ÇANKIRI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NADH ve H_2O_2'nin EŞ ZAMANLI TAYİNİ İÇİN YENİ ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Eda KIYMAZ ONAT

KİMYA ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2019

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Eda KIYMAZ ONAT tarafından hazırlanan "NADH ve H_2O_2'nin EŞ ZAMANLI TAYİNİ İÇİN YENİ ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ" adlı tez çalışması 13/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Melike BİLGİ KAMAÇ

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Burcu ÖZCAN

Dr. Öğr. Üyesi Melike BİLGİ KAMAÇ

Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Doç. Dr. Tamer KEÇELİ

Enstitü Müdürü V.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum ‘‘NADH ve H_2O_2’nin EŞ ZAMANLI TAYİNİ İÇİN YENİ ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ ” konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (13/06/2019).

Eda KIYMAZ ONAT

(imza)

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

NADH ve H_2O_2'nin EŞ ZAMANLI TAYİNİ İÇİN YENİ ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Eda KIYMAZ ONAT

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Melike BİLGİ KAMAÇ

Bu çalışmada, nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) ve hidrojen peroksitin (H_2O_2) nin eş zamanlı tayini için yeni bir elektrokimyasal biyosensör sisteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. İndirgenmiş grafen oksit (RGO), polinötral kırmızı (PNR), altın nanopartikül (AuNP) ile yüzey baskılı karbon elektrotlar (SPCE) ve ikili yüzey baskılı karbon elektrotlar (SPCDE) modifiye edilerek SPCE/RGO/PNR/AuNP ve SPCDE/RGO/PNR/AuNP elektrotları hazırlanmıştır. Bu elektrotlar döngüsel voltametri ile elektrokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Geliştirilen sistemler, NADH, H_2O_2 ve NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı tayininde kullanılmıştır.

Çalışmanın ilk kısmında SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrotlarının NADH ve H_2O_2'ye olan duyarlığı test edilmiş ve ayrı ayrı NADH ve H_2O_2 sensörleri olarak kullanımı incelenmiştir. Bu incelemelerde, NADH ve H_2O_2 tayini için optimum çalışma şartları (pH, çalışma potansiyeli), depolama ve uygulama kararlılığı ile tekrarlanabilirlik gibi performans kriterleri belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında, ilk kısımda belirlenen optimum çalışma koşullarında SPCDE/RGO/PNR/AuNP elektrotları ile NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı amperometrik tayini yapılmıştır. NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı tayini için geliştirilen elektrokimyasal biyosensör sisteminin analitik yönden karakterizasyonları yapılmıştır. Yeni geliştirilen NADH, H_2O_2 ve ikili NADH ve H_2O_2 biyosensörleri, yapay kan serumu numunelerinde, NADH ve H_2O_2 tayini ve eş zamanlı NADH ve H_2O_2 tayini için kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

2019, 67 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: NADH, H_2O_2, indirgenmiş grafen oksit, polinötral kırmızı, biyosensör, ikili yüzey baskılı elektrotlar

ABSTRACT

Master Thesis

DEVELOPMENT OF A NEW ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS SYSTEM FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF NADH and H_2O_2

Eda KIYMAZ ONAT

Cankırı Karatekin University
Department of Chemistry

Supervisors: Melike BİLGİ KAMAÇ

The aim of the study is to develop a new electrochemical biosensor system for the simultaneous determination of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and hydrogen peroxide (H_2O_2). SPCE/RGO/PNR/AuNP and SPCDE/RGO/PNR electrodes are prepared modifying reduced graphene oxide (RGO), polyneutral red (PNR), gold nanoparticle (AuNP), screen-printed carbon electrodes (SPCE) and dual-screen-printed carbon electrodes (SPCDE) electrodes. These electrodes are electrochemically characterized by cyclic voltammetry. These developed systems are used for the determination of NADH, H_2O_2 and simultaneous determination of NADH and H_2O_2.

In the first part of the study, the sensitivity of SPCE/RGO/PNR/AuNP electrodes to NADH and H_2O_2 is primarily tested and their use as individually NADH and H_2O_2 sensors is examined. In these analyses, performance criteria such as optimum operating conditions (pH, working potential), storage and operation stability and repeatability are determination for detection of NADH and H_2O_2.

In the second part of the study, simultaneous amperometric detection of NADH and H_2O_2 with SPCDE/RGO/PNR/AuNP electrodes is determined under optimum operating conditions specified in the first part. Analytical characterization of the electrochemical biosensor system developed for the simultaneous determination of NADH and H_2O_2 is carried out. Currently developed NADH, H_2O_2 and dual NADH and H_2O_2 biosensors are used in artificial blood serum samples, for the determination of NADH and H_2O_2 and the simultaneous determination of NADH and H_2O_2 and successful results are obtained.

2019, 67 pages

KEYWORDS: NADH, H_2O_2, reduced graphene oxide, polyneutral red, biosensor, dual screen printed electrodes

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

"NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı tayini için yeni elektrokimyasal biyosensör sisteminin geliştirilmesi" adlı bu çalışma 2019 yılında hazırlanarak Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne "Yüksek Lisans Tezi" olarak sunulmuştur.

Çalışmanın her safhasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, her türlü yardımını esirgemeyen, her zaman destekleyen ve inanılmaz bir anlayış gösteren çalışmanın yönlendirilmesinde ve yürütülmesinde yol gösteren, kıymetli fikirlerini esirgemeden sunan, değerli hocam Dr.Öğr. Üyesi Melike BİLGİ KAMAÇ'a sonsuz teşekkür ederim. Öğrencisi olduğum günden bugüne kadar maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi ve Enstitüsüne teşekkür eder, çalışmanın değişik aşamalarında yardımlarını gördüğüm değerli mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim. Analizler ve doküman konusunda yardımcı olan Dr.Öğr. Üyesi Muhammet ALTUN'a teşekkürü bir borç bilirim. Laboratuar çalışmalarında yardım eden her zaman destek ve yardımcı olan Merve YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuar çalışmalarım sırasında her türlü zahmete katlanarak yardım eden mezun olmuş veya halen okuyan tüm değerli öğrenci arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Bu aşamaya gelmemde bana emeği geçen tüm hocalarıma, hakkı hiçbir zaman ödenemeyecek olan annem Ayşe Kıymaz, babam Sadi Kıymaz, kardeşim Ece Kıymaz, sevgili eşim İsmail Kadri Onat ve bu dönemde yanımdan hiç ayrılmayan oğlum Ertan Alp Onat'a ve adını burada sayamadığım ve katkısı olan herkese ayrıca şükranlarımı sunarım.

15 Temmuz Şehitlerine ve Gazilerine teşekkürlerimi sunarım.

Eda Kıymaz Onat
Çankırı, Haziran 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xi**
1. GİRİŞ **1**
1.1. Sensörler **1**
1.2. Biyosensörler **3**
1.2.1. Biyosensörlerin Yapısı ve Sınıflandırılması **3**
1.2.1.1. Elektrokimyasal Biyosensörler **4**
1.2.1.2. Kondüktometrik Biyosensörler **4**
1.2.1.3. Potansiyometrik Biyosensörler **5**
1.2.1.4. Amperometrik Biyosensörler **5**
1.2.2. Biyosensörlerin Performans Kriterleri **8**
1.3. *Nikotinamid Adenin Dinükleotitin* Genel Özellikleri **9**
1.4. Hidrojen Peroksitin Yapısı ve Genel Özellikleri **11**
1.5. Nötral Kırmızı Hakkında Genel Bilgi **12**
1.6. Grafenin Yapısı ve Özellikleri **14**
1.6.1. Grafen Sentezi **15**
1.6.1.1. Katman Ayırma Yöntemi **16**
1.6.1.2. Epitaksiyel Büyüme Yöntemi **16**
1.6.1.3. Kimyasal Buhar Biriktirme Yöntemi **17**
1.6.1.4. Kimyasal Ayrıştırma Yöntemi **17**
1.6.2. Grafen Oksit **18**
1.6.3. İndirgenmiş Grafen Oksit **18**
1.7. Kaynak Özetleri **19**
2. MATERYAL VE METOT **21**
2.1. Materyal **21**
2.1.1. Kullanılan kimyasallar **21**

