

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

SPERMİN VE SPERMİDİN TAYİNİ İÇİN (BİYO)SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Tuğçe ÖZMEN DERKUŞ

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2023**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

SPERMİN VE SPERMİDİN TAYİNİ İÇİN (BİYO)SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Tuğçe ÖZMEN DERKUŞ

Danışman: Prof. Dr. Mustafa TAŞTEKİN

Bu çalışmada, spermin ve spermidin tayini için Co_3O_4 nanopartikül ve karboksilli ve karboksilsiz çok duvarlı karbon nanotüp (c-MWCNT ve MWCNT) ile modifiye edilmiş perde baskılı karbon elektrotlar (SPE) üzerine diamin oksidaz (DAO) enziminin immobilize edilmesi ve yüzeyin nafyon (NF) ile kaplanmasıyla amperometrik enzim biyosensörleri geliştirildi. Elektrodun modifikasyonunda kullanılan Co_3O_4 nanopartikül ve çok duvarlı karbon nanotüp miktarları merkezi kompozit tasarım ile optimize edildi. En uygun DAO enzim miktarı 0,005 U bulundu. Hazırlanan biyosensörler için optimum çalışma koşulları ve performans faktörleri belirlendi. NF/DAO/c-MWCNT- Co_3O_4 NP/SPE biyosensörünün duyarlılığı spermin için $51,6 \mu\text{A}/\text{mM}$ ve spermidin için $15,7 \mu\text{A}/\text{mM}$, doğrusal çalışma aralığı spermin için $1,2 \times 10^{-6}$ - $2,6 \times 10^{-4}$ M ve spermidin için $1,9 \times 10^{-6}$ - $1,8 \times 10^{-3}$ M, gözlenebilme sınırı spermin için $4,4 \times 10^{-7}$ M ve spermidin için $1,6 \times 10^{-6}$ M olarak belirlendi. Çalışmada ayrıca Prusya mavisi medyatörü kullanılarak NF/DAO/MWCNT- Co_3O_4 NP-PM/SPE biyosensörü de tasarlanarak daha düşük çalışma potansiyelinde seçiciliğin artırılması ve benzer türlere yönelik girişim etkilerinin azaltılması hedeflendi. NF/DAO/MWCNT- Co_3O_4 NP-PM/SPE biyosensörünün duyarlılığı spermin için $11,2 \mu\text{A}/\text{mM}$ ve spermidin için $9,7 \mu\text{A}/\text{mM}$, doğrusal çalışma aralığı spermin için $5,0 \times 10^{-6}$ - $1,5 \times 10^{-4}$ M ve spermidin için $1,2 \times 10^{-6}$ - $8,4 \times 10^{-5}$ M, gözlenebilme sınırı spermin için $4,2 \times 10^{-6}$ M ve spermidin için $1,7 \times 10^{-6}$ M olarak gözlemlendi. Ayrıca NF/DAO/c-MWCNT- Co_3O_4 NP/SPE biyosensörü ile malt içeceğinde spermin için $\%(100,5 \pm 1,7)$ ve spermidin için $\%(100,8 \pm 1,9)$ geri kazanım ile tayin yapılabildiği görüldü.

Aralık 2023, 110 sayfa

Anahtar Kelimeler: Diamin oksidaz, spermin, spermidin, prusya mavisi, (biyo)sensör.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DEVELOPMENT OF (BIO)SENSOR FOR SPERMINE AND SPERMIDINE DETERMINATION

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Tuğçe ÖZMEN DERKUŞ

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa TAŞTEKİN

In this investigation, the immobilization of diamine oxidase (DAO) enzyme onto modified screen-printed carbon electrodes (SPE), subsequently coated with Nafion (NF) and incorporating Co_3O_4 nanoparticles, as well as carboxylated and carboxyl-free multi-walled carbon nanotubes (c-MWCNT and MWCNT), was undertaken for the precise determination of spermine and spermidine. The quantities of Co_3O_4 nanoparticles and multiwall carbon nanotubes for electrode modification were systematically optimized using a central composite design. The optimal quantity of DAO enzyme was identified as 0.005 U. The study elucidated the optimal working conditions and performance characteristics of the developed biosensor. The calibration sensitivity of the NF/DAO/c-MWCNT- Co_3O_4 NP/SPE biosensor was determined to be 51.6 $\mu\text{A}/\text{mM}$ for spermine and 15.7 $\mu\text{A}/\text{mM}$ for spermidine. The linear working range spanned from 1.2×10^{-6} to 2.6×10^{-4} M for spermine and 1.9×10^{-6} to 1.8×10^{-3} M for spermidine, with a limit of detection of 4.4×10^{-7} M for spermine and 1.6×10^{-6} M for spermidine. Through the design of the NF/DAO/MWCNT- Co_3O_4 NP-PM/SPE mediated biosensor, the objective was to enhance selectivity at lower potentials and minimize interference effects from similar species. The sensitivity of the NF/DAO/MWCNT- Co_3O_4 NP-PM/SPE biosensor was determined to be 11.2 $\mu\text{A}/\text{mM}$ for spermine and 9.7 $\mu\text{A}/\text{mM}$ for spermidine, with a linear working range extending from 5.0×10^{-6} to 1.5×10^{-4} M for spermine and 1.2×10^{-6} to 8.4×10^{-5} M for spermidine. The limit of detection for this biosensor was observed as 4.2×10^{-6} M for spermine and 1.7×10^{-6} M for spermidine. Furthermore, the NF/DAO/c-MWCNT- Co_3O_4 NP/SPE biosensor demonstrated a recovery of $\%(100.5 \pm 1.7)$ for spermine and $\%(100.8 \pm 1.9)$ for spermidine in malt beverage.

December 2023, 110 pages

Key Words: Diammine oxidase, spermine, spermidine, Co_3O_4 NP, prussian blue, (bio)sensor.

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımda engin tecrübesi ile yol gösterici olan, hoşgörüsünü esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa TAŞTEKİN' e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı) teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez konumun belirlenmesinde ve ilgili çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan, bilgisini ve tecrübesini esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Esmâ KILIÇ' a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı) ve Sayın Prof. Dr. Pınar Esra ERDEN' e (Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı) teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam kapsamında gerçekleştirilen merkezi kompozit tasarım çalışmalarında engin bilgi ve tecrübesiyle sağladığı katkılardan dolayı Sayın Prof. Dr. Adnan KENAR (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı) hocama teşekkür ederim.

Varlığıyla yaşam enerjimi artıran canım kızım Güneş'e, mutluluğumu paylaşan aileme ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenen 116Z159 numaralı projeden temin edilen Design Expert yazılımı, cihazlar ve sarf malzemeleri kullanılarak tamamlanmıştır. Aynı projeden aldığım doktora öğrencisi bursu için TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Tuğçe ÖZMEN DERKUŞ

Ankara, Aralık 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI

ETİK.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1 Biyosensörler.....	4
2.2 Elektrokimyasal Yöntemler ve Biyosensörler	5
2.2.1 Voltammetri ve voltammetrik biyosensörler	7
2.2.2 Kronoamperometri (CA) ve amperometrik biyosensörler.....	10
2.3 Elektrot Modifikasyonu ve Nanomalzemeler	12
2.3.1 Karbon nanomalzemeler	14
2.3.2 Metalik ve metal oksit nanopartiküller	22
2.4 Prusya Mavisi	23
2.5 Biyojenik Aminler	25
2.5.1 Biyojenik amin oluşum mekanizması.....	27
2.5.2 Spermin ve spermidin tayininin önemi	29
2.5.3 Biyojenik aminlerin geleneksel tayin yöntemleri	31
2.5.4 Biyojenik amin tayininde biyosensörlerin kullanılması.....	33
2.6 Cevap Yüzey Yöntemleri / Merkezi Kompozit Tasarım	38
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	40
3.1 Kullanılan Cihazlar ve Donanımı	40
3.2 Kimyasal Maddeler, Çözeltiler ve Karışımlar	41
3.2.1 Kullanılan kimyasallar.....	41
3.2.2 Biyojenik aminlerin çözeltileri	43
3.2.3 Amino asit çözeltileri.....	43
3.2.4 Tampon çözeltiler	43

3.2.5 Redoks probu çözeltisi	44
3.2.6 Kitosan çözeltisi	44
3.2.7 EDC-NHS karışımı.....	44
3.2.8 Nafyon (NF) çözeltisi	44
3.2.9 c-MWCNT- Co ₃ O ₄ NP ve MWCNT- Co ₃ O ₄ NP karışımları.....	45
3.2.10 DAO çözeltisi.....	45
3.2.11 PM çözeltisi	45
3.3 Elektrotların Yüzey Bileşimlerinin Optimizasyonu.....	45
3.4 Modifiye Sensörlerin Hazırlanması	48
3.4.1 NF/Co ₃ O ₄ NP/SPE	48
3.4.2 NF/c-MWCNT/SPE.....	48
3.4.3 NF/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE	48
3.4.4 NF/MWCNT/SPE	48
3.4.5 NF/MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE.....	49
3.4.6 NF/MWCNT-Co ₃ O ₄ NP-PM/SPE	49
3.5 Biyosensörlerin Hazırlanması	49
3.6 PM Miktarı Optimizasyonu	49
3.7 DAO Miktarının Optimizasyonu	50
3.8 Elektrotların Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi	50
3.9 Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi	51
3.9.1 Çalışma potansiyeli.....	51
3.9.2 Çalışma pH'sı.....	51
3.10 Biyosensörler için Performans Faktörlerinin Belirlenmesi.....	51
3.11 Gerçek Numunelerde Analitik Uygulanabilirlik	54
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	55
4.1 Yüzey Bileşiminin Optimizasyonu	55
4.1.1 MKT ile c-MWCNT ve Co ₃ O ₄ NP miktarının belirlenmesi	55
4.1.2 Enzim miktarının belirlenmesi.....	58
4.1.3 Prusya mavisi miktarının belirlenmesi.....	60
4.2 Yüzey Karakterizasyonu: c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE ve MWCNT- Co ₃ O ₄ NP-PM/SPE	60
4.2.1 SEM görüntüleri ve EDX spektrumları	60

4.2.2 AFM görüntüleri	65
4.3 Elektrokimyasal Karakterizasyon: c-MWCNT-C ₀₃ O ₄ NP/SPE ve MWCNT-C ₀₃ O ₄ NP-PM/SPE	70
4.3.1 Dönüşümlü voltammogramlar	70
4.3.2 Elektrokimyasal empedans spektroskopi verileri	73
4.4 NF/DAO/c-MWCNT-C ₀₃ O ₄ NP/SPE Biyosensörü ile İlgili Çalışmalar.....	75
4.4.1 Optimum deney koşullarının belirlenmesi.....	75
4.4.2 Performans faktörlerinin belirlenmesi.....	76
4.4.3 Diğer biyojenik aminlere seçiciliği.....	82
4.4.4 Biyosensör cevabına diğer türlerin bozucu etkileri.....	83
4.4.5 Geliştirilen biyosensörün gerçek numuneye analitik uygulanabilirliği.....	87
4.5 NF/DAO/MWCNT-C ₀₃ O ₄ NP-PM/SPE Biyosensörü ile İlgili Çalışmalar	89
4.5.1 Optimum deney koşullarının belirlenmesi.....	89
4.5.2 Performans faktörlerinin belirlenmesi.....	91
4.5.3 Diğer biyojenik aminlere seçiciliği.....	94
4.5.4 Biyosensör cevabına diğer türlerin bozucu etkileri.....	95
4.5.5 Geliştirilen biyosensörün gerçek numunelere analitik uygulanabilirliği...	96
5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	98
KAYNAKLAR.....	102
ÖZGEÇMİŞ	109

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

M	Molar
mM	milimolar
μm	mikrometre
nm	nanometre
mg	miligram
μg	mikrogram
mL	mililitre
μL	mikrolitre
A	Amper
mA	miliamper
V	Volt
mV	milivolt
Hz	Hertz

Kısaltmalar

SPE	Perde baskılı elektrot
CNP	Karbon nanopartiküller
CNT	Karbon nanotüpler
GO	Grafen oksit
rGO	İndirgenmiş grafen oksit
GQDs	Grafen kuantum noktaları
BA	Biyojenik amin
PM	Prusya mavisi
DAO	Diamin oksidaz
MAO	Monoamin oksidaz enzimi
PAOx	Poliamin oksidaz enzimi
SMOx	Spermin oksidaz enzimi
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid
NHS	N-hidroksisüksinimid
BR	Britton-Robinson tampon çözeltisi
AA	Asetik asit-asetat tamponu
MKT	Merkezi kompozit tasarım
LOD	Gözlenebilme sınırı
LOQ	Alt tayin sınırı
Spm	Spermin
Spd	Spermidin
NF	Nafyon
GK	Geri kazanım
BSS	Bağlı standart sapma
ANOVA	Varyans analizi
CA	Kronoamperometri
SWCNT	Tek duvarlı karbon nanotüp
MWCNT	Çok duvarlı karbon nanotüp
c-MWCNT	Karboksilli çok duvarlı karbon nanotüp

CV	Dönüşümlü voltametri
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
SWV	Kare dalga voltametrisi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
RP-HPLC	Ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi
GC	Gaz kromatografisi
MS	Kütle spektroskopisi
UV	Ultraviyole
UVD	Ultraviyole dedektörü
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
EDX	Enerji yayımlı X-ışını spektrometrisi
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
XRD	X-ışını kırınımı
NMR	Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
CVD	Kimyasal buhar biriktirme
BDD	Bor katkılı elmas elektrot
Tyr	Tirozinaz enzimi
GOx	Glukoz oksidaz enzimi
GalOx	Galaktoz oksidaz enzimi
GADH	Galaktoz dehidrojenaz
HRP	Yaban turpu peroksidaz enzimi
R ²	Korelasyon katsayısı
NP	Nanopartikül
s	Standart sapma

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Biyosensörlerin genel gösterimi.....	5
Şekil 2.2 CV tekniği için potansiyel-zaman eğrisi	7
Şekil 2.3 Amperometrik potansiyel-zaman, derişim-zaman ve akım-zaman eğrileri	10
Şekil 2.4 Yaygın kullanılan karbon nanomalzemeler (Holmannova vd. 2022)	15
Şekil 2.5 Prusya mavisini (PM) üç boyutlu gösterimi.....	23
Şekil 2.6 Medyatör olan prusya mavisinin çözelti ortamındaki davranışı	25
Şekil 2.7 Biyojenik aminlerin amino asitlerden genel oluşum şeması.....	27
Şekil 2.8 Spermin ve spermidinin moleköl yapıları	29
Şekil 2.9 Spermin ve spermidinin oluşumu/biyosentezi	29
Şekil 3.1 Perde baskılı karbon elektrot (SPE)	41
Şekil 4.1 NF/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE sensörü için MKT ile elde edilen c-MWCNT ile Co ₃ O ₄ NP miktarlarının değişimini gösteren cevap yüzey grafiği	58
Şekil 4.2 Enzim miktarının NF/DAO/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE'nin akım cevabı üzerine etkisi: (A) spermin ve (B) spermidin (substrat derişimi: $1,0 \times 10^{-2}$ M; pH spermin için 8,5 ve spermidin için 9,0 BR tamponu; çalışma potansiyeli +0,7 V).....	59
Şekil 4.3 (A) Co ₃ O ₄ NP/SPE, (B) c-MWCNT/SPE ve (C) c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE sensör yüzeyleri için SEM görüntüleri.....	61
Şekil 4.4 (A) Co ₃ O ₄ NP/SPE ve (B) c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE sensör yüzeyleri için EDX spektrumları ve elementel bileşim çizelgeleri.....	62
Şekil 4.5 (A) Co ₃ O ₄ NP/SPE, (B) MWCNT/SPE, (C) Co ₃ O ₄ NP-MWCNT/SPE, (D) PM/SPE, (E) Co ₃ O ₄ NP-PM/SPE, (F) MWCNT-PM/SPE, (G) Co ₃ O ₄ NP-MWCNT-PM/SPE sensör yüzeyleri için ve (H) DAO/Co ₃ O ₄ NP-MWCNT-PM/SPE biyosensör yüzeyi için SEM görüntüleri	64
Şekil 4.6 (A) MWCNT/SPE, (B) Co ₃ O ₄ NP-MWCNT/SPE ve (C) Co ₃ O ₄ NP-MWCNT-PM/SPE sensör yüzeyleri için EDX spektrumları ve elementel bileşim çizelgeleri	65
Şekil 4.7 (A) Co ₃ O ₄ NP/SPE, (B) c-MWCNT/SPE ve (C) Co ₃ O ₄ NP/c-MWCNT/SPE yüzeylerinin AFM görüntüleri	67
Şekil 4.8 (A) Co ₃ O ₄ NP/SPE, (B) MWCNT/SPE, (C) Co ₃ O ₄ NP-MWCNT/SPE, (D) PM/SPE, (E) Co ₃ O ₄ NP-PM/SPE, (F) MWCNT-PM/SPE, (G) Co ₃ O ₄ NP-MWCNT-PM/SPE sensör yüzeylerinin AFM görüntüleri.....	69
Şekil 4.9 (A) SPE, (B) NF/Co ₃ O ₄ NP/SPE, (C) NF/c-MWCNT/SPE, (D) NF/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE sensörleri ve (E) NF/DAO/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE biyosensörü için dönüşümlü voltammogramlar	71
Şekil 4.10 (A) SPE, (B) NF/Co ₃ O ₄ NP/SPE, (C) NF/MWCNT/SPE, (D) NF/MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE, (E) NF/PM/SPE (F) NF/MWCNT-PM/SPE, (G) NF/MWCNT-Co ₃ O ₄ NP-PM/SPE sensörleri ve (H) NF/DAO/MWCNT-Co ₃ O ₄ NP-PM/SPE biyosensörü için dönüşümlü voltammogramlar	73
Şekil 4.11 Nyquist eğrileri: (A) a. SPE, b. c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE ve c. DAO/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE (B) a. SPE, b. PM/SPE c. MWCNT-Co ₃ O ₄ NP-PM/SPE ve d. DAO/MWCNT-Co ₃ O ₄ NP-PM/SPE	74

Şekil 4.12 NF/DAO/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE biyosensörünün amperometrik cevabına pH'nın etkisi A. Spermin ve B. Spermidin	76
Şekil 4.13 NF/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE ile A. spermin ve B. spermidin için elde edilen kalibrasyon grafikleri (Spermin için pH 8,5 BR, spermidin için pH 9,0 BR, çalışma potansiyeli +0,7 V)	77
Şekil 4.14 NF/DAO/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE biyosensörü ile elde edilen <i>i-t</i> grafikleri: A. spermin ve B. spermidin (çalışma ortamı: spermin için pH 8,5 BR tamponu; spermidin için pH 9,0 BR tamponu, çalışma potansiyeli: +0,7 V)	78
Şekil 4.15 NF/DAO/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE biyosensörü ile elde edilen kalibrasyon grafikleri: A. spermin ve B. spermidin (çalışma ortamı: spermin için pH 8,5 BR tamponu; spermidin için pH 9,0 BR tamponu, çalışma potansiyeli: +0,7 V; <i>N</i> =6)	79
Şekil 4.16 NF/DAO/c-MWCNT/SPE elektrodu için elde edilen kalibrasyon grafikleri: A. spermin için elde edilen grafik ve B. spermidin için elde edilen grafik (spermin için pH 8,5 BR tamponu, spermidin için pH 9,0 BR tamponu, çalışma potansiyeli +0,7 V)	80
Şekil 4.17 NF/DAO/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE biyosensörü için elde edilen uzun dönem kararlılığı çalışması grafiği; A. spermin ve B. spermidin	82
Şekil 4.18 NF/DAO/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE biyosensörünün cevabına diğer biyojenik aminlerin bozucu etkileri: A. spermin ve B. spermidin	85
Şekil 4.19 NF/DAO/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE biyosensörü ile spermin tayini için standart ekleme grafikleri: A. malt içeceği ve B. malt içeceği+standart....	88
Şekil 4.20 NF/DAO/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE biyosensörü ile spermidin tayini için standart ekleme grafikleri: A. malt içeceği ve B. malt içeceği+standart....	88
Şekil 4.21 NF/PM/SPE'nin BR tamponu ortamında dönüşümlü voltammogramı	90
Şekil 4.22 NF/DAO/MWCNT-Co ₃ O ₄ NP-PM/SPE biyosensörünün amperometrik cevabına pH'nın etkisi: A. spermin ve B. spermidin	91
Şekil 4.23 NF/DAO/MWCNT-Co ₃ O ₄ NP-PM/SPE biyosensörü için elde edilen kalibrasyon grafikleri: A. spermin ve B. spermidin (spermin için pH 8,5 BR tamponu; spermidin için pH 9,0 BR tamponu, çalışma potansiyeli -0,1 V)	92

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Bazı gıda ürünleri ve biyojenik amin içerikleri.....	28
Çizelge 2.2 Bazı gıda örneklerinde spermin ve spermidin içerikleri	30
Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasal maddeler, özellikleri ve markaları	42
Çizelge 3.2 c-MWCNT ile Co ₃ O ₄ NP miktarlarının optimizasyonu için merkezi kompozit tasarım modelindeki deneysel faktör ve seviyeler	46
Çizelge 3.3 Merkezi kompozit tasarım.....	47
Çizelge 4.1 NF/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE için deneysel ve beklenen amperometrik akım cevapları ile bu akım cevapları arasındaki farklara ait iki değişken için MKT	57
Çizelge 4.2 NF/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE için yüzey bileşenlerinin optimizasyonuna ait MKT verileriyle yapılan ANOVA analizi.....	57
Çizelge 4.3 NF/DAO/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE biyosensörünün diğer biyojenik aminlere ait performans karakteristikleri.....	83
Çizelge 4.4 NF/DAO/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE biyosensörünün spermin veya spermidin cevabına diğer biyojenik aminlerin bozucu etkisi	86
Çizelge 4.5 NF/DAO/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE biyosensörü ile spermin için amino asit % bozucu etki çalışması.....	86
Çizelge 4.6 NF/DAO/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE biyosensörü ile spermin için elde edilen geri kazanım sonuçları	88
Çizelge 4.7 NF/DAO/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE biyosensörü ile spermidin için elde edilen geri kazanım sonuçları	89
Çizelge 4.8 NF/DAO/MWCNT-Co ₃ O ₄ NP-PM/SPE biyosensörü ile histamin, putresin ve kadaverine karşı elde edilen performans karakteristikleri	94
Çizelge 4.9 NF/DAO/MWCNT-Co ₃ O ₄ NP-PM/SPE biyosensörü ile biyojenik aminler için bozucu etki çalışması	95
Çizelge 4.10 NF/DAO/MWCNT-Co ₃ O ₄ NP-PM/SPE biyosensörü ile spermin ve spermidin kronoamperometrik cevabına amino asitlerin % bozucu etkileri.....	96
Çizelge 4.11 NF/DAO/MWCNT-Co ₃ O ₄ NP-PM/SPE biyosensörü ile spermin için elde edilen geri kazanım sonuçları	97
Çizelge 4.12 NF/DAO/MWCNT-Co ₃ O ₄ NP-PM/SPE biyosensörü ile spermidin için elde edilen geri kazanım sonuçları	97
Çizelge 5.1 NF/DAO/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ NP/SPE biyosensörünün performans karakteristikleri.....	99
Çizelge 5.2 NF/DAO/MWCNT-Co ₃ O ₄ NP-PM/SPE biyosensörünün performans karakteristikleri.....	99
Çizelge 5.3 PM/PAOx/SPE biyosensörü ile elde edilen performans karakteri stikleri	100
Çizelge 5.4 PM/SMOx/SPE biyosensörü ile elde edilen performans karakteristikleri.....	100
Çizelge 5.5 Literatürdeki benzer bir çalışma ile karşılaştırma tablosu (Spd tayini)	100
Çizelge 5.6 Literatürdeki benzer bir çalışma ile karşılaştırma tablosu (Spm tayini)	101

1. GİRİŞ

Biyosensör teknolojileri, günümüzde oldukça hızlı gelişen endüstriyel alanlarda, gıda sanayilerinde, biyoteknolojik proseslerde hızlı ve güvenilir fiziksel verilere ulaşabilmek için başvurulan, nispeten uygun bütçe ile erişilebilen, pratik, hızlı teknikler olarak dikkat çekmektedir. Biyosensörler “bir substrata karşı elde edilen biyolojik cevabın termal, elektriksel veya optik bir sinyale çeviren cihazlardır” şeklinde tanımlanmaktadır (Rasooly vd. 2005). Biyosensörlere dayalı yöntemler ile geleneksel yöntemler karşılaştırıldıklarında iki yöntemde de benzer şekilde yüksek hassasiyette sonuçlar elde edilebiliyorken, biyosensörler geleneksel yöntemlerin pahalılık ve yavaşlık problemlerine de çözüm getirmektedir.

Biyosensör teknolojilerinin gelişmesinde en önemli etkenlerden biri de gelişen bilimsel alt yapı sayesinde üstün özellikli kimyasal bileşenlerin kullanımınıdır. Biyosensör yapımında son yıllarda çokça tercih edilen nanomalzemeler buna en iyi örnektir. Nanomalzemeler, büyüklüğü 100 nm'den küçük olan üstün özellikli malzemelerdir (Kokorina vd. 2020, Holmannova vd. 2022). Nanomalzemeler büyük yapıya eşdeğerlerine göre daha reaktif olup, ayrıca daha yüksek termal ve mekanik özellikler taşırlar. Ayrıca manyetik, optik ve elektriksel davranışları bakımından da normal boyutlu eşdeğerlerinden farklılaşırlar. Nanomalzemeler yapılarına göre telse, tabakalı, lamelli nano yapılar ve nanopartiküller gibi alt gruplara ayrılırlar. Bu özelliklerinden dolayı nanopartiküller yapımında kullanıldıkları sensörlerin ölçüm hassasiyetine önemli katkılar sağlarlar. (Rasooly vd. 2005)

Biyojenik aminler, aminoasitlerin dekarboksile olması veya keton ve aldehit yapılarının transaminasyonu yoluyla oluştuğu bilinen, düşük moleküler ağırlığa sahip, biyolojik açıdan aktif organik bazlardır (Karovicova ve Kohajdova 2003, Alper ve Temiz 2001). Bu yönüyle biyojenik aminler canlı metabolizmasında sentezlenebildiği gibi, tüketilen gıdalar yoluyla da alınabilmektedir. Gıdalarda doğal olarak bulunan biyojenik aminlerin yanı sıra protein içerikli besin maddelerinde ve özellikle fermente edilmiş gıdaların yapısında bozulma ürünü olarak da gözlenebilmektedirler. Belirli gıda ürünlerinde

bulunan aminoasitleri, yapısındaki dekarboksilaz enzimi ile biyojenik aminlere indirgeyen mikroorganizmalar, bakteriler ve mayalar, söz konusu gıda bozuldukça sayıca artmakta ve böylelikle biyojenik amin miktarında artışa sebep olmaktadır. Bu nedenle bir gıdadaki biyojenik amin miktarı, o gıdanın kalitesi ve tazeliği konusunda ipuçları taşımaktadır. Gıdalardaki biyojenik amin varlığının ve miktarının belirlenebilmesi besin hijyeni ve sağlık açısından büyük önem arz etmektedir. Yüksek miktarlarda biyojenik amin içeren gıdaların tüketimi, insan vücudunda toksik etki göstermesinden dolayı, sağlık sorunlarına yol açabilir (Önal 2007, Alper ve Temiz 2001). Bu nedenlerle gıda kontrollerinde, gıdalardaki biyojenik aminlerin miktarlarını belirlemek için hızlı, duyarlı, seçici, doğru, ucuz ve güvenilir yöntemler geliştirmek çok önemlidir.

Esansiyel aminoasitlerden argininin çeşitli yollarla parçalanması ile oluşan ilk biyojenik amin olan putresin, önce 3 amin grubu taşıyan uzun zincirli bir biyojenik amin olan spermidine dönüşür. Spermidin ise 4 amin grubu taşıyan daha uzun zincirli spermine dönüşür. Biyojenik aminler içerisinde 'poliamin' alt grubunda incelenen spermin ve spermidin, yaygın olarak fermente ürünlerde, peynirlerde, bazı et ürünlerinde, şarapta, birada ve malt içeceklerinde doğal olarak bulunmaktadır. Poliaminler gıdalarda doğal olarak bulunabildiği gibi, ilgili gıdadaki bozulmaların da işaretçisi olabilmektedirler. Ayrıca spermin ve spermidinin canlıların kas dokularındaki limit dışı artışının kanser oluşumunun erken dönem biyolojik işaretçisi olarak kullanılabileceğini gösteren bazı bilimsel çalışmalar bulunmaktadır. (Rawat vd. 2017, Giskeodegard vd. 2013). Bunlar, spermin ve spermidin tayininin giderek artan önemini açıkça ortaya koymaktadır.

Bu tez çalışmasında, pek çok besin maddesinde bulunabilen ve çoğunlukla bozunma ürünü olarak gözlemlenen biyojenik poliaminler spermin ve spermidinin, miktarlarının belirlenebilmesi için enzimatik biyosensörler tasarlandı. Bu amaçla karboksilli ve karboksilsiz çok duvarlı karbon nanotüp (c-MWCNT ve MWCNT), kobalt oksit (Co₃O₄NP) nanopartikül, medyatör olarak prusya mavisi (PM) ve diamin oksidaz (DAO) enzimi kullanılarak perde baskılı elektrot (SPE) yüzeyleri modifiye edildi. Hazırlanan NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE ve NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP-

PM/SPE biyosensörlerinin optimum çalışma koşulları ve performans faktörleri belirlendi ve gerçek numunelerde analitik uygulanabilirliği değerlendirildi.

Bu tez çalışmasında geliştirilen biyosensörler ile spermin ve spermidin için oldukça hızlı ve güvenilir şekilde analiz yapılabildi. Tez çalışmasında geliştirilen yöntem orijinalliğinin yanı sıra, pratikliği, kullanım kolaylığı ve hızlı cevap alınabilmesi gibi avantajları sebebiyle de bilimsel literatüre anlamlı bir katkı sağlayacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

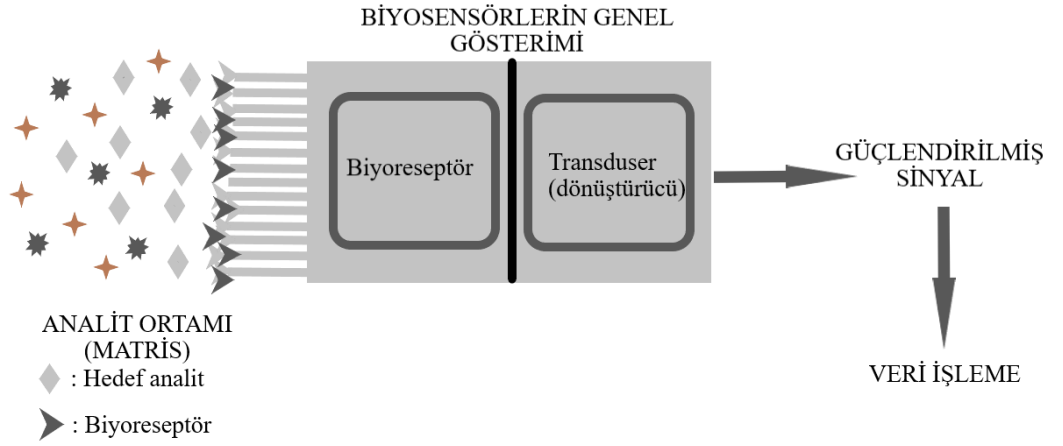
2.1 Biyosensörler

Biyosensörler, biyolojik algılayıcı reseptörün seçiciliği sayesinde ölçümü hedeflenen analitin ortamdaki derişiminde meydana gelen değişim ile orantılı olarak, ölçülebilir bir sinyal üreten cihazlardır (Amine vd. 2015, Aykut ve Temiz 2006). Biyosensörler yüksek duyarlıklı analizleri, hızlı ve basit bir kullanım ile sağlayabilmektedirler. Başka bir deyişle biyosensörler, yapısında bulunan farklı türde biyo-algılayıcıların uygun bir sinyal dönüştürme sistemi ile birleştirilmesi sonucu elde edilen analitik sistemlerdir (Amine vd. 2015, Aykut ve Temiz 2006). Bu farklı türler enzim, nükleik asitler, aptamer veya antikor olabilir. Şekil.2.1’de biyosensörlerin genel işleyişi görülmektedir.

Biyoreseptör yani biyolojik algılayıcı materyal, analitin gözlemlenmesi ve miktarının ölçülmesinde seçiciliğe ve yüksek duyarlığa sahip materyallerdir. Biyoreseptör olarak en yaygın kullanılanlar enzimlerdir. Enzimler dışında antikorlar, aptamerler, nükleik asitler, bakteriler, hücreler, dokular ve benzeri diğer biyolojik malzemeler de kullanılabilir. Biyoreseptörlerin sağladığı türe özgü seçicilik, ilgili biyosensörün performansını iyileştirecek olduğundan oldukça önemlidir.

Transduserler (dönüştürücü) ise, yaygın olarak elektrokimyasal sistemler (potansiyometrik, voltammetrik, amperometrik, impedimetrik gibi) olup, bunlara ek olarak optik, termal, akustik sistemler de olabilmektedir (Amine vd. 2015, Aykut ve Temiz 2006).

Biyoreseptörün hedef analitin miktarına göre oluşturduğu cevap sinyali, transduser kullanılarak potansiyel, empedans, akım, ışık absorpsiyonu, elektrokimyasal, termal, optik veya piezoelektrik açıdan ölçülebilen bir forma çevrilir (Şekil 2.1) (Amine vd. 2015, Aykut ve Temiz 2006).



Şekil 2.1 Biyosensörlerin genel gösterimi

2.2 Elektrokimyasal Yöntemler ve Biyosensörler

Kimyanın bir alt dalı olan elektrokimya en genel anlatım ile, elektrik enerjisi ile kimyasal değişimlerin arasındaki ilişkiyi incelemektedir. Elektrokimyasal yöntemler; elektrokimyasal özelliklerden faydalanarak nitel veya nicel tayinlerin yapılabildiği analitik analiz yöntemleridir. Bu yöntemler kullanılarak, ilgili kimyasal tepkimelerin sitokiyometrisi ve tepkimelerdeki kütle-yük aktarımının hızı ve denge sabitleri gibi birçok bilgi edinilebilir (Skoog vd. 2022).

Diğer analitik yöntemlerle kıyaslandığında, kolayca uygulanabilen ve daha düşük maliyetli olan potansiyometri, voltammetri, amperometri gibi teknikler ayrıca çok düşük tayin sınırlarına ulaşabilmektedir. Farklı yükseltgenme basamağındaki maddelerin eşzamanlı ölçülebilmesi ve aynı cihazda birkaç tekniğin uygulanabilmesi gibi pek çok avantaja sahiptir (Tepeli ve İnan 2016).

Elektrokimyasal tekniklerin pek çok farklı sınıflandırması yapılabilmektedir. Örneğin bu yöntemler, ara yüzey yöntemleri ve analiz ortamında gerçekleşen yöntemler olarak iki genel başlıkta incelenebilir (Skoog vd. 2022).

Analiz ortamının tamamında gerçekleşen yöntemler, kondüktometri ve kondüktometrik titrasyonlardır. Bunlar analiz ortamındaki iletkenliğin değişimine bağlı yapılan ölçümlerdir.

Ara yüzey yöntemleri, statik ve dinamik yöntemler olmak üzere iki gruptur. Statik yöntemler, sistemden geçen akımın sıfır olduğu potansiyometrik analizler ve potansiyometrik titrasyondur. Referans elektrot ile indikatör elektrot arasındaki potansiyel farkın farklı analit ortamları için ölçülmesine dayanan yöntemler *potansiyometrik* yöntemlerdir. (Skoog vd. 2022)

Dinamik yöntemler ise sistemden geçen akımın sıfırdan farklı olduğu yöntemlerdir. Sistemden geçen akım sıfır olmadığı için diğer bir değişken olan potansiyelin kontrolü gerekmektedir. Bu nedenle dinamik yöntemleri de potansiyel kontrollü yöntemler ve sabit akım yöntemleri olarak iki gruba ayırabiliriz (Skoog vd. 2022).

Sabit akımlı yöntemler arasında kulometrik titrasyonlar ve elektrogravimetri sayılabilir. *Kulometri* yöntemi, analiti yükseltgenme durumuna geçirebilmek için gereken yük miktarının belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Sabit akım kulometrisi olduğu gibi sabit potansiyel kulometrisi de bulunmaktadır.

Potansiyel kontrollü yöntemler ise, amperometri ve voltametri gibi yaygın kullanılan teknikleri içermektedir. Ayrıca sabit potansiyel kulometrisi de bu gruba aittir (Skoog vd. 2022).

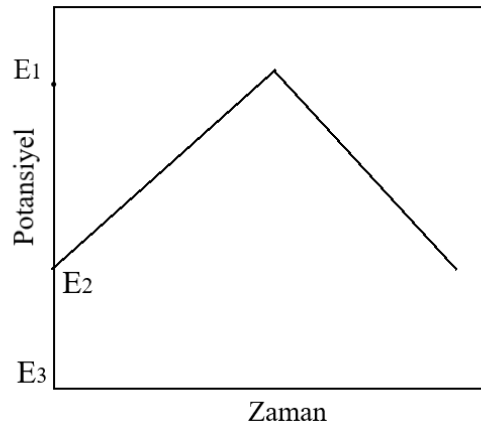
Bu tez çalışmasında hazırlanan elektrotların karakterizasyonlarında ve optimum çalışma potansiyellerinin belirlenmesinde voltammetrik ve impedimetrik yöntemlere başvurulmuştur. Substratlar olan spermin ve spermidin analizi için geliştirilen analiz yöntemi ise amperometri temellidir. Bu nedenle voltametri, amperometri ve empedans yöntemlerine detaylı değinilecek, literatürde bu yöntemler kullanılarak yapılmış benzer çalışmalara yer verilecektir. 2.2.1, 2.2.2 bölümlerinde elektrokimyasal yöntemlerden bu

tez çalışması kapsamında kullanılanlar ve ilgili biyosensör uygulamaları kısaca anlatılmaktadır.

2.2.1 Voltammetri ve voltammetrik biyosensörler

Voltammetrik yöntemler, sabit veya değişken potansiyelde analit derişimi ile orantılı olarak değişen akımın ölçüldüğü sistemlerdir. Bu yöntem kullanılarak ilgili analitin nitel ve nicel tayininin yapılabildiği gibi, tepkime mekanizmaları incelenebilir ve çözelti ortamındaki fizikokimyasal karakteristikler hakkında bilgi edinilebilir (Turan 2008).

Voltammetrik yöntemlerle analiz yaparken çalışma elektrodu üzerine, değeri ayarlanabilen sabit potansiyeller uygulanır ve bu potansiyele bağılı olarak değişen akımın değeri ölçülür. Dönüşümlü (döngüsel) voltammetri (CV) tekniği, elektron aktarımlarının kinetikleri ve adsorpsiyonları, indirgenme-yükseltgenme tepkimelerinin termodinamikleri hakkında bilgi edinmek için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Aşangil vd. 2012). Karıştırma işlemi yapılmayan durgun çözelti içerisindeki elektroda ait potansiyel-zaman grafiği Şekil 2.2' de verilmiştir.



Şekil 2.2 CV tekniği için potansiyel-zaman eğrisi

Başlangıçtaki potansiyel (E_1) ile daha yüksek olan bir diğer potansiyel değerinde (E_2) potansiyel taraması yapıldığında taramalı voltammetri uygulanmaktadır. Daha yüksek olan potansiyel değerine (E_2) erişildiğinde aksi yönde potansiyel taraması yapılırsa

yöntem dönüşümlü voltammetridir. Aksi yöndeki tarama sırasında, potansiyel başlangıç potansiyeli (E_1) değerinde durabileceği gibi farklı bir son potansiyelde (E_3) değerinde de durabilir (Aşangil vd. 2012).

Akımın türü baz alınarak uygulanacak olan teknik değişeceği için, voltammetrik yöntemlerde akımın türünü bilmek önemlidir. CV tekniği, akımın türünü anlamak amacıyla sıklıkla tercih edilir. Bunun için derişim ve tarama hızı değiştirilerek voltammetrik ölçümler alınır. Elde edilen verilerden akımdaki değişimin tarama hızı ile bağlantısı değerlendirilerek akımın türü belirlenir (Yılmaz vd. 2015).

