilmiş altın nanopartiküller elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Modifiye edilen elektrot potansiyometrik yöntemle glikoz ölçümlerinde kullanılmıştır.

2.5. Potansiyometrik Ölçümler

Potansiyometrik ölçümler iki elektrotlu sistem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Modifiye elektrot çalışma elektrot ve Ag/AgCl elektrot referans elektrot olarak kullanılmıştır. İkili elektrot sistemi 5 mL borik asit tamponu içeren elektroliz hücresine daldırılmış ve çözelti sabit karıştırma hızında karıştırılmıştır. Ölçümler açık devre potansiyelinde (open circuit potential) gerçekleştirilmiştir. Çözeltiye glikoz eklenmeden önce iki elektrot arasındaki potansiyel değeri sabitleninceye kadar beklenmiş ve glikoz eklenmeden ve eklendikten sonraki potansiyel farkları takip edilerek ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

3.1. Altın Nanopartikül Sentezi

Vial içerisine %1' lik 2 mL kitosan çözeltisi konumuő ve üzerine 7 mL saf su eklenerek su banyosunda kaynama sıcaklığına gelinceye kadar bekletilmiştir. Kaynama sıcaklığında 1 mL stok altın çözeltisinden eklenerek 15 dk bekletilmiőt sarı renkli altın-kitosan çözeltisinin rengi bekleme süresi sonunda kırmızıya dönüőmüőtür (Şekil 3.1). Daha sonra bu çözelti 8000 devir/dak. devirde 10 dakika süreyle 2 kez santrifüjlenerek dipte toplanan kırmızı renkli partiküller çözeltiden ayrılmıőt ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

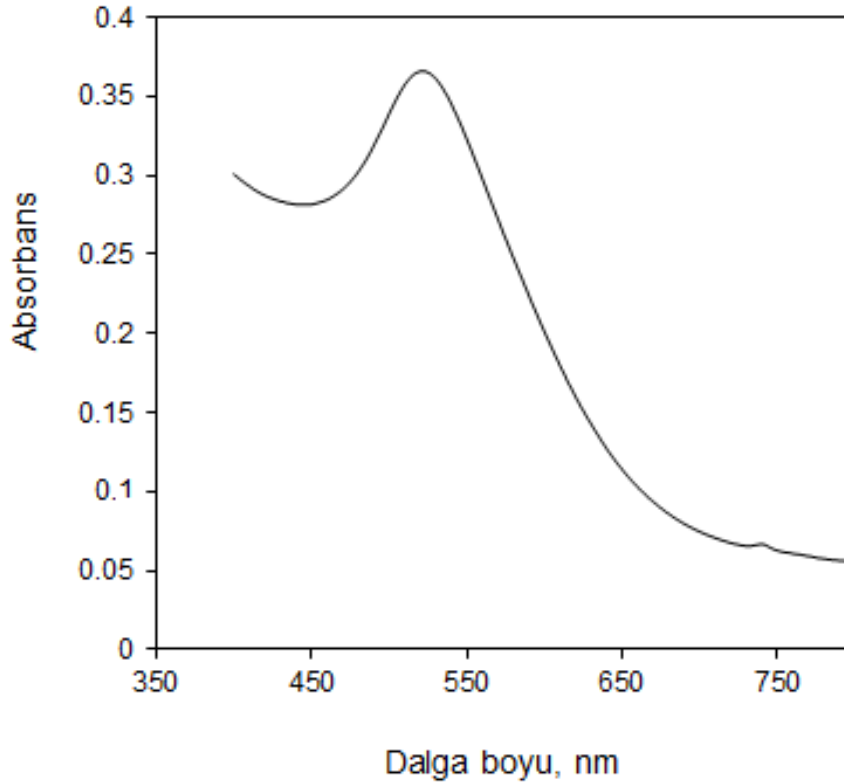


Şekil 3.1.Sentezlenen altın nanopartikül (Ch/AuNp) özeltisi

3.2. Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sentezlenen altın nanopartikül-kitosan kompozit (Ch/AuNp) UV-Vis spektrumu, FTIR, TEM, zeta potansiyel ve SEM yöntemleriyle karakterize edilmiştir.

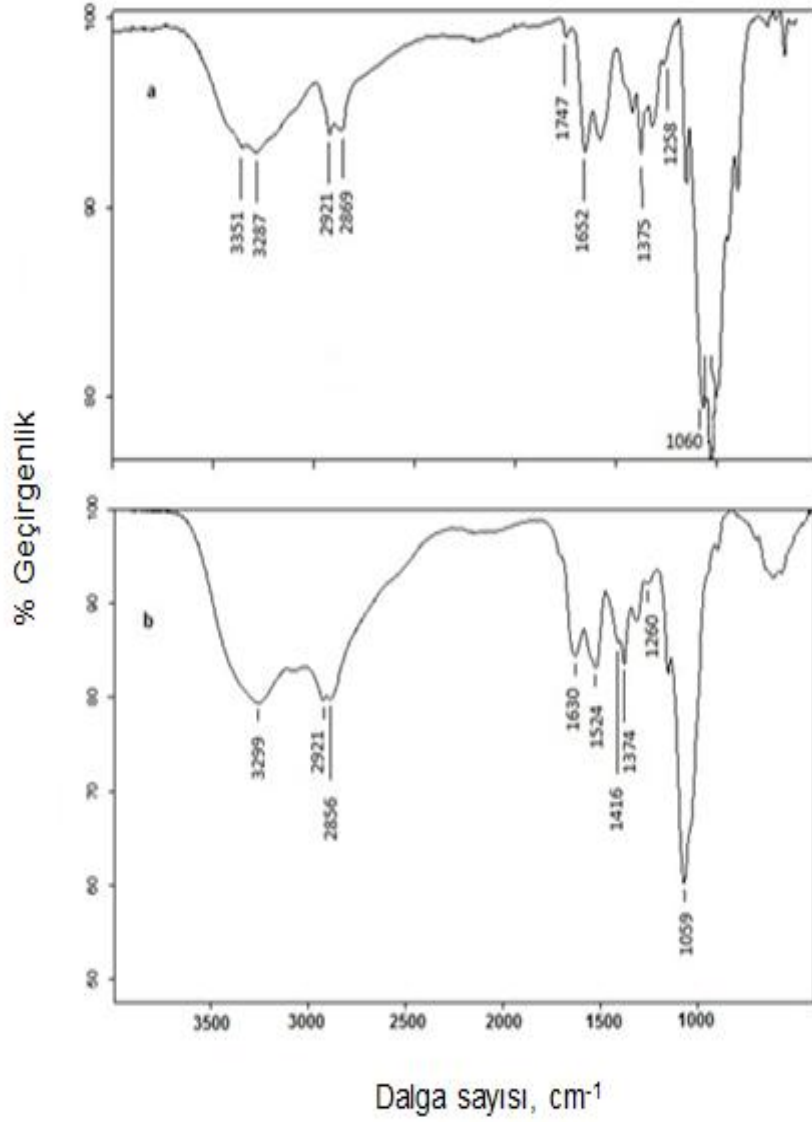
Hazırlanan altın nanopartikül-kitosan kompozitin UV-vis spektrumunda yaklaşık 520 nm'de görülen pik nanoboyutta altına ait karakteristik piktir (Şekil 3.2). Ayrıca spektrumda tek absorpsiyon bandının görülmesi yapının küresel bir geometride olabileceğini göstermektedir [49,50].



Şekil 3.2. Ch/AuNp ait UV-vis spektrumu

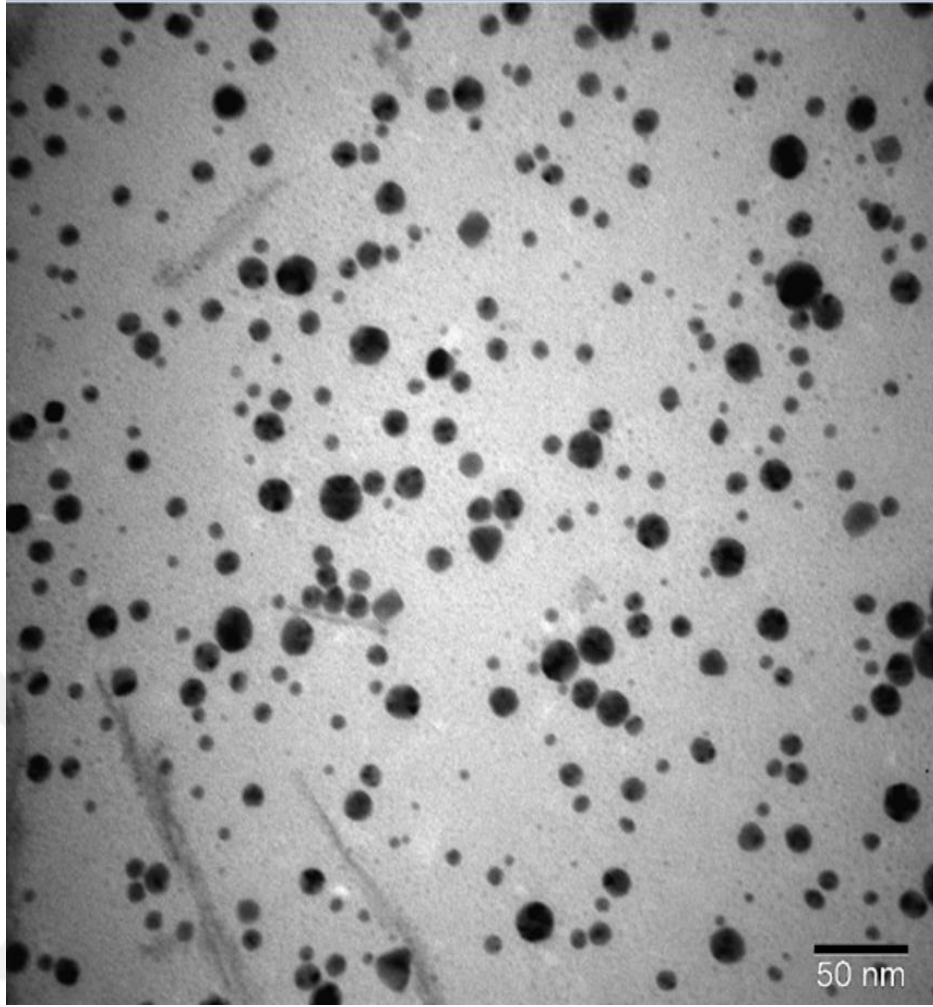
Hazırlanan altın nanopartikül-kitosan kompozit (Ch/AuNp) santrifüjlenerek 2 defa su ile yıkanmıştır. Sentez ortamından ayrılan ve yıkanan kompozitin FTIR spektrumu alınmıştır. FTIR spektrumunda kitosana ait geçişlerin görülmesi AuNp etrafının kitosan ile kaplı olabileceğini desteklemektedir.

