

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LEVODOPA TAYİNİ İÇİN NANOMALZEME VE İLETKEN POLİMER
TEMELLİ AMPEROMETRİK BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ**

Sinem BOYRAZ

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2024**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

LEVODOPA TAYİNİ İÇİN NANOMALZEME VE İLETKEN POLİMER TEMELLİ AMPEROMETRİK BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Sinem BOYRAZ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ceren KAÇAR SELVİ

Bu tez çalışmasında, Parkinson hastalığının tedavisinde ilaç olarak kullanılan ve bir dopamin öncülü olan Levodopa (L-dopa) (3,4-dihidroksi-L-fenilalanin) tayini için; poliglisin (PGL), altın nanoçubuk ve iyonik sıvı (AuNR-IL) ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrotlara (PGE) tirozinaz (Tyr) enzimi immobilize edilmesiyle amperometrik bir biyosensör geliştirildi. Geliştirilen biyosensörün yüzey karakterizasyonu ve elektrokimyasal davranışı taramalı elektron mikroskopu (SEM), dönüşümlü voltammetri (CV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) yöntemleri kullanılarak incelendi. PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr için optimum çalışma koşulları belirlenerek, doğrusal çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-7} - 9,4 \times 10^{-5}$ M, gözlenebilirlik sınırı $2,4 \times 10^{-8}$ M, duyarlılık $136,6 \mu\text{A mM}^{-1}$ ve cevap süresi <10 s olarak bulundu. Biyosensör cevabına girişim yapabilecek bazı türlerin etkisi araştırılarak tablet ve insan serumu numunelerinde analitik uygulanabilirlik çalışması yapıldı. Geliştirilen biyosensör ile elde edilen yüksek geri kazanım değerleri biyosensörün gerçek numunelerde L-dopa tayininde başarılı bir şekilde kullanılabileceğini gösterdi.

Ocak 2024, 61 sayfa

Anahtar Kelimeler: Levodopa (L-dopa), amperometri, tirozinaz, enzim elektrot, kalem grafit elektrot, biyosensör, altın nanorod, Parkinson hastalığı

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

DEVELOPMENT OF A NANOMATERIAL AND CONDUCTIVE POLYMER BASED AMPEROMETRIC BIOSENSOR FOR LEVODOPA DETERMINATION

Sinem BOYRAZ

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ceren KAÇAR SELVİ

In this thesis, an amperometric biosensor based on the immobilization of tyrosinase (Tyr) onto pencil graphite electrodes (PGE) modified with polyglycine (PGL) and gold nanorod-ionic liquid (AuNR-IL) was developed for the determination of Levodopa (L-dopa) (3,4-dihydroxy-L-phenylalanine), a precursor of dopamine and used as a drug in the treatment of Parkinson's disease. The surface characterisation and electrochemical behaviour of the developed biosensor were investigated by using scanning electron microscopy (SEM), cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) methods. The optimum operating conditions for PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr were determined and under these conditions linear working range, limit of detection, sensitivity and response time were found to be $1.0 \times 10^{-7} - 9.4 \times 10^{-5}$ M, 2.4×10^{-8} M, $136.6 \mu\text{A mM}^{-1}$, <10 s, respectively. The effect of some interfering species on the biosensor response was investigated and analytical applicability of the biosensor was studied in tablet and human serum samples. The high recovery values obtained with the developed biosensor showed that the biosensor can be successfully used for the determination of L-dopa in real samples.

January 2024, 61 pages

Key Words: Levodopa (L-dopa), amperometry, tyrosinase, enzyme electrode, pencil graphite electrode, biosensor, gold nanorod, Parkinson's disease

TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesinden tezin tamamlanmasına kadar geçen her aşamada, çalışmalarım sırasında bana her konuda yardımcı olan, bilgisini, tecrübesini ve hoşgörüsünü esirgemeyen, her zaman manevi destek olan danışmanım Sayın Doç. Dr. Ceren KAÇAR SELVİ'ye,

Tez çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan ve desteklerini hep hissettiğim değerli eşim Karya BOYRAZ'a,

Tezimin hazırlanma aşamasında desteklerini esirgemeyen Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi Kimya Bölümü, Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Pınar Esra ERDEN'e,

Hayatımın her döneminde bana verdikleri manevi destek, göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı canım aileme ve değerli arkadaşım Burcu MALDAR'a,

Çalışma hayatımda tez ve eğitim-öğretim dönemim boyunca her zaman manevi destek ve anlayış gösteren değerli yöneticilerim Kader ÇÖMLEKÇİ, Cansu GENCAN, Ahmet Can ÜNAL ve diğer çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sinem BOYRAZ
Ankara, Ocak 2024

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 Elektrokimyasal Yöntemler.....	4
2.1.1 Voltammetri	4
2.1.1.1 Dönüşümlü Voltammetri	5
2.1.2 Amperometri.....	5
2.1.3 Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi	6
2.1.4 Potansiyometri.....	7
2.2 Elektrokimyasal Biyosensörler	7
2.3 Biyosensörlerin Performans Faktörleri	8
2.3.1 Doğrusal çalışma aralığı ve duyarlılık.....	9
2.3.2 Gözlenebilme ve alt tayin sınırı.....	9
2.3.3 Seçicilik	9
2.3.4 Cevap süresi.....	10
2.3.5 Sağlamlık.....	10
2.3.6 Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik	10
2.3.7 Doğruluk	10
2.3.8 Kararlılık	11
2.4 Kalem Grafit Elektrot.....	11
2.5 Altın Nanoçubuklar.....	12
2.6 Polimer	13
2.7 İyonik Sıvı	14
2.8 Enzim.....	14
2.9 Parkinson Hastalığı ve Levodopa	15
2.10 Kaynak Araştırması.....	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1 Ekipmanlar	23
3.2 Kimyasal maddeler	24
3.3 Çözeltiler	25
3.3.1 Fosfat tampon çözeltisi	25
3.3.2 NaOH ve HCl Çözeltileri.....	25
3.3.3 Glisin çözeltisi	25
3.3.4 Altın nanoçubuk çözeltisi.....	25
3.3.5 Altın nanoçubuk-iyonik sıvı çözeltisi.....	26
3.3.6 Tirozinaz enzimi çözeltisi.....	26
3.3.7 Sığır serum albümini çözeltisi	26
3.3.8 Nafyon çözeltisi.....	26
3.3.9 Glutaraldehit çözeltisi.....	26
3.3.10 Levodopa çözeltisi	27

3.3.11 Girişimci türlerin çözeltileri	27
3.3.12 Redoks probu çözeltisi	27
3.4 Kalem Grafit Elektrotların modifikasyonu	27
3.5 Elektrotların Elektrokimyasal Karakterizasyonu	29
3.5.1 Dönüşümlü Voltammetri	29
3.5.2 Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi	29
3.6 Modifiye Kalem Grafit Elektrotların Döngü Sayısı Optimizasyonu.....	29
3.7 Altın Nanoçubuk Miktarının Optimizasyonu.....	30
3.8 İyonik Sıvı Miktarının Optimizasyonu	30
3.9 Enzim Miktarının Optimizasyonu.....	30
3.10 Optimum Çalışma Koşulları	31
3.10.1 pH	31
3.10.2 Çalışma potansiyeli	31
3.11 Biyosensörün Performans Faktörleri	31
3.11.1 Doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı ve alt tayin sınırı	31
3.11.2 Cevap süresi	32
3.11.3 Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik.....	32
3.11.4 Kararlılık.....	33
3.11.5 Uzun dönem kararlılığı	33
3.11.6 Girişimci türlerin etkisi.....	33
3.12 Gerçek Numune Çalışmaları.....	34
3.12.1 Tablet numunesi	34
3.12.2 İnsan serumu	34
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	35
4.1 Modifiye Kalem Grafit Elektrodun Yüzey Bileşimi Optimizasyonu.....	35
4.1.1 Döngü sayısı optimizasyonu	35
4.1.2 Altın Nanoçubuk miktarının optimizasyonu	36
4.1.3 İyonik Sıvı miktarının optimizasyonu	37
4.1.4 Enzim miktarı optimizasyonu	38
4.2 Modifiye Kalem Grafit Elektrotların Elektrokimyasal Karakterizasyonu	39
4.3 Modifiye Kalem Grafit Elektrodun Yüzey Karakterizasyonu	42
4.4 Optimum Çalışma Koşulları	43
4.4.1 pH optimizasyonu	43
4.4.2 Çalışma potansiyeli optimizasyonu	44
4.5 Modifiye Kalem Grafit Elektrodun Performans Faktörleri	46
4.5.1 Doğrusal çalışma Aralığı ve gözlenebilme sınırı.....	46
4.5.2 Cevap süresi.....	47
4.5.3 Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik	48
4.5.4 Kararlılık	48
4.5.5 Uzun dönem kararlılığı.....	48
4.5.6 Girişimci türlerin etkisi	49
4.5.7 Gerçek numune çalışmaları	50
4.5.7.1 Tablet numunesi	50
4.5.7.2 İnsan serumu	51
5. SONUÇ.....	52
KAYNAKLAR.....	56
ÖZGEÇMİŞ.....	61

KISALTMALAR DİZİNİ

A	Amper
cm	Santimetre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
μ L	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
mV	Milivolt
mA	Miliamper
μ A	Mikroamper
s	Saniye
V	Volt
Z	Empedans
Z'	Gerçek empedans
Z''	Sanal empedans
AC	Alternatif akım
AuNPs	Altın nanopartiküller
AuNR	Altın nanoçubuk
AuNR-IL	Altın nanoçubuk - iyonik sıvı
BSA	Sığır serum albümin
BSS	Bağıl standart sapma
CV	Dönüşümlü voltammetri
ÇE	Çalışma elektrodu
DPV	Diferansiyel puls voltammetri
EDX	Enerji dağılımlı X-ışınları spektroskopisi
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
FDMA	Diferansiyel miğroiğne dizisi

FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi
GA	Gluteraldehit
GCE	Camsı karbon elektrot
GO	Grafen oksit
Gr	Grafen
HRP	Horseradish peroksidaz
IL	İyonik sıvı
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
KE	Karşıt elektrot
L-dopa	Levodopa (3-(3,4-Dihidroksifenil)-L-alanin)
LOD	Gözlenebilme sınırı
LOQ	Alt tayin sınırı
MOF	Metal-organik kafes yapı
MWCNT	Çok duvarlı karbon nanotüp
PANI	Polianilin
PGE	Kalem grafit elektrot
PGL	Poliglisin
PPO	Polifenol oksidaz
pPDA	p-fenilendiamin
PU	Poliüretan
RE	Referans elektrot
R_{ct}	Elektron transfer direnci
RGO-AgNP	İndirgenmiş grafen oksit-gümüş nanoparçacık
s	Standart sapma
S/N	Sinyal/gürültü
SPCE	Perde baskılı karbon elektrot
Tyr	Tirozinaz
U	Ünite
ZIF-8	Zeolitik imidazolat kafes yapı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Levodopa'nın kimyasal yapısı	1
Şekil 2.1 Elektrokimyasal ölçümlerde üç elektrotlu hücre sistemi	8
Şekil 3.1 (a) Metrohm Dropsens elektrokimyasal analiz cihazı (çok kanallı), (b) Mikro Min marka M-918 2B 2.0 mm kalem ucu.....	23
Şekil 3.2 Geliştirilen modifiye elektrodun hazırlık aşamalarının şematik olarak gösterimi a) PGE, b) PGE/PGL, c) PGE/PGL/AuNR-IL, d) PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr	28
Şekil 4.1 PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün L-dopa'ya duyarlılığının PGL kaplamasında kullanılan döngü sayısı ile değişimi (0,05 M pH 6,5 PBS, -0,3 V, $N=3$).....	36
Şekil 4.2 PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün L-dopa'ya duyarlılığının AuNR miktarı ile değişimi (0,05 M pH 6,5 PBS, -0,3 V, $N=3$).....	37
Şekil 4.3 PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün L-dopa'ya duyarlılığının IL miktarı ile değişimi (0,05 M pH 6,5 PBS, -0,3 V, $N=3$).....	38
Şekil 4.4 PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün L-dopa'ya duyarlılığının enzim miktarı ile değişimi (0,05 M pH 6,5 PBS, -0,3 V, $N=3$).....	39
Şekil 4.5 (a) PGE, (b) PGE/PGL, (c) PGE/PGL/AuNR, (d) PGE/PGL/AuNR-IL ve (e) PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'lerin dönüşümlü voltammogramları (50 mV s ⁻¹ , 0,1 M KCl ihtiva eden 5,0 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} çözeltisi).....	40
Şekil 4.6 (a) PGE, (b) PGE/PGL, (c) PGE/PGL/AuNR, (d) PGE/PGL/AuNR-IL ve (e) PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'lerin Nyquist eğrileri (0,18 V, 100000 Hz – 0,01 Hz, 0,1 M KCl içeren 5,0 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} çözeltisi).....	41
Şekil 4.7 (A) PGE, (B) PGE/PGL, (C) PGE/PGL/AuNR-IL ve (D) PGE/PGL/ AuNR-IL/Tyr için SEM görüntüleri (10.00 KX büyütme).....	42
Şekil 4.8 PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün L-dopa'ya duyarlılığının tampon pH'sı ile değişimi (-0,3 V; 0,05 M PBS; $N=3$).....	43

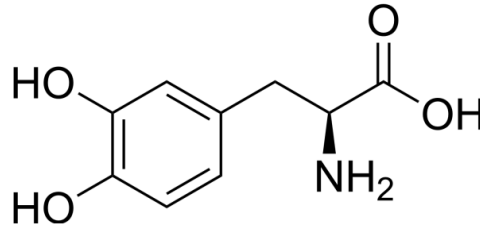
Şekil 4.9 L-dopa'nın tirozinaz enzimi ile L-Dopakinon'a yükseltgenmesi	43
Şekil 4.10 PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün (a) L-dopa içermeyen ve (b) $1,0 \times 10^{-3}$ M L-dopa içeren fosfat tampon çözeltisinde (0,05 M pH 6,5) elde edilen voltammogramları (Tarama hızı: 50 mV s^{-1}).....	44
Şekil 4.11 PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün L-dopa'ya duyarlılığının çalışma potansiyeli ile değişimi (0,05 M pH 6,5 PBS, $N=3$)	45
Şekil 4.12 PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün (A) L-dopa'nın ardışık ilavelerine karşı zaman ile değişen akım cevapları, (B) Kalibrasyon grafığı ($N=3$) (0,05 M pH 6,5 PBS, -0,3 V).....	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasallar, saflık dereceleri ve üretici firmalar.....	24
Çizelge 4.1 Modifiye elektrodların optimum yüzey bileşimi ve çalışma koşulları	45
Çizelge 4.2 PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr ile tablet numunesinde standart ekleme yöntemi ile elde edilen %geri kazanım sonuçları.....	50
Çizelge 4.3 PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr ile insan serumu numunesinde standart ekleme yöntemi ile elde edilen %geri kazanım sonuçları	51
Çizelge 5.1 Elektrokimyasal L-dopa tayini için geliştirilen bazı (biyo)sensörlerin performans faktörlerinin karşılaştırılması	53

1. GİRİŞ

Levodopa (L-Dopa, 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin), dopamin biyosentezi için kullanılan temel öncüllerden biridir ve kimyasal yapısı Şekil.1’de verilmiştir (Prabhu vd. 2011). 1960’lı yıllardan beri, bir nörotransmitter olan dopaminin eksikliğinden kaynaklanan Parkinson hastalığının tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır ve en iyi tedavi edici ajan olup dopaminin bir öncüsüdür. Dopamin kan-beyin bariyerini geçemediği halde L-dopa geçebildiğinden, beyindeki dopamin seviyelerini artırmak için kullanılır (Brunetti vd. 2014, Fang vd. 2022). Kısa yarılanma ömrü nedeniyle L-dopa’nın terapötik penceresi dardır ve uzun süreli L-dopa tedavisi diskinezi, psikoz ve ortostatik hipotansiyon gibi bazı yan etkilere neden olabilir. Bu nedenle, ilaç tedavisi sırasında serum veya kandaki L-dopa düzeyinin kontrolü hayati önem taşımaktadır (Fang vd. 2022).



Şekil 1.1 Levodopa’nın kimyasal yapısı

Bugüne kadar L-dopa tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografi (Elbarbry vd. 2019), spektrofotometri (Tashkhourian vd. 2011), kapiler zon elektroforez (Chen vd. 2005) ve elektrokimyasal yöntemler (Molaakbari vd. 2014, Yue vd. 2019, Beitollahi vd. 2020) gibi birçok yöntem uygulanmıştır. Bunların arasında elektrokimyasal yöntemler düşük maliyetli, oldukça hassas, seçici ve kolayca entegre edilebilirlerdir (Fang vd. 2022).

Son yıllarda pek çok farklı elektrot ve modifiye edici malzemenin kullanımıyla çeşitli elektrokimyasal (biyo)sensörler geliştirilmiş ve birçok türün tayininde başarıyla kullanılmışlardır. (Biyo)sensörlerin hazırlanmasında camı karbon elektrot (GCE), karbon pasta elektrot (CPE), perde baskılı karbon elektrot (SPCE) gibi karbona dayalı elektrotlar çokça tercih edilmektedir (Tesoro vd. 2023). Kalem grafit elektrotlar (PGE) da

elektrot malzemesi olarak son dönemlerde sıklıkla kullanılmaktadır. PGE'ler genel olarak kullanıcı dostu oluşları, karşılaştırılabilir elektriksel özellikleri nedeniyle diğer standart elektrotlara uygun bir alternatif olmaları, düşük maliyetleri, kolaylıkla modifiye edilebilmeleri ve tek kullanımlık uygulamalara olanak sağlamaları sayesinde oldukça fazla tercih edilmektedirler (Torrinha vd. 2018).

Bir elektrokimyasal (biyo)sensör sistemi için duyarlık ve verimlilik esas olarak elektrot modifikasyonunda kullanılan malzemelere bağlıdır. Yüksek performanslı biyosensörler elde edebilmek için, sensöre kolayca adapte edilebilen ve iyi sinyal iletme özelliğine sahip olan malzemeler kullanmak oldukça önemlidir. Son yıllarda nanomalzemeler, iletken polimerler gibi türlerin kullanılmasıyla hazırlanan elektrokimyasal sensörler, düşük maliyetli, iyi elektron transfer kinetiklerine sahip, kimyasal olarak kararlı ve biyoyumlu olmaları nedeniyle yaygın olarak tercih edilmektedirler (Lin vd. 2019).

Metal ve metal oksit nanopartiküller, nanomalzemelerin önemli bir grubudurlar ve bu malzemeler büyük yüzey-hacim oranı, yüksek yüzey reaksiyon aktivitesi, kimyasal kararlılık, iyi katalitik etkinlik gibi özellikleri sayesinde biyosensör performansını geliştirme amacı ile biyomolekül immobilizasyonu için uygun platformlar oluşturur. Altın nanomalzemelerin, mevcut yüzey alanında önemli bir artış sağladığı ve biyosensör uygulamalarında işlevselleştirme için biyoyumlu bir platform sunduğu bilinmektedir. Altın nanomalzemelerin bir türü olan altın nanoçubuklar (AuNR), elektrokimyasal biyosensörler ve biyoelektrokataliz için immobilizasyon matrisi olarak tercih edilmekte olup iyi bir biyoyumluluğa, basit bir hazırlanma prosedürüne ve yüksek kararlılığa sahiptirler (Li vd. 2013).

Son yıllarda, elektrokimyasal (biyo)sensörlerin hazırlanması sırasında yüzeylerin iletken polimerler ile kaplanarak modifiye edilmesi sıklıkla tercih edilmektedir. Bu amaçla kullanılan polimerin genellikle iyi iletkenlikleri, biyoyumlulukları ve gözenekli yapıları sayesinde elektrokimyasal sistemlerin duyarlılığını arttığı görülmüştür (Gürsoy vd. 2019). Yapılarında hem amino (-NH₂) hem de karboksil (-COOH) grupları bulunduran amino asitler elektrot yüzeylerinin elektropolimerizasyon ile modifiye edilmesinde kullanılabilirler (Prinith ve Manjunatha 2022). Amino asitlerin, biyoyumlu olmaları ve

mevcut fonksiyonel grupları ile elektroaktif polimerler oluşturabilme yetenekleri onların sensör uygulamalarında kullanımı için avantaj oluşturmaktadır (Gürsoy vd. 2019).

Elektrot modifikasyonunda ideal adaylar olan bir diğer malzeme sınıfı ise iyonik sıvılardır (IL). IL'ler, yeşil kimya uygulamaları için büyük bir umut vaat etmekte ve birçok bilim insanının ilgisini çekmektedir (Musameh vd. 2008, Singh vd. 2012). IL'lerin hidrofobikliği, alkil zincir uzunluğu, geçirgenliği artırma yetenekleri onların biyosensör kaplamalarında tercih edilmesini sağlamaktadır (Sharma vd. 2023).

