

Fenolik Bileşiklerin Tayini için Polifenol Oksidaz Temelli Amperometrik Enzim Elektrot Hazırlanması

Preparation of Amperometric Enzyme Electrode Based on Polyphenol Oxidase for Determination of Phenolic Compounds

Derya KOYUNCU ZEYBEK¹, Bülent ZEYBEK², Nuran ÖZÇİÇEK PEKMEZ³, Esmâ KILIÇ², Şule PEKYARDIMCI²

¹Ahi Evran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Kırşehir,

²Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Ankara,

³Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Ankara

ÖZET

Bu çalışmada, fenolik bileşiklerin tayini için polimer film temelli amperometrik enzim elektrotlar hazırlandı. Bu amaçla, o-fenilendiamin (o-PD) veya o-PD ve 3-metiltiyofen (3-MT) içeren asetonitril-su karışımı kullanılarak platin elektrotlar elektropolimerizasyon yoluyla modifiye edildi. Hazırlanan Pt/PoPD ve Pt/PoPD-3MT elektrotlara polifenol oksidaz (POx) enzimi immobilize edildi ve elektrotların pirokateşole duyarlılıkları belirlendi. Daha yüksek duyarlılığın elde edildiği Pt/PoPD-3MT/POx elektrot ile çalışma koşulları ve performans faktörleri çalışıldı. Pt/PoPD-3MT/POx elektrot için optimum tampon cinsi, tampon derişimi, pH'sı, sıcaklık ve çalışma potansiyeli sırasıyla fosfat; 0,10 M; 7,0; 25 °C ve Ag/AgCl'e karşı -0,20 V olarak belirlendi. Enzim elektrodun doğrusal çalışma aralığı $1,96 \times 10^{-6}$ - $3,50 \times 10^{-5}$ M olarak belirlendi. Enzim elektrodun cevap süresi, tekrar kullanılabilirliği, ömrü ve diğer bazı fenolik bileşiklere amperometrik cevapları da araştırıldı.

Anahtar Kelimeler: Amperometri, Enzim elektrot, Fenolik bileşikler, Polifenol oksidaz, Poli(o-fenilendiamin), 3-Metiltiyofen.

ABSTRACT

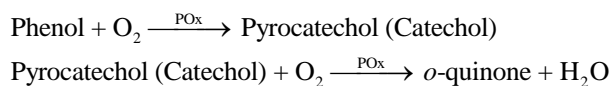
In this study, amperometric enzyme electrodes based on polymer film for determination phenolic compounds were prepared. For this purpose platin electrodes were modified by electropolymerization using asetonitril-water mixture containing o-phenylenediamine (o-PD) or o-phenylenediamine and 3-methylthiophene (3MT). Polyphenol oxidase was immobilized onto Pt/PoPD and Pt/PoPD-3MT electrodes and amperometric responses to pyrocatechol were investigated. Pt/PoPD-3MT/POx electrode that obtained higher sensitivity was used for determination of working conditions and performance factors. Optimum type of buffer, buffer concentration, pH, temperature and working potential were determined as phosphate, 0.10 M,

7.0, 25 °C and -0.20 V (vs. Ag/AgCl) respectively. The linear working range of 1.96×10^{-6} - 3.5×10^{-5} M. Response time, reusability, life time, and amperometric responses to other phenolic compounds were also investigated.

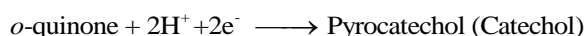
Keywords: Amperometry, Enzyme electrode, Phenolic compounds, Polyphenol oxidase, poly (*o*-phenylenediamine), 3-Methylthiophene.

SUMMARY

Phenolic compounds are toxic contaminants in medical, food and environmental matrices. They are introduced into environment through industrial wastes from resins and plastics production, petroleum refining, dyes, chemicals, and textiles. Most of them are adsorbed through the skin or mucous membrane and can cause damage to the lungs, liver, kidney and urinary tract. For these reason determinations of phenolic compounds are important. Many techniques such as spectrophotometry and chromatography are commonly used methods. However, amperometric enzyme electrodes have been widely used for measuring these compounds due to their advantages such as selectivity, low cost, storage stability and miniaturization. Laccase or polyphenol oxidase is used for development of enzyme electrode for determination phenolic compounds. Latter is more sensitive and commonly used. Polyphenol oxidase catalyses the conversion of phenolic substrates to pyrocatechol, which is subsequently oxidized to quinone:



For amperometric determination of pyrocatechol is based on reduction of *o*-quinone at low potential by following equation:



In this study, an amperometric enzyme electrode based on polyphenol oxidase was constructed for determination pyrocatechol and other phenolic compounds. For this purpose polymeric films was electrochemically synthesized with three-electrode system contain Ag/Ag⁺ electrode, Pt disc electrode and Pt foil electrode were used as reference,

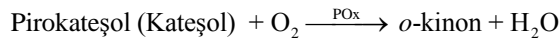
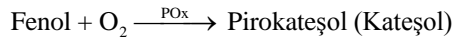
working and counter electrode by potential cycling between -0.4 and $+2.2$ V vs. Ag/AgCl at a scan rate 0.025 V/s in acetonitrile-water mixture containing 0.10 M *o*-phenylenediamine (*o*-PD) and 0.20 M (\pm)-10-camphorsulfonic acid (CSA) or 0.10 M *o*-PD, 0.20 M 3-methylthiophene (3MT) and 0.20 M CSA. Proposed electrodes were called as Pt/*o*PD or Pt/*o*PD-3MT. The polyphenol oxidase was immobilized on polymer films electrochemically generated onto a platinum disk electrode by cross-linking with glutaraldehyde. Pt/*o*PD and Pt/*o*PD-3MT electrode was dipped in to enzyme solution containing $5\mu\text{L}$ glutaraldehyde (25 %) for 12 hours at 4 °C for immobilization of enzyme. Pt/*o*PD/POx and Pt/*o*PD-3MT/POx enzyme electrode were used for determination of pyrocatechol and Pt/*o*PD-3MT/POx which higher sensitivity to pyrocatechol was used at optimization studies. Amperometric studies were carried out three-electrode electrochemical cell at -0.20 V (vs. Ag/AgCl). Working electrode, reference electrode and counter electrode were Pt/*o*PD-3MT/POx enzyme electrode, Ag/AgCl electrode and Pt wire electrode, respectively. Type of buffer, buffer concentration, working pH, temperature, working potential were found phosphate buffer solution, 0.10 M, 7.0 , 25°C and -0.20 V (vs. Ag/AgCl), respectively. The linear working range of the enzyme electrode to pyrocatechol was 1.96×10^{-6} - 3.50×10^{-5} M, response time was 45 s and storage life was at least 2 weeks. The reusability of enzyme electrode was investigated by using calibration curves. Some phenolics compounds (phenol, *o*-cresol, *m*-cresol, and *p*-cresol) were monitoring by proposed enzyme electrode. It can be concluded that Pt/*o*PD-3MT/POx enzyme electrode could be successfully used for determination of phenolic compounds in waste water.