Hazırlanan altın nanopartiküller yüzeyinde kitosan polimerinin bulunup bulunmadığını belirlemek için kitosanın ve kitosan kaplı olduğu düşünülen altın nanopartiküllerin FTIR spektrumları çekilmiştir (Şekil 3.3). Kitosanın FTIR spektrumunda 3200-3400 cm^{-1} arasında görülen pikler kitosanın yapısında bulunan -OH ve -NH fonksiyonel gruplarına ait piklerdir. 2921 ve 2856 cm^{-1} de görülen pikler -CH₂ gruplarına ait piklerdir. Kitosan, kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilmektedir ve bundan dolayı 1652' de görülen pik amit gruplarında bulunan -C=O fonksiyonel gruplarına ait piklerdir. 1375 ve 1258 cm^{-1} de görülen pikler ise -CN ve -C-O-C- gruplarına ait gerilme pikleridir. Kitosana ait temel piklerin altın nanopartiküllerin FTIR spektrumunda da var olduğu görülmektedir. Fakat bazı piklerin yerlerinde kaymaların olduğu görülmektedir. Bu kaymaların altın iyonlarının indirgenmesinde rol oynayan ve nanopartikül oluşumundan sorumlu kitosana ait -OH ve -NH₂ gruplarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu sonuçlar oluşan nanopartiküllerin yüzeylerinin kitosan ile kaplandığını göstermiştir (Ch/AuNp).



Şekil 3.3. FTIR spektrumu a) Kitosan, b) Kitosan kaplı altın nanopartikül (Ch/AuNp)

Ch/AuNp geometrik şekli ve boyut dağılımının belirlenmesi amacıyla TEM görüntüleri de alınmıştır. Şekil 3.4' de görüldüğü gibi Ch/AuNp'nin küresel bir yapıda olduğu ve boyutlarının 25 nm'nin altında olduğu belirlenmiştir.



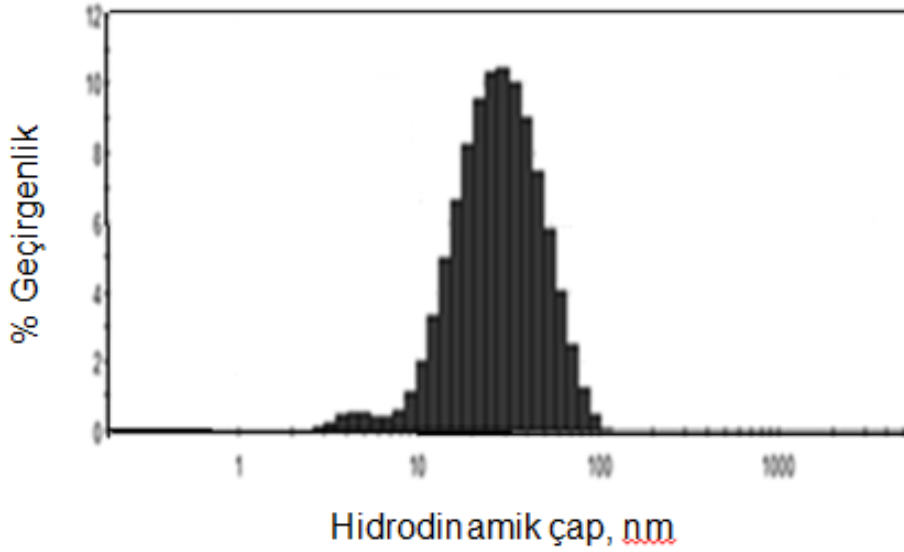
Şekil 3.4. Ch/AuNp ait TEM görüntüsü

Nanopartiküllerin en çok karşılaşılan sıkıntıları kararlılıklarıdır. Zeta potansiyelinin ölçülmesi, kolloidal dispersiyonun saklama stabilitesi hakkında tahminde bulunmaya olanak vermektedir. Genel olarak, yüklü partiküllerde (yüksek zeta potansiyeli), elektriksel itme nedeniyle, partikül agregasyonunun meydana gelme ihtimali daha azdır. Nanopartiküllerin zeta potansiyellerine bakılarak kararlılıkları ve topaklaşma eğilimleri elde edilebilir. Zeta potansiyeli 20-30 mV arasında kararlı, 60 mV üzerinde ise iyi bir kararlılığa sahip olduğu

söylenbilir. Sentezlenen nanopartiküller bu değerler aralığında değilse kararsızdır ve topaklaşarak çökelme eğilimindedirler.

Sentezlediğimiz altın nanopartiküllerin zeta potansiyelleri (+) 42.5 mV seviyesindedir. Partiküllerin zeta potansiyeli çözelti içinde kararlı bir yapıda oldukları ve bir araya gelerek topaklaşmasının (agregasyon) mümkün olduğunca az olabileceğini göstermektedir. Potansiyelin + olması nedeniyle katyonik bir polimer olan kitosan ile altın partiküllerin çevrelendiği ve bu pozitif yüklerin birbirini itmesi sonucu agregasyonun olmadığı partiküllerin çözeltide kararlı bir şekilde kalabildiği düşünülmektedir.

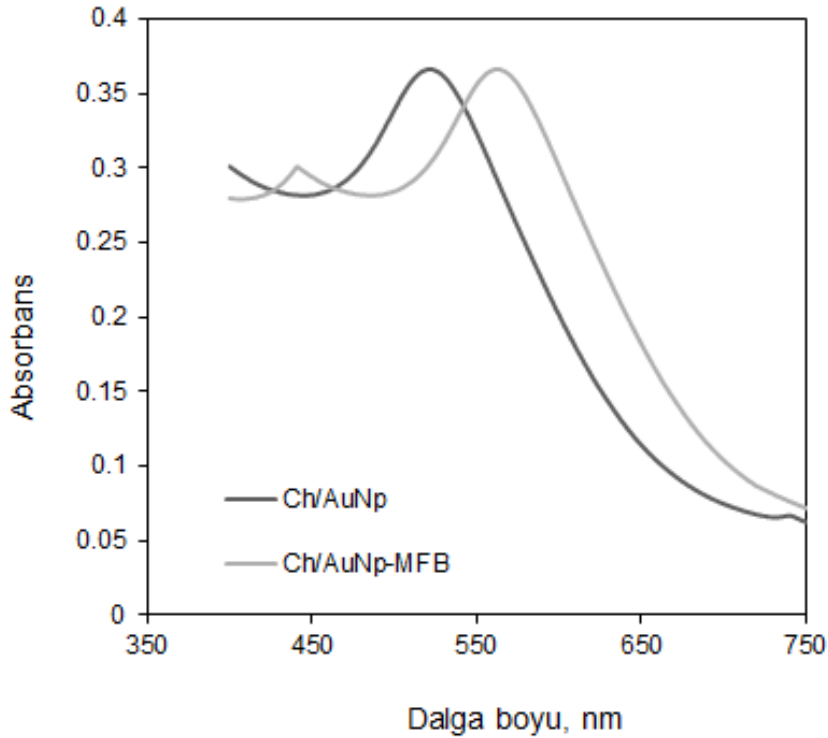
Ch/AuNp hidrodinamik çapı ise 46.3 nm olarak ölçülmüştür (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Ch/AuNp ait partikül büyüklüğü dağılımı

3.3. Altın Nanopartikül Kitosan Kompozit Yüzeyinin Modifikasyonu

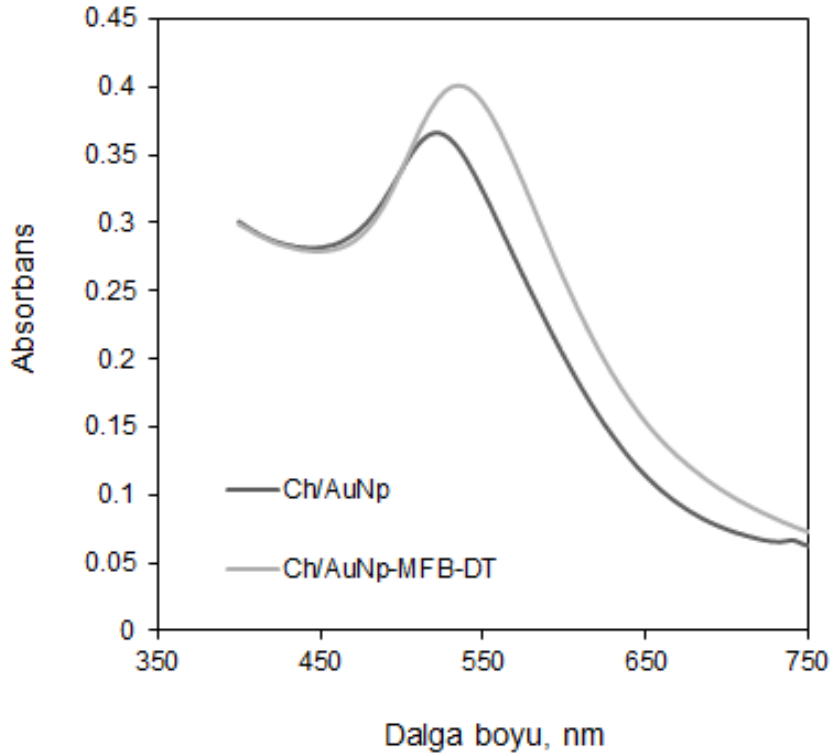
Sentezlenen ve karakterizasyonu yapılan Ch/AuNp kompozitinin potansiyometrik yöntemle glikoz tayininde kullanılabilmesi için nanopartikül yüzeyinin glikoza karşı duyarlı olan boronik asit gurubunu içeren kimyasallarla modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Ch/AuNp kompoziti 20 mM 4-merkaptofenil boronik asit içeren etanol içerisinde 24 saat sabit çalkalama hızında çalkalanmıştır. Daha sonra altın nanopartikül yüzeyine bağlanmamış 4-merkaptofenil boronik asit santrifüjlenerek atılmış ve nanopartiküller 2 defa 5 mL etanol ile yıkanmıştır. Altın nanopartiküllerin yüzey modifikasyonunun gerçekleşmesi UV-Vis spektrumları alınarak karakterize edilmiştir.



Şekil 3.6. Ch/AuNp ile modifiye edilmiş Ch/AuNp-MFB UV-vis spektrumu

Ch/AuNp ile modifiye edilmiş Ch/AuNp-MFB UV-vis spektrumları alındığında altın nanopartiküllere spesifik absorpsiyona ait 520 nm dalga boyunda meydana gelen kayma Ch/AuNp yüzeyinde modifikasyonların gerçekleştiğinin bir göstergesidir (Şekil 3.6.).