Akımın türü 1. grafik ($v^{1/2}$)- (i_p) ve 2. grafik $\log(v)$ - $\log(i_p)$ çizilerek belirlenir (v : tarama hızı, i_p : pik akımını göstermektedir). Çizilen 1. grafiğin R^2 değeri 1'e yakınsa ve 2. grafiğin eğimi 0,5'e yakınsa difüzyon kontrollü akım; 1. grafiğin R^2 'si 1'e uzak ve 2. grafiğin eğimi 1'e yakınsa adsorpsiyon kontrollü akım olarak tanımlanır. Difüzyon kontrollü akım söz konusu olduğunda normal yöntemler uygulanır. Akım türünün adsorpsiyon kontrollü olduğu durumlarda ise sıyırma yöntemleri uygulanır (Özkan ve Biryol, 1993).

CV, elektrokimyasal bir sistemin aydınlatılması için tercih edilen en yaygın yöntemdir. Ancak CV, rutin nicel analizlerde pek tercih edilmemektedir. CV yöntemi yaygın olarak yükseltgenme/indirgenme tepkimelerinin mekanizması ve hızının belirlenmesinde, modifiye edilmiş elektrotların yüzeyinin incelenmesinde, bu yüzeylerin hazırlanması ve aydınlatılmasında kullanılan önemli bir yöntemdir (Skoog vd. 2022).

Voltammetrik biyosensörlerle yapılan çalışmalardan en önemlilerinden biri, Ceto ve çalışma arkadaşları tarafından 2013 yılında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada dört adet voltammetrik sensör tek aygıt haline getirilerek, 20'den fazla türe duyarlı biyo-elektrik dil (Bio-Electronic Tongue, BioET) geliştirilmiştir. Bu grafit-epoksi temelli voltammetrik sensörler, tirozinaz ve lakkaz enzimleri ve Cu nanopartikülü kullanılarak modifiye edilmiş, referans olarak Ag/AgCl elektroda karşı dönüşümlü voltammogramlar alınacak şekilde tasarlanmıştır. Geliştirilen BioET ile şarap

numunelerinde bulunan, tat, koku ve şarap kalitesi üzerine oldukça etkili olan fenolik asitler (benzoik asit, kafeik asit, sinamik asit), stilbenoidler, flavonoller, dihidroflavonoller, antosiyaninler, flavonol monomer ve polimerleri gibi 20 farklı türün analizi, önışlem gerektirmeksizin yapılabilmektedir (Ceto vd. 2013)

Başka bir çalışmada, Liu ve ekibi tarafından 2022 yılında glukoz, dopamin, serotonin, gibi pek çok biyolojik türün voltammetrik analiz performansları karşılaştırılmıştır. Çalışmada ayrıca farklı avantaj ve dezavantajları olan voltammetrik teknikler olan CV, diferansiyel puls voltammetri (DPV) ve kare dalga voltammetri (SWV) tekniklerinin verimlilikleri de karşılaştırılmıştır (Liu vd. 2022). Sonuçları değerlendirilen çalışmalar içerisinde göze çarpan güncel çalışmalardan birinde dopamin, serotonin ve glukoz analizi GOx-DHP/Gr-AV modifiye elektrodu ile her 3 voltammetri tekniği de (CV, DPV, SWV) kullanılarak yapılmıştır (Orzari vd. 2019). Elde edilen SWV ölçüm sonuçlarında, dopamin için alt tayin sınırı 0,13 μM , doğrusal çalışma aralığı 30-800 μM , serotonin için alt tayin sınırı 0,39 μM , doğrusal çalışma aralığı 6-100 μM ve glukoz için ise alt tayin sınırı 0,21 μM bulunmuştur. Ayrıca doğrusal çalışma aralığı 1-10 μM olarak belirlenmiştir. Yapılan değerlendirmede SWV ve DPV teknikleri arasında duyarlık açısından bir fark olmadığı ortaya konmuş, ancak cevap süresi ve daha geniş potansiyel aralığında çalışma imkanı tanınmasıyla SWV tekniğinin daha elverişli olduğuna karar verilmiştir. Bu avantajları yönüyle hassas biyolojik analitlerin analizinde SWV tekniği daha fazla tercih edilmelidir.

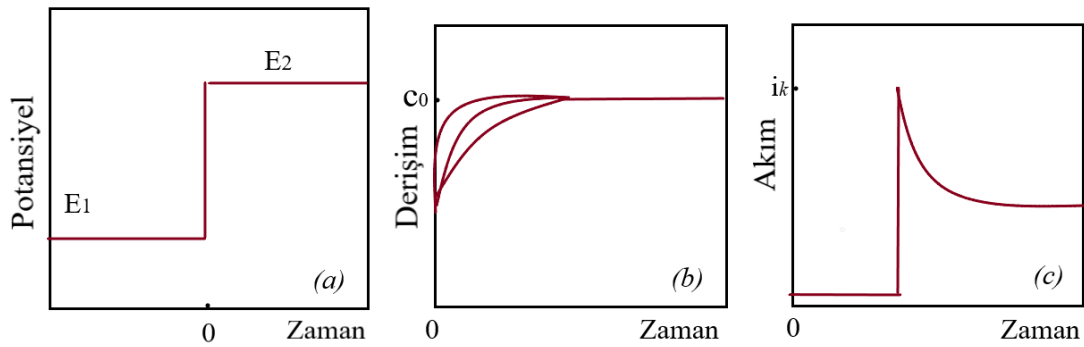
Bir diğer çalışmada Tyr-AuNP/BDD modifiye elektrodu ile fenol analizi SWV kullanılarak yapılmıştır (Janegitz vd. 2012). Elde edilen sonuçlarda alt tayin sınırı 0,07 μM bulunmuştur. Doğrusal çalışma aralığı 0,1-11,0 μM olarak elde edilmiştir. SWV tekniğinin oldukça yüksek duyarlıklı analizlere imkan tanıdığı görülmüştür.

Rafaqat ve çalışma arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada geleneksel elektrokimyasal analiz yöntemlerine hızlı, uygun maliyetli ve yüksek duyarlıklı voltammetrik analiz tekniği geliştirmek istenmiştir. Bunun için lakkaz ve katalaz enzimleri, bakır nanopartikül (CuNP) kullanılarak zararlı pek çok pestisit (alternia,

aspergillus, rhizopus, fusarium, trichoderma gibi) dönüşümlü voltammetrik analizini yapabilecek voltammetrik karbon keçe elektrot temelli (carbon felt electrodes, CF) biyosensörler geliştirilmiştir. Geleneksel yöntemlerden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılabilir düzeyde yüksek performanslı sonuçlar elde edilerek bilimsel literatüre katkı sunulmuştur (Rafaqat vd. 2022)

2.2.2 Kronoamperometri (CA) ve amperometrik biyosensörler

Amperometri, sabit bir potansiyelde elektrik yüklü elektrotlardaki akım değişiminin analit derişimine karşı izlendiği elektrokimyasal bir yöntemdir (Skoog vd. 2022). Kronoamperometri (CA) yönteminde ise çalışma elektrodunun potansiyeli faradayik tepkimeye yetersiz (E_1) potansiyeli, elektron aktarım hızının yüksek olduğu (E_2) potansiyeline değiştirilir. Böylelikle durgun ortamda akım- zaman ilişkisi incelenir. CA yönteminde difüzyon ile kütle transferi gerçekleşir (Skoog vd. 2022, Telli vd. 2011), Şekil 2.3’de görülmektedir.



Şekil 2.3 Amperometrik potansiyel-zaman, derişim-zaman ve akım-zaman eğrileri

CA yöntemi yaygın olarak elektrotta gerçekleşen tepkime mekanizmalarının aydınlatılmasında kullanılır. Ayrıca elektroaktif türlerin difüzyon katsayıları ve elektrot yüzey alanlarının tayin edilmesinde tercih edilir (Wang 2000). CA temelli sistemlerin en önemli avantajı, yüksek duyarlıklı ölçümlerin hızlı ve güvenilir şekilde gerçekleştirilebilmesidir.

Amperometrik biyosensörlerle yapılan çalışmalar arasında öncülerden kabul edilen bir çalışma 1997 yılında Calvo ve Danilowicz tarafından yapılmıştır. Glukoz oksidaz enzimi (GOx) ve HRP medyatörü immobilize edilen bir dizi modifiye camı karbon elektrot hazırlanmıştır. Ferrosen karboksialdehit (Fc) ve poliakrilamit (PAA) kullanılarak redoks jeli elde edilmiş ve camı karbon elektrot yüzeyleri kaplanmıştır. Fc-PAA-GOx modifiye elektrotları ile glukoz örneklerinden amperometrik ölçümlerin yüksek doğrulukla elde edilebildiği rapor edilmiştir (Calvo ve Danilowicz 1997).

Daha güncel çalışmalardan biri, Kanyong ve çalışma arkadaşları tarafından 2019 yılında gerçekleştirilmiştir. İlgili çalışmada galaktoz için tasarlanmış amperometrik biyosensörlerin performansları karşılaştırılmıştır. Bu amaçla galaktoz oksidaz (GalOx) ve galaktoz dehidrojenaz (GADH) kullanılan pek çok biyosensör incelenmiştir (Kanyong vd. 2019).

Dalkıran ve çalışma arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada GalOx/Co₃O₄/grafen/GCE ve GalOx/Co₃O₄/MWCNT/GCE biyosensörleri tasarlanmış, serum numuneleri üzerinde amperometrik ölçümler alınarak performans değerlendirmesi yapılmıştır. GalOx/Co₃O₄/grafen/GCE biyosensörü için elde edilen sonuçlara göre galaktoz için gözlenebilme sınırı 3,0 µM ve doğrusal çalışma aralığı 9,0×10⁻³-0,6 mM bulunmuştur. GalOx/Co₃O₄/MWCNT/GCE biyosensörü için elde edilen sonuçlara göre ise galaktoz için gözlenebilme sınırı 0,9 µM bulunmuştur. Lineer çalışma aralığı ise 9,0×10⁻³-1,0 mM bulunmuştur (Dalkıran vd. 2016)

Sharma ve ekibi tarafından 2006 yılında amperometrik galaktoz biyosensörü tasarlanarak süt numunelerinden yüksek performanslı sonuçlar elde edilmiştir. Bu amaçla polivinilferrosenyum (PVF) ve galaktoz oksidaz enzimi kullanılarak GalOx/PVF/O₂ modifiye elektrotları tasarlanmıştır. Alt tayin sınırı 2,8×10⁴ µM ve doğrusal çalışma aralığı 28,0-168,0 mM olarak belirlenmiştir (Sharma vd. 2006)

Weltin ve çalışma arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada ise laktat, kolin ve glutamat için amperometrik enzim biyosensörlerinin tasarlanıp, mikro boyutta

üretilmesi ve in vivo çalışmalarda kullanılması anlatılmaktadır. Tel, polimer, seramik ve silikon temelli mikrosensörlerin performansları karşılaştırılmıştır. Glutamat için alt tayin sınırı polimer temelli mikrosensör ile 0,22 μM , seramik temelli mikrosensör ile 0,52 μM ve silikon temelli mikrosensör ile 0,32 μM bulunmuştur. Duyarlıklar ise sırasıyla 2,16 $\text{nA mm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$, 2,23 $\text{nA mm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ ve 1,52 $\text{nA mm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Laktat için alt tayin sınırı polimer temelli mikrosensör ile 2-15 μM , seramik temelli mikrosensör ile 78 μM bulunurken tel (wire) temelli mikrosensör ile gözlenebilme sınırı belirlenememiştir. Duyarlıklar ise sırasıyla 0,0021-0,256 $\text{nA mm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$, 0,008 $\text{nA mm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ ve 0,01 $\text{nA mm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Kolin için gözlenebilme sınırı seramik temelli mikrosensör ile 0,412 μM ve silikon temelli mikrosensör ile 0,3 μM bulunmuştur. Duyarlıklar ise sırasıyla 2,64 $\text{nA mm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ ve 1,32 $\text{nA mm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Weltin vd. 2016).

Amperometrik ölçümlerin en büyük avantajı hızlı ve pratik şekilde elde edilebilen sonuçların aynı zamanda yüksek duyarlığa sahip olabilmesidir. Bu avantaj literatürdeki amperometrik çalışmalarda da görülmektedir. Bu tez çalışmasında *kronoamperometrik* enzim biyosensörü tasarımı üzerine yoğunlaşıldı.

2.3 Elektrot Modifikasyonu ve Nanomalzemeler

Günümüzde yapılan biyosensör çalışmalarında camı karbon, altın, platin, karbon pasta, perde baskılı elektrot gibi katı elektrot yüzeyleri çeşitli modifikasyon malzemeleri ile modifiye edilerek kullanılmaktadır. Elektrot modifikasyonunda amaç daha üstün özelliklere sahip bir yüzey elde etmek ve hazırlanan biyosensörün analitik performansını geliştirmektir. Aşağıda bu çalışmada kullanılan perde baskılı elektrotlarla ilgili bilgi verilmiştir.

Son yıllarda geliştirilen elektrokimyasal tekniklerde de görülmektedir ki, deneysel tasarımlardaki temel amaç ölçümün duyarlılığını ve seçiciliğini artırıp, maliyeti ve ölçüm süresini azaltmaktır. Ayrıca bu tekniklerin, kurulum ve kullanım kolaylığına ek olarak farklı numunelere de kolayca uygulanabilmesi beklenmektedir. Elektrokimyasal

ölçümler bakımından perde baskılı elektrotların sunduğu kullanım kolaylığı, hızı ve geniş kullanım yelpazesi oldukça önemli bir gelişme olarak göze çarpmaktadır.

Bilimsel literatüre sunduğu yüksek tekrarlanabilirliğe ve yüksek duyarlılığa sahip ölçüm kalitesine ek olarak sağladığı hızlı ölçüm, kolay kullanım ve pratik özellikleri de perde baskılı elektrotlara endüstriyel bir yön kazandırmaktadır. Teknolojik ve bilimsel gelişmeler taşınabilirlik, kullanım kolaylığı ve hız beklentilerini de beraberinde getirmiştir. Analitik yöntemler de bu yönde geleneksellikten sıyrılarak bu beklentileri karşılamaya çalışmaktadır. Perde baskılı elektrotlar bu yönde bir devrim niteliğindedir.

Perde baskılı elektrotlar karbon temelli ve metal temelli olmak üzere iki genel başlık altında incelenebilir. En yaygın kullanılan perde baskılı elektrot tipi karbon temelli olarak üretilenlerdir. Ancak özellikle Au, Ag, Pt gibi değerli metaller kullanılarak üretilen elektrotlar da çeşitli elementlerin tayin edilmesinde kullanılmaktadır. İnert bir zemin materyali üzerine referans elektrot, karşıt elektrot ve çalışma elektrodunun basılması ile elektrot oluşturulur. Bu işlem için özellikli baskı sistemleri kullanılmaktadır. Elektrotlardan sonra koruyucu tabakanın da yapıştırılması ile elektrodun üretimi tamamlanmış olur. Sonrasında yapılacak olan çalışmaya uygun şekilde modifiye edilen elektrot ölçüme hazırdır.

Perde baskılı karbon elektrotlar tek kullanımlıktırlar. Bu sayede yüksek tekrarlanabilirlikte cevap vermekteler. Farklı referans ve farklı karşıt elektrot sistemleri ile üretilebilmektedirler. Çalışma elektroduna ait yüzey, ticari olarak değişkenlik gösterebilmekle birlikte, farklı geometrik şekillerde ve farklı büyüklüklerde seçilebilmektedir. Böylelikle hammadde sarfiyatı önlenebilmektedir. Perde baskılı karbon elektrotlar kullanıldığında sadece sulu çözelti ortamında çalışılabilmektedir. Ayrıca perde baskılı karbon elektrotların termal kararlılığı incelendiğinde, cevap vermeye devam edebildikleri sıcaklık aralığı 10 °C ile 80 °C arası olarak gözlenmiştir.

Nanomalzemeler, büyüklüğü 100 nm'den küçük olan üstün özellikli malzemelerdir. Nanomalzemeler büyük yapıli eşdeğerlerine göre daha reaktiftir. Ayrıca daha yüksek

mekanik dayanım ve üstün termal özellikler gösterirler. Bunlara ek olarak manyetik, optik ve elektriksel davranışları bakımından da makro boyutlu eşdeğerlerinden farklılaşırlar. Nanomalzemeler yapılarına göre telse, tabakalı, lamelli nanoyapılar ve nanopartiküller gibi alt gruplara ayrılırlar. Bu özelliklerinden dolayı nanopartiküller yapımında kullanıldıkları sensörlerin ölçüm duyarlılığına önemli katkılar sağlarlar (Kokorina vd. 2020, Holmannova vd. 2022).

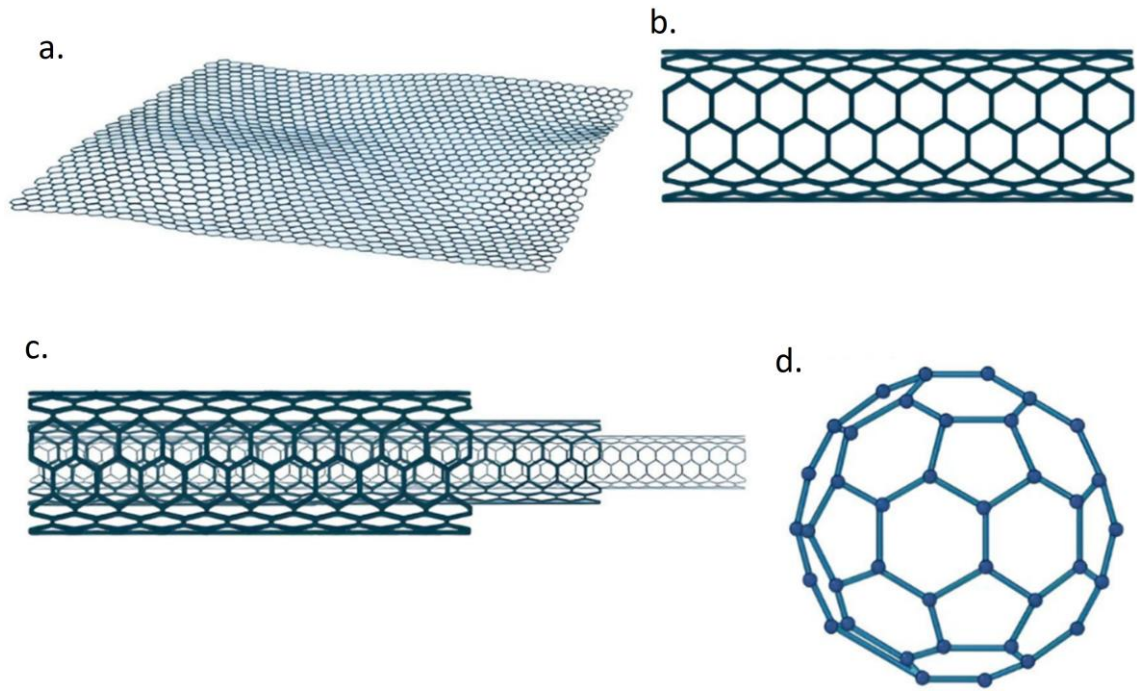
Metal nanopartiküller ve metal oksit nanopartiküller kadar pek çok farklı türde nanopartikül (oksit nanopartiküller, yarı iletken nanopartiküller, çift kompozit nanopartiküller vb.) elektrokimyasal sensör ve biyosensörlerin tasarımında sıklıkla tercih edilmektedir. En yaygın kullanılan metal nanopartiküller altın (AuNP) ve platin (PtNP) nanopartiküllerdir (Luo vd. 2005). Metaloksit nanopartiküllerden ise en sık kullanılanlar demir (Fe_2O_3NP) ve kobalt (Co_3O_4NP) olarak göze çarpmaktadır. Bu nanopartiküller elektrokimyasal tepkimelerin hızını ve elektron transferini artırır. Ayrıca biyolojik moleküllerin immobilizasyonunda önemli rol oynamaktadırlar (Luo vd. 2005).

Karbon temelli nanomalzemeler ise karbonun üstün elementel özellikleri ile nanomalzeme teknolojisinin üstünlüklerini birleştirdiğinden, biyosensör teknolojilerinde sıkça kullanılmaktadır.

2.3.1 Karbon nanomalzemeler

Karbon yeryüzünde en çok bulunan elementlerdendir. Canlı hayatındaki temel bileşenlerde, şekerin yapısında, proteinlerde, DNA yapısında karbon atomları yer alır. Karbon atomu bileşikler dışında çeşitli farklı formlarda da bulunur. En iyi bilinen doğal karbon allotropları elmaslar ve grafitir. Amorf karbon allotropları ise kömür türevleridir. Karbonun üstün kimyasal ve fiziksel özelliklerine karbon temelli nanopartikülleri ve nano malzemeleri de sahiptir (Kokorina vd. 2020, Holmannova vd. 2022).

Saf karbondan oluşan tüm karbon nanopartikül tipleri yüksek kararlılığa, olağanüstü elektriksel ve ısısal iletkenliğe, yüksek mekanik dayanım özelliklerine sahiptirler. Biyolojik sistemlere uyumludurlar ve düşük toksisiteye sahip oldukları bilinmektedir. Ayrıca karbon nanomalzemeler yapılarındaki sp^2 hibritleşmeleri sebebiyle hidrofobik özellik sergilemektedirler (Holmannova vd. 2022). Karbon nanopartiküller (CNP) ve uygulamaları, son zamanlardaki nanoteknolojik gelişmelerin başlıcalarındandır. İlk karbon nanopartiküller 1980'lerde keşfedilmiş ve uygulanmıştır. Üstün fiziksel ve kimyasal özellikler sunan karbon partiküller, grafen oksit, fulleren, tek ve çok duvarlı karbon nanotüpler olmak üzere dört temel alt gruptan oluşmaktadır. Bu karbon malzemelerin türev formları da pek çok bilimsel çalışmada yer bulmaktadır (Holmannova vd. 2022).



Şekil 2.4 Yaygın kullanılan karbon nanomalzemeler (Holmannova vd. 2022)

- a. Grafen
- b. Tek duvarlı karbon nanotüpler (SWCNT)
- c. Çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT)
- d. Fulleren

Fullerenler: Karbon temelli başlıca nanopartikül fullerendir. Karbon temelli nanopartiküller, pentagonal veya hegzagonal tipte birbirilerine bağlanan karbon atomları küre veya elips şekilli görünebilmektedir. Fullerenler içerdiği karbon sayısına göre iki farklı izomere (C60 ve C70) sahiptir. Daha kararlı yapıda olduğundan C60 daha çok tercih edilmektedir (Şekil 2.4.d) (Holmannova vd. 2022, Pilehvar ve Wael 2015).

Fullerenler düşük yoğunluğa ve yüksek kaynama noktasına sahiptir. Ayrıca uelektrokimyasal kararlılık, yüksek elektriksel ve termal iletkenlik özellikleri göstermektedir. Hidrofobik özellik gösteren fullerenler, yüzey modifikasyonlarında sıklıkla kullanılır. Fullerenlerin diğer uygulama alanları arasında organik foto-voltaik malzemeler, antioksidanlar ve ilaç hammaddeleri sayılabilir. Ayrıca bazı medikal uygulamalarda ve su arıtma sistemlerinde kullanılmaktadır. Kimyasal aktivitesi ve kararlılığı sebebiyle katalist olarak enerji sistemlerinde ve elektronik uygulamalarda da kullanılır. Fullerenler, saf halde kullanılabildiği gibi, fullerenin bazı polimerlerle oluşturduğu kompozit yapıların da farklı uygulama alanları bulunmaktadır (Pilehvar ve Wael 2015).

Fullerenin silindirik biçimli versiyonu olan karbon nanotüpler de nanoteknolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Fulleren biyosensörleri hakkında yapılan en önemli çalışmalar Pilehvar ve Wael tarafından 2015 yılında derlenmiştir. Bu çalışmada fulleren C60 yapısının avantajları ve özellikle biyolojik materyallerin analizindeki yaygın kullanımı konu edilmiştir. Bahsedilen çalışmalardan biri Zhang ve çalışma arkadaşları tarafından 2010 yılında dopamin analizi için geliştirilen fulleren temelli biyosensörüdür. Bu amaçla ssDNA (single stranded DNA, tek sarmallı DNA) reseptörü kullanılmıştır. GCE, FNT (fulleren C60 nanotüp) ve DNA ile hazırlanan biyosensörü ile $pH \geq 7,0$ ortamında yapılan dopamin analizlerinde gözlenebilme sınırı $0,6 \mu M$ ve doğrusal çalışma aralığı $2-160 \mu M$ bulunmuştur (Zhang vd. 2010).

Bir diğer fulleren C60 biyosensörü, anti-Hb reseptörü kullanılarak hemogloblin analizi için geliştirilmiştir. Pan ve Shih tarafından 2004 yılında piezoelektrik kuartz kristal analiz sistemi kullanılarak yapılan çalışmada, fulleren ve anti-Hb reseptörü ve kuartz kristali ile hazırlanmış

biyosensör kullanılarak hemoglobinin gözlenebilme sınırı $<10^{-4}$ mg/mL, duyarlık ise $1,56 \times 10^4$ Hz/(mg/mL) olarak belirlenmiştir (Pan ve Shih 2004).

Saeedfar ve ekibinin 2013 yılında gerçekleştirdiği bir çalışmada üreaz enzimi immobilize edilen bir fulleren C60 biyosensörü ile kanda potansiyometrik üre analizi yapılabilmektedir. Perde baskılı elektrot sistemlerine fulleren C60 ve üreaz enzimi immobilize edilerek hazırlanan elektrodun yüzeyi poli(n-butil akrilat, PnBA) ile kaplanmıştır. Üre için pH 7,0'de ve 0,5 mM derişimdeki tampon ortamında elde edilen kalibrasyon grafiklerinden doğrusal çalışma aralığı $2,31 \times 10^{-3}$ - $8,28 \times 10^{-5}$ M ve duyarlık $59,67 \pm 0,91$ mV/dec olarak bulunmuştur (Saeedfar vd. 2013).

Chuang ve Shih 2001 yılında fulleren temelli bir glukoz biyosensörü geliştirmek için fulleren C60, piezoelektrik kuartz kristali ile birlikte glukoz oksidaz (GOx) enzimi kullanmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda gözlenebilme sınırı $3,9 \times 10^{-5}$ M olarak belirlenmiştir. Biyosensörün pH 7,0 ve 30°C çalışma ortamında, 93 günlük kullanımı sonrasında verdiği cevabı % 83 koruduğu görülmüştür. Literatürdeki geleneksel kan şekeri analizlerine göre oldukça düşük bir gözlenebilme sınırı elde edilebilmiştir (Chuang ve Shih 2001).

Gugoasa ve çalışma arkadaşları tarafından 2014 yılında fulleren temelli bir biyosensör geliştirilerek kan numunelerinden epinefrin ve norepinefrin analizi yapmak hedeflenmiştir. Bunun için fulleren C60 ile birlikte dsDNA (double stranded DNA, çift sarmallı DNA) reseptörü immobilize edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre epinefrin için gözlenebilme sınırı $0,1 \mu\text{M}$ ve doğrusal çalışma aralığı 10^{-6} - 10^{-2} M bulunmuştur. Norepinefrin için ise gözlenebilme sınırı $2,3 \mu\text{M}$ ve doğrusal çalışma aralığı 10^{-5} - 10^{-2} M bulunmuştur (Gugosa vd. 2014).

Çalışmada geçen tüm deneysel veriler göz önünde bulundurulduğunda görülmüştür ki, fulleren hem biyolojik analitlerin tayininde sıklıkla tercih edilmekte ve düşük gözlenebilme sınırlarına inilebilmesi, kullanım kolaylığı gibi sebeplerden geleneksel elektrokimyasal analiz yöntemlerine uygun bir alternatif oluşturmaktadır.

Tek ve Çok Duvarlı Karbon nanotüpler (SWCNT ve MWCNT): Karbon nanotüpler (CNT), nanometre çapında silindirik boru şekilli yapılara sahip olan ve grafen levhaların yuvarlanmasıyla oluşturulan nanopartiküllerdir. Karbon nanotüpler, grafen tabakalarındaki katmanların sayısı baz alınarak tek ve çok duvarlı karbon nanotüpler olarak ikiye ayrılır (Anazawa vd. 2002).

Karbon nanotüpleri sentezlemenin en sık kullanılan yöntemleri arasında kimyasal buhar biriktirme (CVD), ark deşarjı ve darbeli lazer ablasyonu yer alır. Kimyasal buhar biriktirme yöntemi ile CO₂ veya C₂H₂, C₂H₄ ve diğer hidrokarbonlar gibi karbon içeren öncü gazlar kullanılarak gerçekleştirilir. CVD sırasında sıcaklık 350–1000 °C civarındadır. Reaksiyon süresi, sıcaklık, katalizör parçacık boyutu veya reaksiyon gazının tipi/hızı gibi çeşitli parametreler, elde edilecek olan karbon nanotüp malzemenin kalitesini etkiler (Anazawa vd. 2002).

Ark deşarj yöntemi ise, katot ve anot elektrotları olarak kullanılan iki grafit çubuğun kullanımına dayanmaktadır. Doğru akım ark voltajı, inert bir gaz olan helyuma daldırılmış elektrotlara uygulanır. Bu yöntem ile fullerenler ve CNT'ler sentezlenir (Anazawa vd. 2002).

Karbon nanotüpler üstün mekanik, elektriksel ve termal özellikler göstermesinin yanı sıra, yüksek saflık, hidrofobiklik, biyolojik materyaller ile uyumluluk, geniş yüzey alanı ve sensör tasarımlarında çok önemli olan destek yapı malzemesi görevi görebilme özelliği taşımaktadır. Enzim ve benzeri biyolojik materyallerin immobilize edilmek istendiği sistemlerde daha fazla yüzey alanı tercih edildiğinden, MWCNT daha fazla tercih edildiği görülmektedir. Sağladıkları avantajlar nedeniyle CNT malzemelerin bilimsel araştırmalarda kullanıldığını sıkça görmekteyiz.

CNT kullanılan biyosensör çalışmalarının yer aldığı bir çalışma Feng ve Ji tarafından 2011 yılında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada farklı tip karbon nanotüplerin, tek ya da çok duvarlı karbon nanotüplerin (SWCNT ya da MWCNT) kullanıldığı, enzim immobilize edilmiş biyosensörlerin performans karşılaştırması yapılmıştır (Feng ve Ji 2011).

Dalkıran ve çalışma arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada GalOx/Co₃O₄/MWCNT/GCE ve GalOx/Co₃O₄/Gr/GCE biyosensörü tasarlanmış, serum numuneleri üzerinde amperometrik ölçümler alınarak performans değerlendirmesi yapılmıştır. GalOx/Co₃O₄/MWCNT/GCE ve GalOx/Co₃O₄/Gr/GCE biyosensörü için elde edilen sonuçlara göre ise galaktoz için gözlenebilme sınırı 0,9 µM ve doğrusal çalışma aralığı 9,0×10⁻³-1,0 mM bulunmuştur. Aynı çalışmada grafen için alınan sonuç ile karşılaştırıldığında MWCNT ile alınan sonucun daha yüksek performanslı olduğu görülmüştür (Dalkıran vd. 2016).

Tkac ve ekibinin 2007 yılında yaptığı bir çalışmada SWCNT kullanarak galaktoz biyosensörü geliştirmek istenmiştir. Glutaraldehit (Glu) ve kitosan (Chit) kullanılarak galaktoz oksidaz enziminin immobilizasyonu sağlanmış, GalOx/Glu/Chit/SWCNT/GCE modifiye elektrodu geliştirilmiştir. Kan numuneleri üzerinde yapılan ölçümlerde gözlenebilme sınırının 25,0 µM değerine kadar düştüğü görülmüştür. Modifiye GCE elektrodun duyarlılığı ise 1126,0 nA/mM olarak belirlenmiştir (Tkac vd. 2007).

Radoi ve çalışma arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada SWCNT kullanılarak probiyotik yoğurt numunelerinden laktoz tayini yapılmak istenmiştir. Bunun için laktat dehidrojenaz (LDH) ve variamin mavisi (VB) kullanılarak LDH/SWCNT/VB/NF modifiye elektrotları elde edilmiştir. Yoğurt numunelerinde analitik uygulanabilir olduğu belirlenmiştir. Yapılan ölçüm sonuçlarına göre doğrusal çalışma aralığı 2×10⁻⁴-1×10⁻³ M olarak belirlenmiştir (Radoi vd. 2010).

Zhang ve çalışma arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada ise MWCNT kullanılarak paraokson* tayininde kullanılacak biyosensör sistemi tasarlanmıştır (*kolinesteraz inhibitörü olarak görev yapan bir parasempatik sinir sistemi uyarıcısıdır). Bunun için asetilkolin esteraz (AChE), organofosfat hidrolaz (OPH) ve polietilen imin (PEI) kullanılarak AChE/OPH/MWCNT/PEI-DNA biyosensörleri geliştirilmiştir. Dönüşümlü voltammetri tekniği kullanılan çalışmada gözlenebilme sınırının 0,5 µM olduğu görülmüştür (Zhang vd. 2015).

Chauhan ve ekibinin 2011 yılında yaptığı bir diğer çalışmada ise c-MWCNT kullanılarak klorprifos** tayininde kullanılmak üzere bir biyosensör geliştirmek istenmiştir (**asetilkolin esteraz enzimini inhibe ederek canlıların sinir sistemine zarar veren organofosfat yapılı bir insektisittir). Fe₃O₄ ve Au np kullanılan AChE/Fe₃O₄/c-MWCNT/Au biyosensöründen elde edilen kronoamperometrik ölçüm sonuçları incelendiğinde 0,1 nM gözlenebilir sınıra ulaşılmıştır. Özellikle süt ve su numunelerinde analizin yüksek doğrulukla yapılabildiği görülmüştür (Chauhan vd. 2011).

CNT materyaller özellikle biyo-uyumlulukları nedeniyle biyosensör çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Bu tez çalışmasında MWCNT ve karboksilli MWCNT (c-MWCNT) kullanılarak tek kullanımlık perde baskılı elektrotlar modifiye edildi.

Grafen ve grafen oksit: Grafen karbon atomlarının iki boyutlu, altıgen bal peteği düzeninde, oldukça ince bir grafit tabakasıdır (Şekil 2.4.a). Grafenin endüstriyel üretimi için en yaygın kullanılan prosesler, ham grafitin kimyasal veya plazma tabakalar halinde dökülmesini, doğal grafitten mekanik olarak parçalanmasını, kimyasal buhar birikimini veya silisyum karbürün silikon yüzeyinde grafenin epitaksiyel büyümesini (epitaksiyel büyüme: taban malzemenin kristal yapısını bozmadan aynı kristal yapıyı devam ettirerek film oluşturmak) içerir. Karbon nanotüpleri açarak veya fullerenin buharlaştırılması yoluyla da türevlerinden olan grafeni üretmek mümkündür (Bahamonde vd. 2018).

Elektrokimyasal analizlerde en sık kullanılan karbon nanomalzemeler grafit ve grafendir. Ayrıca grafenin türevleri olan grafen oksit (GO), indirgenmiş GO (rGO) ve daha yeni bir teknoloji olan grafen kuantum nokta (graphene quantum dots, GQDs) da elektrokimyasal analizlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Grafen oksit, grafenin oksidasyonu ile hazırlanır. Grafen oksitin indirgenmesi ile de indirgenmiş grafen oksit malzeme elde edilir. Bu işlemlerde, grafen oksitleyici protonlanmış çözücüler (nitrik asit, sülfürik asit, fosforik asit veya bu asitlerin karışımları) ve KMnO₄ kullanılır, bu da karboksil ve hidroksil gruplarının grafene kovalent bağının oluşmasıyla sonuçlanır (Suvarnaphaet ve Pechprasarn 2017, Bedeloğlu vd. 2016).

Grafen ve türevleri, nanoteknolojinin diğer pek çok alanında olduğu gibi biyokimyasal analizlerde ve biyosensör teknolojilerinde sıklıkla tercih edilmektedir. Grafen ve türevlerinin kullanıldığı bazı sensör çalışmaları Suvarnaphaet ve Pechprasarn tarafından 2017 yılında yayınlanmış, bu çalışmada aynı yıl yayınlanmış pek çok farklı sensörün performans karşılaştırması yapılmıştır. Bu çalışmalardan biri Xu ve çalışma arkadaşları tarafından 2017 yılında yapılmıştır. Grafen temelli bir dizi elektrot hazırlanarak GFET tekniği (grafen tabanlı alan etkili transistör) kullanılarak DNA analizi hedeflenmiştir. Elde edilen sonuçlarda gözlenebilme sınırının 10 pM değerine kadar düşürülebildiği görülmüştür.

Rahman ve ekibi 2017 yılında Ag-MoS₂-grafen tasarımına sahip bir DNA sensörü geliştirmiştir. Fiber optik SPR tekniği (SPR: yüzey plazmon rezonans) uygulanan çalışmada DNA analizlerinde gözlenebilme sınırı 1 µM bulunmuştur (Rahman vd. 2017).

Bir diğer çalışmada ise Khadija ve çalışma arkadaşları (2017) grafit oksit (GpO)/Cu/Ag np elektrodu ile glukoz tayini yapmışlardır. FET (alan etkili transistör) tekniği kullanılan çalışmada glukozun alt tayin sınırı 1 µM olarak bulunmuştur. Böylelikle glukozun geleneksel elektrokimyasal analiz yöntemlerine alternatif oluşturulmuştur (Khadija vd. 2017).

Esteban ve ekibinin 2017 yılında yaptığı bir çalışmada ise üreaz enzimi immobilize edilen indirgenmiş grafen oksit (rGO) temelli bir biyosensör geliştirilerek üre analizi yapılmıştır. FET (alan etkili transistör) tekniğinin kullanıldığı çalışmada üre için gözlenebilme sınırı 1 µM olarak belirlenmiştir (Esteban vd. 2017).

Xu ve çalışma arkadaşlarının 2019 yılında yaptığı bir diğer çalışmada ise, grafen oksit ve türevleri (GO, rGO ve GQDs) kullanılarak prostat kanserinin erken dönem biyo-belirteci olduğu düşünülen bir proteinin analizi yapılmıştır. Çalışmada GO, rGO ve GQDs modifiye edilmiş bir dizi elektrodun, metilen mavisi, Au np ve DNA aptameri ile tasarımı tamamlanmıştır. FET tekniği kullanılan çalışmada kanserli yapıların diğerlerinden bu yöntem ile ayrıştırılabildiği görülmüştür (Xu vd. 2019).

Grafit, grafen ve türevi karbon nanomalzemelerin gösterdiği üstün fiziksel özelliklere ek olarak biyo-uyumlulukları sebebiyle de bilimsel literatüre olan etkileri oldukça fazladır.

2.3.2 Metalik ve metal oksit nanopartiküller

Metalik ve metal oksit nanopartiküller son yıllarda kullanımını oldukça yaygınlaştırmış, özellikle biyokimyasal analizlerde büyük bir uygulama alanına sahip olmuştur. Metalik nanopartiküller benzersiz termal, spektral ve optik özellikleriyle ve makro eşdeğerlerine göre üstün fiziksel özellikler (yüksek yüzey-hacim oranları, kullanım ve uygulama kolaylığı vb.) sunmaktadırlar. Metalik nanopartiküllerin bu üstün özellikleri, *biyoanalitlerin* spesifik ve yüksek hassasiyette tayin edilmesine izin vermiş, böylelikle yüksek duyarlılıkta ve geniş doğrusal çalışma aralığında uygulanabilen biyosensörlerin geliştirilmesini sağlamıştır. Bunlara ek olarak, floresans, IR ve Raman spektrometrisi vb. yöntemler de metal nanopartiküllerin uygulama alanlarındandır (Doria vd. 2012).

