



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÜRİK ASİT TAYİNİ İÇİN NANOPARTİKÜL TEMELLİ BİYOSENSÖRLER HAZIRLANMASI

Zehra Özden ERDOĞAN

YÜKSEK LİSANS
Kimya Anabilim Dalı

Temmuz-2013
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

ÜRİK ASİT TAYİNİ İÇİN NANOPARTİKÜL TEMELLİ BİYOSENSÖRLER HAZIRLANMASI

Zehra Özden ERDOĞAN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç.Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI

2013, 70 Sayfa

Jüri
Doç.Dr. Mahmut Kuş
Doç.Dr. Gülşin ARSLAN
Yrd. Doç.Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI

Ürik asit, idrar ve kan gibi biyolojik sıvılarda azot içeren başlıca bileşiktir. Birçok hastalık ve psikolojik rahatsızlıkta erken teşhis için önemli göstergedir. Kanda anormal seviyelerdeki ürik asit gut, hiperüremi, diyabet ve böbrek hastalıkları gibi birçok hastalığın belirtisidir. Bundan dolayı, insan fizyolojik sıvılarında ürik asit seviyesinin tespiti, bu hastalıkların teşhisinde vazgeçilmezdir.

Bu çalışmada ürik asit tayini için, magnetit ile modifiye edilmiş karbon pasta enzim elektrot hazırlandı. Bu amaçla ürikaz enzimi, çapraz bağlama yöntemiyle karbon pasta matrikse immobilize edildi. Hazırlanan enzim elektrot için optimum çalışma koşulları ve performans faktörleri incelendi. Enzim elektrot için optimum pH, enzim ve magnetit miktarı, tampon derişimi ve çalışma potansiyeli sırasıyla; 7,5, 0,75 U, 3mg, 0,10 M ve +0,500 V olarak bulundu. Optimum çalışma koşullarında enzim elektrot için çalışma aralığı 1-1000 µM ve gözlenebilme sınırı 0,77µM olarak belirlendi. Enzim elektrodun cevap süresi 50 s, raf ömrü 10 gün ve tekrarlanabilirliğinin hesaplanması sırasında ölçülen akım farkı değerlerinin bağıl standart sapması % 4,94'dur. Enzim elektrodun cevabına, biyolojik sıvılarda bulunan ve girişim etkisi yapan diğer türlerin etkisi incelendi. İmmobilze enzim için görünür Michaelis-Menten sabiti (K_m) 5,202 µM olarak hesaplandı.

Anahtar Kelimeler: Enzim elektrot, magnetit, Michaelis-Menten sabiti, ürik asit, ürikaz

ABSTRACT

MS THESIS

PREPARATİON OF BİOSENSOR FOR URİC ACİD DETERMİNATİON BASED ON NANOPARTİCLE

Zehra Özden ERDOĞAN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN CHEMISTRY

Advisor: Assist. Prof. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI
2013, 70 Pages

Jury
Assoc. Prof.Dr. Mahmut KUŞ
Assoc. Prof. Dr. Gülşin ARSLAN
Assist. Prof. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI

Uric acid is mainly nitrogen-containing compounds of biological fluids such as urine and blood. It can be used as a strong indicator for early warning sign of many diseases and physiological disorders. Abnormal levels of uric acid in the blood is a symptom of many diseases such as gout, hyperuricemia, diabetes and kidney diseases. Therefore, determination of uric acid levels in human physiological fluids is indispensable for the diagnosis of these disorders.

In this study, magnetite modified carbon paste enzyme electrode was prepared for the determination of uric acid. For this purpose, uricase enzyme was immobilized tocarbon paste matris by cross linking method. Optimum working range and performance factors for prepared electrode were examined. Optimum pH, amount of enzyme and magnetite, buffer concentration and working potential for enzyme electrode were 7,5, 0,75 U, 3 mg, 0,10 M and +0,500 V, respectively. The working range of the enzyme electrode and limit of detection were determined as 1-1000 μM with detection limit of 0,77 μM. The response times of enzyme electrode was 50 s, storage stability was 10 days and relative standart deviation of current differences of reproducibility was % 4.94. Effect of the interferences were investigated for enzyme electrode. The apparent Michaelis-Menten constant was calculated as 5,202 μM.

Keywords: Enzyme electrode, magnetite, Michaelis-Menten constant, uric acid, uricase

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimimim süresince çalışmalarıma yön veren, her türlü imkânı bana sağlayan, maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doc. Dr.Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI'na,

Çalışmalarım boyunca bilgisi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, düşüncelerinden her zaman istifade ettiğim ve her konuda yardımlarını esirgemeyen Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Esma KILIÇ ve çalışma arkadaşlarına,

Bana her konuda yardımcı olan, bilgisini ve becerisini esirgemeyen, tanıştığımız ilk günden beri bana öğrettiği her şey için değerli insan Dr. Pınar Esra ERDEN'e,

3 yıl boyunca ailem olduğu, tüm sıkıntılı zamanlarda yanımda olduğu, her şeye rağmen gülümsememi sağladığı ve hayatıma kattığı her şey için yol arkadaşım Huriye ÇAKIR'a,

En zor zamanlarımda beni hiç yalnız bırakmadıkları, uzakta olsalar bile yanımda olduklarını ve sevgilerini hissettirdikleri, her koşulda bana destek oldukları için dostlarım Hilal AYDIN ve Serap BİRCAN'a,

Hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen, değerli fikirleri ile hayatıma yön vermeme yardımcı olan, kariyer yapmam konusunda her zaman beni destekleyen canım AİLEM'e göstermiş oldukları sabır ve yaptıkları fedakârlıklardan dolayı teşekkür ederim.

Zehra Özden ERDOĞAN
KONYA-2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **x**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xi**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xii**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Ürik Asit Tayininin Önemi 2

1.2. Voltametrik Teknikler 4

1.2.1. Voltametri 4

1.2.2. Voltametride Uyarma Sinyalleri 4
1.2.2.1. Dönüşümlü Voltametri 5
1.2.2.2. Kronoamperometri 7
1.3. Biyosensörler 8
1.3.1. Biyosensörlerin Yapısı ve Çalışma Prensibi 10
1.3.2.Biyosensörlerin Sınıflandırılması 12
1.3.3. İdeal Biyosensör Özellikleri 13
1.4. Enzimler 14
1.4.1. Enzimlerin Yapısı ve Çalışma Mekanizması 15
1.4.2. Ürikaz Enziminin Özellikleri 17
1.4.3. Enzim Reaksiyonlarını Etkileyen Faktörler 17
1.4.4. Enzim Reaksiyonlarının Kinetiği 18
1.4.5. Enzimlerin İmmobilizasyon Yöntemleri 19
1.5. Enzim Sensörler 21
1.5.1. Birinci Nesil Enzim Sensörler 21
1.5.2.İkinci Nesil Enzim Sensörler 22
1.5.3 Üçüncü Nesil Enzim Sensörler 24

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **25**

2.1. Ürik Asit Biyosensörleri ile Yapılan Bazı Uygulamalar 25
2.2. Magnetit Nanopartikülü ile Yapılan Bazı Uygulamalar 32

3. MATERYAL VE YÖNTEM **34**

3.1. Kullanılan Cihazlar, Elektrotlar 34
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler 34
3.3. Kullanılan Çözeltiler 35
3.3.1. Tampon Çözelti 35
3.3.2. Potasyum Ferri Siyanür ($K_3[Fe(CN)_6]$) Çözeltisi 35
3.3.3. Hidrojen Peroksit Çözeltisi 36
3.3.4. Ürik Asit Çözeltisi 36
3.3.5. Enzim Çözeltisi 36
3.3.6. Glutaraldehit Çözeltisi 36
3.3.7. Glukoz Çözeltisi 36
3.3.8. Askorbik Asit Çözeltisi 36
3.3.9. Üre Çözeltisi 36
3.4. Deneysel İşlemler 36
3.4.1. Enzimsiz Karbon Pasta Elektrotların Hazırlanması 36
3.4.1.1. Enzimsiz Karbon Pasta Elektrotların Elektrokimyasal Karakterizasyonu 37
3.4.1.2. Enzimsiz Karbon Pasta Elektrotların H_2O_2'e Karşı Duyarlılığı 37
3.4.2. Karbon Pasta Enzim Elektrotların Hazırlanması 37
3.4.2.1. Karbon Pasta Enzim Elektrotların Substrata Karşı Duyarlılığı 38
3.4.3. Ürik Asit Enzim Elektrotların Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi 38
3.4.3.1. Tampon Derişimi 38
3.4.3.2. pH 38
3.4.3.3. Enzim Miktarı 39
3.4.3.4. Fe_3O_4 Miktarı 39
3.4.3.5. Çalışma Potansiyeli 39
3.4.4. Ürik Asit Enzim Elektrotların Performans Faktörlerinin Belirlenmesi 39
3.4.4.1. Cevap Zamanı 39
3.4.4.2. Doğrusal Çalışma Aralığı ve Gözlenebilme Sınırı 39
3.4.4.3. Tekrarlanabilirlik 40
3.4.4.4. Raf Ömrü 40
3.4.5. Girişim Yapan Maddelerin Enzim Elektrodun Cevabına Etkisi 40
3.4.6. Enzim Elektrodun Aktivitesinin Belirlenmesi 40

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 41

4.1. Enzimsiz Karbon Pasta Elektrotların Elektrokimyasal Karakterizasyonu 41
4.2. Enzimsiz Karbon Pasta Elektrotların H_2O_2'e Karşı Duyarlılığı 41
4.3. Karbon Pasta Enzim Elektrotların Substrata Karşı Duyarlılığı 42
4.4. Ürik Asit Enzim Elektrotların Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi 43
4.4.1. Tampon Derişimi 43
4.4.2. pH 43
4.4.3. Enzim Miktarı 44
4.4.4. Fe_3O_4 Miktarı 45
4.4.5. Çalışma Potansiyeli 46
4.5. Ürik Asit Enzim Elektrotların Performans Faktörlerinin Belirlenmesi 46
4.5.1. Cevap Zamanı 46
4.5.2. Doğrusal Çalışma Aralığı ve Gözlenebilme Sınırı 47
4.5.3. Tekrar Kullanılabilirlik 48
4.5.4. Raf Ömrü 49
4.6. Girişim Yapan Maddelerin Enzim Elektrodun Cevabına Etkisi 49

4.7. Enzim Elektrodun Aktivitesinin Belirlenmesi 50

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 52

5.1 Sonuçlar 52
5.2 Öneriler 52

6. KAYNAKLAR 53

ÖZGEÇMİŞ 57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1.Ürik asitin kimyasal formülü ve tanecik yapısı 3
Şekil 1. 2.a) Normal Puls Polarografi b) Diferansiyel Puls Polarografi c) Basamaklı Polarografi d)Kare Dalga Polarografi e) Dogrusal Taramalı Voltametri f) Dönüsümlü Voltametri için Potansiyel- 5
Şekil 1. 3. Dönüşümlü voltametri için potansiyel – zaman eğrisi (Skoog vd., 1998) 6
Şekil 1. 4. Dönüşümlü voltamogram örneği (Skoog vd., 1998) 6
Şekil 1. 5. Kronoamperometri için uygulanan potansiyelin zamanla değişimi (Eggins, 2000) 7
Şekil 1. 6. Tipik bir kronoamperomogram (Eggins, 2000) 7
Şekil 1. 7. Biyosensörün Yapısı 8
Şekil 1. 8. Biyosensörlerin çalışma prensibi 10
Şekil 1. 9. Biyoaffinite ve Biyokatalitik sensörler 11
Şekil 1. 10. Enzimin üç boyutlu yapısı 15
Şekil 1. 11. Bir substrat molekülünü bağlayan bir aktif bölgeli enzimin şematik olarak gösterilmesi 16
Şekil 1. 12. Lineweaver-Burk grafiği 19
Şekil 1. 13. Aracılı biyosensörlerin çalışma ilkesi (E_{ind}, $E_{yük}$ indirgenmiş ve yükseltgenmiş enzimler, Med_{ind}, $Med_{yük}$ indirgenmiş ve yükseltgenmiş medyatörler) 22
Şekil.3 1.Ölçümlerde kullanılan elektrokimyasal sistem 34
Şekil 4. 1.a)Fe_3O_4 ile modifiye b) Sade karbon pasta elektrotların dönüşümlü voltamogramları (0.50 mM K_4[Fe(CN)6] içeren 0.50 M pH 7.0 fosfat tamponunda) 41
Şekil 4. 2.a)Sade b) Fe_3O_4 modifiye karbon pasta elektrotların H_2O_2 duyarlılığı (0.05 M pH fosfat tamponu, +0.700 V) 42
Şekil 4. 3. a)Sade b) Fe_3O_4 modifiye karbon pasta enzim elektrotların ürik asit duyarlılığı (0.05 M pH fosfat tamponu, +0.700 V) 42
Şekil 4. 4.Magnetit modifiye ürik asit enzim elektroduna tampon çözelti derişiminin etkisi (pH 7 fosfat tamponu, +0.700 V) 43
Şekil 4. 5.Magnetit modifiye ürik asit enzim elektroduna pH'nın etkisi (0.1 M fosfat tamponu,+0.700 V) 44
Şekil 4. 6. Magnetit modifiye ürik asit enzim elektroda enzim miktarının etkisi (pH 7.5 0.10 M fosfat tamponu,+0.700 V) 45
Şekil 4. 7. Ürik asit enzim elektroda Fe_3O_4 miktarının etkisi (pH 7.5 0.10 M fosfat tamponu,+0.700 V) 45
Şekil 4. 8. Ürik asit enzim elektroda çalışma potansiyelinin etkisi (pH 7.5 0.10 M fosfat tamponu) 46
Şekil 4. 9. Ürik asit enzim elektrodun cevap süresi (pH 7.5 0.10 M fosfat tamponu, 9×10^{-5} M ürik asit) 47
Şekil 4. 10. Ürik asit enzim elektrodun cevabına ürik asit derişiminin etkisi (0.1M pH 7.5 fosfat tamponu, +0.500 V) 47
Şekil 4. 11.Ürik asit enzim elektrot için farklı derişim aralıklarındaki doğrusal kalibrasyon eğrileri a) 1-10 μM b) 25-100 μM c) 250-1000 μM (pH 7.5 0.10 M fosfat tamponu,+0.500 V) 48
Şekil 4. 12. Fe_3O_4 modifiye ürik asit enzim elektrodun cevabına diğer türlerin girişim etkisi (0.100 M pH 7,5 fosfat tamponu, +0.500 V) 49
Şekil 4. 13. İmmobilize enzim için Lineweaver-Burk Eğrisi 50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. 1.Biyosensör Gruplarının Analiz Alanları 9
Çizelge 1. 2.Biyosensörler için kullanılan farklı dönüştürücüler 12
Çizelge 1. 3.Yaygın Kullanılan Medyatörler 23
Çizelge 3. 1.Kullanılan Kimyasal Maddeler 35
Çizelge 4. 1.Fe_3O_4 modifiye ürik asit enzim elektrodun en iyi elektrot bileşimi, çalışma koşulları ve performans faktörleri 51

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

BSA	Bovin Serum Albumin
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
E_{ind}	İndirgenmiş Enzim
E_{pa}	Anodik pik potansiyeli
E_{pc}	Katodik pik potansiyeli
$E_{yük}$	Yükseltgenmiş Enzim
FAD	Flavin Adenin Nükleotit
Fe_3O_4	Magnetit
GA	Glutaraldehit
GOD	Glukoz Oksidaz
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
I_{pa}	Anodik pik akımı
I_{pc}	Katodik pik akımı
$K_3[Fe(CN)_6]$	Potasyum ferrisiyanür
K_m	Michaelis-Menten sabiti
Med_{ind}	İndirgenmiş Medyatör
$Med_{yük}$	Yükseltgenmiş Medyatör
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
NMP^+	N-metilfeniltiyazin
PANI	Poli(anilin)
PMS	Polimaleimidostiren
$TCNQ^-$	Tetrasiyonokinodimetan
UA	Ürik Asit
UOx	Ürikaz

1. GİRİŞ

Ürik asit, idrar ve kan serumu gibi biyolojik sıvıların azot içeren başlıca bileşiğidir. İnsan vücudunda pürin metabolizmasının son ürünlerinden biridir ve birçok hastalık ve psikolojik bozuklukların erken teşhis için güçlü bir gösterge olarak kullanılabilir (Jindal ve ark.,2012). İnsan kanında ürik asidin fizyolojik normal seviyesi 0,13-0,46 mM arasındadır (Luo ve ark., 2006). Kandaki anormal seviyelerdeki ürik asit, gut, hiperüremi, Lesch-Nyan sendromu, diabet, yüksek kolestrol, nörolojik ve böbrek hastalıkları gibi birçok hastalığın semptomudur. Bundan dolayı, insan fizyolojik sıvılarındaki çözünmüş ürik asit seviyesinin tespiti, değiştirilmiş pürin biyosentezi ve katabolizması ile ilgili bozukluklardan muzdarip hastaların teşhisi için vazgeçilmezdir (Jindal ve ark.,2012).

Spektrofotometrik, enzimatik, yüksek- performans sıvı kromotografisi, kapiler elektroforez, kemilüminesans, floresans ve elektrokimyasal teknikleri içeren birçok yöntem, ürik asit analizi için kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerin çoğu, çok zaman alıcı ve kullanışsızdır; ayrıca ürik asit miktarının bir kısmının direkt oksidasyonuna yol açar (Arora ve ark., 2009). Bu yöntemler arasında, özellikle elektrokimyasal teknikler ürik asit tayini için çok ilgi çekicidirler; çünkü bu teknikler, ön ayırma işlemine gerek duymadan, doğrudan gerçek zamanlı ve on-line veri analizi sağlar.

Biyosensörler; immobilize edilmiş biyolojik olarak aktif bir bileşiğin bir sinyal ve elektronik çoğaltıcı ile direk olarak birleştirildiği sistemlerdir. Sinyal çeviricinin ana görevi, analitle etkileşim sonrasında biyolojik aktif materyaldeki fizikokimyasal değişikliği çıkış sinyaline dönüştürmektir. Canlı yaşamının önemli unsurlarından biri olan görme, işitme, koklama, tad alma, dokunma gibi algılama mekanizmaları doğal ve mükemmel biyosensörik sistemler olarak düşünüldükleri için biyosensör çalışmalarına güzel örnekler oluşturmaktadırlar. Günümüzde görme, işitme gibi yeteneklerini kaybetmiş kişilerin bu yeteneklerini tekrar yerine koyacak yapay sistemler üzerinde yoğun araştırmalar yapılmaktadır ve bu araştırmalarda biyosensör alanına dâhil edilmektedir.

Biyosensörler arasında elektrokimyasal biyosensörler en çok kullanılan biyosensörler haline gelmiştir. Bu biyosensörler, bir biyo-etkileşim sürecinde elektrokimyasal türlerin elektrokimyasal dedektör tarafından ölçülebilen bir elektriksel sinyal oluşturarak, harcanması ya da üretilmesi temeline dayanır. Elektrokimyasal biyosensörler, bulanık ortamlarda kullanılabilirler, oldukça düşük duyarlılığa sahiptirler, küçük boyutlara yatkındırlar ve ucuzdurlar.

Biyosensör tasarımında en yaygın olarak enzim sensörleri kullanılmaktadır. Enzim sensörlerin seçiciliği, analiz yapılacak maddeye uygun enzim kullanılmasından dolayı oldukça yüksektir. Klinik, çevresel ve toksik önem taşıyan kimyasal maddelerin analizi, bu maddelere uygun enzimin kullanılması ile hazırlanan biyosensörler ile hızlı, ucuz ve güvenilir hale gelmiştir (Terzi, 2008). Biyosensörler için en iyi pazar, biyomedikal sektördür. Bu alanda uygulama olanağı bulan ilk biyosensörler enzim sensörlerdir. Ticari olarak üretilen ilk biyosensör ise, şeker hastalığı teşhisi için kan ve idrarda glukoz tayinini mümkün kılan glukoz oksidaz elektrodudur.

Çalışmamızda; ürik asidin hızlı ve kolay tayini için, ürik asit biyosensörünün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla medyatör olarak magnetit (Fe_3O_4), ürikaz enziminin immobilize edileceği matriks olarak karbon pasta kullanılmış ve ürikaz enzimi immobilize edilmiştir. Ürikaz enziminin katalizlediği reaksiyon aşağıda gösterilmiştir.

$$\text{Ürik asit} + 2H_2O + O_2 \xrightarrow{UOX} \text{Allantoin} + H_2O_2 + CO_2$$

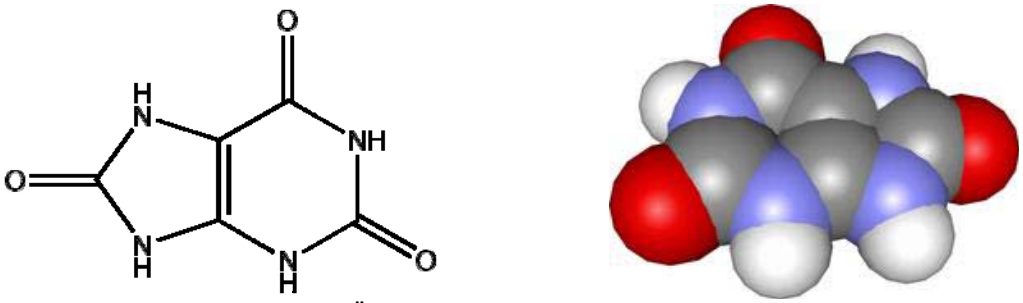
Ürik asidin tayini, enzimatik reaksiyon sırasında oluşan hidrojen peroksidin sabit potansiyelde yükseltgenmesi sonucu oluşan akım değerinin ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir.

Biyosensörün en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi amacıyla tampon derişimi, pH, medyatör miktarı, enzim miktarı ve çalışma potansiyelinin biyosensör cevabına etkisi incelenmiştir. Ayrıca biyosensörün raf ömrü, tekrarlanabilirliği, cevap zamanı, duyarlılığı, tayin aralığı ve gözlenebilme sınırı gibi parametler ve biyolojik sıvılarda bulunan diğer türlerin girişim etkisi incelenmiştir. Tüm bu çalışmalar oksijene doygun ortamda gerçekleştirilmiştir. Son aşamada ise, immobilize enzim için Lineweaver-Burk grafiği çizilerek görünür Michealis-Menten sabiti hesaplanmıştır.

1.1. Ürik Asit Tayininin Önemi

Ürik asit, genellikle kan, serum ve idrar gibi biyolojik sıvılarda bulunan azot içeren önemli bir bileşiktir ve maymunlar, kuşlar ve diğer bazı hayvanlarda pürin katabolizmasının son ürünü olarak oluşurlar. Çoğu memelilerde ve diğer omurgalılarda, ürik asit ürikaz ya da üreat oksidaz reaksiyonu ile daha ileri allantoine parçalanır (Rawal ve ark, 2012).

Ürik asit kimyasal olarak 7,9-1H-purin-2,6,8(3H)-trion olarak bilinmektedir ve formülü ve tanecik yapısı Şekil 1.1'de gösterilmektedir (Atun ve Haznedaroğlu, 2008; Roy ve ark. , 2010).



Şekil 1. 1.Ürik asitin kimyasal formülü ve tanecik yapısı

İnsanlarda ürikaz enziminin düşük düzeyde olmasından dolayı, oldukça düşük seviyelerde ürik asit oluşmaktadır. Örneğin, hayvanlarda kan ürik asit düzeyi 0,5-2,0 mg/dL dolayındayken insanlarda genellikle 5,5 mg/dL'nin üzerindedir. İnsanlarda normal ürik asit derişimi kanda 240-520 μM aralığında değişirken, idrarda 1,4-4,4 mM arasında değişmektedir (Raj ve Ohsaka, 2003).

İnsanlarda ürik asit 5,75'ten yüksek pH'larda monosodyum tuzu olan ürat formunda bulunmaktadır. Sodyum üratın serumda çözünebilirliğinin ortadan kalktığı duruma **hipoürisemi** adı verilir. Serum ürat miktarlarının bilinmesi, özellikle bu hastalığın teşhisinde önem taşımaktadır. Pürin katabolizmasında, ürik asidin allantoine oksidasyonundan sorumlu olan ürikaz (üreat oksidaz) serum ürik asit derişimunu saptamada, klinik teşhis enzimi olarak yaygın bir şekilde kullanılmalıdır (Akyüz, 2011).