L-dopa tayini için geliştirilen biyosensörlerde genellikle biyobileşen olarak tirozinaz (Tyr) enzimi kullanılmıştır ve söz konusu biyosensörlerin çalışma prensibi Tyr'nin L-dopa'yı dopakinona yükseltgemesine dayanmaktadır. Gözlenen cevap, enzimatik olarak üretilen dopakinonun yaklaşık -0,30 V potansiyelde elektrokimyasal indirgenmesine aittir. Kaydedilen akım, L-dopa derişimiyle doğru orantılıdır (Brunetti vd. 2014).

Bu tez çalışmasında, L-dopa tayini için PGE yüzeyinin poliglisin (PGL) ve AuNR-IL kullanılarak modifiye edilmesi ve modifiye yüzeye Tyr enziminin immobilize edilmesiyle bir amperometrik biyosensör oluşturulması amaçlandı. Geliştirilen PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörü için yüzey bileşimi optimizasyonu yapıldı. Biyosensörün optimum çalışma koşullarının belirlenmesi amacıyla çalışma potansiyeli, pH değeri araştırıldı ve belirlenen şartlar altında biyosensörün doğrusal çalışma aralığı, duyarlık, gözlenebilme ve alt tayin sınırı, seçicilik, tekrar üretilebilirlik, tekrarlanabilirlik, kararlılık ve raf ömrü çalışmaları yapıldı. Modifiye edilen elektrotlar için elektrokimyasal karakterizasyon aşamasında taramalı elektron mikroskobu (SEM), elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ve dönüşümlü voltammetri (CV) yöntemleri kullanıldı. Ayrıca, biyosensörün L-dopa cevabı üzerine gerçek numunelerde bulunması muhtemel olan bazı girişimci türlerin (askorbik asit, ürik asit, sitrik asit, okzalik asit, glukoz, parasetamol) etkisi incelendi. Son olarak, biyosensörün gerçek numunede uygulanabilirliğinin araştırılması amacıyla; tablet ve insan serumu ile çalışmalar yapıldı ve L-dopa için elde edilen % geri kazanım değerleri değerlendirildi. Parkinson hastalığı tedavisi aşamasında önemli bir rolü olan L-dopa'nın tayini için geliştirilen PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörü daha önce literatürde rapor edilmemiş olup, yeni ve orijinal bir biyosensördür.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Elektrokimyasal Yöntemler

Elektrokimya, elektriksel ve kimyasal etkilerin karşılıklı ilişkisiyle ilgilenen kimya dalıdır. Bu alanın büyük bir kısmı, bir elektrik akımının geçişinden kaynaklanan kimyasal değişikliklerin incelenmesi ve kimyasal reaksiyonlarla elektrik enerjisi üretimi ile ilgilenir. Elektrokimya, çok sayıda farklı olguyu (örneğin elektroforez ve korozyon), cihazı (elektrokromik ekranlar, elektroanalitik sensörler, piller ve yakıt hücreleri) ve teknolojiyi (metallerin elektrokaplanması ve büyük ölçekli alüminyum ve klor üretimi) kapsamaktadır (Bard ve Faulkner 2001).

Elektrokimyasal yöntemlerin temeli, test çözeltisine bir çift elektrot koyarak bir elektrokimyasal hücre oluşturmak ve daha sonra elektrot-çözelti ara yüzeyinde meydana gelen elektrokimyasal reaksiyonu gözlemleyerek ilgili maddenin nitelik ve niceliğini değerlendirmeye dayanmaktadır. Potansiyometrik yöntemlerde elektrot potansiyeli ile iyon miktarı arasındaki ilişki ile ilgilenilirken voltammetrik yöntemlerde ölçülen parametre, uygulanan bir voltaj üzerine iyon miktarıyla ilişkili olarak elektrottan geçen akımdır. Kondüktometrik yöntemlerde, çözeltideki iyon miktarıyla ilişkili olarak iki elektrot arasındaki direnç incelenir (Yu ve Ji 1993). Bu tez çalışmasında kullanılan elektrokimyasal yöntemlerle ilgili bilgi aşağıda verilmiştir.

2.1.1 Voltammetri

Voltammetrik yöntemler referans elektroda karşı çalışma elektroduna bir potansiyel uygulanması ve akımın ölçülmesi ile karakterize edilir. Akım, çalışma elektrodundaki elektrokimyasal indirgenme veya yükseltgenme yoluyla meydana gelen elektrolizin sonucudur. Elektroliz akımı, moleküllerin elektroda kütle taşıma hızı ile sınırlıdır. Voltammetri, terim olarak incelendiğinde potansiyelin belirli bir aralıkta tarandığı yöntemler için kullanılır. Genellikle akım cevabı analitin derişimi ile orantılı bir tepe ya da plato şeklindedir. Voltammetrik yöntemler arasında doğrusal tarama voltammetrisi,

dönüşümlü voltammetri, diferansiyel puls voltammetrisi, hidrodinamik voltammetri, kare dalga voltammetrisi, sıyırma, polarografi ve alternatif akım (AC) voltammetrisi yer alır. Bu yöntemler genel olarak geniş dinamik aralığa sahip ve düşük derişimdeki türlerin tayini için elverişlidir (Ronkainen vd. 2010).

2.1.1.1 Dönüşümlü voltammetri

Dönüşümlü voltammetride (CV) elektrokimyasal akım, çalışma elektroduna uygulanan potansiyele göre ölçülür ve potansiyel belirli bir tarama hızında taranır. Potansiyel, çalışma ve referans elektrotları arasına uygulanırken akım, çalışma ve karşıt elektrot arasında ölçülür. Elektrokimyasal akım x ekseninde ve elektrot potansiyeli y ekseninde yer alır. Ölçümler sırasında, elektrot potansiyeli ayarlanan bitiş potansiyeline ulaştıktan sonra, tarama ters yönde başlangıç potansiyeline geri döndüğünden bu tekniğe dönüşümlü voltammetri denir. İleri ve geri yöndeki tarama ihtiyaç duyulduğu kadar tekrarlanabilir. Dönüşümlü voltammetri, redoks türlerinin yükseltgenme ve indirgenme işlemi sırasında ortaya çıkan elektrokimyasal akımın ölçülmesi ile gerçekleştirilir. Redoks reaksiyonu sırasında elektronlar analitten çalışma elektroduna veya çalışma elektrodundan analite aktarılır. Bu yöntem, çözeltideki analitin veya elektrot yüzeyine kaplanmış bir malzemenin elektrokimyasal özelliklerini incelemek için kullanılabilir (Kumar ve Kalkal 2021).

2.1.2 Amperometri

Amperometrik sistemler, kimyasal bir reaksiyonda elektrotların yüzeyindeki elektroaktif türlerin indirgenmesi veya yükseltgenmesinden kaynaklanan akımı sürekli olarak belirleyen elektrokimyasal cihazlardır. "Amperometri" terimi potansiyel, çalışma ve referans elektrotları arasında sabit tutulurken zaman içinde akımdaki (elektrokimyasal yükseltgenme veya indirgeme nedeniyle) değişimin izlenmesini ifade eder (Rezaei ve Irannejad 2019). Amperometriyi voltammetriden ayıran, bir tarama potansiyelinin olmamasıdır. Yöntem, potansiyelin doğrudan istenen değere ayarlanması ve ardından oluşan akımın ölçülmesi ile uygulanır. Akım, numunedeki elektroaktif türlerin derişimiyle orantılıdır. Amperometrik sensörler/biyosensörler, tayin için kullanılan

yükseltgenme veya indirgenme potansiyelinin analitin karakteristik özelliği olması nedeniyle iyi bir seçiciliğe sahiptir (Ronkainen vd. 2010).

2.1.3 Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), uygun bir elektrokimyasal dönüştürücüye bağlı veya onun bir parçası olan her türlü katı veya sıvı malzemenin yığın ve arayüzey elektriksel özelliklerinin araştırılması için kullanılabilen bir yöntemdir (Fernandez-Sanchez vd. 2005). Bir elektrokimyasal sistemin iletkenliğini etkileyebilecek bir malzemenin veya belirli bir sürecin herhangi bir yapısal özelliği EIS ile incelenebilir. EIS, uygulanan bir pertürbasyonun frekansının bir fonksiyonu olarak bir sistemin empedansını (Z) ölçer. Elektrokimyasal sistemlerle çalışırken, bu pertürbasyon küçük genlikli bir AC voltajdır ve cevap, uygulanan voltajla genlik ve faz bakımından farklılık gösteren bir akımdır (Fernandez-Sanchez vd. 2005). Fiziksel bir bakış açısından empedans, kapasitörler, dirençler, indüktörler ya da bunların birleşimin ile oluşan bir devreden alternatif akım geçmesi ile ortaya çıkan tamamen karmaşık bir dirençtir (ohm).

Empedans "spektroskopisi" adı, empedansın genellikle tek bir frekans yerine farklı frekanslarda belirlenmesinden türetilmiştir. Farklı frekansların kullanılmasıyla, yüzeylerin, katmanların veya membranların yanı sıra değişim ve difüzyon süreçlerinin karakterizasyonuna izin veren bir empedans spektrumu elde edilir (Lisdat ve Schäfer 2007).

Empedans ölçümleri sıklıkla Nyquist eğrileri ile ifade edilir. Nyquist eğrisi, bir yarım dairesel kısım ve bir doğrusal kısım içerir. Yüksek frekanslarda yarım daire şeklindeki kısım elektron aktarımı ile sınırlı sürece karşılık gelir ve çapı elektrot arayüzündeki redoks probunun elektron transfer kinetiğini kontrol eden elektron transfer direncine (R_{ct}) eşittir (Çelik vd 2015).

EIS, korozyon mekanizmalarının aydınlatılması, membranlar ve membran/çözelti arayüzleri boyunca yük aktarımının karakterizasyonu ve pillerin optimizasyonu için

kullanılmaktadır. Biyosensörlerde ise dönüştürücü yüzeyindeki bağlanma olaylarının incelenmesi için uygulanmaktadır. Ayrıca, biyolojik tanıma süreçlerinin tespitinde ve biyomoleküllerin dönüştürücü üzerine immobilizasyonu sırasında meydana gelen değişimler gibi yüzey modifikasyonlarını karakterize etmek için de değerli bir araçtır (Lisdat ve Schäfer 2007).

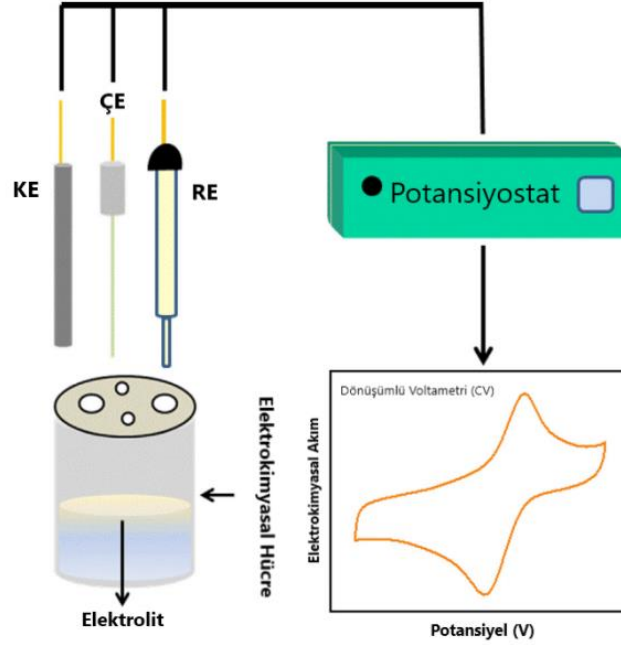
2.1.4 Potansiyometri

Potansiyometrik analiz, basit bir elektrokimyasal hücreye bir referans elektrot ve bir indikatör elektrot yerleştirilmesi ve iki elektrot arasındaki potansiyel farkının kaydedilerek numune derişimi hakkında önemli bilgiler elde edilmesine dayanır. Potansiyometride, akımın sıfıra yaklaştığı durumda meydana gelen potansiyel değişiklikleri (referans elektroda karşı) bir hedef analit derişimindeki değişikliklerle ilişkilendirilir (Magar vd 2021). Potansiyometrik sensörlere örnek olarak cam pH elektrodu ve K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- gibi iyonlar için iyon seçici elektrot verilebilir. Sensörler, ilgili yüklü iyonla seçici olarak reaksiyona giren bir membran boyunca potansiyeli ölçmek için iki referans elektrotlu bir elektrokimyasal hücre kullanırlar (Ronkainen vd. 2010).

2.2 Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal yöntemler, elektrot ve elektrolit ara yüzeyinde oluşan akım, potansiyel veya yükün elektrokimyasal bir sinyal olarak gözlendiği yöntemlerdir. Bu sinyal, elektrotlar ve elektrolit içeren elektrokimyasal hücre adı verilen bir hücrede meydana gelen kimyasal reaksiyon nedeniyle oluşur. Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) elektrokimyasal temelli biyosensörler hakkında kılavuz hazırlamıştır ve buna göre elektrokimyasal biyosensör, bir elektrokimyasal dönüştürücü elemanı ile doğrudan temas halinde tutulan bir biyolojik tanıma elemanı (biyoreseptör) kullanarak kantitatif veya yarı kantitatif analitik bilgi sağlayabilen, kendi kendine yeten entegre bir cihaz olarak tanımlanmıştır. Üç elektrotlu elektrokimyasal hücreler; elektrokimyasal biyosensörde en yaygın kullanılan sistemlerdir. Söz konusu üç elektrot; çalışma elektrodu (ÇE), referans elektrot (RE) ve karşıt (veya yardımcı) elektrottur (KE) (Şekil 2.1). ÇE,

ölçülen kimyasal sinyali elektrik sinyali formuna dönüştüren bir dönüştürücü olarak çalışır (Kumar ve Kalkal 2021).



Şekil 2.1 Elektrokimyasal ölçümlerde üç elektrotlu hücre sistemi (Kumar ve Kalkal 2021)

Biyosensörlerin tasarımında biyoreseptör olarak enzimler, nükleik asitler (DNA, RNA), antikorlar, doku veya mikroorganizmalar kullanılabilirken dönüştürücü olarak ise elektrokimyasal, optik, akustik veya termal dönüştürücülerin kullanılması mümkündür. Bu cihazlar, biyoseptör ve analitin etkileşime bağlı olarak elektrokimyasal sinyaldeki (akım/yük/potansiyel, vb.) değişimi ölçerler (Keskin ve Arslan 2020, Kumar ve Kalkal 2021). Biyosensörler, analite karşı yüksek duyarlık gösteren, hızlı cevap veren, basit cihazlardır ve hastalıkların teşhis ve tedavisi, gıda ve çevre analizleri, biyoteknoloji ve nanoteknoloji gibi alanlarda kullanılmaktadırlar (Keskin ve Arslan 2020).

2.3 Biyosensörlerin Performans Faktörleri

Biyosensör performansı ve verimliliği, IUPAC tarafından belirlenen yönergeler göre iyi tanımlanmış teknik ve işlevsel özellikler açısından değerlendirilir. Dönüştürücü tipi ve numune uygulaması, bir sensörün farklı alanlardaki verimliliğini ve kullanılabilirliğini

belirleyen faktörlerdir. Biyosensör performansı ise doğrusal çalışma aralığı, duyarlık, gözlenebilme sınırı, seçicilik, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik, doğruluk, cevap süresi, sağlamlık ve kararlılık gibi çeşitli parametrelere bağlıdır (Ensafi 2019).

2.3.1 Doğrusal çalışma aralığı ve duyarlık

Sensörlerin doğrusal çalışma aralığı, artan substrat derişimine karşı sensör sinyalinin grafiğe geçirilmesiyle oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlenir. Bu egride sensör sinyali ve substrat derişiminin doğrusal değişim gösterdiği aralık ilgili sensörün doğrusal çalışma aralığıdır. Bir sensörün doğrusal çalışma aralığının bilinmesi bu sensörün ölçebileceği maksimum ve minimum analit derişiminin belirlenmesi için büyük öneme sahiptir. Çizilen kalibrasyon eğrilerinden yararlanılarak ayrıca, bilinmeyen numunelerdeki analit derişimleri de interpolasyon yoluyla belirlenebilir (Ensafi 2019). Duyarlık, analitik yöntemlerde kalibrasyon grafiğinin eğimi olarak tanımlanabilir (Rodríguez vd. 2006).

2.3.2 Gözlenebilme ve alt tayin sınırı

Yeterince düşük sinyal/gürültü (S/N) oranına sahip bir sensör tarafından doğru bir şekilde tespit edilebilen en düşük analit derişimi gözlenebilme sınırı (LOD) olarak tanımlanır. Bu parametre tipik olarak art arda ölçülen başlangıç sinyallerinin standart sapmasının (s) üç katının duyarlığa (m) bölünmesiyle hesaplanır ($3s/m$) (Ensafi 2019).

Analitin, uygun doğruluk ve kesinlikle tayin edilebileceği en düşük derişim ise alt tayin sınırı (LOQ) olarak adlandırılır. Bir sensör için LOQ değeri $10s/m$ formülü kullanılarak hesaplanabilir.

2.3.3 Seçicilik

Bir sensörün belirli bir analite karşı özgülüğü seçicilik olarak adlandırılır. Biyosensör cevabı, girişimci bileşiklerin varlığıyla artabilir ya da azalabilir. Analite yapısal ve/veya

kimyasal olarak benzeyen girişimci türler tipik olarak biyosensör sinyalini arttırır. Buna karşılık, immobilize biyokatalizöre karşı inhibe edici etki gösteren türler genellikle çalışma elektrodunun cevabında ciddi azalmalara yol açar (Ensafi 2019).

2.3.4 Cevap süresi

Cevap süresi, bir sensörün analiz edilecek analitin bulunduğu numune ortamına temas ettiği andan sensör sinyalinin elde edildiği ana kadar geçen süredir. Cevap süresine etki eden faktörler arasında numune sıcaklığı ve derişimi; biyoreseptör kalınlığı, geometrisi ve geçirgenliği; numunenin karıştırılma hızı yer alır. Ayrıca, cevap süresi analit sinyalinin kararlı durum değerin %95'ine ulaşması için gereken süre olarak da tanımlanır (Ensafi 2019).

2.3.5 Sağlamlık

Sağlamlık bir biyosensörün küçük fiziksel veya elektriksel değışimler nedeniyle kalibrasyon sapmaları göstermeme yeteneğı olarak tanımlanır.

2.3.6 Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik

Bir sensör sisteminin art arda yapılan ölçümler sonucunda aynı cevapları üretme yeteneğine tekrarlanabilirlik denir. Tekrar üretilebilirlik ise aynı yöntem kullanılarak hazırlanan birden çok sensörün aynı cevapları üretme kabiliyeti olarak tanımlanır. Daha yüksek tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirliğe sahip bir biyosensörün daha yüksek güvenilirliğe sahip olduğu söylenebilir (Miller ve Miller 2000).

2.3.7 Doğruluk

Bir sensör sisteminin doğruluğı ölçülen değerin gerçek veya gerçek kabul edilen değere yakınlığı olarak tanımlanır. Bir sensörün cevabının doğruluğı, cevabın standart bir ölçüm

maddesiyle kıyaslanmasıyla ya da üstün doğruluğa sahip bir sistem tarafından üretilen bir ölçümle karşılaştırılmasıyla belirlenebilir (Miller ve Miller 2000).

2.3.8 Kararlılık

Kararlılık, belirli bir süre boyunca biyosensörün duyarlılığındaki değişiklikleri temsil eden bir parametredir. Ticari değeri olan biyosensörler, yüksek duyarlılık ve seçicilikle birlikte zaman içinde kabul edilebilir kararlılığa sahip olanlardır. Biyosensör kararlılığı çalışma veya depolama kararlılığı olarak ifade edilebilir. Çalışma kararlılığı sıcaklık, numune çözeltisi pH'ı, organik çözücülerin varlığı ve biyoreseptör immobilizasyon yöntemi gibi çalışma koşullarından etkilenir. Depolama kararlılığı ise depolama koşulları (kuru veya ıslak) gibi faktörlerin yanı sıra biyosensör depolaması için kullanılan tamponun bileşimi, pH'ı ve sıcaklığına bağlıdır (Ensafi 2019).

Yukarıdaki parametreler incelendiğinde, ideal bir biyosensörün yüksek seçicilik, duyarlılık, tekrarlanabilirlik, güvenilirlik ve kararlılık, kalibrasyon kolaylığı, uygulama kolaylığı, sağlamlık ve dayanıklılık, küçük boyutlar (taşınabilirlik) ve kısa cevap süresi ile karakterize edilen bir biyosensör olduğu sonucuna varılabilir (Ensafi 2019).