Farklı şekillerde olabilen metalik ve metal oksit nanopartiküllerin tanecik çapı 1-100 nm arasında değişkenlik gösterir. Ayrıca soy ve ağır metaller gibi pek çok inorganik bileşikten oluşabilirler (Doria vd. 2012). En yaygın tercih edilen metalik nanopartiküller arasında, soy metal nanopartikülleri, platin (PtNP), altın (AuNP) ve gümüş (AgNP) nanopartiküller; ayrıca metaloksit nanopartiküller olan ZnO, Fe₂O₃, Fe₃O₄, Co₃O₄, SnO₂, TiO₂ sayılabilir (Doria vd. 2012).

Biyosensörlerde metalik ve metal oksit nanopartiküllerin kullanılmasının başlıca nedeni biyosensörün elektriksel iletkenliğinin artırılmasıdır. Bu tez çalışmasında Co₃O₄ nanopartikül (Co₃O₄NP) kullanımı tercih edildi. Bunun nedeni Co₃O₄NP'nin biyosensöre sağladığı elektro aktiflik ve katalitik etki gibi performans iyileştirici elektrokimyasal özellikleri yanı sıra ulaşılabilir olmasıdır (Doria vd. 2012).

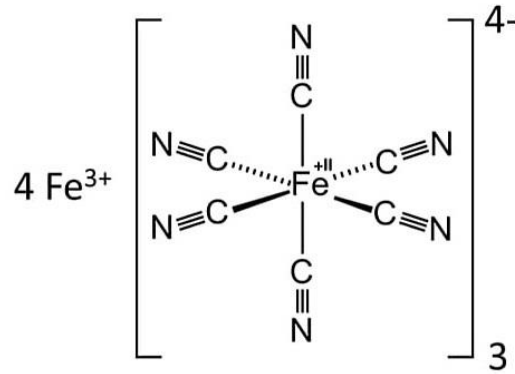
Co₃O₄NP kullanılarak etkisinin belirlenmek istendiği bir çalışma Raouf ve ekip arkadaşları tarafından 2013 yılında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Co₃O₄

nanopartikülün kullanıldığı ve kullanılmadığı iki farklı tip (MWCNT/GCE ve Co₃O₄NP/MWCNT/GCE) modifiye camı karbon elektrot tasarlanmıştır. SEM ile yüzey görüntülemeleri yapılmış, Co₃O₄NP/MWCNT/GCE elektrodu için Co₃O₄ nanopartikülün MWCNT boşluklarına homojen olarak dağıldığı görülmüştür. Aynı zamanda Co₃O₄ nanopartikülün elektrot yüzeyine farklı miktarlarda modifiye edilerek yarattığı etkideki doğrusallık görülmek istenmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde Co₃O₄ nanopartikülün miktarı arttıkça O₂ gazı sarfi üzerinden belirlenen enerji tasarrufu artmış, ayrıca Co₃O₄NP/MWCNT/GCE elektrodu Co₃O₄ nanopartikülün olmadığı diğer modifikasyondaki elektroda göre daha yüksek dayanıklılık ve kararlılık göstermiştir (Raouf vd. 2013).

İlgili literatür çalışmasından ve yapılan ön denemelerden de gözlendiği gibi, Co₃O₄NP'nin modifiye edildiği sensörlerde performans faktörlerinde iyileşme gözlenmektedir.

2.4 Prusya Mavisi

Prusya mavisi (PM), kimyasal adlandırması ferrik hekzasiyanoferrat olan, kapalı formülü C₁₈Fe₇N₁₈ (molekül ağırlığı 859,239 g/mol) olan, genellikle Fe₄[Fe(CN)₆]₃ şeklinde gösterilen, parlak lacivert renkli, pek çok inorganik çözücüde çözünebilen inorganik polikristalin yapıya sahip bir katıdır. Prusya mavisi Şekil 2.5'te gösterilen molekül yapısına sahiptir.



Şekil 2.5 Prusya mavisinin üç boyutlu gösterimi

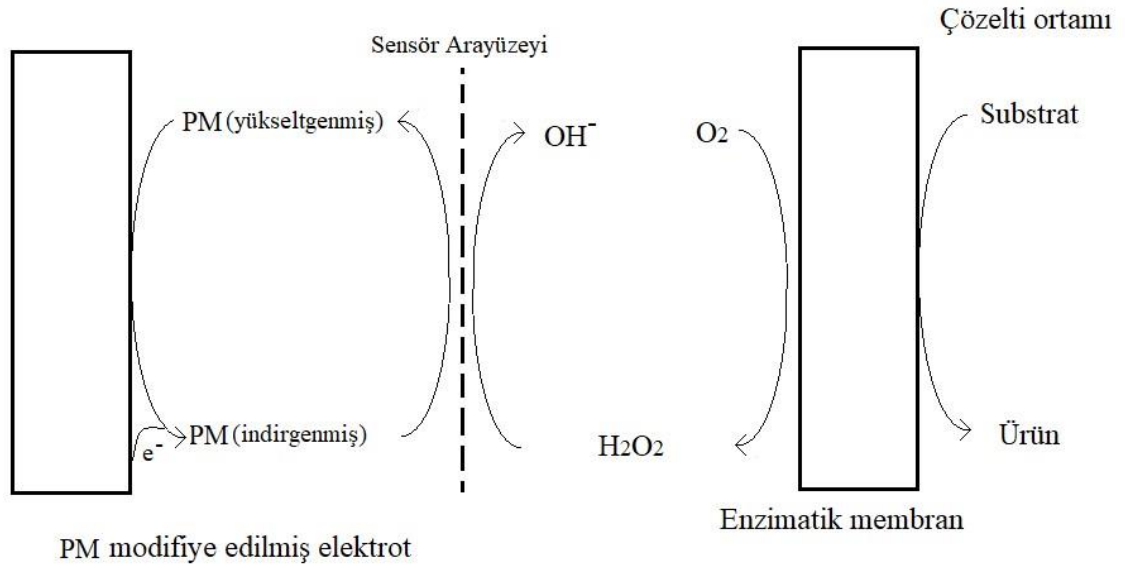
Bilinen en eski koordinasyon malzemelerinden olan prusya mavisi, pek çok elektrokimyasal çalışmada çalışma ortamının potansiyelini düşürücü rol üstlenmektedir (Karyakin 2000). Prusya mavisi gibi metal hekzasiyanoferratlara dayalı tasarlanan kimyasal ve biyolojik sensörler pek çok üstünlüğe sahip olmaktadır.

Prusya mavisinin kullanıldığı ilk sensör çalışması, Karyakin ve çalışma arkadaşlarının 1994 yılında geliştirdiği PM modifiye edilmiş H₂O₂ (peroksit) sensörüdür. Camsı karbon elektrodun kullanıldığı, +180 mV potansiyelde, galvanostatik biriktirme yolu ile tasarlanan biyosensör için gözlenebilme sınırı 1,0 µM ve doğrusal çalışma aralığı 1,0-10⁻³ µM bulunmuştur.

Bir diğer çalışmada Moscone ve ekip arkadaşları 2001 yılında karbon pasta elektroda PM modifiye ederek H₂O₂ (peroksit) sensörü tasarlamışlardır. Grafit tozunun kimyasal biriktirme yöntemi ile elektrot tasarımı tamamlanan çalışmada karıştırılmış yığın amperometri (stirred batch amperometry) yöntemi ile gözlenebilme sınırı 0,25 µM bulunmuştur. Ayrıca doğrusal çalışma aralığı 0,25-200 µM olarak belirlenmiştir (Moscone vd. 2001).

Ricci ve çalışma arkadaşları ise 2003 yılında grafit tabanlı perde baskılı elektrotlara PM modifiye ederek, karıştırılmış yığın amperometri (stirred batch amperometry) yöntemi ile H₂O₂ (peroksit) için gözlenebilme sınırı 0,3 µM ve doğrusal çalışma aralığı 0,5-10⁻³ µM bulunmuştur (Ricci vd. 2003).

Prusya mavisi peroksit duyarlı çalışmalar haricinde, pek çok biyosensör tasarımında medyatör olarak kullanılmaktadır. Medyatör olarak modifiye edildiği bir elektrodun çözelti ortamındaki davranışı da Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6 Medyator olan prusya mavisinin çözelti ortamındaki davranışı

2.5 Biyojenik Aminler

Biyojenik aminler (BA), özellikle bakteriler tarafından aminoasitlerin dekarboksile olması ile oluşan düşük molekül ağırlıklı, bazik yapılardır. Bakteriler haricinde pek çok mikroorganizmanın yaşamsal aktivitesi sonucu biyojenik aminler oluşmaktadır (Toy vd. 2010).

Biyojenik aminler farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Kimyasal yapıları göz önünde bulundurularak sınıflandırıldıklarında,

- Alifatikler: kadaverin (kad), putresin (put), spermin (spm), spermidin (spd)
- Aromatikler: tiramin (trm), β -feniletilamin (fea)
- Heterosiklikler: histamin (his), triptamin (trp)

İçerdikleri amin grubunun sayısı göz önünde bulundurularak sınıflandırıldıklarında ise,

- Monoaminler (tek amin grubu içerenler): trm, fea
- Diaminler (iki amin grubu içerenler): put, kad
- Poliaminler (üç ve daha fazla amin grubu içerenler): spm, spd

Poliaminler sırasıyla 3 ve 4 amin grubu içeren spermidin ve spermindir (Linares vd. 2011). En çok bilinen biyojenik amin vücutta da üretilen histamindir. Histamin ayrıca beslenme yoluyla fazla alındığında sebep olduğu alerjik etkilerle de bilinmektedir. Gıdalardaki varlığı bilinen başlıca biyojenik aminler his, put, kad, trm, trp, fea, spm ve spd'dir (Erim 2013).

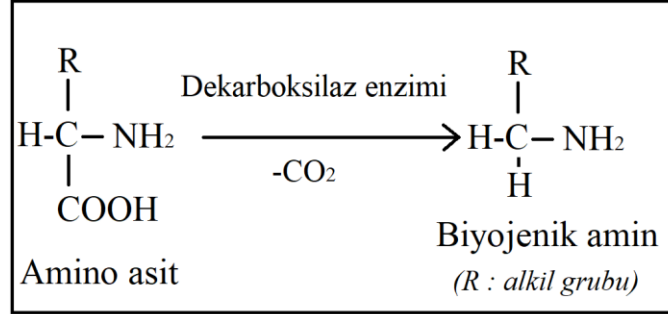
Biyojenik aminlerin canlıların metabolizmasında pek çok önemli görevi olduğu bilinmektedir. Özellikle nükleik asitlerin oluşumunda ve protein sentezlenmesinin ilk basamağında biyojenik aminler rol almaktadır. Ayrıca hormonların oluşumunda da biyojenik aminler görev almaktadır. Canlı hücrelerin önemli bileşenlerinden olan putresin, spermin ve spermidin, immün sistemde ve metabolik fonksiyonların devamlılığında kilit rol oynarlar (Çolak vd. 2002).

Biyojenik aminler tüm canlıların metabolizmasında doğal olarak bulunmaktadır. Ancak biyojenik aminler beslenme yoluyla da alınabilmektedir. Gıdadaki biyojenik amin içeriği ve miktarı ilgili gıdaya uygulanan ısıl işleme, ambalaja ve depolama koşullarına bağlı olarak oluşan bakterilere vb. bağlıdır (Halasz vd. 1994). Gıdalardaki bozulmaların en önemli belirteci olarak kullanılmalarından ötürü, gıdalardaki biyojenik amin miktarlarının tayin edilmesi kalite kontrol prosesleri için büyük önem taşır (Erim 2013).

Biyojenik aminler özellikle fermente ürünlerde, içeceklerde, şarküteri ürünlerinde, balık ürünlerinde ve bazı işlenmiş ürünlerde bulunmaktadır. Beslenme yoluyla yüksek miktarda biyojenik amin tüketildiğinde toksik etkiler gözlenmektedir. Bazı biyojenik aminler oldukça ciddi gıda zehirlenmelerine sebep olup sağlık açısından risk oluşturmakta, bazı biyojenik aminler ise bir gıdadaki bozulmaya işaret eden belirteç olarak kullanılabilir (Lehane ve Olley 2000, Kim vd. 2009). Biyojenik aminlerin yüksek miktarda tüketilmeleri durumunda ayrıca, kan basıncının artması, damarların daralması ve noradrenalin miktarının artışı gibi fizyolojik bulgulara da rastlanmaktadır (Akmeşe 2015). Steril olmayan koşullara bağlı olarak gelişen gıda bozulmalarında sürecin aydınlatılmasını sağlayabildikleri için, gıda endüstrisinde biyojenik aminlerin tayin edilmesi büyük önem taşımaktadır (Lata vd. 2011).

2.5.1 Biyojenik amin oluşum mekanizması

Tüm canlı organizmalardaki doğal metabolik aktivitenin ürünü olan biyojenik aminler, mikroorganizma veya bakterilere ait enzimlerle serbest amino asitlerin dekarboksilasyonu ile oluşmaktadır (Shalaby 1996) (Şekil 2.7). Biyojenik aminler, ilgili aminoasitlerde bulunan α -karboksil grubunun yaygın olarak enzimler yoluyla yapıdan uzaklaşması ile oluşur. Gıdalarda, olgunlaşma ve depolama işlemleri sırasında proteinlerin biyokimyasal süreçlerinden sonra oluşan ornitin, dekarboksile olarak putresine dönüşür. Ortamdaki putresinden ise daha uzun zincirli poliaminler olan spermidin ve spermin meydana gelir. Arjinin agmatine, histidin histamine, tirosin tiramine, lizin kadaverine ve triptofan triptamine dönüşür (Shalaby vd. 1996). Söz konusu gıdanın yapısı ve gıdadaki organizmalara bağlı olarak, mevcut serbest amino asitlerin dekarboksilasyonu ile de biyojenik aminlerin miktarında artma gözlemlenebilir ve bu biyojenik aminin miktarı değişebilir. (Brink vd. 1990).



Şekil 2.7 Biyojenik aminlerin amino asitlerden genel oluşum şeması

Fermente edilmiş gıdalar, bazı alkollü ve alkolsüz içecekler, şarküteri ürünleri gibi gıdalar biyojenik amin içerirler. Fermentasyon işleminde, mevcut mikroorganizmalar gıdaların içeriğinde olan miktardan fazla biyojenik amin üretirler. Bu sebeple fermente gıdalarda çok daha fazla biyojenik amin bulunur (Karahan vd. 2003).

Gıdalarda biyojenik amin oluşumunda, canlı organizmaların dekarboksilaz enziminin aktivitesini etkileyen asitlik, ortam sıcaklığı ve tuz miktarı gibi bazı faktörler önemlidir.

Biyojenik aminler, gıdanın kalitesi ile yakından ilgilidir. Gıdalardaki amin derişimi o gıdanın içinde bulunduğu hijyen koşullarından etkilenmekte ve gıdanın depolanması veya işleme tabi tutulması esnasında da artabilmektedir. Bu nedenlerle gıdaların kalite kontrol süreçlerinde biyojenik aminlerin nicel analizi önem kazanmaktadır (Shalaby vd. 1996). Gıdalarda ilk kez biyojenik aminler oluşmaya başladıktan sonra bu durumu değiştirmek çok zordur. Özellikle his, trm, put, kad, spm ve spd gıdalarda bozulma belirteci olarak kullanılan biyojenik aminlerdendir (Karahana vd. 2003). Çeşitli gıdalarda doğal olarak bulunan veya gıdaların bozulması ile oluşan biyojenik aminlerden bazıları Çizelge 2.1’de verildi.

Çizelge 2.1 Bazı gıda ürünleri ve biyojenik amin içerikleri

	Histamin	Tiramin	Putresin	Kadaverin	Spermin	Spermidin	Triptamin	Fenil etil amin
Beyaz et ürünleri	++	+	+	+	+	+	+	+
Kırmızı et ürünleri	+	+	+	+	+	+	+	+
Peynir	+	++	+	+			+	+
Şarap	+	++	++	+		+		+
Bira ve malt içecekleri	+				++	++		+
Meyve suları	+	+	++				+	+
Süt ve süt ürünleri	+	+	+	+	+	+	+	+

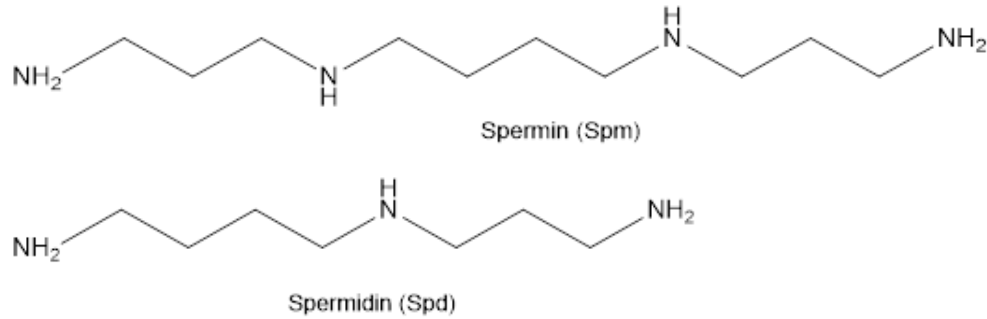
İnsan vücudunda belirli bir miktardan fazla biyojenik aminin bulunması durumunda şiddetli baş ağrıları, hipotansiyon veya hipertansiyon ve pek çok alerjik reaksiyon gözlenir. Biyojenik amin kaynaklı zehirlenmelerden en yaygın olanı histaminden ve tiraminden kaynaklı olanlardır. Gıdalarda bulunması kabul edilen histaminin 1-10 mg/kg aralığında olması gerektiği belirlenmiştir (Alper vd. 2001). Tiramin beslenmeden kaynaklı oluşan migren ağrılarının ve ani yükselen tansiyonun tetikleyicisi olarak öne

çıkılmaktadır (Alper vd. 2001). Tiraminin; 10-80 mg arası alınması durumunda vücutta şişmeler, 100 mg'dan daha fazla alınması durumunda şiddetli baş ağrısı veya migren atağına sebep olduğu kanıtlanmıştır (Erginkaya vd. 1989, Kalac vd. 1999).

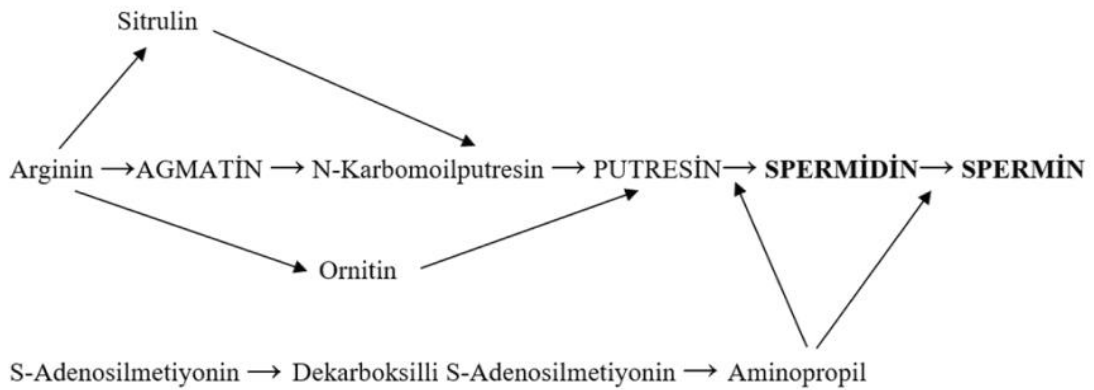
Diğer biyojenik aminler için ise kesin sınırlar belirtilmemiştir. Bunun sebebi, alınan gıdanın türü, miktarı ve gıdadaki biyojenik aminin içeriği gibi faktörlerin limit belirleme işlemini zorlaştırmasıdır (Alper ve Temiz 2001, Önal 2007).

2.5.2 Spermin ve spermidin tayininin önemi

Biyojenik aminlerden, Şekil 2.8'de yapıları verilen, spermin (N, N'-bis(3-aminopropil)bütan-1,4-diamin) ve spermidin (N'-(3-aminopropil)bütan-1,4-diamin) biyojenik poliaminler grubunda yer alır (Rawat vd. 2017). Spermin ve spermidin esansiyel aminoasitlerden argininin ya da agmatinin parçalanması ile oluşur. Bu parçalanma birkaç farklı şekilde yol izleyebilmektedir (Önal 2007) (Şekil 2.9).



Şekil 2.8 Spermin ve spermidinin molekül yapıları



Şekil 2.9 Spermin ve spermidinin oluşumu/biyosentezi (Önal 2007)

Spermin ve spermidin de diğer biyolojik aminler gibi gıdaların bazılarında doğal olarak bulunabildiği gibi, bazı gıdalarda ise olumsuz saklama koşulları veya meydana gelen gıda bozunmalara bağlı olarak artabilmektedir. Spermin ve spermidinin bulunduğu bazı gıdalar Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2.2 Bazı gıda örneklerinde spermin ve spermidin içerikleri

Gıda Örnekleri	Spermin	Spermidin
Beyaz et ürünleri	+	+
Kırmızı et ürünleri	+	+
Peynir	-	-
Portakal suyu	+	-
Süt ve süt ürünleri	+	+
Şarap	+	+
Bira ve malt içecekleri	++	++

Spermin ve spermidin, canlı bünyesindeki ökaryotik hücrelerde doğal olarak bulunabilmekte, ayrıca hücre büyümesinde ve çoğalmasında da önemli rol oynamaktadır. Canlı vücudunda belirlenen spermin ve spermidin miktarlarındaki artış, pek çok kanser türünde tümör büyümesinin izlenmesinde biyomarker olarak kullanılabilir. Spermin ve spermidin seviyelerindeki artışın, özellikle bazı kanser türleri (prostat gibi) ile ilişkili biyolojik süreçlerin göstergesi olduğu görülmüştür (Rawat vd. 2017, Giskeodegard vd. 2013).

Literatürde spermin ve spermidin tayininde kullanılmak için geliştirilen biyosensörlere dair çalışmalar sınırlı sayıda kalmaktadır. Spermin ve spermidin tayininin hızlı ve ekonomik şekilde gerçekleştirilebilmesi pek çok açıdan büyük önem taşımaktadır.

2.5.3 Biyojenik aminlerin geleneksel tayin yöntemleri

Gıdalardaki biyojenik aminlerin tayinini önemli hale getiren iki neden vardır. Birincisi vücuda alınma miktarına bağlı olarak toksisite potansiyeline sahip olmaları; ikincisi ise gıda kalitesine dair önemli işaretçiler olmalarıdır. Biyojenik amin analizlerinin en önemli uygulamaları hammadde ve ürünlerin kalitelerinin belirlenmesi, özellikle fermante gıdalarda üretim süreçlerinin kontrolü ve ilgili araştırma-geliştirme çalışmalarıdır (Önal 2007).

Analizcilerin standartlaştırıp, kesinliğini ve doğruluğunu kesinleştirdiği, biyolojik materyaller ile uyum gösteren pek çok analitik yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler olmadan biyojenik amin miktarının ve limitler içerisinde olup olmadığını belirlemek olası değildir (Shalaby vd. 1996). Gıdalardaki biyojenik aminlerin nicel analizi için kullanıldığı bilinen ilk teknik ince tabaka kromatografi (TLC) yöntemidir. Son yıllarda kromatografik ve spektrofotometrik yöntemlere ek olarak ELISA ve elektroforez gibi daha gelişmiş nicel analiz yöntemleri de bu amaçla kullanılmaya başlanmıştır (Alper vd. 2001).

Gıdalarda bulunan biyojenik aminlerin nitel ve nicel olarak belirlenmesinde en yaygın tercih edilen yöntem ters faz sıvı kromatografisidir (RP-HPLC). Farklı dedeksiyon sistemleri entegre edilmiş yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) tekniği de oldukça yaygın kullanılmaktadır. Bu entegre sistemlerden bazıları HPLC/MS, HPLC/UV ve HPLC/floresans spektroskopisi yöntemleridir (Erim 2013). Gıdalarda biyojenik amin miktarının nitel veya nicel olarak belirlenmesinde kullanılan en kolay teknik ilgili aminoasitlerin analizidir (Simon-Sarkadi ve Holzapfel 1994). Aminoasitler geleneksel analiz yöntemleri ile belirlendiğinde ortamda türevi biyojenik aminlerin varlığından da söz edilebilir. Kan örneklerinde ve biyolojik doku örneklerinde bulunduğu düşünülen histamini saptamak için pek çok enzimatik analiz tekniği bulunmaktadır. Örneğin ELISA tekniği histaminin nicel analizinde tercih edilmektedir (Stratton vd. 1991).

Biyojenik aminlerin nicel analizi için ayrıca florometriye ek olarak spektrofotometri, elektroforez ve nicel PCR gibi daha gelişmiş ve performans açısından iyileştirilmiş teknikler de vardır (Apetrei vd. 2013). Ancak bu yöntemlerin her birinde maliyet ve uğraş gerektiren ön işlem aşamaları bulunmaktadır. Ayrıca bu ön işlemler analizin toplam süresini uzatmaktadır. Bunun sonucu olarak da rutin analizlerde bu tekniklerin uygulanması, yapılması gereken işlemlerin maliyeti oldukça yükselmektedir.

Ali ve ekibi 2010 yılında HPLC/UV dedeksiyon yöntemi ile gıdalardaki biyojenik amin içeriklerini incelemiştir. Olgun peynir numuneleri ve farklı yağ oranlarına sahip süt ürünlerinde yapılan analizler sonucunda olgun peynir numunelerinde putresin 52,3 mg/kg, spermidin 1,2 mg/kg ve spermin 2,6 mg/kg bulunmuştur. Yağı azaltılmış süt numunelerinde ise ortalama putresin miktarı 1,2 mg/kg ve spermidin miktarı 1,0 mg/kg olarak belirlenmiştir. Süt numunelerinde spermin belirlenmemiştir.

Santiago-Silva ve ekibi 2010 yılında farklı tropik meyvelerde iyon-çifti HPLC (ion-pair HPLC) yöntemi kullanarak biyojenik poliaminlerin analizini yapmak istemiştir. Elde edilen verilere göre mangoda 0,46 (0,20-0,76) mg/100 g spermidin ve 0,22 (0,15-0,34) mg/100 g spermin bulunmaktadır. Ananas 0,70 (0,31-1,63) mg/100 g spermidin ve 0,19 (0,07-0,44) mg/100 g spermin içermektedir. Papaya 0,54 (0,38-0,76) mg/100 g spermidin ve 0,07-0,24 mg/100 g aralığında spermin içermektedir. Guava meyvesi 0,38 (0,11-0,52) mg/100 g spermidin ve 0,42 (0,26-0,75) mg/100 g spermin ihtiva etmektedir. Tropik meyveler arasında poliamin içeriği en yüksek olan çarkıfelek meyvesinde ise 3,05 (1,68-7,42) mg/100 g spermidin ve 2,43 (0,55-7,94) mg/100 g spermin bulunmaktadır (Santiago-Silva vd. 2010).

Giskeodegard ve çalışma arkadaşları 2013 yılında yaptıkları bir çalışmada HR-MAS MRS (HR-MAS MRS; high resolution-magic angle spinning magnetic resonance spectroscopy, yüksek çözünürlüklü-özel açılı dönen manyetik rezonans spektroskopisi) yöntemi ile prostat kanseri gelişmiş doku örneklerindeki spermin ve sitrat miktarının belirlenmesini sağlamışlardır. Elde edilen sonuçlara göre normal dokularda spermin 1,92 (0,86-3,13) mmol/kg ve sitrat 9,87 (5,14-14,32) mmol/kg bulunmuştur. Kanserli

dokularda ise spermin 1,22 (0,66-2,0) mmol/kg ve sitrat 6,41 (3,34-9,46) mmol/kg bulunmuştur (Giskeodegard vd. 2013).

Lu ve çalışma arkadaşları 2022 yılında prostat, akciğer ve meme kanseri geliştiği bilinen dokulardaki hücre içi sıvılarda meydana gelen poliamin artışının belirlenmesi üzerine çalışmalarını yoğunlaştırmıştır. Bu çalışmada optik yöntemler (floresans ve görünür bölge) ve optik olmayan yöntemler (GC, GC-MS, LC-MS, HPLC gibi) kullanılarak putresin, spermin, spermidin ve bu biyojenik aminlerin türevlerinin analizi yapılmak istenmiştir. Ayrıca bu çalışmada yöntemler arası performans karşılaştırması yapılmıştır (Lu vd. 2022). Elde edilen veriler ışığında, GC-MS, LC-MS, HPLC gibi geleneksel elektrokimyasal yöntemlerden diğer yöntemlere göre daha hızlı cevap alınmış, yüksek uygulanabilirlik ve yüksek doğruluk ile sonuç alındığı görülmüştür. Bununla beraber karmaşık cihaz sistemi, yüksek maliyetli ekipman, profesyonelleşmiş analizci gereksinimi, uzun ve karmaşık numune ön deriştirme işlemleri ilgili yöntemlerin dezavantajları olarak göze çarpmıştır.

Geleneksel analiz yöntemleriyle kıyaslandığında elektrokimyasal yöntemler; kullanımı daha basit ekipman, yüksek hassasiyetli ölçümler ve düşük maliyetli olmak gibi pek çok avantaja sunmaktadır ve geleneksel yöntemlere karşı önemli bir alternatif olarak göze çarpmaktadır (Raouf vd. 2013).

2.5.4 Biyojenik amin tayininde biyosensörlerin kullanılması

Biyojenik aminlerin elektrokimyasal tekniklerden yararlanarak gerçekleştirilen nitel ve nicel analizleri, yüksek yükseltgenme potansiyeli taşımaları sebebiyle, geleneksel yöntemlere göre oldukça kısıtlıdır (Hena-Escobar vd. 2015).

Müller ve çalışma arkadaşlarının 2022 yılında yaptıkları bir çalışmada biyojenik aminlerin analizi için geliştirilen farklı modifikasyonlara sahip pek çok biyosensörün performansları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalardan biri Stojanovic ve ekibinin 2016 yılında yaptığı SWCNT-CPE modifiye karbon pasta elektrot ile bira ve şarap

örneklerinde bulunan histaminin tayini çalışmasıdır. CV ve DPV tekniklerinin kullanıldığı çalışmada +1,25 V çalışma potansiyelinde ve 0,1 mol/L pH 6,0'a ayarlanmış fosfat tamponunda çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde doğrusal çalışma aralığının 4,5 -720 $\mu\text{mol/L}$ olduğu görülmüştür. Bağlı standart sapma değeri % 0,48 ile % 3,40 arasında bulunmuştur. Ayrıca histamin için gözlenebilme sınırı (LOD) 1,26 $\mu\text{mol/L}$ ve alt tayin sınırı (LOQ) 3,78 $\mu\text{mol/L}$ olarak belirlenmiştir (Müller vd. 2022).

Bir diğer çalışma Apetrei ve çalışma arkadaşları tarafından 2016 yılında putresin tayini için Ppy-FeCN/CSPE (Ppy: polipirol olmak üzere) biyosensörünün tasarımı yapılmıştır. Ppy-FeCN/CSPE biyosensörü ile dana etinin kurutulması sonrasında elde edilen toz numunesi için yapılan CV analizinden putresin için 0,34 $\mu\text{mol/L}$ gözlenebilme sınırı belirlenmiştir. Histamin için geliştirilen bir diğer modifiye elektrot olan DAO/PtNP/Gr/SPE ise pH 7,4'e ayarlanmış fosfat tamponunda ve +0,4 V çalışma potansiyelinde en iyi performansı göstermiştir. Balık numunelerinde yapılan analiz sonuçları incelendiğinde yüksek bir duyarlık 0,0631 $\mu\text{A/mM}$ elde edilmiştir. Ayrıca DAO/PtNP/Gr/SPE modifiye elektrodu için gözlenebilme sınırı (LOD) $2,54 \times 10^{-8}$ M ve doğrusal çalışma aralığı 0,1-300 μM olarak belirlenmiştir (Apetrei vd. 2016).

Zhao ve çalışma arkadaşları tarafından 2018 yılında gerçekleştirdikleri bir çalışmada, pirinç sirkesi numunesinden tiramin tayini yapmak için OPOAP/GCE (OPOAP: aşırı oksitlenmiş poli(θ -aminofenol) olmak üzere) camısı karbon modifiye elektrodu geliştirilmiştir. CV ve SWV tekniklerinden elde edilen sonuçlara göre 0,054 $\mu\text{mol/L}$ gözlenebilme sınırı (LOD) ile tiramin analizi yapılabilmektedir % (95,6-117,2) arasında değişen geri kazanımlar elde edilen çalışmada 10-200 μM doğrusal çalışma aralığı elde edilmiştir (Zhao vd. 2018).

Allonso-Lomillo ve çalışma arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada monoamin oksidaz (MAO) ve diamin oksidaz (DAO) enzimleri ve HRP ile modifiye ettikleri perde baskılı karbon elektrotları ile farklı gıda örneklerinde bulunan biyojenik aminleri kronoamperometri tekniği ile tayin etmişlerdir. MAO ve DAO enzimleri kovalent

bağlama yoluyla SPE yüzeyine immobilize edilmiştir. Bunun için aril diazonyum tuzu, hidroksisüksinimid ve karbodiimid kullanılmıştır. Optimum çalışma koşulları pH 6,7'ye ayarlanmış PBS ortamı ve 250 mV çalışma potansiyeli olarak belirlenmiştir. DAO/HRP/SPCE ve MAO/HRP/SPCE modifiye enzim elektrotları ile balık numunelerinde yapılan histamin tayini sonucunda doğrusal çalışma aralıkları sırasıyla DAO/HRP/SPCE modifiye elektrodu için 0,2-1,6 μM ve MAO/HRP/SPCE modifiye elektrodu için 0,4-2,4 μM bulunmuştur. Balık numuneleri için standart ekleme yöntemi uygulandığında putresin için % 92 gibi yüksek geri kazanımlar elde edilmiştir. Tekrar üretilebilirlik çalışmasında bağıl standart sapma DAO/HRP/SPCE modifiye elektrodu için % 10, MAO/HRP/SPCE modifiye elektrodu için ise %11 elde edilmiştir. Histamin için gözlenebilirlik sınırı DAO/HRP/SPCE modifiye elektrodu için ($0,18 \pm 0,01$) μM , MAO/HRP/SPCE modifiye elektrodu için ($0,40 \pm 0,04$) μM olarak belirlenmiştir. DAO/HRP/SPCE modifiye elektrodunun diğer biyojenik aminlere karşı olan seçicilik çalışması yapılmıştır. DAO/HRP/SPCE modifiye elektrodunun putresine %100, kadaverine % 95, histamine %80, tiramine, spermine ve spermidine % 73, triptamine ise % 23 seçicilik gösterdiği görülmüştür. Poliaminler için elde ettikleri geri kazanım yüzdeleri ise spermidin için % 107,3 ve spermin için % 99,4 olarak bulunmuştur. MAO/HRP/SPE modifiye elektrodu poliamin olan spermin ve spermidine cevap vermezken DAO/HRP/SPE modifiye elektrodunun putresine % 100 seçicilik gösterirken, spermin ve spermidine % 73 oranında seçicilik gösterdiği görülmüştür (Allonso-Lomillo vd. 2010).

Bilimsel literatürde spermin ve spermidin tayinine yönelik oldukça sınırlı sayıda elektrokimyasal biyosensör çalışması olduğu göze çarpmaktadır.

Koppang ve çalışma arkadaşları 1999 yılında BDDE (bor katkılı elmas film elektrot) modifiye ederek, CV ve FIA (akış enjeksiyonlu amperometri) yöntemleri ile poliamin tayini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde spermin için doğrusal çalışma aralığı 1 μM -1 mM ($R^2 = 0,970$), duyarlık 0,908 $\mu\text{A}/\text{mM}$, gözlenebilirlik sınırı 1 μM ($S/N = 6,9$) ve bağıl standart sapma değeri 39 enjeksiyon için % 15,9 bulunmuştur. Spermidin için ise, doğrusal çalışma aralığı 1 μM -1 mM ($R^2 =$

0,988), duyarlık 1,34 $\mu\text{A}/\text{mM}$, gözlenebilme sınırı 1 ($S/N = 10$) bulunmuş, ancak bağıl standart sapma değeri belirlenememiştir (Koppang vd. 1999).

Esparza ve ekibi 2019 yılında bitkisel ve hayvansal kaynaklı pek çok gıdadaki poliamin (putr, spm, spd) içerikleri konusunda yapılan çalışmaları derlemiş ve ortalama miktarlar belirlemiştir. Elde edilen ortalama verilere göre meyvelerde (elma, avokado, muz, kiraz, kivi, portakal, armut, şeftali, ananas, çilek) putresin 1,554 nmol/g, spermidin 6,9-9,8 nmol/g ve spermin 25 nmol/g olarak belirlenmiştir. Sebzelerde (brokoli, kabak, havuç, salatalık, patlıcan, fasulye, yeşil biber, mantar, marul, soğan, patates, ıspanak, domates) putresin 5,7-794 nmol/g, spermidin 6,9-398 nmol/g ve spermin 54 nmol/g olarak belirlenmiştir. İşlem görmemiş taze et ürünlerinde (dana, kuzu, tavuk, domuz, hindi, ördek, tavşan) putresin 1,1-4,7 nmol/g, spermidin 1-92 nmol/g ve spermin 1-342 nmol/g olarak bulunmaktadır. Pişmiş et ürünlerinde ise putresin 4,5-11 nmol/g, spermidin 15-28 nmol/g ve spermin 11-99 nmol/g aralığındadır. Yumurtada putresin 3,1-10 nmol/g, spermidin 1-4 nmol/g ve spermin 1 nmol/g bulunmaktadır. Süt ve yoğurt ürünlerinde putresin 3 nmol/g, spermidin 0,42-5 nmol/g ve spermin 4 nmol/g bulunmaktadır. Peynir türlerinde (olgun peynirler, küf özellikli peynirler, keçi peyniri vb) putresin 1,5-1470 nmol/g, spermidin 262 nmol/g ve spermin 17 nmol/g olarak belirlenmiştir (Esparza vd. 2019).

Bir diğer benzer çalışmada Martinez ve çalışma arkadaşları 2008 yılında yaptıkları poliamin içeriği ve toplam biyojenik amin içeriği tayini çalışmasında HPLC ile uyumlu sonuçlar elde etmişlerdir. Turp ve brokoli üzerinde yapılan çalışmada spermidin içeriği turp numunelerinde 30 mg/kg, brokoli numunelerinde ise 20 mg/kg olarak belirlenmiştir. Spermin içeriği ise turp için (27-30) mg/kg, brokoli için (22-24) mg/kg bulunmuştur. Turp numuneleri (47,8-48,6) mg/kg toplam biyojenik amin ihtiva ederken, brokoli (24-45) mg/kg toplam biyojenik amin ihtiva etmektedir (Esparza vd. 2019).

Biyosensör çalışmaları ile HPLC gibi geleneksel elektrokimyasal analizlerden benzer aralıkta sonuçlar elde edilebilmektedir. Biyosensörlerle yapılan çalışmalar daha düşük maliyet ve kullanım kolaylığı sebebiyle HPLC gibi karmaşık geleneksel yöntemlerden

daha avantajlıdır. Poliaminler günümüzde pek çok tıbbi araştırmada da konu edilmeye başlanmıştır. Freitag ve çalışma arkadaşları 2022 yılında Alzheimer hastalığına sahip hastalarda spermidinin nöro-inflamasyonu (nöro-inflamasyon; beyin hücrelerindeki iltihaplanma ve ödem kaynaklı azalma durumudur) geriletici bir araç olarak kullanılabilmesini öngörmüşlerdir. Alzheimer hastalığı oluşturulan kobay fareler üzerinde in-vivo deneyler sonucunda spermidinin etkisi kanıtlanmıştır (Freitag vd. 2022).

Prasher ve ekibi 2023 yılında anti-kanser ajanı olarak kullanılabilmesini düşündükleri spermidinin etkilerinin belirlenmesine çalışmışlardır. Bu çalışmada pek çok kanserli doku örneğinde in-vivo ve in-vitro çalışmalar ile gözlem yapılmıştır. Spermidinin sahip olduğu bilinen nöroprotektif etki (nöroprotektif etki; yetersiz kan akışı nedeniyle oluşan doku hasarını giderme etkisidir), yaşlanma karşıtı hücre yenileyici ve anti-inflamatuvar etki (anti-inflamatuvar etki; iltihaplanma ve ödem karşıtı etkidir) sebebiyle, hücresel apoptoz (apoptoz; kontrollü, planlı hücre ölümüdür) ve hücresel otofaji (otofaji; vücudun yeni hücre oluşumu için yaşlı ya da hasta hücrelerini yok etmesidir) tetikleyicisi olarak kullanılabilmesi ortaya konmuştur. Spermidinin ve SSAT (SSAT; spermidin/spermin N-1-asetiltransferaz, hücre içi poliamin katabolizmasına ait bir enzimdir) kanserli dokularda gerilemeyi sağlayıcı etkisi kanser tedavisine dair umut verici olup, poliaminlerin analizinin önemini bir kez daha ortaya koymuştur (Prasher vd. 2023).