Ch/AuNp yüzeylerinin diğer bir modifikasyonu ise 10 mM 4-merkaptofenil boronik asit (MFB) ve 10 mM 1-dekantiyolun (DT) 2 mL etanol çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. Yüzey modifikasyonu UV-vis ile karakterize edilmiştir (Şekil 3.7). Altın nanopartiküle ait pikte gözlenen kayma yüzey modifikasyonunun gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 3.7. Ch/AuNp ile modifiye edilmiş Ch/AuNp-MFB-DT UV- vis spektrumu

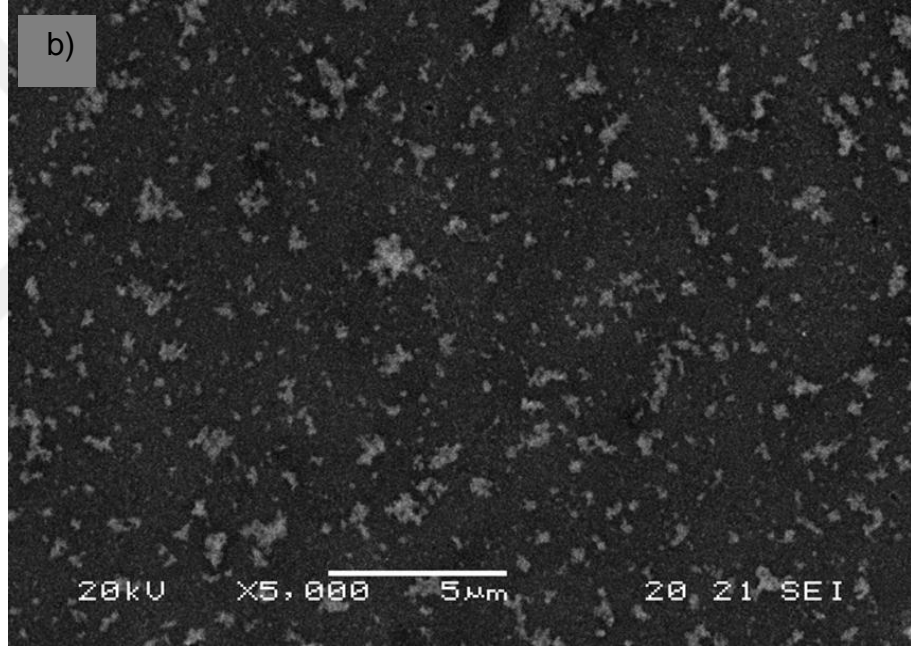
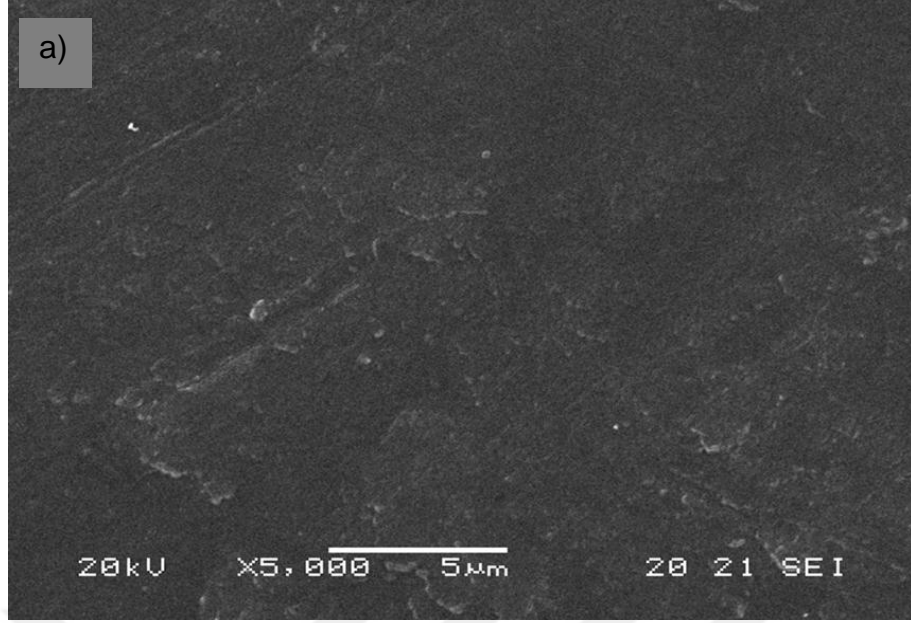
3.4. Elektrot Modifikasyonu

Elektrokimyasal yöntemle glikoz ölçümleri yapılabilmesi için Ch/AuNp-MFB-DT camsı karbon elektrot yüzeyine damlatılıp kurutulmuş ve camsı karbon elektrot yüzeyi modifiye edilmiştir (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. Ch/AuNp-MFB-DT ile modifiye elektrot hazırlanması

Modifiye elektrot yüzeyi taramalı elektron mikroskop (SEM) ile karakterize edilmiştir.

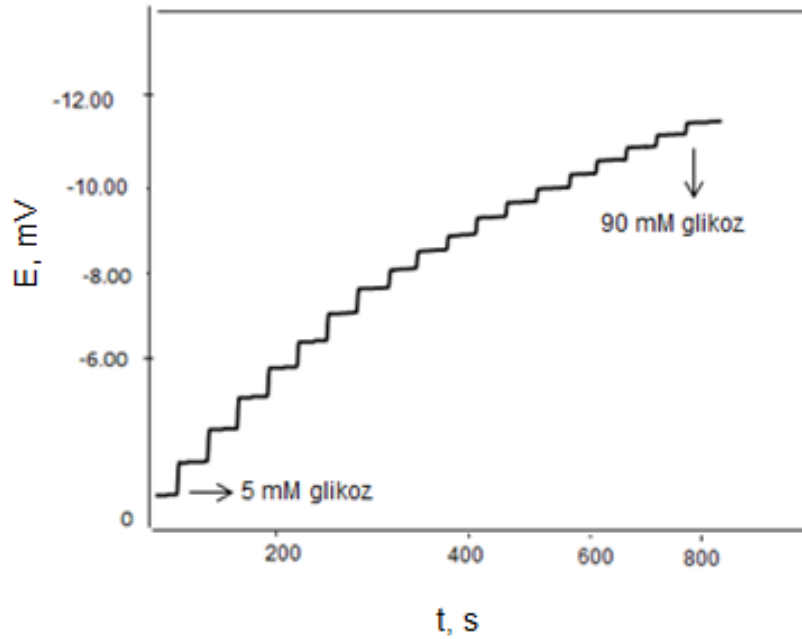


Şekil 3.9. a) Camsı karbon, b) Ch/AuNp-MFB-DT ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyine ait SEM görüntüsü

SEM görüntülerinden nanopartiküllerin elektrot yüzeyine dağıldığı ancak bazı bölgelerde yığılmaların olduğu görülmektedir.

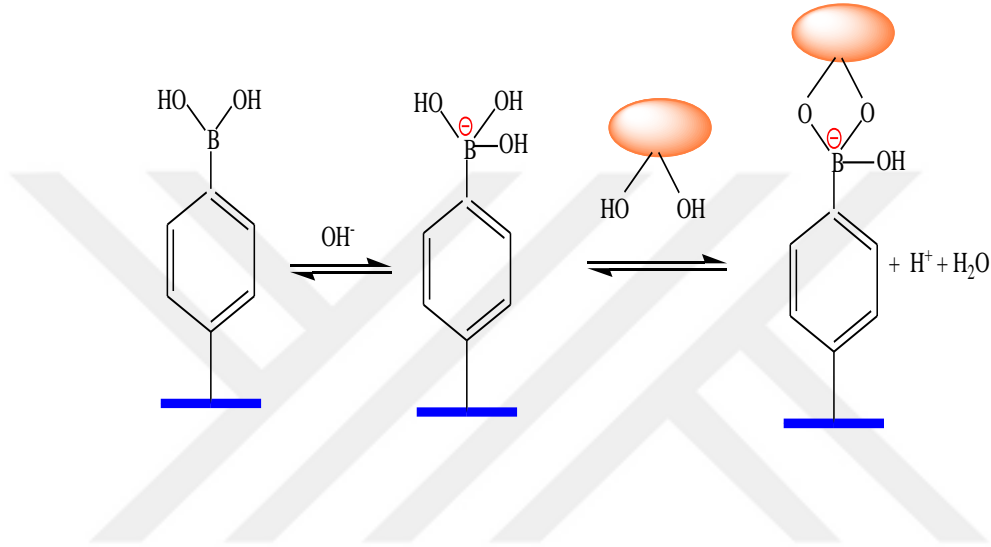
3.5. Ch/AuNp Nanokompozitin Enzimsiz Glikoz Sensör Olarak Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi

Camsı karbon elektrot yüzeyine Ch/AuNp nanokompozitin damlatılıp kurularak elde edilen modifiye elektrot enzimsiz potansiyometrik glikoz ölçümlerinde çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır. Karşılaştırma elektrodu olarak Ag/AgCl elektrotun kullanıldığı 2 elektrotlu sistem ölçümlerde kullanılmıştır. pH=9 borik asit/borat tamponu içine yapılan 5 mM glikoz artışlarında Şekil 3.10' daki gibi potansiyogram elde edilmiştir. Bu veriler ışığında hazırlanan enzimsiz elektrotun glikoz ölçümlerinde kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.



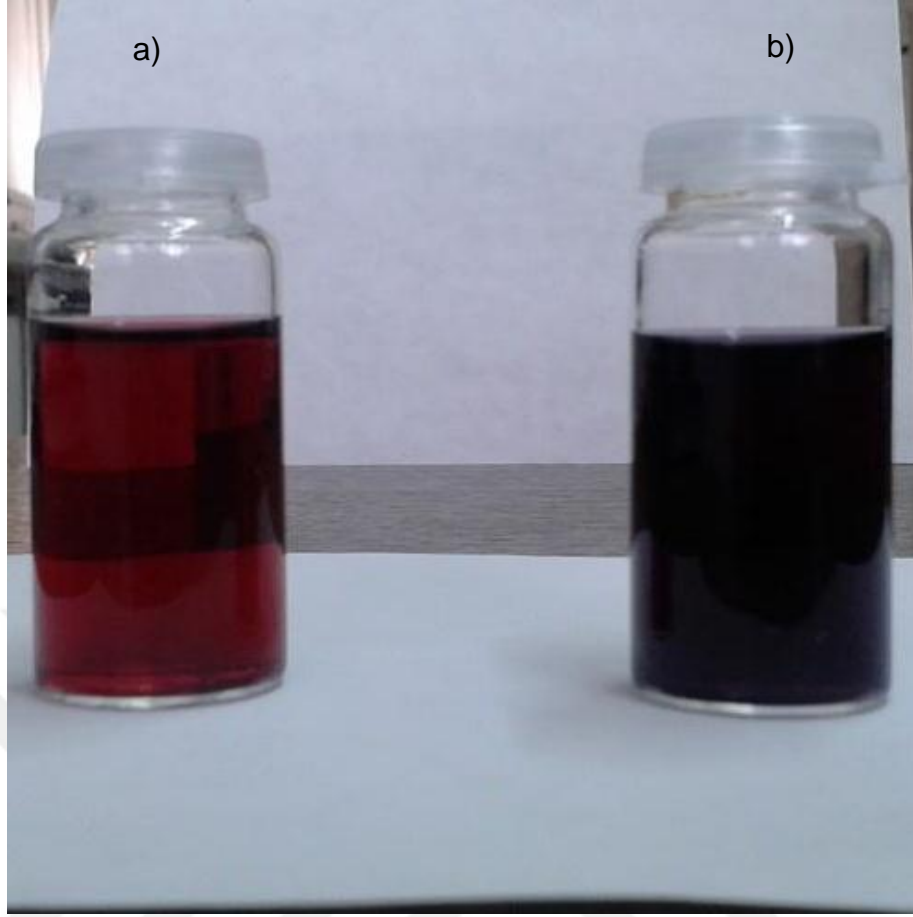
Şekil 3.10. Modifiye elektrotun enzimsiz potansiyometrik glikoz ölçümlerinden elde edilen potansiyogram

Glikoz eklendiğinde potansiyelde meydana gelen bu artışlar glikoz ile boronik asit gruplarının etkileşmesi sonucunda Şekil 3.11’deki gibi H^+ iyonlarının açığa çıkmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. 1,2-diol grupları ile boronik asit gruplarının etkileşme reaksiyonu literatürde de çalışılan araştırma konularından biridir [51].