Biyolojik sıvılarda ürik asit miktarının belirlenmesi bazı hastalıkların belirlenmesinde önem taşımaktadır. Sodyum ürat kristallerinin eklemlerde ve böbreklerde birikmesi gut hastalığına yol açmaktadır. Hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaz enzimi eksiliğinde kalıtsal bir bozukluk olan Lesch-Nyhan sendromu ortaya çıkar. Bu nedenle hipoksantin veya guanin yan yollarda kullanılmaz ve sonuç olarak çok fazla ürik asit sentezlenir. Hastalık zekâ geriliği, istemsiz hareketler gibi sonuçlar doğurur. Ayrıca, idrar yollarında sodyum ürat kristallerinin birikmesi, böbrek fonksiyonlarını bozar (İnan ve Gül 2001, Chen ve ark., 2008). Belirtilen tüm bu sebeplerden dolayı ürik asidin tayini tıbbi açıdan önem taşımaktadır. Ürik asit tayinin kısa sürede, doğru ve ekonomik olarak gerçekleştirilebilmesi için çeşitli biyosensörler geliştirilmektedir.

1.2. Voltametrik Teknikler

1.2.1. Voltametri

Voltemetri, bir indikatör veya çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçülmesinden faydalanarak analit hakkında bilgi edinilen bir grup elektroanalitik yöntemi kapsar. Voltametride, çalışma elektrodu ile referans elektrot arasına uygulanan ve değeri zamanla değiştirilen potansiyel farkına karşı, çalışma elektrodu ile yardımcı elektrotlar arasındaki akım ölçülür (Emre, 2007).

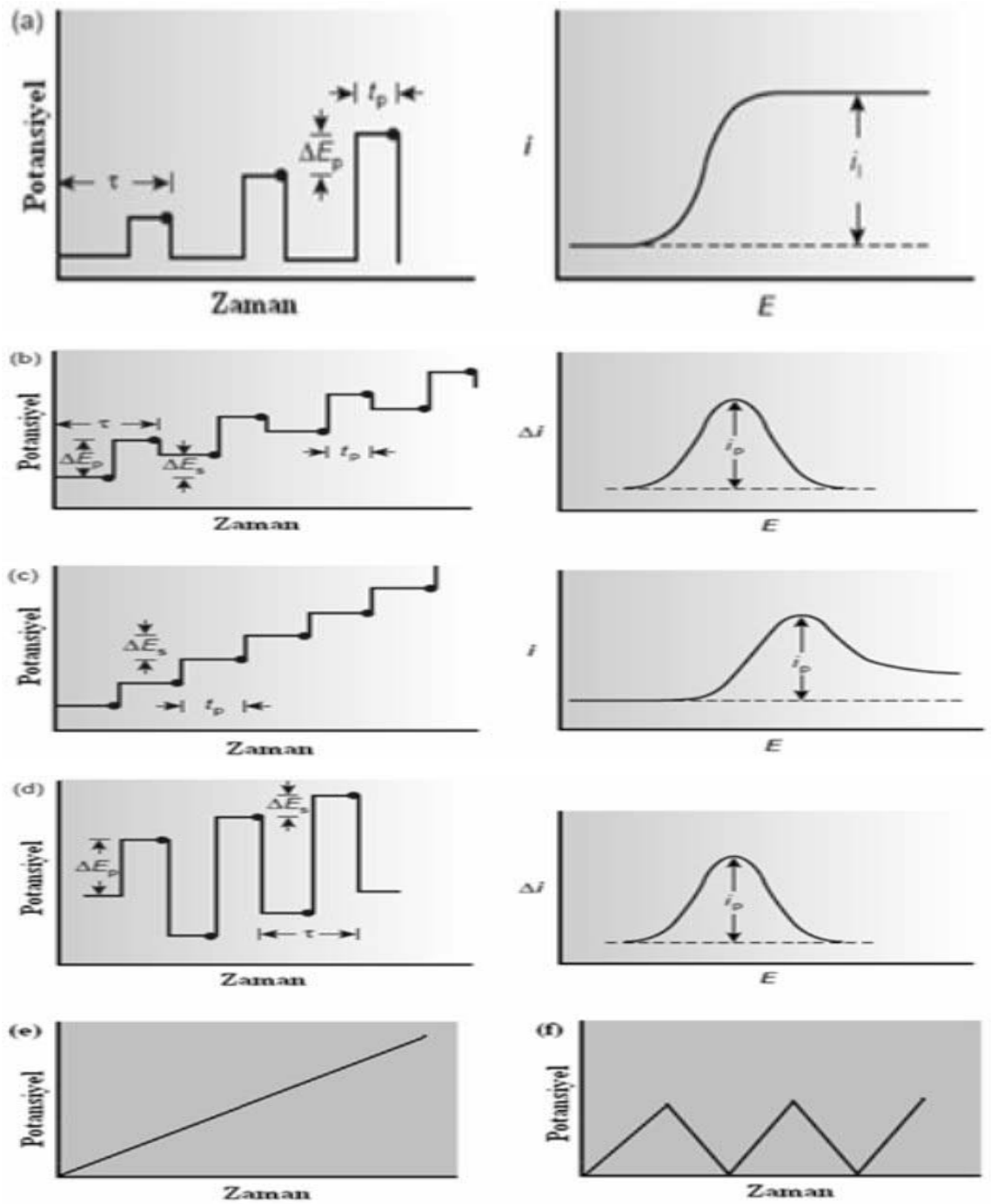
Eğer elektrokimyasal reaksiyonun gerçekleştiği uygun potansiyel biliniyor ise, doğrudan o potansiyel değeri uygulanır ve akım gözlenir. Bu işlem amperometri olarak adlandırılır. Amperometride uygulanan potansiyel sabit iken akım şiddeti ile madde derişimu arasındaki değişimler incelenir.

Tarihsel olarak, voltametri Çekoslavak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından 1920'lerin başında bulunan voltametrinin özel tipi olan polagrofiden geliştirilmiştir. Keşfedildiği ilk zamanlarda voltametri (özellikle klasik polarografi), sulu çözeltilerdeki inorganik iyonların ve bazı organik türlerin tayinleri için kimyacılar tarafından kullanılan en önemli araçlardan biriydi. Ancak 1950'lerin sonu ve 1960'ların başında bu analitik uygulamaların birçoğu yerini çeşitli spektroskopik yöntemlere bıraktı ve voltametri, çözeltideki moleküler oksijenin tayini gibi bazı özel uygulamalar dışında daha az önemli bir analiz yöntemi haline geldi. 1960'ların ortalarında klasik voltametrik yöntemlerde, yöntemin duyarlılığı ve seçiciliğini önemli ölçüde artıran birçok ana değişiklik geliştirildi.

Modern voltametri, yükseltgenme ve indirgenme olaylarının yanı sıra adsorpsiyon olayları ile de ilgilenen kimyacıların halen güçlü bir cihaz olarak kullanılmaya devam etmektedir (Skoog ve ark., 1998).

1.2.2. Voltametride Uyarma Sinyalleri

Voltametride, bir mikroelektrot içeren elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir bir potansiyel uyarma sinyali uygulanır. Bu uyarma sinyali yöntemin dayandığı karakteristik bir cevap akımı oluşturur (Skoog ve ark, 1998). Voltametride yaygın olarak kullanılan uyarma sinyallerinden birkaçı Şekil 1.2' de gösterilmiştir.

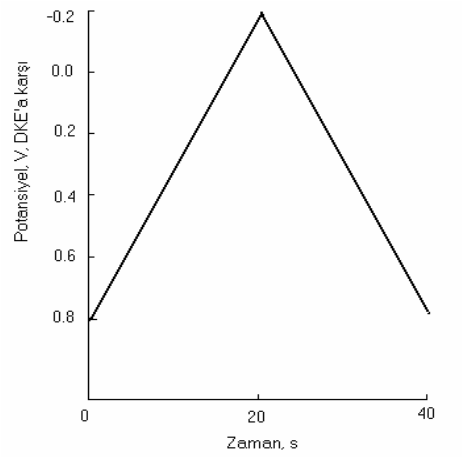


Şekil 1. 2.a) Normal Puls Polarografi b) Diferansiyel Puls Polarografi c) Basamaklı Polarografi d)Kare Dalga Polarografi e) Dogrusal Taramalı Voltametri f) Dönüsümlü Voltametri için Potansiyel-Uyarma sinyalleri ve voltamogramlar

1.2.2.1. Dönüşümlü Voltametri

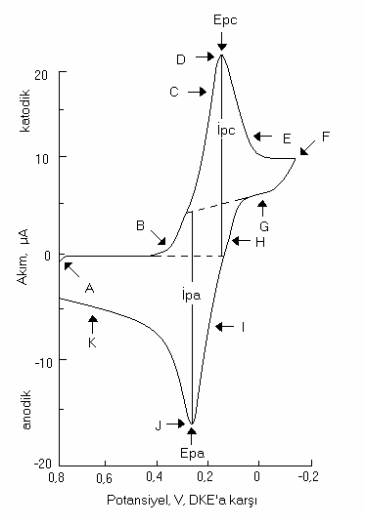
Dönüşümlü voltametri, elektrokimyasal tepkimeler hakkında bilgi edinmek için ilk akla gelen ve en yaygın kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde, potansiyel sabit bir hızla belli bir değere kadar çıkarılır sonra aynı ya da değişik bir hızla ilk potansiyel değerine ya da başka bir değere döndürülür; oluşan akım potansiyele karşı ölçülür.

Dönüşümlü voltametride, karıştırılmayan bir çözeltide küçük bir durgun elektrodun akım cevabı Şekil 1.3 ’de gösterildiği gibi bir üçgen dalga şeklinde potansiyel ile uyarılır.



Şekil 1. 3. Dönüşümlü voltametri için potansiyel – zaman eğrisi (Skoog ve ark., 1998)

Bir dönüşümlü voltamogramın önemli parametreleri, katodik pik potansiyeli $E_{pc,}$ anodik pik potansiyeli E_{pa}, katodik pik akımı $İ_{pc}$ ve anodik pik akımı $İ_{pa}$‘ dır. Bu parametrelerin nasıl bulunacağı Şekil 1.4’de gösterilmiştir. Tersinir bir elektrot reaksiyonu için anodik ve katodik pik akımları mutlak değer olarak yaklaşık eşittir, fakat zıt işaretlidir ve pik potansiyellerinin farkı 0,00592/n’ dir. Burada n, yarı reaksiyonda yer alan elektron sayısıdır.



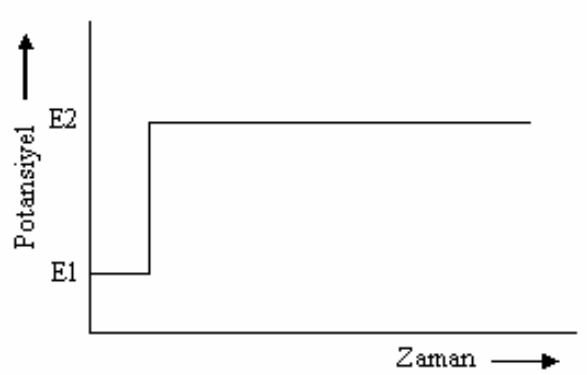
Şekil 1. 4. Dönüşümlü voltamogram örneği (Skoog ve ark., 1998)

Dönüşümlü voltametrinin bir araç olarak başlıca kullanım alanı, çeşitli şartlar altında elektrokimyasal işlemler hakkında kantitatif bilgiler sağlayan temel ve teşhise ait çalışmalardır.

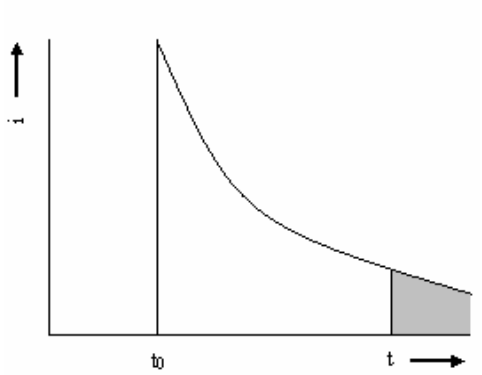
Dönüşümlü voltametri, rutin kantitatif analizlerde kullanılmadığı halde, özellikle organik ve metalorganik sistemlerde yükseltgenme/indirgenme işlemlerinin mekanizması ve hız çalışmaları için önemli bir araçtır. Bu yöntem, normal olarak elektrokimyasal olarak belirtilebilen bir sistemin araştırılması için seçilen ilk tekniktir.

1.2.2.2. Kronoamperometri

Kronoamperometri yönteminde, çalışma elektrodunun potansiyeli ani olarak değiştirilir ve durgun ortamda akım-zaman ilişkisi gözlenir. Kronoamperometrik yöntemin daha genel olarak uygulanan şekli, amperometrik yöntemdir. Şekil 1.5'de kare dalga şeklinde uygulanan potansiyelin zamanla değişimi, Şekil 1.6'de ise elde edilen kronoamperomogramlar görülmektedir.



Şekil 1. 5. Kronoamperometri için uygulanan potansiyelin zamanla değişimi (Eggins, 2000**)**



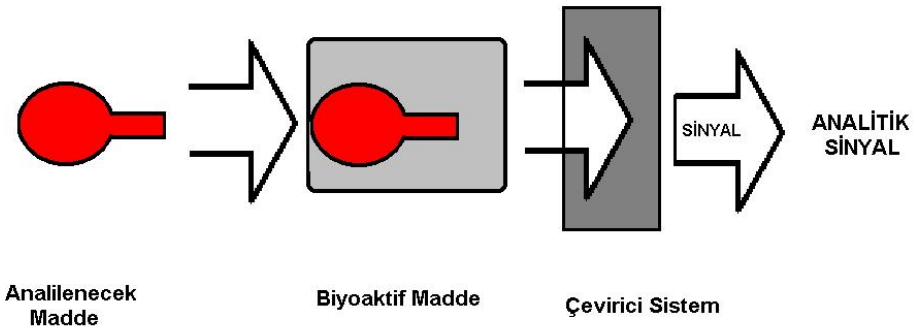
Şekil 1. 6. Tipik bir kronoamperomogram (Eggins, 2000)

Kronoamperometri genellikle elektroaktif türlerin difüzyon katsayılarının veya çalışma elektrodunun yüzey alanının hesaplanmasında kullanılır. Aynı zamanda, elektrot reaksiyonlarının mekanizmasının belirlenmesiyle ilgili çalışmalarda da kronoamperometri verilerinde yararlanılır (Wang, 2000).

1.3. Biyosensörler

Yaşam kalitesinin artırılması son yıllarda yapılan araştırmaların en önemli amaçlarından birisidir. Yaşam kalitesi hastalıkların kontrolü, gıda ve çevre kalitesi ile yakından ilişkilidir ve bütün bu alanlardaki parametrelerin kontrolü için tayinlerin hızlı, duyarlı ve sürekli bir şeklide yapılması gereklidir. Bu durum düşünüldüğünde biyolojik bir tanıma elementi ve uygun ileticiyi (transduseri) birleştiren biyosensörler hızlı ve duyarlı bir tayin için alternatif araçlardır.

Biyosensör, biyolojik olaylardaki biyokimyasal değişimleri algılayarak, biyolojik olayın teşhisine imkân tanıyan bir ölçme sistemi olarak tanımlanabilir. Bir biyosensörün genel anlamdaki şematik tasarımı Şekil 1.7'de gösterilmiştir.



Şekil 1. 7. Biyosensörün Yapısı

Tüm canlılar yaşadıkları ortamdaki değişimleri algılayıp yaşamlarını sürdürebilmek için değişimlere uymaya çalışırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin in vitro kullanımı için temel oluşturmuştur (Coulet, 1991; Turner, 1987).

Biyosensörlerin tarihi 1950'li yılların ortalarında L.C. Clark'ın Cincinnati Hastanesinde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O_2 miktarını bir elektrot ile izlenmesiyle başlar. 1962 yılında Clark ve Lyons, Glikoz Oksidaz (GOD) enzimini O_2 elektrotla kombine ederek kanın glikoz düzeyini ölçmeyi başarmışlardır. Böylece biyolojik sistemin yüksek spesifikliğini (enzim) ve fiziksel sistemin (elektrot) duyarlılığını birleştiren yeni bir analitik sitem oluşmuştur.

$$\text{Glukoz} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{GOD}} \text{Glukonik Asit} + H_2O_2$$

Biyolojik sıvıdaki çözünmüş oksijen elektrot etrafındaki membranı geçerek elektrot yüzeyine ulaştığında glukoz oksitlenip glukonik aside dönüşür ve bu sırada O_2 harcanır. Ortamda glukoz bitince O_2 tüketimi durur. O_2 elektrodu ile başlangıçtaki ve reaksiyon sonundaki çözünmüş oksijen ölçülür. Aradaki fark ortamdaki glukozun yükseltgenmesi için harcanan O_2 olup buradan biyolojik sıvıdaki glukoz miktarı

hesaplanır. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanırken sisteme biyomateryalin de katılması ile diğer birçok maddenin tayini mümkün olmuştur. Böylece hazırlanan analiz sistemlerine biyosensör adı verilmiştir. Clark ve Lyons'un geliştirdiği ilk biyosensörde elektron alıcısı olarak oksijen kullanılırken, ikinci nesil biyosensörlerde O_2 yerine enzimin redoks merkezinden elektrot yüzeyine taşıyabilen bir redoks medyatörü kullanılmaya başlanmıştır.

$$GOD\text{-}FADH_2 + M_{ox} \rightarrow GOD\text{-}FAD + M_{red} + 2H_2$$
$$M_{red} = M_{ox} = \text{redoks medyatörü}$$

Günümüzde biyosensörler; klinik diyagnostik, biyomedikal sektör, proses kontrolü, biyoreaktörler, ilaç sanayi, biyoteknoloji, tarla tarımı, bağ-bahçe tarımı ve veterinerlik, sıvıların analizinde, çevre kirliliği ve kontrolünde, biyoloji, kimya, savunma sanayi, arıtım ve kontrol teknolojileri gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmakta ve bu konularda yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Son yıllarda biyosensör kavram ve tanımlarında önemli değişme ve genişlemelere paralel olarak, algılama mekanizmaları (görme, işitme, koku alma, tat alma) ideal biyosensör olarak görülmekte ve bu mekanizmaların yapay olarak üretilmesi çalışmaları hızla devam etmektedir.

Ayrıca biyosensörler; gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler, organik maddeler, bazı organik bileşiklerin yanında enzimler, virüsler ve mikroorganizmaların tayininde kullanılırlar. Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz alanları Çizelge 1.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 1. 1. Biyosensör Gruplarının Analiz Alanları

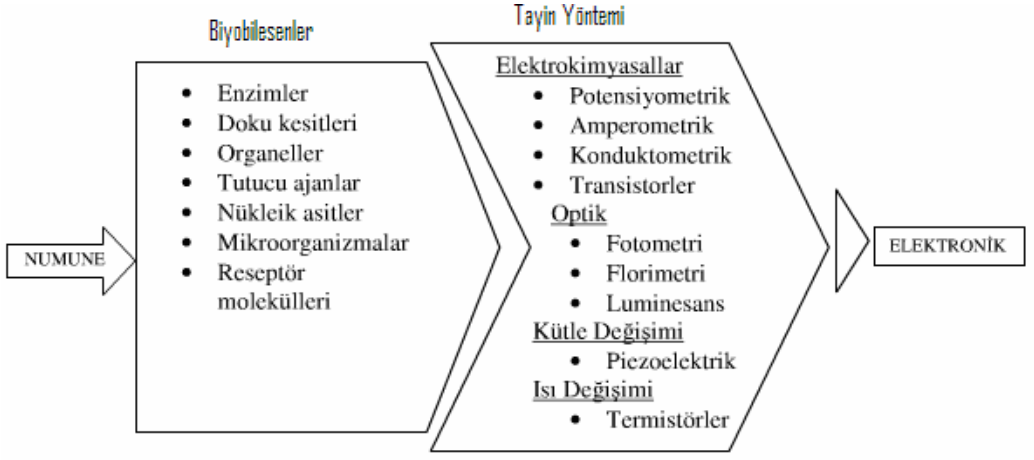
BİYOSENSÖR GRUBU	**KAPSADIĞI ANALİZ ALANI**
Enzim Sensörleri	Küçük moleküllü organik yada anorganik maddeler(ilaçlar, gıda maddeleri, vitaminler, antibiyotikler…)
Mikrobiyal Sensörler	Enzim sensörlerinin kapsadığı alanlar+BOD, Toksisite, Mutajenite
DNA Sensörleri	Virüsler, patojen mikroorganizmalar
Immuno Sensörler	Virüsler, patojen mikroorganizmalar+ ksenobiyotikler

Biyosensörlerdeki biyoaktif bileşen spesifik ve kararlı olmalıdır. Biyoaktif bileşenin kararlı olması çok sayıda analize imkân vereceğinden biyosensörün ekonomik olmasına zemin hazırlar. Biyosensör cevaplarının doğru, duyarlı ve tekrarlanabilir olması büyük önem taşır. Cevap zamanının kısa olması ise biyosensör kullanımının cazip hale gelmesinde en önemli faktörlerden biridir. Biyosensörün ölçüm ünitesinin ucuz ve taşınabilir olması değişik alanlarda yaygın kullanıma imkân sağlar.

Biyosensörlerin yüksek spesifiklik yanında renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir derişim aralığında doğrudan ölçüme olanak sağlaması gibi üstünlükleri vardır. Fakat reseptör olarak adlandırılan biyokomponentlerin pH, sıcaklık ve iyon şiddeti gibi ortam koşullarından etkilenerek biyosensörün kullanım ömrünün kısaltması ise bir dezavantajdır (Skoog ve ark., 1997).

1.3.1. Biyosensörlerin Yapısı ve Çalışma Prensibi

Biyosensörler genel olarak analizlenecek madde ile seçimli olarak etkileşime giren biyoaktif bir bileşenin, bu etkileşim sonucu ortaya çıkan sinyali ileten bir iletici sistem ile birleştirilmesi ve bunların bir ölçüm sistemi ile kombinasyonuyla oluşturulur. Biyosensörün görevi, biyolojik bir olayın elektriksel sinyale dönüştürülmesidir (Telefoncu, 1997).



Şekil 1. 8. Biyosensörlerin çalışma prensibi

Biyosensör sistemi üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bunlar, seçici tanıma mekanizmasına sahip 'biyomolekül, biyoajan', bu biyomolekülün incelenen madde ile etkileşimi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere çeviren 'çevirici' ve 'elektronik' bölümlerdir. Bu bileşenlerden en önemlisi, tayin edilecek maddeye karşı son derece seçimli fakat tersinir bir şekilde etkileşime diren duyarlı biyomoleküllerdir. Biyosensörlerde biyomolekül olarak; enzimler, mikroorganizmalar,

organeller, doku kesitleri, antikorlar, nükleik asitler ve biyolojik zarlar içine yerleşmiş kimyasal reseptörler kullanılabilir. Biyosensörlerin yapısında görev alan biyomoleküller çoğu kez biyoreseptör olarak adlandırılırlar. Biyoreseptörler analizlenecek maddeyi dönüşüme uğratırlar ve bu dönüşüme eşlik eden değişimler dönüştürücü tarafından algılanır. En yaygın kullanılan biyoreseptörler, yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimlerdir. Uygun bir enzimin bulunamaması veya enzimin kararsız olması ve birden çok sayıda maddenin tayini durumlarında hücre sistemleri veya mikroorganizmalar kullanılır. İncelenen maddenin varlığında, biyomolekül bir dönüştürücü ile belirlenebilen fizikokimyasal bir etkiye sahip olmalıdır. Biyomoleküller biyoaffinite ve biyokatalitik moleküller olarak ikiye ayrılabilirler (Şekil 1.9). *Biyoaffinite molekülleri* olan antikorlar, hormon almaçları, DNA, lektin gibi moleküller antijenlerin, hormonların, DNA parçacıklarının ve glikoproteinlerin moleküler tanımlanmasında kullanılırlar (örneğin, iletici sistem üzerinde antikor immobilizasyonuyla antijenlerin tayini). *Biyokatalitik moleküller* ise, analit üzerinde moleküler değişime neden olmakta ve bu dönüşüm onucu ortamda azalan ya da artan madde miktarı takip edilerek sonuca gidilmektedir. Bu amaçla saf enzim sistemleri, mikroorganizmalar ve bitkisel veya hayvansal doku parçaları kullanılır.