Literatürde spermin ve spermidin tayini için geliştirilmiş sınırlı sayıda biyosensör bulunmaktadır. Ancak poliamin tayininin özellikle tıbbi çalışmalarda önemi anlaşıldıkça bu sayı artmaktadır. Bu tez çalışmasına en benzer çalışma 2015 yılında Boffi ve çalışma arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Poliamin oksidaz enzimi (PAOx), spermin oksidaz enzimi (SMOx) ve PM medyatörü kullanılarak geliştirilen spermin ve spermidin biyosensörlerinden, FIA (flow injection amperometry, akış enjeksiyonlu amperometri) yöntemi ile elde edilen performans faktörleri GC-MS referans metodu ile karşılaştırıldığında sonuçların oldukça iyi olduğu görülmüştür. PM/PAOx/SPE enzim elektrotları ile doğrusal çalışma aralığı spermin için 0,003-0,3 mM, spermidin için ise 0,01-0,4 mM olarak belirlenmiştir. PM/SMOx/SPE enzim

elektrotları için doğrusal çalışma aralığı spermin için 0,004-0,5 mM olarak bulunmuştur. PM/SMOx/SPE enzim elektrotları spermidine cevap vermemiştir. PM/PAOx/SPE enzim elektrotları kullanılarak elde edilen bazı performans karakteristikleri Çizelge 5.3'te verildi. Ayrıca çalışmada geliştirilen PM/PAOx/SPE enzim elektrotlarının diğer biyojenik aminlere karşı seçiciliği de incelenmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde PAOx enziminin poliaminlere karşı duyarlı oluşu sebebiyle spermin ve spermidine karşı yüksek bir seçicilik elde edilmiştir. Putresin, kadaverin ve histamin biyojenik aminlerinin her biri için seçicilik % 1'e yakın olarak bulunmuştur (Boffi vd. 2015).

Literatürdeki güncel çalışmalardan da görülmektedir ki, biyojenik poliaminler grubunda yer alan spermin ve spermidinin yüksek duyarlılıklı tayini oldukça önemlidir ve gittikçe daha da önemli hale gelmektedir. Ayrıca spermin ve spermidine duyarlı biyosensör çalışmalarındaki yetersizlik göze çarpmaktadır.

2.6 Cevap Yüzey Yöntemleri / Merkezi Kompozit Tasarım

Kemometrik yaklaşım, aynı amaç için normal şartlarda yapılması gereken deney sayısını minimize etmekle kalmayan, aynı zamanda gereksiz deneylerde harcanacak sarf malzemelerden ve zamandan da tasarruf sağlayan bir yöntemdir. Cevap yüzey yöntemleri ile deney ortamındaki değişkenlerin etkileri ve bu değişkenlerin etkileşimlerinin dolaylı etkisinin incelenmesi sağlanmaktadır (Bhattacharya vd. 2021, Ahmadi vd. 2005).

Kemometrik yaklaşım, yapılması gereken deney sayısından dolayısıyla da sarf malzemedan tasarruf ettirdiği gibi zamandan da kazanılmasını sağlayan bir yaklaşımdır. Deney ortamındaki değişkenlerin karşılıklı etkileşimlerinin olmadığı varsayılan bir sistemde 2² faktöriyel birinci merteye bir tasarım yapılabilir (Bhattacharya vd. 2021, Ahmadi vd. 2005).

$$y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_{1i} + \beta_2 \cdot x_{2i} + r_i$$

$$X = \begin{bmatrix} x_0 & x_1 & x_2 \\ 1 & -1 & -1 \\ 1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix}$$

Bu matristeki birinci kolon kayma değeri için değişken katsayılarını, ikinci kolon x_1 için ve üçüncü kolon ise x_2 için parametre katsayılarını içermektedir. Bu model düz bir yüzey olarak tanımlandığından, yüzeyde herhangi bir eğriliğin söz konusu olmadığı ve dolayısıyla etkileşmenin olmadığını gösterir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde bulunan Analitik Kimya Araştırma Laboratuvarı'nın cihaz ve kimyasal kaynaklarından yararlanıldı. Ayrıca, bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenen 116Z159 numaralı proje kapsamında yapıldı. Çalışmada kullanılan tüm cihazlar, malzemeler, çözeltiler ve deneylerin yapılışı ayrıntılı bir şekilde aşağıda verildi.

3.1 Kullanılan Cihazlar ve Donanımı

Tez çalışmasındaki elektrokimyasal (amperometrik, voltammetrik, impedimetrik ve potansiyometrik) ölçümler için, Iviumstat Electrochemical Analyzer, Autolab Potentiostat ve Thermo Scientific Orion kombine cam pH elektrotlu Thermo Orion 720A pH/iyonmetre cihazlarından yararlanıldı.

Analiz öncesinde ilgili elektrot modifikasyon çözeltilerinin ve tamponların hazırlanmasında ultrasonik banyo (LC30H), vorteks karıştırıcı (ISOLAB), manyetik karıştırıcı (Chiltern MS21S) ve deiyonize ultra saf su cihazı (ELGA-Pure Lab) kullanıldı.

Deneylerde kullanılan kimyasal maddelerin tartılmasında 0,01 mg duyarlığa sahip Mettler Toledo markalı analitik teraziden yararlanıldı. Çözelti aktarma işlemi Axygen marka mikropipetler yardımıyla yapıldı.

Elektrokimyasal ölçümler yapılırken, elektrokimyasal analiz cihazı ile entegre BASi marka elektrokimyasal hücre standı (C-3) kullanıldı.

Elektrotların yüzey karakterizasyonları için FEI, Quanta 450 FEG markalı taramalı elektron mikroskopundan (SEM), NT-MDT NTEGRA Solaris atomik kuvvet

mikroskobundan (AFM) ve Bruker dedektörlü enerji yayımlı X-ışını spektrometreden (EDX) yararlanıldı.

Elektrokimyasal ölçümler ve modifiye elektrotların hazırlanmasında referans elektrot, karşıt elektrot ve çalışma elektrodunun bir arada bulunduğu, yeni nesil bir elektrot sistemi olan perde baskılı elektrotlar (SPE) kullanıldı (Şekil 3.1). Bu amaçla kullanılan SPE'ler DropSens C-110 model referans elektrodu gümüş (Ag), karşıt elektrodu ve çalışma elektrodu ise karbon (C) olan elektrotlardı.



Şekil 3.1 Perde baskılı karbon elektrot (SPE)

Merkezi kompozit tasarım çalışmalarında Design-Expert yazılımının 10.0.3 versiyonu (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) kullanıldı.

3.2 Kimyasal Maddeler, Çözeltiler ve Karışımlar

3.2.1 Kullanılan kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasal maddeler, özellikleri ve markaları Çizelge 3.1'de görüldüğü gibidir.

Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasal maddeler, özellikleri ve markaları

Kimyasal maddeler	Özellikleri	Markaları
Çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT)	%95	Cheaptubes
Karboksilli çok duvarlı karbon nanotüp (c-MWCNT)	%95	Cheaptubes
Kobalt (II, III) oksit nanopartikülü (Co ₃ O ₄ NP)	%99,8	Aldrich
Prusya mavisi (PM)	Analitik saflık	Sigma-Aldrich
Kitosan	Analitik saflık	Sigma-Aldrich
Nafyon (NF)	Analitik saflık, %5	Aldrich
Spermin	≥ %99	Sigma-Aldrich
Spermidin	≥ %99	Sigma-Aldrich
Putresin	≥ %99	Sigma
Kadaverin	≥ %99	Sigma
Histamin	≥ %99	Sigma
Tiramin	≥ %99	Sigma
Triptamin	≥ %99	Sigma
β-Fenil etil amin	≥%99	Sigma
Sodyum dihidrojen fosfat-2-hidrat	%99	Riedel
Sodyum monohidrojen fosfat-7-hidrat	%99	Riedel
Potasyum ferrisiyanür	%99	Sigma-Aldrich
Potasyum ferrosiyanür	%98	Alfa
Sodyum hidroksit	%98	Riedel
Asetik asit	%99	Sigma
Fosforik asit	%85	Sigma
Borik asit	%99,5	Sigma-Aldrich
1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodimid (EDC)	≥ %98	Sigma
N-hidroksisüksinimid (NHS)	≥ %95	Sigma
Diamin oksidaz (DAO)	≥ 0,05 U/mg katı	Sigma-Aldrich
Histidin	≥ %99	Merck
Lizin	≥ %99	Merck
Ornitin	≥ %99	Merck
Arginin	≥%99	Merck
Fenil alanin	≥ %99	Merck
Tirosin	≥ %99	Merck
Triptofan	≥ %99	Merck
Hidrojen peroksit	%(34,5-36,5)	Sigma-Aldrich

3.2.2 Biyojenik aminlerin çözeltileri

Biyojenik aminlerden histamin, β -feniletıl amin, kadaverin, putresin, spermin ve spermidinin 10 mL'lik $1,0 \times 10^{-2}$ M'lık standart sulu çözeltileri Çizelge 3.1'de belirtilen maddelerinden uygun miktarlarda tartılarak hazırlandı. Tiramin ve triptamin çözeltileri ise, suda çözünme güçlüğü nedeniyle, ancak $1,0 \times 10^{-3}$ M'lık çözelti elde edilecek şekilde uygun miktarlarda tartılarak 10 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiler kullanılmadığı sürelerde buzdolabında $+4^{\circ}\text{C}$ 'da saklandı ve haftada bir yeniden hazırlandı.

3.2.3 Amino asit çözeltileri

Histidin, ornitin, lizin, arginin, tirozin, triptofan ve fenil alanin gibi amino asitlerin 10 mL'lik $1,0 \times 10^{-2}$ M'lık standart sulu çözeltileri Çizelge 3.1'de belirtilen maddelerinden uygun miktarlarda tartılarak hazırlandı. Kullanılmadığı sürelerde buzdolabında $+4^{\circ}\text{C}$ 'da saklandı ve her çözelti haftada bir yeniden hazırlandı.

3.2.4 Tampon çözeltiler

Fosfat tampon çözeltisi: Çizelge 3.1'de verilen $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ maddelerinden uygun miktarlarda tartılarak fosfat bakımından analitik molar derişimi 0,05 M olacak şekilde 100 mL'lik çözelti hazırlandı.

Britton- Robinson (BR) tampon çözeltisi: BR tamponu hazırlamak amacıyla, 2,472 mg borik asit (H_3BO_3) tartılarak ultra saf suda çözüldü. Bu çözelti üzerine 2,29 mL asetik asit ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) ve 2,69 mL %85'lik fosforik asit (H_3PO_4) katılıp ultra saf su ile hacmi 1,0 L'ye tamamlandı. Bu çözeltinin pH'sı NaOH çözeltisi kullanılarak istenen değere ayarlandı.

Asetik asit-asetat (AA) tamponu çözeltisi: Asetat yönünden molar analitik derişimi 0,1 M olan asetik asit/asetat tampon çözeltisi uygun miktarda asetik asit ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) ve

sodyum asetat ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$)'ın karıştırılması ve ultra saf suda çözünmesi ile hazırlandı. Bu çözeltinin pH'sı HCl veya NaOH çözeltileri kullanılarak pH 4,0'a ayarlandı.

3.2.5 Redoks probu çözeltisi

KCl yönünden 0,1 M, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ yönünden 5 mM ve $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ yönünden 5 mM olacak şekilde uygun miktarlarda tartılan katı maddelerin ultra saf suda çözülmesiyle hazırlandı. Kullanılmadığı durumlarda $+4^\circ\text{C}$ 'da buzdolabında tutulan çözelti, her hafta yeniden hazırlanarak kullanıldı.

3.2.6 Kitosan çözeltisi

Kitosandan 0,25 g tartılıp yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan pH'sı 4,0 olan asetik asit/asetat tamponundan yavaş yavaş ilave edilerek katı maddenin çözünmesi sağlandı. Karışım homojen hale getirilmesi amacıyla manyetik karıştırıcı ortamında uygun bir süre karıştırıldı.

3.2.7 EDC-NHS karışımı

EDC çözeltisinin hazırlanması için, 5,75 mg EDC, 1 mL pH 7,0'e ayarlanmış BR tampon çözeltisinde çözüldü. NHS çözeltisi ise, 38,34 mg NHS'nin, 1 mL pH 7,0'e ayarlanmış BR tampon çözeltisinde çözülmesiyle hazırlandı. Bu çözeltiler önce 1:1 oranda karıştırıldı ve ardından bu karışım, 1:4 oranında pH 7,0 BR tampon çözeltisi ile seyreltilerek kullanıldı. EDC-NHS karışımı her kullanımdan önce yeniden hazırlandı.

3.2.8 Nafyon (NF) çözeltisi

Çizelge 3.1'de belirtilen %5'lik nafyon çözeltisinden alınan 100 μL 'lik kısım, 200 μL saf su ve 200 μL etanol ile seyreltilerek derişik nafyon çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti, 250 μL saf su ve 250 μL etanol ile seyreltilerek kullanıldı. Kullanılmadığı durumlarda çözelti $+4^\circ\text{C}$ 'da buzdolabında saklandı. Çözelti her hafta yeniden hazırlandı.

3.2.9 c-MWCNT- Co₃O₄NP ve MWCNT- Co₃O₄NP karışımları

c-MWCNT'ten 25 mg ve Co₃O₄NP'den 13,4 mg tartılıp yukarıda açıklandığı gibi hazırlanan kitosan çözeltisinden 1,0 mL ilave edilerek önce ultrasonik banyoda; kullanılmadan önce ise, vorteks karıştırıcıda karıştırılarak homojen hale gelmesi sağlandı.

MWCNT- Co₃O₄NP karışımı da her bir bileşen yukarıda belirtilen miktarlar kullanılarak aynı şekilde hazırlandı.

3.2.10 DAO çözeltisi

Çizelge 3.1'de verilen DAO enziminden 20 mg tartıldı ve 1,0 mL pH 7,0 BR tampon çözeltisinde çözülerek 1,0 U/mL'lik enzim çözeltisi hazırlandı. DAO enzim çözeltisi her kullanımdan önce taze hazırlandı.

3.2.11 PM çözeltisi

Prusya mavisinden 20 mg tartılarak pH 7,0 BR tampon çözeltisi ile hacmi 1,0 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti vorteks karıştırıcı ile homojen hale getirildi.

3.3 Elektrotların Yüzey Bileşimlerinin Optimizasyonu

Elektrot modifikasyonunda kullanılan c-MWCNT ve Co₃O₄NP'nin yüzeydeki optimum miktarlarını belirlemek amacıyla 2² faktöriyel merkezi kompozit tasarımı (MKT) yönteminden yararlanıldı. Bu amaçla c-MWCNT ile Co₃O₄NP miktarlarının optimizasyonu için merkezi kompozit tasarım modelindeki deneysel faktör ve seviyeler Çizelge 3.2'de verildi.

Çizelge 3.2 c-MWCNT ile Co₃O₄NP miktarlarının optimizasyonu için merkezi kompozit tasarım modelindeki deneysel faktör ve seviyeler

Faktör	Birim	Seviye				
		$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
A: c-MWCNT	mg/mL	5,86	10	20	30	34,14
B: Co ₃ O ₄ NP	mg/mL	2,93	5	10	15	17,07

Çizelge 3.2'deki değerlerden yararlanılarak ve Design-Expert programı kullanılarak Çizelge 3.3'deki merkezi kompozit tasarımı oluşturuldu. Sensör oluşturmak amacıyla Çizelge 3.3'de belirtilen tasarım matrisine göre iki bileşen olan c-MWCNT ve Co₃O₄NP içeren farklı yüzey bileşimlerinde 13 elektrot hazırlandı. Böyle bir tasarımda, Çizelge 3.3'ten de görüleceği gibi, 3 faktöriyel 5 aksiyel 5 merkezi nokta bulunmaktadır. Bu tip ortogonal ve döndürülebilir tasarımda 1,414 α değeri kullanılmaktadır (Okman Koçoğlu 2019). Çizelge 3.3'te de görüldüğü gibi 2 değişkenin her biri için 5 farklı seviye incelendi. Bu amaçla Çizelge 3.3'teki verilerden yararlanılarak optimum yüzey bileşimini tahmin edebilmek amacıyla 2. dereceden bir polinom modeli oluşturuldu:

$$Y = \beta_0 + \beta_1[\text{c-MWCNT}] + \beta_2[\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}] + \beta_{11}[\text{c-MWCNT}]^2 + \beta_{22}[\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}]^2 + \beta_{12}[\text{c-MWCNT}][\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}]$$

Bu eşitlikte,

Y : beklenen cevabı

β_0 : model sabitini

göstermektedir.

β_1 ve β_2 : [c-MWCNT] ve [Co₃O₄NP] doğrusal etkileşimin cevaba etkisini

β_{11} ve β_{22} : [c-MWCNT] ve [Co₃O₄NP] ikinci dereceden etkileşimlerin cevaba etkisini

β_{12} : [c-MWCNT] ile [Co₃O₄NP] ikili etkileşimlerin cevaba etkisini

ifade etmektedir. Çizelge 3.3'te belirtilen 13 elektrot, Çizelge 3.2'deki seviyelere karşı gelen c-MWCNT ve Co₃O₄NP miktarları kullanılarak şu şekilde hazırlandı: her bir seviyeye karşı gelen miktarlarda c-MWCNT ve Co₃O₄NP tartıldı ve kitosan çözeltisinde

toplam hacim 1,0 mL olacak şekilde ultrasonik banyo ve vorteks kullanılarak homojen bir şekilde dağıtıldı. Bu karışımdan alınan 3 µL SPE yüzeyine damlatılıp kurutuldu. Her bir elektrodun yüzeyi Bölüm 3.5’te anlatıldığı gibi hazırlanan nafyon çözeltisinden 3 µL damlatılarak nafyon ile kaplandı. Bu 13 modifiye SPE elektrodun kuruması için belli bir süre beklendi. Her bir elektrodun $1,0 \times 10^{-3}$ M H₂O₂ çözeltisinde pH 7,0’de fosfat tamponu ortamında +0,7 V’da amperometrik akım cevabı ölçüldü. Bu akım cevapları yardımıyla [c-MWCNT] ve [Co₃O₄NP] değişkenlerinin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadıklarının incelenmesi ve modelin uygunluğunun belirlenmesi amacıyla %95 güven seviyesinde ($p=0,05$ olasılık seviyesinde) ANOVA testi kullanıldı. Elde edilen verilerden ve polinom modelinin türevi alınarak [c-MWCNT] ve [Co₃O₄NP] optimum miktarları belirlendi.

Çizelge 3.3 Merkezi kompozit tasarım

Elektrot	A	B
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	-1,414
6	0	1,414
7	-1,414	0
8	1,414	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0

3.4 Modifiye Sensörlerin Hazırlanması

3.4.1 NF/Co₃O₄NP/SPE

MKT ile elde edilen optimum miktarda Co₃O₄NP (13,4 mg/mL kitosan) içeren karışımından 3 µL SPE'nin çalışma elektrodu yüzeyine damlatılıp kurutulduktan sonra bu elektrodun yüzeyi 3 µL nafyon çözeltisi ile kaplanarak NF/Co₃O₄NP/SPE hazırlandı.

3.4.2 NF/c-MWCNT/SPE

MKT ile elde edilen optimum miktarda c-MWCNT (25 mg/mL kitosan) içeren karışımından 3 µL SPE'nin çalışma elektrodu yüzeyine damlatılıp kurutulduktan sonra bu elektrodun yüzeyi 3 µL nafyon çözeltisi ile kaplanarak NF/c-MWCNT/SPE hazırlandı.

3.4.3 NF/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE

MKT ile elde edilen optimum miktarlarda c-MWCNT (25 mg/mL kitosan) ile Co₃O₄NP (13,4 mg/mL kitosan) içeren karışımından 3 µL SPE'nin çalışma elektrodu yüzeyine damlatılıp kurutulduktan sonra bu elektrodun yüzeyi 3 µL nafyon çözeltisi ile kaplanarak NF/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE hazırlandı.

3.4.4 NF/MWCNT/SPE

MKT ile c-MWCNT için elde edilen optimum miktar, MWCNT için de (25 mg/mL kitosan) kullanılarak hazırlanan kitosan-MWCNT karışımından (Bölüm 3.5) 3 µL SPE'nin çalışma elektrodu yüzeyine damlatılıp kurutulduktan sonra bu elektrodun yüzeyi 3 µL nafyon çözeltisi ile kaplanarak NF/MWCNT/SPE hazırlandı.

3.4.5 NF/MWCNT-Co₃O₄NP/SPE

Optimum miktarlardaki MWCNT (25 mg/mL kitosan) ile Co₃O₄NP (13,4 mg/mL kitosan) karışımından 3 µL SPE'nin çalışma elektrodu yüzeyine damlatılıp kurutulduktan sonra bu elektrodun yüzeyi 3 µL nafyon çözeltisi ile kaplanarak NF/MWCNT-Co₃O₄NP/SPE hazırlandı.

3.4.6 NF/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE

25 mg MWCNT ve 13,4 mg Co₃O₄NP içeren 1 mL'lik kitosan çözeltisi ile pH 7,0 BR tamponunda hazırlanan 20 mg/mL'lik PM'nin 1:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlanan karışımdan alınan 3 µL'lik kısım SPE'nin çalışma elektrodu yüzeyine damlatılıp kurutulduktan sonra bu elektrodun yüzeyi 3 µL nafyon çözeltisi ile kaplanarak NF/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE hazırlandı.

3.5 Biyosensörlerin Hazırlanması

c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE yüzeyine Bölüm 3.2.7'de anlatıldığı gibi hazırlanan EDC-NHS çözeltisinden 3 µL damlatıldı ve kuruluğa yakın çözücüsü buharlaştırıldı. Bu sensör yüzeyine optimum miktarda enzim içeren çözeltiden 5 µL damlatılarak buzdolabında kurutuldu ve DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE yüzeyi NF ile kaplandı ve NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE hazırlandı. NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörünün hazırlanması da aynı şekilde yapıldı.

3.6 PM Miktarı Optimizasyonu

NF/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE yüzeyinde PM miktarının optimizasyonu amacıyla MWCNT-Co₃O₄NP-PM karışımındaki PM miktarı değiştirilerek bir seri sensör oluşturuldu ve bu sensörlerin yüzeyine optimum miktarda DAO immobilize edilip NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörleri hazırlandı. Bu biyosensörlerin

spermin ve/veya spermidine amperometrik akım cevabı kaydedilerek en yüksek akım cevabının alındığı PM miktarı optimum olarak seçildi.

3.7 DAO Miktarının Optimizasyonu

c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE yüzeyine farklı ünitelerde enzim içeren DAO çözeltisinden 5 µL damlatılarak buzdolabında kurutuldu ve her bir biyosensör (DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE) yüzeyi NF ile kaplanarak NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörü hazırlandı. Oluşturulan bu biyosensörlerin sabit derişimdeki spermin ve spermidin çözeltilerine amperometrik akım cevapları ölçüldü ve en yüksek akım cevabının elde edildiği enzim miktarı optimum miktar olarak alındı. Bu değer NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörünün hazırlanması için de kullanıldı.

3.8 Elektrotların Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi

Dönüşümlü voltammetri (CV): Bölüm 3.4 ve 3.5’de belirtildiği şekilde hazırlanan NF/SPE, NF/c-MWCNT/SPE, NF/Co₃O₄NP/SPE, NF/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE, NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE ve NF/MWCNT/SPE, NF/Co₃O₄NP/SPE, NF/PM/SPE, NF/MWCNT-Co₃O₄NP/SPE, NF/PM-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE ve NF/DAO/PM-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE’lerin elektrokimyasal hücreye redoks probu çözeltisinden (Bölüm 3.2.5) 5 mL konduktan sonra her biri sıra ile bu hücreye daldırılıp 50 mV/s tarama hızında uygun potansiyel aralığında dönüşümlü voltammogramları alındı.

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS): Bölüm 3.4 ve 3.5’de belirtildiği şekilde hazırlanan NF/SPE, NF/c-MWCNT/SPE, NF/Co₃O₄NP/SPE, NF/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE, NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE ve NF/MWCNT/SPE, NF/Co₃O₄NP/SPE, NF/PM/SPE, NF/MWCNT-Co₃O₄NP/SPE, NF/PM-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE ve NF/DAO/PM-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE’lerin EIS ölçümleri, redoks probu çözeltisinde, 0,10 V açık devre potansiyeli ve $1,0 \times 10^5$ - $5,0 \times 10^2$ Hz frekans aralığında elde edildi. Her bir elektrot için elde edilen ölçüm verilerinden yararlanarak Z-Z'' Nyquist eğrileri çizildi ve elektrot-çözelti ara yüzeyinde oluşan dirençler belirlendi.

3.9 Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

3.9.1 Çalışma potansiyeli

Elektrokimyasal reaksiyon sonucu ortamda H_2O_2 oluşması ve H_2O_2 'in yükseltgenmesi sonucunda oluşan amperometrik akımın elektrot cevabı olarak değerlendirilmesi nedeniyle NF/DAO/c-MWCNT- Co_3O_4 NP/SPE'nin çalışma potansiyelinin olarak +0,7 V alındı.

NF/DAO/MWCNT- Co_3O_4 NP-PM/SPE'nin BR tampon çözeltisi ortamında dönüşümlü voltammogramları 100 mV/s tarama hızında -1,0 V–1,0 V potansiyel aralığında alındı. PM için elde edilen yükseltgenme pikinden yararlanarak +0,15 V ve -0,10 V potansiyellerde sabit spermin veya spermidin derişiminde biyosensör için elde edilen akım farklarından yararlanarak uygun çalışma potansiyeli belirlendi.

3.9.2 Çalışma pH'sı

Hazırlanan NF/DAO/c-MWCNT- Co_3O_4 NP/SPE ve NF/DAO/MWCNT- Co_3O_4 NP-PM/SPE biyosensörleri için en uygun ortam pH'sının belirlenmesi amacıyla, geniş pH aralıklarında çalışmaya imkan sağlayan Britton-Robinson (BR) tampon çözeltisi ile 6,0 ila 11,0 arasında değişen farklı pH'larda, biyosensörün sabit derişimdeki spermin veya spermidine verdiği amperometrik akım cevabı ölçüldü. En yüksek akım farkının elde edildiği pH değeri optimum pH olarak kullanıldı.

3.10 Biyosensörler için Performans Faktörlerinin Belirlenmesi

Biyosensörlerin performans faktörlerinin belirlenmesi amacıyla oluşturulan elektrokimyasal hücreye 5 mL BR tampon çözeltisinden (spermin veya spermidin için belirlenen optimum pH'larda) eklendi ve sabit potansiyellerde elektrotlar kararlı hal akımına gelinceye kadar beklenerek dengeye gelmesi sağlandı. Elektrokimyasal hücreye

spermin veya spermidin eklenerek *i-t* grafikleri çizildi ve amperometrik akım cevapları belirlendi. Bulunan akım farkları spermin veya spermidine ait derişime karşı grafiğe geçirilerek +0,7 V'da NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE ve -0,1 V'da NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörleri için kalibrasyon eğrileri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak performans faktörleri aşağıda belirtildiği şekilde bulundu.

Doğrusal çalışma aralığı ve duyarlık: Yukarıda belirtildiği şekilde NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE ve NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörleri için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin doğrusal kısımlarından çalışma aralığı; doğrusal kısmın eğiminden ise elektrodun duyarlığı belirlendi.

Alt tayin sınırı ve gözlenebilme sınırı: Doğrusal çalışma aralığının en düşük derişimine karşı gelen substrat derişimlerinde, spermin ve spermidin için her iki biyosensörün art arda amperometrik akım cevapları 10 kez ölçölüp elde edilen ölçüm sonuçlarının standart sapma (*s*) değeri hesaplandı. Ayrıca aynı biyosensörlerle elde edilen kalibrasyon grafiklerinden elde edilen duyarlık (*m*) bulundu. Standart sapma ve duyarlık kullanılarak $3s/m$ kriteri ile LOD ve $10s/m$ kriteri ile ise LOQ değerleri hesaplandı.

Cevap süresi: Bu amaçla elektrokimyasal hücreye spermin veya spermidin eklendikten sonra elde edilen *i-t* grafiklerinden kararlı hal akımı değerine ulaşılabilmesi için geçen sürenin %95'i cevap süresi olarak kabul edildi.

Tekrar üretilebilirlik: Bölüm 3.5'te anlatıldığı gibi hazırlanan 10 adet NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE ve 10 adet NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE elektrotlarının sabit derişimdeki ilgili substrata amperometrik akım cevabı ölçölüdü ve sonuçların bağlı standart sapmasından yararlanarak tekrar üretilebilirlik saptandı.

Tekrar kullanılabilirlik: Perde baskılı elektrotlar üretimi itibariyle tek kullanımlık elektrotlar olduğundan tekrarlanabilirlik çalışması yapılmadı.

Raf ömrü: Bölüm 3.5'te anlatıldığı gibi hazırlanan NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE ve NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörlerinin sabit derişimdeki spermin veya spermidin çözeltilerinde optimum çalışma koşullarında amperometrik akım cevapları 15 gün boyunca her gün ölçülerek raf ömrü çalışması yapıldı. Bu çalışma için ilk gün elektrotlar hazırlandı ve her gün yeni bir elektrot kullanılacak şekilde % değişim ölçüldü ve geçen süre ile akım farklarında gözlenen değişmelerden biyosensörün hazırlandıktan sonra bekletilmesinin ölçüm sonuçlarındaki verimliliğe etkisi belirlendi.

Uzun dönem kararlılığı: Bölüm 3.5'te anlatıldığı gibi hazırlanan NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE ve NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörlerinin sabit derişimdeki spermin veya spermidin çözeltilerinde optimum çalışma koşullarında amperometrik akım cevapları 30 gün boyunca farklı günlerde ölçüldü ve geçen süre ile akım farklarında gözlenen değişmelerden biyosensörün kaç ölçüm için kullanılabileceği hesaplandı.

Girişim etkisi: NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE ve NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörlerinin çalışma şartlarında BR tamponu ortamına önce spermin veya spermidin ilave edilerek *i-t* grafiklerinden amperometrik akım farkları (Δi_1) kaydedildi. Ardından ortama girişim yapabilecek biyojenik aminler (histamin, putresin, kadaverin, β -feniletilamin, tiramin, triptamin) veya amino asitler (histidin, ornitin, lizin, arginin, fenilalanin, tirozin, triptofan) art arda ilave edilerek tekrar akım farkları (Δi_2) bulundu. Bu amperometrik akım farklarından yararlanarak girişim yüzdeleri aşığıdaki gibi hesaplandı.

$$\% \text{ Girişim etkisi} = \frac{\Delta i_2}{(\Delta i_1 + \Delta i_2)} \times 100 \quad [3.1]$$

3.11 Gerçek Numunelerde Analitik Uygulanabilirlik

Bölüm 3.5’de anlatıldığı gibi hazırlanan biyosensörler kullanılarak ve literatürlerden yararlanarak spermin ve spermidin içeriğinin ölçülebilir düzeyde olduğunu öngördüğümüz alkolsüz malt içeceklerinde spermin/spermidinin tayini gerçekleştirildi.

Numune çalışmasında spermin ve spermidinin tayini için ticari bir alkolsüz malt içeceği BR tamponu kullanılarak spermin için pH 8,5; spermidin için pH 9,0’a ayarlanarak 50 kat seyreltildi ve analize hazırlandı. Numunedeki spermin ve spermidin miktarını belirlemek amacıyla standart ekleme yöntemi kullanıldı. Bu amaçla, spermin tayini için pH 8,5’e; spermidin için pH 9,0’a ayarlanmış 5,0 mL BR tamponu çözeltisinin kararlı hal akımı kaydedildi ve ardından bu çözeltiliye 100 µL analize hazırlanmış malt içeceği ilave edildi. Tekrar kararlı hal akımı ölçüldü. Bu çözeltiliye art arda $1,0 \times 10^{-3}$ M standart spermin veya spermidin çözeltilerinden eklenerek standart ekleme eğrileri oluşturuldu ve regresyon eşitliğinden yararlanarak numunedeki spermin veya spermidin miktarı hesaplandı. Standart çözeltili eklemeleri geliştirilen enzim elektrodun doğrusal çalışma aralığına girecek şekilde yapıldı.

Ayrıca, standart ekleme yöntemi kullanılarak geri kazanım çalışmaları yapıldı. Bu çalışmada malt içeceği ile birlikte 5 mL’lik BR tamponu çözeltisine belli derişimde spermin ve spermidin çözeltisi ilave edildi ve standart substrat çözeltileri art arda katılarak standart ekleme grafikleri oluşturuldu. Oluşturulan bu grafiğin regresyon eşitliğinden malt içeceğindeki substrat derişimi ile eklenen substrat derişiminin toplamı tayin edilerek % geri kazanım hesaplandı. Her bir numune için bu çalışmalar 3 kez tekrarlandı ve *t* testi uygulanarak ölçüm sonucu ile gerçek değer arasında anlamlı bir fark olup olmadığı araştırıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu doktora tez çalışmasında biyojenik aminlerden spermin ve spermidin tayini için iki farklı biyosensör geliştirildi. Bu biyosensörler geliştirilirken modifikasyon malzemesi olarak MWCNT, c-MWCNT, $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$, PM'nin uygun kombinasyonları kullanılarak SPE yüzeyleri modifiye edildi ve sensörler oluşturuldu. Oluşan bu sensörlerin yüzeyine DAO immobilize edilerek biyosensörler hazırlandı. Hazırlanan bu biyosensörler NF/DAO/c-MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ /SPE ve NF/DAO/MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ -PM/SPE şeklinde gösterildi. c-MWCNT ve $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ 'nin elektrot yüzeyindeki optimum miktarını belirlemek amacıyla MKT'den yararlanıldı. Elektrot yüzeyindeki PM miktarları ise tek seferde tek değişken yöntemi ile bulundu. Biyosensörler hazırlanırken her basamaktaki yüzey morfolojisi SEM, EDX ve AFM kullanılarak incelendi. Ayrıca her bir basamakta hazırlanan sensörlerin ve biyosensörlerin elektrokimyasal davranışları dönüşümlü voltammetri ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi ile incelendi. Biyosensörlerin analitik uygulanabilirlikleri malt içeceği gibi gerçek numunelerde spermin ve spermidin tayini yapılarak gösterildi. Aşağıda çeşitli alt başlıklar altında, yukarıda belirtilen tüm hususlarla ilgili bulgular verilerek irdemeler ayrıntılı bir şekilde yapıldı.

4.1 Yüzey Bileşiminin Optimizasyonu

4.1.1 MKT ile c-MWCNT ve $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ miktarının belirlenmesi

Bu çalışmada SPE yüzeyindeki c-MWCNT ve $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ miktarlarının optimize edilmesi amacıyla MKT yöntemi kullanıldı. MKT yöntemi daha az sayıda deney yaparak daha çabuk optimum değerlere ulaşmak ve her bir parametrenin birbiri ile etkileşim etkileşmeyeceğini belirlemek için kullanılacak yöntemlerden biridir. Bu yöntem genellikle deneysel şartların belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmakta olup literatürde yöntemin sensör ve biyosensör yapımında yüzey bileşenlerinin optimum miktarının belirlenmesinde sınırlı sayıda uygulamasına rastlanmaktadır (Koçoğlu Okman 2019, Bhattacharya vd. 2021, Ahmadi vd. 2005).

Bu çalışmada sensör ve biyosensör hazırlamada elektrot yüzeyini modifiye etmek için kullanılan malzemelerin optimum miktarlarını belirlemede MKT yöntemi kullanılarak literatürdeki bu eksikliği gidermek amaçlandı ve 2²-faktöryel MKT yöntemi kullanılarak c-MWCNT ve Co₃O₄NP'nin SPE yüzeyindeki optimum miktarları belirlendi. Bölüm 3'teki Çizelge 3.2'de verilen bu çalışma ile ilgili verilen faktörler ve seviye değerleri kullanılarak Çizelge 4.1'deki 13 elektrot hazırlandı. Bu çalışmada hazırlanan biyosensörlerin DAO enziminin katalizlediği reaksiyon sonucu oluşan H₂O₂'e amperometrik cevapları belirlendiğinden bu 13 elektrodun her birinin 0,025 M fosfat tamponu çözeltisinde pH 8,0'de 2,0×10⁻⁴ M H₂O₂ ortamında +0,7 V'da amperometrik akım cevapları okundu ve elde edilen veriler aynı çizelgede verildi. Bu veriler ANOVA kullanılarak % 95 güven seviyesinde irdelendi ve Çizelge 4.2'de sunuldu. Bu çizelgedeki modelin güvenilirliği ile ilgili olan R² değerinin 0,8852 bulunması ve ayrıca literatür verilerinin değerlendirilmesi sonucu öngörülen modelin güvenilir olduğu belirlendi (Koçoğlu Okman 2019). Çizelgedeki *f* değerinin 10,80; *p* değerinin ise 0,05'ten küçük (0,0035) olması da önerilen modelin anlamlı olduğunun bir göstergesidir. Çizelgede uyumsuzluk için verilen *p* değerinin 0,05'ten büyük yani 0,0826 olması da modelin kabul edilebilir olduğunu doğrulamaktadır. Çizelge 4.2'deki A, B, A² ve B² terimlerine ait olan *p* değerlerinin sırasıyla 0,0021; 0,0166; 0,0093 ve 0,0238 bulunması ve bu değerlerin 0,05'ten küçük olması bu modelde 4 terimin de anlamlı olduğunu göstermektedir. Ancak AB terimi için elde edilen değer 0,1260 olması yani 0,05'ten büyük olması c-MWCNT ile Co₃O₄NP'ün etkileşimlerinin bu modifiye elektrot cevabında anlamlı bir etkisi olmadığını göstermektedir. Bütün bu verilerden önerilen modele ait regresyon eşitliği aşağıdaki gibi verilebilir:

$$Y=8886,40+1877,54[\text{c-MWCNT}]+1253,73[\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}]+(-1502,21)[\text{c-MWCNT}]^2+(-1217,01)[\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}]^2 \quad [4.1]$$

Çizelge 4.1 NF/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE için deneysel ve beklenen amperometrik akım cevapları ile bu akım cevapları arasındaki farklara ait iki değişken için MKT

Elektrot	A	B	Amperometrik cevap akımı, nA		
			Deneysel	Beklenen	Artık
1	-1	-1	1885,2	2209,3	-324,1
2	1	-1	8123,0	7152,6	970,4
3	-1	1	6149,0	6368,9	-219,9
4	1	1	9511,0	8436,4	1074,6
5	0	-1,414	4102,0	4403,6	-301,6
6	0	1,414	7803,0	8252,1	-449,1
7	-1,414	0	3819,2	3279,1	540,1
8	1,414	0	6945,0	8235,8	-1290,8
9	0	0	8640,0	8886,3	-246,3
10	0	0	7799,0	8886,3	-1087,3
11	0	0	9437,0	8886,3	550,7
12	0	0	9120,0	8886,3	233,7
13	0	0	9436,0	8886,3	549,7

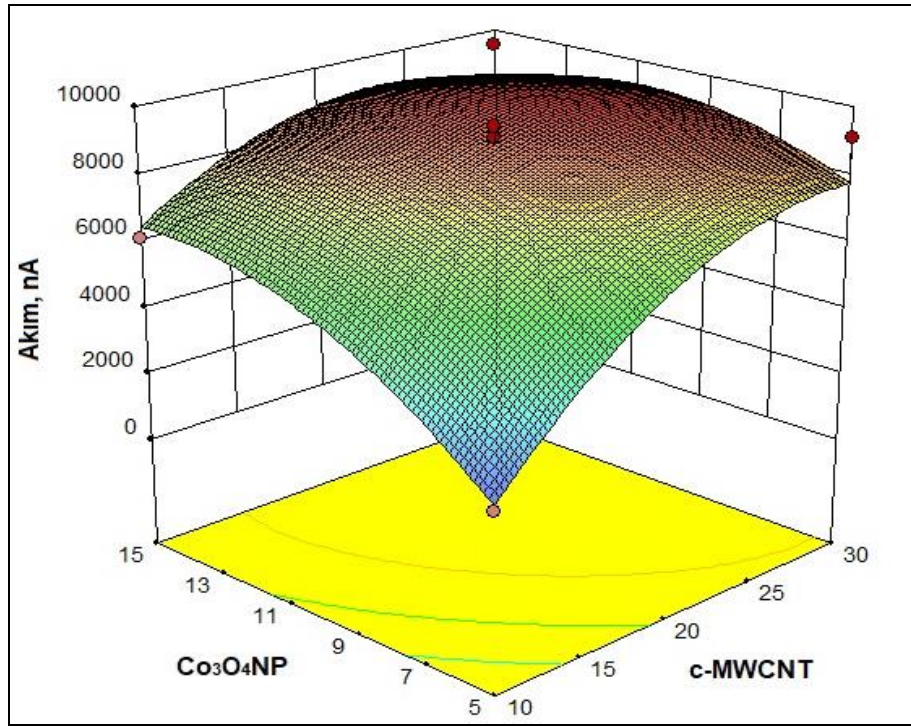
Çizelge 4.2 NF/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE için yüzey bileşenlerinin optimizasyonuna ait MKT verileriyle yapılan ANOVA analizi

Kaynak	β	SS	df	MS	F değeri	p değeri	
Model	8886,40	6,725×10 ⁷	5	1,345×10 ⁷	10,80	0,0035	anlamlı
A	1877,54	2,820×10 ⁷	1	2,820×10 ⁷	22,65	0,0021	anlamlı
B	1253,73	1,222×10 ⁷	1	1,222×10 ⁷	9,81	0,0166	anlamlı
AB	-968,95	3,755×10 ⁶	1	3,755×10 ⁶	3,02	0,1260	
A ²	-1502,21	1,570×10 ⁷	1	1,570×10 ⁷	12,61	0,0093	anlamlı
B ²	-1217,01	1,030×10 ⁷	1	1,030×10 ⁷	8,27	0,0238	anlamlı
Artık		8,717×10 ⁶	7	1,245×10 ⁶			
Uyumsuzluk		6,814×10 ⁶	3	2,271×10 ⁶	4,77	0,0826	anlamlı değil
Saf hata		1,903×10 ⁶	4	4,757×10 ⁵			
Toplam kor.		7,597×10 ⁷	12				
R² = 0,8852							

SS: kareler toplamı; df: serbestlik derecesi; MS: kareler ortalaması; F_{değeri} = MS_{faktör}/MS_{hata}; p_{değeri}: olasılık seviyesi.