2.1.2. Kullanılan cihazlar **21**
2.1.2.1. Elektrokimyasal ölçüm sistemi **21**
2.1.3. Kullanılan elektrotlar, hücreler ve konnektörler **22**
2.2. Metot **23**
2.2.1. Elektrot yüzeyinin temizlenmesi ve aktivasyonu **23**
2.2.2. Destek elektrolit tampon çözeltisinin hazırlanması **24**
2.2.3. SPCE'lerin RGO ile modifikasyonu **24**
2.2.4. SPCE/RGO üzerinde PNR'nin hazırlanması **24**
2.2.5. SPCE/RGO/PNR'lerin AuNP ile modifikasyonu **25**
2.2.6. Elektrokimyasal ölçümler **25**
3. BULGULAR VE TARTIŞMA **26**
3.1. SPCE'ler üzerine indirgenmiş grafen oksitin modifikasyonu **26**
3.2. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun elektrokimyasal karakterizasyonu **27**
3.3. NADH'nin SPCE/RGO/PNR/AuNP Elektrotları Üzerinde Elektrokimyasal Davranışı **32**
3.4. Amperometrik NADH Tayinine İlişkin Bulgular **35**
3.4.1. pH optimizasyonu **35**
3.4.2. Çalışma potansiyelinin optimizasyonu **36**
3.4.3. Analitiksel karakterizasyon **37**
3.4.4 Girişim Testi **43**
3.4.5. Gerçek numune analizi **43**
3.5. SPCE/RGO/PNR/AuNP Elektrotları Üzerinde H_2O_2'nin Elektrokimyasal Davranışı **43**
3.6. Amperometrik H_2O_2 Tayinine İlişkin Bulgular **45**
3.6.1. pH optimizasyonu **45**
3.6.2. Çalışma potansiyelinin optimizasyonu **46**
3.6.3. Analitiksel karakterizasyon **48**
3.6.4 Girişim Testi **53**
3.6.5. Gerçek numune analizi **53**
3.7. NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı amperometrik tayini ve analitiksel karakterizasyonu **53**
3.7.1. Girişim Testi **56**

3.7.2. Gerçek numune analizi 57
4. TARTIŞMA VE SONUÇ 59
KAYNAKLAR 62
ÖZGEÇMİŞ 66

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

A	Yardımcı elektrot
c^o	Konsantrasyon 1 M Referans konsantrasyon
Epc	Katodik pik potansiyeli
Epa	Anodik pik potansiyeli
ΔEp	Anodik ve katodik pik potansiyeli arasındaki fark
Ipa	Anodik pik akımı
Ipc	Katodik pik akımı
R	Referans elektrot
W	Çalışma elektrodu

Kısaltmalar

RGO	İndirgenmiş Grafen Oksit
PNR	Polinötral Kırmızı
AuNP	Altın Nanopartikül
SPCE	Yüzey Baskılı Karbon Elektrot
SPCDE	İkili Yüzey Baskılı Karbon Elektrotlar
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NR	Nötral kırmızı
DA	Dopamin Hidroklorür
AA	L-askorbik asit
UA	Ürik asit
KH_2PO_4	Potasyum dihidrojen fosfat
K_2HPO_4	Potasyum hidrojen fosfat
KCl	Potasyum klorür
DMF	dimetil formamid
HCl	Hidroklorik asit
NaOH	Sodyum Hidroksit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Sensörler ve kullanım alanları **1**
Şekil 1.2. Elektrokimyasal hücrede kesikli analiz ile yapılan amperometri sonucu elde edilen amperogram..... **6**
Şekil 1.3. İlk amperometrik biyosensör (Clark oksijen elektrodu) **6**
Şekil 1.4. Amperometrik biyosensörlerin sınıflandırılması **8**
Şekil 1.5. NADH'nin kimyasal yapısı (Kumar ve Chen, 2008)..... **9**
Şekil.1.6. NADH'nin İndirgenme-Yükseltgenme Reaksiyonları ve Redoks Dönüşümleri (http://proteopedia.org/wiki/) **11**
Şekil 1.7. Nötral Kırmızı'nın kimyasal yapısı **13**
Şekil 1.8. Grafenin Yapısı..... **15**
Şekil 2.1. Dropsens µStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat **22**
Şekil 2.2. Yüzey baskılı karbon ve yüzey baskılı ikili karbon elektrotların yapısı..... **22**
Şekil 2.3. Yüzey baskılı elektrotlar için sensör konnektör çeşitleri A) Damlamalı analizler için kutu şeklinde B) Kesikli analiz için kablo şeklinde..... **23**
Şekil 2.4. Yüzey baskılı elektrotlar için elektrokimyasal hücre..... **23**
Şekil 3.1. SPCE/RGO (A) ve yalın SPCE (B) elektrotlarının SEM görüntüleri..... **26**
Şekil 3.2. SPCE, SPCE/RGO, SPCE/RGO/PNR ve SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrotlarının 5 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (0,1 M KCl içinde) çözeltisindeki -1,0 V ile +1,0 V potansiyel aralığı ve 50 $mV.s^{-1}$ tarama hızında elde edilen döngüsel voltamogramları..... **28**
Şekil 3.3. A) SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun tampon çözeltide - 1,1 V ile + 0,9 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 10, 25, 50, 75, 100, 125 $mV.s^{-1}$, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızının karekökü grafikleri..... **29**
Şekil 3.4. A) SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun 1 mM $K_3Fe(CN)_6$ içerisinde – 0,5 V ile + 0,7 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 10, 25, 50, 75, 100, 125 $mV.s^{-1}$, 0,1M KCl) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızının karekökü grafikleri..... **31**
Şekil 3.5. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun 50 mV s^{-1} tarama hızında 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda (0,1 M KCl) -0,4 V ile +0,5 V potansiyel aralığında 5 mM NADH varlığında ve yokluğundaki döngüsel voltamogramı..... **32**
Şekil 3.6. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun değişen NADH konsantrasyonlarında (0,5 mM - 5 mM) -0,4 V ve +0,9 V potansiyel aralığındaki dönüşümlü voltamogramları (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl; tarama hızı: 50 $mV.s^{-1}$)..... **34**
Şekil 3.7. Farklı pH'lardaki 100 µM NADH çözeltisinin, SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodu kullanılarak elde edilen akım-pH grafiği..... **35**
Şekil 3.8. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörlerinin farklı potansiyellerde (0,100 V, 0,125 V, 0,150 V, 0,175 V, 0,200 V, 0,250 V ve 0,300 V) NADH derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)..... **36**
Şekil 3.9. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunda 100 µM NADH'nin ardışık