GİRİŞ

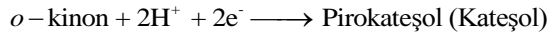
Fenolik bileşikler patlayıcı, ilaç, gübre, boya, tekstil ve plastik gibi pek çok materyalin üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca yüksek oranda çevreye salınan kirleticilerdendir. Bu bileşikler deri ve mukoz membran yolu ile kolayca adsorbe olurlar ve akciğer, karaciğer, böbrek ve üreme sisteminde hasarlara neden olurlar (Wang *et al.* 2002, Shan *et al.* 2007). Bu yüzden çevre, gıda ve endüstriyel örneklerde fenolik bileşiklerin tayini

çok önemlidir. Fenolik bileşiklerin tayini için gaz kromatografi ve spektrofotometri gibi yöntemler mevcuttur (Lupetti *et al.* 2004, Bagheri *et al.* 2004). Ancak, bu yöntemler karışık örnek hazırlama işlemleri içerir ve yerinde uygulamalar için uygun değildir. Elektrokimyasal yöntemler, özellikle amperometrik biyosensörler, enzimlerin varlığından dolayı seçici özellik gösterir. Bunlar düşük yapım ve depolama maliyeti, küçültülebilme ve otomasyona uyum gibi özelliklerinden dolayı büyük oranda kullanılmaktadır (Liu *et al.* 2003, Wang *et al.* 2002).

Polifenol oksidaz (tirozinaz) (Shan *et al.* 2009, Wang *et al.* 2009, Rajesh *et al.* 2004), lakkaz (Vianello *et al.* 2004, Gupta *et al.* 2003, Quan and Shih 2004, Timur *et al.* 2004) veya peroksidaz (Serra *et al.* 2001, Imabayashi *et al.* 2001, Yang *et al.* 2006) enzimleri kullanılarak pirokateşol, fenol, hidrokinon, *m*-krezol, *p*-krezol, *o*-krezol, *o*-klorofenol, dopa, dopamin ve 4-metil kateşol gibi çeşitli fenolik bileşiklerin tayini için pek çok biyosensör geliştirilmiştir. Ancak, polifenol oksidaz enzimi fenole daha duyarlıdır ve fenolik bileşiklerin tayini için daha sıklıkla kullanılan enzimdir (Ameer and Adeloju 2009). Mantar tirozinazı en iyi bilinen iki bakırlı polifenol oksidazdır ve moleküler oksijen varlığında monofenollerin *o*-difenol oluşturmak üzere hidroksilasyonunu ve *o*-difenollerinde *o*-kinonlara yükseltgenmesini katalizler:



Pirokateşolün amperometrik tayini, genellikle enzimatik reaksiyon sonucu oluşan *o*-kinonun, hiçbir elektron medyatörü olmaksızın, düşük potansiyellerde indirgenmesi sırasında oluşan akımının belirlenmesi üzerine temellenmektedir (Liu *et al.* 2003):



Polifenol oksidaz enziminin immobilizasyonu için pek çok farklı destek materyali ve yöntem önerilmiştir. Bunlar arasında çeşitli polimerik filmlerin (Rajesh *et al.* 2004,

Rajesh and Kaneto 2005, Rajesh *et al.* 2005, Wang *et al.* 2009), sol-jel matrikslerin (Wang *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2003), kendi kendine düzenlenen tek tabakanın (Tatsuma and Sato 2004), çok duvarlı karbon nanotüp-Nafyon nanobiyokompozitlerin (Tsai and Chiu 2007), laponit kil-kitosan nanokompozit matriksin (Fan *et al.* 2007) ve karbon pasta matrikslerin (Pedano and Rivas 2000, Liu *et al.* 2003) kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır. Enzim temelli amperometrik biyosensörlerde, elektropolimerizasyon yolu ile hazırlanmış polimer filmler sıklıkla kullanılmaktadır (Vidal *et al.* 2003). Polipirol, polianilin, poliasetilen, poliindol, politiyonin ve politiyofen gibi iletken polimerlerin elektropolimerizasyonu ile hazırlanan biyosensörler geniş oranda kullanılmaktadır (Vidal *et al.* 1999a,b, Vidal *et al.* 2004). Poli(*o*-fenilendiamin) gibi iletken olmayan polimerler de enzimlerin immobilizasyonu için destek matriksi olarak kullanılmaktadır. Bunlar seçici-geçirgenlik ve yüksek tekrarlanabilirlik gibi önemli avantajlara sahiptirler. İletken olmayan polimerler ayrıca, çalışılan ortamda bulunabilecek askorbat, üre, asetaminofen ve diğer bazı yükseltgenebilen türlerden gelen elektrokimyasal girişimi de yok ederler (Rothwell *et al.* 2008). Ancak, poli(*o*-fenilendiamin) film kaplı elektrotlarla ilgili pek çok farklı çalışma bulunmasına rağmen, bu çalışmada kullanılan kaplama koşulları diğer yapılan çalışmalardan oldukça farklıdır (Malitesta *et al.* 1990, Myler *et al.* 1997, Curulli *et al.* 1998, Garjonyte and Malinauskas 1999). Yapılan diğer çalışmalarda, genellikle sulu ortamda film oluşumu gerçekleştirilmektedir ve çoğunlukla PoPD film sadece seçici geçirgen bir membran olarak kullanılmaktadır (Rothwell *et al.* 2008, Dai *et al.* 2006). Ancak, yapılan bu çalışmada hazırlanan film tabakası, hem seçici geçirgen bir membran hem de enzim immobilizasyonu için bir matriks olarak kullanılmakta ve ilave film tabakalarına ihtiyaç duyulmadan ilgili substratların tayininin kolayca yapılabileceği düşünülmektedir. Bu bakımdan da, bu çalışmada yeni tipte poli(*o*-fenilendiamin) film kaplı elektrotlar geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Poli(3-metiltiyofen) (3MT) polimer film elektronik olarak iletken bir polimerdir ve 3MT modifiye edilmiş elektrotların fenolik bileşikler üzerinde iyi elektrokatalitik aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Wang *et al.* 2006).

Bu çalışmada, fenolik bileşiklerin tayini için platin elektrot üzerinde, *o*-fenilendiamin (*o*-PD) veya *o*-fenilendiamin ve 3-metiltiyofen (3MT) içeren asetonitril-su karışımı kullanılarak dönüşümlü voltametri tekniği ile polimer filmler oluşturuldu. Hazırlanan Pt/PoPD ve Pt/PoPD-3MT elektrotlara çapraz bağlayıcı reaktif olan glutaraldehit kullanılarak polifenol oksidaz (POx) enzimi immobilize edildi ve Pt/PoPD/POx ve Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrotların model substrat olarak seçilen pirokateşole duyarlılıkları belirlendi. Ayrıca, pirokateşole daha yüksek duyarlık gösteren enzim elektrodun cevabı üzerine tampon cinsi, derişimi, pH'sı, sıcaklık, çalışma potansiyeli gibi parametrelerin etkisi ve enzim elektrodun diğer fenolik bileşiklere cevabı, cevap süresi, ömrü gibi performans faktörleri araştırıldı.

Deneysel çalışmalar

Kullanılan kimyasal maddeler, çözeltiler ve cihazlar

Polifenol oksidaz (EC 1.14.18.1, 2085 U/mg) enzimi Fluka firmasından temin edildi. *o*-Fenilendiamin ve (\pm)10-kamforsülfonik asit Aldrich, 3-metiltiyofen ve pirokateşol ise Fluka firmalarından sağlandı. Fenol, *o*-krezol, *p*-krezol, *m*-krezol Riedel de Haën firmasından alındı ve $1,0 \times 10^{-3}$ M stok çözeltileri hazırlandı. Glutaraldehit (%25) Sigma firmasından temin edildi. Çalışmada kullanılan diğer kimyasal maddeler yüksek saflıktadır ve ilave saflaştırma işlemleri uygulanmadan kullanıldı. Çalışmada kullanılan fosfat tamponu sodyum dihidrojenfosfat dihidrat ile *di*-sodyum monohidrojenfosfat heptahidrat tuzlarından, TRIS tamponu ise tris(hidroksimetil)aminometan tuzundan hazırlandı ve pH değerleri ORION marka 912600 numaralı kombine cam pH elektrodu kullanılarak ORION 720A cihazı ile ayarlandı.