Design-Expert programı kullanılarak ve Eşitlik 4.1'e dayanarak elde edilen üç boyutlu yüzey diyagramları Şekil 4.1'de verildi. Şekilde verilen bu grafiğin bir maksimumdan geçtiği görülmektedir. Grafikte bu maksimumdaki c-MWCNT ve Co₃O₄NP değerleri elektrodun hazırlanmasında yüzeye damlatılacak çözeltildeki optimum derişimleri

göstermektedir. Bu değerler, ANOVA'daki β katsayıları kullanılarak elde edilen 2. derece denklemin (Eşitlik 4.1) her bir değişken için türevi alınarak bir program yardımıyla hesaplandı. En yüksek amperometrik cevabın SPE yüzeyi 1 mL kitosanda 25 mg c-MWCNT ve 13,4 mg $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ içeren çözeltiden 5 μL ilave edilmesi ile modifiye edilen elektrotla elde edildiği görüldü. Elde edilen bu değerlerden yararlanarak NF/c-MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ /SPE sensörü hazırlandı. NF/MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ /SPE sensörünün hazırlanmasında da optimum MWCNT ve $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ değerleri olarak c-MWCNT ve $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ değerleri için elde edilen optimum değerler kullanıldı.



Şekil 4.1 NF/c-MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ /SPE sensörü için MKT ile elde edilen c-MWCNT ile $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ miktarlarının değişimini gösteren cevap yüzey grafiği

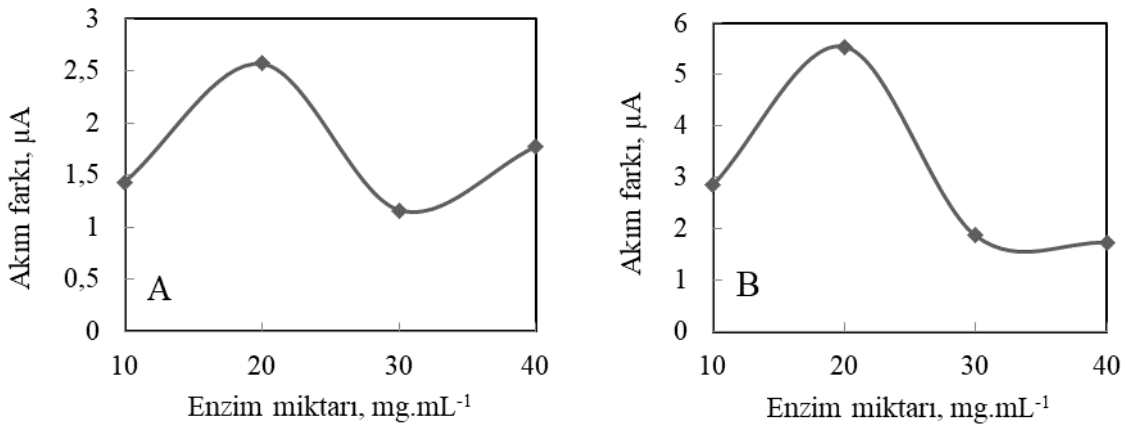
4.1.2 Enzim miktarının belirlenmesi

NF/DAO/c-MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ /SPE biyosensörünü hazırlamak amacıyla kullanılacak DAO miktarının optimizasyonunda tek seferde tek değişken yönteminden yararlanıldı. Enzim miktarının optimizasyonunda tek seferde tek değişken yönteminin kullanılmasının nedeni enzimlerin çok pahalı olmasıdır. DAO miktarı da MKT ile belirlemek istenseydi 2^3 -faktöriyel MKT ile 20 adet biyosensör hazırlanması ve bunların hepsi için enzim

kullanılması gerekecekti.

DAO miktarını optimize edebilmek için c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE yüzeyine DAO'nun farklı miktarlarının (10, 20, 30 ve 40 mg/mL) EDC-NHS yöntemi ile çapraz bağlanarak immobilize edilmesiyle oluşturulan biyosensörlerin (Bölüm 3.5) sabit derişimdeki spermin veya spermidine karşı amperometrik akım cevapları kaydedildi. Bu akım farkları enzim miktarlarına karşı grafiğe geçirilerek Şekil 4.2'de verildi. Şekil incelendiğinde, en yüksek akım farkının 20 mg/mL DAO kullanılarak hazırlanan biyosensör ile elde edildiği belirlendi. 10 mg/mL'lik enzim derişiminde akım farkının düşük çıkması biyosensör yüzeyindeki enzim miktarının yeterli olmadığını; 20 mg/mL'den yüksek enzim miktarlarının ise elektrot yüzeyindeki enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan ürünün elektrot yüzeyine difüzlenmesini güçleştiren bir bariyer oluşturmasından kaynaklandığı düşünüldü. Bu nedenle, 20 mg/mL enzim çözeltisi kullanılarak hazırlanan biyosensörün optimum miktarda enzim içerdiği kabul edildi ve tez çalışması boyunca enzim miktarı olarak bu değer kullanıldı.

NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörünün hazırlanmasında da NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörü için optimum değer olarak kabul edilen 20 mg/mL'lik enzim çözeltisi kullanıldı.



Şekil 4.2 Enzim miktarının NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE'nin akım cevabı üzerine etkisi

(A) spermin ve (B) spermidin (substrat derişimi: $1,0 \times 10^{-2}$ M; pH spermin için 8,5 ve spermidin için 9,0 BR tamponu; çalışma potansiyeli +0,7 V)

4.1.3 Prusya mavisi miktarının belirlenmesi

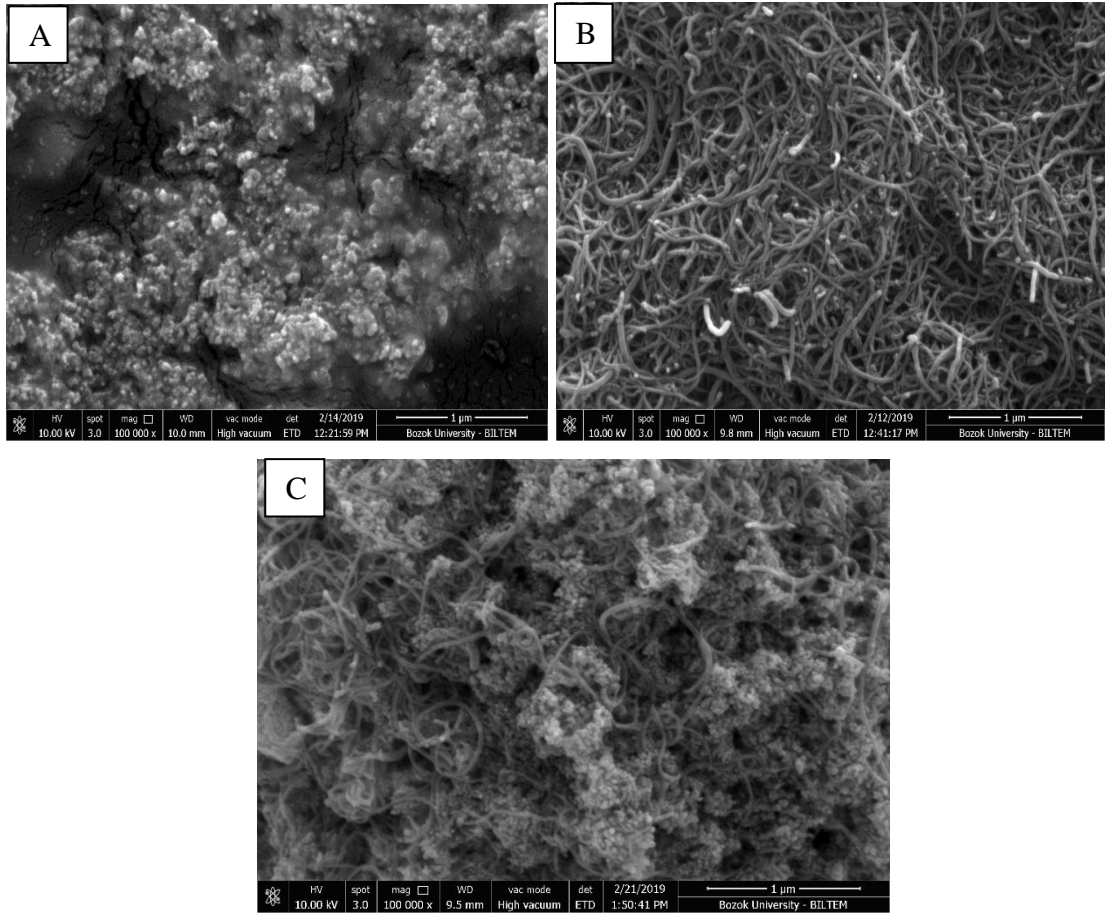
NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE sensörünün hazırlanmasında kullanılacak PM miktarı, tek seferde tek değişken yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla optimum miktarda MWCNT ve Co₃O₄NP içeren 1 mL kitosan ile pH değeri 7,0'a ayarlanmış BR tamponunda farklı derişimlerde (10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL) hazırlanan PM çözeltisi 1:1 oranlarında karıştırılarak elde edilen karışımlar kullanılarak üç adet NF/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE sensörü oluşturuldu. Bu sensör yüzeyine Bölüm 4.1.2'de belirlenen optimum miktardaki DAO immobilize edilerek hazırlanan biyosensörün hem spermin hem de spermidine karşı akım cevapları sabit substrat derişiminde ölçüldü. 10 mg/mL derişimdeki PM ile hazırlanan biyosensörde kararlı akım cevapları elde edilemedi. Ancak 20 mg/mL derişimdeki PM ile hazırlanan biyosensörde kararlı akım cevapları okundu. 30 mg/mL PM içeren çözelti ile hazırlanan biyosensörde ise yüzeyin kısa sürede bozulması nedeniyle bu miktarın uygun olmadığı sonucuna varıldı. Elektrot yüzeyinin PM ile modifiye edilmesinde ikinci bir yol olarak MWCNT-Co₃O₄NP/SPE sensör yüzeyine PM çözeltilerinin her birinden 3 µL damlatılarak MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE sensörü hazırlanmaya çalışıldı. Ancak sensör hazırlanması aşamasında bu modifikasyon malzemelerinin SPE yüzeyine iyi tutunmadığı ve yüzeyin deforme olduğu görüldü. Bu nedenle PM içeren sensör hazırlamada modifikasyon malzemelerinin karışımının kullanılmasının uygun olacağı sonucuna varıldı.

4.2 Yüzey Karakterizasyonu: c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE ve MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE

4.2.1 SEM görüntüleri ve EDX spektrumları

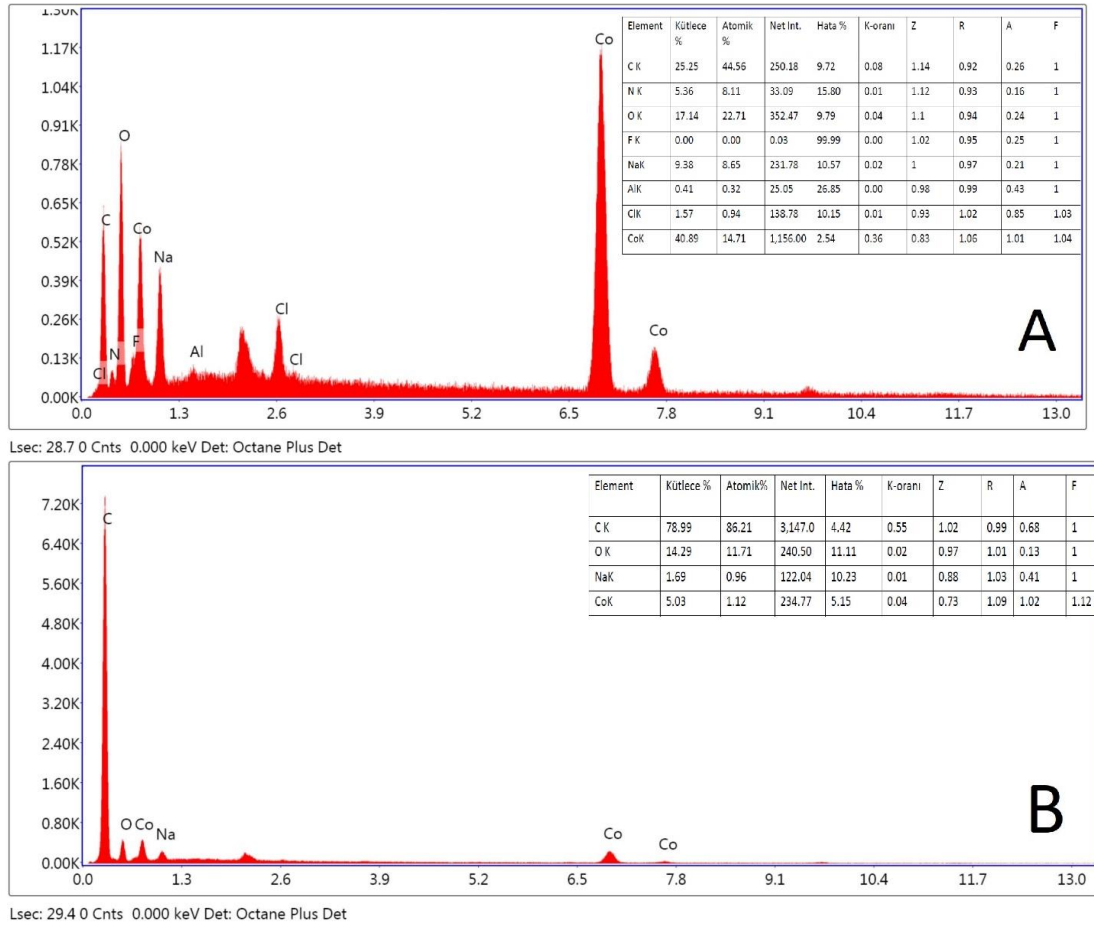
Çalışmada hazırlanan Co₃O₄NP-c-MWCNT/SPE sensörünün yüzey morfolojisini aydınlatmak ve her bir modifikasyon malzemesinin SPE yüzeyinde nasıl dağıldığını belirlemek için (A) Co₃O₄NP/SPE, (B) c-MWCNT/SPE ve (C) c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE sensörleri hazırlandı ve her birinin SEM görüntüsü alınarak Şekil 4.3'te verildi. SEM görüntüleri incelendiğinde, sadece Co₃O₄NP modifiye edilmiş SPE için alınan

SEM görüntüsünde (Şekil 4.3.A) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ 'lerinin SPE yüzeyinde homojen bir şekilde dağıldığı görüldü. c-MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ karışımı kullanılarak modifiye edilmiş SPE ile alınan SEM görüntüsünde (Şekil 4.3.C) ise, c-MWCNT için elde edilen ipliksi yapının (Şekil 4.3.B) daha az görülmesinin, c-MWCNT boşluklarının $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ ile doldurulmasından kaynaklandığı düşünüldü. Sonuç olarak hem $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ ve c-MWCNT hem de bunların karışımının elektrot yüzeyinde homojen bir şekilde dağıldığı görüldü. Ayrıca, c-MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ /SPE yüzeyinde gözlenen gözenekli yapının enzim immobilizasyonu için uygun bir yüzey sağlayacağı sonucuna varıldı.



Şekil 4.3 (A) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ /SPE, (B) c-MWCNT/SPE ve (C) c-MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ /SPE sensör yüzeyleri için SEM görüntüleri

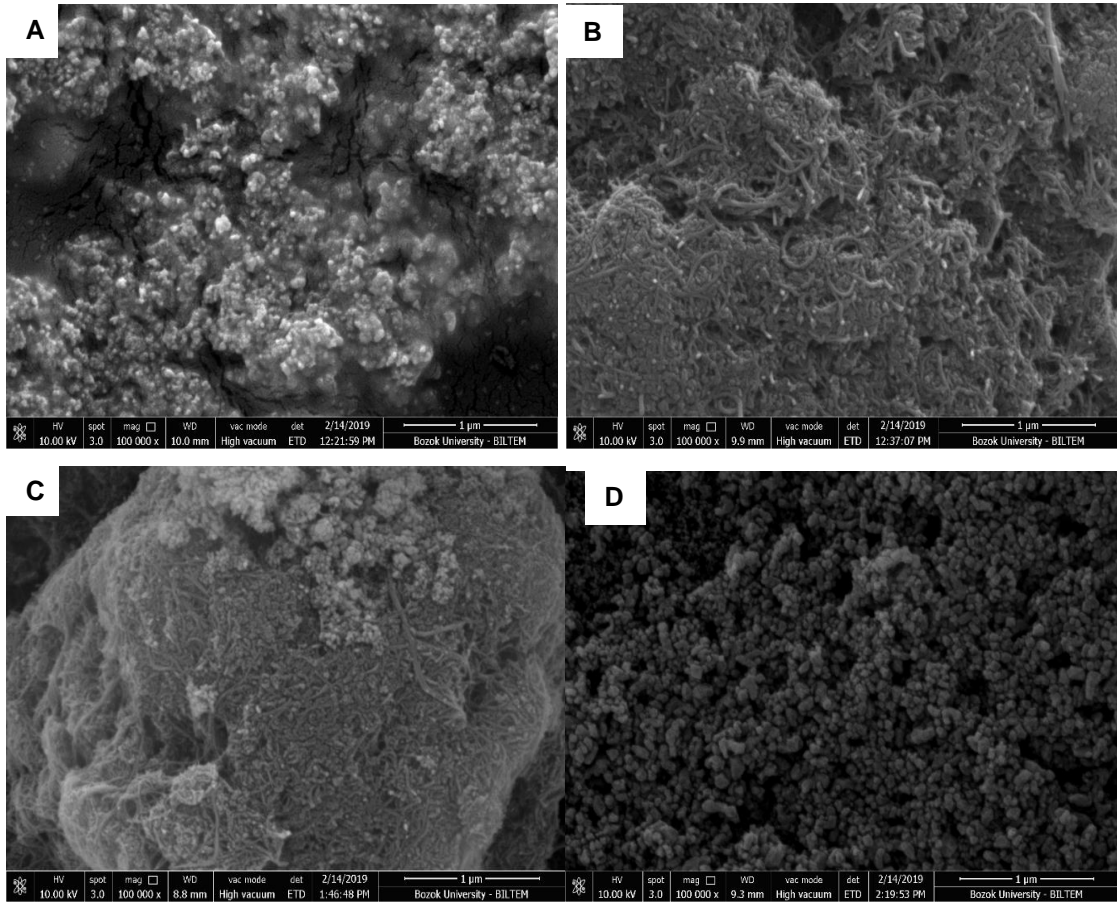
SEM analizlerini desteklemek için (A) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{SPE}$ ve (B) $c\text{-MWCNT-Co}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{SPE}$ sensör yüzeylerinin EDX spektrumları kaydedildi ve elementel analiz çizelgesi ile birlikte Şekil 4.4’de verildi. EDX spektrumunda gözlenen kobalt pikleri sensör yüzeyinde $c\text{-MWCNT}$ ile birlikte $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ ’nin de bulunduğunu gösterdi.



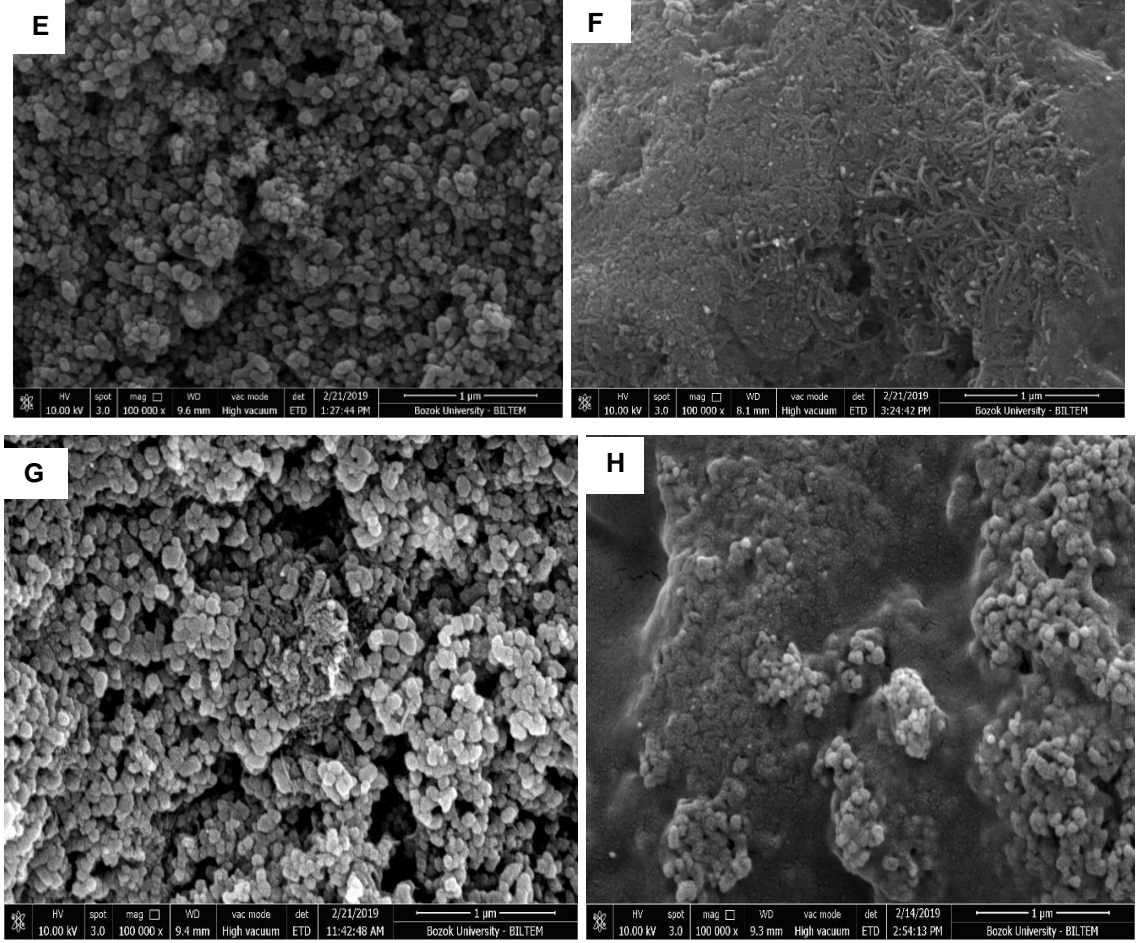
Şekil 4.4 (A) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{SPE}$ ve (B) $c\text{-MWCNT-Co}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{SPE}$ sensör yüzeyleri için EDX spektrumları ve elementel bileşim çizelgeleri

$\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-MWCNT-PM}/\text{SPE}$ sensörünü hazırlamada kullanılan malzemelerin ($\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$, MWCNT, PM) ve bunların ikili veya üçlü karışımlarının SPE yüzeyinde homojen olarak dağılıp dağılmadığını görebilmek ve enzim immobilizasyonu sonrasında oluşturulan biyosensör yüzeyindeki DAO'nun dağılımını belirlemek amacıyla (A) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{SPE}$, (B) MWCNT/SPE, (C) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-MWCNT}/\text{SPE}$, (D) PM/SPE, (E) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-PM}/\text{SPE}$, (F) MWCNT-PM/SPE, (G) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-MWCNT-PM}/\text{SPE}$ sensörlerinin ve (H) DAO/ $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-MWCNT-PM}/\text{SPE}$ biyosensörünün SEM

görüntüleri alındı ve Şekil 4.5’de verildi. Şekil 4.3.B’deki yüzey morfolojisinin ipliksi yapıda olması hem bu şekildeki MWCNT’nin hem de Şekil 4.5.B’deki c-MWCNT’nin karakteristik bir görüntüsüdür. Diğer SEM görüntülerinde bu ipliksi yapının daha az görülmesinin $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ ’nin ve PM’nin ipliksi yapıyı azaltacak şekilde gözeneklere dolmasından kaynaklandığı düşünüldü. Her bir elektrotta diğer malzemelere ait olan SEM görüntüleri incelendiğinde, modifikasyon malzemelerinin ayrı ayrı elektrot yüzeyinde ilgili malzemeye özgü yüzey morfolojisini gösterdiği ve yüzeyde homojen bir şekilde dağıldığı gözlemlendi. Ayrıca, $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ -MWCNT-PM/SPE yüzeyinde gözlenen gözenekli yapının enzim immobilizasyonu için uygun bir ortam sağladığı düşünüldü. Şekil 4.5.H’de de DAO enziminin sensör yüzeyinde homojen bir şekilde dağılarak biyosensörün oluştuğu gözlemlendi.

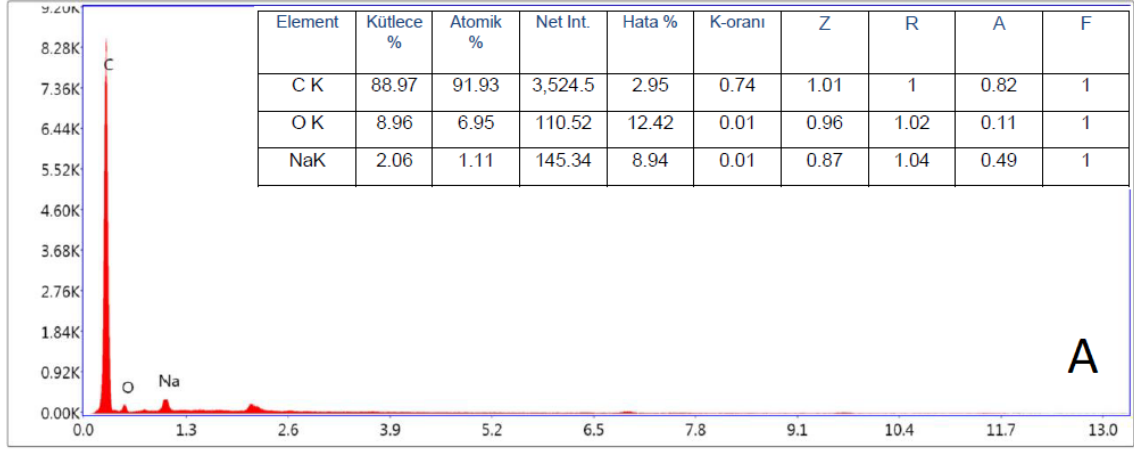


Şekil 4.5 (A) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ /SPE, (B) MWCNT/SPE, (C) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ -MWCNT/SPE, (D) PM/SPE, (E) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ -PM/SPE, (F) MWCNT-PM/SPE, (G) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ -MWCNT-PM/SPE sensör yüzeyleri için ve (H) DAO/ $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ -MWCNT-PM/SPE biyosensör yüzeyi için SEM görüntüleri

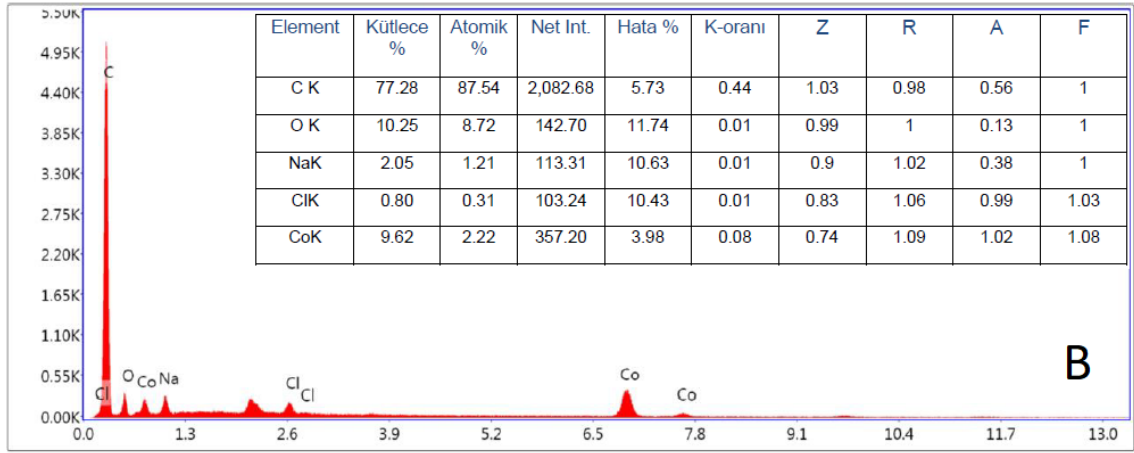


Şekil 4.5 (A) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{SPE}$, (B) MWCNT/SPE , (C) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-MWCNT}/\text{SPE}$, (D) PM/SPE , (E) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-PM}/\text{SPE}$, (F) $\text{MWCNT-PM}/\text{SPE}$, (G) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-MWCNT-PM}/\text{SPE}$ sensör yüzeyleri için ve (H) $\text{DAO}/\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-MWCNT-PM}/\text{SPE}$ biyosensör yüzeyi için SEM görüntüleri (devam)

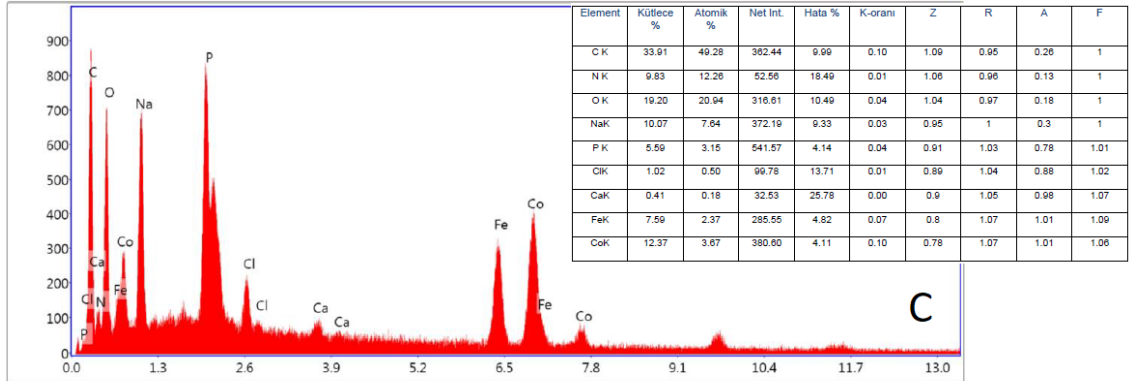
SEM görüntülerini desteklemek ve her bir modifikasyon malzemesinin yüzeyde bulunduğunu göstermek amacıyla (A) MWCNT/SPE , (B) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-MWCNT}/\text{SPE}$ ve (C) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-MWCNT-PM}/\text{SPE}$ sensörlerinin EDX spektrumları alındı ve elementel analiz çizelgeleri ile birlikte Şekil 4.6'da verildi. Spektrumlarda karbon pikine ilave olarak gözlenen Fe ve Co pikleri de $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-MWCNT-PM}$ kompozitinin SPE yüzeyine başarılı bir şekilde modifiye edildiğini destekledi.



Lsec: 29.6 0 Cnts 0.000 keV Det: Octane Plus Det



Lsec: 29.3 0 Cnts 0.000 keV Det: Octane Plus Det



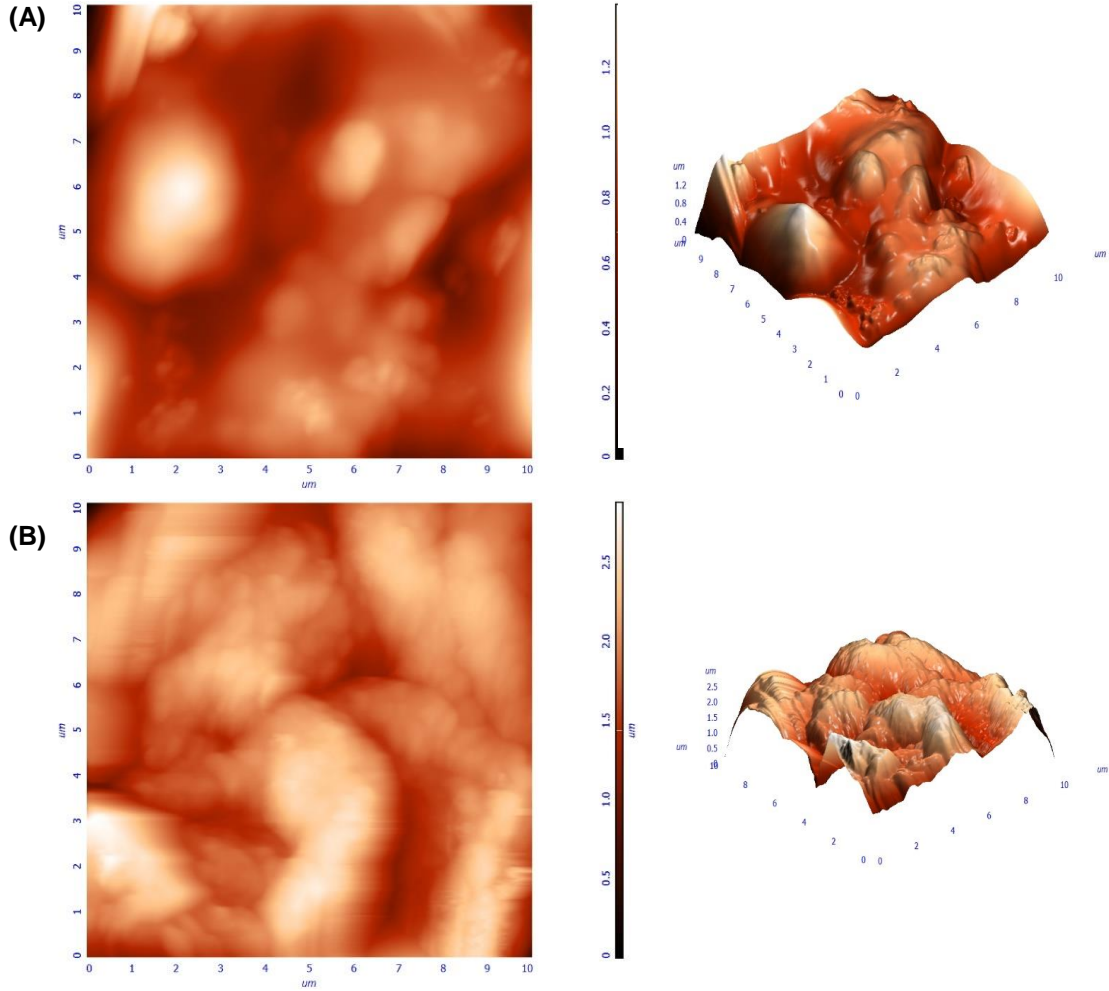
Lsec: 28.5 0 Cnts 0.000 keV Det: Octane Plus Det

Şekil 4.6 (A) MWCNT/SPE, (B) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-MWCNT/SPE}$ ve (C) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-MWCNT-PM/SPE}$ sensor yüzeyleri için EDX spektrumları ve elementel bileşim çizelgeleri

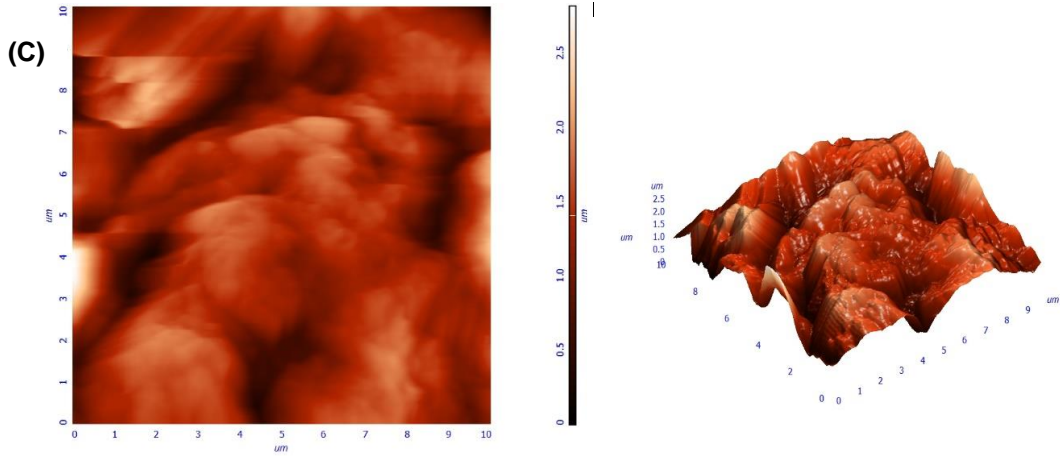
4.2.2 AFM görüntüleri

Elektrot yüzeylerinin pürüzlü yapısı ile modifikasyon malzemelerinin yüzeyde oluşturduğu ortalama kalınlığı belirlemek ve SEM görüntülerinden elde edilen verilerle

karşılaştırmak amacıyla (A) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{SPE}$, (B) $\text{c-MWCNT}/\text{SPE}$ ve (C) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{c-MWCNT}/\text{SPE}$ sensörlerinin AFM görüntüleri alındı ve Şekil 4.7’de verildi. Bu görüntüler incelendiğinde modifikasyon malzemelerinin SPE yüzeyinde hemen hemen homojen olarak dağıldığı gözlemlendi. Sadece $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ ile modifiye edilen SPE yüzeyinin maksimum kalınlığının sadece c-MWCNT ile modifiye edilenden daha düşük olduğu saptandı. $\text{c-MWCNT-Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ karışımı ile modifiye edilen elektrotta maksimum kalınlığın sadece c-MWCNT ile elde edilen kalınlık ile yaklaşık aynı olması $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ ’lerinin c-MWCNT iplikçiklerinin arasını doldurduğu şeklinde yorumlandı. Bu bulgu ve yüzeyin pürüzlülük durumu SEM görüntüleri ile uyum halindedir.