2.4 Kalem Grafit Elektrot

Kalem grafit elektrotlar (PGE), ticari kalem uçları şeklinde olup elektrot malzemesi olarak son dönemlerde sıklıkla kullanılmaktadır. PGE'ler genel olarak kullanıcı dostu oluşları, karşılaştırılabilir elektriksel özellikleri nedeniyle diğer standart elektrotlara uygun bir alternatif olmaları, düşük maliyetleri, kolaylıkla modifiye edilebilmeleri ve tek kullanımlık uygulamalara olanak sağlamaları sayesinde oldukça fazla tercih edilmektedirler. Yapılan voltammetrik çalışmalardan elde edilen bağımsız sonuçlara göre PGE'lerin, çok daha pahalı olan camı karbon, pirolitik grafit ve karbon fiber elektrotlara kıyasla daha yüksek kararlılık ve analitik tekrar üretilebilirlik gösterdikleri vurgulanmıştır (Torrinha vd. 2018). Aynı zamanda PGE'nin yüzey homojenliği ve sulu ortamlarda iyi adsorpsiyon özelliği göstermesinden dolayı iyi bir elektrokimyasal aktivite sergilediği

belirtilmiştir. PGE'lere dayalı sensör ve biyosensörler pestisitler, farmasötikler, gıda katkı maddeleri, metal iyonları, antioksidanlar vb. gibi farklı türlerin araştırılmasında geniş bir uygulama alanına sahiptir (Annu vd. 2020).

PGE kullanılırken en iyi analitik performansı elde etmek için literatürde, sertlik seviyesi ve elektrot yüzeyine yapılan ön işleminin kritik öneme sahip olduğu belirtilmektedir. PGE; grafit, kil ve reçineden oluşur ve bunların oranları sertlik (H) ve koyuluğu (B) dikkate alan bir derecelendirme ölçeğine göre değişir. Sertlik, üretim sırasında kurşun kalem uçlarına eklenen kil miktarına göre belirlenir, kil ne kadar fazla olursa kalem o kadar sert olur. 'H'nin yanındaki sayı ne kadar yüksekse, kurşun kalem ucu o kadar serttir. Ayrıca, 'B'nin yanındaki sayı ne kadar yüksekse, kurşun kalem ucu o kadar yumuşaktır (Romanholo vd. 2020).

2.5 Altın Nanoçubuklar

Metal ve metal oksit nanopartiküller önemli bir nanomalzeme grubudurlar ve bu malzemeler büyük yüzey-hacim oranı, yüksek yüzey reaksiyon aktivitesi, kimyasal kararlılık, iyi katalitik etkinlik gibi özellikleri sebebi ile biyosensör performansını geliştirme amacı ile kullanılırlar. Ayrıca, bu yapıların biyomolekül immobilizasyonu için de uygun platformlar oluşturduğu görülmüştür. Platin, altın, gümüş, gibi metal nanopartiküller ve Co_3O_4 , Fe_3O_4 , TiO_2 , SnO_2 vb. metal oksit nanopartiküller biyosensör çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Chen vd. 2013, Shi vd. 2014).

Altın nanomalzemelerin bir türü olan altın nanoçubuklar (AuNR), elektrokimyasal biyosensörler ve biyoelektrokataliz için immobilizasyon matrisi olarak tercih edilmekte olup, basit bir hazırlanma prosedürüne ve yüksek kararlılığa sahiptirler. Küresel olmayan morfolojiye sahip farklı altın nanokristaller arasında altın nanoçubuklar, etkin kütle taşıma özelliklerine sahip yüksek yüzey alanları ve elektrokimyasal sensörlerin duyarlılığını ve seçiciliğini artırması aynı zamanda biyoyumumlulu özellik göstermesi nedeniyle büyük ilgi görmüştür (Alagiri vd. 2017). Ek olarak, AuNR'lerin yüzey kimyası, güçlü Au-S veya Au-N bağı veya fiziksel adsorpsiyon yoluyla amfifilik polimerler, şekerler, nükleik asitler ve proteinler gibi çeşitli biyofonksiyonel grupların bağlanmasına

izin verecek şekilde çok yönlüdür. Bu nedenle AuNR'ler, kompozit filmin elektrot yüzeyine yapışma kabiliyetini geliştirebilir, enzim immobilizasyonu ve biyosensör üretimi için ideal bir matris sağlayabilirler (Li vd. 2013).

2.6 Polimer

Elektrot yüzeylerinin elektroaktif ve iletken polimerler ile kaplanmasının söz konusu kaplamaların iyi iletkenlikleri, biyouyumlulukları ve gözeneklilikleri nedeniyle sistemlerin duyarlılığını arttırdığı bilinmektedir. Ek olarak, bu polimerlerin çoğu, çıplak elektrodun seçiciliğini geliştirerek koruyucu veya seçici özellikler sergilemişlerdir (Gürsoy vd. 2019). Elektrot yüzeyinin elektropolimerizasyon ile modifiye edilmesinde hem amino ($-NH_2$) hem de karboksil ($-COOH$) gruplarına sahip oldukları için amino asitler oldukça sık tercih edilirler (Prinith ve Manjunatha, 2022). Amino asitlerin biyouyumlu olmaları ve kendi fonksiyonel grupları ile elektroaktif polimerler oluşturabilme yetenekleri onların elektropolimerizasyonda ön plana çıkmalarını sağlamıştır. Ayrıca, biyomolekülleri elektrostatik olarak çekme ve zıt yükler taşıyan iyonik molekülleri bağlama yetenekleri de amino asitlerin biyosensör uygulamalarında kullanımı için avantaj oluşturmaktadır (Gürsoy vd. 2019).

Bu tez çalışmasında polimerleştirilerek elektrot modifikasyonunda kullanılan glisin, sinir sistemi tarafından kullanılan ve epileptik nöbetlerin önlenmesinde nörotransmitter inhibitörü olarak fonksiyon gösteren bir amino asittir (Alqasim 2022). Bir tür poli(amino asit) olan PGL biyouyumlu bir polimerdir ve (biyo)sensör geliştirilmesinde ilgi çekici hale gelmiştir. Hidrofilik özelliği sayesinde elektropolimerizasyon ile elektrokimyasal elektrot yüzeyinde kolayca oluşturularak elektron aktarım hızını arttırmak ve sensör yüzeyinin çabuk kirlenmesini önlemek amacıyla kullanılabilir. Ayrıca, literatürde elektrot yüzeyinin PGL ile modifiye edilmesi sonucu oluşturulan sensörlerin elektrot aktif yüzey alanı, seçicilik ve hassasiyeti artırıcı yönde etki gösterdiği çalışmalar mevcuttur (Kordasht vd. 2021).

2.7 İyonik Sıvı

İyonik sıvılar, uzun alkil zincirlerinden dolayı yüzey aktif iyonik sıvılar olarak kategorize edilirler. Bu sıvılar yanmazlık, iyi iletkenlik, uçuculuk, mükemmel çözünme yetenekleri ve termal kararlılık gibi fizikokimyasal özellikleri nedeniyle son zamanlarda yüzey aktif maddeler olarak sıklıkla kullanılmaktadır. İyonik sıvıların hidrofobikliği, alkil zincir uzunluğu, geçirgenliğini artırma yetenekleri elektrot modifikasyonunda tercih edilmelerini sağlamaktadır (Sharma vd. 2023). IL'lerin en çekici özelliklerinden biri de olağanüstü elektrokimyasal özellikleridir ve bu nedenle, elektrokimyasal sensör ve biyosensör uygulamalarında tercih edilmektedirler. Ayrıca, IL'lerin biyomoleküller ve enzimlerle iyi uyumluluk gösterdiği de bildirilmiştir (Singh vd. 2012).

2.8 Enzim

Enzimler, canlı sistemlerde biyolojik katalizör görevi görerek kimyasal türlerin dönüşümlerini destekler. Seçicilik açısından diğer katalizörlerden daha avantajlı konumdadırlar. Saflaştırma ve ayırma maliyetleri yüksek olduğu ve çevresel koşulların zorluklarına göre aktivitelerinde azalma meydana geldiği için endüstriyel uygulamalarda sınırlı kullanılmaktadır. Aynı zamanda enzimlerin sulu ortamda kolay çözünebilmeleri ve reaksiyon ortamından geri kazanımının zor olması sebebiyle en başarılı ve popüler kullanım yöntemi immobilizasyon olarak bilinmektedir (Kaçar vd. 2016).

Bu tez çalışmasında biyoreseptör olarak kullanılan tirozinaz enzimi aynı zamanda polifenol oksidaz, monofenol oksidaz, fenolaz veya katekolaz olarak da adlandırılır ve bakır içerir. Enzimin işlevinin L-tirozinin L-dopa hidroksilasyonunu ve ardından L-dopa'nın dopakinona yükseltgenmesini katalizlemek olduğu bilinmektedir. Tirozinaz adı, enzimin substrat olarak tirozin ve dihidroksifilalanine karşı spesifikliği nedeniyle kullanılmaktadır. Bu enzim, bitkilerde, mikroorganizmalarda, mantarlarda ve bazı hayvan organlarında yaygın olarak bulunur. L-dopa tirozinaz ile yükseltgenir ve dopakinona dönüştürülür (Pilevneli ve Konuklugil 2020).

2.9 Parkinson Hastalığı ve Levodopa

Parkinson hastalığının klinik özellikleri ilk kez 1817 yılında James Parkinson tarafından tanımlanmıştır. Parkinson, çalışmasında görsel ancak ayrıntılı olarak semptomları tanımlamış ve hastalığın ilerleyici kötüleşmesini de tartışmıştır. Günümüzde, ikinci en yaygın görülen aşamalı nörodejeneratif bozukluk olan Parkinson hastalığı, nörolojik bozukluğun önde gelen nedenlerinden biridir. Yaygınlığı 50 yaşın üzerindeki kişilerde %1-2'ye ulaşmaktadır. Dünya çapında bir dağılıma sahiptir ve her iki cinsiyette de görülebilir (Shastri 2001).

Parkinson hastalığının semptom ve bulguları bazal gangliyonlardaki ilerleyen dopamin kaybıyla ilişkilidir. Diğer bir deyişle Parkinson hastalığının önemli nedeni, doğrudan alındığında beyne ulaşmak için kan-beyin bariyerini geçemeyen dopamin eksikliğidir. Dopaminin ilk öncüsü olan L-dopa (l-3,4-dihidroksifenilalanin), 1960'lardan beri Parkinson hastalığının tedavisinde en etkili semptomatik tedavi olmuştur. Bu nedenle, dopamin agonistleri veya L-dopa hastalığın erken evresinde mekanik bozuklukları düzeltmek için dışarıdan ikame kullanılır. L-dopa alındıktan sonra dopamine dönüşerek dopaminerjik nöronlarda depolanır. Bu depolama kapasitesi, L-dopa'nın değişken oral biyoyararlanımından kaynaklanan plazma seviyelerindeki dalgalanmaları tamponlar. L-dopa, Parkinson hastalığının tedavisinde hala altın standart olarak kabul edilmektedir (Goole ve Amighi 2009). Bu nedenle, hastaların genellikle beyindeki dopamin dekarboksilazın etkisi altında dopamine indirgenebilen L-dopa'yı alternatif bir tedavi olarak almaları gerekir. L-dopa, Parkinson hastalığının neden olduğu çeşitli semptomları etkili bir şekilde hafifletebilir, ancak dozaj sorunu klinik uygulamalarda hala büyük bir problemdir. Düşük dozaj hastalığı etkili bir şekilde durduramazken, yüksek dozaj dispraksi, miyospazm, zihinsel bozukluk vb. dahil olmak üzere bir dizi yan etkiye neden olabilir. Dahası, bireyler arasındaki ilaç etkisi ve ilaç metabolizması farklılıkları ilaç dozu kontrolündeki zorlukları artırmaktadır. Bu nedenle, Parkinson hastalığı tedavisi sırasında, insan serumunda L-dopa tayini, ilaç güvenliği ve sağlık yönetimi için büyük önem taşımaktadır (Yu vd. 2020).

2.10 Kaynak Araştırması

Mijajlovic ve arkadaşları (2023), L-dopa'nın elektrokimyasal tayini için $\text{Eu}_2\text{O}_3@\text{Cr}_2\text{O}_3$ nanopartikülleri ile modifiye edilmiş bir karbon pasta elektrot (CPE) hazırlamıştır. Elektrot modifikasyonunda kullanılan elementlerden biri olan Evropiyum, bir nadir toprak elementi olup, bu türler gelişmiş elektrokatalitik özelliklere sahip yeni elektrot nanokompozitleri tasarlamak için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Evropiyum, daha büyük redoks reaksiyon davranışına sahip önemli bir lantanit elementi olarak kabul edilmiştir. Bu çalışmada, $\text{Eu}_2\text{O}_3@\text{Cr}_2\text{O}_3$ 'ün hidrotermal sentezi gerçekleştirilmiş ve elde edilen nanopartiküller ilk kez CPE'yi modifiye etmek için kullanılmıştır. Geliştirilen $\text{Eu}_2\text{O}_3@\text{Cr}_2\text{O}_3/\text{CPE}$ elektrokatalitik özellikleri açısından incelenmiş ve L-dopa tayini için analitik bir yöntem geliştirmek amacıyla kullanılmıştır. Sensörün, geniş bir doğrusal çalışma aralığı (1–100 μM), yüksek duyarlık (1,38 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) ve düşük bir gözlenebilme sınırı (0,72 μM) sunduğu belirtilmiştir. Hazırlanan sensörün analitik uygulaması, piyasada bulunan farmasötik L-dopa tabletleri kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar $\text{Eu}_2\text{O}_3@\text{Cr}_2\text{O}_3/\text{CPE}$ sensörünün gerçek zamanlı L-dopa tayini için yüksek bir potansiyeli olduğunu göstermiştir.

Cembalo ve arkadaşları 2023 yılında yaptıkları çalışmada, elektrobiriktirme yoluyla hazırlanan bir grafen oksit tabakası üzerine çapraz bağlanma yöntemi ile tirozinaz enzimi immobilize ederek L-dopa tayini için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Bu biyosensörün hazırlanması sırasında enzim immobilizasyon prosedürü dikkatli bir şekilde optimize edilmiş olup bu sayede biyosensör üretimi önemli ölçüde kısalıp basitleştirilmiş ve uzun vadeli kararlılığın iyileştirilmesi sağlanmıştır. Immobilizasyon protokolünün etkinliği grafen oksidin gelişmiş performansı ile birleştiğinde tirozinaz ve grafen oksit modifiye camı karbon elektrot (GCE/GO/Tyr) için $3,21 \pm 0,01 \mu\text{A mM}^{-1}$ gibi yüksek bir duyarlık, 1–210 μM aralığında geniş bir doğrusal çalışma aralığı ve terapötik penceresi içinde L-dopa tayini için uygun olan 0,84 μM 'lık bir gözlenebilme sınırı elde edilmesini sağlamıştır. İlaçla tedavi edilen hastalarda tipik olarak gözlenen derişim seviyelerinde test edilen endojen bileşiklerden kaynaklanan girişimin elektrot üzerinde önemli bir etki yapmadığı görülmüştür. Askorbik asidin ise tirozinaz enzimini inhibe edici bir davranış sergilediği bulunmuş olup elektrodun dış yüzeyinin Nafyon ile modifiye

edilmesiyle bu etki bertaraf edilmiştir. Geliştirilen biyosensör insan plazmasında L-dopa tayini için uygulanmış ve elde edilen geri kazanımların %90,8–%102,4 arasında değiştiği görülmüştür.

Xiao ve arkadaşlarının 2022 yaptığı çalışmada Parkinson hastalığı için etkili bir ilaç olan L-dopa'nın terdeki derişimini izlemek için basit, giyilebilir, invaziv olmayan ve taşınabilir, enzim ve metal-organik kafes yapı (MOF) tabanlı bir elektrokimyasal biyosensör hazırlanmıştır. Zeolitik imidazolat kafes yapı/grafen oksit (ZIF-8/GO) kompozitleri, ZIF-8 nanopartiküllerinin GO yüzeyinde büyütülmesiyle hazırlanmış ve ardından kompozit yüzeyine tirozinaz enzimi immobilize edilerek biyosensör elde edilmiştir. Sürekli analiz ve takip yapılabilmesi için kablosuz bir elektronik devre yardımı ile sensör ve akıllı telefon arasında bağlantı yapılmıştır. Biyosensörün doğrusal çalışma aralığı 1–95 μM ve gözlenebilme sınırı (LOD) 0,45 μM olarak bulunmuş olup, tatmin edici bir tekrarlanabilirliğe ve mükemmel bir seçiciliğe sahip olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca, enzimin yüzeye immobilizasyonu sonucunda biyosensörün yüksek duyarlık ve iyi kararlılık gösterdiği belirtilmiştir. Biyosensörün yüksek kararlılığının tirozinaz enziminin ZIF-8/GO kompozit yüzeyine başarıyla immobilize edilmesinden kaynaklandığı söylenmiştir. Söz konusu sensörün, terdeki L-dopa'yı invaziv olmayan şekilde tespit etmek için kullanılabildiği ve sensörün kablosuz iletişim cihazlarıyla birleştirildiğinde, ticari elektrokimyasal çalışma ünitelerine kıyasla daha taşınabilir ve düşük maliyetli olacağı ifade edilmiştir.

Fang ve arkadaşları tarafından 2022 yılında yapılan çalışmada, Parkinson hastalığının takibi ve L-dopa tayini için bir giyilebilir amperometrik mikroiğne biyosensörü geliştirilmiştir. L-dopa, Parkinson hastalığı tedavisi için mevcut en etkili tedavilerden biri olarak kabul edilmektedir. Kısa yarı ömrü nedeniyle L-dopa'nın terapötik penceresinin dar olduğu ve uzun süreli L-dopa tedavisinin diskineziler, psikoz ve ortostatik hipotansiyon gibi bazı yan etkilere neden olacağı ifade edilmiştir. Bu nedenle, komplikasyon riskini azaltmak için Parkinson hastalarında L-dopa'nın dinamik derişimini giyilebilir biyosensörlerle izlemenin büyük önem taşıdığı savunulmuştur. Bununla birlikte, vücuttaki yüksek girişimci derişiminin L-dopa'nın in vivo izlenmesinde büyük zorluklara yol açtığı ve bu sorunu ele almak için, esnek bir diferansiyel mikroiğne dizisine

(FDMA) dayanan invaziv bir L-dopa biyosensörü önerilmiştir. Çalışmada 2 adet çalışma elektrodu tasarlanmıştır ve bu elektrotlar, paslanmaz çelik üzerine katman katman modifikasyon yapılarak elde edilmiş olup ilk çalışma elektrodunda Au nanodendrit katalitik katman, Nafyon, Polianilin (PANI)/enzim ve poliüretan (PU) kullanılırken, ikinci çalışma elektrodunda PANI/enzim katmanı yerine tirozinaz enzimi kullanılmıştır. Çalışma elektrotlarından biri L-dopa ve girişim yapan maddelere cevap verirken, diğer çalışma elektrodu yalnızca elektroaktif girişimlere yanıt vermiştir. Bu iki elektrodun diferansiyel akım cevabı, ortak girişimi ortadan kaldırarak L-dopa derişimiyle ilişkilendirilmiştir. Diferansiyel yapı sensöre mükemmel bir girişim önleme performansı sağlamış ve sensörün doğruluğunu artırmıştır. Bu yeni esnek mikroiğne sensörünün geniş bir doğrusal çalışma aralığı ($0-20 \mu\text{M}$), yüksek duyarlık ($12,618 \text{ nA } \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) ve uzun vadeli kararlılık (iki hafta) sergilediği görülmüştür. Sensör, L-dopa derişiminin invaziv izlenmesi yoluyla in vivo olarak da test edilmiş ve bu amaçla sıçanlar kullanılmıştır. FDMA, $+0,3 \text{ V}$ potansiyelde yaklaşık 2500 saniye boyunca deri altında denge akımına ulaşılması için bekletilmiş ve ardından sıçanın karın boşluğuna uygun miktarda L-dopa enjekte edilmesiyle ölçüm yapılmıştır. İn vivo deney, L-dopa'nın dinamik derişiminin minimal invaziv ve sürekli izlenmesi için FDMA'nın uygulanabilirliğini göstermiştir. Sonuç olarak, L-dopa sensörünün in vivo L-dopa'ya dinamik olarak hızlı cevap verdiği, önemli ölçüde girişim önleme özelliği göstermiş olduğu ve Parkinson hastalığında L-dopa'nın sürekli izlenmesi için kullanılabilme olasılığı olduğu ifade edilmiştir.