BİYOAFFİNİTE SENSÖRLER		BİYOKATALİTİK SENSÖRLER	
RESEPTÖR	ANALİT	RESEPTÖR	ANALİT
• Enzim	Substrat,İnhibitör	Enzim	Substrat
• Apoenzim	Prostetik grup	Mikroorganizma	Kofaktör
• Antikor	Antigen	Organel	Aktivatör
• Reseptör	Hormon	Doku kesiti	İnhibitör
• Lektin	Glikoproteinler		Enzim
	Sakkaritler		
	Protein		

Şekil 1. 9. Biyoaffinite ve Biyokatalitik sensörler

Dönüştürücüler (transduserler), biyomolekül aracılığı ile reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştüren cihazlardır (Gerard ve ark., 2002). Dönüştürücüler biyokimyasal reaksiyona göre seçilirler (Çizelge 1.2). Elektrotlar, amperometrik ve potansiyometrik ölçmelerde kullanılır ve burada hedef analit maddedir (O_2 elektrodunda çözünmüş O_2, pH elektrodunda H^+ iyonu gibi).

Teorik olarak biyoreseptör ve dönüştürücülerin (transduserlerin) birçok kombinasyonu mümkün olmasına rağmen bu kombinasyonlar bir elektrik sinyali

oluşturmazlar ise biyosensör fonksiyon göstermez. Örneğin; dönüştürücü olarak bir termistörün kullanılması durumunda substratın dönüşüm reaksiyonu sonucu entalpide herhangi bir değişim olmaz ise biyosensör çalışmaz (Telefoncu, 1999).

Çizelge 1. 2. Biyosensörler için kullanılan farklı dönüştürücüler

Dönüştürücü Teknolojisi	**Yanıt**
Elektrokimyasal	
Amperometrik	Uygulanan akım
Potansiyometrik	Voltaj
Kondüktometrik	Empedans
Optik	
Kalorimetrik	Renk
Luminesans	Işık şiddeti
Floresans	Işık şiddeti
Kalorimetrik	
Termistör	Sıcaklık

Biyosensörlerin çalışması sırasında ilk olarak substratın çözelti içerisinden biyosensör yüzeyine taşınması gerçekleşir. Substratın taşınması difüzyon, karıştırma gibi çeşitli şekilde olabilir. Daha sonra substrat biyomolekülün aktif bölgesine difüzlenir. Biyomolekül ve substrat arasında reaksiyon meydana gelir ve bu etkileşme sonucu gaz molekülleri (O_2, CO_3, NH_3 gibi) salınabilir ya da kullanılabilir, seçimli iyonlar oluşabilir (H^+, NH_4^+, diğer tek değerlikli anyon ve katyonlar), ısı açığa çıkar ya da kaybolur, optik yoğunluk değişebilir, elektron salınabilir ya da kullanılabilir. Biyomolekül ile substratın reaksiyonu sonucu oluşan ürün dönüştürücü yüzeyine taşınır. Dönüştürücü yüzeyinde yukarıda anlatılan değişimler algılanıp elektriksel devrelerle ölçülebilecek bir boyuta dönüştürülür. Ölçülen elektriksel sinyal analit derişimiyle orantılıdır.

1.3.2.Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler kullanılan dönüştürücünün (transduserin) çeşidine bağlı olarak optik, kalorimetrik, piezoelektrik ve elektrokimyasal olarak sınıflandırılabilirler.

Optik biyosensörler; biyokimyasal bir reaksiyon sonucu yayılan ya da absorplanan ışının ölçümünü esas alırlar. Optik biyosensörlerde hedef ışıktır. *Kalorimetrik biyosensörler*; analitin uygun biyomolekül ile biyokimyasal reaksiyonu

sonucu oluşan ısı değişiminin ölçümüne dayanır. *Piezoelektrik biyosensörler*; karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan numunenin kütlesinin ölçümüne dayanır. Kristalin salınım rezonansının kütle yüklenimi sebebiyle değişmesi piezoelektrik sensörlerin hedefidir. *Elektrokimyasal biyosensörler*; biyoetkileşim sırasında oluşan ya da tüketilen elektron gibi elektrokimyasal türlerin oluşturduğu sinyalin ölçümünü esas alır. Ölçülecek elektrokimyasal özelliğe göre elektrokimyasal biyosensörler, kondüktometrik, potansiyometrik ve amperometrik olarak üç gruba ayrılır. *Kondüktometrik biyosensörler*, biyolojik bir elementin sebep olduğu bir çift metal elektrot arasındaki iletkenlikteki değişiklerin ölçümüne dayanır. *Potansiyometrik biyosensörlerde*, çalışma elektrodu ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünden yararlanılarak madde miktarı tayin edilir. *Amperometrik biyosensörlerde* ise, sabit bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümü esas alınır (Telefoncu, 1999; Chaubey ve Malhotra, 2002).

1.3.3. İdeal Biyosensör Özellikleri

İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler ve karakteristik davranışlar vardır. Bunlar;

Kararlılık; Hazırlanan biyosensörün kararlı olması biyosensör ömrünün uzun olması anlamına gelir. Elektrot kararlılığının yüksek olması ideal biyosensör için gereklidir. Kararlılık kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır. Ayrıca pH, ısı, nem, ortam, O_2 derişimi gibi parametrelerden de biyosensörün kararlılığı etkilenmektedir.

Doğrusal çalışma aralığı ve gözlenebilme sınırı; Kalibrasyon grafiğinde substrat derişimi ile sensör cevabı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu derişim aralığına 'doğrusal çalışma aralığı'; bu doğrusal grafiğin en alt sınırı 'gözlenebilme sınırı' olarak tanımlanır. Doğrusal çalışma aralığı ve gözlenebilme sınırı, ortamda var olan ve girişim yapan maddelerin varlığına önemli ölçüde bağlıdır. Buna ek olarak ortamın pH'sı, sıcaklık, kullanılan tampon cinsi, tampon derişimi gibi parametreler de biyosensör cevabına etki ederek doğrusal çalışma aralığını ve gözlenebilme sınırını değiştiren faktörlerdir.

Tekrarlanabilirlik; İdeal bir biyosensör de elektrot ile aynı koşullar altında ard arda yapılan ölçümlerde hemen hemen aynı sonuçların okunması istenir. Ancak pratikte pek mümkün olmayan bu durum göz önüne alınarak yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir. Enzim sensörleri ile tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesinde kullanılan enzimin aktivitesi, kararlılığı ve

saflık düzeyinin önemi büyüktür. Biyosensörün tekrarlanabilirliği ne kadar iyi olursa biyosensörün uygulamalarının da o kadar iyi olduğundan söz edilebilir.

Duyarlılık; Duyarlılık spesifik bir türün derişimindeki değişikliğe bağlı olarak biyosensör sinyalinin zamanla değişimi olarak tanımlanabilir. İdeal bir biyosensörün duyarlılığı, biyosensör ömrü boyunca sabit kalmalı ve sinyalin elektronik tasarım ile uygun biçimde ölçülebilmesi için yeterince yüksek olmalıdır.

Seçicilik; İdeal bir biyosensörde en önemli parametrelerden birisi seçicilik özelliğidir. Biyosensör, yalnızca hedef analitin derişimindeki değişimlere cevap vermeli ve diğer türlerin varlığından etkilenmemelidir.

Cevap süresi; Cevap süresi, biyosensörün analizlenecek maddenin bulunduğu ortama temas ettiği andan sinyalin kararlı hale geldiği ana kadar geçen süredir. Bir biyosensörün cevap süresi elde edilen akım-zaman eğrilerinden anlaşılabilir. Örneğin, elde edilen eğride basamakların şekli yayvan ve geniş ise cevap zamanı uzun (yavaş), tersi durumda ise cevap zamanı kısa (hızlı)'dır. Çok sayıda numunenin söz konusu olduğu rutin analizlerde en kısa sürede elde edilen sonuç büyük önem taşıdığından dolayı biyosensörün cevap zamanının kısa olması istenir.

Biyosensör ömrü; Biyosensörün normal çalışma şartlarında duyarlılığını koruduğu süre biyosensör ömrü olarak tanımlanır. Biyosensörün ömrü yapılan ölçüm sayısına ya da ölçülen analitin derişimine bağlı olarak değişebilir. Biyosensör ömrüng kısıtlayan en önemli faktör biyolojik dönüştürücünün aktivitesindeki azalmadır.

1.4. Enzimler

Enzimler; kendisi parçalanmadan veya değişikliğe uğramadan kimyasal reaksiyonu katalizleyen biyolojik sistemlerin reaksiyon katalizörleri, biyokimyasal olayların vücutta yaşam ile uyumlu bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan moleküllerdir. Enzimler, gerekli koşullar sağlanması durumunda doğal ortamlarının dışında pek çok alanda kullanılabilmektedir. Enzimler çoğu zaman renksizdirler; suda veya tuz çözeltisinde çözülebilirler. İşlem sonunda, tepkimeye girdikleri ilk hallerinde tepkimeden çıkabildiklerinden dolayı her enzim bir biyokatalizördür.

Kuramsal olarak bir enzim belirli bir tepkimeye girip, herhangi bir değişikliğe uğramadan çıktığı için sürekli aynı türden tepkimelere katılabilmelidir. Ancak gerçekte durum enzimlerinde belirli bir ömrü olduğundan dolayı böyle değildir (Arnold,1999).

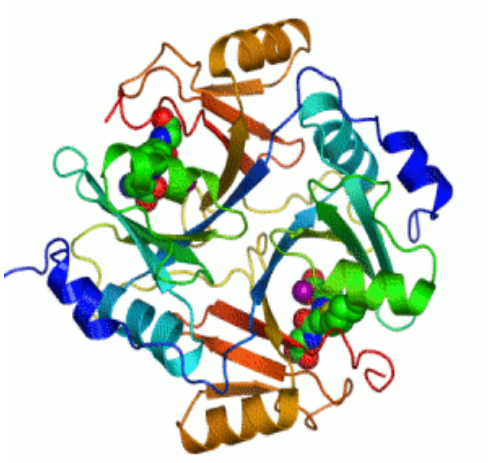
Bir mikromol substratı bir dakikada ve optimum koşullarda ürüne çeviren enzim miktarı bir ünite olarak kabul edilmektedir. Bir miligram proteinde bulunan ünite sayısı

ise spesifik aktivite olarak kabul edilir. Yani spesifik aktivite ünite/mg olarak kabul edilmektedir.

Enzimlerin spesifiklik özellikleri dört kısımda açıklanabilir. *Mutlak spesifiklik*; bir enzimin yalnızca spesifik bir substratın spesifik bir reaksiyonunu katalize etme özelliğidir. *Grup spesifikliği*; bir enzimin benzer fonksiyonel grupları içeren sınırlı sayıda substrat ile reaksiyonlaşma özelliğidir. *Bağ spesifikliği*; bir enzimin proteinlerin peptit bağı, karbonhidratların glukozidik bağı gibi belli bağ tipleri üzerine etkili olmasıdır. *Stereospesifiklik*; bir enzimin yalnızca glukozun D ve L izomerleri gibi belli optik izomerlere etkili olma özelliğidir.

1.4.1. Enzimlerin Yapısı ve Çalışma Mekanizması

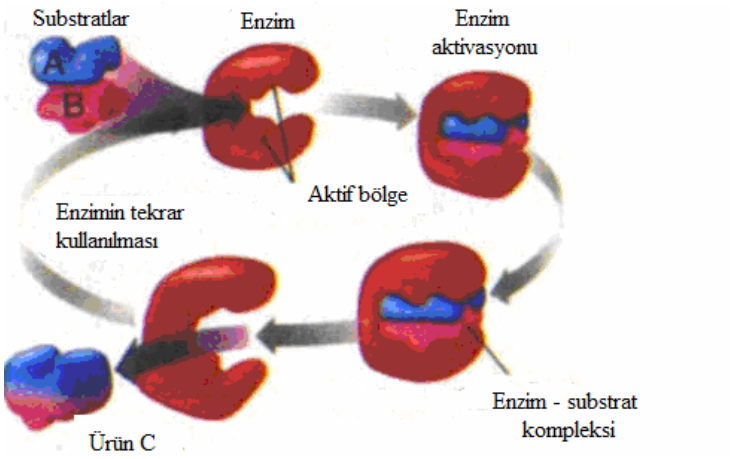
Enzimler birer proteindir ve amino asit denilen yapı taşlarından oluşmuşlardır. Amino asitler; bir tane karbon atomuna (C) bağlanmış bir amino grubu ($-NH_2$), bir hidrojen (-H), bir karboksil grubu (-COOH) ve bir de değişken yan gruptan (-R) oluşurlar. Yirmi amino asidin tamamı bu temel yapıya sahiptir. Onları birbirinden ayıran tek şey, taşıdıkları yan grupların büyüklük, şekil, elektrik yükü, suya duyulan ilgi ve aktiflik açısından farklı olmalarıdır. Enzimi oluşturan amino asitler birbirleriyle etkileşerek, zincirin kıvrılıp bükülmesine ve sonuç olarak da üç boyutlu bir yapı kazanmasına neden olurlar (Şekil 1.10).



Şekil 1. 10. Gliyoksalaz enzimin üç boyutlu yapısı (tr.wikipedia.org)

Yapıdaki bazı amino asitlerin taşıdıkları yan gruplar, enzimin üç boyutlu yapısında bir bölgede toplanarak ‘aktif bölge ‘ denilen bir alan oluştururlar. Enzimlerin tepkimeleri katalizleme ve çok seçici olmalarının sırrı bu bölgedir. Enzim büyük olmasına karşın, substrat molekülün sadece aktif bölgeye bağlanır ve biyokimyasal reaksiyonlar bu bölgede gerçekleşir. Aktif bölgeyi oluşturan amino asit yan zincirleri

substrata uyumlu üç boyutlu bir yapı oluşturur ve aktif bölge substratı bağlayarak bir enzim-substrat kompleksi meydana getirir. Ardından oluşan kompleks ürüne dönüştükten sonra enzim üründen ayrılır (Şekil 1.11).



Şekil 1. 11. Bir substrat molekülünü bağlayan bir aktif bölgeli enzimin şematik olarak gösterilmesi (www.bilgiustam.com)

Enzim reaksiyonlarında substrat ürüne dönüşürken enzim-substrat kompleksi üzerinden geçtiği kabul edilir. Aktif bölgenin substrat için uygun geometride olması uygun yön ve açıda bulunması, etki reaksiyon serbest enerji (ΔG) değişiminin yaklaşık 10 kat azalmasına yani reaksiyon hızlarının yüz milyon kat artmasında yardım ederek enzimlerin substrat kompleksinin oluşmasını çok kolaylaştırır. Ayrıca aktif komplekste bir gerginlik meydana gelir ki, ürüne dönüşürken bu gerginliğin giderilmesinde reaksiyon hızının artmasına katkısı olur (Tüzün,1992).

Aktif bölgedeki enzim-substrat bağlanmasını açıklayan iki model ileri sürülmüştür. Fisher'in anahtar-kilit modelinde substrat ve enzimin aktif bölgesinin birbirine uyacak şekilde önceden belirlenmiş olduğu varsayılır. Koshland'ın uyum modeline göre ise aktif bölge esnek yapıdadır; substrat varlığında, proteinin tersiyer yapısında oluşan bir değişiklikle, enzim substratı katalize en uygun biçimde bağlayacak şekilde bir değişikliğe uğrar.

Her enzim molekülü saniyede 100-1000 substrat molekülünü ürüne çevirme yeteneğine sahiptir. Enzimlerin aktifliği düzenlenebilir. Yani; enzimler ürün oluşum hızı ile hücrenin ihtiyacını karşılayacak şekilde aktive ve inhibe edilebilirler (Telefoncu, 1997).

Enzimler diğer katalizörlerden farklı olarak üç önemli özelliğe sahiptirler:

-Son derece hızlı çalışırlar: Enzimatik reaksiyonları diğer katalizörlerden çok daha hızlı bir şekilde yürütürler.

-Enzimatik reaksiyonları spesifik olarak katalizler: Katalizörlerin çoğu çeşitli kimyasal reaksiyonda katalizör olarak görev yapmasına karşın enzimler genellikle tek tip bir reaksiyonu spesifik olarak katalize eder.

-Biyokimyasal reaksiyonları, vücut sıcaklığında az enerji kullanarak başarırlar: Laboratuvar koşullarında çok yüksek sıcaklıklarda ve fazla enerji kullanarak gerçekleşecek birçok reaksiyon, enzimler sayesinde daha az enerji ile daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşebilir (Gözükara, 2001).

1.4.2. Ürikaz Enziminin Özellikleri

Ürikaz, pürin metabolizmasında oksijenin varlığında ürik asidin hidrojen peroksit ve karbondioksite parçalanmasını katalizleyen bir enzimdir (Yurahi ve ark., 2000). Ürikaz enzimi çoğu memelide, bitkilerde ve mikrobiyal hücrelerde bulunmasına karşın insan ve maymunlarda bu enzim yoktur. Ürikazın insanlarda olmayışının avantaj sayılacak bir yönü ürik asidin kuvvetli antioksidan olmasıdır. Bu özelliği sayesinde ürik asit radikalik oksijen türlerini yok eder ve başta lipid peroksidasyonu olmak üzere doku hasarlarını önlemede önemli rol oynar (Whiteman ve Halliwell, 1996).İnsanlarda ürik asidin anormal seviyelerde artışı gut gibi hastalıklara sebep olduğundan ürikaz kan ve idrarda ürik asit içeriğinin ölçülmesi için yararlıdır ve diagnostik bir enzimdir (Suzuki ve ark., 2004). Enzimin izoelektrik noktasının pH deperi 4,64; aktivite için optimum pH değeri 8,5-9,5arasında olduğu ve kararlıklık için optimum pH değerinin ise 6,0-9,5 aralığında olduğu belirtilmektedir (www.sigmaaldrich.com).

1.4.3. Enzim Reaksiyonlarını Etkileyen Faktörler

Enzimler kimyasal reaksiyonları gerçekleştirirken bazı faktörlerin etkisi altında kalırlar. Bunlardan en önemlileri, ortam pH'sı, sıcaklık ve substrat derişimidir.

Sıcaklık: Her enzim reaksiyonunun optimal bir ısı seviyesi vardır. Sıcaklık arttığında moleküllerin hareketi artığından dolayı tüm kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonların hızı da artar. Enzimler protein yapısında olduklarından, belirli bir sıcaklıktan sonra denatüre olmaya başlar. Bu enzim molekülünün önce tersiyer yapısının ve sıcaklık artmaya devam ettikçe sekonder yapısının bozulması demektir. Yapının bozulmasından enzimin aktif bölgesi de etkilenir ve reaksiyon hızı ani olarak azalır (Tüzün, 1992).

pH: Enzim, substrat ve koenzim moleküllerinde asidik ve bazik gruplar vardır. Enzim –substrat kompleksinin en kararlı biçimde oluşması, yani reaksiyon hızının

maksimum olması için bu grupların belirli bir iyonlaşma durumunda olması gerekir. Bunun dışındaki iyonlaşmalarda enzim-substrat kompleksi zayıflar ve reaksiyon hızı düşer. Bu, optimum bir pH'da reaksiyon hızının maksimum olması demektir (Tüzün,1992). Her enzimin pH 3 ile 8 arasında olan optimum bir pH'sı vardır. Optimum pH'nın her iki yanında reaksiyon yavaşlamaktadır. Çok aşırı uçlarda ise, enzim inaktive olabilmektedir. Bundan dolayı enzim çalışmalarında pH' yı optimumda sabit tutmak için tampon çözeltileri kullanılmaktadır. Kullanılan tampon cinsi, substratın yapısı ve enzimin elde edildiği kaynak gibi faktörler optimum pH'yı etkilemektedir (Gözükara, 2001).

Substrat derişimi: Enzimatik bir reaksiyon hızı substrat derişimi arttıkça artar ve belirli bir substrat derişiminde hız maksimum olur. Bu noktada enzim substrata tamamen doymuştur ve bu noktadan sonra hız değişmez.

1.4.4. Enzim Reaksiyonlarının Kinetiği

Enzimler reaksiyon kinetiği ve mekanizması yönünden kimyasal katalizörlere benzerler. Reaksiyonda ilk olarak enzim ile substrat arasında bir ara bileşik oluşur. Bu kararsız ara bileşiğin oluşum hızı enzim ve substrat derişimine bağlıdır. Reaksiyon koşulları ile enzim derişimi sabit tutulup substrat derişimi arttırılırsa reaksiyon hızı belli bir maksimum değere ulaşır. Bu değerden sonra, substrat derişimi artırılsa bile reaksiyon hızında herhangi bir değişim gözlenmez. Bunun nedeni, ortamdaki enzim moleküllerinin ortamdaki substrat moleküllerini karşılayamamasıdır. Yani, enzim-substrat ara bileşiğinin oluşum hızında enzim derişimi kısıtlayıcı rol oynar. Enzimlerin bu davranışı 1913 yılında L. Michealis ve M.Menten tarafından önerilen bir mekanizmayla açıklanmıştır.

$$E+S \leftrightarrow ES \leftrightarrow P+E \qquad (1.1)$$

Burada E enzimi, S substratı, ES arabileşiği ve P ürünü göstermektedir. Bu mekanizmanın kinetik analizi 1926 yılında Brips ve Haldane tarafından yapılmıştır.

Reaksiyon hızı için;

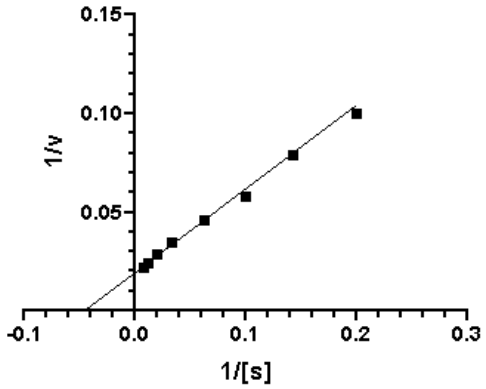
$$V= V_m.[S] / K_m+S \qquad (1.2)$$

eşitliği elde edilir. Bu eşitlik (1.2) de görüldüğü gibi belli bir değerden sonra substrat derişiminin artırılmasıyla tepkime hızının artmayıp sabit değerde kalmasını sağlar. Bu denklem Michealis- Menten eşitliği ve 'K_m' ise Michealis-Menten sabiti olarak tanımlanır. Fiziksel olarak K_m katsayısı enzim ile substratın birbirine olan ilgisini göstermektedir. Enzim ve substrat arasındaki ilgi fazla ise oldukça düşük substrat derişimlerinde enzimi substrat ile doyurmak mümkün olur (Devlin, 1997).

Lineerleştirmek için eştilik (1.2) 'nin tersi alınır.

$$1/V = Km/Vm \times 1/S + 1/Vm \qquad (1.3)$$

denklemi elde edilir. (1/[S])' e karşı (1/V) grafiği çizildiğinde doğru elde edilir.



Şekil 1. 12. Lineweaver-Burk grafiği

Enzimin Km değeri hesaplanırken Şekil.1.12'deki, (1.3) denklemi ile tanımlanan Line weaver-Burk çiziminden yararlanılır.

Michealis-Menten eşitliği, çözünmüş substratlar ve kütle aktarım kısıtlaması olmayan sistemler için geçerlidir. Bu nedenle çözünmez substrat sisteminde ve immobilize enzimler difüzyon kısıtlamalarından dolayı görünür K_m değerleri verilir (Bailey ve Ollis,1997).

1.4.5. Enzimlerin İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzimler suda çözünen spesifik katalizörlerdir. Biyosensör sisteminde en yaygın kullanılan biyomolekül enzimdir. Serbest enzim reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılamadığından uygulamalarda reaksiyonu kontrol etmek oldukça zordur. Ayrıca enzimi aktivitesini yitirmeden reaksiyon ortamından çıkarmak olanaksız olduğundan enzimin tekrar kullanılması mümkün değildir. Enzimler spesifik ancak pahalı katatlizörlerdir. Tüm bu sorunları ortadan kaldırmak için enzimler immobilize edilmektedir. İmmobilize enzimin serbest enzime göre üstünlükleri:

-Reaksiyon sonunca ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir.

-Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.

-Birçok kez ve devamlı kullanılabilir.

-Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.

-Sürekli işlemlere uygulanabilir.

-Enzimin kendini parçalama olasılığı azdır.

-Bazı durumlarda serbest enzimden daha fazla aktivite gösterebilir.

-Mekanistik çarpışmalara uygundur.

-Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.s) karşı dayanıklıdır.

Kelime anlamı olarak immobilizasyon hareketsiz hale getirme demektir. İmmobilize hale getirilmiş enzimlerin gerçekten hareketleri sınırlandırılmış olmakla birlikte tam olarak hareketsiz hale getirilmemektedir. Biyosensörler hazırlanırken elektroda enzim immobilizasyonu için yaygın kullanılan yöntemler aşağıda anlatılmaktadır (Telefoncu 1997, Mello ve Kubota 2002):

Kovalent bağlama: Enzimler doğrudan iletiçiye veya önceden uygun bir film ya da tabaka ile kaplanmış iletiçiye kovalent bağlanabilirler. Kovalent bağlama enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir. Biyomoleküllerin kovalent bağlama ile immobilizasyonu biyosensöre pH, iyonik şiddet ve sıcaklık değişikliklerine karşı yüksek bir direnç ve defalarca kullanıma uygun kararlılık kazandırsa da biyomolekülde kısmi bir aktivite kaybına sebep olabilir. Enzimlerin kovalent bağlanmasında dikkat edilmesi gereken önemli nokta bağlanmanın enzim aktivitesi için esas olan aminoasitlet üzerinden gerçekleşmemesi ve bu grupların bağlanma sırasında sterik olarak rahatsız edilmemesidir (Mascini ve Guilbant, 1986; Telefoncu, 1999; Eggins, 2002).

Adsorpsiyon: İmmobilizasyonda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Genellikle, enzim çözeltisine, yüzeyi membran ya da film ile kaplanmış elektrot daldırılır ve belirli bir süre enzimin adsorplanması için beklenir. Adsorpsiyonda etkin olan Van der Waals kuvvetleridir. Enzim elektrodun kullanımı sırasında sıcaklık, pH, iyonik şiddet gibi faktörlerin değişimine bağlı olarak adsorplanan enzimin bir kısmının veya tamamının çözeltiye geçmesi mümkün olabileceğinden, adsorpsiyon ile immobilizasyon güvenilir bir yöntem değildir. En sık kullanılan adsorbanlar, karbon, selüloz asetat membranları, polistiren, polivinilklorür ve silikadır.

Tutuklama: Enzim molekülünün bir membran veya tabaka (matriks) içerisinde hapsedilmesidir. Tutuklama yöntemi ile immobilizasyonda enzim fiziksel veya kimyasal olarak bir taşıyıcıya bağlı değildir. Enzimler polimer matrikslerde veya mikrokapsülleme ile yarı geçirgen membranlarda tutuklanabilirler.

İyonik bağlama: Bu yöntemde, iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması esastır. Bazı durumlarda iyonik bağlamanın yanında fiziksel adsorpsiyon da etkili olmaktadır. İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden dolayı enzim kaybı söz konusu olabilmektedir.

Çapraz bağlama: Bu yöntem, tutuklama yöntemi ile kimyasal bağlanmanın bir kombinasyonudur. Tutuklanmış molekül glutaraldehit, hegzametilen diizosiyanat, diflorodinitrobenzen, disüksinil süberat gibi bifonksiyonel reaktiflerle film veya

tabakaya kovalent bağlanır. Gluteraldehit en sık kullanılan çapraz bağlayıcı reaktiftir ve ortamdaki derişimi %2-5 (w/w) olmalıdır.

1.5. Enzim Sensörler

Biyosensör teknolojisinin tarihsel geçmişine bakıldığında bu alandaki ilk çalışmaların enzim sensörler ile başladığı görülmektedir. Çeşitli maddelerin duyarlı ve pratik analizlerine duyulan ihtiyacın artmasıyla birlikte ilk enzim sensörler ile ilgili bilimsel çalışmalar 1950'li yılların başında başlamıştır. 1962'de Clark ve Lyons ile 1962'de Updike ve Hick tarafından rapor edilen glukoz tayinine yönelik glukoz oksidaz enzim elektrotları bu konudaki ilk örneklerdir.

Genel anlamda bakıldığında diğer biyosensörlerde olduğu gibi enzim sensörleri de biyoaktif tabaka, iletici ve ölçüm sisteminden oluşur. Enzim sensörleri diğer biyosensörlerden ayıran tek fark biyomolekül olarak enzim kullanılmasıdır.

Pratik ve ticari uygulamalarda enzim sensörlerin büyük bir üstünlüğü göze çarpmaktadır. Bu durumdaki en büyük etmen canlı sistemlerle ilgili hemen hemen her türlü maddenin doğrudan ya da dolaylı olarak analizinde kullanılabilecek binlerce enzimin varlığıdır. Enzim sensörlerin en önemli özelliği, son derece seçimli olarak biyolojik etkileşmelere cevap verebilmeleridir. Enzimin katıldığı biyolojik etkileşmelerde substrat harcanması, ürün oluşumu, pH ya da iletkenlik değişimi, ısı alışverişi gibi çeşitli olaylar gözlenebilir. Bu değişimlerden herhangi biri düzenleyici sistemlerden biri tarafından algılanması sonucunda istenilen ölçüm gerçekleştirilebilir.

Sensörlerde elektrot materyalinin biyomolekül ile elektrot yüzeyi arasında bir yük aktarım yolu sağlamak amacıyla elektron vericileri ya da alıcıları ile modifiye edilmesi ilgi çeken bir yaklaşımdır. Böylece, elektrottaki elektronların aktarımı daha düşük potansiyellerde gerçekleşebilir; bunun sonuncunda da bozucu türlerin etkisi azaltılabilir. Bu yaklaşımın bir yararı da belirli reaksiyonların oksijen bağımlılığına son vermesidir.

Enzim sensörler, birinci nesil, ikinci nesil ve üçüncü nesil olarak sınıflandırılabilir (Scott,1998).

1.5.1. Birinci Nesil Enzim Sensörler

Birinci nesil enzim elektrotlar, sadece biyolojik tanıma elementi olan enzim ve ileticiden oluşur. Moleküler oksijenin indirgenmesinin ya da reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksidin (H_2O_2) yükseltgenmesinin belirlenmesini esas alır. Bu elektrotlarda, sabit potansiyelde kaydedilen akım, substrat derişimi ile orantılıdır. Bu elektrotların en

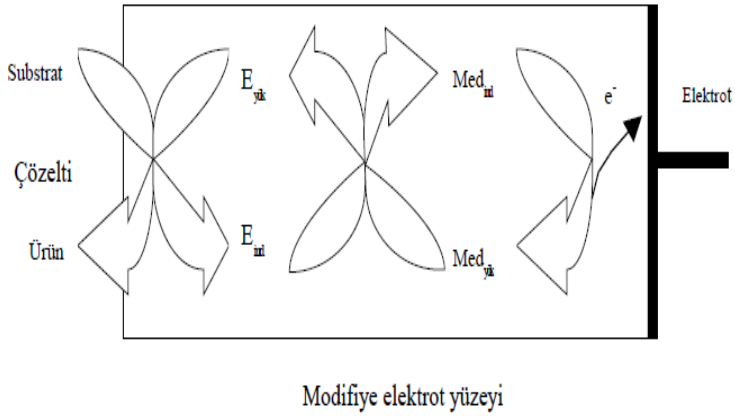
büyük sakıncası, H_2O_2 nin yükseltgendiği yüksek potansiyele yükseltgenebilecek diğer türlerin girişim etkisi yapmasıdır (Castillo ve ark., 2004).

$$\text{Glukoz} + O_2 + H_2O \xrightarrow{GOD} Glukonik\ Asit + H_2O_2$$

Birincil nesil enzim elektrotlarda reaksiyon ürünü olan hidrojen peroksidin +0,68 V'luk sabit potansiyelde yükseltgenmesinden de yararlanılır (Chaubey ve Malhotra, 2002).

1.5.2.İkinci Nesil Enzim Sensörler

İkinci nesil (aracılı) enzim elektrotlarda, elektron taşıyıcısı olarak medyatör adı verilen alternatif yükseltgeyiciler kullanılır. Aracısız sistemlerde reaksiyon oksijene bağımlıyken, aracılı sistemlerde ise oksijen yerine başka bir elektron alıcısı (medyatör) kullanılarak reaksiyonun oksijen bağımlılığına son verilir. Aracılı biyosensörlerin çalışma ilkesi Şekil.1. 13' de verilmiştir.



Şekil 1. 13. Aracılı biyosensörlerin çalışma ilkesi (E_{ind}, $E_{yük}$ indirgenmiş ve yükseltgenmiş enzimler, Med_{ind}, $Med_{yük}$ indirgenmiş ve yükseltgenmiş medyatörler)

Enzim elektrotlarda elektron aktarımını hızlandırmak amacıyla medyatörler kullanılmaktadır (Çizelge.1.3). Medyatörler (aracılar) indirgenmiş enzimi yeniden yükseltgeyebilen ve elektrotta tekrar yükseltgenebilen elektron aktarıcılarıdır. Medyatör kullanımının ölçümlerin oksijen bağımlılıklarının azaltılması, daha düşük yükseltgenme potansiyellerinde çalışılarak ortamda bulunan hedef analit dışındaki diğer elektroaktif türlerin girişim etkisinin azaltılması gibi üstünlükleri vardır (Chaubey ve Malhotra, 2002).

İdeal bir medyatörün sahip olması gereken özellikler; indirgenmiş enzimle hızlı reaksiyon vermesi, kararlı indirgenmiş ve yükseltgenmiş formlarının olması, indirgenmiş formunun oksijenle reaksiyon vermemesi, çalışma koşullarında kararlı

olması ve elektron aktarımı sırasında yan reaksiyonlara katılmaması, numunedeki diğer elektroaktif türlerden daha düşük bir redoks potansiyeline sahip olması ve toksik olmaması olarak sıralanabilir (Kellner ve ark., 1998; Chaubey ve Malhotra, 2002). Medyatör olarak kullanılan madde çözeltiye katılabildiği gibi, elektroda immobilize de edilebilir. İlk yöntem kolay olmasına

karşın teknolojik bir yöntem değildir. Medyatörlerin immobilizasyonu ise, uygun ve daha teknolojik bir yöntemdir (Dzyadevych ve ark., 2008).

Birinci nesil sensörler ile kıyaslandığında, ikici nesil sensörlerin pek çok üstünlüğü olmasına rağmen, özellikle gıda endüstrisi ve biyomedikal uygulamalarda analizler karmaşık matrikslerde gerçekleştirildiğinde, numunelerin yapay bir medyatör ile kirlenmesinin önlenmesi zorunluluğu gibi sorunlar ortaya çıkar (Castillo ve ark.,2004).

Çizelge 1. 3. Yaygın Kullanılan Medyatörler

Medyatör	**Çalışma Potansiyeli (DKE'a karşı)**
Benzokinon	+350 mV
1, 1' – Dimetilferrosen	+100 mV
Ferrosen	+180 mV
Ferrosen – 1, 1'-dikarboksilik asit	+400 mV
Ferrosen monokarboksilik asit	+290 mV
Potasyum hekzasiyanoferrat	+450 mV
Rutenyum heksamin	+ 50 mV
Tetrasiyanokinodimetan	+ 45 mV
Tetratiafulvalen	+160 mV

1.5.3 Üçüncü Nesil Enzim Sensörler

Üçüncü nesil enzim sensörlerin temelini, enzim ve elektrot arasındaki doğrudan elektron aktarımı oluşturur. N-metilfenotiyazin ve tetrasiyanokinodimetandan hazırlanan (NMP^+ $TCNQ^-$) gibi organik iletken tuzlar bu tip sensörlerde elektrot materyali olarak kullanılabilir(Chaubey ve Malhotra,2002).

$$\text{Etanol} + ADH_{(yük)} \longrightarrow Asetaldehi\ d + H^+ + ADH_{(ind)}$$

$$ADH_{(ind)} + NAD \longrightarrow ADH_{(yük)} + NADH$$

$$NADH \xrightarrow{NMP.TCN\ \phi\ Elektrot} NAD + H^+ + \bar{e}$$

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Ürik Asit Biyosensörleri ile Yapılan Bazı Uygulamalar

Çete ve arkadaşları (2006); ürik asit tayini için biyosensör hazırlamak amacıyla, Platin(Pt) yüzeyine pirolün elektropolimerizasyonunu, pirol, elektron taşıyıcısı olarak ferrosen ve asetonitrilde tetrabütilamonyumtetrafloroborat içeren elektrokimyasal hücre ile 0,0-1,0 V arasında 50mV/s tarama hızında dönüşümlü voltametriyle gerçekleştirmişlerdir. Elektrokimyasal polimerizasyon prosesinden sonra ürikazı polipirol film üzerine gluteraldehit/jelâtin çapraz bağlanma prosesiyle immobilize etmişlerdir. Ürik aside karşı biyosensörün cevabı, +0,7 V sabit potansiyel uygulanmasını takiben 330 s sonra ölçülmüştür. Oluşturulan biyosensör ürik asit için mükemmel elektrokataliz göstermiştir. Amperometrik tayin; ürik asitin amperometrik tayininde oluşan H_2O_2 nin elektrokimyasal tayinine dayalıdır. Sensör $5{,}0\times10^{-7}$ M tayin limiti ile ürik aside cevap verir ve 5 hafta süreyle sensör kararlı kalır. Biyosensörün amperometrik cevabına interferans etkileri incelenmişlerdir ve biyolojik sıvılarda biyosensör ile ürik asit tayini gerçekleştirmişlerdir.

Ürik asit seviyesinin gut, hiperüremik ve Lesch-Nyan sendromu ile önemli bir ilişkisi vardır. Böbrek hastalıklarının teşhis ve kliniği için ürik asit tayini önemli bir işarettir. Luo ve arkadaşları (2006); ürikaz immobilize edilmiş Ir modifiye karbon (Ir-C) elektroda dayalı amperometrik ürik asit biyosensörünü ince film screen printing (film baskısı) tekniği ile geliştirmişlerdir. Ürik asit biyosensöründeki yüksek seçiciliğe, Ir-C elektroda dayalı oksidasyon potansiyelinde H_2O_2 nin indirgenmesinden dolayı ulaşılmıştır. Algılama elektrodu olarak ürikaz/Ir-C kullanıldığında, elektroaktif biyolojik türlerden girişim, 0.25 V algılama potansiyelinde azaltılabilir. Ürik asidi, 0,1-0,8 mM derişim aralığında, 16,60 μA/mM hassasiyet ile ürikaz/Ir-C elektroda dayalı amperometrik olarak tayin etmişlerdir. 37 ^{o}C de pH 7 fosfat tamponunda ürik asit biyosensörünün tayin limitini 0,01 mM (S/N=6,18) bulmuşlardır ve ürik asidin algılama karakteristiklerine pH nın, sıcaklığın ve enzim yüklemenin etkisi incelenmişlerdir.

Zhang ve arkadaşları (2007); yumurta kabuğu membran ve oksijen elektroda immobilize edilmiş ürikazdan yapılan ürik asit biyosensörünü tarif etmişlerdir. Algılama düzenleri, ürik asit çözeltisine maruz kalmış çözünmüş oksijen seviyesinin azalmasına neden olan ürikazın enzimatik reaksiyonlarını içerir. Oksijen seviyesindeki azalmayı izlenmişler ve ürik asit derişimu ile ilişkilendirilmişlerdir. Taramalı elektron mikroskopu, ürikazın başarılı bir şekilde immobilize olduğu yumurta kabuğu membranının mikroyapısını göstermiştir. Enzim yüklenmesi, pH, sıcaklık ve fosfat

tampon çözeltisinin biyosensör cevabına etkisini incelenmişlerdir. Ürik asit biyosensörü 2,0 μM tayin limiti ile 4,0-640 μM aralığında doğrusal cevaba ve 100 s den daha düşük cevap zamanına sahiptir. % 3,2 bağıl standart sapma ile 0,10 mM ürik asit çözeltisinde biyosensör iyi bir tekrarlanabilirlik göstermiştir. 4 farklı membran kullanılarak yapılan biyosensörlerin tekrarlanabilirliği % 3,2 dir ve biyosensör en az 3 ay raf ömrü ile iyi bir kararlılık göstermiştir. Örneklerde; glukoz, üre, askorbik asit, laktik asit, glisin, DL-α-alanin, DL-sistein, KCl, NaCl, $CaCl_2$, $MgSO_4$ ve NH_4Cl gibi bazı yaygın interferanslar ürik asit biyosensörünün cevabına hiç girişim yapmadığını göstermişlerdir. Biyosensörü, bazı insan kan ve idrar örneklerinde ürik asit tayininde uygulanmışlar ve sonuçlar ticari kolorimetrik deney kiti ile elde edilenlerle yakınlık gösterdiğini bulmuşlardır.

Arora ve arkadaşları (2007); ürikazı, elektrokimyasal olarak sentezlenmiş polianilin (PANI) filmlerin üzerine çapraz bağlayıcı olarak gluteraldehit kullanarak immobilize etmişlerdir. Bu PANI-ürikaz elektrotları, spektroskopi, dönüşümlü voltametri ve impedans ölçümleri ile karakterize etmişlerdir. Ürikazın morfolojisi ve kovalent bağlanması, yüksek enzim yüklenmesine ve iyi raf ömrüne neden olur. $5{,}1\times10^{-3}$ mM/L olarak elde edilen Michealis-Menten sabiti değeri, serbest ürikaz enzimi için $3{,}4\times10^{-1}$ mM/L ile karşılaştırıldığında önerilen biyosensörlerde, PANI ye bağlanan ürikazların ilgisi ya da aktivitesi gelişmiş olduğu göstermektedir. pH, sıcaklık ve derişimun elektrot aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmişlerdir. Enzim elektrot 4 ^{o}C de saklandığında 17-18 hafta sonra aktivitesinin %95 ini korumuştur. Bu elektrotlar yaklaşık 60 s cevap zamanına sahiptir ve kandaki ürik asidi ölçmede kullanılmışlardır. PANI-ürikaz elektrotla elektrokimyasal ölçümlerde yaklaşık 30 kez kullanıldığında aktivitesinin %90 nını koruması gelişmiş performansını işaret eder.

Wang ve arkadaşları (2007); yeni amperometrik ürik asit sensörü, enzim; ürikaz için dispersant olarak 5 mg/mL polimaleimidostiren (PMS) çözeltisinin 30 μL si ile birlikte 30 mg/mL PMS kloroform çözeltisinin 30 μL si ile oluşturulan polistiren (PS) membran ile altın elektrot yüzeyinin kaplanması yoluyla geliştirmişlerdir. Bu membranı, ürikaz için immobilizasyon kaynağı olarak kullanmışlardır. PS membranda mişel benzer karakterli PMS formları aktif bölgede ürikaz içerir. Bu immobilize ürikaz membran, oksijen geçişine izin verir ki bu ürikaz reaksiyonuyla tüketilir. 5-105 μM derişim aralığında iyi bir doğrusallık elde etmişlerdir. Ürik asit derişimunu var olan indirgenmiş oksijenin azalmasına dayalı negatif potansiyelde tayin etmişlerdir ve L-askorbik asitin girişimi tamamen ortadan kaldırılmışlardır.

Chen ve arkadaşları (2008); substrat dönüşümü ve ürikaz yenilenmesine dayalı sinyal güçlendirme prensibini yeni tek kullanımlık ürik asit (UA) şeridine uygulamışlardır. Hassasiyeti ditiyotreitol kullanılan bir seri metodun üzerinde geliştirilmişler ve ürik asidin tayin limiti 3×10^{-6} mol/L bulmuşlardır. Enzimin elektronlarını verdiği elektrokimyasal olarak aktif elektron alıcısı (potasyum ferrisiyanur) kullanıldığında, UA şeridine interferansları ortadan kaldırmanın mümkün olduğu düşük bir elektrot potansiyeli uygulanabilir. Bu kimyasal güçlendirilmiş sistem; mükemmel hassasiyet ve seçicilikle tayin potansiyeline sahip olduğundan dolayı, kanda örneklere ön işlem uygulanmadan direk ürik asit tayini için oldukça kullanışlıdır. Bu şerit ve geleneksel spektroskopi arasında iyi bağdaşma gözlenmiştir.

Arora ve arkadaşları (2009); 20 günlük eski börülce yapraklarından saflaştırdıkları ürikazı, serbest enzimin başlangıç aktivitesinin %80 nini tutma ve 0,056 mg/cm^2 konjugasyon verimi ile epoksi reçine membranın üzerine immobilize etmişlerdir. Ürikaz epoksi reçine biokonjuge membranı, ürik asit biyosensörü oluşturmak için 'Lovibond' çözünmüş O_2 (DO) ölçer ile kombine elektrot algılama bölümü üzerine takılmışlardır. Biyosensör immobilize ürikaz ile ürik asit oksidasyonu sırasında çözünmüş O_2 deki azalmayı ölçer ki bu ürik asit derişimuyla direk olarak orantılıdır. Biyosensör; pH 8,5, 35 ^oC de ve 10-12 s içinde optimum cevap göstermiştir. 0,025-0,1 mM ürik asit derişimu ve O_2(mg/L) tüketimi arasında doğrusal ilişki bulmuşlardır ve biyosensörü, kanda ürik asit ölçümü için kullanmışlardır. Serumda ürik asitin ortalama değeri sağlıklı erkekte 4,92 mg/dL ve sağlıklı bayanda 3,11 mg/dL dir. Reaksiyon karışımı (8,9 ve 9,8 mg/dl) içinde eklenen ürik asitin geri dönüşüm ortalaması sırasıyla 93,6 ±2,34 ve 87,18±3,17 dir. Var olan yöntem ve standart enzimatik kolorimetrik yöntem ile elde edilen kan ürik asit değerleri korelasyon (r=0,996) ve regresyon eşitliği y=0,984x+0,0674 göstermiştir. Test edilen çeşitli metabolitler arasından sadece glukoz (%11), üre (%38), NaCl (%25), kolestrol (%13) ve askorbik asit (%56) azalmaya neden olurken, $MgSO_4$ ve $CaCl_2$ immobilize enzim üzerinde hiçbir etkisi yoktur. Enzim elektrot, 4 ^oC de 60 günlük periyoda 100 kere kullanım sırasında sadece %32 azalma göstermiştir.

Ahuja ve arkadaşları (2010); etiketsiz ürik asit biyosensörünü, indiyum-kalay-oksit (ITO) kaplı cam plaka üzerine Bis[sülfosüksinimid]suberat (BS^3) çapraz bağlayıcısı kullanarak 3-aminopropiltrietoksisilan (APTES) kendiliğinden oluşan tek tabaka aracılığıyla ürikaz enziminin immobilizasyonuyla tanımlamışlardır. Biyosensörü, (ürikaz/BS^3/APTES/ITO), taramalı elektron mikroskopisi (SEM), atomsal kuvvet

mikroskopisi (AFM) ve elektrokimyasal yöntemlerle karakterize etmişlerdir. Kronoamperometrik cevabı, ürik asit derişimunun bir fonksiyonu olarak sulu çözeltilerde (pH 7,4) ölçmüşlerdir. Biyosensör 39,35 μA/mM hassasiyet ile 0,05-0,58 mM derişim aralığında doğrusal cevap göstermiştir. Cevap zamanı 50s dir ve yaklaşık 7 hafta süresinde enzim aktivitesinin % 90 nı korunmuştur. Elde edilen sonuçlar, APTES modifiye ITO cam tabaka yüzeyinin üzerine çapraz bağlayıcı ile enzimi bağlamanın etkili olduğunu göstermiştir.