katımı ile elde edilen örnek bir kronoamperogram (+0,150 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)..... **38**
Şekil 3.10. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile NADH derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (+0,25 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)..... **39**
Şekil 3.11. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün 100 µM NADH derişimine karşı elde edilen yüzde bağıl akım değerleri-gün sayısı grafiği (+0,150 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)..... **41**
Şekil 3.12. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün farklı depolama zamanlarında 100 µM NADH derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (+0,150 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)..... **42**
Şekil 3.13. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün 100 µM DA derişimine karşı elde edilen akım değerleri-hafta sayısı grafiği (+0,150 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)..... **42**
Şekil 3.14. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun 50 mV s^{-1} tarama hızında 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda (0,1 M KCl) -1,0 V ile +1,0 V potansiyel aralığında 10 mM H_2O_2 varlığında ve yokluğundaki döngüsel voltamogramı..... **45**
Şekil 3.15. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun değişen H_2O_2 konsantrasyonlarında (0,25 mM - 5 mM) -1,0 V ve +1,0 V potansiyel aralığındaki döngüsel voltamogramları (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl; tarama hızı 50 $mV.s^{-1}$)..... **45**
Şekil 3.16. Farklı pH'lardaki 100 µM H_2O_2 çözeltisinin, SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodu kullanılarak elde edilen akım-pH grafiği..... **46**
Şekil 3.17. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörlerinin farklı potansiyellerde (-0,40 V, -0,45 V ve -0,50 V) H_2O_2 derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)..... **47**
Şekil 3.18. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunda 100 µM H_2O_2'nin ardışık katımı ile elde edilen örnek bir kronoamperogram (+0,25 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)..... **48**
Şekil 3.19. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile H_2O_2 derişimine karşı elde edilen akım grafikleri -0,45 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)..... **49**
Şekil 3.20. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün 100 µM H_2O_2 derişimine karşı elde edilen yüzde bağıl akım değerleri-gün sayısı grafiği (-0,45 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)..... **51**
Şekil 3.21. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün farklı depolama zamanlarında 100 µM H_2O_2 derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (-0,45 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)..... **52**
Şekil 3.22. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün 100 µM H_2O_2 derişimine karşı elde edilen akım değerleri-hafta sayısı grafiği (-0,45 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)..... **52**
Şekil 3.23. SPCDE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile NADH ve H_2O_2'nin a) damlamalı analiz b) batch analiz ile eş zamanlı tayinleri sonucu farklı NADH ve H_2O_2'nin derişimlerinde elde edilen örnek kronoamperogramlar (+0,15 V ve -0,45 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)..... **54**
Şekil 3.24. SPCDE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile NADH ve H_2O_2'nin eş

zamanlı tayinleri sonucu NADH ve H_2O_2'nin derişimlerine karşı elde edilen akım grafikleri +0,15 V ve -0,45 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)..... **55**
Şekil 3.25. SPCDE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile NADH ve H_2O_2'nin batch analiz ile eş zamanlı tayin yönteminde analitlerin tek başlarına ve karışım halinde ilavesi ile elde edilen örnek kronoamperogramlar (+0,15 V ve -0,45 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl) **57**

ÇİZELGELER DİZİNİ

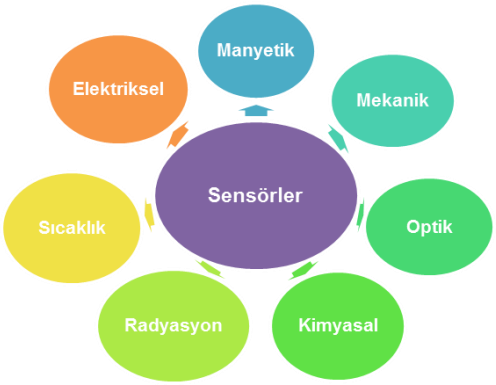
Çizelge 3.1. Şekil 3.2'de verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen Epa ve Ipa değerleri **28**
Çizelge 3.2. Şekil 3.8'de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayıları değerleri **37**
Çizelge 3.3. NADH'nin amperometrik tayini için SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile elde edilen analitiksel parametreler **39**
Çizelge 3.4. Literatürde çeşitli materyallerle modifiye edilmiş elektrotlar ile NADH'nin amperometrik tayini için elde edilen elektroanalitik karakterizasyonlar..... **470**
Çizelge 3.5. Şekil 3.17'de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve koreleasyon katsayıları değerleri **47**
Çizelge 3.6. H_2O_2'nin amperometrik tayini için SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile elde edilen analitiksel parametreler **49**
Çizelge 3.7. Literatürde çeşitli materyallerle modifiye edilmiş elektrotlar ile H_2O_2'nin amperometrik tayini için elde edilen elektroanalitik karakterizasyonlar..... **50**
Çizelge 3.8. NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı amperometrik tayini için SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile elde edilen analitiksel parametreler **56**

1. GİRİŞ

1.1. Sensörler

İnsanlar hayata gözlerini açtıklarında etraflarında meydana gelen olayların bir kısmını algılama kapasitesine sahip olurlar. Bu kapasiteyi sağlayanlar ise duyu organlarımızdır. Günlük hayatta ısı, ışık, basınç, ses gibi büyüklüklerin etkilerini duyu organlarımız ile algılar, varlıklarından haberdar oluruz. Bu fiziksel büyüklükleri insanlar gibi algılayan ve bunun sonucunda gerekli ekipmanları devreye sokan veya çıkartan elemanlar sensörlerdir. Fiziksel ortamla elektrik-elektronik cihazları birbirine bağlayan bir köprü görevi görürler. İlk olarak 1987 yılında 'Steinel' tarafından kullanılan sensörün, o yıllardaki üretim amacı aydınlatmaydı. Şu an ise sensörler bize enerji harcatmamak için çoğu problemlerin çözümünde kolaylık sağlamaktadır. (http://www.muhendisbeyinler.net/sensor-nedir-cesitleri-nelerdir/, 2006)

Sistemdeki sensör veya sensör gruplarının yapısı hangi değişkene duyarlı ise sistem dışındaki değişkeni algılar ve elde ettiği değerleri sistemin karar verme birimine yollar. Elde edilen bu verilerin anlaşılabilirliği önemlidir. Bu sebeple sensörlerin yapısı çeşitli değişkenlere göre çalışır. Kullanacağımız alana en uygun sensörü seçmekte önemli faktörlerden birisidir. Bu değişkenlerin ifade edildiği birim aslında sensörün ne amaçla kullanılacağını belirtir. Bu değişkenler sensörlerin giriş büyüklükleri başlığı altında gruplandırılmıştır.



Şekil 1.1. Sensörler ve kullanım alanları

Mekanik Sensörler: Uzunluk, alan, miktar, kütlesel akış, kuvvet, tork(moment), basınç,hız,ivme,pozisyon,ses,dalga boyu ve yoğunluğu gibi mekaniksel değişken değerlerini ölçebilir. Sensörler kategorisindeki en basit sensördür. Çalışma prensibi açma-kapama anahtarı ile aynıdır. Genellikle yaylı bir sistem engele çarpınca kontakt kapanır ve elektrik akımı sağlanır. Duyargalar olarak da adlandırılırlar.

Sıcaklık (Termal) Sensörler: Sıcaklık, ısı akışı gibi değişkenler ölçülebilir. Birçok maddenin elektriksel direnci sıcaklıkla değişmektedir. Sıcaklığa karşı hassas olan maddeler kullanılarak sıcaklık kontrolü ve sıcaklık ölçümü yapılır. Sıcaklık en çok ölçülen çevresel bir büyüklüktür. Çünkü fiziksel, elektronik, kimyasal, mekanik ve biyolojik tüm sistemler sıcaklıktan etkilenir. Bu nedenle kontrol sistemlerinde sıcaklığın ölçülmesi ve belli değerde tutulması önemlidir.

Elektriksel Sensörler: Voltaj, akım, direnç, endüktans, kapasitans, dielektrik katsayısı, polarizasyon, elektrik alanı ve frekans gibi elektriksel değerler ölçülebilir.

Manyetik Sensörler: Alan yoğunluğu, akım yoğunluğu, manyetik moment, geçirgenlik gibi manyetik alana bağlı değişkenlerin değerleri ölçülebilir. Bobin yardımıyla elde edilen manyetik alan etkisinden faydalanılarak elde edilen sensör çeşitidir. Manyetik alan etkisinden faydalanılarak pek çok sensör elde edilmiştir. Günlük hayatımızda pek çok alanda kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak hazine arama detektörü, X-Ray cihazları, tıp elektroniğinde sıkça kullanılmaktadır. Ayrıca endüstride metal algılama amaçlı kullanılmaktadır.

Kimyasal Sensörler: Yoğunlaşma, içerik, oksidasyon-redoksiyon, reaksiyon hızı, pH miktarı gibi kimyasal değerlerin ölçüldüğü sensör değerleridir. Analiz edilen bileşene karşı özel hazırlanmış bir numunenin derişiminden yararlanarak elde edilen kimyasal bilgiyi analitiksel olarak yararlı bir sinyale dönüştürebilen sistemlerdir.