Amperometrik çalışmalar, bilgisayar bağlantılı IviumStat elektrokimyasal analiz cihazı ve BAS marka beş girişli hücre standı kullanılarak yapıldı. Sabit sıcaklık gerektiren çalışmalarda Grant LTD GG marka termostatl ve sirkülasyonlu su banyosu kullanıldı. Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan bidestile su ELGA Purelab Classic marka ultra saf su cihazı ile elde edildi. Elektropolimerizasyon çalışmaları, çalışma elektrodu,

referans elektrot ve karşıt elektrot olarak sırasıyla 4 mm çapında platin (Pt) disk elektrot, Ag/Ag⁺ elektrot ve platin levha elektrottan ibaret olan, üç elektrotlu elektrokimyasal hücre sistemi kullanılarak yapıldı. Amperometrik ölçümlerde ise, çalışma elektrodu olarak elektropolimerizasyon yolu ile hazırlanmış polimer film kaplı platin disk elektrotlar, referans elektrot olarak BAS firmasından temin edilen Ag/AgCl elektrot (MF 2052), karşıt elektrot olarak ise yine BAS firmasından temin edilen platin tel elektrot (MW 1034) kullanıldı. Elektropolimerizasyon çalışmalarında çözeltideki oksijeni uzaklaştırmak için inert gaz olarak yüksek saflıktaki (% 99,99) argon gazı ve fenolik bileşiklerin tayini için geliştirilen amperometrik biyosensörlerde gerçekleşen enzimatik reaksiyonlar oksijenli ortam gerektirdiğinden, enzim elektrotlarla yapılan amperometrik ölçümlerde oksijen gazı (%99,95) kullanıldı.

Elektropolimerizasyon ile Modifiye Enzim Elektrotların Hazırlanması

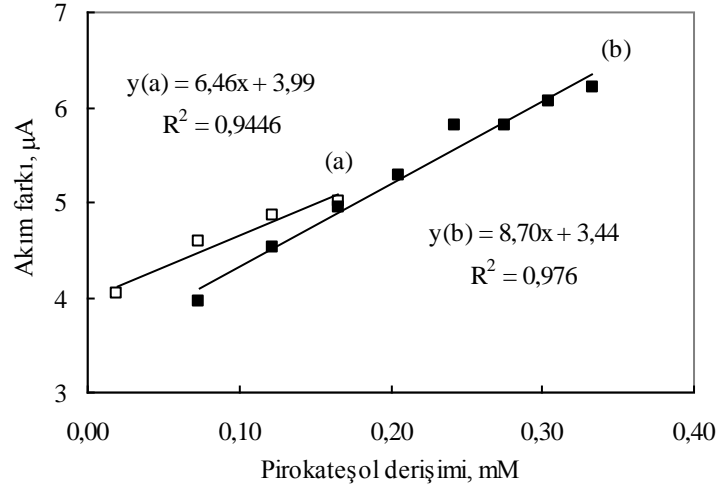
Çalışma elektrodu olarak platin disk elektrot kullanılmadan önce BAS firmasından temin edilen, temizleme kiti (MF 2060) ve iki farklı boyutta alimünadan hazırlanmış yüzey temizleme süspansiyonları (CF 1050 ve MF 2054) kullanılarak temizlendi. Bu şekilde temizlenen elektrotlar, sırasıyla etanole ve saf suya daldırılarak birkaç dakika ultrasonikatörde tutuldu ve oda sıcaklığında kurutuldu. Enzim immobilizasyonunda uygun matriks ortamının sağlanması için, Pt disk elektrotlar polimer filmler ile elektropolimerizasyon yolu ile kaplandı. Bu amaçla, 0,10 M *o*-fenilendiamin (*o*PD) ve 0,20 M (±)-10-kamforsülfonik asit (CSA) destek elektroliti içeren % 94 asetonitril - % 6 saf su veya 0,10 M *o*-fenilendiamin (*o*PD), 0,20 M (±)-10-kamforsülfonik asit ve 0,20 M 3-metiltiyofen (3MT) içeren % 94 asetonitril - % 6 saf su karışımı elektrokimyasal hücreye kondu. Çalışma, referans ve karşıt elektrotlar olarak kullanılan platin disk elektrot, Ag/Ag⁺ elektrot ve platin levha elektrotlar bu çözeltiliye daldırıldı ve 0,025 V/s tarama hızıyla (-0,4)-(2,2) V potansiyel aralığında 50 döngü ile elektropolimerizasyon işlemi gerçekleştirildi. Polimer film kaplanmış elektrotlar, asetonitrile daldırıldı ve polimerin yapısına katılmayan türler uzaklaştırıldı. Hazırlanan polimer film kaplı elektrotlar Pt/*o*PD ve Pt/*o*PD-3MT olarak adlandırıldı. Bu elektrotlar, 1 mg/1 mL

polifenol oksidaz enzimi ve 5 µL glutaraldehit (% 25) içeren çözeltiye daldırıldı ve 12 saat boyunca +4 °C'de tutuldu. Enzim immobilizasyonu ile hazırlanan enzim elektrotlar Pt/PoPD/POx ve Pt/PoPD-3MT/POx olarak adlandırıldı.

Araştırma Bulguları

Pt/PoPD/POx ve Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrotların pirokateşole duyarlılıkları

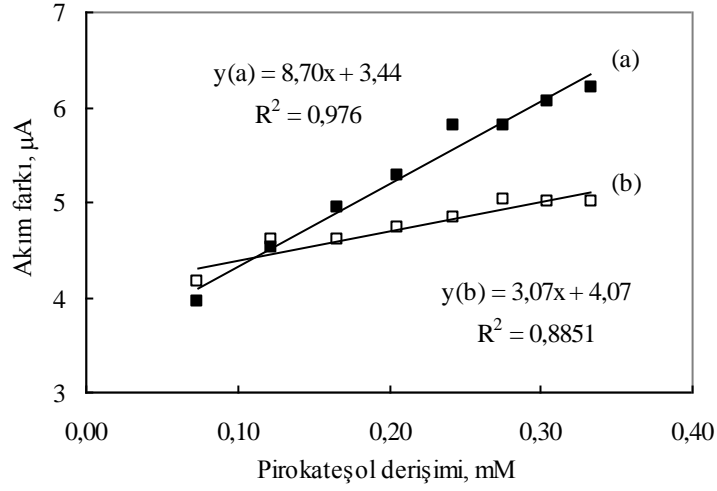
Pt/PoPD/POx ve Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrotlar ayrı ayrı Ag/AgCl'e karşı -0,2 V'da 0,10 M pH 7,0 fosfat tamponunda dengeye getirildikten sonra çalışma ortamına belli derişimde pirokateşol eklemeleri yapıldı ve derişimine karşı belirlenen akım farkları grafiğe geçirildi (Şekil 1). Şekil 1 incelendiğinde, Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrot ile elde edilen duyarlık değerinin Pt/PoPD/POx enzim elektrot ile elde edilen ile çok farklı olmadığı ancak, Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrot ile pirokateşol için elde edilen doğrusal çalışma aralığının daha geniş olduğu görüldü. Bu nedenle, sonraki çalışmalarda Pt/PoPD-3MT/POx elektrodun kullanılmasına karar verildi ve optimizasyon çalışmaları bu enzim elektrot kullanılarak yapıldı. Bu elektrotla daha yüksek duyarlık ve nispeten daha geniş bir çalışma aralığının elde edilmesinin sebebinin bu polimer film kaplı elektrotta daha gözenekli bir yapının oluşmasından ileri geldiği söylenebilir. Çünkü PoPD film pek çok oksidaz temelli biyosensörün tayin mekanizmasında yer alan hidrojen peroksite geçirgen olup daha büyük moleküllere geçirgen değildir. Ancak, fenolik bileşiklerin tayini enzimatik reaksiyon sonucu oluşan *o*-kinonun elektrot yüzeyinde indirgenmesine dayandığından polimerik filmin bu moleküle geçirgen olması gerekmektedir. Bununla beraber 3MT'nin elektrotun iletkenliğini de artırdı söylenebilir.