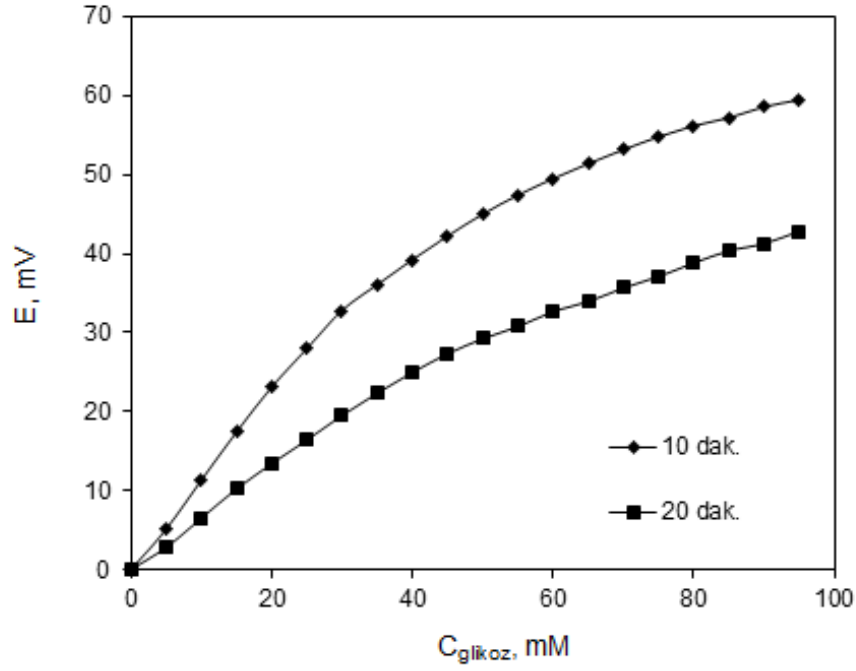
Şekil 3.11. Boronik asit ile glikoz etkileşim reaksiyonu

Glikoz ölçümlerine etki eden farklı parametrelerin etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla potansiyometrik ölçümler farklı boyutlarda olduğu düşünülen altın nanopartiküller kullanılarak denenmiştir. Termal olarak altın nanopartiküller kitosan varlığında kaynama sıcaklığında 10 dakika ve 25 dakika bekleme sürelerinde elde edilmiştir. Farklı sürelerde elde edilen Ch/AuNp kompozitlerin farklı şekil ve boyutlarda olabileceği görüntülerinden anlaşılmaktadır [52] (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. a) 10 dak., b) 20 dak. bekleme sürelerinde elde edilen nanopartiküllere ait görüntü

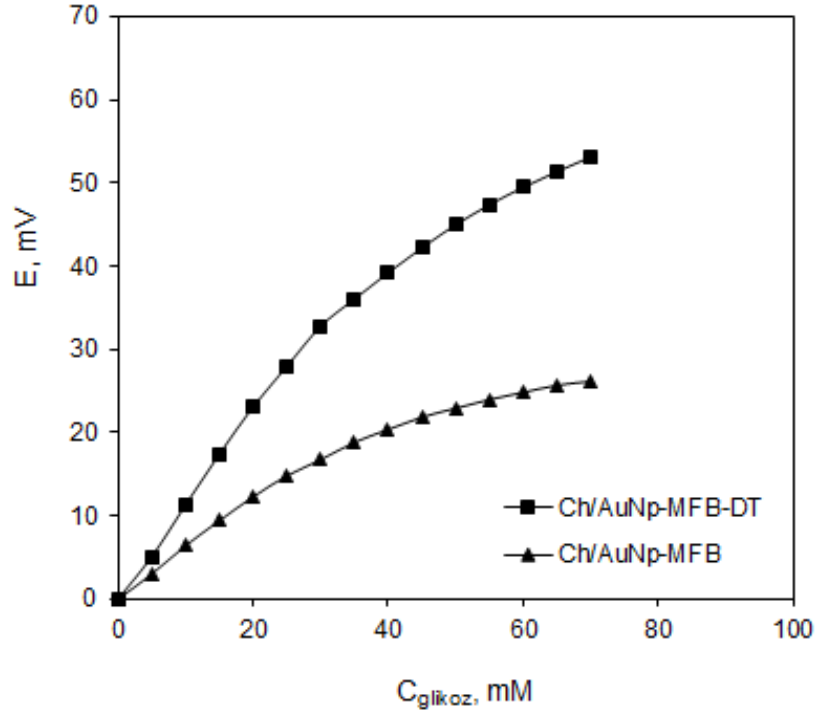
Her iki bekleme süresinde elde edilen Ch/AuNp yüzeyleri daha önce belirtildiği şekilde MFB ve DT karışımı ile modifiye edilmiş ve modifiye elektrot hazırlanmasında kullanılmışlardır. Hazırlanan modifiye elektrotlar ile yapılan potansiyometrik glikoz ölçüm sonuçları Şekil 3.13' de gösterilmektedir.



Şekil 3.13. Farklı bekleme sürelerinde elde edilen Ch/AuNp kullanımı ile potansiyometrik glikoz ölçümleri

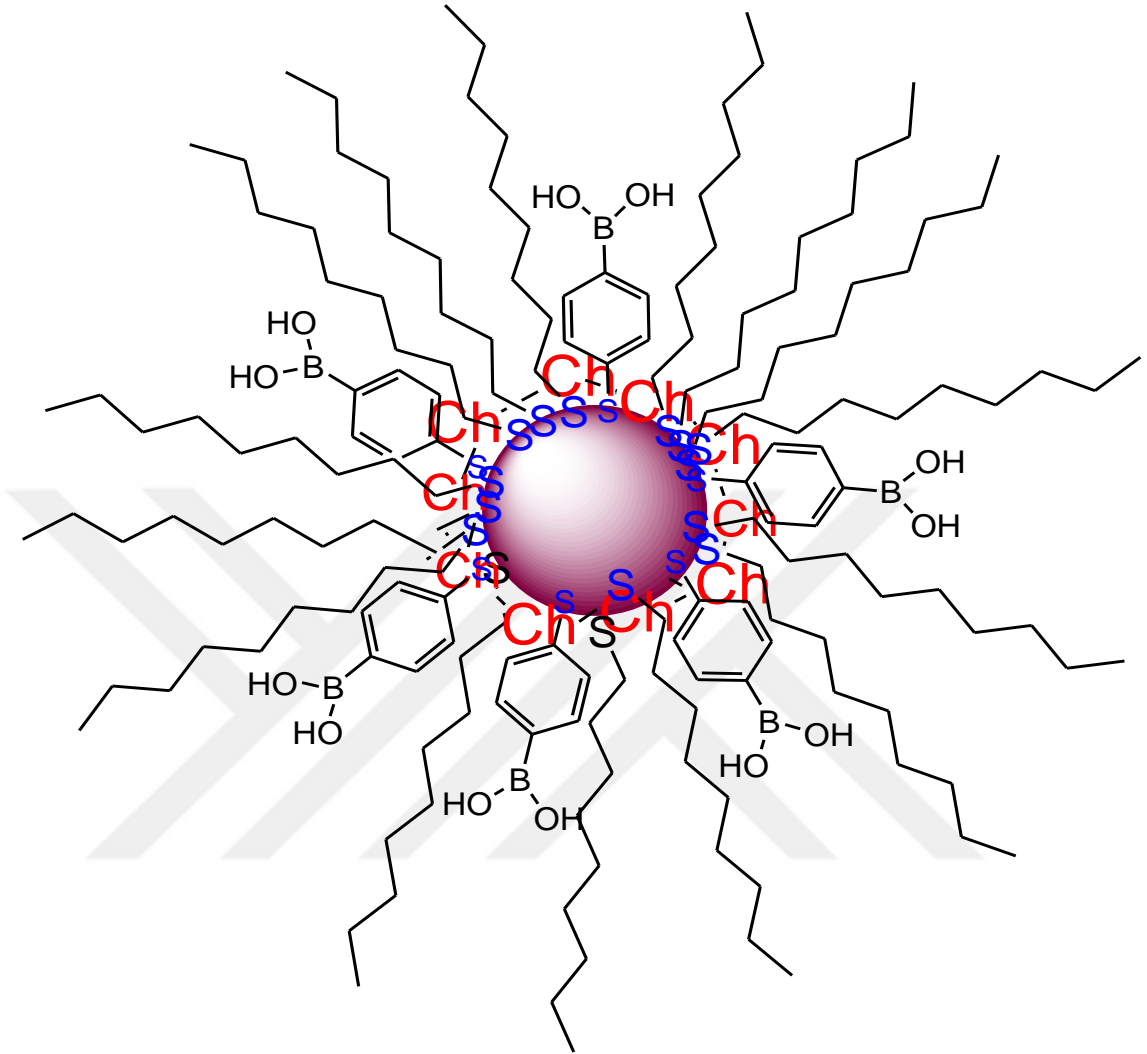
10 dakika bekleme süresi ile elde edilen ve TEM fotoğraflarında küresel yapıda olduğu belirlenen Ch/AuNp kompozitin MFB ve DT ile modifikasyonu sonucunda glikoz ölçümlerinin daha iyi olduğu gözlemlenmiş ve çalışmalara bu şekilde hazırlanmış Ch/AuNp kullanımı ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Ch/AuNp yüzeyinin modifikasyonu 20 mM MFB ve 10 mM MFB - 10 mM DT ile modifiye edilerek kullanılmıştır. Glikoz ölçüm sonuçları MFB ve DT karışımı ile modifikasyonunda sadece MFB modifikasyonuna göre daha iyi sonuçlar elde edildiğini göstermiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Ch/AuNp yüzeyinin MFB ve MFB-DT ile modifikasyonuna ilişkin glikoz ölçüm sonuçları

Modifikasyonda DT gruplarının kullanılması boronik asit gruplarına bağlanan glikoz moleküllerinin tutuklanmasına ve zayıf olabilecek etkileşimlerle çekilen glikoz moleküllerinin yüzeyden ayrılmalarını zorlaştırdığı şeklinde etkisinin olduğu düşünülmektedir. Çalışmalara MFB-DT karışımının kullanılmasıyla devam edilmiştir. Hazırlanan modifiye edilmiş Ch/AuNp (Ch/AuNp-MFB-DT) kompozitin şematik diyagramı Şekil 3.15' de gösterilmiştir.