Radyasyon Sensörler: Ortamdaki radyasyon miktarını ölçmek için kullanılan sensörlerdir.

Optik (Fotoelektrik) Sensörler: Işığın yansıma özelliği kullanılarak elde edilen sensörlerdir. Bulunduğu ortamdan aldığı ışık enerjisine göre direnci değişen yada uçları arasındaki potansiyel farkı oluşturan elemanlar ve uygulanan elektrik enerjisini ışık enerjisine dönüştüren sistemlerdir. (http://diyot.net/sensor-cesitleri-nelerdir/, 2010)

1.2. Biyosensörler

Biyosensörler ilk olarak 1977 yılında Karl Camman tarafından tanımlanmıştır. IUPAC tanımı ise Thevenot ve arkadaşları tarafından 1999-2001 yılları arasında yapılmıştır (Thevenot vd 2001). IUPAC'e göre bir biyosensör, biyolojik tanımlama elemanı kullanılarak özgün,nicel veya yarı-nicel analitiksel bilgiyi sağlama yeteneğine sahip olan ve kendi kendine yeten bileşik(entegre) bir cihaz olarak tanımlanır.

1.2.1. Biyosensörlerin Yapısı ve Sınıflandırılması

Bir biyosensör, analit derişimi ile orantılı olarak ölçülebilen bir sinyal derişimi üretmek için biyolojik tanımlama elemanı ve fiziksel dönüştürücü içeren analit bir cihazdır.
Biyosensörler, biyoalgılayıcı element ve kullanılan çevirici türlerine göre sınıflandırılır. Biyoalgılayıcı elementlerin amacı, hedef moleküle bağlanmaktır. Bunlar yüksek özgünlükte olmalı, saklanma şartlarında kararlı olmalı ve yüzeye sabitlenebilmelilerdir. Biyoalgılayıcılar ise ikiye ayrılır. Bunlar affinite ve katalitik biyoalgılayıcılardır. Çevirici elemente göre biyosensörler, yani diğer adı ile transduserler ise bio-etkileşim işlemi sırasında elektronlar gibi kimyasal türlerin tüketilmesi yada üretilmesiyle oluşan elektrokimyasal sinyalin, bir elektrokimyasal dedektör tarafından ölçülmesine dayanır. Bu yüzden elektrokimyasal biyosensörler hızlı, basit ve ucuz olmasıyla en çok tercih edilen biyosensör olarak bilinir.

1.2.1.1.Elektrokimyasal Biyosensörler

En yaygın kullanılan biyosensörler, elektrokimyasal biyosensörlerdir. Ekonomik, pratik, hızlı ve diğer tip biyosensörlere göre kullanımında dezavantajlarının kolay yok edilebilmesi nedenleri ile tercih edilir (Chaubey ve Malhotro,2002) .
Biyosensörlerde, elektrokimyasal çevirici olarak kondüktometri, amperometri ve potansiyometri kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra, döngüsel voltametri (CV) , diferansiyel puls voltametrisi gibi ileri voltametrik tekniklerde biyosensör yanıtlarını daha ayrıntılı incelemek için kullanılmaktadır.

1.2.1.2.Kondüktometrik Biyosensörler

İletkenlik ölçüm ilkesine bağlı olarak yapılan analiz yöntemlerine 'Kondüktometri' denir. Kondüktometrik biyosensörlerde, analiz edilmek istenen numunelerde meydana gelen değişiklikler, reaksiyonların yüklü türler oluşturması veya tüketmesi ilkesine dayanmaktadır. Kondüktometrik dönüştürücü, küçültülmüş elektrotlardan meydana gelir ve elektrot yüzeyine yakın olan ince elektrolit tabakasının iletkenliğini ölçer. Bu ince tabakadaki değişimde, enzimatik reaksiyon gözlenebilir. Bu yüzden kondüktometri yöntemi enzim katalizinde kullanılarak, enzim aktivitesi ve bileşik derişimi tayini yapılabilir. Yöntemin seçiciliği kullanılan enzimden kaynaklanır (Anık,2002) .

Potansiyometrik ve amperometrik biyosensörlere göre kullanım alanı fazla olmasa da, bazı avantajlara sahiptir (Jaffrezic-Renault ve Dzyadevych, 2008) .

a) İnce film elektrotları küçültmeye uygundur ve ucuz bir şekilde çok sayıda üretilebilir.
b) Referans elektrota ihtiyaç duymazlar.
c) Çalışma potansiyeli çok düşüktür.
d) Farklı doğal bileşiklerin geniş bir spektrumda, farklı tepkime ve mekanizmalarını temel alan tayinleri yapılabilir.
e) Çeviricileri, ışığa karşı duyarlı değildir.

1.2.1.3.Potansiyometrik Biyosensörler

Galvanik bir pil sisteminde, iki elektrot arasındaki potansiyel fark ya çok düşük yada sıfırdır. Bu akım altında gözlenebilen ölçüm yöntemine 'Potansiyometri' denir (Anık,2002). Bir biyolojik reaksiyonu, elektrik sinyale dönüştürmek için iyon seçimli elektrotların kullanıldığı biyosensörlerdir. Bu elektrotlar genellikle bir pH elektrodu üzerine tutturulmuş bir enzimden meydana gelir. Katalizlenen reaksiyon sonuç olarak ya hidrojen iyonu oluşturur ya da hidrojen iyonu absorplar.

Potansiyometrik biyosensörlerde kullanılan elektrotlar 3'e ayrılır;

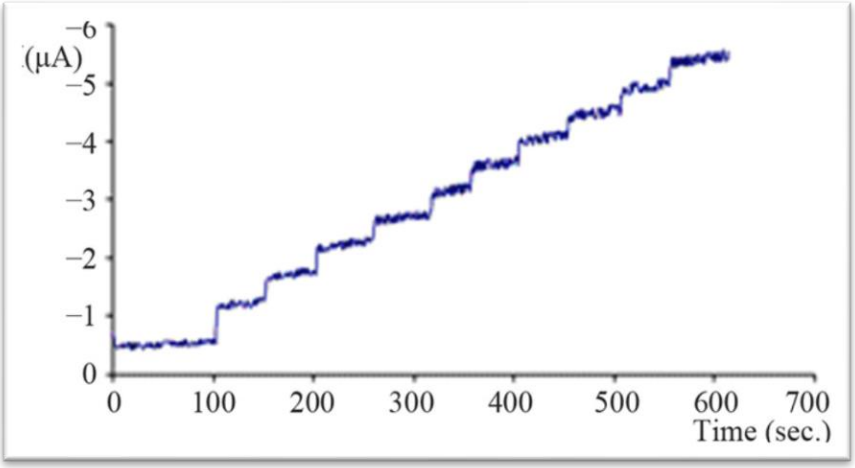
a) *Normal pH elektrotu:* Spesifik bağlanma bölgelerine bağlanan katyonlara uygun cam elektrottur. Membranın seçiciliğide camın bileşimine bağlı olarak değişmektedir.

b) *CO_2, NH_3 ve H_2S'ye duyarlı gaz geçirgen cam membranlar ile kaplanmış pHelektrotlar:*Difüzlenen gazlar, membran ve elektrotlar arasındaki çözeltide pH değişikliğine neden olur. Bu pH değişiminin izlenmesi ilkesine dayanarak yapılan ölçümdür.

c) *Gümüş sülfür ve gümüş halojenür karışımından meydana gelen ince bir membran içeren katı hal elektrotları* (Şahin,2013).