Şekil 1. (a) Pt/PoPD/POx (b) Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrotların pirokateşole duyarlılığı (0,10 M pH 7,0 fosfat tamponu, -0,20 V, oda sıcaklığı)

Tampon Cinsinin Etkisi

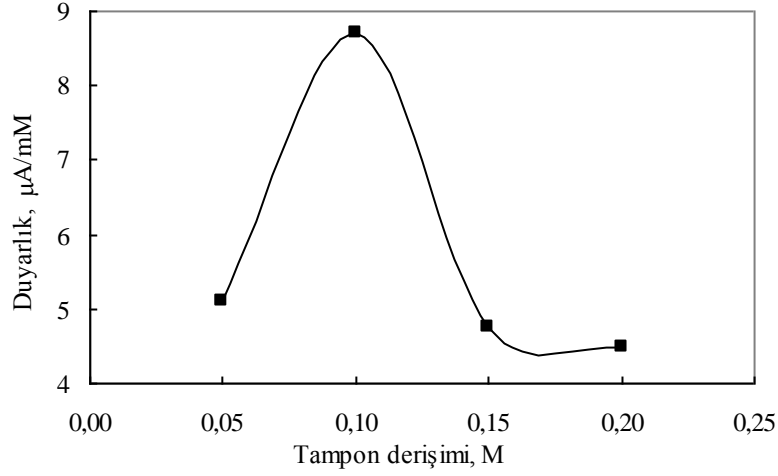
En uygun tampon cinsinin belirlenmesi amacı ile Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodu ayrı ayrı 0,10 M pH 7,0 fosfat ve TRIS tamponlarında Ag/AgCl'e karşı -0,20 V'da kararlı hal akımları elde edilene kadar tutuldu ve stok pirokateşol çözeltisinden belli miktarlar ilave edilerek kalibrasyon grafikleri çizildi (Şekil 2 a ve b). Grafikler incelendiğinde, fosfat tamponunda elde edilen duyarlılığın TRIS tamponunda elde edilen duyarlıktan daha yüksek olduğu görüldü. Ayrıca, fosfat tamponunda nispeten daha geniş bir doğrusal çalışma aralığı elde edildi. Bu sebepten, daha sonraki çalışmalar fosfat tamponu kullanılarak yapıldı. Fenolik bileşiklerin tayinine yönelik daha önceki çalışmalarda genellikle fosfat tamponu çalışma tamponu olarak kullanılmıştır (Shan *et al.* 2009, Kochana *et al.* 2008, Fan *et al.* 2007, Tembe *et al.* 2006, Rajesh *et al.* 2004, Vedrine *et al.* 2003).



Şekil 2. *Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodunun cevabına tampon cinsinin etkisi (a) 0,10 M pH 7,0 fosfat tamponu ve (b) 0,10 M pH 7,0 TRIS (-0,20 V, oda sıcaklığı)*

Tampon Derişiminin Etkisi

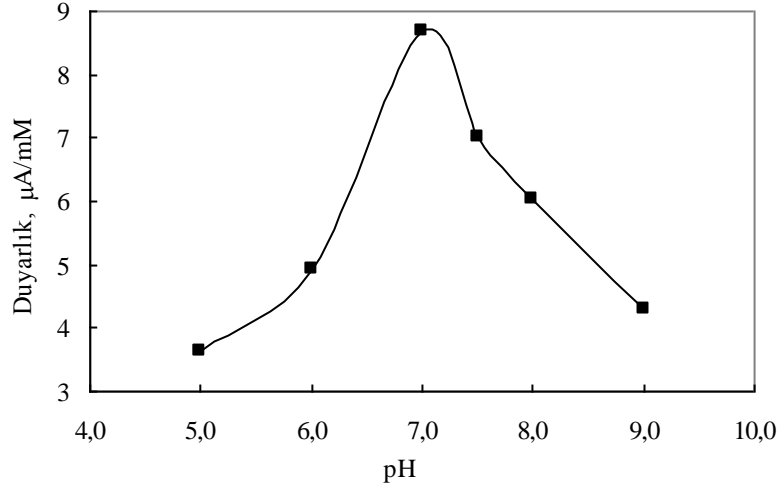
Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodunun cevabına tampon derişiminin etkisinin belirlenmesi amacıyla, farklı fosfat derişimine sahip tamponlarda ayrı ayrı Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodunun pirokateşole duyarlılıkları belirlendi. Elde edilen duyarlılık değerleri tampon derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 3). Şekilden görüldüğü üzere, en yüksek duyarlılık, tampon derişiminin 0,10 M olduğu zaman elde edildi ve daha sonraki çalışmalarda bu derişim kullanıldı. Fenolik bileşiklerin tayini için geliştirilen diğer birçok biyosensörde de tampon derişimi 0,10 M olarak seçilmiştir (Mailley *et al.* 2004, Rajesh and Kaneto 2005, Tembe *et al.* 2006, Tsai *et al.* 2007, Shan *et al.* 2009, 2007).



Şekil 3. Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodunun cevabına tampon derişiminin etkisi (pH 7,0 fosfat tamponu, -0,20 V, oda sıcaklığı)

pH'nin Etkisi

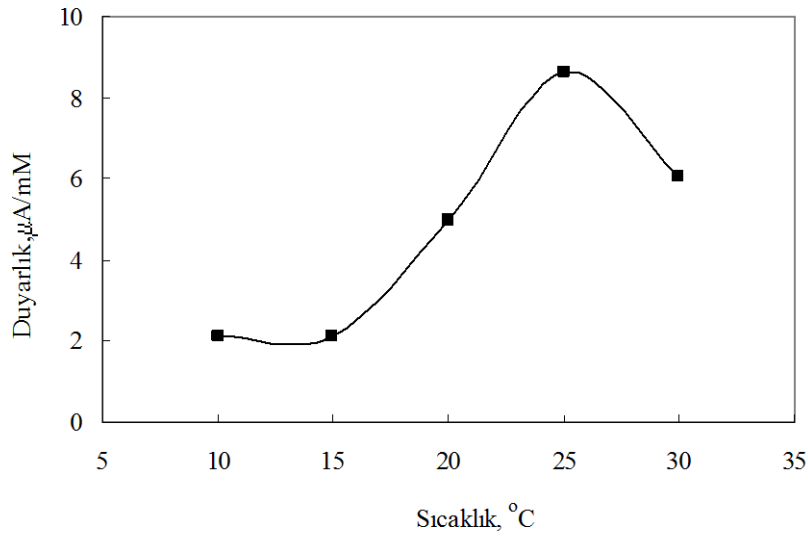
Enzim aktivitesi yüksek oranda ortamın pH'sına bağlıdır. Bu nedenle her enzimin optimum aktivite gösterdiği pH'nın belirlenmesi gerekmektedir. Aynı durum immobilize enzimler için de geçerlidir. Hazırlanan Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodunun optimum tampon pH'sının belirlenmesi için çeşitli pH değerlerinde hazırlanan 0,10 M fosfat tamponlarında pirokateşole duyarlılıkları belirlendi ve pH'a karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4). Grafik incelendiğinde en yüksek duyarlılığın pH 7,0' de elde edildiği görüldü. Hazırlanan enzim elektrot için belirlenen optimum pH değeri serbest polifenol oksidaz enzimi için belirtilen pH aralığının (5,0–8,0) içindedir. Bu durum, immobilizasyon işleminin polifenol oksidazın optimum pH değerini değiştirmedini göstermektedir (Shan *et al.* 2007). Bu sebepten, çalışmada tampon pH'sı 7,0 olarak seçilmesinin uygun olacağı sonucuna varıldı ve daha sonraki çalışmalar bu pH değerinde yapıldı. Literatürde fenolik bileşik biyosensörlerinde pH 7,0'de yapılan çalışmalar mevcuttur (Tsai *et al.* 2007, Li *et al.* 2006).