Moon ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptığı çalışmada L-dopa'nın, Parkinson hastalığının tedavisinde "altın standart" ilaç olarak kullanılmakta olduğu ancak, uzun süreli L-dopa kullanımının, motor ve motor olmayan komplikasyonların gelişmesi ile ilişkili olduğundan bahsedilmiştir. Çalışma grubu, vücuda L-dopa hapı alımı sonrasında terdeki L-dopa derişiminin etkin ve invaziv olmayan takibi için tek bir parmak ucu dokunuşuna dayalı bir biyosensör geliştirilmiştir. Söz konusu biyosensörü hazırlamak için perde baskılı karbon elektrot (SPCE) yüzeyine tirozinaz enzimi immobilize edilmiş ve enzimin sızmasını önlemek için glutaraldehit ile çapraz bağlama yapılmıştır. Dokunmaya dayalı invaziv olmayan tayin yönteminin, parmak ucu terinin anlık olarak toplanması ve yüksek geçirgenliğe sahip bir hidrojel üzerinden tirozinaz enzimi immobilize edilmiş elektroda taşınmasına dayandığı belirtilmiş olup terdeki L-dopa, enzimatik reaksiyon

sonrası oluşan dopakinonun -0,3 V potansiyelde indirgenmesiyle ölçülmüştür. Hazırlanan biyosensör, L-dopa'ya 5–30 μM derişim aralığında doğrusal cevap göstermiş ve gözlenebilme sınırı 1 μM (tahmini gözlenebilme sınırı 300 nM) olarak bulunmuştur. L-dopa sensörünün tekrarlanabilirliği, altı farklı sensörde 10 μM L-dopa derişiminin ölçülmesiyle değerlendirilmiş ve sonuçlar, sensörün %2,6 bağıl standart sapma (BSS) ile yüksek tekrar üretilebilirliğe sahip olduğunu ortaya koymuştur. 4°C'de tutulan sensörlerin, bir hafta sonra başlangıçta gösterdikleri akım cevabının %97,3'ünü koruyarak yüksek depolama kararlılığı sergiledikleri görülmüştür. İnsan deneklerden oluşan bir grupta kişiselleştirilmiş doz-cevap ilişkisi ve parmak dokunmasına dayalı ter ile kılcal kan örnekleri arasındaki yakın farmakokinetik ilişki gösterilmiştir.

Kannan ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı çalışmada L-dopa'nın yüksek hassasiyette tespiti için altın nanopartiküller ile işlevselleştirilmiş polipirol nanotüplere dayalı bir elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir. Elektrot modifikasyonunda kullanılan polipirol (PPy) nanotüpler, metil oranj ve FeCl_3 'ün kendiliğinden bozulan şablon olarak kullanılmasıyla elde edilmiştir. Ardından, altın nanopartiküller (AuNPs) elektrokimyasal yöntemle PPy nanotüpler üzerine biriktirilmiştir. Hazırlanan PPy-AuNPs hibrit kompoziti çeşitli karakterizasyon yöntemleriyle incelenmiştir. PPy nanotüpleri ile altın nanopartiküllerin birleşiminin, L-dopa'nın elektrokimyasal yükseltgenmesi için geniş yüzey alanı ve yüksek iletkenlik sağladığı belirtilmiştir. Modifiye elektrodun etkin yüzey alanı, dönüşümlü voltammetri (CV) yönteminden yararlanılarak 0,174 cm^2 olarak tespit edilmiştir. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) yöntemi ile elde edilen sonuçlar incelendiğinde, AuNP/PPy/GCE ile elde edilen düşük R_{ct} değeri, modifiye elektrodun elektron transfer kinetiğinin modifiye edilmemiş camı karbon elektroda (GCE) göre arttığını ortaya koymaktadır. Çalışmada, PPy-AuNPs'nin GCE üzerine kaplanmasıyla hazırlanan sensörün, daha düşük gözlenebilme sınırı (0,075 μM) ve yükseltgenme potansiyeli (380 mV) yanında iyi bir kararlılık ve tekrarlanabilirliğe sahip olduğu ifade edilmiştir. Modifiye elektrot, idrar ve ilaç gibi gerçek örneklerde L-dopa tayini için başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Sandeep ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı çalışmada, elektrokimyasal olarak indirgenmiş grafen oksit-gümüş nano parçacıkların (RGO-Ag) kullanıldığı nano

kompozit modifiye grafit (Gr) elektrot üzerine immobilize edilmiş ham Polifenol oksidaz enzimi (PPO) kullanılarak L-dopa'nın seçici ve duyarlı elektrokimyasal tayini gerçekleştirilmiştir. Gr elektrot, grafit elektrot üzerindeki grafen oksit-gümüş (GO-Ag) nano kompozitinin RGO-Ag nano kompozitine elektrokimyasal olarak indirgenmesi yoluyla modifiye edilmiştir. Daha sonra, *Manilkara Zapota* meyvesinden elde edilen ham PPO özütü Gr/ RGO-Ag modifiye elektrot üzerine immobilize edilmiştir. Hazırlanan Gr elektrodun her modifikasyon basamağı CV ve EIS teknikleri ile doğrulanmıştır. Modifiye elektrodun yüzey karakterizasyonu Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen sensörün, düşük gözlenebilme sınırı ve yüksek duyarlılık ile 1–150 μM derişim aralığında L-dopa tayinine yönelik mükemmel elektrokatalitik aktivite sergilediği öne sürülmüş olup kronoamperometrik ölçümler +0,2 V çalışma potansiyelinde gerçekleştirilmiştir. Söz konusu sensörün uzun dönem kararlılığını incelemek için CV tekniğinden yararlanılmış olup ölçümler 0,05 mM L-dopa içeren 0,05 M PBS tamponu içinde 50 mV s^{-1} tarama hızı ve (-0,1) – (+0,7) V potansiyel aralığında yapılmıştır. Ayrıca, geliştirilen biyosensörün idrar örneklerinde L-dopa tayini için pratik uygulanabilirliği incelenmiştir.

Narang ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapılan bir çalışmada, polifenolik içeriğin belirlenmesi için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Bu çalışmada, polivinil alkol membrana bağlı polifenol oksidazın altın kaplı Ag tel üzerine yerleştirilmesiyle çalışma elektrodu hazırlanmış olup, referans elektrot olarak gümüş/gümüş klorür (Ag/AgCl) ve karşıt elektrot olarak da Pt tel kullanılmıştır. Hazırlanan biyosensörün 30 °C sıcaklıkta 30 saniyede optimum cevap verdiği ve optimum çalışma pH'sının 7,5 olduğu ifade edilmiştir. Geliştirilen polifenol biyosensörünün +0,4 V potansiyelde L-dopa için doğrusal çalışma aralığı $5,0 \times 10^{-7}$ – $2,0 \times 10^{-5}$ M, gözlenebilme sınırı ise $5,0 \times 10^{-7}$ M olarak bulunmuştur. Biyosensörün çay yapraklarındaki, alkollü içeceklerdeki ve sudaki polifenollerini ölçebildiği rapor edilmiştir. Enzim elektrot 6 ay boyunca 280 kez kullanılmış olup kullanılmadığında 4°C'de saklanmıştır. Biyosensörün, gözlenebilme sınırı (0,5 μM) ve kararlılık (6 ay) açısından daha önceki membran bazlı biyosensörlerden daha iyi olduğu savunulmuştur.

Shoja ve arkadaşları tarafından 2015 yılında yapılan çalışmada sulu ortamda (fosfat tampon çözeltisi, pH 7,0) L-dopa'nın voltammetrik tayini için yeni ve seçici bir enzimatik biyosensör tasarlanmıştır. Biyosensörün geliştirilmesi, organik nükleofilik karbon nanotüp kompoziti ile modifiye edilmiş GCE üzerine horseradish peroksidaz enziminin (HRP) fiziksel olarak immobilize edilmesine dayanmaktadır; bu kompozitte organik nükleofil olarak p-fenilendiamin (pPDA) fonksiyonelleştirilmiş çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) ile kimyasal olarak bağlanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, hazırlanan biyoorganik nükleofilik karbon nanotüp kompozitinin (HRP/MWCNT-pPDA), L-dopa'nın yükseltgenmesi için yüksek elektron aktarım hızına, daha fazla $-NH_2$ reaktif bölgesine ve geniş etkin yüzey alanına sahip olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, bu çalışmada L-dopa folik asit ve ürik asit gibi girişimciler varlığında da tayin edilebilmiştir. Geliştirilen biyosensör SEM, enerji dağılımlı X-ışını analizi (EDX), FT-IR spektroskopisi ve CV ile karakterize edilmiştir. Diferansiyel puls voltammetrisi (DPV) kullanılarak L-dopa için çalışılan doğrusal aralığın 0,1–1,9 μM , gözlenebilme sınırı 40 nM ($S/N=3$ için) ve duyarlık yaklaşık 35,5 $\mu A \mu M^{-1}$ olarak bulunmuştur. Söz konusu biyosensörün hızlı cevap yüksek kararlılık ve tekrarlanabilirlik gibi çeşitli avantajlara sahip olduğu savunulmuştur.

Brunetti ve arkadaşlarının 2014 yılında yapmış olduğu çalışmada, seyreltilmemiş insan serumunda L-dopa tayini için tek kullanımlık bir elektrokimyasal biyosensör tasarlanmıştır. Bu biyosensörün hazırlanması, karbon nanotüplerle modifiye edilmiş perde baskılı karbon elektrot (SPCE) yüzeyine elektropolimerizasyon ile poli(tiyonin) film kaplanması ve ardından modifiye yüzeye tirozinaz enziminin çapraz bağlanmasına dayanmaktadır. Son olarak sensör bir nafyon katmanıyla kaplanmış ve bu sayede ön işleme ihtiyaç olmaksızın sensörün doğrudan insan serumunda kullanılmasının mümkün olduğu ifade edilmiştir. Geliştirilen biyosensörün -0,31 V sabit potansiyelde kronoamperometrik yöntem ile artan derişimlerdeki L-dopa'ya karşı akım cevapları ölçülmüştür. Elde edilen akım farkı–derişim grafiklerinden yararlanılarak SPCE/CNTs/poli(tiyonin)/tirozinaz/nafyon için doğrusal çalışma aralığı 0,8–22 μM olarak bulunmuştur. Söz konusu biyosensör için gözlenebilme sınırının ise 2,5 μM olarak tespit edildiği ifade edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, elektrot modifikasyonunda kullanılan karbon nanotüplerin varlığının sensörün duyarlılığını arttırdığı ve tirozinaz

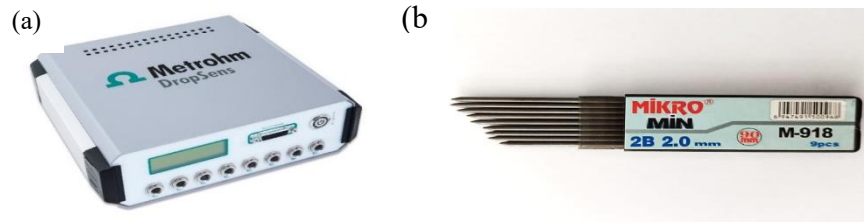
enziminin poli(tiyonin) katmanı üzerine immobilizasyonunun ise etkili sonuç verdiği düşünölmüştür. Geliştirilen biyosensörün, düşük maliyeti, taşınabilirliği ve az miktarda numune ile çalışmayı mümkün kılması ile birlikte, numune ön işlemine gerek olmaması ve tek kullanımlık olması sayesinde tekrarlanan kullanımdan kaynaklanan elektrot zehirlenmesinin önüne geçmesi gibi bazı önemli avantajları, söz konusu biyosensörün rutin klinik analizler için önemli bir umut vaat ettiğini düşöndürmüştür.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Ekipmanlar

Tez çalışması boyunca, amperometrik çalışmalar Metrohm Dropsens (A μ Stat 8000) marka potansiyostat kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 3.1a). EIS ve CV ölçümlerinde Metrohm Autolab marka potansiyostat kullanıldı. Çalışma elektrodu olarak Şekil 3.1b’de gösterilen Mikro Min 2B 2.0 mm M-918 kalem ucu karşı elektrot olarak platin tel (BASi–MW–1032), referans elektrot olarak da Ag/AgCl referans elektrodu (BASi–MF–2052) kullanıldı.

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Mettler Toledo marka hassas terazi kullanılarak tartıldı. Karışımların hazırlanma aşamasında homojenliği sağlamak amacıyla Chiltern marka (MS21S model) manyetik karıştırıcı, vorteks karıştırıcı (Isolab-I.622.01.001) ve ultrasonik banyo (Elma-LC30H) kullanıldı. Çözelti hazırlığında kullanılan su, Ultra Pure Water System'den (ELGA) sağlanan ultra saf su olarak temin edildi. Kullanılan karışımlar için pH ölçümleri Orion marka pH/iyon metre (720A) (Thermo Scientific, ABD) ile yapıldı.



Şekil 3.1 (a) Metrohm Dropsens elektrokimyasal analiz cihazı (çok kanallı), (b) Mikro Min marka M-918 2B 2.0 mm kalem ucu

Elektrot yüzeylerine ait SEM görüntüleri Ankara Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü'nde bulunan Carl Zeiss AG, EVO® 50 Series markalı taramalı elektron mikroskobu kullanılarak alındı.

3.2 Kimyasal maddeler

Çizelge 3.1, tez çalışması sırasında kullanılan kimyasallar, saflık düzeyleri ve üretici firmaları listelemektedir.

Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasallar, saflık dereceleri ve üretici firmalar

Kimyasal	Saflık Düzeyi	Üretici Firma
Altın nanoçubuk	>30 µg mL ⁻¹	Sigma
Askorbik asit	Ultra saf	Sigma
1-bütıl-3-metilimidazolyum hekzaflorofosfat	≥%97	Sigma
3-(3,4-dihidroksifenil)-L-alanin	%99	Acros Organics
Etanol	%99,8	Riedel
Glisin	%99	Acros Organics
Glutaraldehit	%25	Sigma
Glukoz	≥%99,5	Fluka
Hidroklorik asit	%36,5-38	Sigma
İnsan serumu	Filtrelenmiş, steril	Sigma
Lityum karbonat	≥%99	Sigma
Nafyon	%5	Sigma
Okzalik asit dihidrat	Saf	Riedel-de-Haen
Parasetamol	≥%98	Fluka
Potasyum ferrosiyanür (III)	%99	Sigma
Potasyum hekzasiyanoferrat (II)	≥%99,5	Sigma
Potasyum Klorür	Saf	Merck
Sığır serum albümini	≥96	Sigma
Sodyum hidroksit	%98-100,5	Sigma
Sodyum fosfat dihidrat	Saf	Sigma
Sodyum fosfat monohidrat	Saf	Sigma
Tirozinaz	≥1000 U mg ⁻¹	Sigma
Ürik asit	≥%99	Sigma

Ayrıca, gerçek numune çalışmasının yapıldığı analitik bileşen olarak tabloda belirtilen insan serumu ve Deva İlaç markalı Madopar 125 mg tablet (100 mg L-dopa) kullanıldı.

3.3 Çözeltiler

3.3.1 Fosfat tampon çözeltisi

Deney çalışmaları kapsamında 0,05 M derişimde ve istenen pH değerlerinde fosfat tampon çözeltileri (PBS) hazırlamak için uygun miktarlardaki sodyum fosfat dihidrat ve sodyum fosfat monohidrat katıları tartıldı ve gerekli miktarda ultra saf su içerisinde çözüldü. Çözeltinin pH'sını ayarlamak için 0,1 M NaOH ve 0,1 M HCl çözeltileri kullanıldı. Hazırlanan çözeltiler buzdolabında +4 °C'de muhafaza edildi.

3.3.2 NaOH ve HCl Çözeltileri

PBS'lerin pH ayarlanmasında kullanılan 0,1 M NaOH için %98-100,5'lik sodyum hidroksit katısından, 0,1 M HCl için %36,5-38'lik hidroklorik asit çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp ultra saf su ile homojen çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiler +4 °C'de muhafaza edildi.

3.3.3 Glisin çözeltisi

1 mM glisin çözeltisi, Çizelge 3.1'de belirtilen glisin standardından 3,75 mg tartılıp 50,0 mL pH 7,0 PBS içerisinde çözülmesi ile elde edildi. Homojen karışım elde etmek için çözelti vorteks cihazı yardımıyla karıştırıldı. İlgili çözelti her deney öncesinde taze olarak hazırlandı.

3.3.4 Altın nanoçubuk çözeltisi

Altın nanoçubuk (AuNR) çözeltisi ultra saf su ile seyreltilerek 7,5 µg mL⁻¹'lik çözeltisi hazırlandı. AuNR çözeltisi 30 µg mL⁻¹'lik şişesinden alınırken her seferinde saf N₂(g) ile doyuruldu ve çözeltinin homojen olması için vorteks cihazında karıştırıldı. Çözelti deneylerin öncesinde taze hazırlandı.

3.3.5 Altın nanoçubuk-iyonik sıvı çözeltisi

7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik AuNR çözeltisinden 97 μL alınarak üzerine Çizelge 3.1'de verilen 1-bütill-3-metilimidazolyum hekzaflorofosfat (IL) kimyasalından 3 μL ilave edildi ve %3'lük IL içeren AuNR (AuNR-IL) çözeltisi elde edildi. Çözelti hazırlanırken yüksek saflıkta $\text{N}_2(\text{g})$ ile doyuruldu ve çözeltinin homojen olması için vorteks cihazında karıştırıldı. Her deney öncesinde çözelti taze olarak hazırlandı.

3.3.6 Tirozinaz enzimi çözeltisi

Enzim çözeltisinin hazırlamak için 25 KU tirozinaz (Tyr), 500 μL pH 7,5 PBS ilavesiyle çözüldü ve vorteks cihazı ile karıştırılarak elde edilen homojen çözelti (50 U μL^{-1}) belirli kısımlara ayrılarak -18°C 'de muhafaza edildi.

3.3.7 Sığır serum albümini çözeltisi

1 mg mL^{-1} sığır serum albümini (BSA) çözeltisi hazırlamak için 1 mg BSA tartılarak 1 mL pH 7,5 PBS tamponunda çözüldü. Çözelti her deney öncesinde taze olarak hazırlandı.

3.3.8 Nafyon çözeltisi

%5'lik Nafyon çözeltisinden alınan 0,1 mL'lik kısım, 1:1 oranında hazırlanan etanol-su çözeltisi ile 1 mL'ye tamamlanarak %0,5'lik Nafyon çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözelti vorteks cihazı kullanılarak homojen hale getirildi ve kullanılmadığında $+4^\circ\text{C}$ 'de tutuldu.

3.3.9 Glutaraldehit çözeltisi

Glutaraldehitin (GA) %25'lik çözeltisi ultra saf su ile 1:100 oranında seyreltilerek %0,25'lik GA çözeltisi elde edildi. %0,25'lik GA çözeltisi her deney öncesinde taze olarak hazırlandı.

3.3.10 Levodopa çözeltisi

Derişimi $1,0 \times 10^{-2}$ M olan L-dopa çözeltisi hazırlamak için uygun miktarda 3-(3,4-dihidroksifenil)-L-alanin standardı tartılarak ultra saf su içinde çözüldü. Stok L-dopa çözeltisinin homojenliğinin sağlanması için söz konusu çözelti 15 dakika ultrasonik banyoda tutularak ardından vorteks cihazı yardımıyla karıştırıldı. Stok çözelti her deney öncesi taze hazırlandı ve bu çözeltiden alınan uygun miktarların saf su ile seyreltilmesiyle farklı derişimlerde L-dopa çözeltileri elde edildi.

3.3.11 Girişimci türlerin çözeltileri

Biyosensörün cevabı üzerine bozucu etki yapabilecek olan askorbik asit, ürik asit, sitrik asit, okzalik asit, glukoz, parasetamol gibi türlerin $1,0 \times 10^{-2}$ M'lık stok çözeltileri, bu maddelerden tartılan belirli miktarların ultra saf suda çözülmesiyle hazırlandı. Daha sonra stok çözeltilerin seyreltilmesiyle her bir türün $1,0 \times 10^{-3}$ M'lık çözeltileri hazırlandı ve taze olarak kullanıldı.

3.3.12 Redoks probu çözeltisi

Bu çözelti, potasyum hekzasiyanoferrat (II) ve potasyum ferrosiyanür (III) türlerinin derişimi 5 mM ve potasyum klorür derişimi ise 0,1 M olacak şekilde uygun miktarların tartılması ve ultra saf su kullanılarak çözülmesi ile hazırlandı.

3.4 Kalem Grafit Elektrotların modifikasyonu

Ticari olarak satın alınan kalem grafit uçlar, 0,5 cm'lik kısımları dışarıda kalacak şekilde yalıtkan bir materyal ile kaplandı. Bu uygulama sonrasında eşlenik olarak hazırlanan kalem grafit elektrotlar (PGE) yapılan tüm deneylerde çalışma elektrodu olarak kullanıldı.