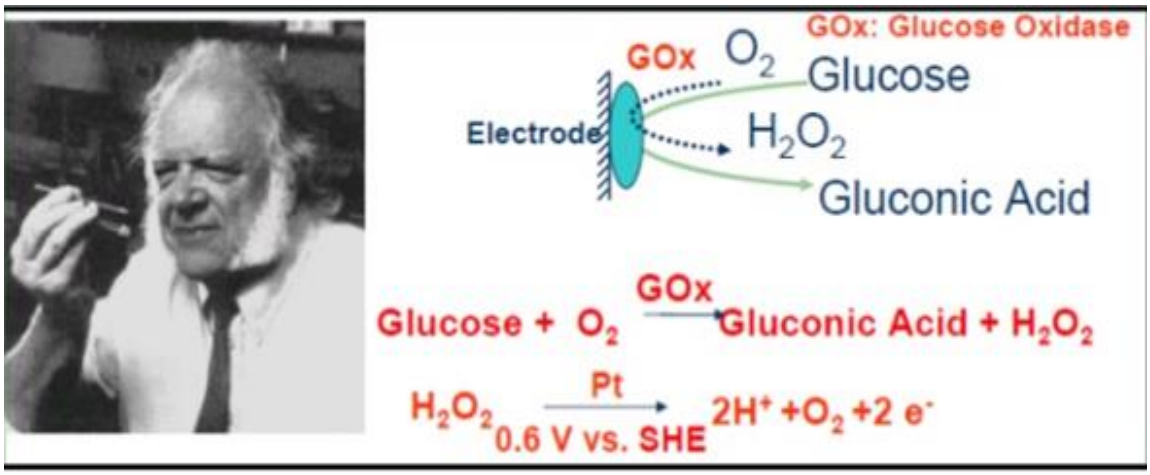
1.2.1.4.Amperometrik Biyosensörler

Sabit bir potansiyel değerinde, bir elektrokimyasal hücrede ya akım yada akım değerini ölçen yönteme 'Amperometri' denir. Bu sabit potansiyeldeki akım değişimini izleyerek derişim tayini yapılabilir (Anık,2002) .



Şekil 1.2. Elektrokimyasal hücrede kesikli analiz ile yapılan amperometri sonucu elde edilen amperogram

Ortamda bulunan analitin indirgenmesi veya yükseltgenmesini tanıyacak büyüklükte sabit bir potansiyel uygulanır ve buna bağlı olarak elde edilen akım, analit derişimi ile doğru orantılıdır. Amperometrik biyosensörler, potansiyometrik biyosensörlere göre kesin, hassas ve doğrudur. Termodinamik dengeye kadar izlemeye gereksinim duymaz. Bu yüzden seçicilik, var olan türlerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi potansiyeli ile kontrol edilir. Sonuç olarak elde edilen akım birçok kimyasal türün katkısını içerir (Mello ve Kubota,2002) .



Şekil 1.3. İlk amperometrik biyosensör (Clark oksijen elektrodu)

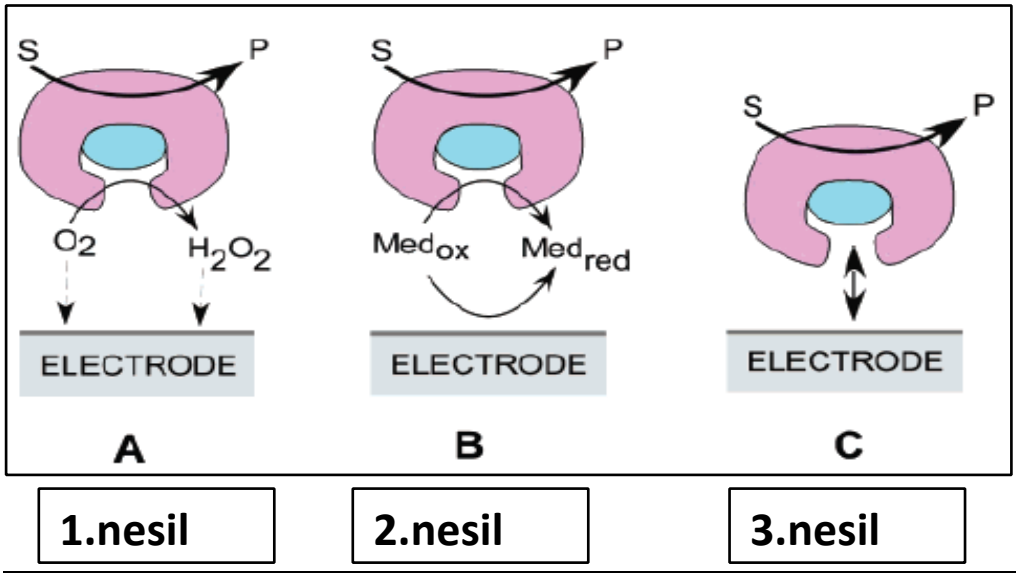
İlk kullanılan amperometrik biyosensör Prof. Leland C. Clark (1918-2005) tarafından, oksijen elektrotu içeren bir sistem ile geliştirilmiştir. Bu elektrot oksijen geçirici bir hidrofobik zarla kaplanmış platin disk elektrotla, platin elektrodun çevresini kaplayan gümüş bir levhadan oluşmaktadır. Bu metaller ve tamponlanmış KCl çözeltisi ile kombine elektrot sistemi oluşturulur. Pile sabit gerilim kaynağından uygun düzeyde potansiyel uygulanırsa, gözenekli zardan geçen oksijen derişimine bağlı olarak devreden bir akım geçer. Bu sistemde biyomateryal olarak da glukozoksidaz (GOx) kullanılmaktadır ve H_2O_2'in yükseltgenmesi takip edilmektedir.

Amperometrik biyosensörler 3 ana sınıfa ayrılır;

a) *1.Nesil amperometrik biyosensörler:* Bu sistemlerde substratın ürüne dönüşümü sırasında ortamda bulunan moleküler oksijen (O_2) hidrojen peroksite (H_2O_2)'e indirgenir. Katodik potansiyelde O_2 indirgenmesi veya anodik potansiyelde H_2O_2 yükseltgenmesi izlenerek ürüne dönüştürülen substrat miktari belirlenir.

b) *2.Nesil amperometrik biyosensörler:* Bu sistemler, medyatör adı verilen aracı moleküller kullanılarak üretilen sistemlerdir. Enzimatik tepkimede elektron transferi medyatörlerin indirgenip-yükseltgenmesine bağlı olarak gerçekleştirilir. Kullanılacak medyatörlerin ortamdaki oksijenle tepkime vermemesi, indirgenmiş koenzim ile hızlı tepkimeye girmesi gerekmektedir. Ferrosen türevi bileşikler en çok kullanılan medyatörlerdir.

c) *3.Nesil amperometrik biyosensörler:* Bu sistemlerin temelinde enzim redoks merkezi ile elektrot yüzeyi arasında doğrudan bir etkileşim vardır. Bunu da genellikle organik iletken tuzlar sağlar. Söz konusu maddeler, ortam sıcaklığında genellikle metalik özellik gösterdiklerinden organik metaller olarak adlandırılırlar.



Şekil 1.4. Amperometrik biyosensörlerin sınıflandırılması

1.2.2. Biyosensörlerin Performans Kriterleri

1994 yılında, Buck ve Linder, biyosensör cevabının karakterizasyonunun, moleküler tanımlama esaslı tüm biyosensörler için önemli olduğunu bildirmişlerdir. Hız sınırlayıcı basamakların doğası (taşıma ve tepkime) ve matris içinde bulunan biyosensörün optimizasyonunun belirlenmesinde de bu uygulama önemli bir yere sahiptir. Bir elektrokimyasal biyosensör dünüştürücüsü ve reseptörü ile ilişkisinin yorumlanması ve performans kriterlerinin belirlenmesi faydalı olacaktır. Performans kriterleri biyosensörlere özgü bir özellik değildir, hatta analitik yöntemlerin çoğu için kullanılır. Bu kriterler IUPAC tarafından şu şekilde tanımlanmıştır.