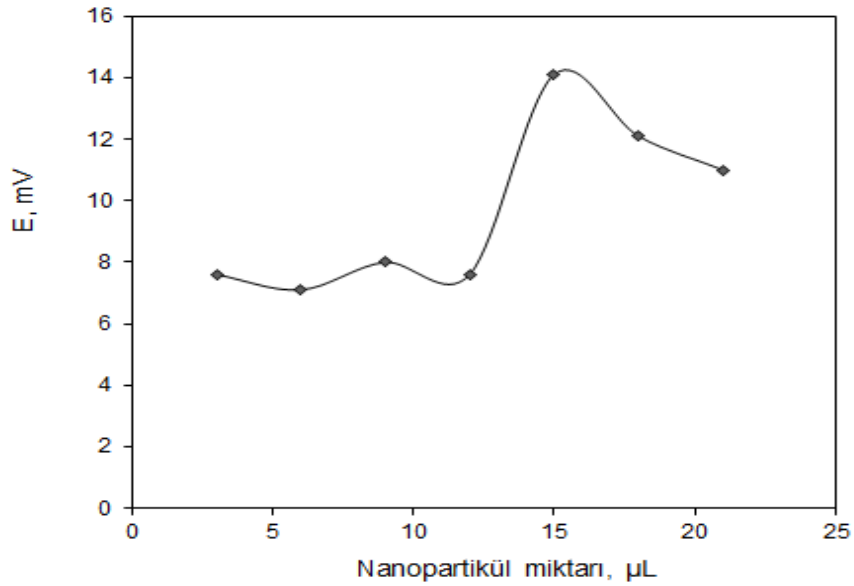
Şekil 3.15. MFB ve DT ile modifiye edilmiş Ch/AuNp (Ch/AuNp-MFB-DT)

şematik gösterimi

3.6. Glikoz Tayini İçin Hazırlanan Enzimsiz Sensörde Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

3.6.1. Altın nanopartiküllerin elektrot yüzeyindeki optimum film kalınlığının belirlenmesi

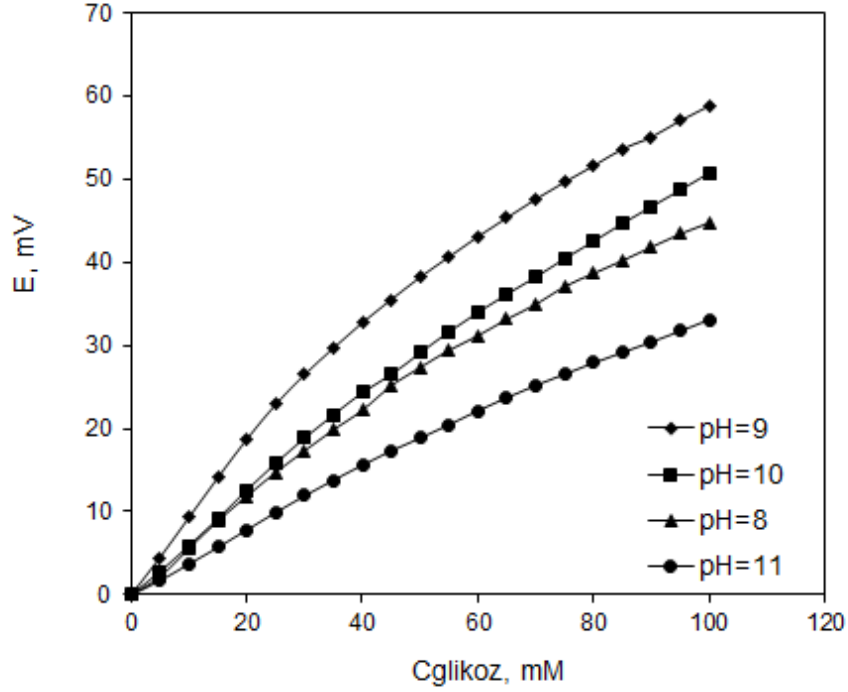
Elektrot modifikasyonunda elektrotun yüzeyinin film tabakasıyla kaplanmasında film kalınlığının elektrokimyasal cevap üzerinde oldukça fazla etkisinin olduğu bilinmektedir. Bu nedenle elektrot yüzeyine damlatılacak Ch/AuNp-MFB-DT'nin optimum damla sayısı belirlenmeye çalışılmıştır. Glikoza verilen en iyi cevap 5 damla (15 μ L) ile optimize edilmiştir (Şekil 3.16). Sonraki aşamalarda elektrot modifikasyonu için 15 μ L Ch/AuNp-MFB-DT damlatılarak devam edilmiştir.



Şekil 3.16. Elektrot yüzeyindeki nanopartikül miktarının glikoz cevabına etkisi
(pH=9, MFB/DT=1/1)

3.6.2. Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

Sensörün performansını etkileyen en önemli faktörlerden biri de çalışma ortamının pH'ıdır. Boronik asit grupları ile diol etkileşimlerinin pH= 6.0-10.0 arasında en iyi olduğu literatürde yapılan çalışmalardan ve daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmalardan bilinmektedir [53]. Bu bilgiler ışığında ortam pH'sının etkisini araştırmak amacıyla pH 8.0 ile pH 11.0 arasında 0.5 M borik asit/borat tampon çözeltilerinde glikoz ilavesinden sonra maksimum potansiyel değerleri ölçülmüş ve pH değerine karşı eklenen glikoz derişimiyle potansiyeldeki değişim değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 3.17). Şekil 3.17' de görüldüğü gibi pH 9.0' da potansiyeldeki değişme çalışılan pH aralığında en yüksek değerde bulunmuş ve sonraki aşamalarda çalışmalar pH 9.0' da gerçekleştirilmiştir.

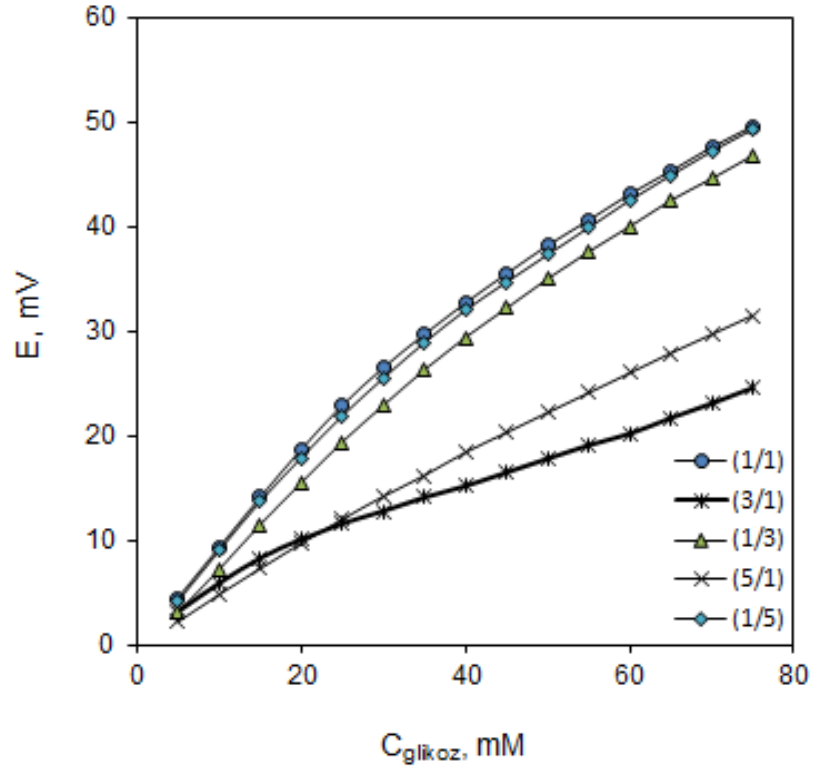


Şekil 3.17. Farklı pH değerlerinde yapılan potansiyometrik glikoz ölçümleri

(Ch/AuNp-MFB-DT= 15 μ L, MFB/DT= 1/1)

3.6.3. Ch/AuNp Modifikasyonunda (MFB/DT) Molar Oranının Belirlenmesi

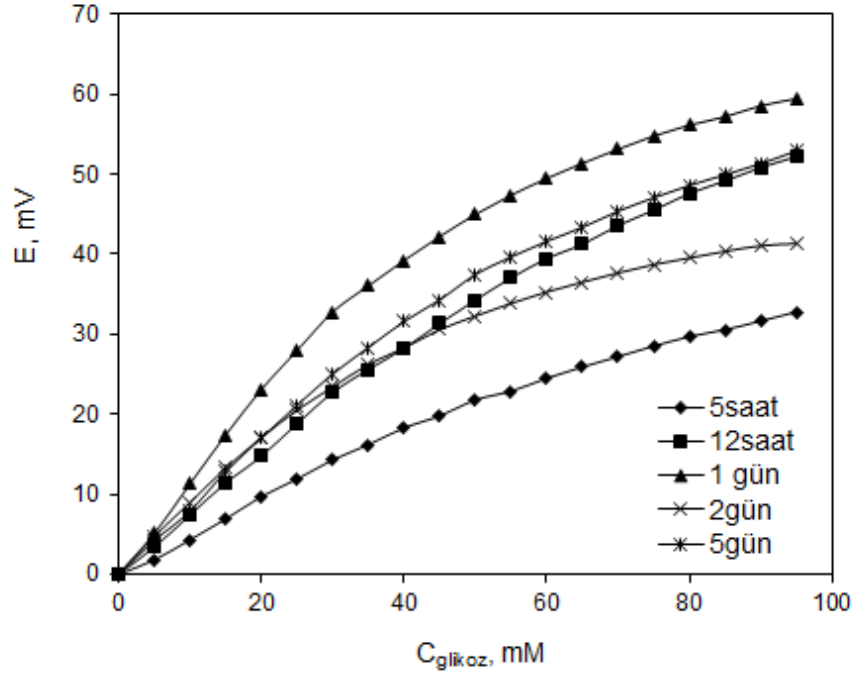
Ch/AuNp yüzeyinin MFB/DT ile modifikasyonunda glikoz için en iyi sonuçların alındığı molar oranlar belirlenmiştir. Bunun için kompozit yüzeyi 2 mL etanol içinde farklı molar oranlarında hazırlanan MFB/DT içinde 1 gece bekletilerek modifiye edilmiştir. Sonuçlar en iyi glikoz cevabının MFB/DT oranının 1/1 olduğunu göstermiştir (Şekil 3.18).



Şekil 3.18. MFB/DT molar oranının glikoz cevabına etkisi

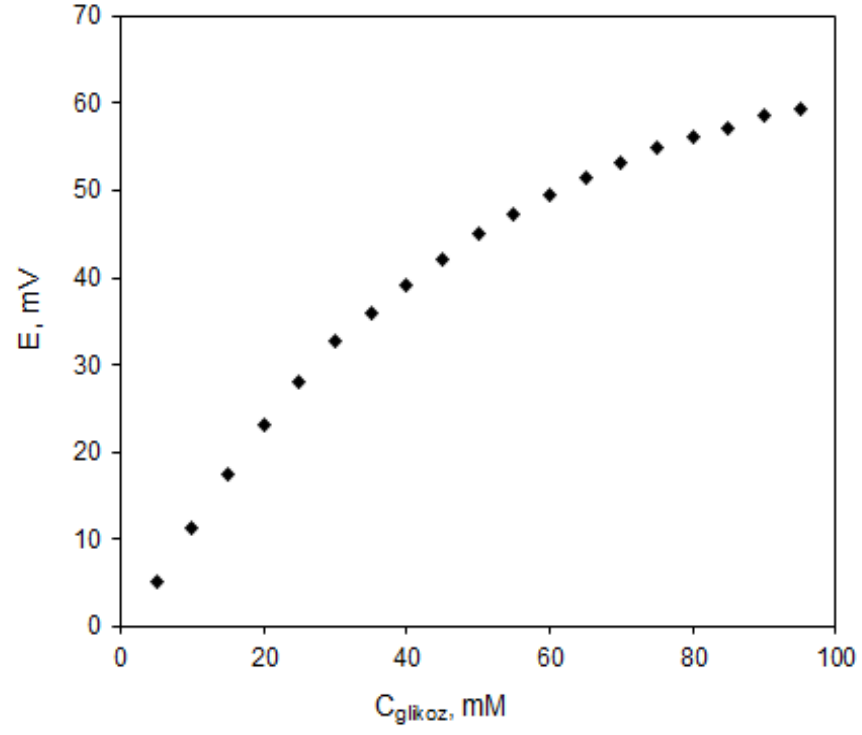
3.6.4. Modifiye Ch/AuNp Hazırlanmasında Etkileşim Süresinin Belirlenmesi

Ch/AuNp ile 1/1 oranında optimizasyonu yapılan MFB/DT'nin 2 mL etanolde etkileşimi farklı sürelerde denenmiş ve glikoz cevabı için en iyi etkileşim süresi 1 gün olarak belirlenmiştir (Şekil 3.19). Etkileşim süresi 1 günün üstünde yapıldığında glikoz cevabının azaldığı görülmektedir. Bu sonuçlar etkileşim süresi 1 günün üstünde yapıldığında Ch/AuNp yüzeyine bağlanan MFB veya DT' nin yüzeyi terk ettiği ve glikozla etkileşimin düşük olduğunu düşündürmüştür.