3.5 Elektrotların Elektrokimyasal Karakterizasyonu

3.5.1 Dönüşümlü Voltammetri

Bölüm 3.4'te belirtilen basamakların uygulanmasıyla hazırlanan PGE, PGE/PGL, PGE/PGL/AuNR, PGE/PGL/AuNR-IL ve PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'ler için 0,1 M KCl içeren 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ çözeltisi içinde (-0,40) – (+0,80) V potansiyel aralığında ve 50 mV s⁻¹ tarama hızında dönüşümlü voltammetri (CV) çalışmaları yapıldı.

Ayrıca, L-Dopa'nın PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr yüzeyindeki elektrokimyasal davranışını incelemek için 0,1 M KCl ihtiva eden 0,05 M pH 7,0 PBS içinde, 50 mV s⁻¹ tarama hızında ve (-0,80) – (+0,80) V potansiyel aralığında dönüşümlü voltammogramlar alındı.

3.5.2 Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi

Bölüm 3.4'te anlatıldığı şekilde hazırlanan PGE, PGE/PGL, PGE/PGL/AuNR, PGE/PGL/AuNR-IL ve PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'lerin elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ölçümleri 0,1 M KCl ihtiva eden 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ çözeltisi içinde 0,18 V potansiyel ve 0,01–100000 Hz frekans aralığında yapıldı.

3.6 Modifiye Kalem Grafit Elektrotların Döngü Sayısı Optimizasyonu

Biyosensörün hazırlanmasında ilk basamak olan PGE yüzeyine PGL kaplanması aşamasında optimum döngü sayısının bulunması için Bölüm 3.4'te anlatılan şekilde 4 adet elektrot hazırlandı ve bu elektrotlara döngü sayıları sırasıyla 5; 10; 15 ve 20 olacak şekilde PGL kaplandı. Hazırlanan her bir PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'nin -0,3 V potansiyelde kararlı hal akımına ulaşması beklendi (pH 6,5 PBS). Kararlı hal akımının elde edilmesinin ardından çözeltiye art arda L-Dopa ilaveleri yapılarak kalibrasyon grafikleri oluşturuldu ($N=3$). Elde edilen duyarlıklar kıyaslandı ve en yüksek duyarlığın elde edildiği PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'nin hazırlanmasında uygulanan döngü sayısı optimum değer olarak kabul edildi.

3.7 Altın Nanoçubuk Miktarının Optimizasyonu

Biyosensör modifikasyonunda kullanılan AuNR'nin elektrot yüzeyindeki optimum derişimini bulabilmek için IL derişimi %3 olacak şekilde sabit tutularak 4 farklı derişimde AuNR içeren çözeltiler hazırlandı. Sırasıyla 3; 7,5; 15 ve 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AuNR içeren çözeltiler kullanılarak 4 adet PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr oluşturuldu. Hazırlanan biyosensörlerin her biri için -0,3 V potansiyelde 3 tekrarlı kalibrasyon eğrileri elde edildi (pH 6,5 PBS). L-dopa için en yüksek duyarlığın elde edildiği biyosensörün oluşturulmasında kullanılan karışımdaki AuNR derişimi optimum değer olarak belirlendi.

3.8 İyonik Sıvı Miktarının Optimizasyonu

PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'nin oluşturulmasında kullanılan türlerden biri olan IL'nin elektrot yüzeyindeki optimum derişimini bulabilmek amacıyla AuNR derişimi sabit tutularak (7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) sırasıyla %0,5, %1; %3 ve %5 IL içeren çözeltiler ile 4 farklı biyosensör hazırlandı. Söz konusu biyosensörlerin pH 6,5 PBS'de ve -0,3 V potansiyeldeki duyarlıkları belirlendi ve L-dopa için en yüksek duyarlığın gözleendiği biyosensörün hazırlanmasında kullanılan karışımda yer alan IL değeri optimum olarak seçildi.

3.9 Enzim Miktarının Optimizasyonu

PGE/PGL/AuNR-IL yüzeyine immobilize edilen Tyr enziminin optimum miktarının belirlenmesi için, diğer bileşenler optimum düzeyde modifiye edildikten sonra söz konusu elektrot yüzeyine sırasıyla 50 U, 100 U, 150 U, 200 U ve 250 U enzim immobilize edilerek 5 farklı biyosensör hazırlandı. PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'ler ile elde duyarlıklar kıyaslanarak L-dopa için en yüksek duyarlığın elde edildiği biyosensöre immobilize edilen enzim miktarı optimum olarak kabul edildi.

3.10 Optimum Çalışma Koşulları

3.10.1 pH

Deney çalışmaları için ortamın optimum pH değerinin belirlenmesinde 6,0–9,0 aralığında 0,5 birim farklarla 0,05 M derişimde yedi farklı PBS çözeltisi hazırlandı. -0,3 V potansiyel uygulanan PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr ile farklı pH’larda PBS içeren çözeltilere art arda L-dopa ilaveleri yapıldı ve elde edilen kalibrasyon eğrilerinin duyarlıkları karşılaştırıldı. En yüksek duyarlığın elde edildiği tampon çözelti belirlenerek tüm deneylerde söz konusu pH’ya ayarlanmış PBS kullanıldı.

3.10.2 Çalışma potansiyeli

Geliştirilen biyosensörün amperometrik akım cevabının potansiyel ile değişimini incelemek için biyosensöre sırasıyla; -0,1; -0,2; -0,3 ve -0,4 V potansiyeller uygulandı. 4 farklı potansiyelde elde edilen akım cevapları incelenerek biyosensörün L-dopa için en duyarlı cevap verdiği potansiyel belirlendi.

3.11 Biyosensörün Performans Faktörleri

3.11.1 Doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı ve alt tayin sınırı

Optimum bileşimde hazırlanan PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörü 0,05 M pH 6,5 PBS ve -0,3 V çalışma potansiyelinde kararlı hal akımı gözleninceye kadar bekletildi ve bu noktada elektrokimyasal hücreye uygun L-Dopa derişimindeki çözeltilerden art arda ilaveler yapılması ile elde edilen akım cevapları kaydedildi. Her bir derişimde elde edilen akım farkları (akım cevabı-kararlı hal akımın) söz konusu derişime karşı grafiğe geçirildi. Elde edilen kalibrasyon eğrisinin doğrusal olduğu bölge biyosensörün doğrusal çalışma aralığı olarak belirlendi.

Gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ), L-Dopa için belirlenen doğrusal çalışma aralığının en düşük derişiminin tespit edilmesi ve bu derişimdeki akım cevabının 10 kere ölçülmesi ile hesaplandı. Ölçümler sonucunda hesaplanan akım farklarının standart sapması (s) bulundu ve s değerinin 3 katının kalibrasyon eğrisinin eğimine (m) bölünmesi ile ($3s/m$) LOD; s değerinin 10 katının kalibrasyon eğrisinin eğimine (m) bölünmesi ile ($10s/m$) LOQ değerleri belirlendi.

3.11.2 Cevap süresi

Bölüm 3.4'te anlatılan şekilde hazırlanan PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün cevap süresini belirlemek için -0,3 V potansiyel ve 0,05 M pH 6,5 PBS'de kararlı hal akımının gözlenmesi sonrasında hücreye art arda L-dopa ilaveleri yapıldı ve oluşturulan $i-t$ grafiklerinden yararlanıldı. Her bir ilave sonrasında kararlı haldeki akım cevaplarının %95'ine ulaşılması için gerekli süre belirlendi ve biyosensörün ortalama cevap süresi hesaplandı.

3.11.3 Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik

PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörün tekrarlanabilirliğinin incelenmesi amacıyla aynı elektrot ile ardışık 3 ölçüm yapıldı. Amperometrik ölçümler için elektrokimyasal hücreye uygun derişimlerdeki standart L-Dopa çözeltilerinden art arda ilaveler yapıldı ve değişen derişime karşı elde edilen akım cevapları kullanılarak kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Kalibrasyon eğrilerinin duyarlıklarından yararlanarak hesaplanan standart sapma ve ortalama değerin kullanımıyla %BSS bulundu.

Geliştirilen biyosensörün tekrar üretilebilirliğinin değerlendirilmesi için ise 3 farklı PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr hazırlandı ve her bir elektrot için amperometrik ölçümler yapıldı. Ölçümlerden elde edilen veriler ile oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin duyarlıkları kullanılarak %BSS hesaplandı.

3.11.4 Kararlılık

PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörün üst üste yapılan ölçümlere gösterdiği kararlılığı incelemek için optimum çalışma koşulları altında ve $1,0 \times 10^{-5}$ M sabit L-Dopa derişiminde 50 ardışık ölçüm yapıldı. Elde edilen ilk ve son akım cevapları kıyaslanarak 50 ölçüm sonrasında PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'nin L-Dopa'ya cevabında meydana gelen % değişim hesaplandı.

3.11.5 Uzun dönem kararlılığı

Geliştirilen biyosensör ile elde edilen akım cevaplarının zamanla değişiminin değerlendirilmesi için optimum koşullarda hazırlanan PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'nin belirli günlerde sabit L-Dopa derişiminde ($1,0 \times 10^{-5}$ M) akım cevapları ölçüldü. Biyosensörün hazırlandığı ilk gün elde edilen akım cevabı ile ölçümlerin yapıldığı günlerde elde edilen akım cevapları kıyaslandı ve geçen zamana karşı akım cevabında meydana gelen % değişim hesaplandı. Hazırlanan biyosensör çalışma süresi boyunca buzdolabında $+4$ °C'de muhafaza edildi.

3.11.6 Girişimci türlerin etkisi

Hazırlanan biyosensörün (Bölüm 3.4) cevabı üzerine gerçek numunelerde bulunması muhtemel olan bazı girişimci türlerin (askorbik asit, ürik asit, sitrik asit, okzalik asit, glukoz, parasetamol) etkisi incelendi. Bu amaçla, optimum koşullarda kararlı hal akımı elde edilen biyosensöre ilk olarak L-Dopa çözeltisi ve ardından bahsedilen türlerin 3.3.11'de anlatılan şekilde hazırlanmış çözeltileri sırasıyla ilave edildi. Biyosensörün, sabit derişimde L-Dopa ($4,0 \times 10^{-5}$ M) için gösterdiği akım cevabı ile muhtemel girişimci türlerin her birinin ($4,0 \times 10^{-6}$ M) çözelti ortamına art arda ilaveleri sonrasında elde edilen akım cevapları kıyaslandı. Akım cevaplarında meydana gelen % değişimler hesaplanarak bozucu etki değerlendirildi.

3.12 Gerçek Numune Çalışmaları

3.12.1 Tablet numunesi

Geliştirilen PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'nin gerçek numunelerde L-Dopa tayininde kullanılabilirliğini göstermek amacıyla Madopar® tablet (100 mg L-Dopa/125 mg tablet) kullanıldı. Numune çözeltisini hazırlamak için 5 adet tablet alınarak havanda ezildi ve 1 tablete eşdeğer miktar tartılıp ultra saf su ile muamele edilerek ultrasonik banyoda 30 dakika tutuldu. Daha sonra çözelti süzülerek tabletin içeriğindeki çözünmeyen kısımlar ayrıldı ve elde edilen süzüntünün son hacmi 50 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan tablet numunesinden alınan uygun bir miktar içindeki L-Dopa derişimi standart ekleme yöntemi ile belirlendi ($N=3$). Madopar® tablet için beyan edilen L-Dopa değeri ve geliştirilen biyosensör ile elde edilen değerler karşılaştırılarak % geri kazanım hesaplandı.

3.12.2 İnsan serumu

Geliştirilen biyosensörün gerçek numunelere uygulanabilirliğinin araştırılması için filtrelenmiş steril insan serumu da kullanıldı ve serumdan alınan uygun miktar ultra saf su ile 100 kat seyreltilerek numune çözeltisi hazırlandı. Deney sırasında elektrotlar ile kararlı hal akımı elde edilene kadar beklendi ve daha sonra elektrokimyasal hücreye hazırlanan serum çözeltisi ilave edilerek amperometrik cevap kaydedildi. Ardından, hücre içerisine standart L-dopa çözeltisinden ardışık ilaveler yapıldı ve standart katma eğrileri hazırlandı. Söz konusu eğrilerden elde edilen veriler kullanılarak serum numunesindeki L-dopa derişimi hesaplandı. Serum numunelerine uygun miktarlarda standart L-dopa ilaveleri yapılarak hazırlanan 3 farklı karışım da benzer şekilde tayin edildi ($N=3$) ve karışımların analiz edilmesi sonucu elde edilen L-dopa derişimleri ile başlangıçta serum numunesine ilave edilen değer kıyaslanarak % geri kazanım hesaplandı.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

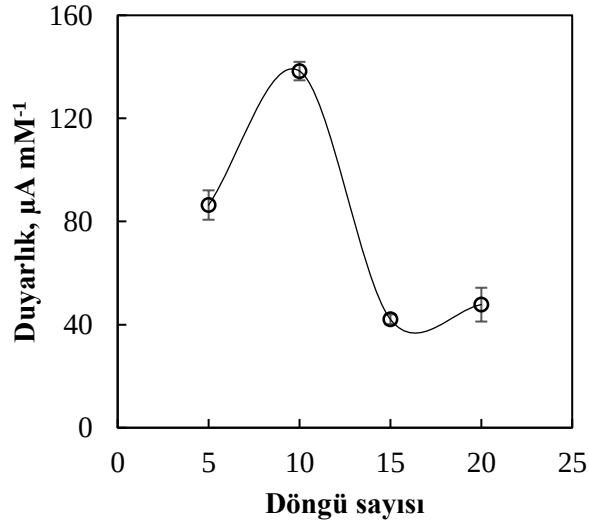
Bu çalışmada L-dopa'nın amperometrik yöntem ile tayini için PGE'nin PGL ve AuNR-IL ile modifiye edilmesi ve modifiye yüzeye Tyr enziminin immobilize edilmesine dayanan bir biyosensör geliştirilmesi amaçlandı. Geliştirilen biyosensörün elektrokimyasal karakterizasyonu için CV ve EIS yöntemlerinden yararlanıldı. Söz konusu biyosensörün yüzey morfolojisi ise SEM yöntemi ile incelendi. Modifikasyonda kullanılan tüm maddelerin elektrot yüzeyindeki miktarları optimize edilerek optimum bileşimde bir biyosensör hazırlandı. Ayrıca, pH ve çalışma potansiyelinin biyosensör cevabı üzerindeki etkileri incelenerek çalışma koşulları da optimize edildi. Geliştirilen biyosensörün performans parametreleri optimum koşullarda belirlendi. Ayrıca, biyosensörün cevabına bazı girişimci türlerin etkisi ve bu biyosensörün tablet ve insan serumu numunelerinde L-dopa tayini için uygulanabilirliği de araştırıldı. Elde edilen sonuçlar ve yapılan değerlendirmeler detayları ile aşağıda verildi.

4.1 Modifiye Kalem Grafit Elektrodun Yüzey Bileşimi Optimizasyonu

4.1.1 Döngü sayısı optimizasyonu

PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'nin oluşturulması sırasında ilk basamak, ön işlem uygulanmış PGE yüzeyinin 1 mM glisin çözeltisi içerisinde elektropolimerizasyon yöntemi ile PGL kaplanmasıdır. Elektropolimerizasyon basamağında kullanılan döngü sayısının optimizasyonu için sırasıyla 5; 10; 15 ve 20 döngü ile 4 farklı modifiye elektrot hazırlandı. Hazırlanan PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'lerin her biri için -0,3 V potansiyelde kararlı hal akımı elde edildi ve ardından çözelti üzerine ardışık L-dopa ilaveleri yapılarak $1,0 \times 10^{-5}$ – $7,0 \times 10^{-5}$ M derişim aralığında kalibrasyon grafikleri oluşturuldu ($N=3$). Her bir elektrot ile elde edilen ortalama duyarlık değerlerinin polimer kaplanması sırasında kullanılan döngü sayısına karşı grafiğe geçirilmesi ile Şekil 4.1'de verilen grafik elde edildi. Elde edilen grafik incelendiğinde duyarlık değerlerinin 10 döngü ile kaplanarak hazırlanan PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr için en yüksek olduğu ve bu noktadan sonra döngü sayısı arttıkça duyarlığın azaldığı görüldü. Duyarlıkta meydana gelen bu düşüşün, elektrot yüzeyinde oluşturulan film kalınlığının artmasıyla substratın elektrot yüzeyine

difüzyonunun zorlaşmasından kaynaklandığı düşünüldü (Zhang vd. 2016, Li vd. 2018). Bu nedenle duyarlılığın en yüksek olduğu ($138,4 \mu\text{A mM}^{-1}$) değere karşılık gelen 10 döngü sayısı optimum olarak belirlendi.

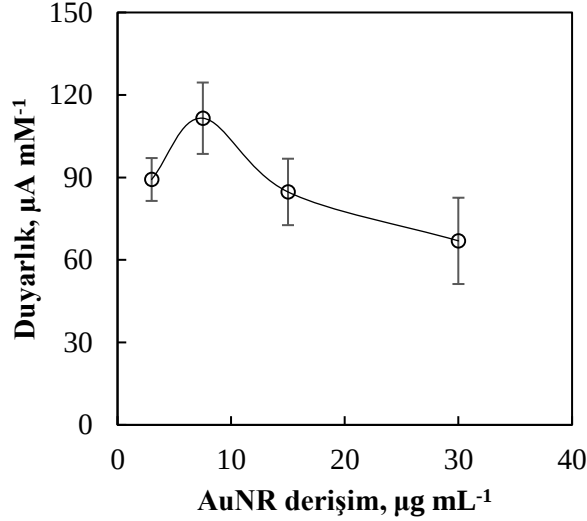


Şekil 4.1 PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün L-dopa'ya duyarlılığının PGL kaplamasında kullanılan döngü sayısı ile değişimi (0,05 M pH 6,5 PBS, -0,3 V, $N=3$)

4.1.2 Altın Nanoçubuk miktarının optimizasyonu

PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'nin modifikasyonu sırasında kullanılan AuNR'nin optimum miktarının belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.3.4 ve 3.3.5'te bahsedildiği gibi AuNR-IL çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerdeki IL miktarı (%3) sabit tutuldu ve AuNR derişimleri sırasıyla 3; 7,5; 15 ve $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde değiştirildi. PGE/PGL'lerin yüzeyi hazırlanan bu çözeltiler ile modifiye edilerek 4 farklı PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr oluşturuldu. Her bir biyosensör ile L-dopa için 3 tekrarlı kalibrasyon eğrileri çizildi ve ilgili duyarlıklar değişen AuNR derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.2). Şekil 4.2 incelendiğinde biyosensör duyarlıklarının AuNR derişimi etkisi ile arttığı, $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'den daha yüksek derişimde ise azalmaya başladığı görüldü. Duyarlılıkta gözlenen bu düşüşün elektrot yüzeyinde aşırı miktarda AuNR bulunması sonucu etkin yüzey alanının azalmasından kaynaklanabileceği düşünüldü (Zhang vd. 2013). Sonuç olarak, en yüksek

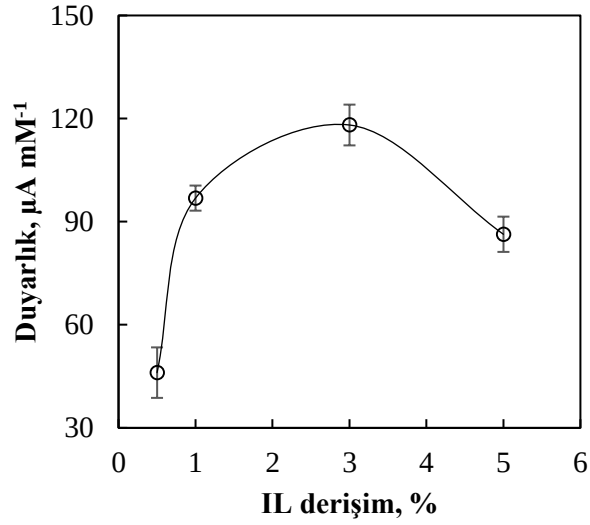
duyarlık değerinin elde edildiği biyosensörün hazırlanmasında kullanılan $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ AuNR optimum olarak seçildi.