Şekil 4. *Pt/PoPD-3MT/POx* enzim elektrot cevabına pH'nın etkisi (0,10 M fosfat tamponu, – 0,20V, oda sıcaklığı)

Sıcaklığın Etkisi

En uygun çalışma sıcaklığını belirlemek amacıyla, hazırlanan Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodun 10–30 °C arasındaki belli sıcaklıklarda ayrı ayrı uygun miktarda pirokateşol eklemeleriyle kalibrasyon grafikleri çizildi ve grafiklerden belirlenen duyarlık değerleri karşılaştırıldı (Şekil 5). Şekilden görülebileceği gibi, 25 °C'ye kadar sıcaklık arttıkça enzim elektrodun duyarlığı artmakta, 25°C'de en yüksek değerine ulaşmakta ve bu sıcaklığın üstünde duyarlık azda olsa düşmektedir. Bu sebepten enzimin denatürasyonunu önlemek ve çalışmaların daha pratik yürütülmesi amacıyla amperometrik çalışmaların oda sıcaklığında (23±2 °C) yapılmasına karar verildi.

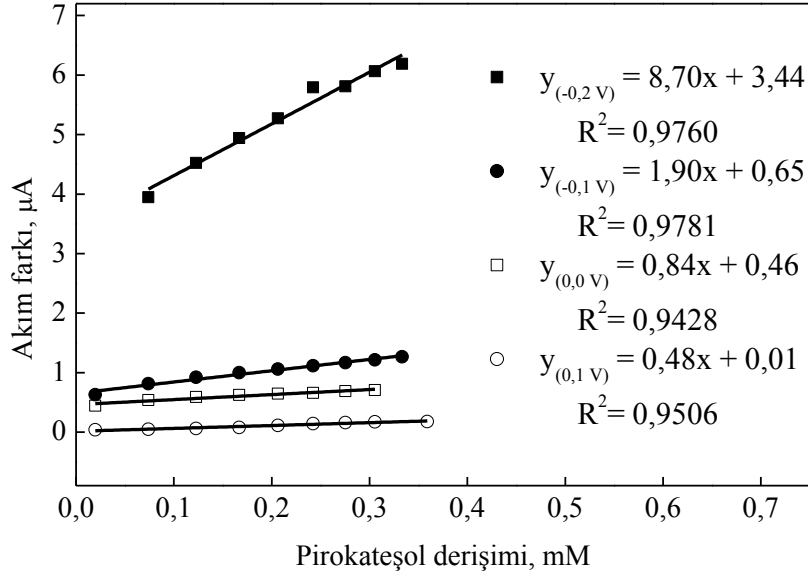


Şekil 5. *Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodunun cevabına sıcaklığın etkisi (0,10 M pH 7,0 fosfat tamponu, -0,20V)*

Çalışma Potansiyelinin Etkisi

Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodu için en uygun çalışma potansiyelinin belirlenmesi amacıyla, 0,10 M pH 7,0 fosfat tamponunda, Ag/AgCl'e karşı 0,10; 0,0; -0,1 ve -0,20 V çalışma potansiyellerinde pirokateşole enzim elektrodunun amperometrik cevabı ölçüldü. Elde edilen kalibrasyon grafikleri Şekil 6'da verildi. Grafikler incelendiğinde, -0,20 V'da elde edilen duyarlılığın +0,10 V, 0,0 V ve -0,1 V çalışma potansiyelinde elde edilenlere göre oldukça yüksek olduğu görüldü ve bu potansiyel çalışma potansiyeli olarak seçildi. Fenolik bileşiklerin tayinine yönelik yapılan çalışmalarda çoğunlukla çalışma potansiyeli olarak -0,20 V olarak seçilmiştir (Shan *et al.* 2007, Rajesh and Kaneto 2005, Rajesh *et al.* 2004, Dempsey *et al.* 2004, Vedrine *et al.* 2003, Cosnier *et al.* 2000, Shan *et al.* 2002). Bu potansiyel enzimatik reaksiyon sonucu oluşan *o*-kinonun herhangi bir medyatör olmaksızın elektrot yüzeyinde indirgenmesini olanaklı kılar (Liu *et al.* 2003). Bu gibi düşük potansiyellerde örneklerde bulunan kirleticilerin indirgenmemesi beklenmektedir. Ayrıca, düşük çalışma potansiyeli, elektroaktif

türlerden gelebilecek bozucu etkileri de azaltmaktadır (Rajesh *et al.* 2004, Rajesh and Kaneto 2005). Ancak, farklı matris ortamlarının ve medyatörlerin kullanıldığı bazı çalışmalarda 0,0 V (Kochana *et al.* 2008), -0,15 V (Liu *et al.* 2003) ve +0,12 V (Rajesh *et al.* 2005) gibi çalışma potansiyellerinde de kullanıldığı görülmüştür.

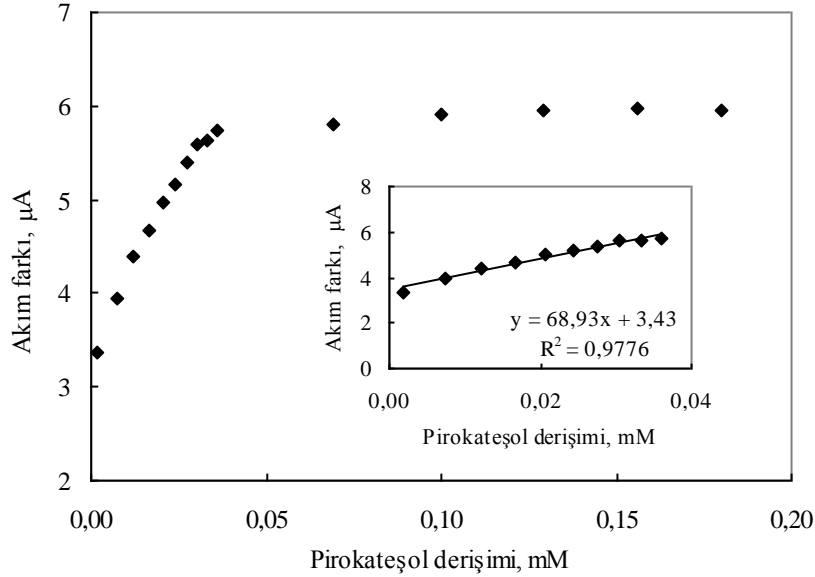


Şekil 6. Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodunun cevabına çalışma potansiyelinin etkisi (0,10 M pH 7,0 fosfat tamponu, oda sıcaklığı)