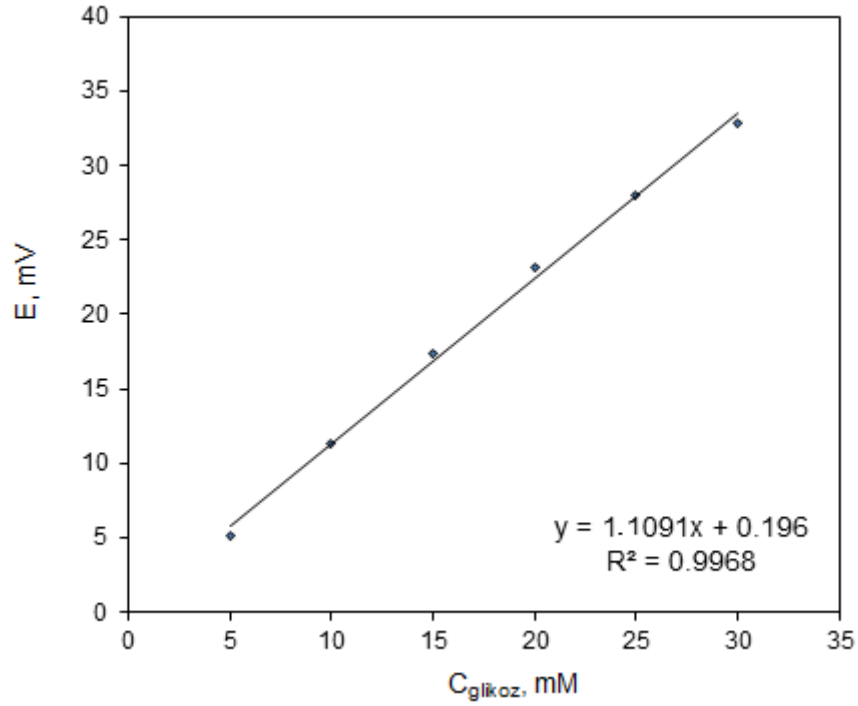


Şekil 3.19. Ch/AuNp ile MFB/DT etkileşim süresinin glikoz ölçümüne etkisi

Hazırlanan enzim içermeyen glikoz sensörün glikoza karşı cevabının optimum koşulları belirlendikten sonra sensörün doğrusal çalışma aralığı belirlenmiştir. Sağlanan şartlarda glikoz derişimiyle açık devre potansiyel değişimi takip edilmiş ve sensörün 5-90 mM glikoz derişimlerinde davranışı incelenmiştir. Enzimsiz sensör 5-30 mM glikoz derişimlerinde doğrusal bir değişim göstermiş ve doğrusal bölge sensörün çalıştığı glikoz derişim aralığı olarak belirlenmiştir.



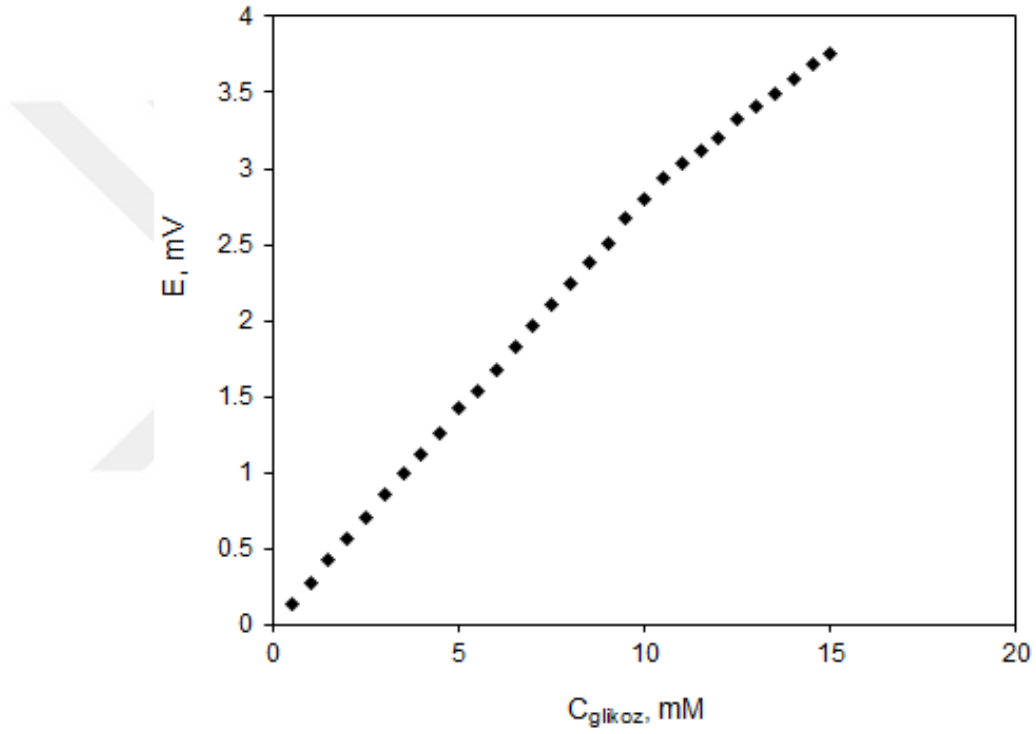
Şekil 3.20. Optimum şartlarda glikoz derişimiyle potansiyel değişimi



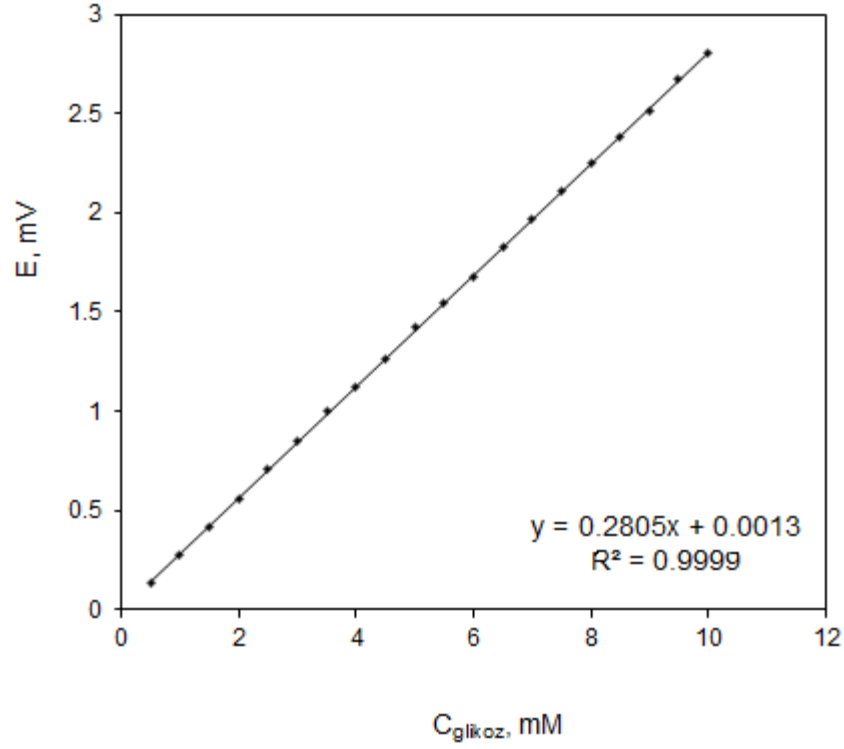
Şekil 3.21. Optimum çalışma koşullarına ait kalibrasyon grafiği

Daha düşük glikoz derişimlerinde de denemeler yapılmıştır. Bu amaçla 0.5-15 mM glikoz derişim aralığında çalışmalar yapılmış ve hazırlanan sensörün 0.5-10 mM derişim aralığında glikoza karşı doğrusal bir değişim gösterdiği belirlenmiş ve doğru denklemi:

$$E \text{ (mV)} = 0.2805 C \text{ (mM)} + 0.0013 \text{ olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.21).}$$



Şekil 3. 22. Düşük glikoz derişiminde sensörün glikoz cevabı



Şekil 3.23. Düşük glikoz derişimine ait kalibrasyon grafiği

3.7. Sensörün Tekrarlanabilirliğinin İncelenmesi

Tekrarlanabilirlik çalışmasında aynı elektrot kullanılarak 5 mM derişimde glikoz için 8 ayrı potansiyometrik ölçüm alınmıştır. 6 ölçüme kadar alınan sonuçların birbirine yakın değerler olduğu ancak ölçüm sayısı daha da artırıldığında potansiyel değerlerinde sapmalar olduğu gözlemlenmiştir. Sensörün tekrarlanabilirlik denemelerine ilişkin sonuçlar Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

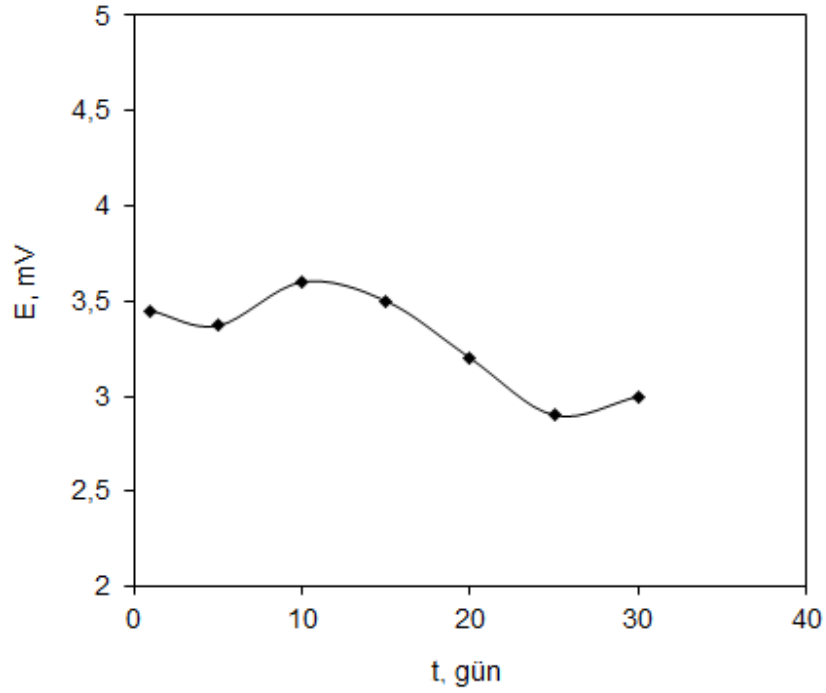
Çizelge 3.1. Tekrarlanabilirlik denemelerine ilişkin sonuçlar.