Şekil 4.2 PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün L-dopa'ya duyarlılığının AuNR miktarı ile değişimi (0,05 M pH 6,5 PBS, -0,3 V, $N=3$)

4.1.3 İyonik sıvı miktarının optimizasyonu

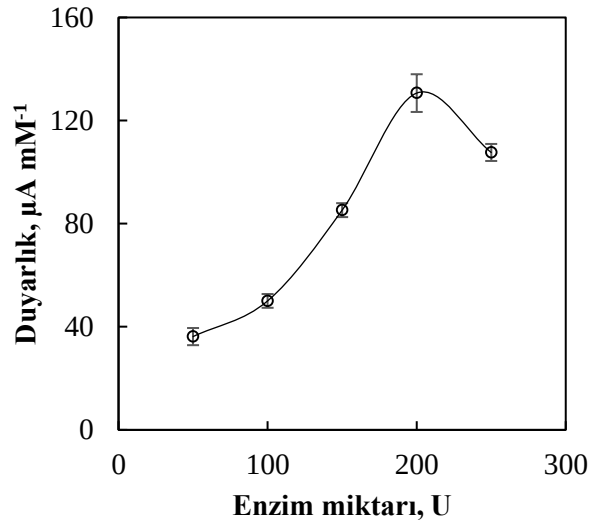
Biyosensörün hazırlanmasında kullanılacak olan en iyi IL derişimini belirlemek için yapılacak olan çalışmada kullanılmak üzere, optimizasyon sonrası belirlenmiş olan AuNR derişimi ($7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) sabit tutulup %IL değerleri değiştirilerek bir dizi AuNR-IL çözeltisi hazırlandı. Bu amaçla hazırlanan AuNR-IL çözeltilerindeki %IL değerleri sırasıyla %0,5; %1; %3 ve %5 olacak şekilde değiştirildi. Söz konusu çözeltiler ile modifiye edilerek hazırlanan PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'lerin L-dopa'ya karşı gösterdikleri duyarlıklar değişen IL yüzdesine karşı grafiğe geçirilerek Şekil 4.3'te gösterilen grafik oluşturuldu. Oluşturulan grafik incelendiğinde en yüksek duyarlık değerine karşılık gelen %3 IL derişimi optimum değer olarak belirlendi ve sonraki biyosensörlerin hazırlanmasında bu değer kullanıldı. Bu derişimden sonra duyarlılıkta düşüş olduğu gözlemlendi ve bu düşüşün yüksek viskoziteli IL'nin elektrot yüzeyindeki miktarının artmasıyla elektron transfer direncinde meydana gelen artıştan kaynaklandığı değerlendirildi (Silva vd. 2020, Koçoğlu vd. 2024).



Şekil 4.3 PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün L-dopa'ya duyarlılığının IL miktarı ile değişimi (0,05 M pH 6,5 PBS, -0,3 V, $N=3$)

4.1.4 Enzim miktarı optimizasyonu

Optimum miktarlar kullanılarak hazırlanan PGE/PGL/AuNR-IL yüzeyine çeşitli ünitelerde Tyr enzimi immobilize edilerek en yüksek L-dopa duyarlılığı gösteren biyosensör belirlendi. Bu amaçla 50 U, 100 U, 150 U, 200 U ve 250 U Tyr enziminin PGE/PGL/AuNR-IL yüzeyine immobilize edilmesiyle 5 farklı biyosensör hazırlandı. Optimum çalışma koşullarında biyosensörlerin kararlı akımlarının gözlenmesinin ardından elektrokimyasal hücreye ardışık L-dopa ilaveleri yapıldı ve değişen Tyr miktarına karşı elde edilen duyarlılıkların grafiğe geçirilmesiyle Şekil 4.4 oluşturuldu. Grafik incelendiğinde elektrot yüzeyine immobilize edilen Tyr miktarının artmasıyla gözlenen duyarlılığın da arttığı, 200 U'den sonra ise duyarlılıkta düşüş olduğu gözlemlendi. Yüksek miktarda enzim immobilizasyonu yapıldığında duyarlılığın azalması, artan film kalınlığı ile substrat molekülünün yüzeye difüzyonunun güçleşmesine bağlanabilir (Kaçar ve Erden 2020). Buna dayanarak, biyosensör performansının en yüksek olduğu duyarlık değerine karşılık gelen enzim miktarının 200 U olduğu görüldü ve optimum miktar olarak belirlendi.

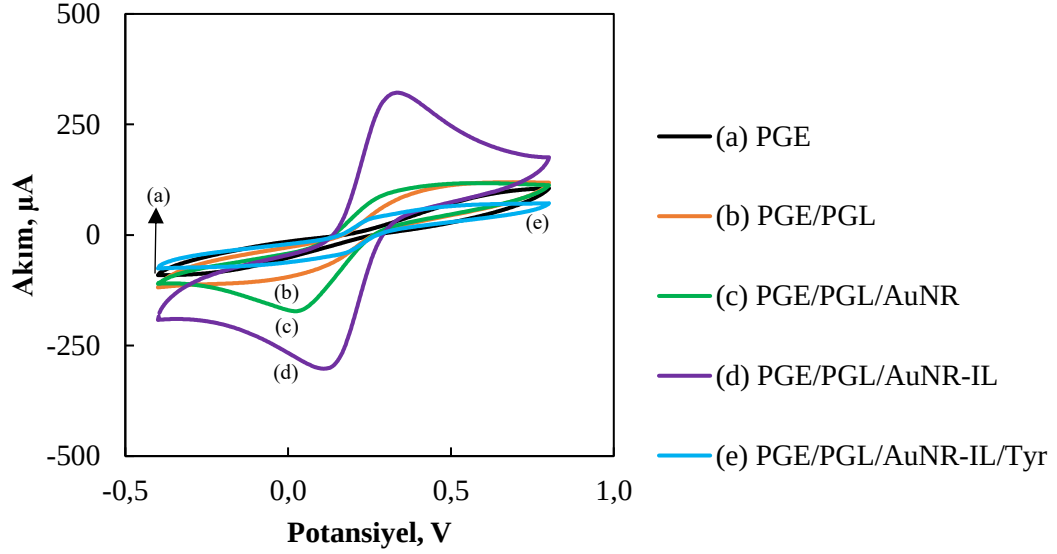


Şekil 4.4 PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün L-dopa'ya duyarlılığının enzim miktarı ile değişimi (0,05 M pH 6,5 PBS, -0,3 V, $N=3$)

4.2 Modifiye Kalem Grafit Elektrotların Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Bu tez çalışmasında geliştirilen PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'nin hazırlanması için kullanılan her bir modifikasyon basamağının elektrokimyasal davranış üzerindeki etkisi CV ve EIS çalışmaları ile incelendi. Bölüm 3.4'te anlatıldığı gibi hazırlanan PGE, PGE/PGL, PGE/PGL/AuNR, PGE/PGL/AuNR-IL ve PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'nin 0,1 M KCl ihtiva eden 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ çözeltisi içinde (-0,40) – (+0,80) V potansiyel aralığında ve 50 mV s^{-1} tarama hızında dönüşümlü voltammogramları kaydedildi (Şekil 4.5). Voltammogramlarda görülen ve her bir elektrot için farklı olan yükseltgenme ve indirgenme pikleri, ferrisiyanür-ferrosiyanür çiftinin redoks davranışına karşılık gelmektedir. PGE'nin modifikasyonu ile oluşturulan (b) PGE/PGL, (c) PGE/PGL/AuNR ve (d) PGE/PGL/AuNR-IL'ya ait voltammogramlar incelendiğinde anodik ve katodik redoks pik akımlarının (a) PGE'ye kıyasla arttığı ve en yüksek pik akımının modifikasyonda kullanılan PGL, AuNR ve IL'nin bir arada olduğu PGE/PGL/AuNR-IL ile elde edildiği gözlemlendi. Bunun, PGE yüzeyinin PGL, AuNR ve IL ile modifiye edilmesinin elektrodun iletkenliği ve yüzey alanını arttırmasından kaynaklandığı düşünüldü. En yüksek pik akımının elde edildiği PGE/PGL/AuNR-IL yüzeyine Tyr enziminin immobilize edilmesiyle oluşturulan PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'ye ait voltammogram (e) incelendiğinde ise anodik ve katodik pik akımlarında ciddi bir düşüş

olduğu ve bu düşüşün enzim tabakasının yüzeyin iletkenliğini düşürmesinden kaynaklandığı düşünüldü (Xiao vd. 2022).



Şekil 4.5 (a) PGE, (b) PGE/PGL, (c) PGE/PGL/AuNR, (d) PGE/PGL/AuNR-IL ve (e) PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'lerin dönüşümlü voltammogramları (50 mV s^{-1} , $0,1 \text{ M KCl}$ ihtiva eden $5,0 \text{ mM Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ çözeltisi)

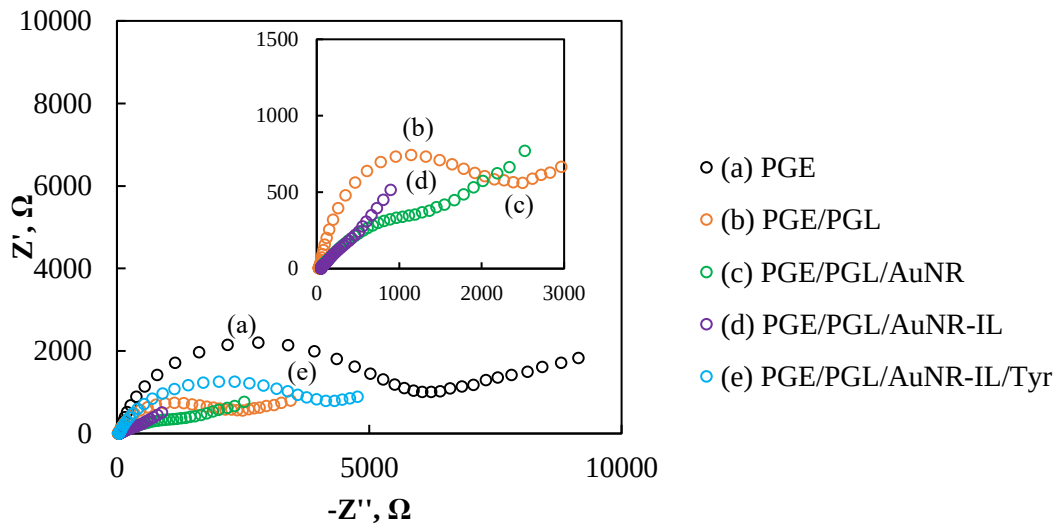
Dönüşümlü voltammogramı alınan her bir elektrodun elektroaktif yüzey alanı ise Randles-Sevcik eşitliği yardımıyla hesaplandı (Batchelor-McAuley ve Compton 2012):

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2}$$

Eşitlikte yer alan; n aktarılan elektron sayısını, A elektrodun yüzey alanını, C derişimi, D difüzyon katsayısını ve v tarama hızını temsil etmektedir. Bu eşitliğe göre yapılan hesaplamalardan PGE, PGE/PGL, PGE/PGL/AuNR, PGE/PGL/AuNR-IL ve PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'lerin yüzey alanları sırasıyla $0,023$; $0,071$; $0,107$, $0,353$ ve $0,041 \text{ cm}^2$ olarak bulundu.

EIS, yüzeyi modifiye edilmiş elektrotların elektrokimyasal özelliklerini araştırmak için kullanılan yöntemlerden biridir. Deneysel çalışmalardan elde edilen empedans verileri Nyquist grafiği olarak gösterilebilir. Bu grafik, yüksek frekanslarda elektron aktarım direncine karşılık gelen bir yarım daire ve daha düşük frekanslarda difüzyon sürecine

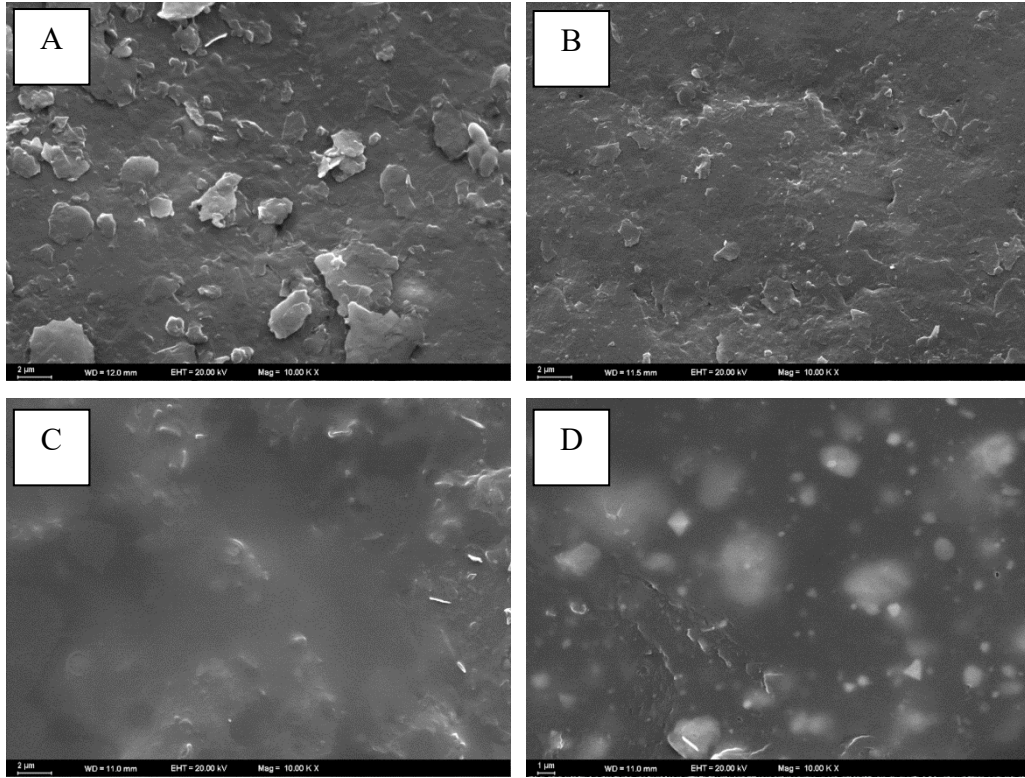
atfedilen doğrusal bir kısım içerir (Erden vd. 2021). Geliştirilen PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün modifikasyon sürecinde elektrot yüzeyinde meydana gelen değişimleri incelemek için 0,1 M KCl içeren 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ çözeltisi içinde 0,18 V potansiyel ve 100000 Hz – 0,01 Hz frekans aralığında EIS ölçümleri yapılarak gerçek empedans (Z') ve sanal empedans (Z'') değerleri ile Nyquist eğrileri oluşturuldu (Şekil 4.6). Şekil 4.6'da verilen eğriler incelendiğinde ve yük transfer direnci (R_{ct}) olarak bilinen yarımların çapları karşılaştırıldığında, en yüksek elektron aktarım direncini PGE'nin gösterdiği görüldü. PGE yüzeyinin PGL, AuNR ve IL ile modifiye edilmesiyle R_{ct} 'nin azaldığı, en az elektron aktarım direnci gösteren elektrodun ise modifikasyon için kullanılan tüm türlerin bir arada bulunduğu PGE/PGL/AuNR-IL olduğu gözlemlendi. Bu davranışın sebebinin PGL, AuNR ve IL'nin birlikte kullanılması ile yapılan yüzey modifikasyonun çözelti elektrot arayüzündeki direnci düşürerek elektron aktarımını artırması olduğu düşünüldü (Batchelor-McAuley ve Compton 2012). PGE/PGL/AuNR-IL yüzeyine iletken özellik göstermeyen enzim moleküllerinin immobilize edilmesiyle R_{ct} 'nin arttığı gözlemlendi. Bu artışın sebebinin yüzeydeki Tyr enziminin elektrot-çözelti arayüzündeki direnci artırması olduğu değerlendirildi (Yin vd. 2010). Modifiye elektrotlara ait R_{ct} değerlerindeki değişim sırasıyla $\text{PGE} > \text{PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr} > \text{PGE/PGL} > \text{PGE/PGL/AuNR} > \text{PGE/PGL/AuNR-IL}$ olarak bulundu.



Şekil 4.6 (a) PGE, (b) PGE/PGL, (c) PGE/PGL/AuNR, (d) PGE/PGL/AuNR-IL ve (e) PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'lerin Nyquist eğrileri (0,18 V, 100000 Hz – 0,01 Hz, 0,1 M KCl içeren 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ çözeltisi)

4.3 Modifiye Kalem Grafit Elektrodun Yüzey Karakterizasyonu

PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr oluşturmak için yapılan modifikasyonun farklı aşamalarında elektrot yüzeylerinin morfolojisini karakterize etmek için SEM görüntüleri alındı. Elektrotların yüzey görüntüleri taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiş olup Şekil 4.7’de görülmektedir. Modifiye edilmemiş PGE yüzeyine ait görüntü (Şekil 4.7A) incelendiğinde yüzeyin pürüzlü ve katmanlı yapısı net bir şekilde görüldü (Işın vd. 2022). PGE yüzeyine PGL kaplanmasıyla oluşturulan PGE/PGL’ye ait görüntüye (Şekil 4.7B) bakıldığında, yüzeye polimerin kaplanması ile PGE’nin pürüzlü yapısının azaldığı gözlemlendi. PGE/PGL yüzeyine AuNR-IL kaplanmasıyla elde edilen yüzeyde ise morfolojik yapının oldukça değiştiği ve bu değişimin IL varlığından kaynaklanabileceği düşünüldü (Şekil 4.7C). Şekil 4.7D’de ise PGE/PGL/AuNR-IL’ye Tyr enzimi immobilize edilmesiyle elde edilen biyosensörün yüzeyine ait görüntü yer almakta olup, Şekil 4.7C ile kıyaslandığında bu yüzeyde enzim immobilizasyonundan kaynaklandığı düşünülen farklı yapıda türlerin varlığı farkedildi.

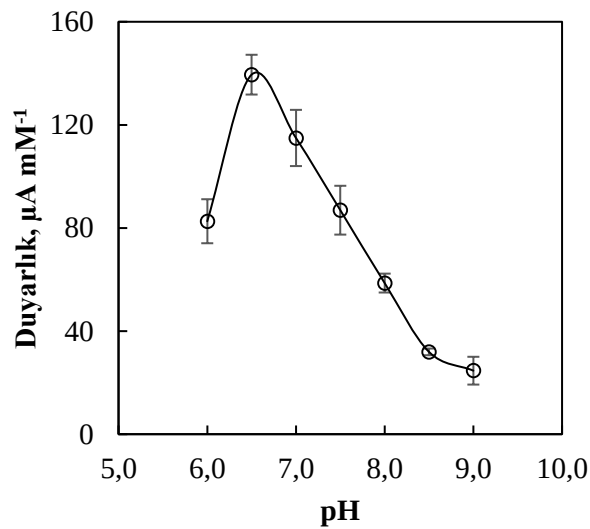


Şekil 4.7 (A) PGE, (B) PGE/PGL, (C) PGE/PGL/AuNR-IL ve (D) PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr için SEM görüntüleri (10.00 KX büyütme)

4.4 Optimum Çalışma Koşulları

4.4.1 pH optimizasyonu

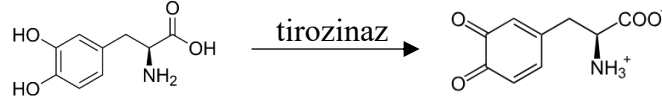
Enzim elektrotların performansını etkileyen parametrelerden biri olan çalışma ortamı pH'sının optimizasyonu için optimum koşullarda hazırlanan PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr kullanılarak farklı pH değerindeki tampon çözeltilerde L-dopa cevabı ölçüldü. 0,05 M fosfat tamponu çözeltilerinin pH'ları 6,0 – 9,0 aralığında 0,5 birim farklandırılarak 7 ayrı PBS hazırlandı. PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'nin her bir tampon çözeltide kararlı hal akımına ulaşması beklendi ve ardından elektrokimyasal hücreye ardışık L-dopa ilavelerinin yapılmasıyla $1,0 \times 10^{-5}$ – $7,0 \times 10^{-5}$ M derişim aralığında kalibrasyon grafikleri oluşturuldu. Söz konusu eğrilerin duyarlıkları değişen pH'a karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.8). Grafik incelendiğinde en yüksek duyarlığın pH 6,5 PBS'de elde edildiği ve bu noktadan sonra pH'nın artmasıyla duyarlıkların düştüğü gözlemlendiğinden optimum olarak bu değer kabul edildi. Kabul edilen bu pH değerinin literatürde L-dopa tayini için Tyr enzimi kullanılarak geliştirilen diğer bazı biyosensörler ile bulunan; GCE/GO/Tyr için pH 6,8 (Cembalo vd. 2023), ZIF-8/GO/Au/Tyr için 7,0 (Xiao vd. 2022), FDMA/AuND/PU/Tyr için 7,2 (Fang vd. 2022), SPCE/CNTs/Politiyonin/Tyr için 7,2 (Brunetti vd. 2014) ve serbest Tyr için bulunan pH 6,8 (Espín vd. 2000) değerleri ile uyumlu olduğu görüldü.