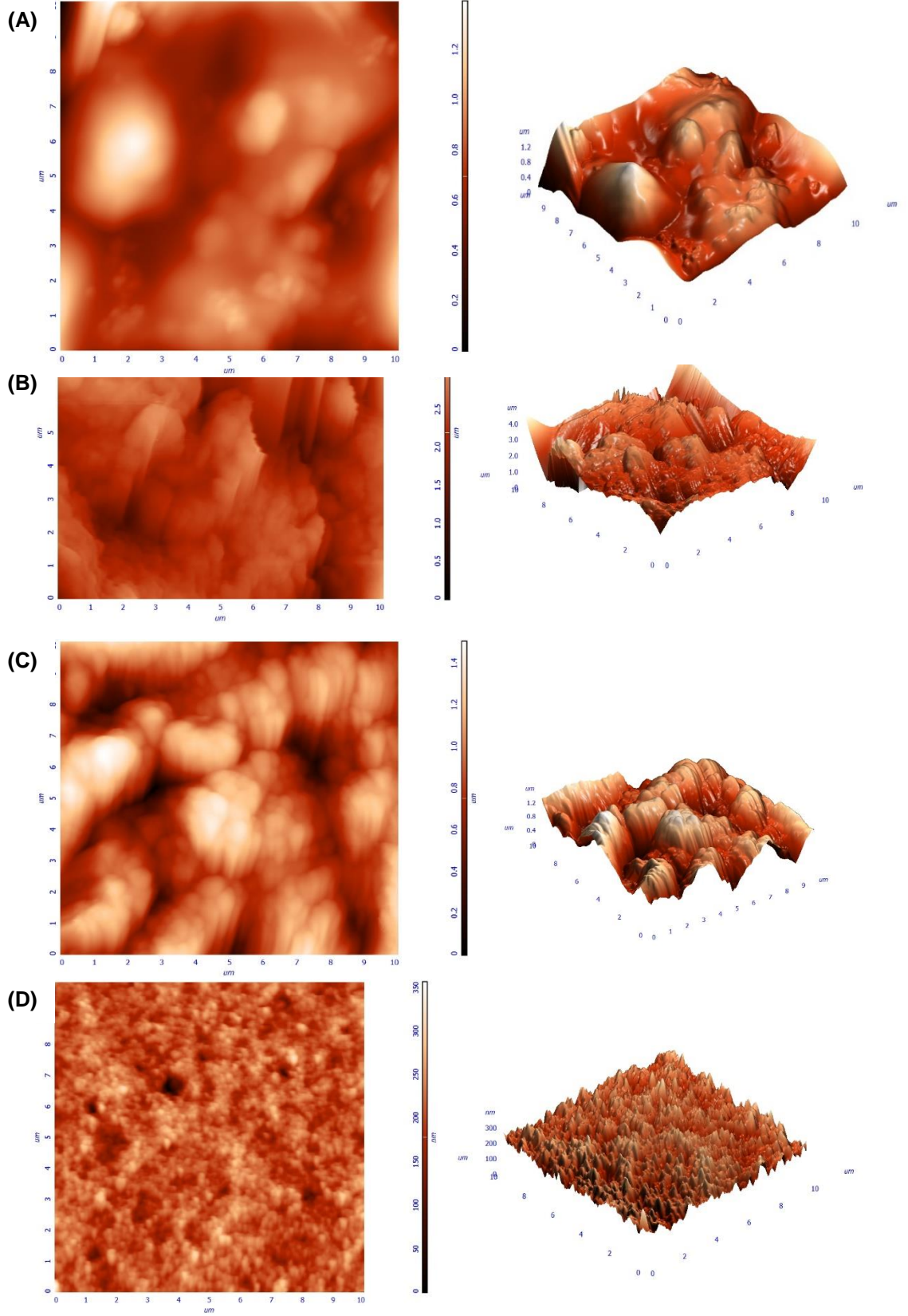


Şekil 4.7 (A) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{SPE}$, (B) $\text{c-MWCNT}/\text{SPE}$ ve (C) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{c-MWCNT}/\text{SPE}$ yüzeylerinin AFM görüntüleri

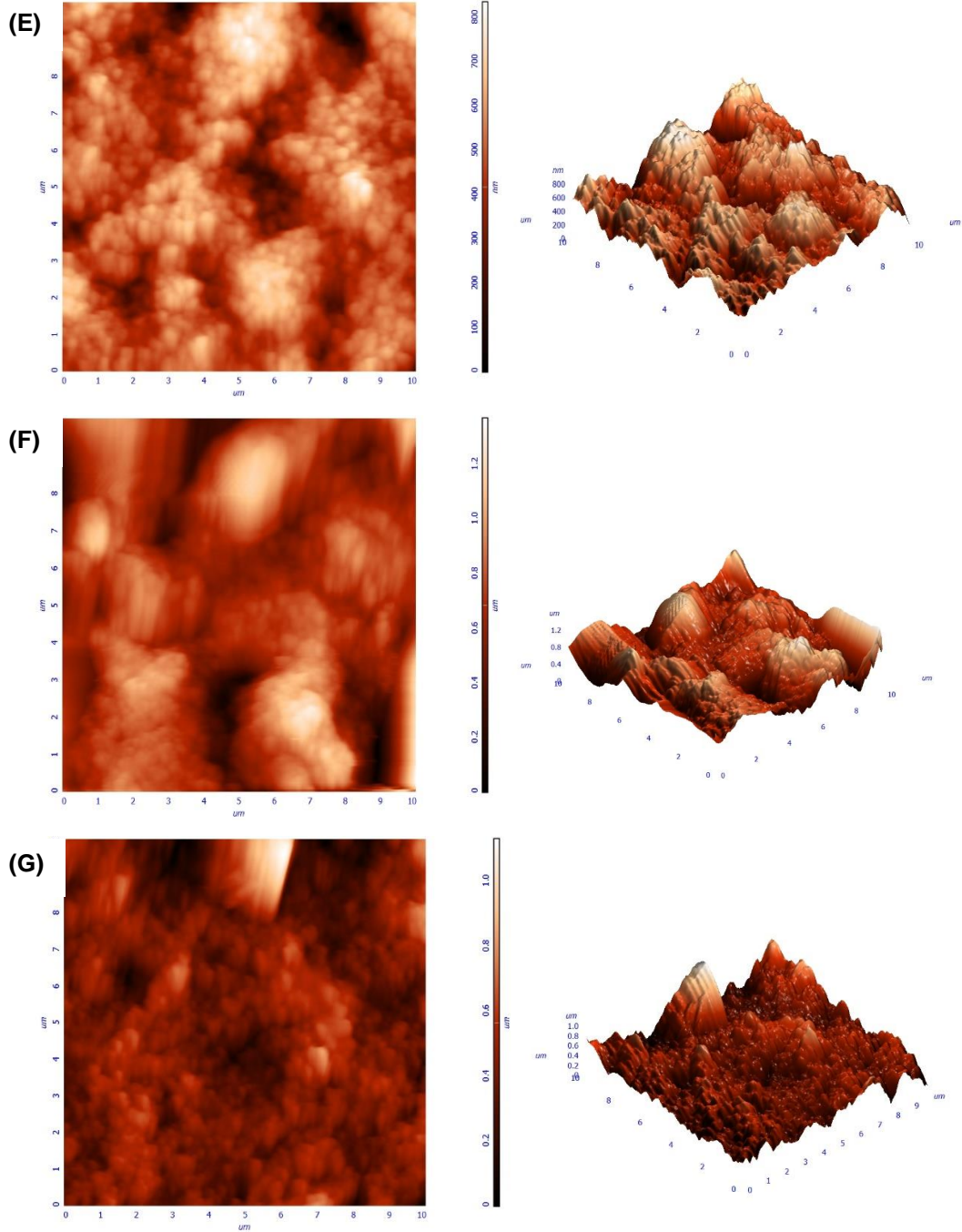


Şekil 4.7 (A) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP/SPE}$, (B) c-MWCNT/SPE ve (C) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP/c-MWCNT/SPE}$ yüzeylerinin AFM görüntüleri (devam)

NF/DAO/ $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-MWCNT-PM/SPE}$ biyosensörünün hazırlanmasında kullanılan $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$, MWCNT ve PM modifikasyon malzemelerinin yüzey pürüzlülüğünü nasıl etkilediği ve yüzeyde homojen olarak dağılıp dağılmadığını belirlemek amacıyla (A) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP/SPE}$, (B) MWCNT/SPE, (C) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-MWCNT/SPE}$, (D) PM/SPE, (E) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-PM/SPE}$, (F) MWCNT-PM/SPE ve (G) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-MWCNT-PM/SPE}$ sensörlerinin AFM görüntüleri alındı ve Şekil 4.8’de verildi. Şekillerde belirtilen sol taraftaki düzlemsel görüntüler modifikasyon malzemelerinin yüzeyde homojen olarak dağıldığının göstergesidir. Bu AFM görüntülerinde de sadece $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ modifiye edilmiş elektrottaki modifikasyon malzemesinin maksimum kalınlığının sadece MWCNT ile modifiye edilmiş elektrottan daha düşük olduğu gözlenmiş ve bu durumun c-MWCNT için elde edilen ile uyumlu olduğu görülmüştür. MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ karışımı ile modifiye edilmiş elektrotta modifikasyon malzemesinin maksimum kalınlığının düşmesi $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ ’lerin MWCNT içine girdiğinin göstergesidir. AFM görüntüsü A ile AFM görüntüsü E’nin karşılaştırılması karışım hazırlanırken PM çözeltisinin kullanılmasından dolayı $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ gözeneklerinin tamamen PM tanecikleri ile dolduğunu göstermektedir. Bu durumu PM/SPE’nin D’de verilen AFM görüntüsü de desteklemektedir. F’de verilen MWCNT-PM/SPE’nin maksimum kalınlığının düşmesi bu modifikasyon malzemesi karışımının hazırlanmasında PM çözeltisinin kullanılması ve gözeneklerin tamamen dolması ile açıklanabilir. G görüntüsü, üç modifikasyon malzemesi olan MWCNT, $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ ve PM’nin bir arada SPE yüzeyinin modifikasyonunda yüzeyin kalınlığının oldukça düşük olmasına neden olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.8 (A) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{SPE}$, (B) MWCNT/SPE , (C) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-MWCNT}/\text{SPE}$, (D) PM/SPE , (E) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-PM}/\text{SPE}$, (F) $\text{MWCNT-PM}/\text{SPE}$, (G) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-MWCNT-PM}/\text{SPE}$ sensör yüzeylerinin AFM görüntüleri



Şekil 4.8 (A) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{SPE}$, (B) MWCNT/SPE , (C) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-MWCNT}/\text{SPE}$, (D) PM/SPE , (E) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-PM}/\text{SPE}$, (F) $\text{MWCNT-PM}/\text{SPE}$, (G) $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP-MWCNT-PM}/\text{SPE}$ sensör yüzeylerinin AFM görüntüleri (devam)

Sadece $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ ile modifiye edilmiş elektrot ve MKT ile belirlenmiş optimum miktarlarda hazırlanmış olan c-MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ karışımı ile modifiye edilmiş elektroda ait AFM görüntüleri Şekil 4.8'de görülmektedir. Görüntülerden de anlaşıldığı gibi, elektrot yüzeyine yapılan modifikasyon oldukça kalın bir tabaka halindedir.

Duyarlık ve çalışma aralığı açısından yüksek performans sunan bu elektrot için, bu kalınlık bir dezavantajdır. Bu nedenle elektrot dayanıklılığını azalttığı sonucuna varılmıştır.

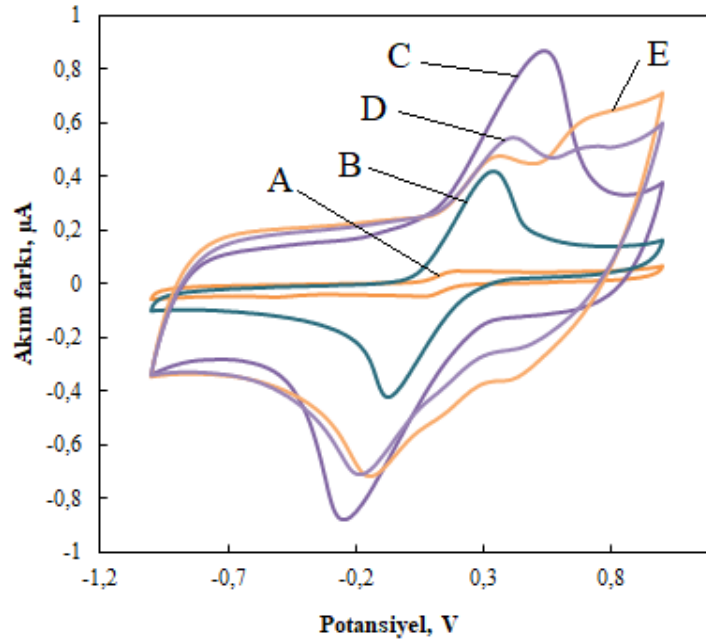
4.3 Elektrokimyasal Karakterizasyon: c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE ve MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE

4.3.1 Dönüşümlü voltammogramlar

NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörünün hazırlanmasında kullanılan üç modifikasyon malzemesinin SPE'nin elektrokimyasal davranışına nasıl etki ettiğini belirlemek için (A) SPE, (B) NF/Co₃O₄NP/SPE, (C) NF/c-MWCNT/SPE, (D) NF/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE sensörleri ve (E) NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörü için dönüşümlü voltammogramlar 0,1 M KCl içeren 5 mM redoks probunda 100 mV/s tarama hızında alındı ve Şekil 4.9'da verildi. SPE yüzeyi Co₃O₄NP ile modifiye edildiğinde (voltammogram B) SPE'ye göre pik akımlarının arttığı gözlemlendi. Bu durumun Co₃O₄NP varlığında elektrodun yüzey alanının artması ve Co₃O₄NP'nin iletkenliği artırmasından kaynaklandığı düşünüldü. SPE yüzeyine sadece c-MWCNT kaplandığında akımın daha fazla artması, yüzey alanının artmasının yanı sıra c-MWCNT iletkenliğinin yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Söz konusu iki modifikasyon malzemesi bir arada iken elde edilen voltammogram C'de pik akımlarının sadece c-MWCNT ile modifiye edilen elektrodunkinden daha düşük; ancak sadece Co₃O₄NP olandan daha yüksek olması c-MWCNT gözeneklerine Co₃O₄NP'lerinin girerek yüzey alanının azalmasından kaynaklandığı şeklinde yorumlandı. NF/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE yüzeyine DAO immobilize edildiğinde oluşan biyosensör ile, ilgili sensörünkenden daha düşük akımın elde edilmesinin nedeninin protein yapısındaki büyük moleküllü DAO'nun elektrot yüzeyini kaplaması ve yüzey alanını azaltması olduğu düşünüldü.

Şekil 4.9'daki voltammogramlardaki piklerin potansiyellerinden yararlanarak her bir sensör ve ilgili biyosensör için ΔE_{pik} değerleri hesaplandı ve (A) SPE için 270 mV, (B) NF/Co₃O₄NP/SPE için 410 mV, (C) NF/c-MWCNT/SPE için 790 mV, (D) NF/c-

MWCNT-Co₃O₄NP/SPE için 530 mV ve (E) NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörü için 610 mV olarak bulundu. SPE elektrodu için en düşük ΔE_{pik} değeri bulunmasına rağmen pik akımlarının çok düşük olduğu görüldüğünden elektrodun modifiye edilerek bu pik akımlarının artırılması hedeflendi. Ancak modifikasyonda kullanılan Co₃O₄NP ve c-MWCNT optimum miktarları çok yüksek olduğundan elektrot yüzeyinde kalın bir tabaka oluşması nedeniyle ΔE_{pik} değerlerinde bir artış görüldü. Bu da elektron aktarım hızının yavaşladığının bir göstergesi olarak kabul edildi. B, C ve D elektrotlarında ΔE_{pik} 'lerin değişiminin modifikasyon malzemelerinin yüzey kalınlığına etkisini belirleyen AFM görüntüleri ile uyumlu olduğu görüldü. Ancak bu artışın dezavantajı yanında pik akımlarının yükselmesinin elektrot duyarlılığı üzerinde önemli etkisi olduğundan elektrot modifikasyonunun yukarıda belirtildiği şekilde yapılacağı sonucuna varıldı. Biyosensör oluşturmada kullanılan DAO'nun NF/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE yüzeyine immobilize edilmesi sonucunda ise ΔE_{pik} değerinde önemli bir azalma görülmesi bu şekilde hazırlanan biyosensörün elektron aktarım hızı açısından bir avantajı olarak değerlendirildi.

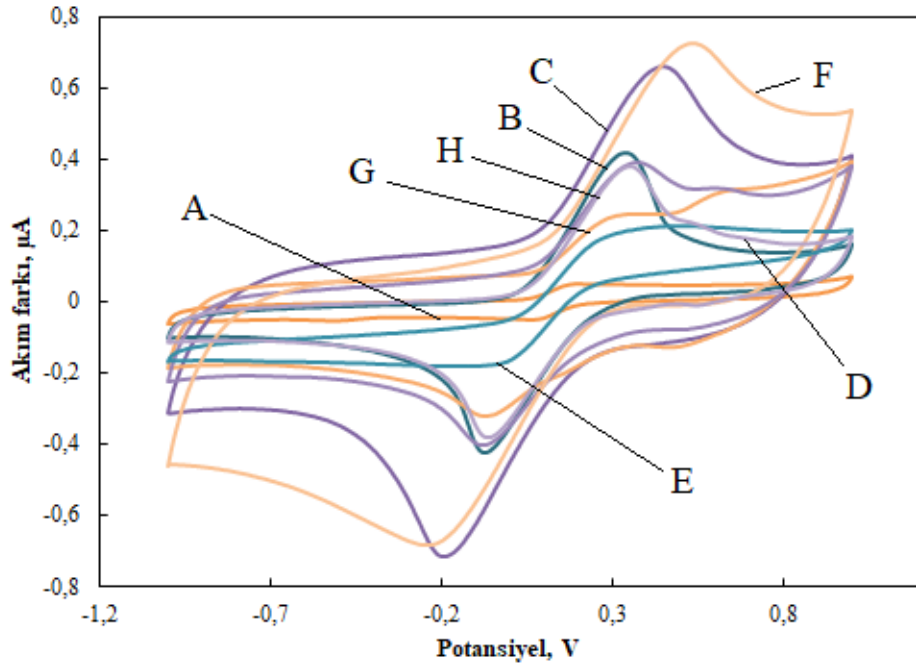


Şekil 4.9 (A) SPE, (B) NF/Co₃O₄NP/SPE, (C) NF/c-MWCNT/SPE, (D) NF/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE sensörleri ve (E) NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörü için dönüşümlü voltammogramlar (tarama hızı 100 mV/s; 0,1 M KCl içeren 5 mM redoks probu)

NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörü hazırlanması için elektrot modifikasyonunda kullanılan her bir malzemenin biyosensörün akım miktarı üzerine

etkisini belirlemek için (A) SPE, (B) NF/Co₃O₄NP/SPE, (C) NF/MWCNT/SPE, (D) NF/MWCNT-Co₃O₄NP/SPE, (E) NF/PM/SPE (F) NF/MWCNT-PM/SPE, (G) NF/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE sensörleri ve (H) NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörünün redoks probunda, 100 mV/s tarama hızında dönüşümlü voltammogramları alındı.

Şekil 4.10'da verilen voltammogramlardaki piklerin potansiyellerinden yararlanarak ΔE_{pik} değerleri hesaplandı ve (A) SPE için 270 mV, (B) NF/Co₃O₄NP/SPE için 410 mV, (C) NF/MWCNT/SPE için 640 mV, (D) NF/MWCNT-Co₃O₄NP/SPE için 440 mV, (E) NF/PM/SPE için 630 mV, (F) NF/MWCNT-PM/SPE için 760 mV, (G) NF/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE için 720 mV ve (H) NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE için 470 mV olarak bulundu. Bu değerler incelendiğinde Co₃O₄NP içeren sensörlerden B ve D sensörlerinin ΔE_{pik} değerlerinin PM içeren E, F, G sensörlerinininkine göre oldukça yüksek olduğu gözlemlendi. NF/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE sensörüne DAO immobilize edilerek oluşan biyosensörde ise bu değerlerin oldukça düştüğü ve bu biyosensörün de elektron aktarım hızının diğer modifiye elektrotların pek çoğundan iyi olduğu belirlendi. Bu sensörlerde de ΔE_{pik} değerlerinin SPE'nin ΔE_{pik} değerinden çok yüksek bulunmasının elektrot modifikasyonu sırasında kullanılan malzemelerin miktarlarının fazla olup yüzeyde kalın bir tabaka oluşturması ve elektron aktarımını güçleştirmesinden kaynaklandığı değerlendirildi. Bu veriler AFM ile elde edilen malzeme kalınlıkları ile tam olarak uyuşmamaktadır. Ancak c-MWCNT, Co₃O₄NP ve c-MWCNT-Co₃O₄NP ile modifiye edilen elektrotlar için elde edilen sonuçlar MWCNT, Co₃O₄NP ve MWCNT-Co₃O₄NP ile elde edilen elektrotların yüzey kalınlıkları- ΔE_{pik} değerleri ile uyum halindedir. Diğer taraftan yüzeye bu modifikasyon malzemeleri ile birlikte PM girdiğinde, elektrodun hazırlanma şekli nedeniyle PM/SPE, MWCNT-PM/SPE ve MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE için gözenekli yapının kompakt bir yapıya dönüşmesi nedeniyle bu ilişkinin kendi arasında uyumlu olduğu ancak PM içermeyen elektrotlarla uyumlu olmadığı düşünüldü. Sonuç olarak, elektrodun aktarım hızının hem elektrot yüzeyindeki modifikasyon malzemelerinin oluşturduğu kalınlığa hem de oluşan yüzeyin kompakt olup olmamasına bağlı olduğu söylenebilir.



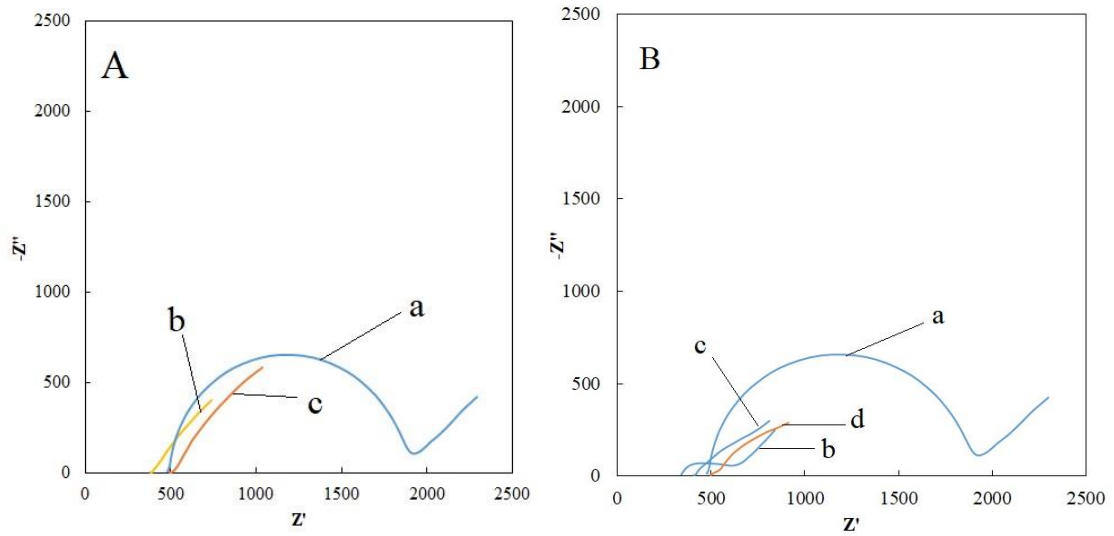
Şekil 4.10 (A) SPE, (B) NF/Co₃O₄NP/SPE, (C) NF/MWCNT/SPE, (D) NF/MWCNT-Co₃O₄NP/SPE, (E) NF/PM/SPE (F) NF/MWCNT-PM/SPE, (G) NF/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE sensörleri ve (H) NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörü için dönüşümlü voltammogramlar (tarama hızı 100 mV/s; 0,1 M KCl içeren 5 mM redoks probu)

Şekil 4.9 ve 4.10'daki c-MWCNT/SPE ($\Delta E_{\text{pik}} = 790$ mV) ile MWCNT/SPE ($\Delta E_{\text{pik}} = 640$ mV) ve c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE ($\Delta E_{\text{pik}} = 530$ mV) ile MWCNT-Co₃O₄NP/SPE ($\Delta E_{\text{pik}} = 440$ mV) elektrotları için ΔE_{pik} değerleri karşılaştırıldığında, c-MWCNT modifiye sensörlerin ΔE_{pik} değerlerinin daha yüksek olması, sensör yüzeyinde bulunan c-MWCNT'daki -COOH grubunun iyonlaşması ile yüzeyin negatif yüklenmesine ve redoks probunda bulunan negatif yüklü ferro/ferrisiyanür ([Fe(CN)₆]^{-3/4}) iyonlarının elektrot yüzeyine ulaşmasını kısmen engellemesi şeklinde yorumlandı. Literatürde farklı tipte sensörler için de benzer sonuçlara rastlanmaktadır (Lu vd.2022).

4.3.2 Elektrokimyasal empedans spektroskopisi verileri

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi modifiye elektrotlarda kullanılan modifikasyon malzemelerinin çözelti/elektrot arayüzeyinde yük aktarım direncine etkisini belirlemek için yaygın kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE ve NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörlerinin oluşturulmasında

kullanılan c-MWCNT-Co₃O₄NP ile DAO'nun ve PM ile MWCNT-Co₃O₄NP-PM ve DAO'nun SPE/çözelti arayüzündeki direnci nasıl değiştirdiğini göstermek için EIS ölçümleri yapıldı ve elde edilen Nyquist eğrileri Şekil 4.11.A ve B'de verildi. Nyquist eğrileri, yarım daire şeklinde ve doğrusal olmak üzere iki bölgeden oluşur. Yüksek frekanslarda yarım daire bölgesi sınırlı elektron aktarımını gösterirken, düşük frekanslarda doğrusal bölge ise, difüzyonu ifade eder. Yarım daire bölgesinin yarıçapı, elektrot ile çözeltinin arayüzündeki elektron aktarım direnci hakkında bilgi taşır (Park vd. 2006).



Şekil 4.11 Nyquist eğrileri: (A) a. SPE, b. c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE ve c. DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE (B) a. SPE, b. PM/SPE c. MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE ve d. DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE (0,1 M KCl içeren 5 mM redoks probu)

Bu eğriler incelendiğinde SPE için belirgin bir yarım daire elde edildiği ve bunun için çözelti/elektrot arayüzündeki yük aktarım direncinin yüksek olduğu gözlemlendi. Ancak SPE yüzeyi c-MWCNT-Co₃O₄NP veya MWCNT-Co₃O₄NP-PM ile modifiye edildiğinde yarım dairenin bulunmaması yük aktarım direncinin modifikasyon sonrası oldukça düştüğünü gösterdi. Literatür incelendiğinde protein yapılı enzim moleküllerinin elektrot yüzeyine immobilizasyonu sonucunda yük aktarım direncinde genellikle artış olduğu ve Nyquist eğrilerinde iyi tanımlanmış yarım dairelerin elde edildiği görülmektedir (Park vd. 2006). Bu çalışmada ise, her iki elektrot yüzeyine de enzim immobilize edildiğinde dirençte belirgin bir şekilde düşmenin gözlenmemesi,

modifikasyon malzemelerinin yüzeydeki miktarlarının DAO miktarına göre oldukça yüksek olması ve elektron aktarımında bariyer oluşturabilecek kadar elektrot/çözelti arayüzeyindeki direnci etkilememesi şeklinde yorumlandı.

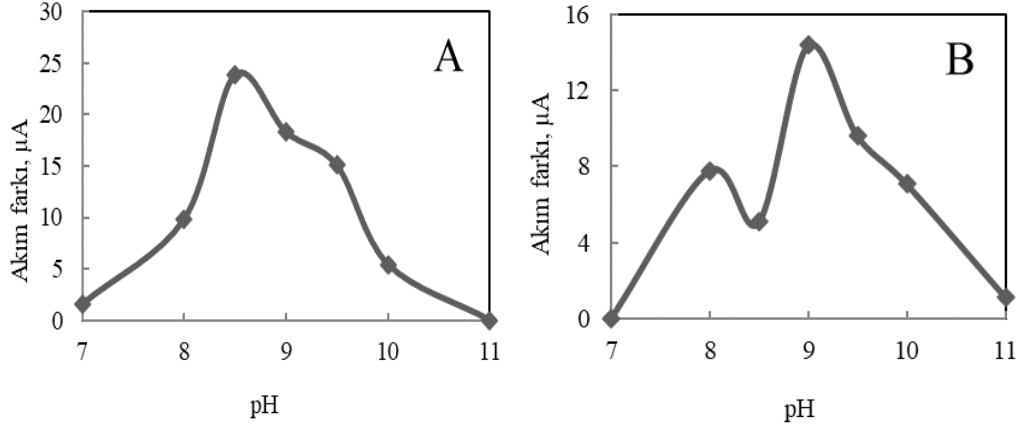
4.4 NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE Biyosensörü ile İlgili Çalışmalar

4.4.1 Optimum deney koşullarının belirlenmesi

Çalışma potansiyeli: Bu tez çalışmasında geliştirilen NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörü için uygun çalışma potansiyeli +0,7 V olarak seçildi. Bu potansiyelin seçilmesinin nedeni, spermin ve spermidin biyojenik aminlerinin elektrot yüzeyindeki enzimatik reaksiyonu sonucu H₂O₂ oluşması ve H₂O₂'in yükseltgenmesine dayanarak yapılan tayinlerde +0,7 V gibi yüksek potansiyellerin yaygın bir şekilde kullanılmasıdır (Koppang vd. 1999). Bu durum dikkate alınarak çalışma potansiyeli optimizasyonunda daha ayrıntılı bir çalışma yapılması düşünülmüdü.

pH optimizasyonu: Enzimlere dayalı biyosensörlerin etkin bir şekilde kullanılması ortam pH'sına bağlıdır. Bu nedenle hazırlanan biyosensörlerin optimum çalışma pH'sının belirlenmesi gereklidir. DAO enzimi ile oluşturulan biyosensörler ile genellikle pH 7-10 aralığında çalışılabilmektedir (Apetrei vd. 2016). Bu çalışmada optimum bileşimde hazırlanan NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörünün amperometrik akım cevabı BR tampon çözeltisinin pH'sı 7-11 arasında 0,5 birim değiştirilerek 7 farklı pH'da hem spermin hem de spermidin için ayrı ayrı sabit biyojenik amin derişiminde ölçüldü. Elde edilen akım farklarının pH ile değişimi grafiğe geçirildi ve Şekil 4.12'de verildi. Spermine ait Şekil 4.12.A incelendiğinde pH 8,5'a kadar akım farkının arttığı, pH 8,5'tan sonra ise azaldığı görülmektedir. Buna dayanarak optimum çalışma pH'sı spermin için 8,5 olarak seçildi. Şekil 4.12.B'de görüldüğü gibi spermidin için ise biri pH 8,5'da diğeri pH 9'da olmak üzere iki maksimum elde edildi ancak pH 9'daki akım farkının daha yüksek olması nedeniyle spermidin için optimum pH'nın 9 olarak seçilmesine karar verildi. Literatürde spermin

ve spermidin için sensör/biyosensör çalışmalarında optimum pH'ların pH 6,7 ila pH 10 arasında olduğu gözlemlendi (Boffi vd. 2015, Koppang vd. 1999).



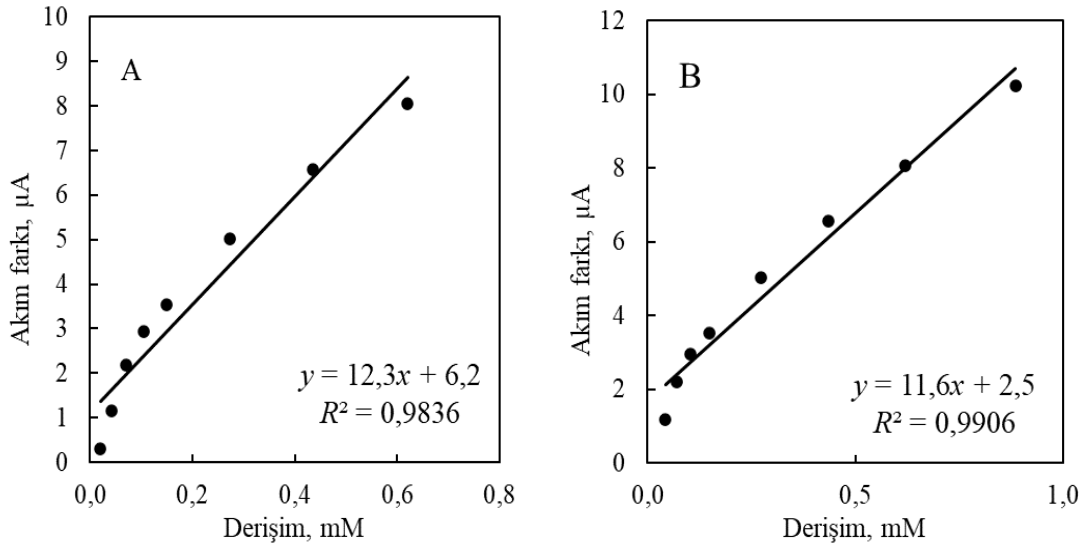
Şekil 4.12 NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörünün amperometrik cevabına pH'nın etkisi A. Spermin ve B. Spermidin (BR tamponunda biyojenik amin derişimi: 0,01 M; çalışma potansiyeli: +0,7 V)

4.4.2 Performans faktörlerinin belirlenmesi

NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörünün doğrusal çalışma aralığı, duyarlık, gözlenebilme sınırı (LOD), alt tayin sınırı (LOQ), tekrar üretilebilirlik, cevap süresi, çalışma kararlılığı, seçicilik ve çeşitli türlerin girişim etkileri gibi performans faktörleri hem spermin hem de spermidin için ayrı ayrı belirlendi. Ayrıca enzimsiz sensörün spermin ve spermidin cevabı da incelendi. Co₃O₄NP'nin biyosensör cevabına etkisi belirlemek amacıyla da NF/DAO/c-MWCNT/SPE biyosensörü hazırlandı ve bunun spermin ile spermidine cevapları da araştırıldı. Son olarak optimum bileşimdeki biyosensörün gerçek numunelerde spermin ve spermidin tayinine uygulanabilirliği incelendi.

NF/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE sensörünün spermin ve spermidin cevabı: Bölüm 3.5'de anlatıldığı şekilde hazırlanan NF/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE sensörü kullanılarak biyosensör hazırlandığı için öncelikle bu sensörün doğrudan spermin ve spermidine cevap verip vermediği araştırıldı. Bu amaçla, her bir biyojenik amin için optimum pH'da ve +0,7 V'da *i-t* grafikleri oluşturuldu ve bu grafiklerden yararlanarak belirlenen

akım farkları kullanılarak kalibrasyon grafikleri çizildi. (Şekil 4.13) Şekildeki A grafiği incelendiğinde, spermin için çalışma aralığı $1,04 \times 10^{-4}$ - $4,02 \times 10^{-3}$ M, kalibrasyon duyarlılığı $12,3 \mu\text{A}/\text{mM}$ olarak belirlendi. Spermidine ait Şekil 4.13.B'deki kalibrasyon eğrisi incelendiğinde ise, çalışma aralığı $1,96 \times 10^{-5}$ - $4,02 \times 10^{-3}$ M ve kalibrasyon duyarlılığı $11,6 \mu\text{A}/\text{mM}$ bulundu.

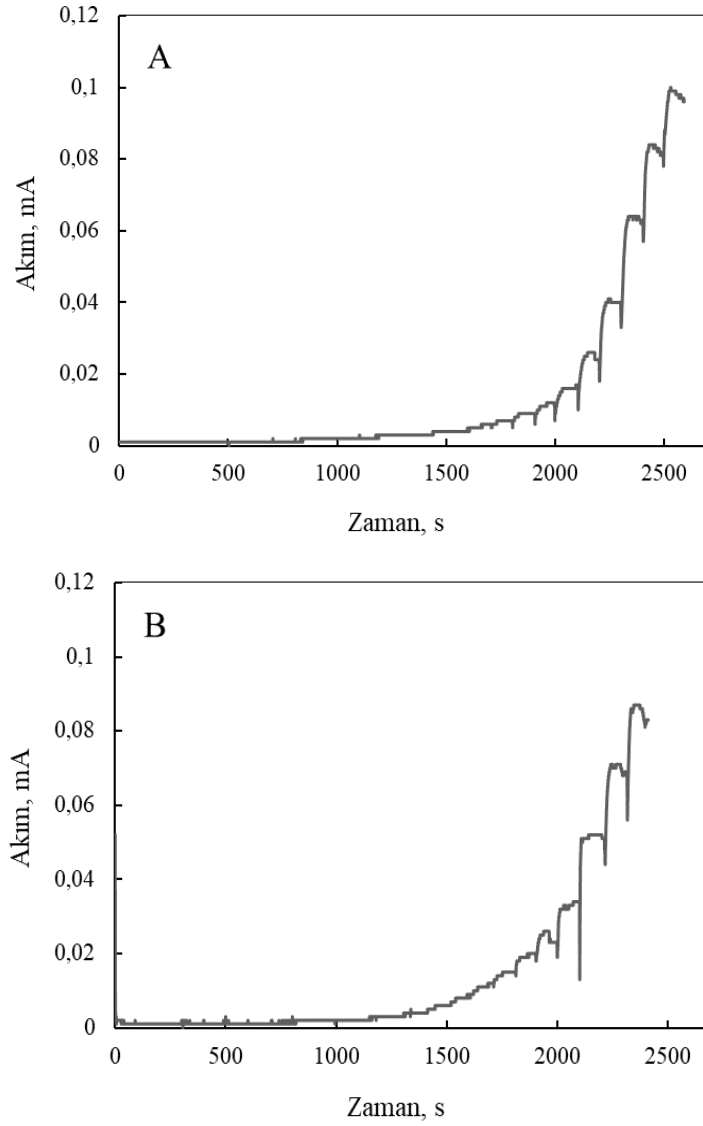


Şekil 4.13 NF/c-MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{SPE}$ ile A. spermin ve B. spermidin için elde edilen kalibrasyon grafikleri (Spermin için pH 8,5 BR, spermidin için pH 9,0 BR, çalışma potansiyeli +0,7 V)

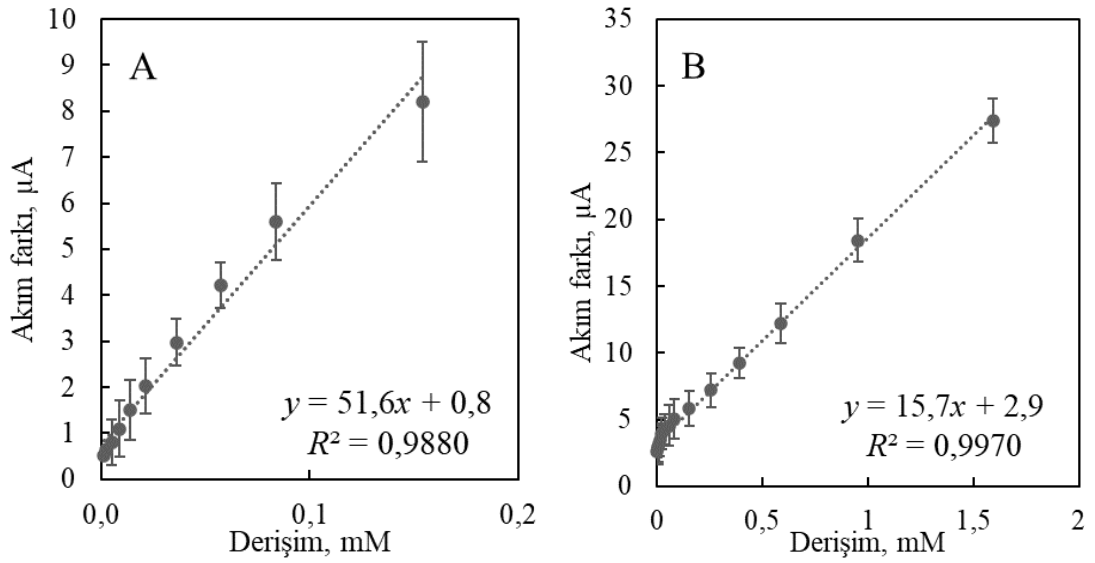
NF/c-MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{SPE}$ elektrodunun enzim içermemesine rağmen spermin ve spermidin substratlarına amperometrik akım cevabı vermesine, uygulanan yüksek çalışma potansiyelinin (+0,7 V) sebep olabileceği düşünüldü. Literatürde spermin ve spermidin için kullanılan yüksek performanslı enzimsiz elektrot örneğine rastlanmamıştır.