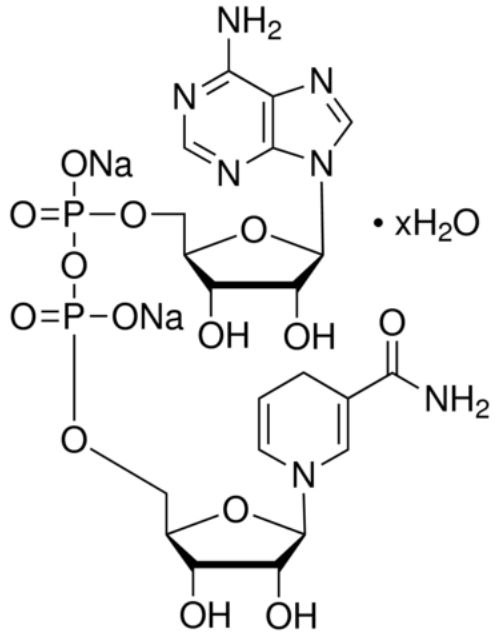
- Duyarlılık
- Doğruluk
- Laboratuarlar arası ve farklı kullanıcılar arası tekrarlanabilirlik (Thevenot vd, 2001)

Fakat bu kriterler, biyosensörlerin hızlı değişim ve çeşitlilik özelliklerinden dolayı zorlaşmaktadır. Bu protokoller genel kullanım için önerilmekte ve birçok farklı parametreyi içermektedir. Bu parametreler şöyledir (Thevenotvd, 2001) :

- Kalibrasyon karakteristikleri: Duyarlılık, çalışma ve doğrusal derişim aralığı, gözlenebilme ve nicel tayin sınırları
- Seçicilik ve güvenilirlik
- Durgun hal ve geçiş cevap zamanları, numune miktarı
- Tekrarlanabilirlik, kararlılık ve biyosensör ömrü

1.3. *Nikotinamid Adenin Dinükleotitin* Genel Özellikleri

Oksidasyon gerçekleşmiş bir substrat molekülü (dehidrojenasyon) iki hidrojen atomunu vererek, nükleotidin okside formu (NAD^+ veya $NADP^+$) bir hidrit iyonu kabul eder ($:H^-$, bir proton ve iki elektrona eş değerdir) ve indirgenmiş formuna (NADH veya NADPH) dönüşmektedir.

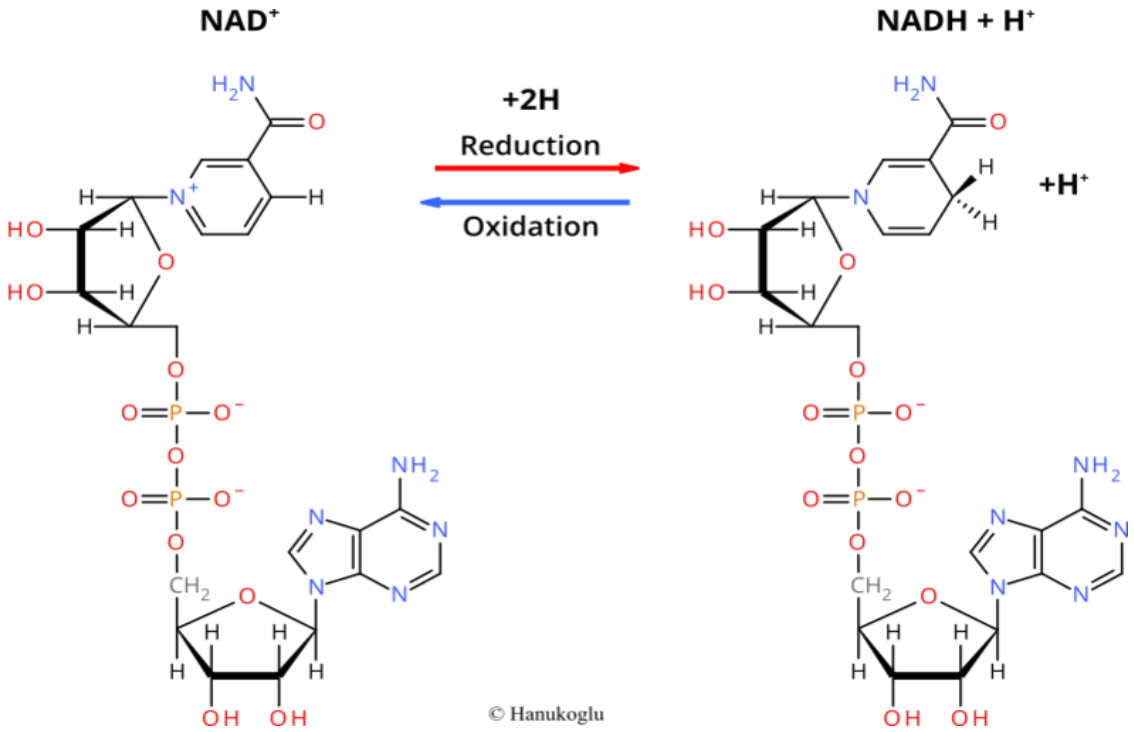


Şekil 1.5. NADH'nin kimyasal yapısı (Kumar ve Chen, 2008)

Nikotinamid adenin dinükleotitin indirgenmiş formu (NADH), insan vücudunda bulunan en önemli koenzimdir. NADH'nin kimyasal yapısı Şekil 1.5'de verilmiştir. Besinler tüketildikten sonra, sindirim prosesi boyunca her canlı hücrede NADH doğal olarak oluşmaktadır. NADH, adenozin trifosfat (ATP) molekülünün oluşması için

ATP'ye bağlanmaktadır. ATP, kimyasal yapısında enerji depolanmasından sorumludur. Koenzim olarak NADH, beyin fonsiyonlarının uyarılması, immün sistem için enerji desteği sağlanması ve DNA sisteminin onarılması gibi birçok metabolik reaksiyonlarda yer almaktadır (Birkmayer, 1993). Bu sistemler, ATP molekülünün sabit desteğini gerektirir. NADH, dopamin, noradrenalin ve seratonin gibi nörotransmitterlerin hücresel üretimini de uyarır (Stein, 2012).Vücutta NADH'deki eksiklik ATP üretiminin yoksunluğu nedeniyle, hücresel seviyede bir enerji açıklığına neden olur. Örneğin, insan hücrelerinde üretilen enerjinin üçte biri beyin tarafından tüketilir. Eğer beyinde bulunan ATP miktarı azalırsa, dikkat eksikliği, mental uyanıklık, uzayan reaksiyon zamanı ve Alzheimer bunaması gibi kötü etkilere yol açar. Amerika'da yürütülen bir çalışmada, depresyon, aşırı yorgunluk ve kas ağrısı gibi kronik tükenmişlik sendromu (CFS) hastalarının kas dokularında düşük seviyede ATP olduğu bildirilmiştir (Birkmayer, 1993; Castro-Marrero vd., 2014). Hücrelerde NADH'nin fazlası ise bulantı, endişe, yorgunluk ve enerji fazlalığı nedeniyle aşırı uyarılma gibi kötü yan etkilere neden olmaktadır (Shalian, 2014). Bu yüzden, NADH miktarının tayini için yüksek kesinlik ve seçicilikte sensörlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir. NADH'nin tayini için birçok biyosensör geliştirilmiştir. Ancak, NADH'nin doğrudan yükseltgenmesi, yalın elektrotlarda oldukça yüksek aşırı potansiyel gerektirmektedir (>1V). NADH'nin yüksek potansiyeldeki elektroyükseltgenmesi, NAD^+'nın enzimatik olarak inaktif tersinmez formlarının oluşmasına, bu ürünlerin adsorpsiyonu nedeniyle elektrot yüzeyinin kontaminasyonuna (fouling) ve gerçek örneklerde girişim yapan zemin akımına neden olmaktadır. Bu oluşumlar elektrodun duyarlık ve seçiciliğinin azalmasına ve kararsız analitiksel sinyallere neden olmaktadır. Katekolamin, askorbik asit ve ürik asit gibi çoğu elektroaktif biyomolekül de, NADH'nin yükseltgenme potansiyeline yakın bir potansiyelde yükseltgenmekte ve NADH tayinlerinde girişim yapmaktadır (Kumar ve Chen, 2008; Gorton ve Dominguez, 2002). Bu nedenle karbon bazlı elektrotlarda NADH'nin amperometrik tayini için yükseltgenme potansiyelinin düşürülmesi gerekmektedir. Bu problemi çözmek için, uygun bir medyatör, iletken ve redoks polimerleri, ve nanomateryaller ile modifiye edilmiş elektrotlar kullanılmaktadır (Bilgi ve Ayrancı, 2016; Şahin ve Ayrancı, 2015; Gao vd., 2003; Meng vd., 2008).