Şekil 4.8 PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün L-dopa'ya duyarlılığının tampon pH'sı ile değişimi (-0,3 V; 0,05 M PBS; $N=3$)

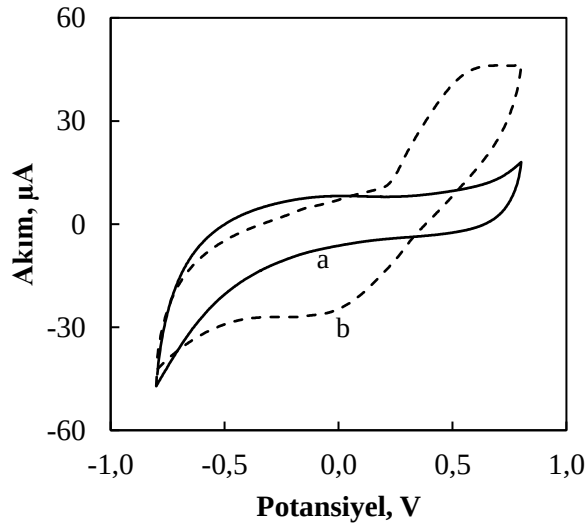
4.4.2 Çalışma potansiyeli optimizasyonu

Bu tez çalışmasında hazırlanan amperometrik biyosensörün çalışma prensibi, aşağıda gösterildiği gibi L-dopa'nın elektrot yüzeyine immobilize edilmiş Tyr tarafından L-dopakinon'a katalitik yükseltgenmesine dayanmaktadır (Şekil 4.9):



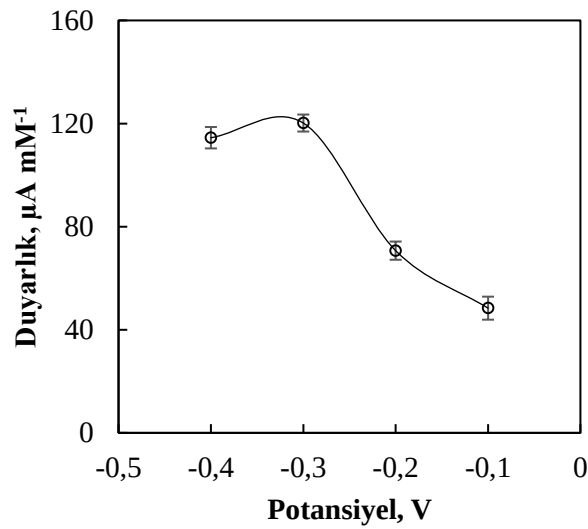
Şekil 4.9 L-dopa'nın tirozinaz enzimi ile L-Dopakinon'a yükseltgenmesi

Çalışma elektroduna katodik bir potansiyel uygulanmasıyla, L-dopakinon elektrokimyasal olarak tekrar L-dopa'ya indirgenir ve enzimatik olarak yükseltgenen L-dopa miktarıyla orantılı bir akım sinyali üretir (Cembalo vd. 2023). Oluşan L-dopakinonun PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr yüzeyinde indirgenmesi için uygun potansiyelin belirlenmesi amacıyla öncelikle CV yöntemi kullanıldı. Bu amaçla biyosensörün L-dopa içermeyen ve $1,0 \times 10^{-3}$ M L-dopa içeren pH 6,5 PBS'de voltammogramları alındı (Şekil 4.10). L-dopakinon'un indirgenmesini değerlendirmek amacıyla katodik yöndeki taramalar incelendi ve L-dopa varlığında bu bölgede gözlenen belirgin pikin L-dopakinonun indirgenmesi sonucu ortaya çıktığı düşünüldü.



Şekil 4.10 PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün (a) L-dopa içermeyen ve (b) $1,0 \times 10^{-3}$ M L-dopa içeren fosfat tampon çözeltisinde (0,05 M pH 6,5) elde edilen voltammogramları (Tarama hızı: 50 mV s^{-1})

Şekil 4.10'dan elde edilen bilgiler ışığında, katodik pikin yer aldığı bölgede -0,1 ile -0,4 V potansiyel aralığında biyosensörün L-dopa duyarlılığı incelendi ve optimum çalışma potansiyeli belirlendi. Bu amaçla, optimum bileşimde hazırlanan PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'nin $1,0-7,0 \times 10^{-5}$ M derişim aralığında L-dopa duyarlılığı sırasıyla -0,1 V; -0,2 V; -0,3 V ve -0,4 V potansiyellerde ölçüldü. Elde edilen duyarlıkların değişen potansiyele karşı grafiğe geçirilmesiyle Şekil 4.11'de görülen grafik oluşturuldu. L-dopa duyarlılığının en yüksek olduğu potansiyel değeri olan -0,3 V değeri optimum çalışma potansiyeli olarak belirlendi.



Şekil 4.11 PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün L-dopa'ya duyarlılığının çalışma potansiyeli ile değişimi (0,05 M pH 6,5 PBS, $N=3$)

Bu çalışmalar sonucunda; PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr için belirlenen optimum yüzey bileşimi değerleri ve çalışma koşulları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

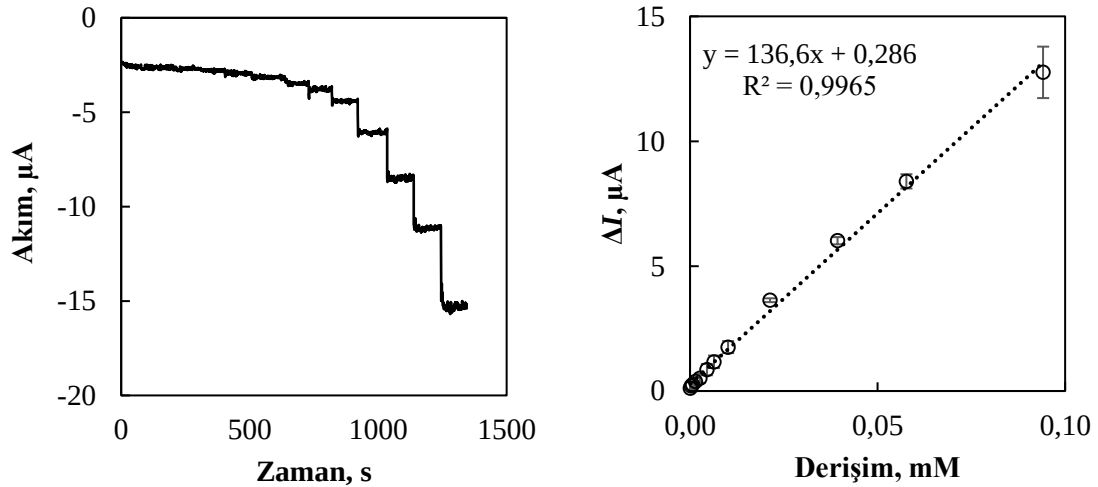
Çizelge 4.1 Modifiye elektrodların optimum yüzey bileşimi ve çalışma koşulları

Optimizasyon Parametresi	Bulgular
Döngü Sayısı	10
AuNR Miktarı	$7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$
IL Miktarı	% 3
Try Enzimi Miktarı	200 U
pH	6,5
Çalışma Potansiyeli	-0,3 V

4.5 Modifiye Kalem Grafit Elektrodun Performans Faktörleri

4.5.1 Doğrusal çalışma Aralığı ve gözlenebilme sınırı

Bölüm 3.4'te anlatılan şekilde hazırlanan PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün L-dopa'ya doğrusal cevap verdiği aralığın, duyarlılığının ve gözlenebilme sınırının belirlenmesi için söz konusu biyosensörün optimum çalışma koşulları altında amperometrik cevabı incelendi. Bu amaçla, optimum çalışma koşullarında kararlı hal akımı elde edilen PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'nin içerisinde bulunduğu elektrokimyasal hücreye farklı derişimlerde L-dopa standartlarından art arda ilaveler yapılarak akım-zaman eğrileri oluşturuldu (Şekil 4.12A). Elde edilen akım-zaman eğrilerinden yararlanılarak değişen derişime karşı hesaplanan akım farkı değerleri grafiğe geçirildi ve kalibrasyon eğrileri çizildi (Şekil 4.12B). Geliştirilen biyosensörün L-dopa'ya $136,6 \mu\text{A mM}^{-1}$ duyarlık ile $1,0 \times 10^{-7} - 9,4 \times 10^{-5}$ M aralığında doğrusal olarak cevap verdiği belirlendi.



Şekil 4.12 PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün (A) L-dopa'nın ardışık ilavelerine karşı zaman ile değişen akım cevapları, (B) Kalibrasyon grafiği ($N=3$) (0,05 M pH 6,5 PBS, -0,3 V)

Tez çalışmasında geliştirilen PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün $1,0 \times 10^{-7} - 9,4 \times 10^{-5}$ M olan doğrusal çalışma aralığının, literatürde L-dopa tayini için geliştirilmiş Ag/PVA/Au/PPO ile elde edilen $5,0 \times 10^{-7} - 2,0 \times 10^{-5}$ M (Narang vd. 2013);

SPCE/CNTs/Politiyonin/Try biyosensörü ile gözlenen $8,0 \times 10^{-7} - 2,2 \times 10^{-5}$ (Brunetti vd. 2014), GCE/Ppy/AuNP ile bulunan $1,0 \times 10^{-7} - 6,0 \times 10^{-6}$ (Kannan vd. 2020), SPCE/Try biyosensörü ile belirlenen $5,0 \times 10^{-6} - 3,0 \times 10^{-5}$ (Moon vd. 2021), ZIF-8/GO/Au/Try ile elde edilen $1,0 \times 10^{-6} - 9,5 \times 10^{-5}$ (Xiao vd. 2022) ve $\text{Eu}_2\text{O}_3@\text{Cr}_2\text{O}_3/\text{CPE}$ ile hesaplanan $1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$ (Mijajlovic vd. 2023) doğrusal çalışma aralıklarına kıyasla daha geniş olduğu gözlemlendi.

LOD ve LOQ değerlerinin için Bölüm 3.11.1’de anlatılan şekilde kalibrasyon eğrisinin en düşük derişimde 10 ardışık ölçüm yapıldı ve hesaplanan akım farkı değerlerinin standart sapması (s) ile ilgili eğrinin eğimi (m) kullanılarak LOD değeri $2,4 \times 10^{-8}$ M ($3s/m$), LOQ değeri ise $7,9 \times 10^{-8}$ M ($10s/m$) olarak bulundu.

Gözlenebilme sınırı $2,4 \times 10^{-8}$ M değeri yine literatürdeki diğer çalışmalar ile kıyaslandığında; Ag/PVA/Au/PPO için $5,0 \times 10^{-7}$ (Narang vd. 2013), SPCE/CNTs/Politiyonin/Tyr için $2,5 \times 10^{-6}$ (Brunetti vd. 2014), Gr/RGO-AgNPs/PPO için $1,8 \times 10^{-6}$ (Sandeep vd. 2018), SPCE/Tyr için $1,0 \times 10^{-6}$ (Moon vd. 2021), FDMA/AuND/PU/Tyr için $1,8 \times 10^{-7}$ (Fang vd. 2022), ZIF-8/GO/Au/Tyr için $4,5 \times 10^{-7}$ (Xiao vd. 2022), GCE/GO/Tyr için $1,8 \times 10^{-7}$ (Cembalo vd. 2023) ve $\text{Eu}_2\text{O}_3@\text{Cr}_2\text{O}_3/\text{CPE}$ için $7,2 \times 10^{-7}$ (Mijajlovic vd. 2023) değerlerinden daha düşük bulundu.

4.5.2 Cevap süresi

Geliştirilen PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün cevap süresinin belirlenmesi Bölüm 3.11.2’de anlatıldığı şekilde yapıldı. Optimum çalışma koşullarında L-dopa’nın elektrokimyasal hücreye ardışık ilavelerinden sonra kararlı hal akımı elde edilene kadar beklendi ve akım cevapları kaydedildi. Her bir ilave sonrasında elde edilen kararlı akım cevaplarının %95’ine ulaşması için gerekli süreler hesaplandı ve ortalama cevap süresinin <10 s olduğu bulundu. Elde edilen cevap süresinin, literatürde L-dopa tayini için hesaplanan 15 s (Fang vd. 2022) ve <30 s (Narang vd. 2013) değerlerine göre düşük, 5 s (Kannan vd. 2020, Shoja vd. 2016) ile kıyaslanabilir olduğu belirlendi.

4.5.3 Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik

PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'nin tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirliğini belirlemek için Bölüm 3.11.3'te anlatılan çalışmalar yapıldı. Tekrarlanabilirlik çalışmasında, optimum çalışma koşullarında aynı elektrot kullanılarak art arda 3 kalibrasyon eğrisi elde edildi ve eğrilerin duyarlıklarından yararlanılarak %BSS değeri 2,3 olarak hesaplandı.

Geliştirilen biyosensörün tekrar üretilebilirliği ile ilgili bilgi sahibi olmak için ise aynı koşullarda 3 farklı modifiye biyosensör hazırlandı ve her biri ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin duyarlıkları kullanılarak %BSS değeri %3,2 olarak bulundu. Her iki çalışmada da hesaplanan %BSS değerlerinin düşük olması ticari olarak satın alınan kalem ucu kullanılarak hazırlanan bu modifiye elektrodun oldukça iyi tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirliğe sahip olduğunu gösterdi.

4.5.4 Kararlılık

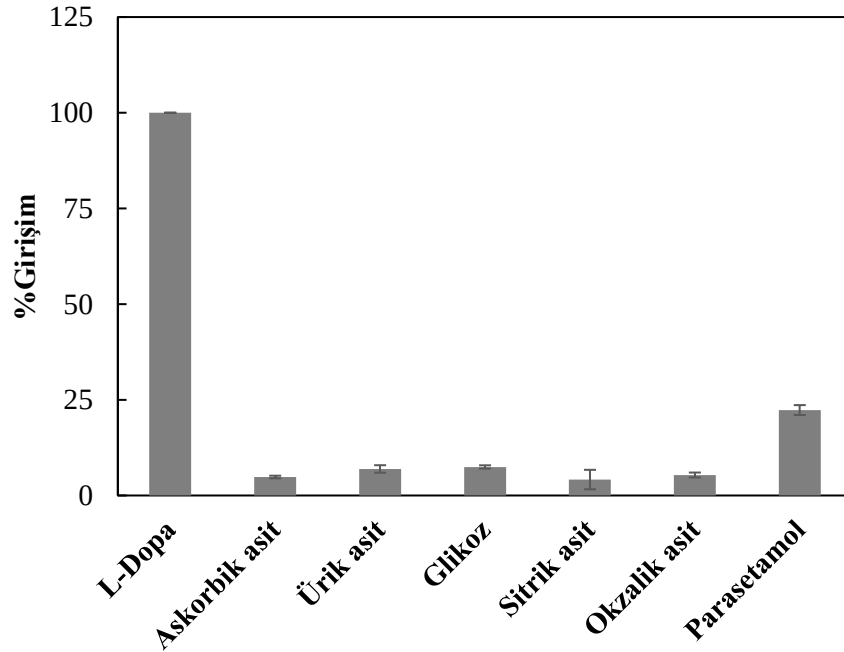
PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr modifiye biyosensör Bölüm 3.4'te anlatıldığı gibi hazırlanarak optimum çalışma koşullarında elektrodun kararlılığı incelendi. Bunun için $1,0 \times 10^{-5}$ M L-dopa içeren çözeltide art arda 50 ölçüm yapılarak her bir ölçüm için akım farkları hesaplandı. 50 ölçüm sonrasında elektrodun L-dopa'ya gösterdiği akım cevabının başlangıca göre %14,9 azaldığı bulundu.

4.5.5 Uzun dönem kararlılığı

Hazırlanan biyosensörün L-dopa'ya verdiği cevabın zaman içinde nasıl değiştiği Bölüm 3.11.5'te bahsedilen şekilde yapıldı. PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'nin $1,0 \times 10^{-5}$ M L-dopa'ya karşı verdiği akım cevapları 1, 4, 8, 12, 16, 20 ve 28. günlerde kaydedildi ve geçen zamana karşı akım farklarında meydana gelen değişiklik incelendi. 1 ay sonunda elde edilen sonuçlar incelendiğinde biyosensörün başlangıç cevabının %25,4'ünü kaybettiği görüldü. Akım cevabındaki bu düşüşün yüzeye immobilize edilen enzimin zamanla denatüre olmasından kaynaklandığı düşünüldü (Giménez-Gómez vd. 2016).

4.5.6 Girişimci türlerin etkisi

Tez çalışmasında kullanılan PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün cevabı üzerine gerçek numunelerde bulunması muhtemel olan bazı girişimci türlerin etkisi incelendi. Yapılan bu çalışmada askorbik asit, ürik asit, sitrik asit, okzalik asit, glukoz ve parasetamolün amperometrik cevap üzerindeki etkisini incelemek için $4,0 \times 10^{-5}$ M L-dopa içeren tampon çözelti ortamına her bir türün derişimi $4,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde art arda ilaveler yapıldı ve akım cevabındaki değişim kaydedildi. Biyosensörün her bir tür ve L-dopa için verdiği akım cevaplarından yararlanılarak %girişim değerleri hesaplandı (Şekil 4.13). Buna göre geliştirilen biyosensörün L-dopa cevabına askorbik asidin %4,8; ürik asidin %6,9; sitrik asidin %7,5; okzalik asidin %4,2; glukozun %5,4 ve parasetamolün %22,3 bozucu etki yaptığı bulundu. Sonuçlar incelendiğinde, girişimci türlerin çoğunun PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'nin akım cevabına etkisinin $< \%10$ olduğu, parasetamolün ise akım cevabına bir miktar bozucu etkisi olduğu görüldü. Sonuç olarak, PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'nin söz konusu bozucu türler varlığında gerçek numunelerde L dopa tayininde kullanılabileceği; ancak, parasetamol varlığında ise standart katma yöntemi kullanılarak girişim etkisinin giderilebileceği düşünüldü.



Şekil 4.13 PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün amperometrik cevabına bazı girişimci türlerin etkisi (0,05 M pH 6,5 PBS, -0,3 V, $N=3$)

4.5.7 Gerçek numune çalışmaları

Bölüm 2.3.7’de bahsedildiği üzere bir sensör sisteminin doğruluğu ölçülen değerin gerçek veya gerçek kabul edilen değere yakınlığı olarak tanımlanır ve cevabının doğruluğu, standart bir ölçüm maddesiyle kıyaslanmasıyla belirlenebilir. Geliştirilen PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörünün gerçek numunelerde L-dopa ölçümünün uygulanabilirliğini test etmek amacıyla Çizelge 3.1’de verilen Sigma markalı filtrelenmiş steril insan serumu ve Deva İlaç markalı Madopar® 125 mg tablet (100 mg L-dopa) kullanılmasıyla aşağıdaki çalışmalar yapıldı.

4.5.7.1 Tablet numunesi

PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr biyosensörü ile optimum çalışma koşulları altında L-dopa derişimi bilinen tablet numunesinde standart katma yöntemi kullanılarak geri kazanım çalışması yapıldı. Bu amaçla, kararlı hal akımı elde edilen biyosensörün bulunduğu elektrokimyasal hücreye önce belirli miktarda tablet çözeltisi, sonrasında ise art arda L-dopa standardı ilave edildi. Elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak tablet çözeltisinde bulunan L-dopa miktarı hesaplandı ve tablet içerisinde bulunduğu beyan edilen miktar ile karşılaştırılarak yüzde geri kazanımlar hesaplandı (Çizelge 4.2). Sonuçlar değerlendirildiğinde geliştirilen biyosensörün tablet numunelerindeki L-dopa tayini için başarılı bir şekilde kullanılabileceği düşünüldü.

Çizelge 4.2 PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr ile tablet numunesinde standart ekleme yöntemi ile elde edilen %geri kazanım sonuçları

	Bilinen L-dopa, mg L⁻¹	Bulunan L-dopa, mg L⁻¹	Geri Kazanım, %	Ortalama ± %BSS
1	0,197	0,199	101,2	
2	0,197	0,203	103,1	102,3 ± 0,9
3	0,197	0,202	102,5	

4.5.7.2 İnsan serumu

Bölüm 3.4'te anlatıldığı gibi geliştirilen PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'nin doğruluk çalışmalarında tablet numunesine ek olarak insan serumu numunesi de kullanıldı. Steril filtrelenmiş insan serumu numunesi Bölüm 3.12.2'de anlatıldığı gibi seyreltilerek hazırlandı. Sertifikalı serum numunesine bilinen miktarlarda L-dopa ilaveleri yapılarak standart katma yöntemi ile geri kazanım çalışmaları yapıldı. Bu amaçla incelenen 3 farklı derişimde elde edilen L-dopa miktarları ve hesaplanan %geri kazanım değerleri Çizelge 4.3'de verildi. Çizelge 4.3 incelendiğinde elde edilen %100'e yakın ortalama geri kazanım değerleri göz önünde bulundurularak, geliştirilen biyosensör ile serum numunesinde L-dopa tayininin başarıyla uygulanabildiği değerlendirildi.