Doğrusal çalışma aralığı ve duyarlık: NF/DAO/c-MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{SPE}$ biyosensörünün doğrusal çalışma aralığı ve duyarlığını belirlemek amacıyla +0,7 V'ta pH'sı spermin için 8,5; spermidin için 9,0 olan BR tamponu ortamında elektrokimyasal hücreye art arda standart biyojenik amin çözeltilerinden ilave edilerek önce *i-t* grafikleri oluşturuldu (Şekil 4.14). Bu grafiklerden yararlanarak elde edilen akım farkları

biyojenik amin derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri oluşturuldu ve spermin ile spermidin için sırasıyla Şekil 4.15 A ve B’de verildi.



Şekil 4.14 NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörü ile elde edilen *i-t* grafikleri: A. spermin ve B. spermidin (çalışma ortamı: spermin için pH 8,5 BR tamponu; spermidin için pH 9,0 BR tamponu, çalışma potansiyeli: +0,7 V)

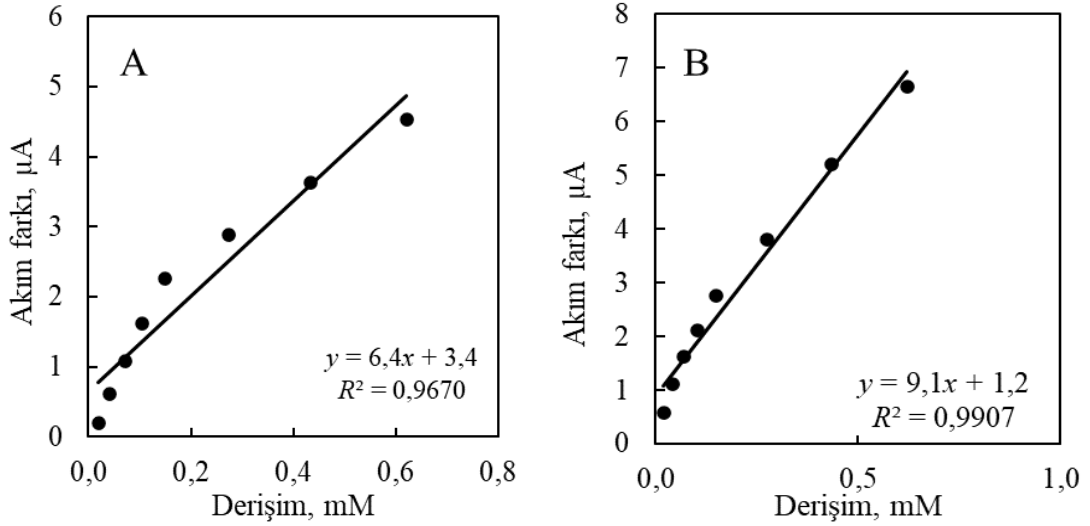


Şekil 4.15 NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörü ile elde edilen kalibrasyon grafikleri: A. spermin ve B. spermidin (çalışma ortamı: spermin için pH 8,5 BR tamponu; spermidin için pH 9,0 BR tamponu, çalışma potansiyeli: +0,7 V; N=6)

Kalibrasyon grafiklerinden de görüldüğü gibi doğrusal çalışma aralıkları spermin için $1,2 \times 10^{-6}$ - $9,5 \times 10^{-4}$ M ve spermidin için $2,0 \times 10^{-6}$ - $2,9 \times 10^{-3}$ M bulundu. Bu kalibrasyon grafiklerinin eğimleri ise duyarlık olarak değerlendirildi ve spermin için $51,6 \mu A/mM$ ve spermidin için $15,7 \mu A/mM$ olarak belirlendi. Bu sonuçlara göre NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörünün spermine duyarlığının spermidine duyarlığının yaklaşık 3 katı olduğu görüldü. Elde edilen kalibrasyon grafiklerinden de görülebildiği gibi optimum bileşimde hazırlanan biyosensörlerden spermin ve spermidin için geniş bir çalışma aralığında ve yüksek duyarlıkta cevap alınabilmektedir.

Co₃O₄NP'nin biyosensörün performansına önemli bir katkı sağlayıp sağlamadığını incelemek amacıyla NF/DAO/c-MWCNT/SPE biyosensörü hazırlandı ve bu biyosensör kullanılarak spermin ve spermidin için kalibrasyon eğrileri yukarıda anlatıldığı gibi belirlendi ve Şekil 4.16'da verildi. Bu şekillerden doğrusal çalışma aralıkları ve duyarlıklar belirlendi ve spermin için çalışma aralığı $2,0 \times 10^{-5}$ - $8,5 \times 10^{-3}$ M ve kalibrasyon duyarlığı $6,4 \mu A/mM$; spermidin için çalışma aralığı $2,0 \times 10^{-5}$ - $4,0 \times 10^{-3}$ M ve kalibrasyon duyarlığı $9,1 \mu A/mM$ olarak bulundu. Bu sonuçlar NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörü için elde edilenler ile karşılaştırıldığında, burada

bulunan çalışma aralıklarının daha dar; eğimlerinin ise daha düşük bulunması $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ 'lerin biyosensör cevabı üzerine önemli bir etkisi olduğunu gösterdi. $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ 'lerin sonuçlar üzerindeki bu olumlu etkisi literatür verileriyle de uyumludur (Raouf vd. 2013).



Şekil 4.16 NF/DAO/c-MWCNT/SPE elektrodu için elde edilen kalibrasyon grafikleri: A. spermin için elde edilen grafik ve B. spermidin için elde edilen grafik (spermin için pH 8,5 BR tamponu, spermidin için pH 9,0 BR tamponu, çalışma potansiyeli +0,7 V)

Gözlenebilme sınırı ve alt tayin sınırı: NF/DAO/c-MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ /SPE biyosensörü için gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) değerleri Bölüm 3.10'da anlatıldığı gibi tayin edildi. Elde edilen sonuçlara göre LOD spermin için $4,4 \times 10^{-7}$ M ve spermidin için $1,6 \times 10^{-6}$ M; LOQ ise, spermin için $1,5 \times 10^{-6}$ M ve spermidin için $5,2 \times 10^{-6}$ M olarak bulundu. Bu değerler literatürde spermin ve spermidin için elde edilenle karşılaştırıldığında geleneksel yöntemlerle karşılaştırılabilir düzeyde sonuçlar elde edildiği görülmektedir (Boffi vd. 2015, Koppang vd. 1999).

Tekrar üretilebilirlik: Sensör ve biyosensörlerin üretiminin tekrarlanabilir olması seri halde üretim yapabilmek için oldukça önemlidir. Bu çalışmada NF/DAO/c-MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ /SPE biyosensörünün tekrar üretilebilirliğinin belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.5'te belirtildiği şekilde hazırlanan 6'şar adet biyosensör ile spermin ve spermidin için kalibrasyon eğrileri oluşturuldu ve her bir kalibrasyon eğrisinin duyarlılığı belirlenerek

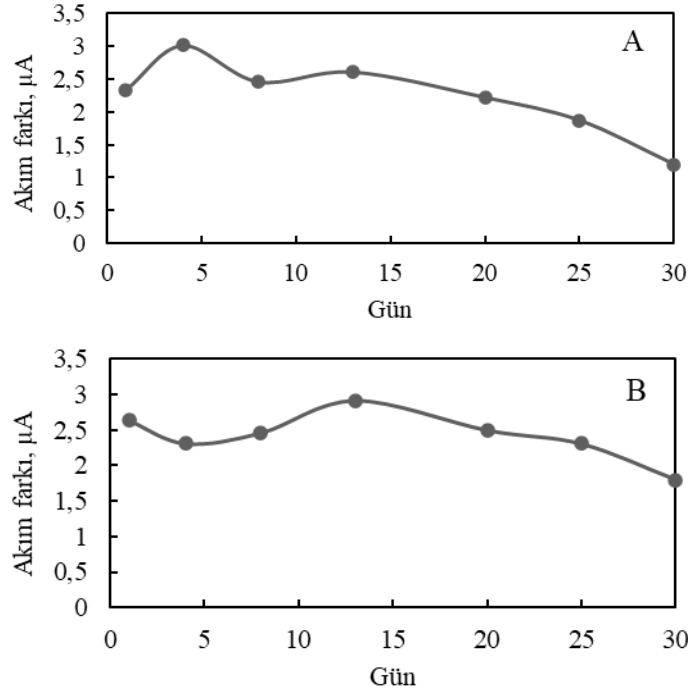
bu duyarlıkların bağıl standart sapmaları (BSS) hesaplandı. % BSS değerleri spermin için 5,8; spermidin için ise 5,7 bulundu. Bu sonuçlar, elle hazırlanan bu biyosensörlerin tekrar üretilebilirliklerinin oldukça iyi ve fabrikasyon üretimine de uygun olduğunu gösterdi.

Cevap süresi: Bir sensörün veya biyosensörün cevap süresi ne kadar kısa ise analitik uygulanabilirlikte kullanılmasının o kadar iyi olacağı düşünülür. Çünkü bir yöntemle yapılacak tayinler için ne kadar kısa sürede ne kadar tayin yapılacağı önemlidir. Bu amaçla hazırlanan NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörünün cevap süresini belirlemek amacıyla, *i-t* grafiklerinden yararlanıldı. Şekil 4.14 A ve B’den de görüldüğü gibi her bir biyojenik amin ilavesinden sonra biyosensörün kısa sürede dengeye geldiği görüldü ve bu sürenin spermin için 10 saniye ve spermidin için ise 15 saniye civarında olduğu belirlendi.

Raf ömrü: NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörünün raf ömrünün belirlenmesi için 30 adet elektrot hazırlandı. Bunlardan 15 tanesi spermin diğeri 15 tanesi ise spermidin için kullanıldı. Her elektrot yalnızca 1 kere kullanıldı. 15 gün boyunca her gün dengeye getirilen yeni elektrot ile sabit derişimdeki spermin veya spermidine karşı oluşturduğu akım farkı ölçüm günlerine karşı grafiğe geçirilerek akım farklarındaki %değişim hesaplandı. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde hazırlandığı gün kullanılan elektrot ile 15. günün sonunda ilk defa kullanılan biyosensörün cevabı arasında herhangi bir düşüş olmadığı saptandı.

Uzun dönem kararlılığı: NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörünün uzun dönem kararlılığının belirlenmesi için iki elektrot hazırlandı. Bunlardan biri spermin diğeri ise spermidin için kullanıldı. Aynı elektrotların 30 gün boyunca belli aralıklarla dengeye getirildikten sonra sabit derişimdeki biyojenik amine karşı oluşturduğu akım farkı ölçüm günlerine karşı grafiğe geçirilerek akım farklarındaki % değişim hesaplandı. 25. güne kadar akım farkında çok önemli bir değişiklik olmadığı, 30.günde ise spermine karşı akım cevabında % 40 (Şekil 4.17.A), spermidine karşı akım cevabında ise % 68’lik bir düşüş gözlemlendi (Şekil 4.17.B). 30. güne kadar olan dalgalanmalar da önemli

boyutlarda idi. Bu da tek kullanımlık elektrotların 1 kere kullanıldıktan sonra + 4⁰C’da saklansa bile tekrar kullanıldığında aynı cevabı vermeyeceğini göstermektedir. Ayrıca bu elektrotlar tek kullanımlık olarak hazırlandığından böyle bir çalışma yapılmasının ve bundan herhangi bir sonuç beklenmesinin de pek önemli olmadığına karar verildi.



Şekil 4.17 NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörü için elde edilen uzun dönem kararlılığı çalışması grafiği; A. spermin ve B.spermidin

Şekil 4.17’de verilen kararlılık verileri incelendiğinde görülen düşüşün sebebi olarak, elektrot modifikasyonunda kullanıma bağlı olarak meydana gelen deformasyon ve DAO aktivitesinin zaman içinde azalması olabileceği düşünüldü.

4.4.3 Diğer biyojenik aminlere seçiciliği

NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörünün spermin ve spermidine kronoamperometrik cevabı üzerine gerçek numunelerde bulunabilecek diğer biyojenik aminlerin etkisi incelendi. Bu amaçla öncelikle histamin, putresin, kadaverin, tiramin, triptamin, β-feniletılamin gibi biyojenik aminlere ait optimum pH değeri belirlendi ve

bu pH değerlerinde her bir biyojenik amin için ayrı ayrı kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Bu biyojenik aminlere ait kalibrasyon verilerinden yararlanarak doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı ve duyarlık belirlendi. Bu veriler Çizelge 4.3'te optimum çalışma pH değerleri ile birlikte verildi.

Çizelge 4.3 NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörünün diğer biyojenik aminlere ait performans karakteristikleri

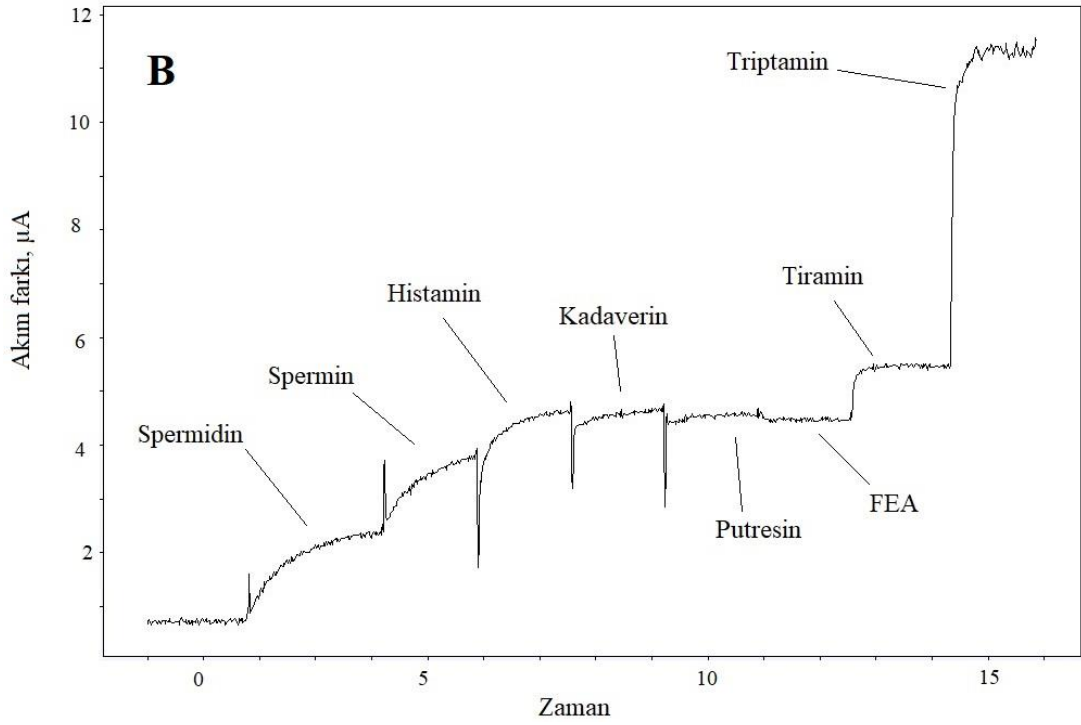
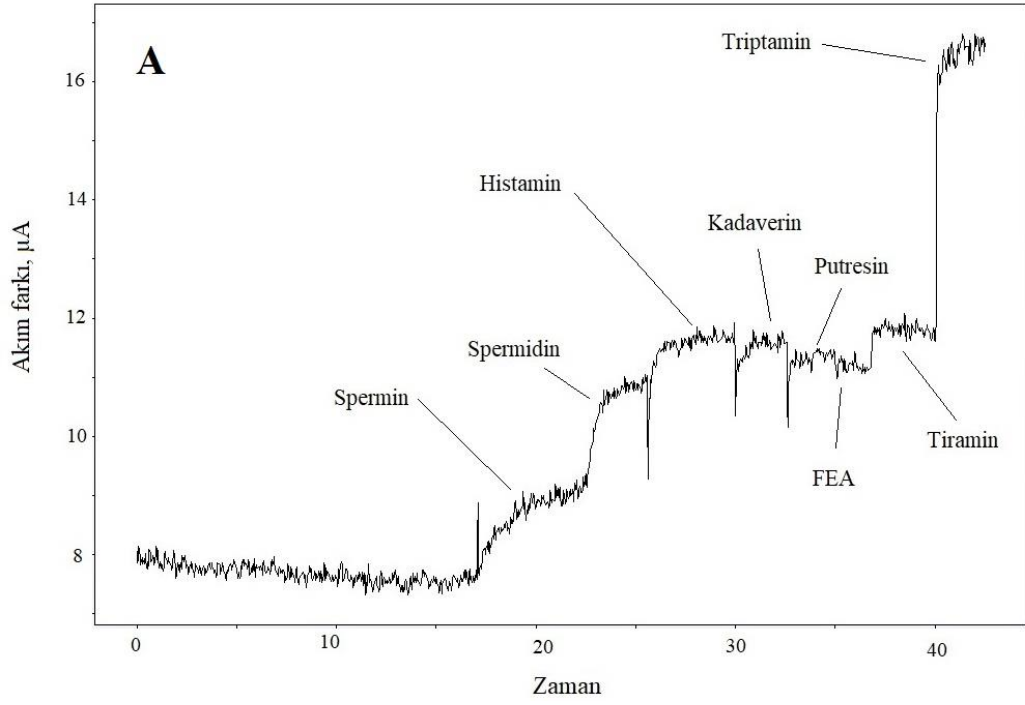
Biyojenik amin	pH	Duyarlık, $\mu\text{A}/\text{mM}$	Doğrusal çalışma aralığı, M	LOD, M	LOQ, M
Histamin	8,5	4,6	$2,5 \times 10^{-6}$ - $9,5 \times 10^{-4}$	$2,2 \times 10^{-6}$	$7,3 \times 10^{-6}$
Putresin	8,5	44,6	$2,0 \times 10^{-7}$ - $3,6 \times 10^{-5}$	$7,7 \times 10^{-8}$	$2,6 \times 10^{-7}$
Kadaverin	8,0	1,5	$1,4 \times 10^{-5}$ - $5,9 \times 10^{-5}$	$4,8 \times 10^{-6}$	$1,6 \times 10^{-5}$
Tiramin	8,0	66,1	$2,0 \times 10^{-7}$ - $9,5 \times 10^{-4}$	$7,4 \times 10^{-8}$	$2,5 \times 10^{-7}$
Fenil etil amin	8,0	0,9	$1,4 \times 10^{-5}$ - $1,4 \times 10^{-2}$	$6,1 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-5}$
Triptamin	8,0	65,6	$2,0 \times 10^{-7}$ - $8,4 \times 10^{-5}$	$9,0 \times 10^{-8}$	$3,0 \times 10^{-7}$

Çizelge 4.3 incelendiğinde spermin ve spermidin ile birlikte bulunabilecek diğer biyojenik aminlerden kadaverin ve fenil etil amin hariç diğer hepsinin bu biyosensöre duyarlılığının oldukça yüksek olduğu görüldü. Özellikle bu biyosensörün putresin, tiramin ve triptamine geniş bir derişim aralığında doğrusal bir cevap verdiği belirlendi. Sonuç olarak, literatürde de belirtildiği gibi biyojenik amin tayini için geliştirilen sensörlerin tek bir biyojenik amine değil toplam biyojenik amin tayinine daha uygun olduğuna karar verildi (Boffi vd. 2015). Ayrıca bu biyojenik aminler için de gözlenebilme sınırlarının oldukça düşük olduğu saptandı.

4.4.4 Biyosensör cevabına diğer türlerin bozucu etkileri

Bölüm 4.4.3'te ilgili biyosensörün spermin ve spermidin dışındaki diğer biyojenik aminlerin her birine ait optimum pH değerinde duyarlılığının yüksek ve çalışma aralığının genellikle geniş olduğu görüldü. Bu biyojenik aminlerin spermin ve

spermidine ait optimum şartlarda da bozucu bir etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla amperometrik akımlar üzerine etkisi incelendi. Bu amaçla hem spermin hem de spermidin için optimum çalışma koşullarında $2,0 \times 10^{-5}$ M spermin veya spermidin içeren elektrokimyasal hücrede kronoamperometrik veriler kaydedildi. Hücreye diğer biyojenik aminlerin her biri sırasıyla ilave edilerek kronoamperometrik veriler kaydedildi ve Şekil 4.18 A ve B’de spermin ve spermidin için ayrı ayrı verildi. Her bir biyojenik amin ilavesinden sonra elde edilen akım farkı Δi_2 ve spermin veya spermidin için elde edilen akım farkı Δi_1 değerlerinden yararlanılarak Bölüm 3.10’da verilen formül yardımıyla % bozucu etkiler hesaplandı ve Çizelge 4.4’te verildi. Çizelge incelendiğinde, histamin, tiramin ve triptaminin en fazla bozucu etkiye sahip olduğu gözlemlendi. Bu gözlem ortamda bulunan DAO’nun etkisi olduğu kadar +0,7 V’ta söz konusu biyojenik aminlerin doğrudan yükseltgenmesinden de kaynaklandığı şeklinde yorumlandı. Çizelgeden çıkarabileceğimiz bir diğer sonuç ise bozucu etkiler üzerine ortamın pH’sının da etkisinin de önemli olduğudur. Çünkü spermin için pH 8,5’te putresin, kadaverin ve fenil etil aminin bozucu etkisi daha yüksek iken, pH 9,0’da bu etkinin daha düşük olduğu görülmektedir.



Şekil 4.18 NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörünün cevabına diğer biyojenik aminlerin bozucu etkileri

A. spermin (pH 8,5 BR tamponu; biyojenik amin derişimleri: $2,0 \times 10^{-5}$ M; çalışma potansiyeli +0,7 V) ve B. spermidin (pH 9,0 BR tamponu; biyojenik amin derişimleri: $2,0 \times 10^{-5}$ M; çalışma potansiyeli +0,7 V)

Çizelge 4.4 NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörünün spermin veya spermidin cevabına diğer biyojenik aminlerin bozucu etkisi

	% Bozucu etki	
Spermin	100	44,6
Spermidin	46,7	100
Histamin	26,5	34,6
Kadaverin	16,7	-0,8
Putresin	-9,2	-6,6
Fenil etil amin	-19,6	-2,3
Tiramin	20,9	37,3
Triptamin	71,6	77,7

İşlenmiş gıdalarda ortamda biyojenik amin oluşumu gıdalardaki amino asitlerin dekarboksilasyonu sonucu olduğundan ve gıdalarda amino asitlerin yüksek oranda bulunmasından dolayı biyosensör cevabına amino asitlerin bozucu etki yapıp yapmadığının araştırılması da önemlidir. Bu nedenle çalışmamızda histidin, ornitin, lizin, arginin, fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi amino asitlerin bozucu etkileri incelendi. Bu amaçla spermin ve spermidinin kronoamperometrik cevabı belirlenerek diğer amino asitlerin kronoamperometrik cevapları karşılaştırıldı ve % bozucu etkiler hesaplandı. Bu amaçla, optimum pH (spermin için 8,5 ve spermidin için 9,0) ile tamponlanmış çalışma ortamına $2,0 \times 10^{-5}$ M standart spermin/spermidin çözeltisinden ve sonra $2,0 \times 10^{-5}$ M amino asit çözeltilerinden eklendi. Elde edilen kronoamperometrik cevaplar Şekil 4.18’de verildi. Bu çalışmadan elde edilen spermin ve spermidinin akım farkları Δi_1 , amino asitler ile elde edilen akım farkları Δi_2 yardımıyla % bozucu etki hesaplandı (Bölüm 3.10) ve Çizelge 4.5’de verildi.

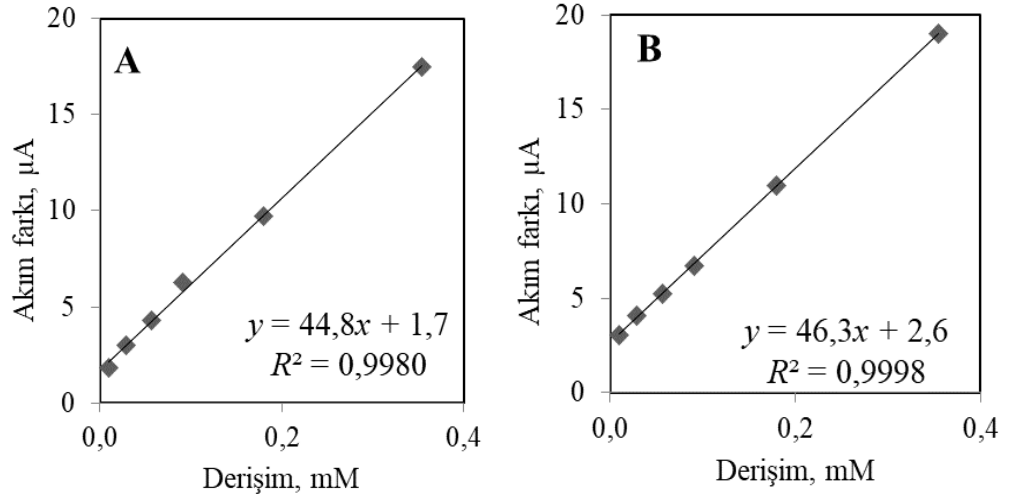
Çizelge 4.5 NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörü ile spermin için amino asit % bozucu etki çalışması

	% Bozucu etki	
Spermin	100,0	-
Spermidin	-	100,0
Histidin	21,2	61,7
Ornitin	20,0	50,2
Lizin	28,2	22,0
Arginin	17,9	11,3
Fenil alanin	31,3	25,7
Tirozin	65,3	40,9
Triptofan	27,4	43,9

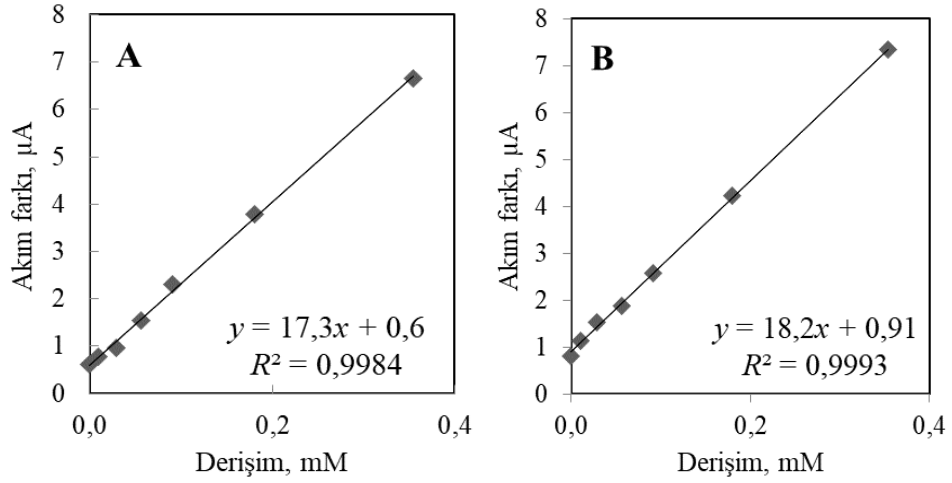
Çizelge 4.5’de verilen spermin ve spermidin girişim çalışması sonuçları incelendiğinde NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörünün özellikle bazı aminoasitlere yüksek bir cevap verdiği gözlemlendi. Bu yüksek cevabın elektroaktif türlerin NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörünün çalışma potansiyeli olan +0,7 V değerinde yükseltgenmesinden kaynaklandığı düşünüldü. Özellikle elektroaktif türlerde karşılaşılan yüksek bozucu etki, daha düşük bir potansiyelde çalışılarak azaltılabilir.

4.4.5 Geliştirilen biyosensörün gerçek numuneye analitik uygulanabilirliği

Biyojenik amin olan spermin ve spermidin gibi poliaminler genellikle fermente ürünlerde yüksek oranda bulunduğundan bu tez çalışmasında alkolsüz malt içeceğinde spermin ve spermidinin tayin edilebilirliği araştırıldı. Malt içecekleri diüretik özelliğinden dolayı tıbbi alanlarda yaygın olarak kullanılan bir içecektir. Malt içeceğinde spermin ve spermidin analizi Bölüm 3.11’de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Spermin ve spermidin için elde edilen standart ekleme eğrileri sırasıyla Şekil 4.19 ve Şekil 4.20’de verildi. Bu tip eğrilerden yararlanarak bulunan sonuçlar spermin için Çizelge 4.6’da; spermidin için ise Çizelge 4.7’de verildi. Çizelgelerden de görüleceği gibi malt içeceğindeki spermin miktarı $3,5 \times 10^{-5}$ M ve spermidin miktarı ise $5,1 \times 10^{-5}$ M olarak hesaplandı. Bu değerlerin doğruluğunu kontrol etmek amacıyla aynı çözeltilere standart spermin veya spermidin çözeltilerinden belirli miktarlarda ilave edilerek toplam spermin veya spermidin tayini standart ekleme yöntemi kullanılarak yapıldı. Bulunan değerler ile belirli miktarda eklediğimiz bilinen değer karşılaştırılarak ilgili substrat için % geri kazanım değerleri hesaplandı. Geri kazanım spermidin için % $(100,8 \pm 1,9)$ olarak belirlendi. Spermin için ise % $(100,5 \pm 1,7)$ olarak bulundu. Elde edilen geri kazanım değeri için % 95 güven seviyesi için *t* testi uygulanarak ölçüm sonucu ile gerçek değer arasında anlamlı bir fark olup olmadığı araştırıldı. Hem spermidin için hem de spermin için $t_d < t_k$ bulundu. Buradan ölçüm sonuçları ile gerçek değer arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörü ile substratların her ikisi için de %100’e yakın geri kazanım değerleri bulunması geliştirilen biyosensörün malt içeceğinde spermin ve spermidin analizinde kullanılabileceğini gösterdi.



Şekil 4.19 NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörü ile spermin tayini için standart ekleme grafikleri: A. malt içeceği ve B. malt içeceği+standart



Şekil 4.20 NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörü ile spermidin tayini için standart ekleme grafikleri: A. malt içeceği ve B. malt içeceği+standart

Çizelge 4.6 NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörü ile malt içeceğinde bulunan spermin derişimi ve geri kazanım sonuçları

Tekrar sayısı	Orijinal numunedeki spm, M	İlave edilen spm, M	Beklenen spm, M	Bulunan spm, M	Geri kazanım, %
1	$3,5 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-5}$	$5,4 \times 10^{-5}$	$5,5 \times 10^{-5}$	102,4
2	$3,6 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-5}$	$5,5 \times 10^{-5}$	$5,3 \times 10^{-5}$	100,0
3	$3,5 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-5}$	$5,4 \times 10^{-5}$	$5,4 \times 10^{-5}$	99,2
Ortalama \pm s	$3,5 \times 10^{-5} \pm 6,3 \times 10^{-7}$	-	$5,4 \times 10^{-5} \pm 6,3 \times 10^{-7}$	$5,5 \times 10^{-5} \pm 1,1 \times 10^{-6}$	$100,5 \pm 1,7$

Çizelge 4.7 NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörü ile malt içeceğinde bulunan spermidin derişimi ve geri kazanım sonuçları

Tekrar sayısı	Orijinal numunedeki spd, M	İlave edilen spd, M	Beklenen spd, M	Bulunan spd, M	Geri kazanım, %
1	$4,9 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-5}$	$6,8 \times 10^{-5}$	$6,9 \times 10^{-5}$	102,1
2	$5,1 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-5}$	$6,9 \times 10^{-5}$	$6,9 \times 10^{-5}$	98,6
3	$5,3 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-5}$	$7,2 \times 10^{-5}$	$7,3 \times 10^{-5}$	101,6
Ortalama \pm s	$5,1 \times 10^{-5} \pm 1,6 \times 10^{-6}$	-	$7,0 \times 10^{-5} \pm 1,6 \times 10^{-6}$	$7,1 \times 10^{-5} \pm 2,1 \times 10^{-6}$	$100,8 \pm 1,9$

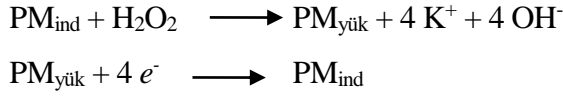
4. 5 NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE Biyosensörü ile İlgili Çalışmalar

Bölüm 4.4'te anlatılan NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensör ile +0,7 V'da çalışıldığından ve biyojenik aminlerin bazıları ile çeşitli amino asitler bu potansiyelde yükseltgendiğinden ilgili biyosensörün seçiciliğinin düşük olduğu gözlemlendi. Bu nedenle daha düşük potansiyellerde çalışarak bu girişimin azaltılması hedeflendi. Daha düşük potansiyellerde çalışarak bu girişimin azaltılabileceği düşünüldüğünden bir medyatörün kullanılmasının uygun olacağına karar verildi. Bu çalışmada medyatör olarak Prusya mavisi (PM) seçildi. Elde edilen sonuçlar ve irdemeleri aşağıda verildi.

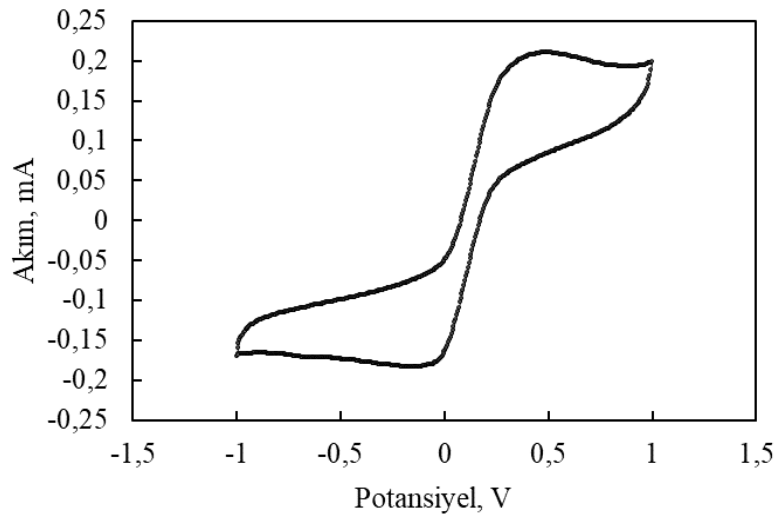
4.5.1 Optimum deney koşullarının belirlenmesi

Çalışma potansiyeli: Bu çalışmada geliştirilen NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörünün çalışma potansiyelinin belirlenmesi amacıyla öncelikle biyosensörün yapısındaki PM'nin redoks davranışı BR tamponu ortamında dönüşümlü voltammogramı alınarak incelendi ve Şekil 4.21'de verildi. Şekilden görüldüğü gibi PM için yaklaşık -0,1 V'da bir indirgenme piki ve +0,4 V'da bir yükseltgenme piki elde edildi. Çalışma potansiyelini belirlemek için bu piklerden yararlanıldı. Literatür incelendiğinde, PM ve oksidaz enzimi içeren biyosensörlerde cevap mekanizmasının aşağıdaki gibi olduğu görülmektedir (Kaçar vd. 2019):



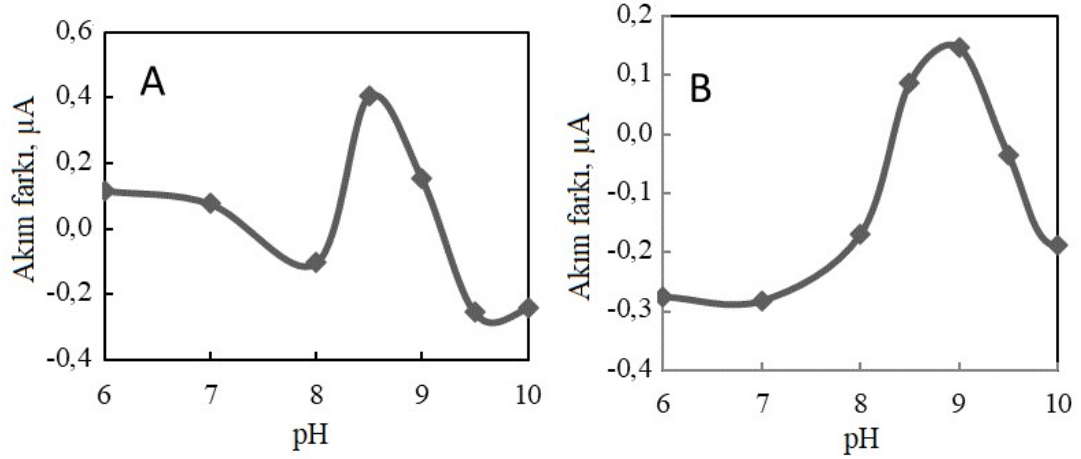


Mekanizmadan da anlaşılacağı gibi bu tip biyosensörlerle çalışırken PM'nin indirgenme potansiyeli civarında çalışmanın uygun olduğu görülmektedir. Bu nedenle -0,1 V civarında çeşitli potansiyelerde yapılan çalışmalarda en iyi cevabın -0,1 V'da alındığı belirlendiğinden, NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörü için bu potansiyel çalışma potansiyeli olarak seçildi.



Şekil 4.21 NF/PM/SPE'nin BR tamponu ortamında dönüşümlü voltammogramı

pH optimizasyonu: NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörünün spermin ve spermidin için optimum çalışma pH'sını belirlemek amacıyla, Bölüm 3.10'da açıklandığı gibi, BR tamponunun pH değeri 6,0-10,0 aralığında değiştirilerek biyosensörün sabit derişimde spermin/spermidin varlığında verdiği kronoamperometrik akım cevabı ölçüldü. Elde edilen akım farkları pH'ya karşı grafiğe geçirilerek Şekil 4.22'de verildi. Şekil incelendiğinde biyosensörün spermine en yüksek cevabı pH 8,5'te; spermidine ise pH 9,0'da verdiği, diğer pH değerlerine ise düşük cevaplar verdiği görüldü. Bu değerler NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörü için elde edilen değerler ile uyum halinde olduğundan bu değerler optimum çalışma pH'sı olarak seçildi.



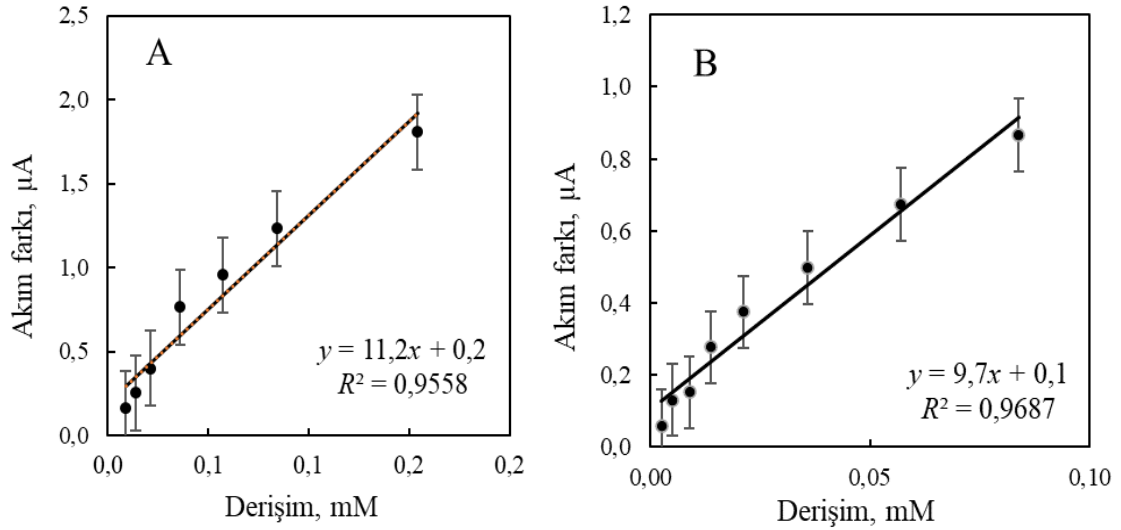
Şekil 4.22 NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörünün amperometrik cevabına pH'nın etkisi: A. spermin ve B. spermidin

4.5.2 Performans faktörlerinin belirlenmesi

NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörünün optimum çalışma koşulları belirlendikten sonra, biyosensörün bu koşullarda; doğrusal çalışma aralığı, duyarlık, gözlenebilme ve alt tayin sınırları, tekrar üretilebilirlik, cevap süresi, bozucu türlere cevap gibi performans faktörleri incelendi.