Ölçüm Sayısı	Ölçülen potansiyel değerleri (mV)
1	2.18
2	2.42
3	2.36
4	2.53
5	2.29
6	2.59
7	4.58
8	4.85

Tekrarlanabilirlik çalışmaları sonucunda birbirine yakın bulunan 6 ölçüm sonucu elde edilen değerlerin bağıl standart sapması (%RSD) %6.34 olarak hesaplanmıştır.

3.8. Sensörün Raf Ömrünün Belirlenmesi

Sensörlerde aranan en önemli özelliklerden biri de elektrodun uzun ömürlü olmasıdır. Bu amaçla sensörün raf ömrünün belirlenmesi önemlidir. Hazırlanan sensörün raf ömrünün belirlenebilmesi için +4°C'da buzdolabında pH=9 borik asit/borat tamponu içinde farklı sürelerde bekletilmiştir.



Şekil 3.24. Sensörün bekleme süresiyle glikoz cevabının değişimi

Hazırlanan enzimsiz elektrotlar buzdolabında 30 güne kadar saklanmış ve belirli günlerin sonunda ayrı elektrotlarda 15 mM glikozun eklenmesiyle potansiyometrik cevapları alınmıştır. 20 gün sonunda 15 mM glikoz eklenmesiyle test edilen elektrotun glikoz cevabında % 5.9 azalma görülürken 30 gün sonunda ise % 10.97 lik bir azalma görülmüştür (Şekil 3.24).

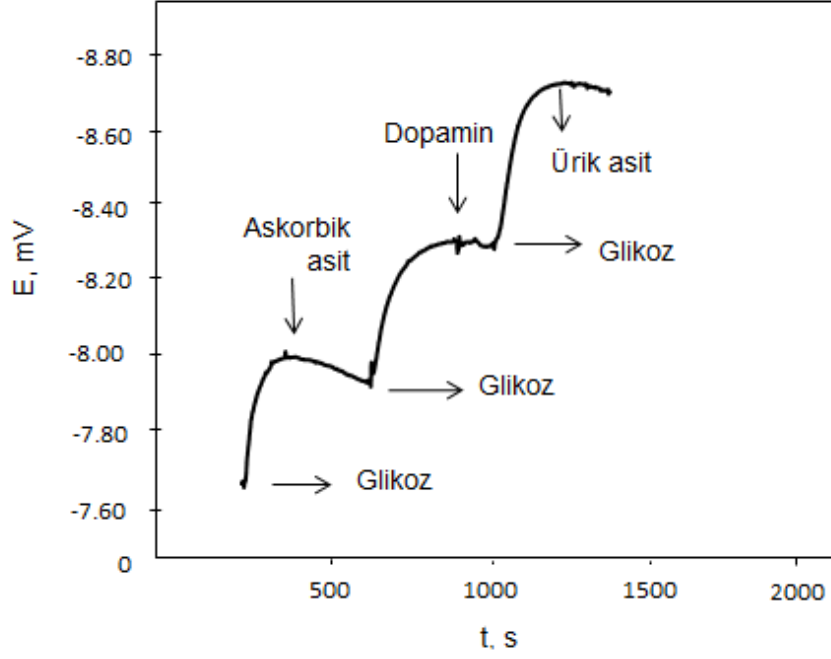
3.9. Girişim Etkisinin İncelenmesi

Hazırlanan Ch/AuNp-MFB-DT sensörün glikoz ölçümlerinde ölçümlere girişim etkisi yapabilecek askorbik asit, ürik asit, dopamin gibi moleküllerin etkisi araştırılmıştır.

Biyolojik sıvılarda bulunan askorbik asidin girişim yaptığı ve bunu önlemenin kolay olmadığı belirtilmektedir. Askorbik asidin ciddi girişimlere sebep olduğu ve bu girişim etkisinin büyük oranlarda seyreltme, doğrudan askorbik asidi yükseltgeyen askorbat oksidaz ilavesi yöntemleri ile giderilmeye çalışıldığı literatürde belirtilmiştir [54,55]. Ürik asidin girişim etkisinin az da olsa görüldüğü ve bunun seyreltme yapılarak giderildiği belirtilmektedir [54,56].

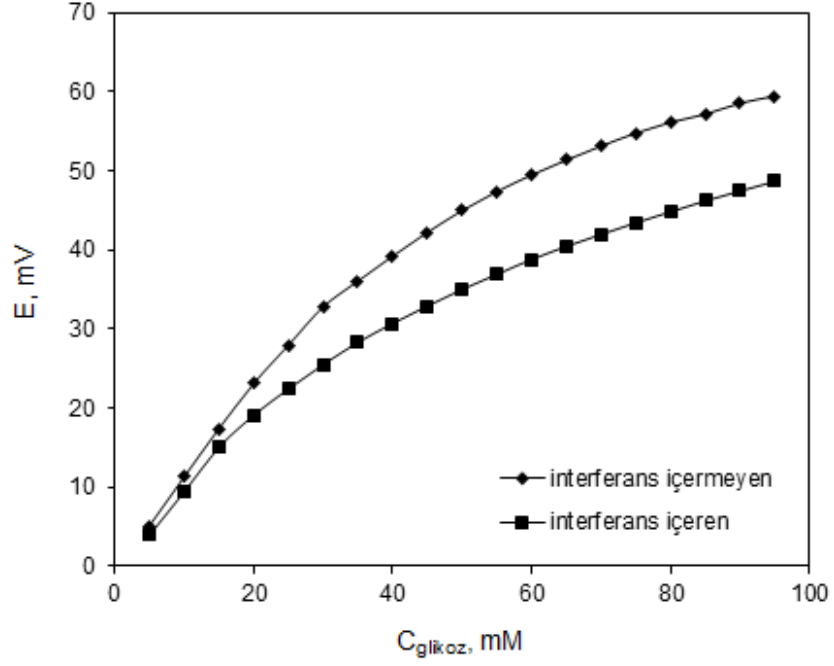
Kanda normal olarak 0.1 mM askorbik asit, 0.2 mM dopamin, 0.4 mM ürik asit, vardır.

Bu potansiyel girişim etkisi yapabilecek moleküllerin etkisini görebilmek için hazırlanan sensöre 5 mM glikoz eklenmesiyle potansiyometrik cevap alınmış daha sonra çözelti ortamına 0.1 mM askorbik asit ilave edilmiştir ve askorbik asit eklenmesiyle potansiyelde bir değişiklik gözlenmemiştir. Şekil 3.23'de görüldüğü gibi aynı işlemler 0.2 mM dopamin ve 0.4 mM ürik asit ilaveleri içinde denenmiş ve bu moleküllerin eklenmesiyle de glikoz cevabına bir etkilerinin olmadığı görülmüştür (Şekil 3.25).



Şekil 3.25. Glukoz ölçümlerine girişim yapabilecek moleküllerin etkisi

Glukoz belirlenmesi çalışmaları sulu çözeltide girişim yapabilecek askorbik asit, dopamin ve ürik asit içeren ve içermeyen çözeltilerde gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.25'e göre bu 3 molekülün girişim etkilerinin olmadığı bulunsa da glukoz ölçümlerinde glukoz cevabının bir miktar düşmesine neden olmuştur (Şekil 3.26). Bu sonuç hazırlanan sensörün bu moleküllere karşı glukoz belirlenmesinde seçici olduğu ancak glukozun elektrot yüzeyine ulaşmasına engel olduklarını göstermiştir (Şekil3.26).



Şekil 3.26. İnterferans molekülleri içeren ve içermeyen ortamda glikoz ölçümleri

3.10. Biyolojik Sıvıda (Kanda) Glikoz Tayini

Biyolojik sıvı olarak kullanılan kandaki glikoz tayini için üç sağlıklı bireyin kan serumu örneği Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinden alınmıştır. Bu örnekler steril kaplara alınarak -18°C de muhafaza edilmiştir.

Ölçümlerin yapıldığı hücreye 250 μL kan serumu konulmuş ve hacim 2500 μL ye pH' sı 9 olan borik asit tamponu çözeltisi ile tamamlanmıştır. Serum çözeltisi içine glikoz eklenerek kalibrasyon grafiği oluşturulmuş ve serum içindeki glikoz miktarı hesaplanmıştır (Çizelge 3.2). Aynı işlemler alınan üç kan serumu numunesi içinde gerçekleştirildi ve her serum numunesi için 3 deney yapılmıştır. Standart sapma değerleri hesaplanarak

ölçüm sonuçları hastane de yapılan ölçüm sonuçları ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Serum örneklerindeki glikoz sonuçlarının karşılaştırılması

Serum numunesi	Sonuçlar (Modifiye Elektrot ile) (mg/dL)	Hastane Sonuçları (Spektrofotometrik yöntem ile) (mg/dL)
1	74.5±0.845	84
2	90.09±1.096	98
3	99.82±0.655	102

Bulunan sonuçlar, enzimatik kit kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülen hastane sonuçları ile yakın bir fark olduğu gözlemlendi.

4. SONUÇLAR

Sensör teknolojileri, çeşitli alanlarda pek çok bilim alanındaki bilgi birikimini gelişmeler paralelinde ve gereksinimler doğrultusunda kullanarak çok hızlı bir şekilde ilerlemektedir. Sensörlerin klasik tayin yöntemlerine göre çoğu zaman spesifik ve duyarlı sonuçların pratik ve kısa sürede alınmasını sağlamaları, tekrar kullanılabilir ya da düşük maliyetle tek kullanımlık şekilde seri olarak üretilibilmeleri ve bu türlerin çoğu zaman kullanırken özel deneyim gerektirmemeleri sensörleri gelecek vaat eden analitik sistemler olarak ön planda tutmaktadır.

Çalışmamızda enzim içermeyen yeni bir potansiyometrik glikoz sensör tasarlanmıştır. Bu amaçla;

- Doğal bir polimer olan kitosan kullanılarak altın nanopartiküller hazırlanmıştır. Katyonik bir polimer olan kitosan nanopartiküllerin çözeltide kararlı kalmalarını sağlamıştır. Optimum şartlarda hazırlanan altın nanopartiküllerin boyutları 25 nm den daha küçük olduğu bulunmuştur. Ayrıca partiküller FTIR, UV-vis gibi yöntemlerle karakterize edilmiştir.
- Ch/AuNp glikoz sensör olarak kullanılabilmesi için yüzeyleri MFB ve DT ile modifiye edilmiştir.
- Modifiye edilmiş nanopartiküller (Ch/AuNp-MFB-DT) camsı karbon elektrot yüzeyine alınarak yeni bir modifiye elektrot hazırlanmıştır.
- Modifiye edilmiş elektrot potansiyometrik enzim içermeyen glikoz sensör olarak kullanılmıştır.

- Glikoz ölçümleri için optimum koşullar belirlenmiştir. Sensörün çalıştığı en iyi pH 9 olarak bulunmuştur.
- Enzimsiz sensörün sulu çözeltide ve optimum şartlardaki glikoz derişimine karşı doğrusal çalışma aralığı 5-30 mM' dir. En düşük tayin sınırı ise 0.5 mM olarak bulunmuştur.
- Tekrarlanabilirlik çalışma sonuçlarına göre hazırlanan sensör en az 6 kere kullanılabilir.
- Sensörün kullanılmadan bekleme süresi (raf ömrü) çalışmalarında ise 30 gün beklenildiğinde glikoz cevabında yaklaşık % 10.97 azalma görülmüştür.
- Glikoza girişim etkisi yapabilecek dopamin, ürik asit ve askorbik asitin kayda değer girişimlerinin olmadığı görülmüştür.
- Gerçek örnek çalışmalarında insan kan serumu kullanılmıştır. Sonuçlar sensörün kan serumunda kullanılabileceğini göstermiştir.