NAD^+/NADH'nin genel olarak uygulanan formal potansiyel değeri -0,56 V'dur (vs SCE, pH 7,0, Clark 1960). Şekil 1.6'da NADH'nin yükseltgenme tepkimesi ile birlikte redoks dönüşümleri gösterilmiştir. (Katakis ve Dominguez 1997). NADH'nin direk yükseltgenmesi, sade elektrotlarda (örneğin; Au, camsı karbon elektrot vs) olabildiğince yüksek potansiyel gerektirmektedir (>1V) (Kumar ve Chen 2008). Örneğin, NADH'nin yükseltgenmesi pH 7'de karbon elektrot için yaklaşık 1,1 V (Moiroux ve Elving 1978), platin elektrot için ise 1,3 V gibi bir (Jaegfeldt,1980) yüksek potansiyele ihtiyaç duyulmaktadır. NADH'nin yükseltgenmesine yakın potansiyel değerinde, katekolamin, askorbik asit ve ürik asit gibi çoğu elektroaktif biyomolekül de yükseltgenmektedir.



Şekil 1.6. NADH'nin İndirgenme-Yükseltgenme Reaksiyonları ve Redoks Dönüşümleri (http://proteopedia.org/wiki/)

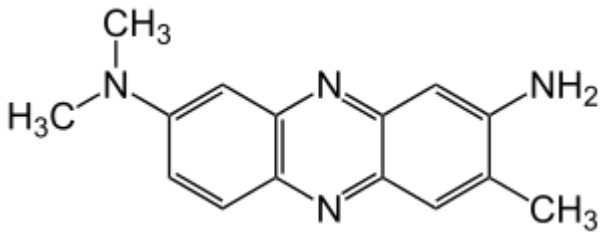
1.4. Hidrojen Peroksitin Yapısı ve Genel Özellikleri

Hidrojen peroksit (H_2O_2), oksidaz enzimleri ile katalizlenen reaksiyonlarda üretilen elektroaktif türlerden biridir. Oksidaz temelli elektrokimyasal biyosensörlerin çoğunda, analitin miktarı ile orantılı olarak üretilen H_2O_2'in konsantrasyonunun takibi temel

alınmaktadır. Bu nedenle, H_2O_2'nin hızlı ve yüksek doğrulukta tayini, ilaç, klinik, endüstriyel ve çevre analizlerinde oldukça önemlidir (Chen ve., 2012). H_2O_2'nin tayini için titrimetri, fotometri, kemilüminesans, yüksek perfromanslı sıvı kromatografisi ve elektrokimyasal metotlar kullanılmaktadır (Vogel, 1987; Armstrong ve Lanon, 1987; Darder vd., 1999; Xu ve Dong, 1999). Farklı analitik metotlar arasında elektrokimyasal (biyo)sensörler, yüksek duyarlık ve seçicilikleri, hızlı cevap alınması, pratikliği, düşük maliyeti ve düşük hacimde numune gerektirmesi gibi avantajları ile önemli derecede ilgi çekicidir (Ensafi vd., 2013). Elektrokimyasal yöntemlerle H_2O_2'nin tayini, yaygın elektrotların yüzeyinde H_2O_2'nin doğrudan yükseltgenmesinin veya indirgenmesinin temeline dayanır. Fakat, yaygın elektrotlar kullanılarak yapılan H_2O_2 tayininde, yavaş elektrokimyasal kinetik ve yüksek aşırı gerilim problemleri bulunmaktadır (He vd., 2010; Huang vd., 2008). Bu problemleri çözmek için, uygun bir medyatör, iletken ve redoks polimerleri, geçiş metalleri, metal oksitleri, metal porfirinleri, metal ftalosiyaninler ve nanomateryaller ile modifiye edilmiş elektrotlar kullanılmaktadır (Chen vd., 2012; Chen vd., 2013; Baghayeri vd., 2013; Baghayeri vd., 2014; Baghayeri vd., 2015).

1.5. Nötral Kırmızı Hakkında Genel Bilgi

Nötral kırmızı (NR), virüsler gibi biyolojik materyalleri incelemek için bir renklendirici, biyokimyasal sistemlerde pH indikatörü, optik veya elektrokimyasal metotlar kullanarak DNA'nın incelenmesi gibi çeşitli amaçlarla kullanılan bir fenazin boyasıdır (Şekil 1.7) (Pauliukaite ve Brett, 2008). NR, diğer fenazin boyaları gibi elektrokimyasal olarak polimerleştirilerek iletken bir polimer oluşturabilir. Son zamanlarda poli(nötral kırmızı) (PNR), sensor ve biyosensörlerde hem iletken polimer hem de redoks medyatörü olarak kullanılan bir polimerdir (Bilgi ve Ayrancı, 2016; Pauliukaite ve Brett, 2008; Şahin 2013; Sahin ve Ayrancı, 2015). PNR, NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı elektrokimyasal tayininde daha önce kullanılmamıştır.



Şekil 1.7. Nötral Kırmızı'nın kimyasal yapısı

NR, diğer fenazin boyaları gibi elektrokimyasal olarak polimerleştirilerek iletken bir polimer oluşturabilir. Son zamanlarda poli(nötral kırmızı) (PNR), sensor ve biyosensörlerde hem iletken polimer hem de redoks medyatörü olarak kullanılan bir polimerdir (Pauliukaite ve Brett 2008). NR'nin elektrokimyasal polimerizasyonu ile ilgili ilk çalışma Nikolskii vd tarafından 1970 yılında yapılmıştır. Bu araştırmalar pH 0,5 ile 11,5 arasındaki bölgede nötral kırmızı-leuko-nötral kırmızı sisteminin yükseltgenme potansiyelinin pH'ya olan bağlılığını bildirmişlerdir. Elde edilen eğim verilerine göre dört doğrusal aralık vardır:

$0{,}5 \leq pH \leq 4{,}3$ — 110 mV pH^{-1} (1)

$4{,}3 \leq pH \leq 6{,}1$ — 74 mV pH^{-1} (2)

$6{,}1 \leq pH \leq 7{,}3$ — 37 mV pH^{-1} (3)

$7{,}3 \leq pH \leq 11{,}5$ — 74 mV pH^{-1} (4)

1, 2 ve 3'üncü bölgelerin eğimleri sırasıyla NR'nin toplam derişimin artmasıyla azalır. Yazarlar bu kaymayı nötral kırmızı katyonunun (NR'nin tek protonlu formu) dimerizasyonu ve tetramerizasyonu olarak yorumlamışlardır. Daha önceki çalışmalarında yaptıkları hesaplamalardan yola çıkarak Nikolskii vd aşağıdaki dengeleri önermişlerdir:

$$NRH^+ + H^+ + 2e^- \Leftrightarrow NRH_2 \quad (1.1)$$

$$NRH^+ \Leftrightarrow NR + H^+ \quad (1.2)$$

$$NRH_3^+ \Leftrightarrow NRH_2 + H^+ \quad (1.3)$$

$$NRH_4^{+2}\ NRH_3^+ + H^+ \quad (1.4)$$

Bu tepkimelerde NR nötral kırmızıyı, NRH_2 leuko-nötral kırmızı molekülünü göstermektedir. Deprotonlama tepkimelerinin pKa değerleri tepkime (1.2) için 6,7, tepkime (1.3) için 6,3, tepkime (1.4) için ise 4,4 olarak bulunmuştur.