Çizelge 4.3 PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr ile insan serumu numunesinde standart ekleme yöntemi ile elde edilen %geri kazanım sonuçları

	Eklenen L-dopa, mg L⁻¹	Bulunan L-dopa, mg L⁻¹	Geri Kazanım, %	Ortalama ± %BSS
	0,158	0,150	95,1	
1	0,158	0,155	98,3	98,1 ± 2,9
	0,158	0,159	100,8	
	0,315	0,324	102,8	
2	0,315	0,315	100,1	101,3 ± 1,4
	0,315	0,318	101,0	
	0,393	0,384	97,5	
3	0,393	0,391	99,5	98,5 ± 1,0
	0,393	0,387	98,5	

5. SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında Parkinson hastalığının tedavisinde önemli bir bileşen olan L-dopa'nın tayini için literatürde ilk kez PGL, AuNR ve IL ile modifiye edilerek yüzeyine Tyr enzimi immobilize edilmiş PGE ile amperometrik bir biyosensör geliştirildi. Geliştirilen biyosensörün yüzey modifikasyonunda kullanılan tüm malzemelerin miktarları ve çalışmaların yapıldığı ortam koşulları optimize edilerek L-dopa tayini için analitik performans faktörleri bulundu. PGE/PGL/AuNR-IL/Tyr'nin;

- yüksek duyarlık ($136,6 \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)
- geniş bir doğrusal çalışma aralığı ($1 \times 10^{-7} - 9,4 \times 10^{-5} \text{ M}$)
- düşük gözlenebilme sınırı ($2,4 \times 10^{-8} \text{ M}$)
- kısa cevap süresi ($<10 \text{ s}$),
- oldukça iyi tekrarlanabilirlik değeri (%2,3 BSS)
- uygun tekrar üretilebilirlik değeri (%3,2 BSS)
- iyi kararlılık (50 ölçüm sonunda cevapta %14,9 azalma),
- ortalama bir raf ömrü (1 ay sonunda cevapta %25,4 azalma),
- yüksek seçicilik,
- gerçek numunelerde başarıyla uygulanabilme,
- düşük maliyet ile pratik şekilde hazırlanabilme,

özelliklerine sahip olduğu belirlendi.

Tez süreci boyunca yapılan tüm analizlerin sonuçları incelendiğinde, PGE yüzeyine PGL, AuNR ve IL ile yapılan modifikasyonunun biyosensörün iletkenliğini arttırarak L-dopa'nın akım cevabını yükselttiği ve literatürdeki diğer amperometrik çalışmalar ile kıyaslandığında geliştirilen biyosensörün oldukça iyi bir performans sergilediği gözlemlendi (Çizelge 5.1). Biyosensör ile tablet ve serum numunelerinde %100'e yakın geri kazanımlar elde edilerek gerçek numune uygulamalarında kullanılabilirlik gösterildi.

Çizelge 5.1 Elektrokimyasal L-dopa tayini için geliştirilen bazı (biyo)sensörlerin performans faktörlerinin karşılaştırılması

Elektrot	Yöntem	Çalışma potansiyeli, V	Çalışma aralığı, M	Gözlenebilme sınırı, M	pH	Tekrar üretilirlik, %BSS	Cevap süresi	Duyarlık	Raf ömrü	Uygulama	Kaynaklar
Eu ₂ O ₃ @Cr ₂ O ₃ /CPE	DPV	-	1,0×10 ⁻⁶ – 1,0×10 ⁻⁴	7,2×10 ⁻⁷	7,0	%4,5 (N=5)	-	1,4 µA µM ⁻¹ cm ⁻²	%94,9 (30 Gün)	Tablet	Mijajlovic vd. 2023
GCE/GO/Tyr	Amp.	-0,10	1,0×10 ⁻⁶ – 1,9×10 ⁻⁴	1,8×10 ⁻⁷	6,8	%6,7 (N=5)	-	7,2 µA µM ⁻¹	%80 (3 hafta)	İnsan serumu	Cembalo vd. 2023
ZIF-8/GO/Au/Tyr	Amp.	0,30	1,0×10 ⁻⁶ – 9,5×10 ⁻⁵	4,5×10 ⁻⁷	7,0	-	-	-	50 dakika	İnsan teri	Xiao vd. 2022
FDMA/AuND/PU/Tyr	Amp.	0,30	0 – 2,0×10 ⁻⁵	1,8×10 ⁻⁷	7,2	-	15 s	12,6 nA µM ⁻¹ cm ⁻²	2 hafta	-	Fang vd. 2022

Çizelge 5.1 Amperometrik L-dopa tayini için geliştirilen bazı biyosensörlerin performans faktörlerinin karşılaştırılması (devam)

Elektrot	Yöntem	Çalışma potansiyeli, V	Çalışma aralığı, M	Gözlenebilen sınırlar, M	pH	Tekrar üretilirlik, %BSS	Cevap süresi	Duyarlık	Raf ömrü	Uygulama	Kaynaklar
SPCE/Tyr	Amp.	-0,30	$5,0 \times 10^{-6} - 3,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-6}$	-	%2,6 (N=6)	-	-	%97,3 (1 hafta)	İnsan teri, kan ve tablet	Moon vd. 2021
GCE/Ppy/AuNP	Amp.	0,38	$1,0 \times 10^{-7} - 6,0 \times 10^{-6}$	$7,5 \times 10^{-8}$	7,0	%2,7 (N=4)	5 s	-	%94 (2 ay)	İnsan idrarı ve tablet	Kannan vd. 2020
Gr/RGO-AgNPs/PPO	Amp.	0,20	$1,0 \times 10^{-6} - 1,5 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-6}$	7,0	-	-	$18,9 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	6 gün	İnsan idrarı	Sandeep vd. 2018
MWCNT/pPDA/GCE/HRP	Amp.	0,20	$1,0 \times 10^{-8} - 1,9 \times 10^{-6}$	$4,0 \times 10^{-8}$	7,0	%3,0 (N=10)	5 s	$35,5 \mu\text{A mM}^{-1}$	%90 (2 ay)	Serum	Shoja vd. 2016

Çizelge 5.1 Amperometrik L-dopa tayini için geliştirilen bazı biyosensörlerin performans faktörlerinin karşılaştırılması(devam)

Elektrot	Yöntem	Çalışma potansiyeli, V	Çalışma aralığı, M	Gözlenebilme sınırı, M	pH	Tekrar üretilirlik, %BSS	Cevap süresi	Duyarlık	Raf ömrü	Uygulama	Kaynaklar
SPCE/CNTs/ Politiyonin/Tyr	Amp.	-0,31	$8,0 \times 10^{-7} - 2,2 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-6}$	7,2	%5 (N=3)	-	-	-	İnsan serumu	Brunetti vd. 2014
Ag/PVA/Au/PPO	Amp.	0,40	$5,0 \times 10^{-7} - 2,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-7}$	7,5	-	<30 s	-	%70 (6 ay)	-	Narang vd. 2013
PGE/PGL/ AuNR-IL/Tyr	Amp.	-0,30	$1,0 \times 10^{-7} - 9,4 \times 10^{-5}$	$2,4 \times 10^{-8}$	6,5	%3,2 (N=3)	<10 s	$136,6 \mu\text{A mM}^{-1}$	%74,6 (1 Ay)	İnsan serumu ve tablet	Bu tez çalışması

AgNPs: Gümüş nanopartikül; Amp: Amperometri; AuND: Altın nanodentrit; AuNP: Altın nanopartikül; AuNR-IL: Altın nanoçubuk-iyonik sıvı; CNTs: Karbon nanotüp; CPE: Karbon pasta elektrot; $\text{Eu}_2\text{O}_3@\text{Cr}_2\text{O}_3$: Evropiyum(III) oksit ve krom(III) oksit kompoziti; FDMA: Diferansiyel miğroiğne dizisi; GCE: Camı karbon elektrot; GO: Grafen oksit; Gr: Grafit; HRP: Horseradish peroksidaz; MWCNT: Çok duvarlı karbon nanotüp; pPDA: p-fenilendiamin; PPO: Polifenol oksidaz; Ppy: Polipirol; PU: Poliüretan; PVA: Polivinil alkol; RGO: İndirgenmiş grafen oksit; SPCE: Perde-baskılı karbon elektrot; ZIF-8: Zeolitik imidazolat kafes yapı

KAYNAKLAR

- Alagiri, M., Rameshkumar, P., Pandikumar, A. 2017. Gold nanorod-based electrochemical sensing of small biomolecules: A review. *Microchimica Acta*, 184, 3069-3092.
- Alqasım, W. 2022. Glisin, Gaba, Glutamat ve Serin'in kulometrik detektörlü sıvı kromatografisi kullanılarak mikrodializ örneklerinden tayini. Yüksek Lisans Tezi. Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, 42, Eskişehir.
- Annu, Sharma, S., Jain, R., Raja, A. N. 2020. Pencil graphite electrode: an emerging sensing material. *Journal of The Electrochemical Society*, 167, 037501.
- Bard, A. J., Faulkner, L. R. 2001. *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Inc, 1-3, New York.
- Batchelor-McAuley, C., Compton, G. R. 2012. Voltammetry of multi-electron electrode processes of organic species. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 669, 73-81.
- Beitollahi, H., Safaei, M., Tajik, S. 2020. Electrochemical deduction of levodopa by utilizing modified electrodes: A review. *Microchemical Journal*, 152, 104287.
- Brunetti, B., Valdés-Ramírez, G., Litvan, I., Wang, J. 2014. A disposable electrochemical biosensor for L-DOPA determination in undiluted human serum. *Electrochemistry Communications*, 48, 28-3.
- Cembalo, G., Ciriello, R., Tesoro, C., Guerrieri, A., Bianco, G., Lelario, F., Acquavia, A. M., Capua, D. A. 2023. An amperometric biosensor based on a bilayer of electrodeposited graphene oxide and co-crosslinked tyrosinase for L-dopa detection in untreated human plasma. *Molecules*, 28, 5239.
- Chen, S., Yuan, R., Chai, Y., Hu, F. 2013. Electrochemical sensing of hydrogen peroxide using metal nanoparticles: a review. *Microchim Acta*, 180, 15-32.
- Chen, X., Zhang, J., Zhai, H., Chen, X., Hu, Z. 2005. Determination of levodopa by capillary zone electrophoresis using an acidic phosphate buffer and its application in the analysis of beans. *Food Chemistry*, 92, 381-386.
- Ensafi, A., A. 2019. An introduction to sensors and biosensors. *Electrochemical Biosensors*, 1-10.
- Erden, E. P., Selvi, K. C., Kılıç, E. 2021. A novel tyramine biosensor based on carbon nanofibers, 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and gold nanoparticles. *Microchemical Journal*, 170, 106729.

- Espín, J. C., Varón, R., Fenoll, L. G., Gilabert, M. A., García-Ruíz, P. A., Tudela, J., García-Cánovas, F. 2000. Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *European Journal of Biochemistry*, 267(5), 1270-1279.
- Fang, L., Ren, H., Mao, X., Zhang S., Cai, Y., Xu, S., Zhang, Y., Li, L., Ye, X., ve Liang, B. 2022. Differential Amperometric Microneedle Biosensor for Wearable Levodopa Monitoring of Parkinson's Disease. *Biosensors*, 12, 102.
- Fernandez-Sanchez, C., McNeil, C. J., Rawson, K. 2005. Electrochemical impedance spectroscopy studies of polymer degradation: application to biosensor development. *Trends in Analytical Chemistry*, 24(1), 37-48.
- Giménez-Gómez, P., Gutiérrez-Capitán, M., Capdevila, F., Puig-Pujol, A., Fernández-Sánchez, C., Jiménez-Jorquera, C. 2016. Monitoring of malolactic fermentation in wine using an electrochemical bienzymatic biosensor for L-lactate with long term stability. *Analytica Chimica Acta*, 905, 126-133.
- Goole, J., Amighi, K. 2009. Levodopa delivery systems for the treatment of Parkinson's disease: An overview. *International Journal of Pharmaceutics*, 380, 1-15.
- Gürsoy, S., Dükar, N., Yaman, Y. T., Abacı, S., Kuralay, F. (2019). Electroactive polyglycine coatings for nanobiosensing applications: Label-free DNA hybridization, DNA-antitumor agent interaction and antitumor agent determination. *Analytica Chimica Acta*, 1072, 15-24.
- Işın, D., Eksin, E., Erdem, A. 2022. Graphene-oxide and ionic liquid modified electrodes for electrochemical sensing of breast cancer 1 gene. *Biosensors*, 12(2), 95.
- Kaçar, C. 2016. L-lizin tayini için karbon nanomalzemelere dayalı amperometrik enzim elektrotlar hazırlanması. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 150, Ankara.
- Kaçar, C., Erden E. P. 2020. An amperometric biosensor based on poly(L-aspartic acid), nanodiamond particles, carbon nanofiber, and ascorbate oxidase-modified glassy carbon electrode for the determination of L-ascorbic acid. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412, 5315-5327.
- Kannan, A., Radhakrishnan, S. 2020. Fabrication of an electrochemical sensor based on gold nanoparticles functionalized polypyrrole nanotubes for the highly sensitive detection of L-dopa. *Materials Today Communications*, 25, 101330.
- Keskin, M., Arslan, F. 2020. Biyosensörler. Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi, 1(2), 51-60
- Koçoğlu O. İ., Erden, E. P., Kılıç, E. 2024. Disposable biosensor based on ionic liquid, carbon nanofiber and poly(glutamic acid) for tyramine determination. *Analytical Biochemistry*, 684, 115387.

- Kordasht, H. K., Hasanzadeh, M., Seidi, F., Alizadeh, P. M. 2021. Poly (amino acids) towards sensing: Recent progress and challenges. *Trends in Analytical Chemistry*, 140, 116279.
- Kumar, S., Kalkal A. 2021. Electrochemical detection: cyclic voltammetry/differential pulse voltammetry/impedance spectroscopy. *Nanotechnology in Cancer Management*, 43-71.
- Li, L., Lu, H., Deng, L. 2013. A sensitive NADH and ethanol biosensor based on graphene–Au nanorods nanocomposites. *Talanta*, 113, 1-6.
- Li, Y., Liu, X., Wei, W. 2011. Square wave voltammetry for selective detection of dopamine using polyglycine modified carbon ionic liquid electrode. *Elektroanalysis*, 23(12), 2832-2838.
- Lin, Z., Wu, G., Zhao, L., Lai, K. W. C. 2019. Carbon nanomaterial-based biosensors: A review of design and applications. *IEEE Nanotechnology Magazine*, 13(5), 4-14.
- Lisdat, F., Schäfer, D. 2008. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 1555-1567.
- Mijajlović, A., Ognjanović, M., Manojlović, D., Vlahović, F., Đurđić, S., Stanković, V., Stanković, D. 2023. $\text{Eu}_2\text{O}_3@\text{Cr}_2\text{O}_3$ nanoparticles-modified carbon paste electrode for efficient electrochemical sensing of neurotransmitters precursor L-dopa. *Biosensors*, 13, 201.
- Miller, J.C., Miller, J.N., 2000. *Statistics for analytical chemistry*, Pearson Prentice Hall, 5th Edition, 5-7, England.
- Molaakbari, E., Mostafavi, A., Beitollahi, H., Alizadeh, R. 2014. Synthesis of ZnO nanorods and their application in the construction of a nanostructure-based electrochemical sensor for determination of levodopa in the presence of carbidopa. *Analyst*, 139(17), 4356-4364.
- Moon, M. J., Teymourian, H., Paz, D. E., Sempionatto, R. J., Mahato, K., Sonsard, T., Huang, N., Longardner, K., Litvan, I., Wang, J. 2021. Non-invasive sweat-based tracking of L-dopa pharmacokinetic profiles following an oral tablet administration. *Angewandte Chemie International Edition*, 60, 19074 – 19078.
- Musameh, M. M., Kachoosangi, R. T., Xiao, L., Russell, A., Compton, R. G. 2008. Ionic liquid-carbon composite glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(1), 87-92.
- Narang, J., Chawla, S., Chauhan, N., Dahiya, M., Pundir, S. C. 2013. Construction of an amperometric polyphenol biosensor based on PVA membrane. *Food Measure*, 7, 22-28.
- Pilevneli, D. A., Konuklugil, B. 2020. Marine derived tyrosinase inhibitors. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(4), 427-436.

- Prabhu, P., Babu S. R., Narayana S.S. 2011. Amperometric determination of l-dopa by nickel hexacyanoferrate film modified gold nanoparticle graphite composite electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical* 156(2), 606-614.
- Rezaei, B., Irannejad, N. 2019. Electrochemical detection techniques in biosensor applications. *Electrochemical Biosensors*, 11-43.
- Rodríguez, C. L., García, A. M., Linares, J. C., Ceba R. M. 2006. Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. *Analytical Letters*, 26(6), 1243-1258.
- Romanholo, V. V. P., Sgobbi, F. L., Carrilho, E. 2020. Exploring paper as a substrate for electrochemical micro-devices. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 89, 0166-526X.
- Ronkainen, N. J., Halsall, B. H., Heineman, W. R. 2010. Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39, 1747-1763.
- Sandeep, S., Santhosh, S. A., Swamy, K. N., Suresh, S.G., Melo, S. J., Nithin, S. K. 2018. Electrochemical detection of L-dopa using crude Polyphenol oxidase enzyme immobilized on electrochemically reduced RGO-Ag nanocomposite modified graphite electrode. *Materials Science & Engineering*, 15(21), 232-235.
- Sharma, P., Sharma, S., Kumar, H. 2023. Introduction to ionic liquids, applications and micellization behaviour in presence of different additives. *Journal of Molecular Liquids*, 393, 123447.
- Shastri, S. B. 2001. Parkinson disease: etiology, pathogenesis and future of gene therapy. *Neuroscience Research*, 41, 5-12.
- 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), 1-22.
- Shoja, Y., Rafati, A., Ghodsi, J. 2016. Glassy carbon electrode modified with horse radish peroxidase/organic nucleophilic-functionalized carbon nanotube composite for enhanced electrocatalytic oxidation and efficient voltammetric sensing of levodopa. *Materials Science and Engineering*, 58, 835-845.
- Silva, A. T., Wong, A., Fatibello-Filho, O. 2020. Electrochemical sensor based on ionic liquid and carbon black for voltammetric determination of Allura red colorant at nanomolar levels in soft drink powders. *Talanta*, 209, 120588.
- Singh, V. V., Nigam, A. K., Batra, A., Boopathi, M., Singh, B., Vijayaraghavan, R. 2012. Applications of ionic liquids in electrochemical sensors and biosensors. *International Journal of Electrochemistry*, 2012, 165683.
- Tashkhourian, J., Hormozi-Nezhad, M. R., Khodaveisi, J. 2011. Application of silver nanoparticles and principal component-artificial neural network models for simultaneous determination of levodopa and benserazide

- hydrochloride by a kinetic spectrophotometric method. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 82(1), 25-30.
- Tesoro, C., Cembalo, G., Guerrieri, A., Bianco, G., Acquavia, A. M., Capua D. A., Lelario, F., Ciriello, R. 2023. A critical overview of enzyme-based electrochemical biosensors for l-dopa detection in biological samples. *Chemsensors*, 11(10), 523.
- Torrinha, Á., Amorim, G. C., Montenegro, M., Araújo, A. 2018. Biosensing based on pencil graphite electrodes. *Talanta*, 190, 235-247.
- Xiao, J., Fan, C., Xu, T., Su, L., Zhang, X. 2022. An electrochemical wearable sensor for levodopa quantification in sweat based on a metal–Organic framework/graphene oxide composite with integrated enzymes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 359, 131586.
- Yin, H., Zhou, Y., Xu, J., Ai, J., Cui, L., Zhu, L. 2010. Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized onto multiwalled carbon nanotubes-cobalt phthalocyanine-silk fibroin film and its application to determine bisphenol A. *Analytica Chimica Acta*, 659 (1-2), 144-150.
- Yu, T. R., Ji, G. L. 1993. *Electrochemical Methods in Soil and Water Research*. Pergamon Press 45-48, New York.
- Zhang, G., He, P., Feng, W., Ding, S., Chen, J., Li, L., He, H., Zhang, S., Dong, F. 2016. Carbon nanohorns/poly(glycine) modified glassy carbon electrode: Preparation, characterization and simultaneous electrochemical determination of uric acid, dopamine and ascorbic acid. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 760, 24-31.
- Zhang, J., Wang, C., Chen, S., Yuan, D., Zhong, X., 2013. Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase–lectin biospecific interaction. *Enzyme and Microbial Technology*, 52(3), 134-140.