Literatürde potansiyometrik enzimsiz glikoz sensörleri ile ilgili az sayıda olan çalışmalar dikkate alındığında, geliştirilen potansiyometrik enzimsiz glikoz sensörün bu alandaki çalışmalara önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Olsan, A., Glucose and glucose containing syrups, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, VCH Publishers , New York. 12: 457-475, 1991.
- [2] Li, Y., Liu, X., Yuan, H. and Xiao, D., Glucose biosensor based on the roomtemperature phosphorescence of TiO₂/SiO₂ nanocomposite, Biosensors and Bioelectronics, 24: 3706-3710, 2009.
- [3] Kanj, H., Schhneider, S.H., Ruderman, N.B., Exercise and Diabetes Mellitus in Exercise and Sport Sciences Reviews Volume 16, Eds., Pandolf, Kent. Macmilan Publishing Co., New York, 1998.
- [4] Devlin, J.T., Horton, E.S., Vranic, M., Diabetes Mellitus and Exersise, Eds., Smith Gordon Publishers, London, 1992.
- [5] Zinker, B.A., Nutrition and exercise in individuals with diabetes, Clinical Sports Medicine, 18 (3) : 585-606, 1999.
- [6] Glasgow, R.E., Fisher, L., Skaff, M., Mullan, J., Toobert, D.J., Problem solving and diabetes self-management: investigation in a large, multiracial sample. Diabetes Care. 7 (1) : 30-33, 2007.

- [7] Praet, S.F., Manders, R.J., Lieveise, A.G., Influence of acute exercise on hyperglycemia in insulin-treated type 2 diabetes. *Med Sci Sports Exerc.* 44 (12): 38-2037, 2006.
- [8] Weiss, J., Sumpio, B., Review of prevalence and outcome of vascular disease in patients with diabetes mellitus, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 50 (2) : 31-143, 2006.
- [9] Veves, A., Malik, R. A., *Diabetic Neuropathy : Clinical Management (Clinical Diabetes)*, Humana Press, New York, 2: 188-198, 2007.
- [10] Gispen, W. H., Biessels, G. J., Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus, *Trends Neurosci*, 9 (11) : 23-542, 2000.
- [11] Comba, F.N., Rubianes, M.D., Herrasti, P. and Rivas, G.A., Glucose biosensing at carbon paste electrodes containing iron nanoparticles *Sensors and Actuators B.*, 149: 306-309, 2010.
- [12] Wang, J., In vivo glucose monitoring: Towards 'Sense and Act' feedback loop individualized medical systems, *Talanta*, 75 : 636-641, 2008.
- [13] Slijukia, B., Banks, C.E., Salter, C., Crossiey, A., Electrochemically polymerized composites of multi walled carbon nanotubes and poly (vinylferrocene) and their use as modified electrodiodes, Application to glucose sensing, *Analyst*, 131: 670-677, 1995.

- [14] Oliver, N.S., Toumazou, C., Cass, A.E., Johnstan, D.G., Glucose sensors: a review of current and emerging technology, *Diabet Med.*, 26: 197-210, 2009.
- [15] Todd, W.S., Samuel, R.S., Craig, A.E., Joseph, R.W., and Peter, J.O., An Enzymatic Fluorometric Assay for Fructose. *Anal. Biochem.* 280: 329-331, 2000.
- [16] Cao, L., Ye, J., Tong, L., Tang, B., A New Route to the Considerable Enhancement of Glucose Oxidase (GOx) Activity: The Simple Assembly of a Complex from CdTe Quantum Dots and GOx, and Its Glucose Sensing. *Chem. Eur. J.* 14: 9633-9640, 2008.
- [17] Gerard, M., Chaubey, A., Molhotra, B.D., Application of conducting polymers to biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 17: 345-359, 2002.
- [18] Cash, K.J., and Clark, H.A., *Trends in Molecular Medicine*, 16: 584-593, 2010.
- [19] L.C., Clark Jr., C., Lyons, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102: 29-45, 1962.
- [20] Gürdal, O., *Algılayıcılar ve Dönüştürücüler*, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 2000.

- [21] Supothina, S., Gas sensing properties of nanocrystalline SnO₂ thin films prepared by liquid flow deposition, *Sensors and Actuators B.*, 93: 526-530, 2003.
- [22] Dunbar, A., Richardson, T.H., McNaughton, A.J., Barford, W., Hutchinson, J., Hunter, C.A., Understanding the interactions of porphyrin LB films with NO₂, *Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 284-285, 339-344, 2006.
- [23] Hall, E. A. H., *Biosensors*, Ch., *Biosensors in context*, Open University Press, İngiltere, 1: 3-30, 1990.
- [24] Suleiman, A.A., and Guilbault, G.G., Piezoelectric (PZ) Immunosensors and Their Applications. *Analytical Letters*, 24 (8): 1283-1291, 1991.
- [25] Thevenot, D. R., Toth, K., R., Durst, A., Wilson, S. G., Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, 16: 121-131, 2001.
- [26] Xu, Jing-Juan., Zhao, W., Luo, Xi-Liang., Chen, Hong-Yuan., A sensitive biosensor for lactate based on layer-by-layer assembling MnO₂ nanoparticles and lactate oxidase on ion-sensitive field-effect transistors, *Chem. Commun.*, 792-794, 2005.

- [27] Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F., *Pure App. Chem.*, 63: 1247-1250, 1991.
- [28] Toth, K., Durst, R.A., and Wilason G.S., *Pure App. Chem.* 71: 2333-2348, 1999.
- [29] Boyaci, G.H., Mutlu, M., Preparation of Lactate Electrode for General Food Application, FAB 98, Twelfth Forum for Applied Biotechnology, Brugges, Belgium, 24-25, 2 : (28), 1421, 1998.
- [30] Lewenstam, A., Maj-Zurawska, M., and Hulanicki, A., Application Of Ion-Selective Electrodes in Clinical Analysis, *Electroanalysis*, 3: 727-734, 1991.
- [31] Kao, K. C., Huang, W., *Electronical Transport in Solids*, Pergaman Press, New York, 59: 145-541 1981.
- [32] Thevenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., Wilson, G.S., Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Pure Appl. Chem.*, 71: (12), 2333-2348, 1999.
- [33] Skoog, D., Holler, F., Nieman, T., *Principles of Instrumental Analysis*, 5th Ed.; Harcourt Brace, London, 1998.
- [34] Eggins, B., *Biosensors An Introduction*, 1st Ed., John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 1996.

- [35] Kaufman, F.B., Schroeder, A.H., Engler, E.M., Kramer, S.R., Chambers, J.Q., Ion and electron-transport in stable, electroactive tetrathiafulvalene polymer coated electrodes, *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 483-488, 1980.
- [36] Wang, J., Selectivity coefficients for amperometric sensors, *Talanta*, 41, 857-863, 1994.
- [37] Merkoçi, A., Nanobiomaterials in electroanalysis, *Electroanal.*, 19: 739-731, 2007.
- [38] Van Hove., M. A., From surface science to nanotechnology, *Catal. Today*, 113: 133-140, 2006 .
- [39] Jianrong, C., Yuqing, M., Nongyue, H., Xiaohua, W., Sijiao, L., Nanotechnology and biosensors, *Nanotechnol. Adv.*, 22: 505–518, 2004.
- [40] Bouwmeester, H., Dekkers, S., Noordam, M.Y., Hagens, W.I., Bulder, A.S., de Heer, C., ten Voorde, S.E.C.G., Wijnhoven, S.W.P., Marvin, H.J.P., Sips, A.J.A.M., Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 53: 52-62, 2009.

- [41] Serrano, E., Rus, G., García-Martínez, J., Nanotechnology for sustainable energy, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13: 2373-2384, 2009.
- [42] Vaddiraju, S., Tomazos, I., Burgess, D.J., Jain, F.C., Papadimitrakopoulos, F., Emerging synergy between nanotechnology and implantable biosensors: A review, *Biosensors and Bioelectronics*, 25: 1553-1565, 2010.
- [43] Telefoncu, A., Enzimoloji, Ege Üniversitesi, 380-386, 1997.
- [44] Castañeda, M. T., Alegret, S., Merkoçi, A., Electrochemical Sensing of DNA Using Gold Nanoparticles, *Electroanalysis*, 19 (7-8): 743-753, 2007.
- [45] Miller, J. C., *The handbook of nanotechnology : business, policy, And intellectual property law*, John Wiley & Sons, Hoboken, N.J., 13: 350-368, 2005.
- [46] Guo, S., Wang, E., Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles, *Anal. Chim. Acta*, 598: 181-192, 2007.
- [47] Pingarron, J. M., Sedenó, P. Y., Cortes, A. G., Gold nanoparticle based electrochemical biosensors, *Electrochim. Acta*, 53: 5848-5866, 2008.

- [48] Pison, U., Welte, T., Giersig, M., Groneberg, D. A., Nanomedicine for respiratory diseases, *Eur. J. Pharmacol.*, 533: 341-350, 2006.
- [49] Njoki, P.N., Lim, I-Im., S., Mott, D., Park H-Y, Khan, B., Mishra, S., Sujakumar, R., Luo, J., and Zhong, C-J., *J. Phys. Chem.* 9: 111-14664, 2007.
- [50] Shoji, E., Freund, M.S., Potentiometric saccharide detection based on the pKa changes of poly(aniline boronic acid), *Journal of American Chemical Society* 124: 12486-12493, 2002.
- [51] K.M., Manesh, P., Santhosh, A., Gopalan, Kwang-Pill Lee, Electrospun poly(vinylidene Fluoride)/poly(aminophenylboronic acid) composite nanofibrous membrane as a novel glucose sensor, *Analytical Biochemistry* 360: 191-195, 2007.
- [52] Sun, C., Qu., R., Chen., H., Ji, C., Wang, C., Sun, Y. and Wang, B., *Carbohydr. Res.* 343: (9), 2595-2599, 2008.
- [53] Çiftçi H., Tamer U., Teker, M.Ş., Pekmez, N.Ö., An enzyme free potentiometric detection of glucose based on a conducting polymer poly (3-aminophenyl boronic acid-co-3-octylthiophene) *Electrochimica Acta.* 90: 362-365, 2013.

- [54] Perez, D. M., Ferrer, M. L. ve Mateo, C.R., A reagent less fluorescent sol-gel biosensor for uric acid detection in biological fluids , Analytical Biochemistry, 322: 238-242, 2003.
- [55] Junior, L. R., Fernandes, J. R., and Kubota, L. T., Determination of salicylate in blood serum using an amperometric biosensor based on salicylate hydroxylase immobilized in a polypyrrole-glutaraldehyde matrix, Talanta., 51:547-557, 2000.
- [56] Galban, J., Andreu, Y., Almenara, M. J. and Castillo, J. R., Direct determination of uric acid in serum by a fluorometric-enzymatic method based on uricase , Talanta., 54: 847-854, 2001.