Pirokateşol Derişiminin Etkisi

Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodunun doğrusal çalışma aralığını ve gözlenebilme sınırını belirlemek için, belli derişimlerde pirokateşol çözeltileri 0,10 M pH 7,0 fosfat tamponunda dengeye getirilen enzim elektrodunun olduğu hücreye ilave edilerek akım farkları belirlendi ve derişime karşı grafiğe geçirildi (Şekil 7). Bu grafiğin içinde verilen grafik hazırlanan enzim elektrodunun doğrusal çalışma aralığını göstermektedir. Ayrıca, Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodunun pirokateşol için gözlenebilme sınırının yaklaşık $1,96 \times 10^{-6}$ M ve üst tayin sınırının $3,5 \times 10^{-5}$ M olduğu bulundu. Grafikten görüldüğü üzere, yüksek pirokateşol derişimlerinde doğrusallıktan sapma meydana gelmektedir. Bunun da fenolik bileşiklerin yüksek derişimlerde, difüzyon sınırlamasına yol

açmasından ve reaksiyon ürünlerinin elektrot yüzeyini zehirlenmesinden kaynaklandığı söylenmektedir (Rajesh and Kaneto 2005).



Şekil 7. *Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodun cevabına pirokateşol derişimin etkisi (0,10 M pH 7,0 fosfat tamponu, -0,20 V, oda sıcaklığı)*

Enzim Elektrodun Cevap Süresi

Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodun cevap süresini belirlemek amacıyla, 0,10 M pH 7,0 fosfat tamponunda ve -0,20 V'da kararlı hal akımı elde edilene kadar bekletildi ve ayrı ayrı belli derişimlerde ($1,0 \times 10^{-5}$ M ve $1,0 \times 10^{-4}$ M) pirokateşol çözeltisi eklemelerine karşı elde edilen amperometrik cevaplar belli zaman aralıklarında kaydedildi. Her iki derişimde için elde edilen eğrilerin birbirine paralel gittiği ve düşük pirokateşol derişimde enzim elektrodun cevap süresinin daha kısa olduğu görüldü. Amperometrik cevapların yaklaşık sabit kaldığı 45 saniye cevap süresi olarak seçildi. Literatürde fenolik bileşiklerin tayini için geliştirilen biyosensörlerde 10 saniye (Rajesh *et al.* 2004), 12 saniye (Shan *et al.* 2007), 80 saniye (Rajesh *et al.* 2005) gibi cevap

sürelerinin olduğu görüldü. Bu çalışmada elde edilen cevap süresinin ise bir biyosensör için uygun olduğu sonucuna varıldı.

Enzim Elektrodun Tekrar Kullanılabilirliği

Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodun tekrar kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla, aynı enzim elektrot kullanılarak beş kez ardı ardına kalibrasyon grafiği çizildi. Kalibrasyon grafiklerinin eğimlerinden yararlanılarak bulunan duyarlık değerlerinin bağıl standart sapması % 4,2 olarak bulundu. Fenolik bileşiklerin tayini için geliştirilen biyosensörlerde çoğunlukla pirokateşol derişimi sabit tutulduğu ortamda amperometrik cevabın belirlenmesi ile yapılmaktadır. Ancak, bu çalışmada kalibrasyon grafiklerinden elde edilen duyarlıklar karşılaştırıldığından bir enzim elektrot ile yaklaşık 25 ölçüm yapıldığı söylenebilir. Bu da hazırlanan enzim elektrodun tekrar tekrar kullanılabilceğini göstermektedir.

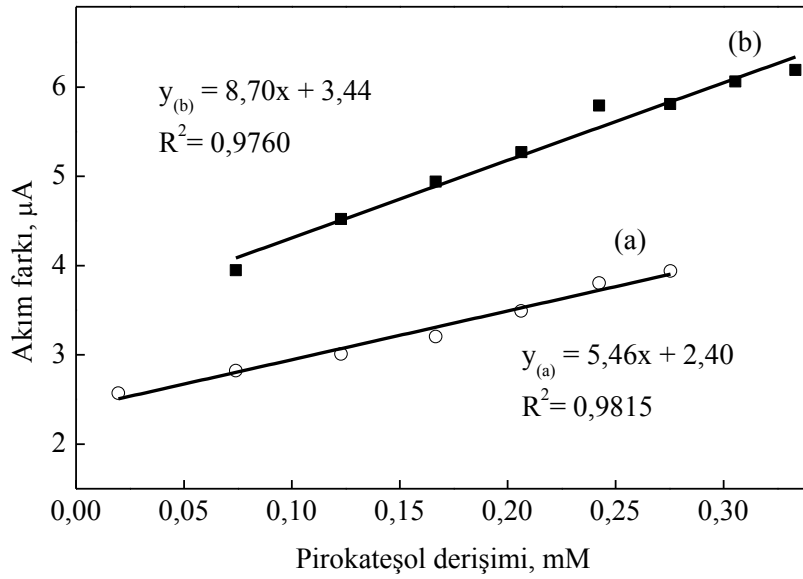
Enzim Elektrodun Ömrü

Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodun ömrünü belirlemek için, 17 gün boyunca belirli aralıklarla pirokateşol eklemeleriyle kalibrasyon grafikleri çizildi ve kalibrasyon grafiklerinden belirlenen duyarlık değerleri değerlendirildiğinde 10 gün sonunda enzim elektrodun duyarlığının %75'inin korunduğu ve 13 gün sonunda duyarlığın yaklaşık % 50 oranında azaldığı sonucuna varılmaktadır. Bu sebepten hazırlanan tek bir enzim elektrodun ömrünün yaklaşık 2 hafta olduğu söylenebilir. Bu çalışmada hazırlanan enzim elektrodun ömrünün geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

Enzim Elektrodun serbest polifenol oksidaz varlığında pirokateşole duyarlığı

Pt/PoPD-3MT elektrodunun serbest polifenol oksidaz oksidaz varlığında pirokateşole

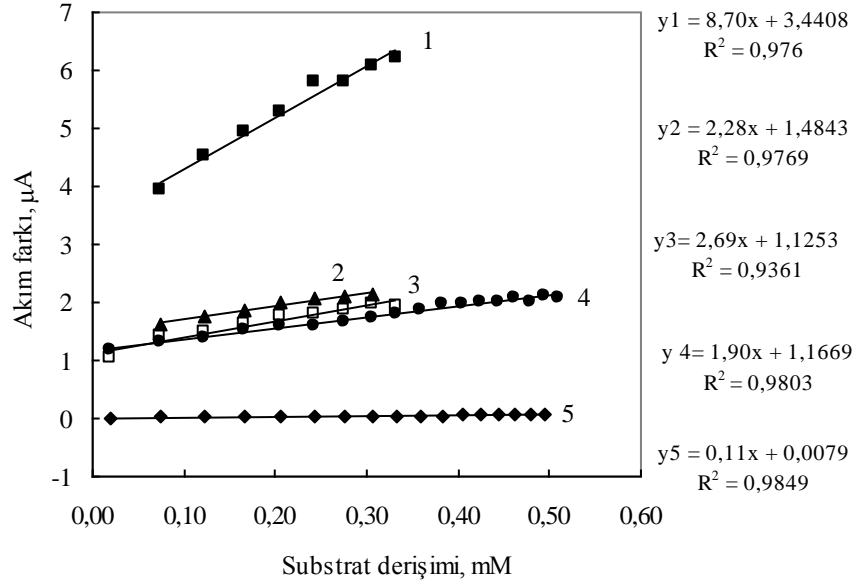
duyarlılığını belirlemek için immobilizasyonda kullanılan enzim çalışma ortamına ilave edildi. Stok pirokateşol çözeltisinden ilave edilerek belirlenen akım farkları pirokateşol derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 8 a). Ayrıca, Şekil 8 b'de Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrot ile pirokateşol için aynı koşullarda çizilen kalibrasyon grafiği görülmektedir. Grafikler incelendiğinde, serbest enzim varlığında Pt/PoPD-3MT elektrodun pirokateşole duyarlılığının, Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrot ile elde edilen duyarlık değerinden az da olsa düşük olduğu görülmektedir. Bu da, immobilizasyon sonucunda enzimin aktivitesini kaybetmediğini ve hazırlanan enzim elektrodun pirokateşole duyarlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca, duyarlıktaki bu fark çalışma tamponuna ilave edilen enzim moleküllerinin seyrelmenin etkisi ile pirokateşol molekülleri ile reaksiyonunun veya enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan *o*-kinon moleküllerinin elektrot yüzeyine ulaşmasının sınırlanmış olmasından kaynaklandığı söylenebilir.