Erden ve arkadaşları (2011); ürik asit tayini için iki yeni amperometrik karbon pasta enzim elektrot geliştirmişlerdir. Karbon pasta, ürikaz enzimi, medyatör olarak 1,4-benzokinon ya da poli(vinilferrosen), grafit tozu ve parafin yağının karıştırılmasıyla hazırlanmış ve sonra pasta teflon elektrot gövdesine yerleştirmişlerdir. Ürik asitin tayini enzimatik olarak oluşan H_2O_2 nin oksidasyonu ile gerçekleştirilmişlerdir. Enzim bileşimi, medyatör miktarı, tampon cinsi, pH, tampon derişimu, çalışma potansiyeli ve sıcaklık her iki elektrot için incelenmişlerdir. 1,4-benzokinon modifiye enzim elektrodun çalışma aralığı $1,9\times10^{-8}$ – $2,7\times10^{-3}$ M, tayin limiti $1,9\times10^{-8}$ M ve cevap zamanı 150 sn dir. PVF modifiye enzim elektrodun çalışma aralığı $7,4\times10^{-8}$ – $7,0\times10^{-3}$ M, tayin limiti $7,4\times10^{-8}$ M ve cevap zamanı 120 s dir. Enzim elektrodun raf ömrü, tekrarlanabilirliği ve girişim etkisi incelemiş ve enzim elektrotları kan örneklerinde ürik asit tayini için kullanmışlardır.

Arora ve arkadaşları (2011); yapmış oldukları çalışmada son derece hassasiyet ve seçicilikte ürik asit biyosensörünün gerçekleştirilmesi için potansiyel bir matris olarak, NiO birirktirilen platin kaplı cam yüzeye (NiO/Pt/Ti/cam) RF sıçratmasının önemini vurgulamışlardır. Ürikaz NiO matrisinin üzerine fiziksel adsorpsiyon tekniği ile immobilize etmişlerdir. Hazırlanan biyoelektrodu (ürikaz/NiO/Pt/Ti/cam), dönüşümlü voltametri ve UV görünür spektroskopi tekniği kullanarak ürik asidi algılamak için kullanmışlardır. Biyoelektrot; 1278,48 μA/mM hassasiyet, 0,05-1,0 mM iyi doğrusallık ve analit etrafında ürikazın yüksek ilgisini işaret eden 0,17 mM çok düşük Michealis-Menten sabiti ile yüksek algılama cevap karakteristikleri gösterdiğini bulmuşlardır. Gelişen cevap, tercih edilen yönlendirme ile enzimin etkin yüklenmesi için iyi elektron transfer özelliği ve nanogözenek morfolojisi ile geliştirilen NiO matrisinden dolayıdır.

Amperometrik ürik asit biyosensörünü; Chauhan ve Pundir (2011), altın elektrot üzerine altın nanopartikül (AuNP)-çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) biriktirilmiş tabaka üzerine ürikazın immobilizasyonu ile yapmışlardır. Ürik asit tayinini 0,4 V' da

H_2O_2 nin enzimatik olarak üretilmesiyle gerçekleştirmişlerdir. Sensör optimum cevabı, 7 s, 40C de 50mM tris-HCl tamponunda (pH=7,5) göstermiştir. Biyosensörün doğrusal çalışma aralığı 0.01 mM-0.08 mM , tayin sınırı ise 0,01 mM dır. Sensör ile sağlıklı bireylerin ve gut hastalığı çeken kişilerin kanlarında ürik asit seviyelerini ölçmüşlerdir. Eklenen ürik asitin analitik geri dönüşümü, 10 ve 20 mg L-1, sırasıyla % 98,0 ve % 96,5 dir. Geliştirilen yöntem ve standart enzimik kolorimetrik yöntem ile serum ürik asit seviyeleri arasında iyi bir korelasyon (r=0,998) elde etmişlerdir. Birçok serum maddesi pratik olarak girişim etkisine sahip değildir. Sensör 200 den fazla analizde kullanılmıştır ve 120 gün 4c de saklama ömrüne sahiptir.

Rawal ve arkadaşları (2012); Kitosan-gluteraldehit çaprazbağlı ürikaz, Altın (Au) elektrot yüzeyine elektrokimyasal olarak biriktirilmiş, karboksillendirilmiş çok duvarlı karbon nanotüp (c-MWCNT) ve polianilin (PANI) üzerine absorblanmış Prussion mavisi nanopartiküller üzerine immobilize etmişlerdir. Nanohibrit-ürikaz elektrodu, taramalı elektron mikroskopu (SEM), Furier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (FTIR) ve siklik voltametri (CV) ile karakterize etmişlerdir. Amperometrik ürik asit biyosensörünü, çalışma elektrodu olarak potantiostata direk bağlanan ürikaz / c-MWCNT / PBNPs / Au elektrot, standart olarak Ag/AgCl ve karşı olarak Pt tel elektrot kullanılarak yapmışlardır. Biyosensör optimum cevabı 4s pH 7,5 ve 40 C de göstermiştir. Ürik asit için liner çalışma aralığı 0,005-0,8 mM, gözlenebilme sınırı 5 μM dır. Bu sensörle gerçek serum örneklerindeki ürik asit seviyesini ölçmüşlerdir. Sensor, 4 ^{o}C de saklandığında 7 aylık bir periyotta 400 kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin sadece %37 kaybetmektedir.

Etkin reaktifsiz ürik asit biyosensörünü; Jindal ve ark. (2012), Pulser Lazer Çöktürme Tekniği ile platin kaplı cam yüzeyler üzerine büyütülmüş bakır oksit (CuO) ince film matriksini kullanarak gerçekleştirmişlerdir. P- tip CuO matris film elektroda redoks özellikleri getirmiş ve gelişmiş elektron iletim gücü sağlamıştır. Hassas yanıt elde edilmesini; ürikaz/CuO/ cam elektrot ile ürik asitin biyokatalitik oksidasyonu yoluyla herhangi harici medyatör olmaksızın dönüşümlü voltametri (CV) ve fotometrik analiz kullanılarak çalışmışlardır. Çalışmalar açığa çıkarmıştır ki; ürikaz/CuO/Pt/cam biyo-elektrot 2,7 mA/mM gelişmiş yanıt ile 0,05 mM-1,0 mM ürik asit derişim aralığı üzerinde iyi linerlik ve uzun raf ömrü (>14 hafta) göstermiştir. Düşük Michealis-Menten sabiti (0,12 mM) ; immobilize enzimin analite karşı ilgisini geliştirdiğini göstermiştir. Sonuçlar, reaktifsiz entegre implant biyosensör yapılması için p-tip CuO ince film matrisinin umut verici olduğunu doğrulamıştır.

Chu ve ark. (2012); ürikazın immobilizasyonuna dayalı elektrokemilüminesans(ECL) biyosensörü, işaretçi olarak lüminol ile ürik asit tayini için geliştirmişlerdir. Ürikazı, 0,80 V potansiyelde pirol monomerinin elektropolimerizasyonu sırasında platin elektrot üzerinde polipirol matriksine tutuklandırmışlardır. ECL temelli biyosensör; enzimatik reaksiyonu sağlayan elektron reseptörü gibi davranan potasyum ferrisiyanür ile ürikaz tarafından ürik asidin katalitik oksidasyonu sırasında hidrojen peroksit üretildiğinden dolayı ürik aside cevap verir. Maksimum reaksiyon hızı (Vmax) ve Michealis- Menten sabiti (Km) olarak enzimatik reaksiyonun kinetik parametrelerini, potasyum ferrisiyanür varlığında $1,42\times10^{-3}$ As^{-1} ve $3,4\times10^{-7}$ M olarak hesaplamışlardır. Hazırlanan biyosensör, sade elektroda göre 50 kattan daha fazla hassasiyet ile ürik asit tayini için mükemmel analitik performans göstermiştir. Biyosensör ile 75 pM tayin limiti ve 6.25×10-9 M ürik asit için 4,45 bağıl standart sapma (n=6) elde etmişlerdir. ECL temelli biyosensörü; porfirya ve yosun örneklerinde ürik asit tayini için başarılı bir şekilde uygulanmşlardır.

Kanyong ve arkadaşları (2012); elektrokataliz kobalt ftalosiyanin (CoPC) içeren baskılı ekran karbon elektrodu (SPCE) mürekkep formuna dayalı su kullanarak yapmışlar, ürik asit biyosensörü için temel dönüştürücü olarak incelemişlerdir. Sandviç biyosensörü, ilk bu dönüştürücünün (CoPC-SPCE) üzerine selüloz asetat, takiben ürikaz (UOX) ve son olarak polikarbonat (PC) membran biriktirilmesiyle yapmışlar ve bu cihazı PC-UOX-CA-CoPC-SPCE şeklinde tasarlamışlardır. Bu biyosensör ile, idrar analizi için optimum şartlar ile kronoamperometriyi bir arada kullanmışlardır: sıcaklık 35 ^{o}C; tampon pH 9.2; iyonik şiddet 50 mM, ürikaz 0,6 U; inkübasyon zamanı 180 s. Önerilen biyosensör, sağlıklı kişilerin idrarında uygulamışlardır. Katkısız idrarda belirlenen kararlılık (n=6) % 5,82 dir. İdara 0,225 mM UA eklenmiş ve kesinlik ve geri dönüşüm sonuçları sırasıyla 4,21 ve % 97,3 bulunmuştur. Biyosensörün liner çalışma aralığı 0,015- 0,25 mM olarak bulunmuş ve hassasiyet 2,10 μA/mM olarak hesaplanmıştır.

Ivekovic ve arkadaşları (2012); Ni^{2+} iyonları içeren Prussian mavisi ile modifiye edilmiş elektrotları; üreat oksidaza dayalı amperometrik ürik asit biyosensörlerinde alkalin-sabit H_2O_2 dönüştürücüleri olarak kullanmışlardır. Oluşturulan H_2O_2 çeviricileri, düşük katodik potansiyellerde ve üreat oksidazın optimum pHsına yakın yumuşak alkalin ortamda biyosensör operasyonuna olanak sağlamıştır. 9,0 pH değerinde ve -0,05 V çalışma potansiyelinde; biyosensör, 2,5-200 μM derişim aralığında 26,9±0,4 $\mu A/Mcm^2$ hassasiyet ile ürik aside karşı doğrusal cevap göstermiştir ve tayin limiti 0,65

μM bulunmuştur. Biyosensörü, ticari günlük ürün örneklerinde ürik asit tayininde başarılı bir şekilde uygulamışlardır.

Wang ve Hasebe (2012); ürikazı (UOX) gözenekli karbon keçe (CF) yüzeyi üzerine absorde etmişler ve ortaya çıkan UOX-CF, ürik asit için akış amperometrik biyosensör yapımında biyoelektrokatalitik H_2O_2 akış detektörüne dayalı peroksidaz-adsorbe CF çiftleştirilen sütun tipi enzim reaktörü olarak kullanmışlardır. Bu akış biyosensör sisteminde; UOx-CF reaktöründe üretilen H_2O_2 horseradish peroksidaz (HRP) ve tiyonin (Th)-çiftadsorbe CF (HRP/Th-CF) dayalı -0,05 V da biyoelektrokatalitik akış dedektörü ile katodik olarak belirlenmiştir. UOx için çeşitli adsorpsiyon koşulları (adsorpsiyon çözeltisinin pH sı, adsorbsiyon çözücü olarak kullanılan tamponun tipi ve derişimu, UOx derişimu ve adsorpsiyon zamanı) ve UOx-CF ve HRP/Th-CFakış çifti biyosensörünün operasyon şartları optimize edilmiştir. UOx-CF ve HRP/Th-CF-çifti akış biyosensörünün analitik performansı; hassasiyet 0,25 μA/uM; doğrusal aralık 0,3-20 μM; düşük tayin limiti 0,18 μM ve örnek ham madde miktarı 30-90 örnek/h olarak bulunmuştur. Ürik asit için oluşturulan amperometrik akış biyosensörü, seyreltilmiş vücut sıvılarında (insan kanı ve idrarı) ürik asit tayinine izin verir ve oluşturulan biyosensör ile elde edilen analitik sonuçlar, enzim temelli spektrofotometri ile elde edilenlerle oldukça uyumludur.

Sun ve arkadaşları (2013); tiyonin modifiye grafen oksitten türevlendirilmiş nonobiyokompozit kullanarak, hassas ve kararlı amperometrik ürik asit (UA) biyosensörünü yapmışlardır. π-π istifleme yoluyla tiyonin-grafen oksit hibrit nanokatmanların (T-GOs) sentezi için daha basit ıslak-kimyasal yöntem gösterilmiştir. UV-vis absorpsiyon spektroskopisi, X-Ray fotoelektron spektroskopisi (XPS), geçirimli elektron mikroskopisi (TEM), atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) ve elektrokimya gibi çeşitli teknikler, T-GOs oluşumunu karakterize etmek için kullanılmıştır. Tiyonin ve grafen oksit arasındaki sinerjik etkileşimden dolayı, nanokatmanlar H_2O_2 indirgenmesine karşı mükemmel performans göstermiştir. Grafen oksit yüzeyi üzerinde tiyoninle birleşmesi sonucunda tiyonin modifiye elektrodun H_2O_2 ye amperometrik cevabında 2 kattan fazla artışla sonuçlanmıştır. Oluşan T-GO'lar enzim ve elektrot arasında kolaylaştıran medyatör ve enzim birleştirmek için biyouyumlu matris olarak görev yapar. Bir model sistem olarak UOx kullanarak, fizyolojik düzeyde ürik asit atyini için basit ve etkili algılama altyapı geliştirmişlerdir. Ürik asit, -0.1 V da fizyolojik seviyelerdeki glukoz (5 mM), askorbik asit (0,1 mM), noradrenalin (0,1 mM) ve dopamin (0,1 mM) diğer elektroaktif bileşiklerden dolayı

herhangi bir girişim olmadan tayin edilmiştir. Biyossensör 7 μM tayin limiti ile 0,02-4,5 mM aralığında doğrusallık göstermiştir. Kan ve idrarada bu modifiye elektrodun uygulaması iyi bir performans göstermiştir. Sağlam ve gelişmiş hibrit malzemeler, biyoalgılama, enerji dönüşümü, biyomedikal ve elektronik sistemlerde umut verici olabilir.

Kolay amperometrik ürik asit sensörü; Liu ve arkadaşları (2013), altın/amino asit nanobileşim üzerine ürikazın immobilizasyonuyla yapmışlardır. Oluşan biyosensör 4 s den daha az cevap süresine, 108 μA mM^{-1} cm^{-1} hassasiyete ve 0,02 mM-0,5mM çalışma aralığına sahiptir. Deneysel tayin limitini 7,0 μM (S/N=3) ve görünür Michelis- Menten sabitini 1,78 mM olarak hesaplanmışlardır. Ayrıca biyosensör; mükemmel termal kararlılık, iyi anti-girişim kabiliyeti ve nispeten uzun süreli depolamanın üzerinde iyi dayanıklılık göstermiştir. Sonuçlar göstermiştir ki; altın/amino asit nanobileşimler, biyosensör tasarımı ve diğer biyolojik uygulamalar için ümit verici materyal ihtiyacını karşılayabilir.

Huang ve arkadaşları (2013); ürikaz içeren nötr sulu çözelti içinde hafif oksidan kloroplatinat ile tiofen-3-boronik asit (TBA) monomer bağlı glikoproteinin kimyasal oksidasyonuyla, platinle kaplanmış (Pttabaka) altın (Au) elektrot üzerinde yüksek spesifik aktiviteyle ürikaz-PTBA-Ptnano-biyo kompozit elde etmişlerdir ve elektrodu CS/ürikaz-PTBA_Ptnano/Pttabaka/Au elektrot yapımında dış katman kitosan film ile kaplanmışlardır. Bu elektrot 5 μM- 1,2 mM ürik asit derişimda doğrusal bir amperometrik cevap, 134 μA mM^{-1} cm^{-2} duyarlılıkla, (S/N=3) 1 μM tespit sınırı ve serum örneklerinde iyi çalışmayla mükemmel işlem/dengeli depolama ile sergilemiştir.

2.2. Magnetit Nanopartikülü ile Yapılan Bazı Uygulamalar

Kaçar ve arkadaşları (2013); Fe_3O_4 nanopartikül modifiye karbon pasta elektroda dayalı, kreatin tayini için amperometrik biyosensör hazırlamışlardır. Modifiye olmamış ve Fe_3O_4 nanopartikül modifiye elektrodun elektron transfer özelliklerini, siklik voltametri (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskospisi (EIS) ile incelemişlerdir. Fe_3O_4 nanopartikülü elektrodun yüzey alanını ve elektrik iletkenliğini artırmış, böylece elektrot hassasiyeti gelişmiştir. Optimum pH, tampon konsantrasyonu, çalışma potansiyeli ve enzim yüklemesini sırasıyla; 7,0, 0,05 mol L^{-1}, +0,30 V ve 2,0 ünite kreatinaz (CI), 1.0 sarkozin oksidaz olarak seçmişlerdir. Önerilen biyosensör, $2{,}0\times 10^{-7}$ mol L^{-1} tayin limiti ile $2{,}0\times10^{-7}$ mol L^{-1} 'den $3{,}8\times10^{-6}$ mol L^{-1} ve $9{,}0\times10^{-6}$ mol L^{-1}'den $1{,}2\times10^{-4}$ mol L^{-1} e mükemmel doğrusallık göstermiştir. Biyosensör ticari kreatin toz örneklerinde kreatin tayini için kullanılmıştır ve iyi hassasiyet göstermiştir.

Klinik teşhis ve gıda güvenliği için DNA tayini oldukça önemlidir. Gui-Fang ve arkadaşları (2009); yapmış oldukları çalışmada, ayrılmış ve zenginleştirilmiş magnetik nanoincilere dayalı, DNA dizisi mutasyonlarının tayini için hassas elektrokimyasal biyosensör önermişlerdir. Önerilen biyosensör için, prob dizileri, dizileri tanıyan karboksille fonksiyonellendirilmiş magnetik nanoincilerin (MB) yüzeyi üzerine immobilize edilmiş ve metilen mavisi hibridizasyon indikatörü olarak kullanılmıştır. $1{,}0\times10^{-13}$ – $1{,}0\times10^{-6}$ M aralıkta tamamlayıcı dizi derişimi MB'nin elektrokimyasal cevap sinyali ile doğrusaldır ve tanımlayıcı oligonükleotidin tayin limiti 43 fM'dir. Bu biyosensörün tayin hassasiyetindeki gelişme, magnetik zenginleştirme ve çok duvarlı karbon nanotüp modifiye elektrottan dolayıdır.

Yang ve arkadaşları (2009); pratik glukoz biyosensörünü, içsel peroksidaz benzeri Fe_3O_4 nanopartikülleri (Fe_3O_4 NPs) ve anti-girişim yeteneğine sahip nafyon filmin birleşimi ile geliştirmişlerdir. Glukoz oksidazı basit bir şekilde Fe_3O_4 NPs ile karıştırmışlar ve kitosan (Cs) ortamında Pt elektrot üzerine glutaraldehit ile çapraz bağlamışlar ve daha sonra ince nafyon film ile kaplamışlardır. Biyosensör; yüksek hassasiyet (11,54 $\mu Acm^{-2}\ mM^{-1}$), düşük tayin limiti (6×10^{-6} M) ve iyi saklanabilme kabiliyeti göstermiştir. Doğrusal kalibrasyon eğrisi, 6×10^{-6}- $2{,}2\times10^{-3}$ M yaygın derişim aralığında elde etmişlerdir. Modifiye elektrot, glukoz tayini sırasında hemen hemen girişimleri ortadan kaldırmıştır. Ayrıca, biyosensörü, insan serum örneklerinde glukoz tayininde başarılı bir şekilde uygulanmışlardır. Hazırlanan glukoz biyosensörü, basit yöntem sağlaması ve pratik uygulamalarda optimize koşullarından dolayı büyük ilgi çekmiştir.

He ve arkadaşları (2011), magnetit-grafeni (Fe_3O_4-GE), hidrazinin kimyasal indirgenmesi ile takip eden, etkili kimyasal çöktürme yöntemi ile hazırlamışlardır. Fe_3O_4-GE, Raman spektroskopisi, taramalı elektron mikroskopu, X-ray toz kırınımı ve elektrokimyasal yöntemlerle kararkterize etmişlerdir. Hidrojen peroksit (H_2O_2) biyosensörünü, bir kerelik Fe_3O_4-GE üzerine hemoglobinin (Hb) immobilizasyonu ile yapmışlardır. Biyosensörün elektrokimyasal incelemeleri, E_{pa}= - 0,285 V ve E_{pc}= - 0,363 V ile tarama hızı 100 mV/s de fosfat tamponunda (0,1 mol/L, pH 7,0), iyi ayrılmış, yarı tersinir redoks pikleri göstermiştir. Hb-Fe_3O_4-GE, H_2O_2'nin indirgenme işlemi için iyi sinerjik elektrokimyasal etki göstermiştir. Biyosensör, hızlı cevap zamanı (< 3s) ve 1,50-585 μmol/L aralığında H_2O_2 için geniş doğrusal cevap sergilemiştir. Ayrıca, biyosensör pratik analizlerde uygulanabilir ve uzun süreli kararlılık ve iyi tekrarlanabilirlik göstermiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar, Elektrotlar

Elektrokimyasal ölçümler, BAP projesinden (Proje No: 14401123) temin edilen bilgisayar kontrollü CHI 6032 D elektrokimyasal analizör, C4 cell stand kullanıldı (Şekil 3.1). Çalışma elektrodu olarak karbon pasta elektrot (BAS 002210), karşıt elektrot olarak platin tel (CHI 115) ve referans elektrot olarak da Ag/AgCl referans elektrodu (CHI 111) kullanıldı.

Deneyler için kullanılacak çözeltilerin hazırlanması sırasında tartım işlemlerinde ACCULAB marka tartı kullanıldı. Çözelti hazırlamada kullanılan bazı maddeleri çözmek için ELMA LC 30 H marka sonikatör kullanıldı. Hazırlanan çözeltilerin pH'sı Thermo Orion model 520 A pH-iyon metre ile kullanılarak ayarlandı. Çözeltilerin hazırlanmasında ELGA marka saf su cihazından elde edilen ultra saf su kullanıldı.



Şekil.3 1.Ölçümlerde kullanılan elektrokimyasal sistem

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çözelti ortamında bulunan oksijeni uzaklaştırmak için inert gaz olarak yüksek saflıktaki azot gazı ve çözeltiyi oksijence doyurmak için yüksek saflıktaki oksijen gazı kullanıldı. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 1.4'de gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan ürikaz enzimi (E.C.1.7.3.3, *Arthrobacter gloformis*) Sigma firmasından temin edilmiştir.

Çizelge 3. 1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Adı	Saflık Derecesi	Temin Edildiği Firma
Ürik Asit	≥99 %	Sigma
Üre	99,8%	Prolabo
Askorbik Asit	99,9%	Prolabo
Glukoz	99 %	Prolabo
Grafit	Yüksek saflıkta	Fluka
Parafin yağı	IR spektr.için	Fluka
Glutaraldehit	25%	Merck
Bovin Serum Albümin	≥ 96%	Sigma
Hidrojen Peroksit	30%	Merck
Magnetit (Fe_3O_4)	≥ 98%	Aldrich
Potasyum klorür (KCl)	99%	Panreac
Potasyum ferrisiyanür		Merck
Sodyum dihidrojenfosfat monohidrat ($NaH_2PO4.H_2O$)	99%	Merck
Disodyum hidrojenfosfatdihidrat ($Na_2HPO_4.2H_2O$)	99,5%	Merck
Lityum Karbonat ($LiCO_3$)	99%	Alfa Aesar

3.3. Kullanılan Çözeltiler

3.3.1. Tampon Çözelti

Fosfat derişimi 0,050 M olacak şekilde monosodyum dihidrojenfosfatmonohidrat ve disodyum hidrojenfosfatdihidrattan uygun miktarlarda tartıldı ve ultra saf suda çözüldü. Hazırlanan tampon çözeltinin pH'sı 0,100 M NaOH ve 0,100 M HCl kullanılarak 7,00'ye ayarlandı. Değişik derişim ve pH değerlerindeki fosfat tampon çözeltileri benzer şekilde hazırlandı.