Doğrusal çalışma aralığı ve duyarlık: Belirlenen optimum çalışma koşulları olan -0,1 V çalışma potansiyeli ve spermin için pH 8,5, spermidin için pH 9,0 BR tamponuna standart spermin ve spermidin çözeltilerinden art arda ilave edilerek NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörünün kronoamperometrik akım cevabı ölçüldü ve *i-t* grafikleri çizildi. Buradan hesaplanan akım farkları derişime karşı grafiğe geçirilerek elde edilen kalibrasyon grafikleri oluşturuldu ve Şekil 4.23'te verildi. Kalibrasyon eğrilerinden spermin için doğrusal çalışma aralığı $5,0 \times 10^{-6}$ - $1,5 \times 10^{-4}$ M ve spermidin için $2,5 \times 10^{-6}$ - $8,4 \times 10^{-5}$ M olarak belirlendi. Spermin için bulunan çalışma aralığının NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörü ile spermin için elde edilen çalışma aralığına ($1,2 \times 10^{-6}$ - $9,5 \times 10^{-4}$ M) benzer; spermidin için belirlenen doğrusal çalışma aralığının ise NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörü ile spermidin için bulunan doğrusal çalışma aralığından ($2,0 \times 10^{-6}$ - $2,9 \times 10^{-4}$ M) daha dar olduğu görüldü. Biyosensörün duyarlığı, spermin için 11,2 µA/mM ve spermidin için

9,7 $\mu\text{A}/\text{mM}$ olarak bulundu. NF/DAO/MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ -PM/SPE biyosensöründen elde edilen duyarlıkların NF/DAO/c-MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ /SPE biyosensöründen elde edilen duyarlıklardan (spermin için 51,6 $\mu\text{A}/\text{mM}$ ve spermidin için 15,7 $\mu\text{A}/\text{mM}$) daha düşük olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.23 NF/DAO/MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ -PM/SPE biyosensörü için elde edilen kalibrasyon grafikleri: A. spermin ve B. spermidin (spermin için pH 8,5 BR tamponu; spermidin için pH 9,0 BR tamponu, çalışma potansiyeli -0,1 V)

Gözlenebilme sınırı ve alt tayin sınırı: NF/DAO/MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ -PM/SPE biyosensörünün gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) Bölüm 3.10'da belirtildiği gibi sırasıyla 3s/m ve 10s/m formüllerinden hesaplandı. Spermin için gözlenebilme sınırı $4,2 \times 10^{-6}$ M ve alt tayin sınırı $1,4 \times 10^{-5}$ M bulundu. Spermidin için ise gözlenebilme sınırı $1,6 \times 10^{-6}$ M ve alt tayin sınırı $5,5 \times 10^{-6}$ M olarak belirlendi. Bu değerler NF/DAO/c-MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ /SPE biyosensörü için spermin için $4,4 \times 10^{-7}$ M ve spermidin için $1,6 \times 10^{-6}$ M olan LOD ile spermin için $1,5 \times 10^{-6}$ M ve spermidin için $5,2 \times 10^{-6}$ M olan LOQ değerleri ile kıyaslandığında daha düşük olduğu görüldü.

Tekrar üretilebilirlik: NF/DAO/MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ -PM/SPE biyosensörünün tekrar üretilebilirliğini belirlemek için Bölüm 3.10'da anlatıldığı gibi aynı şekilde ve eş zamanlı hazırlanan altı biyosensörün sabit derişimdeki ilgili biyojenik amine cevabı

ölçülerek, sonuçların yüzde bağıl standart sapması hesaplandı. % BSS değerleri spermin için % 4,2 ve spermidin için ise % 4,5 olarak bulundu. Bulunan %BSS değerleri % 5'ten düşük olduğundan biyosensörlerin tekrar üretilebilirliğinin yüksek olduğu değerlendirildi.

Cevap süresi: Cevap süresini belirlemek amacıyla NF/DAO/MWCNT-CO₃O₄NP-PM/SPE biyosensörü kararlı hal akımı elde edilinceye kadar sabit potansiyelde BR tamponunda bekletildi. Elektrokimyasal hücreye ilgili substratların eklenmesinden kararlı kronoamperometrik akım cevabı gözlenene kadar geçen süre ölçüldü ve Bölüm 3.10'da anlatıldığı gibi cevap süresi spermin için yaklaşık 10 saniye ve spermidin için yaklaşık 15 saniye olarak belirlendi. Bu süreler literatürdeki elektrokimyasal biyosensör çalışmaları için rapor edilen cevap süreleri ile kıyaslandığında oldukça uygun sürelerdir (Kaçar vd. 2019). Literatürdeki benzer bir çalışmada benzer modifikasyondaki bir biyosensörden spermin ve spermidine karşı elde edilen cevap süresinin 60 ile 80 saniye olduğu görülmüştür (Boffi vd. 2015). Bu durum, geliştirdiğimiz biyosensörün rutin analitik çalışmalar yapmak için daha uygun olduğunu göstermektedir.

Uzun dönem kararlılığı: Her ne kadar kullandığımız elektrotlar tek kullanımlık elektrotlar olsa da bu elektrotların uzun süre kullanılıp kullanılamayacağı araştırıldı. Bu amaçla, Bölüm 3.5'te anlatıldığı gibi hazırlanan biyosensörün 30 gün boyunca belirli aralıklarla sabit substrat derişiminde kronoamperometrik cevapları ölçüldü ve bu sonuçların zamanla değişimi incelendi. Ayrıca ölçülen bu akım farklarının zamanla değişimlerinden yola çıkarak biyosensörün başlangıç cevabının ne kadarını kaybedeceğinin hesaplanması hedeflendi. Ölçümler arasında biyosensör + 4⁰C'da bekletildi. Hem spermin hem de spermidine karşı elde edilen cevapların zamanla önemli ölçüde düştüğü belirlendi. Bu düşüşün yüzeydeki hafif bozulmalardan kaynaklanabileceği düşünüldü. Ölçüm sırasında SPE yüzeyindeki modifikasyon malzemelerinin 20 gün boyunca gözle görülür bir değişime uğramadığı, dolayısıyla bu sürede cevap üzerinde önemli bir etkisi olmadığı gözlemlendi. Ancak bu süreden sonra elektrot yüzeyindeki modifikasyon malzemelerinin gözle görülür şekilde deformasyona uğradığı belirlendi ve ilk 20 günde elde edilen % düşüşler spermin için % 60, spermidin için ise % 31,5 olarak kaydedildi. Sonuç olarak tek kullanımlık olmasına rağmen bu

biyosensörün 20 gün boyunca kullanılabileceği yani raf ömrünün uzun olabileceği sonucuna varıldı.

4.5.3 Diğer biyojenik aminlere seçiciliği

NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörünün gıdalarda yaygın bulunabilen diğer biyojenik aminler olan histamin, putresin, kadaverin, fenil etil amin, triptamin ve tiramine kronoamperometrik cevabı Bölüm 3.10'da açıklandığı gibi araştırıldı. Bu amaçla öncelikle biyosensörün incelenen her biyojenik amin için optimum pH'sı belirlendi ve NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörü ile her biyojenik aminin optimum pH değerinde ilgili biyojenik amin için kalibrasyon grafikleri çizildi. Bu grafiklerden NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörü ile elde edilen diğer biyojenik aminler için performans karakteristikleri ve optimum çalışma pH değeri Çizelge 4.8'de verildi. İncelenen biyojenik aminler içerisinde, çizelgede de görüldüğü gibi, histamin, putresin ve kadaverinin daha dar bir doğrusal çalışma aralığında ve daha düşük duyarlılıkla cevap verdiği görüldü. Bunun nedeninin düşük potansiyelde çalışmadan kaynaklandığı değerlendirildi. NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörü ile -0,1 V potansiyelde tiramin, triptamin ve β-fenil etil amin biyojenik aminlerine cevap alınamadı. Halbuki tiramin, triptamin ve β-fenil etil amin gibi biyojenik aminlerin NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörü ile yüksek potansiyelde çalışması nedeniyle, bu potansiyelde yükseltgendiklerinden cevaplarının oldukça yüksek olduğu görülmüştü.

Çizelge 4.8 NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörü ile histamin, putresin ve kadaverine karşı elde edilen performans karakteristikleri

Biyojenik amin	Optimum pH	Kalibrasyon duyarlılığı, $\mu\text{A}/\text{mM}$	Doğrusal çalışma aralığı, M	LOD, M	LOQ, M
Histamin	9,5	8,5	$3,6 \times 10^{-5} - 5,9 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-6}$ M	$3,7 \times 10^{-6}$
Putresin	8,0	0,2	$5,0 \times 10^{-6} - 1,4 \times 10^{-2}$	$3,0 \times 10^{-6}$ M	$1,0 \times 10^{-5}$
Kadaverin	8,0	0,2	$5,7 \times 10^{-5} - 8,7 \times 10^{-3}$	$2,2 \times 10^{-5}$ M	$7,2 \times 10^{-5}$

4.5.4 Biyosensör cevabına diğer türlerin bozucu etkileri

Bölüm 4.5.3'te NF/DAO/MWCNT-CO₃O₄NP-PM/SPE biyosensörünün cevap verdiği histamin, putresin ve kadaverinin spermin ve spermidine ait optimum şartlarda da amperometrik akımlar üzerine bir etkisi olup olmadığı araştırıldı. Bu amaçla hem spermin hem de spermidine için optimum çalışma koşullarında 2,0×10⁻⁵ M spermin veya spermidin içeren elektrokimyasal hücrede kronoamperometrik veriler kaydedildi. Hücreye diğer 2,0×10⁻⁵ M derişimdeki biyojenik aminlerin her biri sırasıyla ilave edilerek kronoamperometrik veriler kaydedildi. Her bir biyojenik aminin % bozucu etkisi Bölüm 3.10'da verilen formül yardımıyla hesaplandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9'da verildi. Çizelge 4.9 incelendiğinde, kadaverin ve putresinin en fazla bozucu etkiye sahip olduğu gözlemlendi. Bu da Çizelge 4.8'deki veriler ile uyum halindedir.

Çizelge 4.9 NF/DAO/MWCNT-CO₃O₄NP-PM/SPE biyosensörü ile biyojenik aminler için bozucu etki çalışması

	% Bozucu etki	
	100	-
Spermin	100	-
Spermidin	-	100
Histamin	34,4	32,6
Kadaverin	76,4	70,4
Putresin	70,4	63,3

Çalışmada ayrıca, NF/DAO/MWCNT-CO₃O₄NP-PM/SPE biyosensörünün spermin ve spermidine kronoamperometrik cevabı kaydedilip gıdalarda bulunabilecek bazı amino asitlere kronoamperometrik cevabı incelendi. Bu amaçla biyosensörün 2,0×10⁻⁵ M spermin ya da spermidin içeren ortamda yine aynı derişimde bulunan histidin, ornitin, lizin, arginin, fenil alanin, tirozin ve triptofan amino asitlerine olan kronoamperometrik cevabı belirlenerek bu amino asitlerin % bozucu etkileri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.10'da verildi. Çizelge incelendiğinde NF/DAO/MWCNT-CO₃O₄NP-PM/SPE biyosensörünün cevabına argininin çok yüksek etkisi olduğu görüldü. Çizelgedeki veriler NF/DAO/c-MWCNT-CO₃O₄NP/SPE biyosensörüne amino asitlerin bozucu etkisi ile kıyaslandığında daha düşük bulundu. Bunun NF/DAO/MWCNT-

Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörü ile daha düşük potansiyelde (-0,1 V) çalışılması sebebiyle olduğu değerlendirildi.

Çizelge 4.10 NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörü ile spermin ve spermidin kronoamperometrik cevabına amino asitlerin % bozucu etkileri

	% Bozucu etki	
Spermin	100	-
Spermidin	-	100
Histidin	23,9	22,9
Ornitin	9,2	22,0
Lizin	16,0	29,6
Arginin	-67,9	-33,6
Fenil alanin	-7,2	-10,0
Tirosin	-7,2	-20,8
Triptofan	-2,3	-25,5

4.5.5 Geliştirilen biyosensörün gerçek numunelere analitik uygulanabilirliği

NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörünün gerçek numune çalışmasında spermin ve spermidin tayini için alkolsüz bira (malt içeceği) kullanıldı ve analizler standart ekleme yöntemi kullanılarak Bölüm 3.11’de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Malt içeceğindeki spermin miktarı $3,5 \times 10^{-5}$ M ve spermidin miktarı $4,9 \times 10^{-5}$ M olarak hesaplandı. Daha sonra malt içeceği ile birlikte derişimi bilinen standart spermin ve spermidin çözeltilerinden bilinen miktarda alınarak elektrokimyasal hücreye eklendi ve standart ekleme yöntemi ile toplam spermin ve spermidin derişimi bulundu. Eklene ve bulunan değerlerden yararlanarak her bir substrat için % geri kazanım değerleri hesaplandı (Çizelge 4.11 ve 4.12). Yüzde geri kazanım değeri spermin için % $(99,9 \pm 3,6)$; spermidin için ise % $(101,7 \pm 0,4)$ olarak bulundu. Elde edilen geri kazanım değeri için % 95 güven seviyesi için *t* testi uygulanarak ölçüm sonucu ile gerçek değer arasında anlamlı bir fark olup olmadığı belirlendi. Hem spermidin hem de spermin için $t_d < t_k$ bulundu. NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörü ile substratların her ikisi için de % 100’e yakın geri kazanım değerleri bulunması geliştirilen biyosensörün malt içeceğinde spermin ve spermidin analizinde kullanılabileceğini gösterdi.

Çizelge 4.11 NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörü ile spermin için elde edilen geri kazanım sonuçları

Tekrar sayısı	Orijinal numunedeki spm, M	İlave edilen spm, M	Beklenen spm, M	Bulunan spm, M	Geri kazanım, %
1	$3,4 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-5}$	$5,4 \times 10^{-5}$	$5,3 \times 10^{-5}$	97,1
2	$3,8 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-5}$	$5,7 \times 10^{-5}$	$6,0 \times 10^{-5}$	103,9
3	$3,3 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-5}$	$5,3 \times 10^{-5}$	$5,2 \times 10^{-5}$	98,7
Ortalama \pm s	$3,5 \times 10^{-5} \pm 2,2 \times 10^{-6}$	-	$5,4 \times 10^{-5} \pm 2,2 \times 10^{-6}$	$5,4 \times 10^{-5} \pm 2,9 \times 10^{-6}$	$99,9 \pm 3,6$

Çizelge 4.12 NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörü ile spermidin için elde edilen geri kazanım sonuçları

Tekrar sayısı	Orijinal numunedeki spd, M	İlave edilen spd, M	Beklenen spd, M	Bulunan spd, M	Geri kazanım, %
1	$4,8 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-5}$	$6,9 \times 10^{-5}$	$6,9 \times 10^{-5}$	101,7
2	$4,9 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-5}$	$6,9 \times 10^{-5}$	$7,1 \times 10^{-5}$	102,1
3	$5,0 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-5}$	$7,0 \times 10^{-5}$	$6,9 \times 10^{-5}$	101,3
Ortalama \pm s	$4,9 \times 10^{-5} \pm 9,8 \times 10^{-7}$	-	$7,0 \times 10^{-5} \pm 9,8 \times 10^{-7}$	$7,0 \times 10^{-5} \pm 6,4 \times 10^{-5}$	$101,7 \pm 0,4$

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında gıdalarda yaygın olarak bulunan biyojenik aminlerin spermin ve spermidin tayini için diamin oksidaz, karboksilli karbon nanotüp ve kobalt oksit nanopartiküle dayanan NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörü ve diamin oksidaz, karbon nanotüp, kobalt oksit nanopartikül ve Prusya mavisine dayanan NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörü geliştirildi. Bu biyosensörlerin hazırlanmasında kullanılan tüm bileşenlerin miktarları merkezi kompozit tasarım ve tek seferde tek değişken yöntemleri kullanılarak optimize edildi. Hazırlanan biyosensörler için optimum çalışma şartları belirlendikten sonra bu şartlar altında biyosensörlerin cevap süresi, doğrusal çalışma aralığı, duyarlık, gözlenebilme sınırı, seçicilik ve tekrar üretilebilirlik gibi performans faktörleri belirlendi. Tez çalışmamızın son bölümünde ise, geliştirilen biyosensörler ile gerçek numune (alkolsüz malt içeceği) ortamında spermin ve spermidin analizi yapılarak biyosensörlerin analitik uygulanabilirliği incelendi. Çalışmada geliştirilen NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE ve NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörlerinin optimum çalışma şartları ve analitik performans faktörleri sırasıyla Çizelge 5.1 ve Çizelge 5.2’de verildi. Çizelge 5.1 incelendiğinde NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörünün spermin ve spermidin için geniş bir çalışma aralığına ve yüksek duyarlığa sahip olduğu, gözlenebilme sınırının ve cevap süresinin düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca biyosensör iyi bir tekrar üretilebilirliğe sahiptir.

Çizelge 5.2 incelendiğinde ise NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörünün spermin için geniş bir çalışma aralığına ve düşük cevap süresine; spermidin içinse cevap süresi düşük olmakla birlikte NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörüne göre daha dar doğrusal çalışma aralığına sahip olduğu görüldü. Ayrıca geliştirilen iki biyosensörün duyarlıkları kıyaslandığında NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörünün spermin ve spermidin için daha düşük bir duyarlık gösterdiği belirlendi.

Çizelge 5.1 NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE biyosensörünün performans karakteristikleri

	Spermin	Spermidin
pH	8,5	9,0
Çalışma potansiyeli	+ 0,7 V	+ 0,7 V
Cevap süresi	<10 s	<15 s
Doğrusal çalışma aralığı	$1,2 \times 10^{-6} - 2,6 \times 10^{-4}$ M	$1,9 \times 10^{-6} - 1,8 \times 10^{-3}$ M
Kalibrasyon duyarlılığı	51,6 μ A/mM	15,7 μ A/mM
Tekrar üretilebilirlik, BSS (%)	5,8	5,7
Gözlenebilme sınırı (LOD)	$4,4 \times 10^{-7}$ M	$1,6 \times 10^{-6}$ M
Alt tayin sınırı (LOQ)	$1,5 \times 10^{-6}$ M	$5,2 \times 10^{-6}$ M

Çizelge 5.2 NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörünün performans karakteristikleri

	Spermin	Spermidin
pH	8,5	9,0
Çalışma potansiyeli	-0,1 V	-0,1 V
Cevap süresi	<10 s	<15 s
Doğrusal çalışma aralığı	$5,0 \times 10^{-6} - 1,5 \times 10^{-4}$ M	$1,2 \times 10^{-6} - 8,4 \times 10^{-5}$ M
Kalibrasyon duyarlılığı	11,2 μ A/mM	9,7 μ A/mM
Tekrar üretilebilirlik, BSS (%)	4,2	4,5
Gözlenebilme sınırı (LOD)	$4,2 \times 10^{-6}$ M	$1,7 \times 10^{-6}$ M
Alt tayin sınırı (LOQ)	$1,4 \times 10^{-5}$ M	$5,5 \times 10^{-6}$ M

Bu tez çalışmasından elde edilen veriler, geliştirilen biyosensörlerin bilimsel literatüre olan önemli katkısının haricinde rutin analizlerde uygulanabilirlik potansiyeline sahip olması sebebiyle de oldukça önemlidir.

Literatürde spermin ve spermidin tayini için geliştirilmiş sınırlı sayıda biyosensör bulunmaktadır. Ancak poliamin tayininin özellikle tıbbi çalışmalardaki önemi anlaşıldıkça bu sayı artmaktadır. Spermin ve spermidin tayini için 2015 yılında Boffi ve çalışma arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada poliamin oksidaz enzimi (PAOx), spermin oksidaz enzimi (SMOx) ve PM medyatörü kullanılarak hazırlanan PM/PAOx/SPE ve PM/SMOx/SPE biyosensörlerinden, FIA (flow injection

amperometry, akış enjeksiyonlu amperometri) yöntemi ile elde edilen performans faktörleri sırasıyla Çizelge 5.3 ve Çizelge 5.4'te verildi.

Çizelge 5.3 PM/PAOx/SPE biyosensörü ile elde edilen performans karakteristikleri

	Spermidin	Spermin
Cevap süresi, s	60	60
Ömür (ölçüm sayısı)	20	20
Duyarlık ($\mu\text{A}/\text{mM}$)	2,57	5,01
Doğrusal çalışma aralığı	0,01-0,4	0,003-0,3
R^2	0,9946	0,9927
LOD (mM)	0,005	0,001
Tekrarlanabilirlik, %BSS	2,1	1,8

Çizelge 5.4 PM/SMOx/SPE biyosensörü ile elde edilen performans karakteristikleri

	Spermin
Cevap süresi, s	80
Ömür (ölçüm sayısı)	15
Duyarlık ($\mu\text{A}/\text{mM}$)	1,11
Doğrusal çalışma aralığı	0,004-0,5
R^2	0,9927
LOD (mM)	0,002
Tekrarlanabilirlik, %BSS	1,5

Tez çalışmamızda geliştirdiğimiz NF/DAO/c-MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}/\text{SPE}$ ve NF/DAO/MWCNT- $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}-\text{PM}/\text{SPE}$ biyosensörlerinden elde ettiğimiz performans faktörleri ile literatürdeki PM/PAOx/SPE biyosensörü (*Boffi vd. 2015) ile elde edilen performans faktörlerinin karşılaştırılmaları spermidin için Çizelge 5.5'te ve spermin için Çizelge 5.6'da verildi.

Çizelge 5.5 Literatürdeki benzer bir çalışma ile karşılaştırma tablosu (Spd tayini)

	PM/PAOx/SPE*	NF/DAO/c-MWCNT- Co₃O₄NP/SPE	NF/DAO/MWCNT- Co₃O₄NP-PM/SPE
Cevap süresi (s)	60	<15	<15
Duyarlık ($\mu\text{A}/\text{mM}$)	2,6	15,7	9,7
Doğrusal aralık (M)	$1 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-6} - 1,8 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-6} - 8,4 \times 10^{-5}$

Çizelge 5.6 Literatürdeki benzer bir çalışma ile karşılaştırma tablosu (Spm tayini)

	PM/SMO _x /SPE*	NF/DAO/c-MWCNT-Co ₃ O ₄ /SPE	NF/DAO/MWCNT-Co ₃ O ₄ NP-PM/SPE
Cevap süresi (s)	80	<10	<10
Duyarlık (µA/mM)	1,1	51,6	11,2
Doğrusal aralık (M)	$4 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-6} - 2,6 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-6} - 1,5 \times 10^{-4}$

Tez çalışmamızda geliştirilen NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE ve NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörleri ile literatürdeki benzer çalışmada elde edilen verilere göre daha kısa cevap süresi, daha geniş çalışma aralığı ve daha yüksek duyarlık elde edildi.

Ayrıca geliştirilen NF/DAO/c-MWCNT-Co₃O₄NP/SPE ve NF/DAO/MWCNT-Co₃O₄NP-PM/SPE biyosensörlerinin yüzey modifikasyonlarının ilk kez kullanılmış olması ve poliaminlerin elektrokimyasal tekniklerle belirlenmesine yönelik çok az sayıda veri bulunması sebebiyle, yapılan bu çalışma, spermin ve spermidin analizleri için yenilikçi ve orijinal bir yaklaşım sunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Ahmed, M. U., Hossain, M. M., Safavieh, M., Wong, Y. L., Rahman, I. A., Zourob, M., & Tamiya, E. (2016). Toward the development of smart and low cost point-of-care biosensors based on screen printed electrodes. *Critical reviews in biotechnology*, 36(3), 495-505.
- Alper, N., Temiz, A. (2001). Gıdalardaki biyojen aminler ve önemi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 58(2), 71-80.
- Alonso-Lomillo, M.A., Renedo, O.D. (2010). Screen-printed biosensors in microbiology. *Talanta*, 82(5), 1629-1636.
- Anazawa, K., Shimotani, K., Manabe, C. (2002). High-purity carbon nanotubes synthesis method by an arc discharging in magnetic field. *Applied Physics*, 81, 739-741.
- Antiochia, R., Vinci, G., & Gorton, L. (2013). Rapid and direct determination of fructose in food: A new osmium-polymer mediated biosensor. *Food Chemistry*, 140(4), 742-747.
- Apetrei, I.M., Apetrei, C. (2013). Amperometric biosensor based on polypyrrolle and tyrosinase for the detection of tyramine in food samples. *Sensors and Actuators B*, 178, 40-46.
- Aşangil, D., Taşdemir, İ.H., Kılıç, E. (2012). Adsorptive stripping voltammetric methods for determination of aripiprazole. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2(3), 193-199.
- Arduini, F., Micheli, L., Moscone, D., Paleschi, G., Piermarini, S., Ricci, F., & Volpe, G. (2016). Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 79, 114-126.
- Beneduce, L., Romano, A., Capozzi, V., Lucas, P., Barnavon, L., Bach, B., Vuchot, P., Grieco, F. & Spano, G. (2010). *Annals of Microbiology*, 60(4), 573-578.
- Bhattacharya, S. (2021). Central composite design for response surface methodology and its application in pharmacy. *Surface Methodology in Engineering Science*,
- Bilgi, M., Sahin, E. M., & Ayranci, E. (2018). Sensor and biosensor application of a new redox mediator: Rosmarinic acid modified screen-printed carbon electrode for electrochemical determination of NADH and ethanol. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 813, 67-74.
- Boffi, A., Favero, G., Federico, R., Macone, A., Antiochia, R., Tortolini, C., ... & Mazzei, F. (2015). Amine oxidase-based biosensors for spermine and

- spermidine determination. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(4), 1131-1137.
- Bomke, S., Seiwert, B., Dudek, L., Effkemann, S., & Karst, U. (2009). Determination of biogenic amines in food samples using derivatization followed by liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 393(1), 247.
- Calvo, E.J., Danilowicz, C. (1997). Amperometric enzyme electrodes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 8(6).
- Ceto, X., Cespedes, F., Valle, M. (2013). Comparison of methods for the processing of voltammetric electronic tongues data. *Microchimica Acta* 180, 319-330.
- Chow, C. F., Lam, M. H., & Wong, W. Y. (2013). Design and synthesis of heterobimetallic Ru (II)–Ln (III) complexes as chemodosimetric ensembles for the detection of biogenic amine odorants. *Analytical Chemistry*, 85(17), 8246-8253.
- Clarke, R. A., Schirra, H. J., Catto, J. W., Lavin, M. F., & Gardiner, R. A. (2010). Markers for detection of prostate cancer. *Cancers*, 2(2), 1125-1154.
- Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs (Text with EEA relevance) (OJ L 338, p. 1)
- Dalkıran, B., Kaçar, C., Erden, P. E., & Kılıç, E. (2014). Amperometric xanthine biosensors based on chitosan-Co₃O₄-multiwall carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 200, 87-91.
- De Volder, MF., Tawfick, SH., Baughman, RH., & Hart, AJ. (2013). Carbon nanotubes: present and future commercial applications. *Science*, 339(6119), 535-9.
- Devi, L. G. & Kavitha, R. (2013). A review on non metal ion doped titania for the photocatalytic degradation of organic pollutants under UV/solar light: Role of photogenerated charge carrier dynamics in enhancing the activity. *Applied Catalysis B: Environmental*, 140-141, 559-587.
- Di Fusco, M., Federico, R., Boffi, A., Macone, A., Favero, G., & Mazzei, F. (2011). Characterization and application of a diamine oxidase from *Lathyrus sativus* as component of an electrochemical biosensor for the determination of biogenic amines in wine and beer. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 401(2), 707-716.
- Doria, G., Conde, J., Veigas, B., Giestas, L., Almeida, C., Assunção, M., Rosa, J. & Baptista, P. V. (2012). Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications. *Sensors*, 12(2), 1657-1687.

- 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.
- Erden, P. E., & Kılıç, E. (2013). A review of enzymatic uric acid biosensors based on amperometric detection. *Talanta*, 107, 312-323.
- Esparza, N. M., Moratalla, M.L. (2019). Polyamines in food. *Frontiers in, Nutrition* Vol. 6.
- Feng, W, Ji, P. (2011). Enzymes immobilized on carbon nanotubes. *Biotechnology Advances*, 29(6), 889-895.
- Fernandes, J. O., & Ferreira, M. A. (2000). Combined ion-pair extraction and gas chromatography–mass spectrometry for the simultaneous determination of diamines, polyamines and aromatic amines in Port wine and grape juice. *Journal of Chromatography A*, 886(1-2), 183-195.
- Fletcher, J. T., & Bruck, B. S. (2015). Spermine detection via metal-mediated ethynylarene ‘turn-on’ fluorescence signaling. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 207, 843-848.
- Giskeodegard, G.F., Bertilsson, H., Selnaes, K.M., Wright, A.J., Bathen, T.F., & Tessem, A. (2013). Spermine and citrate as metabolic biomarkers for assessing prostate cancer aggressiveness. *PLoS ONE* 8(4), e62375.
- Han, Z. J., Yang, H. Y., Yu, S. F., Pey, K. L., Ostrikov, K. & Karnik, R. (2013). Carbon nanotube membranes with ultrahigh specific adsorption capacity for water desalination and purification. *Nature Communications*, 4:2220, DOI: 10.1038/ncomms3220.
- Henao-Escobar, W., Roman, L.D.T. (2016). Resolution of quaternary mixtures of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by the square wave voltammetry and partial least square method. *Talanta*, 143, 97-100.
- Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (1996). Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in meat and meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2710-2715.
- Holmannova, D., Borsky, P., Svadlakova, T., Borska, L., & Fiala, Z. (2022). Carbon nanoparticles and their biomedical applications. *Applied Sciences*, 12(15), 7865.
- Iijima, S., Ajayan, P. M. & Ichihashi, T. (1992). Growth Model of Carbon Nanotubes. *Physical Review Letters*. 69(21), 3100-3103.

- Jansen, S. C., Dusseldorp, M., Bottema, K. C., & Dubois, A. E. J. (2003). Intolerans to dietary biogenic amines: a review. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 91(3), 233-241.
- Kaçar, C., Dalkıran, B., Erden, P. E., Kılıç, E. (2014). An amperometric hydrogen peroxide biosensor based on Co₃O₄ nanoparticles and multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Applied Surface Science*, 311, 139-146.
- Kalač, P., Šavel, J., Křížek, M., Pelikánová, T., & Prokopová, M. (2002). Biogenic amine formation in bottled beer. *Food chemistry*, 79(4), 431-434.
- Kanyong, P., Davis, J.J. (2020). Homogeneous functional self-assembled monolayers: faradaic impedance baseline signal drift suppression for high-sensitivity immunosensing. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 856, 113675.
- Karovicova, J., Kohajdova, Z. (2003). Lactic acid fermented vegetable juices. *Agriculture journals*, (4), 152-158.
- Kawakita, M., & Hiramatsu, K. (2006). Diacetylated derivatives of spermine and spermidine as novel promising tumor markers. *Journal of biochemistry*, 139(3), 315-322.
- Kokorina, A.A., Ermakov, A.V., Abramova, A.M., Goryacheva, I.Y., & Sukhorukov, G.B. (2020). Carbon nanoparticles and materials on their basis. *Colloids Interfaces*, 4(4), 42.
- Koppang, M.D, Witek, M., Blau, J., Swain, G.M. (1999). Electrochemical oxidation of polyamines at diamond thin-film electrodes. *Analytical Chemistry*, 71(6), 1188-1195.
- Kovács, Á., Simon-Sarkadi, L., & Ganzler, K. (1999). Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 836(2), 305-313.
- Köstereli, Z., & Severin, K. (2012). Fluorescence sensing of spermine with a frustrated amphiphile. *Chemical Communications*, 48(47), 5841-5843.
- Ladero, V., Calles-Enriquez, M., Fernandez, M., & Alvarez, M. (2010a). Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. *Current Nutrition & Food Science*, 6(2), 145-156(12).
- Lee, B., Scopelliti, R., & Severin, K. (2011). A molecular probe for the optical detection of biogenic amines. *Chemical Communications*, 47(34), 9639-9641.
- Luo, C., Zhang, Y., Zeng, Y, Wang, Y. (2005). The role of poly(ethylene glycol) in the formation of silver nanoparticles. *J. Colloid and Interface Science*, 288(2), 444-448.

- Maynor, M. S., Nelson, T. L., O'Sullivan, C., & Lavigne, J. J. (2007). A food freshness sensor using the multistate response from analyte-induced aggregation of a cross-reactive poly (thiophene). *Organic Letters*, 9(17), 3217-3220.
- Monosik, R., Stredansky, M., Luspai, K., Magdolen, P., & Sturdik, E. (2012). Amperometric glucose biosensor utilizing FAD-dependent glucose dehydrogenase immobilized on nanocomposite electrode. *Enzyme and Microbial Technology*, 50(4-5), 227-32.
- Narsaiah, K., Jha, S. N., Bhardwaj, R., Sharma, R. & Kumar, R. (2012). Optical biosensors for food quality and safety assurance—a review. *Journal of Food Science and Technology*, 49(4), 383-406.
- Okman Koçoğlu, İ., Erden, P.E., Kenar, A. & Kılıç, E. (2019). Application of central composite design for the optimization of electrode surface composition for glucose biosensor fabrication. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411, 413-425.
- Önal, A. (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food chemistry*, 103(4), 1475-1486.
- Özkan, B., Biryol, İ., Şentürk, Z. (1993). Modifiye elektrotlara genel bir bakış. *FABAD J.Pharm.Sci.*, 18, 95-101.
- Öztürk, S., Kılınc, N. & Öztürk Z. Z. (2013). Fabrication of ZnO nanorods for NO₂ sensor applications: Effect of dimensions and electrode position. *Journal of Alloys and Compounds*, 581, 196-201.
- Pan, N.Y., Shih, J.S. (2004). Piezoelectric crystal immunosensors based on immobilized fullerene C₆₀-antibodies. *Sensors and Actuators B*, 98(2-3), 180-187.
- Park, J.S., Choi, J.H., Woo, J.J., Moon, S.H. (2006). An electrical impedance spectroscopic study on transport characteristics of ion-exchange membrane systems. *J. Colloid and Interface Science*, 300(2), 655-662.
- Periasamy, A. P., Chang, Y. J., & Chen, S. M. (2011). Amperometric glucose sensor based on glucose oxidase immobilized on gelatin-multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry*, 80(2), 114-120.
- Pilehvar, S., Wael, K. (2017). Recent advantages in electrochemical biosensors based on fullerene-C₆₀ nano-structured platforms. *Nanocarbons for Electroanalysis*, 7(2).
- Rafaqat, S. Ali, N., Hussain, A. (2022). Validating role of different enzymes based voltammetric biosensors in detection of pesticide and dye. *Materials Chemistry and Physics* 290, 126545.

- Rasooly, A., Sergeev, V., Heroldu, K.E. (2005). Biosensor technologies for microbial and environmental analysis. *Minerva Biotechnologica*, 19, 105-116.
- Rawat, K. A., Bhamore, J. R., Singhal, R. K., & Kailasa, S. K. (2017). Microwave assisted synthesis of tyrosine protected gold nanoparticles for dual (colorimetric and fluorimetric) detection of spermine and spermidine in biological samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 88, 71-77.
- Remenant, B., Jaffrès, E., Dousset, X., Pilet, M. F., & Zagorec, M. (2015). Bacterial spoilers of food: behavior, fitness and functional properties. *Food microbiology*, 45, 45-53.
- Prodromidis, M. I., & Karayannis, M. I. (2002). Enzyme Based Amperometric Biosensors for Food Analysis. *Electroanalysis*, 14(4), 241-261.
- Saeedfar, K, Heng, L.Y., Ling, T.L., Rezayi, M. (2013). Potentiometric urea biosensor based on an immobilised fullerene-urease bio-conjugate. *Sensors*, 13(12), 16851-16866.
- Saei, A. A., Dolatabadi, J. E. N., Najafi-Marandi, P., Abhari, A. & Guardia, M. (2013). Electrochemical biosensors for glucose based on metal nanoparticles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 42, 216-227.
- Saeki, Y., Uehara, N., & Shirakawa, S. (1978). Sensitive fluorimetric method for the determination of putrescine, spermidine and spermine by high-performance liquid chromatography and its application to human blood. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 145(2), 221-229.
- Saleem, M., Yu, H., Wang, L., Khalid, H., Akram, M., Abbasi, N. M., & Huang, J. (2015). Review on synthesis of ferrocene-based redox polymers and derivatives and their application in glucose sensing. *Analytica chimica acta*, 876, 9-25.
- Santiago-Silva, P., Labanca, R.A. (2011). Functional potential of tropical fruits with respect to free bioactive amines. *Food Research International*, 44(5), 1264-1268.
- Satrijo, A., & Swager, T. M. (2007). Anthryl-doped conjugated polyelectrolytes as aggregation-based sensors for nonquenching multicationic analytes. *Journal of the American Chemical Society*, 129(51), 16020-16028.
- Sethuraman, V., Muthuraja, P., Raj, J. A., & Manisankar, P. (2016). A highly sensitive electrochemical biosensor for catechol using conducting polymer reduced graphene oxide–metal oxide enzyme modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 84, 112-119.
- Shalaby AR (1996) Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res Int* 29:675–690.

- Shi, X., Gu, W., Li, B., Chen, N., Zhao, K., & Xian, Y. (2014). Enzymatic biosensors based on the use of metal oxide nanoparticles. *Microchimica Acta*, 181(1-2), 1-22.
- Singh, A. P., Gupta, B. K., Mishra, M., Govind, Chandra, A., Mathur, R. B. & Dhawan, S. K. (2013). Multiwalled carbon nanotube/cement composites with exceptional electromagnetic interference shielding properties. *Carbon*, 56, 86-96.
- Song, Y., Luo, Y., Zhu, C., Li, H., Du, D., & Lin, Y. (2016). Recent advances in electrochemical biosensors based on graphene two-dimensional nanomaterials. *Biosensors and Bioelectronics*, 76, 195-212.
- Taleat, Z., Khoshroo, A., & Ardakani, M. M. (2014). Screen-printed electrodes for biosensing: A review (2008-2013). *Microchimica Acta*, 181(9-10), 865-891.
- Til, H. P., Falke, H. E., Prinsen, M. K. & Willems, M. I. (1997). Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 35(3-4), 337-348.
- Tepeli, Y., Anik, U. (2016). Preparation, characterization and electrochemical application of graphene-metallic nanocomposites. *Electroanalysis* 28(12), 3048-3054.
- Tilmaciu, C. M., & Morris, M. C. (2015). Carbon nanotube biosensors. *Frontiers in chemistry*, 3, 59.
- Weltin, A., Kieninger, J., Urban, G.A. (2016). Microfabricated, amperometric, enzyme-based biosensors for in vivo applications. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408, 4503-4521.
- Yadav, S., Devi, R., Kumari, S., Yadav, S. & Pundir, C. S. (2011). An amperometric oxalate biosensor based on sorghum oxalate oxidase bound carboxylated multiwalled carbon nanotubes–polyaniline composite film. *Journal of Biotechnology*, 151(2), 212-217.
- Yilmaz, U.T., Inan, D. (2015). Quantification of histamine in various fish samples using square wave stripping voltammetric method. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 6671-6678.
- Zheng, Z., Zhou, Y., Li, X., Liu, S. & Tang, Z. (2011). Highly-sensitive organophosphorous pesticide biosensors based on nanostructured films of acetylcholinesterase and CdTe quantum dots. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(6), 3081-3085.
- Zhu, C., Yang, G., Li, H., Du, D., & Lin, Y. (2014). Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and nanostructures. *Analytical chemistry*, 87(1), 230-249.