Şekil 8. (a) Pt/PoPD-3MT elektrodun serbest enzim varlığında pirokateşole duyarlılığı, (b) Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodun pirokateşole duyarlılığı, (0,10 M pH 7,0 fosfat tamponu, -0,20 V, oda sıcaklığı)

Enzim elektrodun diğer fenolik bileşiklere duyarlılığı

Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodun diğer bazı fenolik bileşiklere (fenol, *o*-krezol, *m*-krezol, ve *p*-krezol) duyarlıklarını belirlemek amacıyla bu bileşiklerin çözeltileri çalışma ortamına eklenerek kalibrasyon grafikleri çizildi ve her bir bileşik için elde edilen grafikler Şekil 9'da verildi. Grafikler incelendiğinde, pirokateşol için elde edilen duyarlılığın diğerlerine göre daha yüksek olduğu; ancak, *p*-krezol için elde edilen kalibrasyon grafiğinin doğrusal çalışma aralığının diğerlerine göre daha geniş olduğu görüldü. Bu durum, hazırlanan biyosensörün fenolik bileşiklerin toplam miktarının tayininde kullanılabileceğini gösterdi. Shan *et al.* (2009) tarafından yapılan bir çalışmada pek çok değişik fenolik bileşiğin duyarlıkları karşılaştırılmış ve *p*-krezol, kateşol, *m*-krezol, *p*-klorofenol, fenol şeklinde duyarlılığın azaldığı belirlenmiştir. Tsai *et al.* (2007) tarafından yapılan bir çalışmada hazırlanan biyosensörün kateşol>fenol>*m*-krezol>*p*-krezol>dopamin şeklinde cevap verdiği görülmüştür. Rajesh *et al.* (2005) tarafından yapılan bir çalışmada da duyarlık değerlerinin değişimi kateşol>fenol>*p*-krezol şeklinde bulunmuştur. Bir diğer çalışmada, ise duyarlılığın kateşol>*p*-krezol>fenol şeklinde azaldığı belirlenmiştir (Verdine *et al.* 2003). Yapılan pek çok çalışmada pirokateşole duyarlık diğer fenolik bileşiklere karşı elde edilen duyarlık değerlerinden daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda bulunan sonuç da literatür verileri ile uyumludur.



Şekil 9. *Pt/PoPD-3MT/POX enzim elektrodun diğer fenolik bileşiklere (1: pirokateşol, 2: fenol, 3: m-krezol, 4: p-krezol, 5: o-krezol) cevabı (0,10 M pH 7,0 fosfat tamponu, – 0,20 V, oda sıcaklığı)*

SONUÇLAR

Bu çalışmada hazırlanan Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodun en iyi çalışma koşulları ve performans faktörleri Tablo 1’de özetlenmekte olup elde edilen sonuçlar aşağıda verilmektedir:

- Fenolik bileşiklerin tayini için hazırlanan Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodun kullanılabilceği gösterildi.
- Hazırlanan Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodun en iyi çalışma koşullarının pek çok diğer çalışma ile uyum içinde olduğu görüldü.
- Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodun belirlenen performans faktörlerinin fenolik bileşikler için geliştirilen enzim elektrotlar ile karşılaştırılabilir nitelikte olduğu sonucuna varıldı.
- Yapılan çalışmalar ışığında hazırlanan Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrot ile gerçek örneklerde fenolik bileşiklerin tayininde kullanılabilceği söylenebilir.

Tablo 1. Pt/PoPD-3MT/POx enzim elektrodun çalışma koşulları ve performans faktörleri

Çalışma Koşulları		Performans Faktörleri	
Tampon	Fosfat	Çalışma aralığı	$1,96 \times 10^{-6} \text{ M} - 3,5 \times 10^{-5} \text{ M}$
pH	7,0	Gözlenebilme sınırı	$1,96 \times 10^{-6} \text{ M}$
Tampon derişimi	0,10 M	Tekrarlanabilirlik	% 4,2
Sıcaklık	25 °C	Cevap süresi	45 saniye
Çalışma potansiyeli	-0,20 V	Raf ömrü	~ 2 hafta

Teşekkür

Bu çalışmaya desteğinden dolayı TÜBİTAK'a (Proje No: 106T359) teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Ameer, Q. and Adeloju, S.B. (2009). Development of a potentiometric catechol biosensor by entrapment of tyrosinase within polypropylene film. *Sensors and Actuators B*, 140, 4-11.
- Bagheri, H., Mohammadi, A. and Salemi, A. (2004). On-line trace enrichment of phenolic compounds from water using a pyrrole-based polymer as the solid-phase extraction sorbent coupled with high-performance liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 513, 445-449.
- Cosnier, S., Fologea, D., Szunerits, S. and Marks R.S. (2000). Poly(dicarbazole-N-hydroxysuccinimide) film: a new polymer for the reagentless grafting of enzymes and redox mediators, *Electrochemistry Communications*, 2, 827-831.
- Curulli, A. Kelly, S., O'Sullivan, C., Guilbault, G.G. and Palleschi, G. (1998). A new interference-free lysine using a non-conducting polymer film. *Biosensors and Bioelectronics*, 13, 1245-1250.
- Dai, Y.Q., Zhou, D.M. and Shiu, K.K. (2006). Permeability and permselectivity of polyphenylenedimine films synthesized at palladium disk electrode. *Electrochimica Acta*, 52, 297-303.
- Dempsey, E., Diamond, D. and Collier, A. (2004). Development of a biosensor for endocrine disrupting compounds based on tyrosinase entrapped within a poly(thionine) film. *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 367-377.
- Fan, Q., Shan, D., Xue, H., He, Y. and Cosnier, S. (2007). Amperometric phenol biosensor based on laponite clay-chitosan nanocomposite matrix. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 816-821.
- Garjonyte, R. and Malinauskas, A. (1999). Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized in poly(*o*-phenylenediamine) layer. *Sensors and Actuators B*, 56, 85-92.
- Gupta, G., Rajendran, V. and Atanassov, P. (2003). Laccase biosensor on monolayer-modified gold electrode. *Electroanalysis*, 15 (20), 1577-1583.
- Imabayashi, S., Kong, Y. and Watanabe, M. (2001). Amperometric biosensor for polyphenol based on horseradish peroxidase immobilized on gold electrodes. *Electroanalysis*, 13(5), 408-412.
- Kochana, J., Nowak, P., Jarosz-Wilkolazka, A.J., Bioeron, M. (2008). Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. *Microchemical Journal*, 89, 171-174.