3.3.2. Potasyum Ferri Siyanür ($K_3[Fe(CN)_6]$) Çözeltisi

0,050 M 50 mL $K_3[Fe(CN)_6]$ çözeltisi hazırlamak için katı $K_3[Fe(CN)_6]$ belirli bir miktar tartıldı ve 0,10 M KCl içeren 0,05 M pH 7,00 fosfat tamponunda çözüldü. Çözelti kullanılmadığı zamanlarda +4 ^oC de buzdolabında saklandı.

3.3.3. Hidrojen Peroksit Çözeltisi

%30'lik ρ=1,11 kg/L olan hidrojen peroksitten uygun miktarda kullanılarak 10 mL 1×10^{-2} M lık stok çözelti hazırlandı.

3.3.4. Ürik Asit Çözeltisi

Ürik asit ve lityum karbonattan uygun miktarlarda tartılarak 70-80 ^{o}C de saf suda çözüldü ve derişimi 1×10^{-2} M olacak şekilde her gün taze olarak hazırlandı. Çözelti ısı ve ışıktan etkilenmemesi için alüminyum folya ile kaplandı.

3.3.5. Enzim Çözeltisi

Ürikaz enziminin tamamı 2 mL fosfat tamponunda çözülmüş ve 20 µL'lik (1U) parçalara ayrıldı. Hazırlanan çözeltiler kullanılmadıkları zamanlarda derin dondurucuda saklandı.

3.3.6. Glutaraldehit Çözeltisi

%25'lik glutaraldehit çözeltisinden %2,5'lik glutaraldehit çözeltisi hazırlamak amacıyla belirli bir miktar alınarak fosfat tampon çözeltisiyle seyreltildi.

3.3.7. Glukoz Çözeltisi

10 mL 1×10^{-1} M glukoz çözeltisi hazırlamak amacıyla katı glukozdan belirli bir miktar tartıldı ve ultra saf suyla çözüldü. Çözelti kullanılmadığı zamanlarda +4 ^{o}C de buzdolabında saklandı.

3.3.8. Askorbik Asit Çözeltisi

10 mL 1×10^{-2} M askorbik asit çözeltisi hazırlamak amacıyla katı askorbik asitten belirli miktar tartıldı ve ultra saf suyla çözüldü. Çözelti kullanılmadığı zamanlarda +4 ^{o}C de buzdolabında saklandı.

3.3.9. Üre Çözeltisi

10 mL 1×10^{-1} M üre çözeltisi hazırlamak amacıyla katı üreden belirli bir miktar tartıldı ve ultra saf suyla çözüldü. Çözelti kullanılmadığı zamanlarda +4 ^{o}C de buzdolabında saklandı.

3.4. Deneysel İşlemler

3.4.1. Enzimsiz Karbon Pasta Elektrotların Hazırlanması

Sade karbon pasta elektrodun hazırlanması için, 30 mg grafit tozu tartıldı ve 10 µL sıvı parafin yağı eklenerek ile homojen bir karışım elde edilene kadar karıştırıldı. Hazırlanan homojen karışım ticari elektrot gövdesinin içine yerleştirildi ve elektrot yüzeyi pürüzsüz bir kâğıt üzerinde düzleştirildi.

Magnetit ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrodun hazırlanması için ise, 25 mg grafit, 5 mg magnetit (Fe_3O_4) tartıldı ve 10 µL parafin yağı ile homojen bir karışım

elde edilene kadar karıştırıldı. Hazırlanan homojen karışım ticari elektrot gövdesine yerleştirildi ve elektrot yüzeyi pürüzsüz bir kâğıt üzerinde düzleştirildi.

3.4.1.1. Enzimsiz Karbon Pasta Elektrotların Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Hazırlanan modifiye elektrot dönüşümlü voltametri tekniği ile karakterize edildi, elde edilen sonuçlar sade elektrodun karakterizasyon sonuçları ile karşılaştırıldı. Bunun için; her iki elektrodun, 0,05 M $K_3[Fe(CN)_6]$ ve 0,10 M KCl içeren 0,050 M fosfat tampon çözeltisinde (pH 7,00) -0,2/ +1,0 V potansiyel aralığında dönüşümlü voltamogramları kaydedil ve elde edilen voltamogramlar karşılaştırıldı.

3.4.1.2. Enzimsiz Karbon Pasta Elektrotların H_2O_2'e Karşı Duyarlılığı

Sade elektrotların H_2O_2'e duyarlılığı belirlemek için, üç elektrotlu hücre sistemi kullanıldı. Hücreye 0,050 M pH 7,00 fosfat tamponundan 6 mL konulmuş ve çözeltideki oksijeni uzaklaştırmak için belirli bir süre ortamdan azot gazı geçirildi. Kararlı hal akımı elde edebilmek amacıyla elektrot +0,700 V sabit potansiyelde elektrot belirli bir süre dengeye getirildi ve kararlı hal akım değeri kaydedildi. Bölüm 3.3.2' de anlatıldığı gibi hazırlanan H_2O_2 stok çözeltisinden 1×10^{-3} M H_2O_2 çözeltisi hazırlandı. 1×10^{-3} M H_2O_2 çözeltisinin uygun miktarlarda deney hücresine eklendi ve çözelti karıştırıldı. +0.700 V sabit potansiyelde akımlar kaydedildi ve kararlı hal akım değerleri, elde edilen akım değerlerinden çıkarıldı. H_2O_2 derişimine karşı akım farkları grafiğe geçirildi ve modifiye olmamış elektrodun H_2O_2'e karşı duyarlılığı belirlendi.

Fe_3O_4 ile modifiye edilmiş elektrodun H_2O_2'e karşı duyarlığını belirlemek için, Bölüm 3.3.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanan modifiye elektrodun da, yukarıda anlatıldığı şekilde H_2O_2'e karşı duyarlılığı belirlendi ve sade elektrodun duyarlılığı ile karşılaştırıldı.

3.4.2. Karbon Pasta Enzim Elektrotların Hazırlanması

Fe_3O_4 ile modifiye edilmiş ve sade enzim elektrotların hazırlanması için, ilk olarak enzim çözeltisi hazırlandı. Enzim çözeltisi, ependorf tüpünde 10 µL % 2,5 glutaraldehit (GA) ve 1.5 mg bovin serum albuminin (BSA) karıştırılması ve daha sonra belirli bir miktar ürikaz enziminin eklenip çapraz bağlanması sağlanarak hazırlandı. Sade karbon pasta enzim elektrodu hazırlamak amacıyla, 30 mg grafit tartıldı ve enzim çözeltisi eklenip karıştırılıp, kuruması için yaklaşık 15 dakika beklendi. Karışıma 10 µL parafin yağı eklendi ve homojen bir karışım elde edilinceye kadar karıştırıldı. Hazırlanan homojen karışım ticari elektrot gövdesinin içine yerleştirildi ve elektrot yüzeyi pürüzsüz bir kâğıt üzerinde düzleştirildi.

Fe_3O_4 ile modifiye karbon pasta elektrodun hazırlanması için ise, 25,0 mg grafit, 5,0 mg Fe_3O_4 tartıldı ve enzim çözeltisi eklendi, kuruması için yaklaşık 15 dakika beklendi. Karışıma 10 µL parafin yağı eklendi ve homojen bir karışım elde edilinceye kadar karıştırıldı. Hazırlanan homojen karışım ticari elektrot gövdesinin içine yerleştirildi ve elektrot yüzeyi pürüzsüz bir kâğıt üzerinde düzleştirildi. Elektrot kullanılmadığı zaman buzdolabında +4 ^oC de saklandı.

3.4.2.1. Karbon Pasta Enzim Elektrotların Substrata Karşı Duyarlılığı

Fe_3O_4 ile modifiye edilmiş ve sade karbon pasta elektrotların substrata karşı duyarlılığını belirlemek için, üç elektrotlu hücre sistemi kullanıldı. Hücreye 0,050 M pH 7,00 fosfat tamponundan 6 mL konuldu. Kararlı hal akımı elde edebilmek amacıyla elektrot +0,700 V sabit potansiyelde elektrot belirli bir süre dengeye getirildi ve kararlı hal akım değeri kaydedildi. Bölüm 3.3.3' de anlatıldığı gibi hazırlanan ürik asit stok çözeltisinden 1×10^{-3} M ürik asit çözeltisi hazırlandı. 1×10^{-3} M ürik asit çözeltisinin uygun miktarlarda deney hücresine eklendi. Çözeltiden oksijen gazı geçirilip belirli bir süre karıştırıldıktan sonra +0,700 V sabit potansiyelde akımlar kaydedildi. Ürik asit derişimine karşı akım farkları grafiğe geçirilerek elektrotların ürik aside karşı duyarlılığı belirlendi. Çalışmada yapılan ön denemelerde sonucu bulunan tüm deneyler, en iyi elektrot bileşimi ve optimum çalışma koşullarında tekrar edildi.

3.4.3. Ürik Asit Enzim Elektrotların Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

3.4.3.1. Tampon Derişimi

Enzimatik reaksiyonda kullanılan tampon derişiminin enzim elektrodun cevabına etkisini incelemek için; pH 7,00 de 0,025, 0,050, 0,100, 0,150 ve 0,200 M'lık fosfat tampon çözeltileri hazırlandı. Bölüm 3.4.2'de anlatıldığı gibi hazırlanan enzim elektrot, 0.025 M fosfat tamponunda +0,700 V'da kararlı hal akımı elde edilene kadar dengeye getirildi ve kararlı hal akım değeri kaydedildi. Stok ürik asit çözeltisinden belirli bir miktar eklendi ve belirli bir süre oksijen geçirilip karıştırıldıktan sonra ölçüm alındı. Elde edilen akım değerinden kararlı hal akım değeri çıkarıldı ve akım farkı bulundu. Aynı işlemler her bir fosfat derişimin de tekrarlandı ve elde edilen akım farkı değerleri karşılaştırılarak en iyi tampon derişimi belirlendi.

3.4.3.2. pH

Tampon pH'sının enzim elektrodun cevabına etkisini incelemek için; 0.100 M fosfat derişimde 6,50, 7,00, 7,50, 8,00 ve 8,50 pH değerlerinde tampon çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan enzim elektrot pH 6.50'da +0.700 V'da dengeye getirildi ve stok

ürik asit çözeltisinden belirli bir miktar eklenerek ürik aside cevabı ölçüldü. Her bir elektrot için aynı işlem tekrarlandı ve en iyi pH değeri belirlendi.

3.4.3.3. Enzim Miktarı

Fe_3O_4 ile modifiye edilmiş enzim elektrot için en iyi enzim miktarının belirlenmesi amacıyla; medyatör miktarı sabit tutulup enzim miktarı 0,25, 0,50, 0,75 ve 1,00 U olacak şekilde dört farklı enzim elektrot hazırlandı. Her bir elektrot +0,700 V'da 0,100 M pH 7,50 fosfat tamponunda dengeye getirildi. Stok ürik asit çözeltisinden belirli bir miktar eklenerek her bir enzim elektrodun ürik aside cevabı ölçüldü ve en iyi enzim miktarı belirlendi.

3.4.3.4. Fe_3O_4 Miktarı

Fe_3O_4 ile modifiye edilmiş enzim elektrotlara Fe_3O_4 miktarının etkisinin belirlenmesi için; enzim miktarı sabit tutulup Fe_3O_4 miktarı 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 ve 5.0 mg olacak şekilde beş farklı enzim elektrot hazırlandı. Her bir elektrot +0.700 V'da 0.100 M pH 7,50 fosfat tamponunda dengeye getirildi. Stok ürik asit çözeltisinden belirli bir miktar eklenerek her bir enzim elektrodun ürik aside cevabı ölçüldü ve optimum medyatör miktarı belirlendi.

3.4.3.5. Çalışma Potansiyeli

Fe_3O_4 ile modifiye enzim elektrot için en uygun çalışma potansiyelinin belirlenmesi için; enzim elektrodun (+0,100)-(+0,700) V arasındaki çeşitli potansiyel değerlerinde akım değerleri elde edildi. Her bir potansiyel değerinde 0,100 M pH 7,50 fosfat tamponunda enzim elektrot dengeye getirildi. Stok ürik asit çözeltisinden belirli bir miktar eklenerek ürik aside cevabı ölçüldü ve çalışmalarda kullanılacak potansiyel değeri belirlendi.

3.4.4. Ürik Asit Enzim Elektrotların Performans Faktörlerinin Belirlenmesi

3.4.4.1. Cevap Zamanı

Fe_3O_4 ile modifiye edilmiş enzim elektrodun cevap zamanını belirlemek için, 0,100 M pH 7,00 fosfat tamponunda +0,500 V'da enzim elektrot dengeye getirildi. Stok ürik asit çözeltisinden belirli bir miktar eklendi ve süre 300 saniyeye ayarlanarak +0,500 V'da ölçüm alındı. Akım değerinin hemen hemen sabit kaldığı süre medyatör ile modifiye edilmiş enzim elektrodun cevap süresi olarak belirlendi.

3.4.4.2. Doğrusal Çalışma Aralığı ve Gözlenebilme Sınırı

+0,500 V'da 0,100 M pH 7,50 fosfat tamponunda dengeye getirilen enzim elektrodun doğrusal çalışma aralığı ve gözlenebilme sınırının belirlenmesi için, $1{,}0\times10^{-4}$ M- $1{,}0\times10^{-2}$ M derişim aralığında hazırlanan çözeltilerden deney hücresine belirli

miktarlarda ilave edilerek +0,500 V sabit potansiyelde ürik aside cevabı ölçüldü ve elde edilen akım farkı değerleri, ürik asit derişimine karşı grafiğe geçirildi. Her ölçüm 3 kez tekrarlandı ve kalibrasyon eğrisi elde edildi. Bu eğrilerden yararlanarak enzim elektrodun doğrusal çalışma aralığı ve gözlenebilme sınırı belirlendi.

3.4.4.3. Tekrar Kullanılabilirlik

Ürik asit tayini için Bölüm 3.4.2'de anlatıldığı gibi hazırlanan ve optimum çalışma şartları belirlenen enzim elektrodun tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi için, enzim elektrot +0,500 V sabit potansiyelde 0,100 M pH 7,50 fosfat tamponunda kararlı hal akımı elde edilinceye kadar dengeye getirildi. Stok ürik asit çözeltisinden belirli bir miktar eklenerek +0,500 V sabit potansiyelde ürik aside cevabı ölçüldü. Aynı işlem ard arda altı kez tekrarlandı. Elde edilen akım farkı değerlerinin bağıl standart sapması hesaplanarak enzim elektrodun tekrarlanabilirliği belirlendi.

3.4.4.4. Raf Ömrü

Fe_3O_4 ile modifiye edilmiş enzim elektrodun raf ömrünün belirlenmesi için; optimum şartlarda hazırlanan enzim elektrodun 10 gün boyunca farklı günlerde ürik aside cevabı ölçüldü ve enzim elektrodun cevabındaki azalma belirlendi. Elektrot ölçüm alınmadığı zamanda +4 ^oC de buzdolabında saklandı.

3.4.5. Girişim Yapan Maddelerin Enzim Elektrodun Cevabına Etkisi

Ölçüm ortamında bulunabilen ve ürik asit cevabına etki edeceği düşünülen askorbik asit, üre ve glukozun enzim elektrodun cevabına girişim etkisi incelendi. Bölüm 3.4.2'de anlatıldığı gibi hazırlandı ve optimum şartlarda +0,500 V sabit potansiyelde dengeye getirildi. Hücre içerisinde 0,50 mM ürik asit olacak şekilde stok ürik asit çözeltisinden hücreye eklendi ve ürik asit cevabı ölçüldü. Cihaz hiç durdurulmadan sırasıyla askorbik asit, üre ve glukoz çözeltilerinden sırasıyla 0,10; 5; 5 mM olacak şekilde belirli bir miktar eklendi ve akım değerindeki değişme belirlendi.

3.4.6. Enzim Elektrodun Aktivitesinin Belirlenmesi

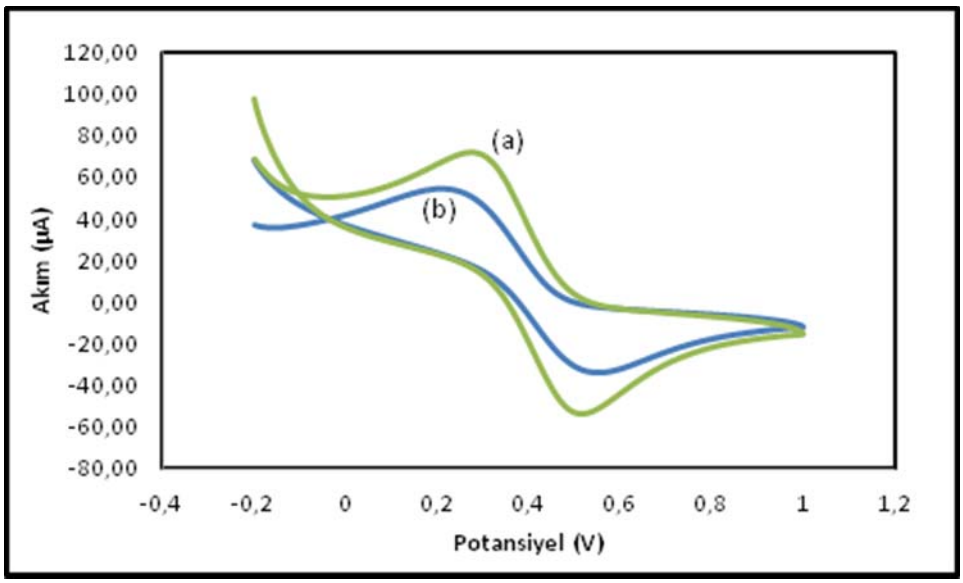
Bölüm 3.4.2'de anlatıldığı gibi hazırlanan ve optimum şartlarda dengeye getirilen enzim elektrodun aktivitesinin belirlenmesi için, farklı ürik asit derişimlerindeki ürik asit cevabı ölçülmüştür. Bu deneyler sırasında 0,100 M pH 7,50 fosfat tamponu kullanılmıştır. İmmobilize enzim için Michealis-Menten sabitinin hesaplanması için; 1/C ye karşı 1/ΔIp grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen Lineweaver-Burk eğrisi kullanılarak Michealis-Menten sabiti hesaplanmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Enzimsiz Karbon Pasta Elektrotların Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Fe_3O_4 ile modifiye edilmiş elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonu Bölüm 3.4.1.1'de anlatıldığı gibi dönüşümlü voltametri tekniği ile yapıldı ve elde edilen voltamogramlar Şekil.4.1'de gösterildi.

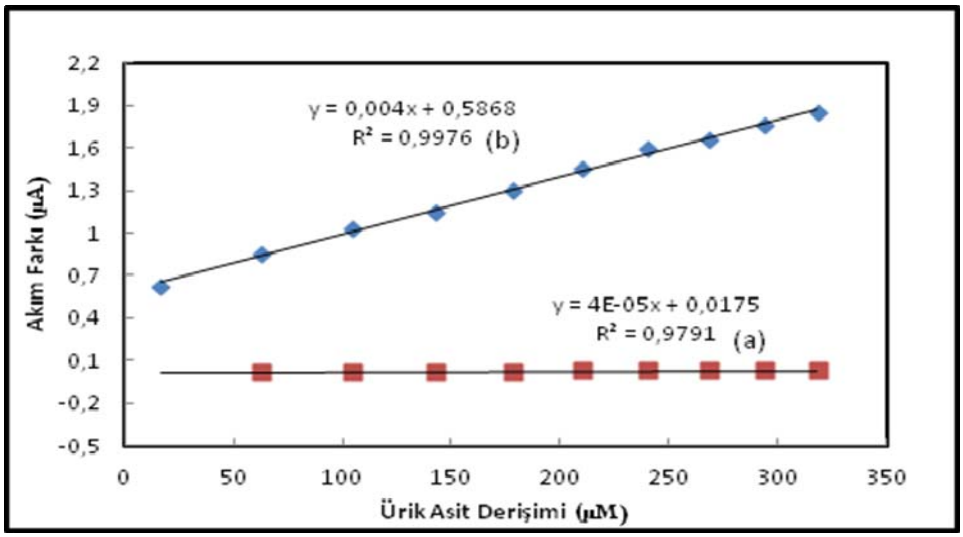
Ferri siyanür sisteminin dönüşümlü voltametrisi, modifiye elektrot yüzeylerinin karakterizasyonunu gözlemlemekte uygun bir araçtır (Rawal ve ark., 2012). Sade karbon pasta elektrotta $K_3[Fe(CN)_6]$ nın indirgenme ve yükseltgenme belirgin bir şekilde görülmektedir. Ancak Fe_3O_4 ile modifiye elektrotta, elektrottaki elektroaktif yüzey alanı arttığından dolayı, piklerde belirgin bir artış görülmektedir. Bu da bize, Fe_3O_4 ile modifiye edilen karbon pasta elektrodunun elektrokimyasal cevabının daha iyi olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 1.a)Fe_3O_4 ile modifiye b) Sade karbon pasta elektrotların dönüşümlü voltamogramları (0,50 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ içeren 0,050 M pH 7,00 fosfat tamponunda)

4.2. Enzimsiz Karbon Pasta Elektrotların H_2O_2'e Karşı Duyarlılığı

Karbon pasta elektrodun H_2O_2 duyarlılığının, Fe_3O_4 ile modifiye edilmesinin nasıl bir etkisi olduğunu incelemek için, sade ve Fe_3O_4 ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrodun H_2O_2 duyarlılığı Bölüm.3.4.1.2'de anlatıldığı gibi incelendi. Hidrojen peroksit derişimine karşı elde edilen akım değerleri grafiğe geçirildi ve elde edilen eğriler Şekil.4.2'de gösterilmiştir.

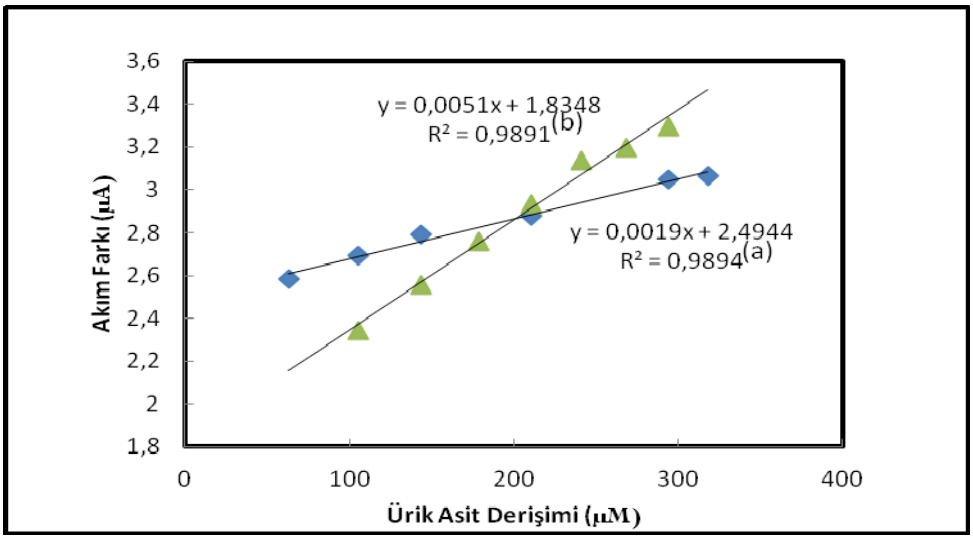


Şekil 4. 2.a)Sade b) Fe_3O_4 modifiye karbon pasta elektrotların H_2O_2 duyarlılığı (0,050 M pH fosfat tamponu, +0,700 V)

Şekil.4.2'de görüldüğü gibi; hem sade karbon pasta elektrot hem de Fe_3O_4 ile modifiye edilmiş elektrot, H_2O_2 karşı doğrusal cevap vermektedir. Ancak, Fe_3O_4 ile modifiye edilmiş karbon pasta enzim elektrodun duyarlılığı daha yüksektir. Bunun nedeni olarak, yük aktarım yolu sağlayarak H_2O_2'in daha kolay yükseltgenebilmesi için, Fe_3O_4 medyatör olarak rol oynadığı düşünülmüştür.

4.3. Karbon Pasta Enzim Elektrotların Substrata Karşı Duyarlılığı

Bölüm 3.4.2'de anlatıldığı gibi hazırlanan ve +0.700 V'da dengeye getirilen Fe_3O_4 modifiye karbon pasta enzim elektrodun ürik aside karşı duyarlılığı Bölüm 3.4.2.1'de anlatıldığı gibi incelendi. Ürik asit derişimine karşı elde edilen akım değerleri grafiğe geçirildi ve elde edilen eğriler Şekil.4.3'de gösterilmiştir.



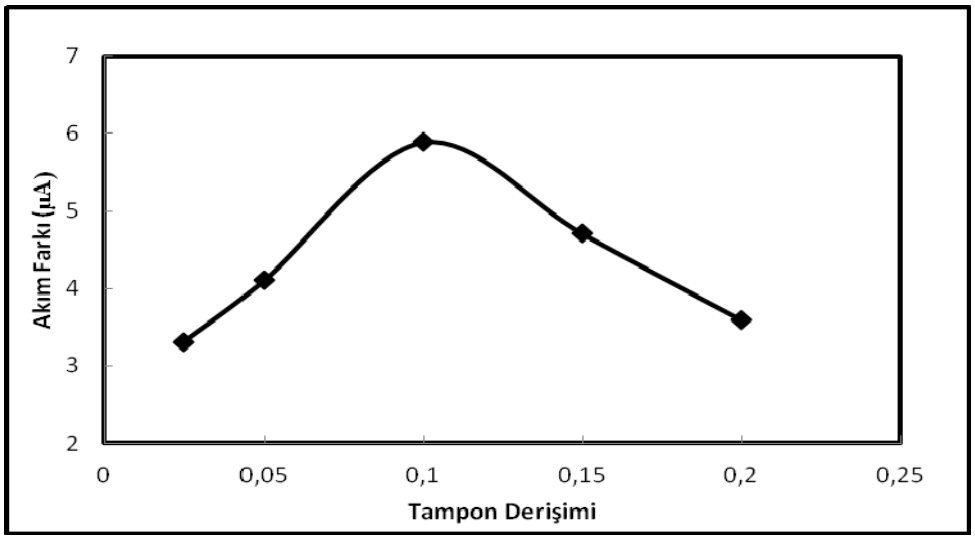
Şekil 4. 3. a)Sade b) Fe_3O_4 modifiye karbon pasta enzim elektrotların ürik asit duyarlılığı (0.05 M pH fosfat tamponu, +0.700 V)

Şekilde de görüldüğü üzere, Fe_3O_4 modifiye enzim karbon pasta elektrodun duyarlılığı, sade karbon pasta elektrodun duyarlılığına göre yaklaşık 3 kat daha fazladır. Bu sonuç, karbon pasta elektrotların H_2O_2 duyarlılığında olduğu gibi, Fe_3O4 medyatör olarak önemli rol oynadığını göstermektedir.

4.4. Ürik Asit Enzim Elektrotların Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

4.4.1. Tampon Derişimi

Ortam pH'sını sabit tutmak için kullanılan tampon çözeltisinin derişimi, enzim elektrodun ürik asit enzim elektrodun cevabını etkilemektedir. Bundan dolayı tampon çözelti derişiminin enzim elektrot cevabına etkisi Bölüm 3.4.3.1'de anlatıldığı gibi +0.700 V sabit potansiyelde incelendi ve elde edilen akım farkı değerleri tampon çözelti derişimlerine karşı grafiğe geçirildi. (Şekil 4.4)



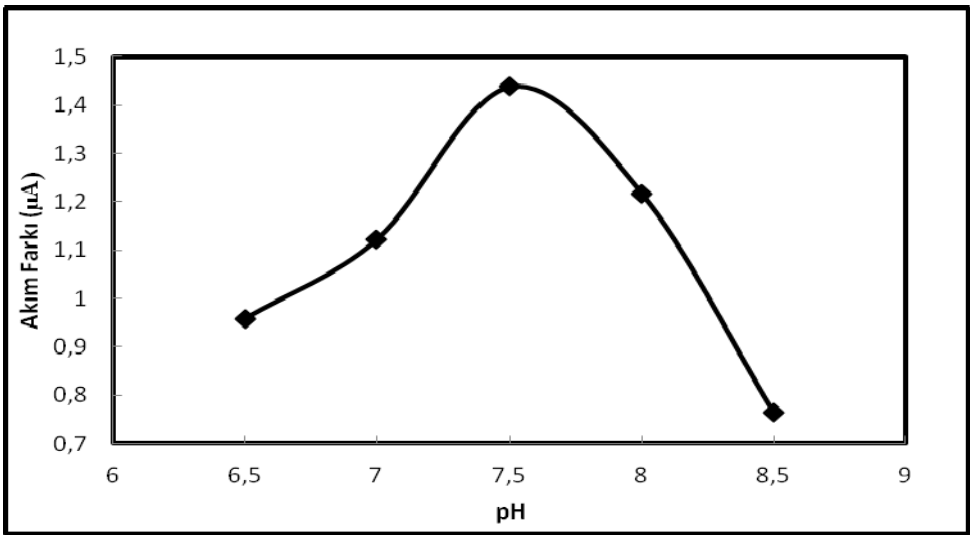
Şekil 4. 4. Magnetit modifiye ürik asit enzim elektroduna tampon çözelti derişiminin etkisi (pH 7,00 fosfat tamponu, +0,700 V)

Yukarıdaki şekilde görüldüğü üzere, 0,025 – 0,100 M aralığında enzim elektrodun ürik aside cevabı artmışken, 0,100 M dan sonra azalmaya başlamıştır. Düşük tampon derişimlerinde ortamın pH'sında değişiklik meydana gelebileceğinden ve yüksek tampon derişimlerinde ise, karbon pasta elektrot yüzeyinde bozulabileceğinden dolayı ürik asit cevabında azalma olduğu söylenebilir. Optimum tampon derişimi olarak, en yüksek akım farkı değerinin elde edildiği 0,100 M tampon derişimi seçildi.

4.4.2. pH

Enzim aktivitesinin ortam pH'sından etkilenmesinden dolayı enzim temelli sensörlerin performansı, çevresel pH'ya oldukça bağlıdır (Liu, 2013). Her enzimin

aktivitesinin en yüksek olduğu bir pH değeri vardır. Bundan dolayı, her enzim elektrodun en uygun çalışma pH'sının belirlenmesi gerekmektedir (Erden, 2010). Ürikaz immobilize edilmiş modifiye karbon pasta elektrot için en uygun ortam pH'sının belirlenmesi, Bölüm 3.4.3.2'de anlatıldığı gibi +0,700 V sabit potansiyelde gerçekleştirildi ve elde edilen akım farkı değerleri pH'ya karşı grafiğe geçirildi. (Şekil 4.5)



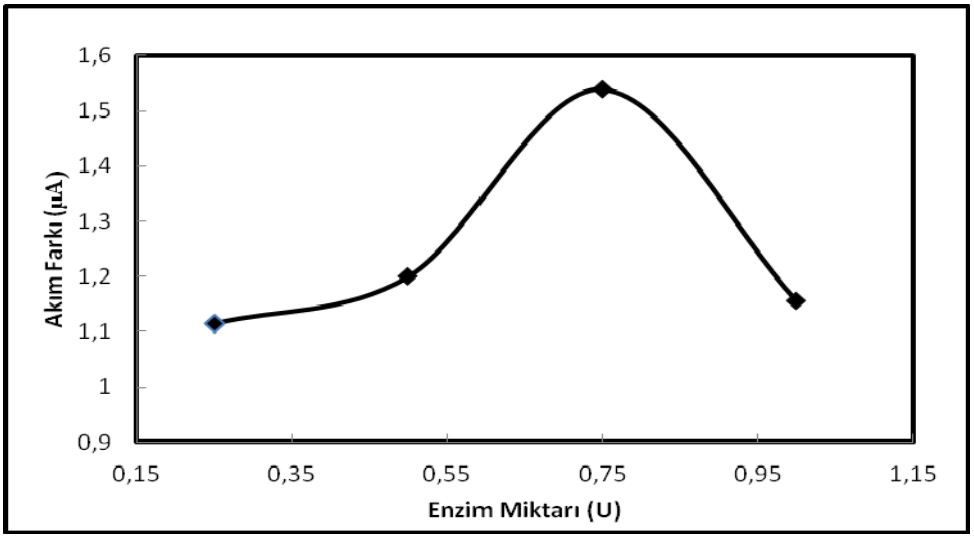
Şekil 4. 5. Magnetit modifiye ürik asit enzim elektroduna pH'nın etkisi (0,100 M fosfat tamponu,+0,700 V)

Yukarıdaki şekil incelendiğinde, 6,50-7,50 pH aralığında enzim elektrodun ürik aside cevabı arttığı, pH 7,50'dan sonra ise düşmeye başladığı ve enzim elektrot için en uygun pH, en yüksek akım farkının elde edildiği pH 7,50 olduğu görüldü. Ürikaz immobilize edilmiş karbon pasta elektrodun optimum pH değeri, serbest enzimin pH değerinden (pH 8,00) (Rawal, 2012) kısmen düşüktür. İmmobilizasyondan sonra optimum pH'daki düşüş, enzimin immobilize edildiği matriksten ya da kullanılan immobilizasyon yönteminden kaynaklanabilmektedir. Ayrıca, çalışmamızda bulduğumuz optimum pH değerinin serbest enzimin pH değerinden kısmen küçük olmasından dolayı, kullanılan matriksin ya da immobilizasyon yönteminin ürikazın özelliklerinde herhangi bir değişiklik yapmadığı söylenebilir.

4.4.3. Enzim Miktarı

Karbon pasta enzim elektrodun amrepometrik cevabı, enzim miktarına fazlasıyla bağlıdır. İmmobilizasyonda kullanılan enzim miktarının elektrot cevabına etkisi; Bölüm 3.4.3.3'de anlatıldığı gibi +0,700 V sabit potansiyelde incelendi ve elde edilen akım farkı değerlerine karşı enzim miktarları grafiğe geçirildi (Şekil 4.6). En yüksek elektrot

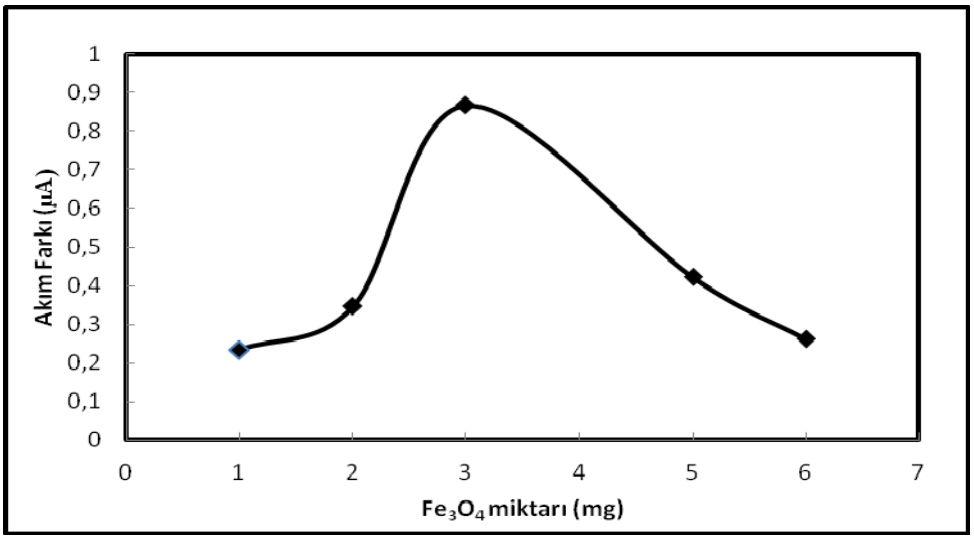
cevabının 0,75 U enzim miktarı kullanıldığında elde edildiği görülmüştür. Artan enzim miktarlarında, enzim elektrodun cevabının azaldığı görüldü. Bunun sebebi olarak da; immobilize edilen enzim miktarı arttıkça, elektrot yüzeyindeki aktif alanın bir kısmının enzim ile kapanabileceği düşünülmüştür.



Şekil 4. 6. Magnetit modifiye ürik asit enzim elektroda enzim miktarının etkisi (pH 7,50 0,100 M fosfat tamponu,+0,700 V)

4.4.4. Fe_3O_4 Miktarı

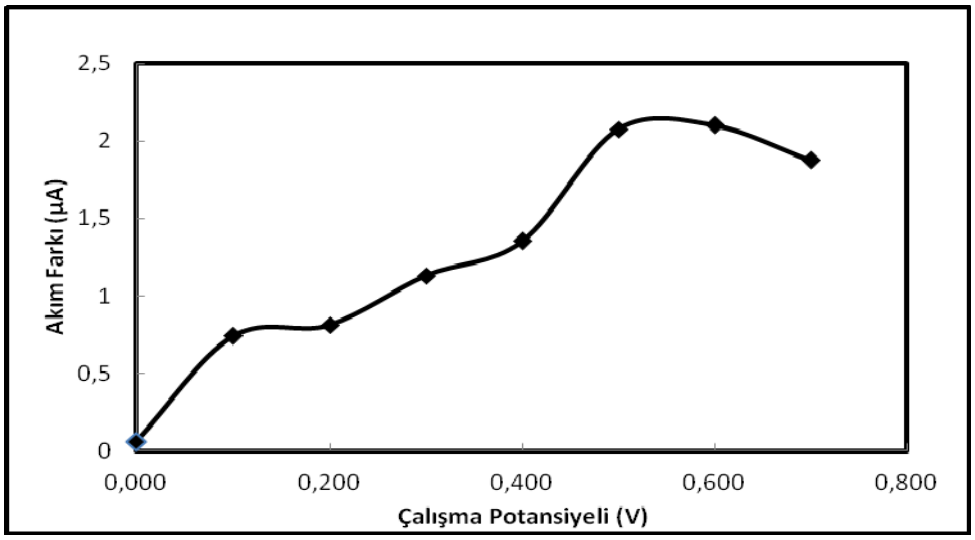
Enzim elektrodun cevabına Fe_3O_4 miktarının etkisi, Bölüm 3.4.3.4'de anlatıldığı gibi +0,700 V sabit potansiyelde incelendi ve elde edilen akım farkı değerlerine karşı enzim miktarları grafiğe geçirildi (Şekil 4.7). Aşağıdaki şekilde görüldüğü gibi, en yüksek elektrot cevabı 3mg Fe_3O_4 kullanıldığında elde edildi ve optimum Fe_3O_4 miktarı olarak 3 mg seçildi.



Şekil 4. 7. Ürik asit enzim elektroda Fe_3O_4 miktarının etkisi (pH 7,5 0,100 M fosfat tamponu,+0,700 V)

4.4.5. Çalışma Potansiyeli

Enzim elektrodun cevabına çalışma potansiyelinin etkisi, Bölüm 3.4.3.5'te anlatıldığı gibi (+0,100)-(+0,700) V arasında çeşitli potansiyellerde ölçüm alınarak incelenemiştir. Elde edilen akım değerlerine karşı potansiyel değerleri grafiğe geçirildiğinde (Şekil 4.8) en yüksek cevabında +0,600 V'da elde edildiği görüldü. Ancak +0,500 V'da elde edilen akım farkı değeri ile +0,600 V 'daki değer ile arasında çok fark olmadığı şekilde grafikte görüldü. Biyolojik sıvılardaki diğer türlerin girişim etkisini azaltılması düşünüldüğünden deneysel çalışmalar +0,500 V çalışma potansiyelinde gerçekleştirildi.

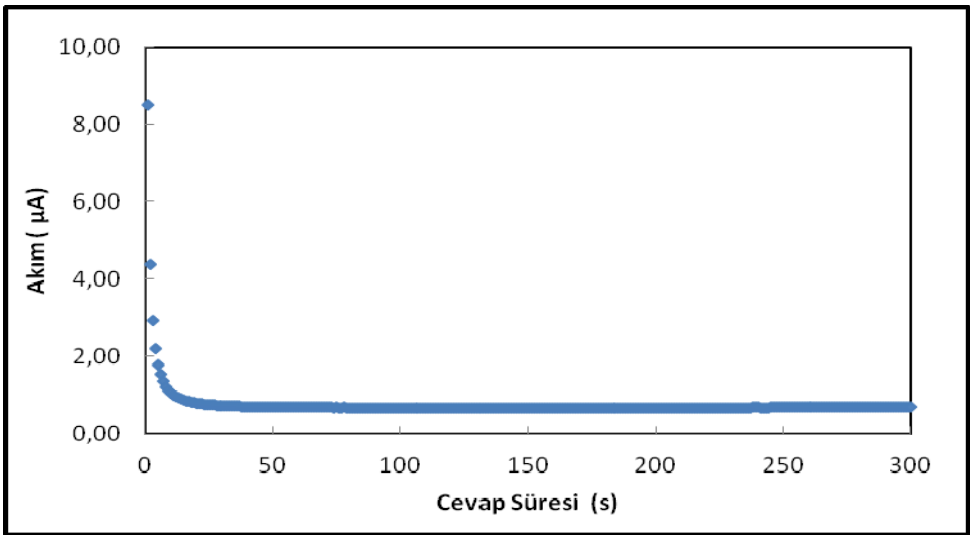


Şekil 4. 8. Ürik asit enzim elektroda çalışma potansiyelinin etkisi (pH 7.5 0.10 M fosfat tamponu)

4.5. Ürik Asit Enzim Elektrotların Performans Faktörlerinin Belirlenmesi

4.5.1. Cevap Zamanı

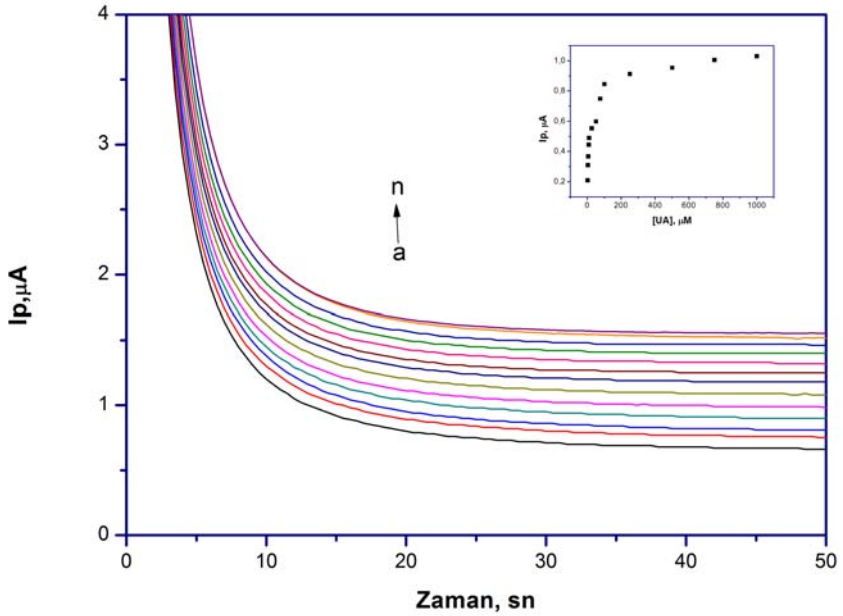
Bölüm 3.4.2'de anlatıldığı gibi hazırlanan enzim elektrodun ürik aside cevap süresi, Bölüm 3.4.4.1'de anlatıldığı gibi belirlendi ve belirli sürelerde elde edilen akım değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.9). Aşağıdaki şekilden ürik asit cevabının 50 saniyeden sonra hemen hemen sabit gittiği görülmektedir. Bundan dolayı, çalışmalarda akım değerleri 50 saniyenin sonunda okundu. Literatürdeki çalışmalara göre; bulduğumuz cevap zamanının daha uzun olmasının sebebi, çalışma elektrodu olarak karbon pasta elektrot ile kullanıldığında maddenin elektrot ile etkileşiminin daha zor olması düşünülmüştür.



Şekil 4. 9. Ürik asit enzim elektrodun cevap süresi (pH 7,50 0,100 M fosfat tamponu, 9×10^{-5} M ürik asit)

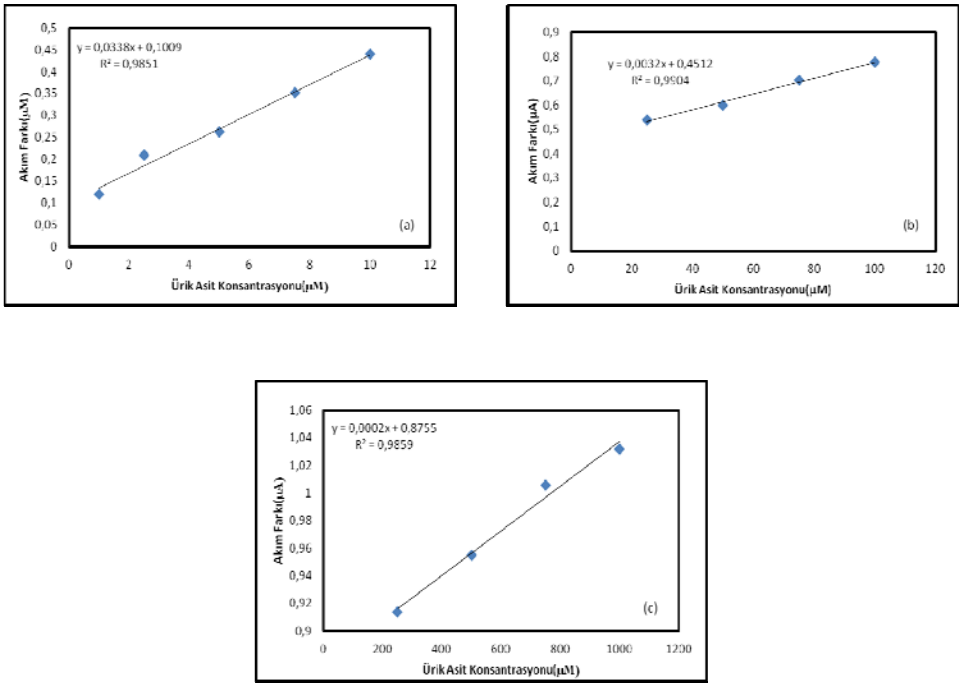
4.5.2. Doğrusal Çalışma Aralığı ve Gözlenebilme Sınırı

Fe_3O_4 ile modifiye edilmiş enzim elektrodun ürik aside duyarlı olduğu derişim aralığı, Bölüm 3.4.4.2'de anlatıldığı gibi, +0,500V'da belirlendi ve elde edilen akım farklarına karşı ürik asit derişimleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.10).



Şekil 4. 10. Ürik asit enzim elektrodun cevabına ürik asit derişiminin etkisi (0,100 M pH 7,50 fosfat tamponu, +0,500 V)

Şekilden de görüldüğü gibi, ürik asit enzim elektrot için doğrusal çalışma aralığı 1-1000 µM olarak belirlendi. Elde ettiğimiz bu aralık, kandaki normal seviyede bulunan ürik asit derişim aralığını (130-460 µM) kapsadığından dolayı hazırlanan enzim elektrot ile kanda ürik asit tayini yapılabileceği söylenebilir. Şekil 4.10'daki veriler kullanılarak doğrusal bölgeler grafiğe geçirildiğinde ürik asit enzim elektrot için 3 farklı çalışma aralığı elde edildi (Şekil 4.11 a, b, c,).



Şekil 4. 11.Ürik asit enzim elektrot için farklı derişim aralıklarındaki doğrusal kalibrasyon eğrileri a) 1-10 µM b) 25-100 µM c) 250-1000 µM (pH 7.5 0.10 M fosfat tamponu,+0.500 V)

Şekilde kalibrasyon grafikleri kullanılarak enzim elektrot için gözlenebilme sınırı 0,77 µM ve tayin sınırı 2,34 µM olarak hesaplanmıştır. Literatürde ürik asit tayini için hazırlanan enzim elektrotların gözlenebilme sınırları; Chauhan ve Pundir (2011) tarafından 0,01 mM, Rawal vd. (2012) tarafından 5 µM, Huang vd. (2013) tarafından 1µM, Liu vd. (2013) tarafından 7 µM ve Erden vd. (2011) tarafından 0,074 µM olarak rapor edilmiştir.

Çalışmamızda bulduğumuz değerin, Erden vd. tarafından rapor edilen değerden küçük, diğer rapor edilen değerlere göre ise daha iyi olduğu görülmektedir.