- Li, Y.F., Liu, Z.M., Liu, Y.L., Yang, Y.H. Shen, G.L., Yu, R.Q. (2006). A mediator-free phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to ZnO nanoparticles. *Analytical Biochemistry*, 349, 33-40.
- Liu, S., Yu, J. and Ju, H. (2003). Renewable phenol biosensor based on a tyrosinase-colloidal gold modified carbon paste electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 540, 61-67.
- Lupetti, K. O., Rocha F. R.P. and Fatibello-Filho, O. (2004). An improved flow system for phenols determination exploiting multicommutation and long pathlength spectrophotometry. *Talanta*, 62, 463-467.
- Mailley, P., Cummings E.A., Mailley, S. Cosnier, S. Eggins, B.R. and McAdams E. (2004). Amperometric detection of phenolic compounds by polypyrrole-based composite carbon paste electrodes. *Bioelectrochemistry*, 63, 291-296.
- Malitesta, C., Palmisano, F., Torsi, L. and Zambonin, P.G. (1990). Glucose fast-response amperometric sensor based on glucose oxidase immobilized in an electropolymerized poly(*o*-phenylenedimine) film. *Analytical Chemistry*, 62, 2735-2740.
- Myler, S. Eaton, S. Higson, S.P.J. (1997). Poly(*o*-phenylenedimine) ultra-thin polymer-film composite membranes for enzyme electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 357, 55-61.
- Pedano, M.L. and Rivas, G.A. (2000). Amperometric biosensor for the quantification of gentisic acid using polyphenol oxidase modified carbon paste electrode. *Talanta*, 53, 489-495.
- Quan, D. and Shin, W. (2004). Amperometric detection of catechol and catecholamines by immobilized laccase from deniLite. *Electroanalysis*, 16 (19), 1576-1582.
- Rajesh, Takashima, W. and Kaneto, K. (2004). Amperometric phenol biosensor based on covalent immobilization of tyrosinase onto an electrochemically prepared novel copolymer poly(N-3-aminopropyl pyrrole-co-pyrrole) film. *Sensors and Actuators B*, 102, 271-277.
- Rajesh and Kaneto, K. (2005). A new tyrosinase biosensor based on covalent immobilization of enzyme on N-(3-aminopropyl) pyrrole polymer film. *Current Applied Physics*, 5, 178-183.
- Rajesh, Pandey, S.S., Takashima, W. and Kaneto, K. (2005). Simultaneous co-immobilization of enzyme and a redox mediator in polypyrrole film for

- fabrication of an amperometric phenol biosensor. *Current Applied Physics*, 5, 184-188.
- Rothwell, S.A., Killoroan, S.J., Neville, E.M., Crotty, A.M. and O'Neill, R.D. (2008). Poly(*o*-phenylenedamine) electrosynthesized in absence of added background electrolyte provides a new permselectivity benchmark for biosensor. *Electrochemistry Communications*, 10, 1078-1081.
- Serra, B., Benito, B., Agüi L., Reviejo, A.J. and Pingarron, J.M. (2001). Graphide-Teflon-peroxidase composite electrochemical biosensors. A tool for wide detection of phenolic compounds. *Electroanalysis*, 13 (8/9), 693-700.
- Shan, D., Mousty, C., Cosnier, S. and Mu, S. (2002). A composite poly azure B-clay-enzyme sensors for the mediated electrochemical determination of phenols. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 537, 103-109.
- Shan, D., Zhu, M., Han, E., Xue, H. and Cosnier, S. (2007). Calcium carbonate nanoparticles: A host for the construction of highly sensitive amperometric phenol biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 648-654.
- Shan, D., Zhang, J., Xue, H.G., Zhang, Y.C., Cosnier, S. and Ding, S.N. (2009). Polycrystalline bismuth oxide films for development of amperometric biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 2671-3676.
- Tatsuma, T. and Sato, T. (2004). Self-wiring from tyrosinase to an electrode with redox polymer. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 572, 15-19.
- Tembe, S., Karve, M., Inamdar, S., Haram, S., Melo, J. and D'Souza, S. (2006). Development of electrochemical biosensor based on tyrosinase immobilized in composite biopolymeric film. *Analytical Biochemistry*, 349, 72-77.
- Timur, S., Pazarlıoğlu, N., Pilloton, R. and Telefoncu, A. (2004). Thick film sensors based on laccases from different sources immobilized in polyaniline matrix. *Sensors and Actuators B*, 97, 132-136.
- Tsai, Y.C. and Chiu, C.C. (2007). Amperometric biosensors based on multiwalled carbon nanotube-Nafion-tyrosinase nanobiocomposites for the determination of phenolic compounds. *Sensors and Actuators B*, 125, 10-16.
- Vérdine, C., Fabiano, S. and Tran-Minh, C. (2003). Amperometric tyrosinase based biosensor using an electrogenerated polythiophene film as an entrapment support. *Talanta*, 59, 535-544.
- Vianello, F., Cambria, A., Ragusa, S., Cambria, M.T. Zennaro, L. and Rigo, A. (2004). A high sensitivity amperometric biosensor using a monomolecular layer of

- laccase as biorecognition element. *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (2), 315-321.
- Vidal, J.C., Garcia, E. and Castillo, J.R. (1999a). In situ preparation of a cholesterol biosensor: entrapment of cholesterol oxidase in an overoxidized polypyrrole film electrodeposited in a flow system Determination of total cholesterol in serum. *Analytical Chimica Acta*, 385, 213-222.
- Vidal, J.C., Garcia, E. and Castillo, J.R. (1999b). In situ preparation of overoxidized PPy/oPPD bilayer biosensor for the determination of glucose and cholesterol in serum. *Sensors and Actuators B*, 57, 219-226.
- Vidal, J.C., Garcia-Ruiz, E. and Castillo, J.R. (2003). Recent Advances in Electropolymerized Conducting Polymers in Amperometric Biosensors, *Microchimica. Acta* 143, 93–111.
- Vidal, J.C., Espuelas, J., Garcia-Ruiz, E. and Castillo, J.R. (2004). Amperometric cholesterol biosensors based on the electropolymerization of pyrrole and the electrocatalytic effect of Prussian-Blue layers helped with self-assembled monolayers. *Talanta*, 64, 655-664.
- Wang, B., Zhang, J. and Dong, S. (2000). Silica sol-gel composite film as an encapsulation matrix for the construction of an amperometric tyrosinase-based biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 15, 397-402.
- Wang, G., Xu, J.J., Ye, L.H., Zhu, J.J. and Chen, H.Y. (2002). Highly sensitive sensors based on the immobilization of tyrosinase in chitosan, *Bioelectrochemistry*, 57, 33-38.
- Wang H.S., Li, T.H., Jia, W.L and Xu, H.Y. (2006) Highly selective and sensitive determination of dopamine using a Nafion/carbon nanotubes coated poly(3-methylthiophene) modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 664–669
- Wang, P. Liu, M. and Kan, J. (2009). Amperometric phenol biosensor based on polyaniline. *Sensors and Actuators B*, 140, 577-584.
- Yang, S., Li, Y., Jiang, X., Chen, Z. and Lin, X. (2006). Horseradish peroxidase biosensor based on layer-by-layer technique for the determination of phenolic compounds. *Sensors and Actuators B*, 114, 774-780
- Zhang, T., Tian, B., Kong, J., Yang, P. Liu, B. (2003). A sensitive mediator-free tyrosinase biosensor based on an inorganic-organic hybrid titania sol-gel matrix. *Analytica Chimica Acta*, 489, 199-206.