4.5.3. Tekrar Kullanılabilirlik

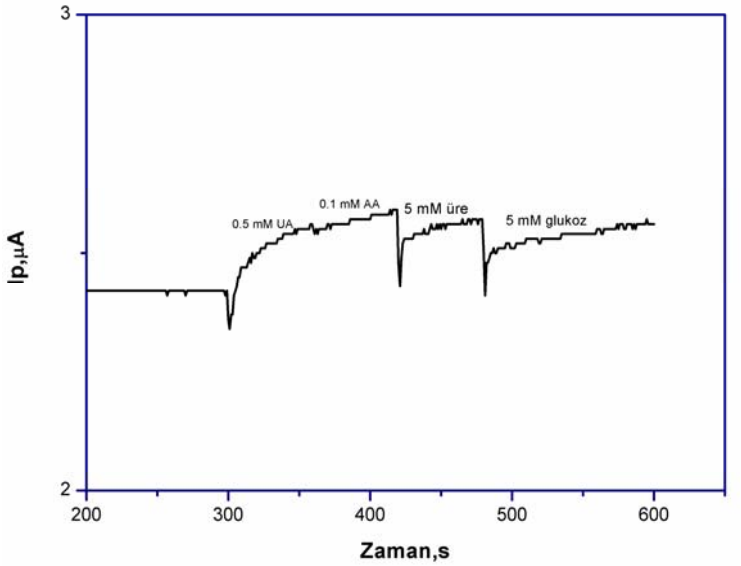
Hazırlanan enzim elektrodun tekrar kullanılabilirliği, Bölüm 3.4.4.3'de anlatıldığı gibi aynı gün içerisinde ard arda altı kez ölçüm alınarak belirlendi. Elde edilen akım farkı değerlerinin bağıl standart sapması %4,94 olarak hesaplandı. Standart sapma ve bağıl standart sapma, biyosensör sistemlerinin güvenilirliğinin belirlenmesinde önemli parametrelerdir. Biyosensör sistemlerinin kullanılabilir olduğunun söylenebilmesi için bağıl standart sapma değerinin %5'ten küçük olması istenir (Akyüz, 2011). Bu durum göz önüne alındığında, hazırladığımız biyosensörün tekrarlanabilirliğinin kabul edilebilir seviyede olduğu görülmektedir.

4.5.4. Raf Ömrü

Fe_3O_4 ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrodun raf ömrü Bölüm 3.4.4.4'te anlatıldığı gibi belirlendi. 10 gün boyunca farklı günlerde enzim elektrodu ürik aside karşı cevabı ölçüldü. 10. gün sonunda enzim elektrot aktivitesinin yaklaşık %83'ünü koruduğu görülmüştür. Ancak enzim elektrot yüzeyinde bozulma olduğundan dolayı sonrasında alınan ölçümlerden düzgün sonuçlar elde edilemedi. Bundan dolayı da, enzim elektrodun raf ömrü 10 gün olarak kabul edildi.

4.6. Girişim Yapan Maddelerin Enzim Elektrodun Cevabına Etkisi

Fe_3O_4 ile modifiye edilmiş enzim elektrodun ürik aside cevabını, kan ve idrarda yaygın olarak bulunan askorbik asit, üre ve glukozun girişim etkisi, Bölüm 3.4.5'te anlatıldığı gibi incelendi.

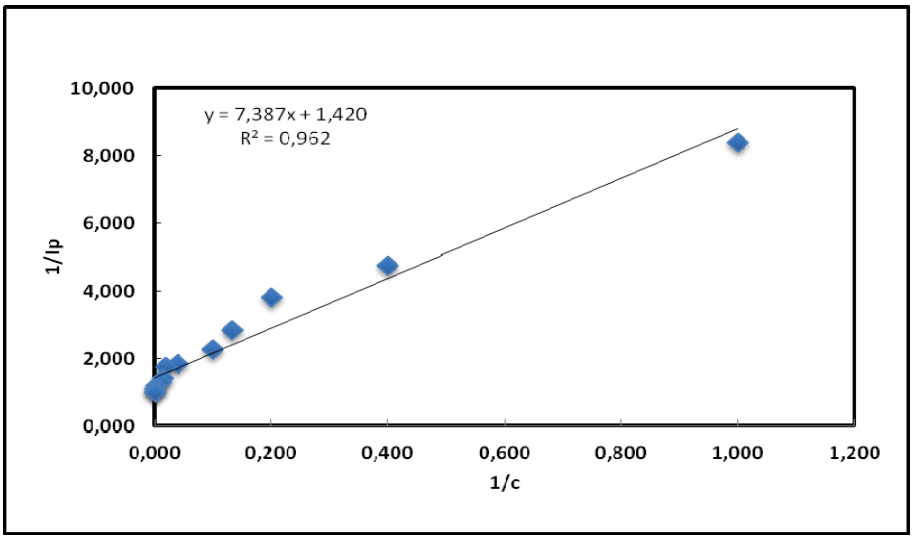


Şekil 4. 12. Fe_3O_4 modifiye ürik asit enzim elektrodun cevabına diğer türlerin girişim etkisi (0,100 M pH 7,50 fosfat tamponu, +0,500 V)

Şekil 4.12'de görüldüğü gibi enzim elektrodun ürik asit cevabına ortamda bulunan askorbik asidin hemen hemen hiçbir bozucu etki göstermediği, üre ve glukozun ise az miktarda akım değerinde azalmaya neden olduğu görülmüştür. Girişm etkisi ayrıca askorbik asit, üre ve glukoz için tek tek de yapıldı ve aynı sonuçlar elde edildi.

4.7. Enzim Elektrodun Aktivitesinin Belirlenmesi

Fe_3O_4 modifiye karbon pasta elektroda immobilize edilmiş ürikaz enzimin aktivitesinin, Bölüm 3.4.6'da anlatıldığı gibi, farklı ürik asit derişimlerinde elektrodun cevabı ölçülmüsiyle belirlenmiştir. Michaelis-Menten kinetiğine göre; enzimin katalizlediği tepkimelerde substrat derişimi arttığında reaksiyon hızı da artar ve sonuç olarak sabit bir değere ulaşır. Bunun nedeni, ortamdaki enzim miktarının sabit olmasıdır. Belli bir substrat derişiminden sonra reaksiyon hızı, ortamdaki enzim miktarından dolayı kısıtlandığından akım sabit kalmaktadır (Yavuz, 2005). Michaelis-Menten sabitinin (K_m) hesaplanabilmesi için, 1/C'ye karşı 1/ΔIp grafiğe geçirilmiş ve Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 13. İmmobilize enzim için Lineweaver-Burk Eğrisi

Şekildeki grafikteki veriler kullanılarak, K_m 5,202 µM olarak hesaplanmıştır. Km değerinin düşük olması, daha yüksek hassasiyet dolayısıyla da daha iyi biyosensör özellikleri anlamına gelmektedir. Literatürde K_m değerleri, Liu ve ark. (2013) tarafından 1,780 mM, Jindal ve ark. (2012) tarafından 0,120 mM, Huang ve ark. (2013) tarafından 5,440 mM, Rawal ve ark. (2012) tarafından 0,058 mM, Chauhan ve ark. (2011) tarafından 0,500 mM ve Chu ve ark. (2012) tarafından 0,340 µM olarak rapor edilmiştir. Bu verilere bakıldığı zaman hesapladığımız K_m değerinin oldukça iyi olduğu görülmektedir.

Hazırlanan ürik asit enzim elektrot için uygun elektrot bileşimi, çalışma koşulları ve performans faktörleri Çizelge 4.1' de özetlenmiştir.

Çizelge 4. 1. Fe_3O_4 modifiye ürik asit enzim elektrodun en iyi elektrot bileşimi, çalışma koşulları ve performans faktörleri

Elektrot Bileşimi		**Optimum Çalışma Koşulları**		**Performans Faktörleri**	
Fe_3O_4	3 mg	Tampon Derişimi	0,100 M	Doğrusal Çalışma Aralığı	1.bölge: 1-10 μM 2.bölge: 25-100 μM 3.bölge:25-1000 μM
Grafit	27 mg	pH	7,50	Cevap Süresi	50 s
Enzim	0,75 U	Çalışma Potansiyeli	+0,500 V	Tekrar kullanılabilirlik	% 4,94
Parafin	10 μL			Gözlenebilme Sınırı	0,77 μM
BSA	1,5 mg			Raf Ömrü	10 gün
GA	10 μL			K_m	5,202 μM

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Bu çalışmada; ürik asidin tayini için, ürik asit biyosensörünün geliştirilmesi için karbon pasta enzim elektrot hazırlandı. Bu hazırlanan elektrot magnetit (Fe_3O_4) kullanılarak modifiye edildi ve çapraz bağlama yöntemiyle ürikaz enzimi karbon pasta matriksine immobilize edildi. Ürik asit tayini için hazırlanan enzim elektrodunun optimum şartları belirlendi ve performans faktörleri tespit edildi. Bu elektrot:

- Elektrot bileşimi; % 7,5 Fe_3O_4, % 67,5 grafit ve % 25 parafin de kolayca hazırlanabilmektedir.
- 7,5 pH'da en iyi cevabı vermektedir.
- Çalışma potansiyeli düşüktür (+0,500 V).
- Kullanılan tampon kolayca hazırlanabilmektedir (0,100 M).
- Geniş bir derişim aralığında (1-1000 μM) çalışılabilmektedir.
- Gözlenebilme sınırı düşüktür (0,77 μM).
- Cevap süresi karbon pasta elektrot için düşüktür (50 s).
- Tekrar kullanılabilirliği yüksektir (Akım farklarının bağıl standart sapması % 4,94).
- Enzim-substrat etkileşimi iyidir. (K_m= 5,202μM)
- Ürik asit tayini için biyolojik sıvılarda olan ve girişim etkisi yapabilecek olan bozucu türlerin etkisi azdır.

Sonuç olarak, kaynak araştırmasından da görüleceği gibi ürik asit tayini için kullanılan diğer metotlarla kıyaslandığında hazırlanan magnetit modifiyeli ürik asit enzim elektrodumuz hazırlama işleminin kısa sürmesi, pratik olması gibi üstünlüklerinin yanında düşük derişimlerde yüksek hassasiyetle cevap verebilen iyi bir biyosensör özelliği taşımaktadır.

5.2 Öneriler

Bizim çalışmamızda hazırladığımız modifiye ürik asit enzim elektrodun, yukarıda sayılan avantajlar göz önünde bulundurularak hastanelerde serum ve diğer biyolojik sıvılarda ürik asit tayini için rutin olarak tercih edilebileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Ahaju, T., Rajesh, Kumar, D., Tanwar, D.K., Sharma, V., Singh, N., Biradar, A.M., 2010, An amperometric uric acid biosensor based on Bis[sulfosuccinimidyl] suberate crosslinker/3-aminopropyltriethoxysilane surface modified ITO glass electrode, Thin Solid Films, 519, 1128-1134.

Akyüz, E., 2011, Ürik Asit Tayini için Yeni Bir Biyosensör Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

Arnold, S., Donnert, C.,1999, Directed Evolution of Industrial Enzymes, Trens in Biotechnology, 17,135-136.

Arora, J., Nandwani, S., Bhambi, M., Pundir, C.S., 2009, Fabrication of dissolved O_2 metric uric acid biosensor using uricase epoxy resin biocomposite membrane, Analytica Chimica Acta, 647, 195-201.

Arora, K., Sumana, G., Saxena, V., Gupta, R.K., Gupta, S.K., Yakhmi, J.V., Pandey, M.K., Chand, S., Malhotra, B.D., 2007, Improved performance of polyaniline-uricase biosensor, Analytica Chimica Acta, 594, 17-23.

Arora, K., Tomar, M., Gupta, V., 2011, Highly sensitive and selective uric acid biosensor based on RF sputtered NiO thin film, Biosensors and Bioelectronics, 30, 333-336.

Atun, G., Haznedaroğlu, H. N., 2008, The Effect of UV Radiation on Anodic Wave of Human Serum, Bioelectrochemistry, 72, 81-86.

Bailey, J.E., Ollis, F.D., 1997, Biochemical Engineering Fundamentals, Mc. Graw-Hill Kogakusha Ltd., Tokyo.

Castillo, J., Gaspar, S., Leth, S., Niculescu, M., Mortari, A., Bontidean, I., Soukharev, V., Dorneanu, S.A., Ryabov, A.D., Csoregi, E., 2004, Biosensors For Life Quality Design, Development and Applications, Sensors and Actoators B, 102, 179-194.

Chaubey, A., Malhotra, B. D., 2002, Mediated Biosensors, Biosensors and Bioelectronics, 17, 441-456.

Chauhan, N., Pundir, C.S., 2011, An amperometric uric acid biosensors based on multiwalled carbon nanotube-gold nanoparticles composite, Analytical Biochemistry, 413, 97-103.

Chen, Z., Fang, C., Wang, H., he, J., Deng, Z., A novel disposable amperometric UA strip, Sensors and Actuators B, 129, 710-715.

Cheng, G.F., Huang, C.H., Zhao, J., Tan, X.L., He, P.G., Fang, Y.Z., 2009, A novel electrochemical biosensor for deoxyribonucleic acid detection based on magnetite nanoparticles, Chinese Journal of Analytical Chemistry, 37, 169-173.

Chu, H., Wei, X., Wu, M., Yan, J., Tu, Y., 2012, An electrochemiluminescent biosensor based on polypyrrole immobilized uricase for ultrasensitive uric acid detection, 163, 247-252.

Coulet, P. R., 1991, What is a biosensor, Biosensors principles and applications, Ed:

Çete, S., Yaşar, A., Arslan, F., 2006, An amperometric biosensor for uric acid determination prepared from uricase immobilized in polypyrrole film, 34, 367-380.

Devlin, T., 1997, Text Book of Biochemistry with Clinical Correlations, 136-139.

Dzyadevych, S.V., Arkhypova, V.N., Soldatkin, A.P., El'skaya A.V., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N., 2008, Amperometric Enzyme Biosensors:Past, Present and Future, ITBM-RBM, 29, 171-180.

Eggings, B.R., 2002, Chemical Sensors and Biosensors, University of Ulster at Jordanstown Northern Ireland, UK, 1-11.

Eggings, R. B., 2000, Chemical Sensors and Biosensors, John Wiley& Sons. Ltd, New York.

Emre, F.B., 2007, Kolestrol Biyosensörü Tasarımında Bazı Polimerik Materyallerin Enzim İmmobilizasyon Ortamı Olark Kullanımı, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.

Erden, P.E., 2010, Ksantin ve Ürik Asit Tayini İçin Farklı Medyatörlü Modifiye Karbon Pasta Enzim Elektrotların Hazırlanması, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Erden, P.E., Pekyardımcı Ş., Kılıç, E., 2011, Amperometric carbon paste enzyme electrodes for uric acid determination with different mediators, Collect. Czech.Chem.Commun., 76, 1055-1073.

Gerard, M., Chaubey, A., Malhotra, B. D., 2002, Application of Conducting Polymersto Biosensors, Biosens. & Bioelec., 17,345-359.

Gözükara,E., 2001, Biyokimya 2.Cilt, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.

He,Y., Sheng, Q., Jianbin, Z., Wang, M., Liu, B., 2011, Magnetite-graphene for the direct electrochemistry of hemoglobin and its biosensing applications, Electrochimica Acta, 56, 2471-2476.

Huang, Y., Bu, L., Wangi W., Qin, X., Li, Z., Huang, Z., Fu, Y., Xiaoli, S., Xie, Q., Yao, S., 2013, One-pot prepation of uricase-poly(thiophene-3-boronic acid)-Pt nano composites for high-performance amperometric biosensing of uric acid, Sensors and Actuators B, 177, 116-123.

Ivekovic, A., Japec, M., Solar, M., Zivkovic, N., 2012, Amperometrc uric acid biosensor with improved analytical performance based on alkaline-stable H_2O_2 transducer, Int. J. Electrochem. Sci., 7, 3252-3264.

İnan, Y., Gül, M., 2001, Biyokimya 1. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.

Jindal, K., Tomar, M., Gupta, V., 2012, CuO thin film based uric acid biosensor with enhanced response characteristics, Biosensors and Bioelectronics, 38, 11-18.

Kaçar, C., Erden, P.E., Pekyardımcı, Ş., Kılıç, E., 2013, An Fe_3O_4-nanoparticles-based amperometric biosensors for creatin determination, Artifical Cells, Nanomedicine and Biotechnology, 41, 2-7.

Kanyong, P., Pemberton, R.M., Jackson, S.K., Hart, J.P., 2012, Development of sandwich format, amperometric screen-printed uric acid biosensor for urine analysis, Analytical Biochemistry, 428, 39-43.

Kellner, R., Mermet, J.M., Otto, M., Widner, H.M., 1998, Analytical Chemistry, Viley Vch, France.

Liu, Y., Yuan, M., Liu, L., Guo, R., 2013, A facile electrochemical uricase biosensor designed from gold/amino acid nanocomposites, Sensors and Actuators B, 176, 592-597.

Luo, Y.C., Do, J.S., Liu, C.C., 2006, An amperometric uric acid biosensor based on modified Ir-C electrode, Biosensors and Bioelectronics, 22, 482-488.

Mascini, M., Guilbault, G.G., 1986, Clinical Uses of Enzyme Electrode Probes, Biosensors, 147-172.

Mello, L.D., Kubota, L.T, 2002, Review of the Use of Biosensors as Analytical Tools in the Food and Drink İndustries, Analytical, Nutritional and Clinical Methods Food Chemistry, 77, 237-256.

Raj, C.R., Ohsaka, T., 2003, Voltammetric detection of uric acid in the presence of ascorbic acid at a gold electrode modified with a self-assembled monolayer of heteroaromatic thiol, Journal of Electroanalytical Chemistry, 540, 69-77.

Rawal, R., Chawla, S., Chauhan, N., Dahiya, T., Pundir, C.S., 2012, Construction of amperometric uric acid biosensor based on uricase immobilized on

PBNPs/CMWCNT/PANI/Au composite, International Journal of Biological Macromolecules, 50, 112-118.

Roy, A. C., Lunn, F. A., Bearne, S. L., 2010, Inhibition of CTP synthase from *Escherichia coli* by xanthines and uric acids, Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters, 20, 141-144.

Scott, A.O, 1998, Biosensor for Food Analysis, The Royal Society of Chemistry, 197 s, Cambridge-UK.

Skoog, D.A., Holler, F.J. ve Nieman, T.A., (1998), Enstrümental Analiz _lkeleri (Çev., E. Kılıç, F. Köseoglu ve H. Yılmaz), Bilim Yayıncılık, Ankara.

D. A. Skoog, F. J. Holler and T. A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, U.S.A., 1997, 656-657

Sun, Z., Fu, H., Deng, L., Wang, J., 2013, Redox-active thionin-graphene oxide hybrid nanosheet:One-pot rapid synthesis and application as a sensing platform for uric acid, Analytica Chimica Acta, 761, 84-91.

Suzuki, K., Sakaswgawa, S.I., Misaki, H., Sugiyama, M., 2004, Moleculer cloning and expression of uricase gene from arthrobacter globiformis in *Escheria coli* and characterization of gene product, Journal of Bioscince and Bioengineering, 98, 153-158.

Telefoncu, A., 1997, Enzimoloji, Lisansüstü Yaz Okulu, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, 446s., Aydın.

Telefoncu, A., 1999, Biyosensörlere Genel Bakış, Lisansüstü Yaz Okulu Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, 280s., Aydın.

Terzi, Ö., 2008, Amperometrik Nitrat Biyosensörlerinin Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.

tr.wikipedia.org

Turner, A. P. F.; 1987, Biosensors Fundamental and Applications, Oxford University Press, Oxford.

Tüzün, C., 1992, Enzim Reaksiyonlarına Sıcaklığın ve pH'nın Etkisi, Biyokimya, Palme Yayınları, 125-130.

Wang, J., 2000, Analytical Electrochemistry, 2nd Edition, John Wiley and Sons. Inc. New York.

Wang, Y., Hasebe, Y., 2012, Uricase-adsorbed carbon-felt reactor coupled with a peroxidase-modified carbon-felt-based H_2O_2 detector for highly sensitive amperometric flow determination of uric acid, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 57, 125-132.

Wang, X., Hagiwara, T., Uchiyama, S., 2007, Immobilization of uricase within polystyrene using polymaleimido styrene as a stabilizer and its application to uric acid sensor, Analytica Chimica Acta, 587, 41-46.

Whietman, M., Halliwell, B., 1996, Protection against peroxynitrite dependent tyrosine nitration and alpha I- antiproteinase inactivation by ascorbic acid. A comparision with other biological antioxidants, Free Radical Research, 25, 275-283.

www.bilgiustam.com

www.sigmaaldirch.com

Yang, L., Ren, X., Tang, F., Zhang, L., 2009, A practical glucose biosensor based on Fe_3O_4 nanoparticles and Chitosan/Nafion composite film, Biosensors and Bioelectronics, 25, 889-895.

Yavuz, A. G., 2005, Polivinil Ferrosen Modifiye Elektrodunu Temel Alan Glukoz Biyosensörünün Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.

Yuhari, H., Tetsuhika, S., Hajime, I., 2000, Cloning sequence analysis and expression in *Escherichia coli* at the gene enconding a uricase from the Yeast-Like Symbiant of brown planthappen, Insect. Biochem. Mol. Bio, 30, 173-188.

Zhang, Y., Wen, G., Zhou, Y., Shuang, S., Dong, C., Choi, M.M.F, Development and analytical application of an uric acid biosensor using an uricase-immobilized eggshell membrane, Biosensors and Bioelectronics, 22, 1791-1797.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Zehra Özden ERDOĞAN
Uyruğu : T.C
Doğum Yeri ve Tarihi : Akşehir / 26.03.1988
Telefon : 05542136845
Faks :
e-mail : duruzera@gmail.com

EĞİTİM

Derece		Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	:	Atatürk Lisesi, Merkez, Zonguldak	2006
Üniversite	:	Kocaeli Üniversitesi, Umuttepe, Kocaeli	2010
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	Devam ediyor

UZMANLIK ALANI
Biyosensörler

YABANCI DİLLER
İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

- ✓ Origin 8.0 grafik çizim programı bilgisi
- ✓ Elektrokimyasal analizör (Potansiyostat) cihaz kullanımı
- ✓ Ultra Viyole Visible Spektoroskopisi (UV-VİS) cihaz kullanımı
- ✓ Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihaz kullanımı

BİLİMSEL ÇALIŞMALAR VE YAYINLAR

- Bilber, O., Erdoğan, Z.Ö., Küçükkolbaşı, S., Kara, H., Suda ve Yağda Çözünen Vitaminlerin Tabletlerde Eşzamanlı Tayini, 25.Ulusal Kimya Kongresi, 27 Haziran-2 Temmuz 2011, Erzurum.
- Koçak, N., Şahin, M., Küçükkolbaşı, S., Erdoğan, Z.Ö., 2012 Synthesis and Characterization of Novel Nano-Chitosan Schiff Base and Use of Lead (II) Sensor, Int. J. Biol. Macromol., 51, 1159-1166.
- Koçak, N., Şahin, M., Küçükkolbaşı, S., Erdoğan, Z.Ö., Yeni Bir Nano-Kitozan Schiff Bazının Sentezlenmesi, Karakterizasyonu ve Kurşun (II) Sensör Özelliklerinin İncelenmesi, VI. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 3-7 Eylül 2012, Hatay.
- Küçükkolbaşı, S., Erdoğan, Z.Ö., Koçak, N., Şahin, M., Gübbük, İ.H., Electrochemical Method For Pb(II) Detection, 3rd Pak-Turk Conference On Chemical Science, 13-15 September 2012, Bursa.

- Küçükkolbaşı, S., Erdoğan, Z.Ö., Barek, J., Şahin, M., Koçak, N., 2013, A Novel Nanoparticle-Schiff Base Modified Carbon Paste Electrode as a Sensor for the Determination of Pb (II) in Waste Water, Int. J. Electrochem. Sci., 8, 2164-2181.
- Küçükkolbaşı, S., Erdoğan, Z.Ö., Koçak, N., Şahin, M., Gübbük, İ.H., 2013, The Use of Voltammetry for the Sorption Studies of Pb^{2+} from Aqueous Media using Schiff Base mmobilized Biologic Polymer Material, 224,1474.