NR ve leuko-NR'nin protonlanmasıyla ilgili bilgilerin bir kombinasyonuyla farklı pH bölgelerinde NR'nin indirgenmesi için aşağıdaki tepkimeler elde edilmiştir (Halliday ve Matthews 1983):

$0,5 \leq pH \leq 4,4$ $\quad NRH^+ + 3H^+ + 2e^- \Leftrightarrow NRH_4^{+2}$ (1.5)

$4,4 \leq pH \leq 6,3$ $\quad NRH^+ + 2H^+ + 2e^- \Leftrightarrow NRH^{3+}$ (1.6)

$6,3 \leq pH \leq 6,7$ $\quad NRH^+ + H^+ + 2e^- \Leftrightarrow NRH_2$ (1.7)

$6,7 \leq pH \leq 11,5$ $\quad NR + 2H^+ + 2e^- \Leftrightarrow NRH_2$ (1.8)

Tepkimeler (1.5), (1.6.), ve (1.7) NR'nın katyonlarını içerirken, tepkimeler (1.8) nötral NR molekülünü içermektedir. pH 0,5 ile 11,5 aralığı deneysel bilgilerin sınırlamaları için önemlidir.

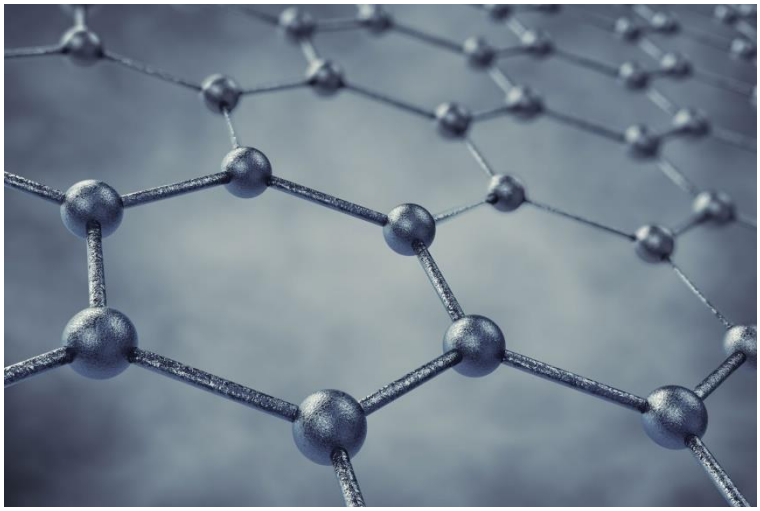
1.6. Grafenin Yapısı ve Özellikleri

Son zamanlarda grafen ve yapısı hakkında çok fazla çalışma yapılmıştır. Grafen ve grafenin optik elektronik özellikleri çoğu uygulamalarda yer almıştır. Grafenin bir atom kalınlığında olması ilk olarak 2004 yılında Geim ve Novaselov tarafından grafene olan ilginin çoğalmasına neden olmuştur. 2 boyutlu olması ve yüksek kristolografik kalite ve uygun şartlarda kararlı özellik göstermesi çoğu teknolojik uygulamalar açısından grafeni tercih edilir kılmıştır. (Farghali et al. 2013).

Karbonun bir bileşiği olan grafen farklı farklı amaçlar ile kullanılmaktadır. Elmastan sert olmasına karşın esnek özelliğe de sahiptir. Hafif bir yapıya sahiptir. Karbon gibi grafen oksit bileşiğinin yapısı da biyo uyumlu bir bileşiktir. (Chang et al. 2011). Grafen sp^2 hibrit yapısına sahiptir fakat poliaromatik hidrokarbon olmadığı bilinmektedir. (Wu et al. 2007). Novaselov ve arkadaşları 2004 yılında grafeni tek tabaka şeklinde sentezlemişler ve grafenin fiziksel ve elektronik özelliklerinin varlığını keşfetmişlerdir.

Bu altı yıllık çalışmalarından ötürü 2010 yılında grafen için yaptıkları çalışmalarıyla Andre Geim ve Konstantine Novaselov grafenin tanınması, izolasyonu, üretimi ve karakterizasyonundan Nobel fizik ödüllerini almışlardır.

Grafenin sensör teknolojisinde kullanılması da önemli bir gelişmedir. Andre Geim ve çalışma arkadaşları moleküler hassasiyeti tespit etmede grafen ile azot dioksit moleküllerinin grafen yüzeyine yapışma ve ayrılmasına bağlamıştır. Grafen kullanarak NEMS(Nano Teknoloji Elektromekanik Sistemler) sistemleri yapmak da mümkündür. Cornell Üniversitesinden araştırmacılar grafeni son derece hassas elektromekanik rezonatör yapımında kullanmışlardır.



Şekil 1.8. Grafenin Yapısı

1.6.1. Grafen Sentezi

Grafen son günlerde oldukça ilgiyi üzerine toplayan nanomalzemelerdendir. Kullanım alanları ve sentez yöntemleri sürekli olarak araştırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda istenilen tabaka sayısına bağlı olarak sentez yöntemleri de farklılık göstermektedir. Bu nedenden dolayı elde edilen tabaka sayısı sentez yöntemine göre farklılık göstermektedir. (Rao vd. 2010). Bugüne kadarki grafen hakkındaki çoğu araştırma mikromekanik ayrıştırma, grafit oksitin (GO) kimyasal indirgenmesi, grafitin sıvı faz ayrılması, epitaksiyel büyüme ve GO'in kimyasal ya da termal dağılması gibi

yöntemleri de içeren tek grafen tabakasının üretimi için etkili sentez teknikleri geliştirme üzerine olmuştur. Bahsedilen üretim yöntemleri arasında grafitin oksitleyicilerle tepkimesiyle üretilen GO'in kimyasal ya da termal indirgenmesi en yaygın yöntemlerden biri olarak görülmektedir. Bu yöntem bir veya birden fazla grafen tabakalarının üretilmesinde de başarılıdır.

1.6.1.1.Katman Ayırma Yöntemi

Bu yöntem ile grafen, ilk defa Manchester grubundan Giem ve arkadaşları tarafından sentezlenmiştir. Burada grafen tabakalarının ayrılması, grafit tabakasını bir zemin üzerinde kaydırarak gerçekleştirilir. (Novaselov vd. 2004). Bu yöntem ile 100 mikrometredeki grafen parçacıkları sentezlenebilmektedir. Günümüzde de yüksek verimlilikte grafen üretmek için kullanılan en popüler tekniktir. Bu yöntemdeki yapıştırıcı içerikten dolayı grafen kısmen kirlilik içerebilmektedir. Mikromekanik ayrıştırmada başlangıçta yüksek kaliteli tek kristal grafit kaynağı kullanılırsa elde edilen grafenin elektriksel ve yapısal kalitesi en yüksek olmaktadır.

1.6.1.2.Epitaksiyel Büyüme Yöntemi

Tek kristal SiC (Silüsyum Karbür)'ün grafitlenmesi ve metal alttaşlar üzerinde büyütülmesi olarak açıklanmıştır. Grafenin katı alttaş yüzeyinde doğrudan büyümesi 1970'lerde bilinmekteydi ve bununla birlikte iki farklı mekanizma ile gerçekleşebileceği öngörülmüştü. Bunlardan birincisi karbidlerin ısı ile dekompozisyonu diğeri ise kimyasal buhar depozisyonuyla hidrokarbonların metalik veya metal karbid alttaş yüzeyinde grafenin epitaksiyel büyümesidir. Vakum altında yaklaşık 1300°C değerinde silisyum karbid ısı ile etkileştiğinde silisyum atomlarının süblimleşmesiyle yüzeyde karbon ile zengin bölgeler kalır ve uygun yüksek sıcaklıklarda bu bölgelerin yeniden düzeltilmesi ile grafitlenme meydana gelir.

1.6.1.3.Kimyasal Buhar Biriktirme Yöntemi (Silisyum Karbür-Karbon, CVD)

Bu yöntem büyük boyutta grafen eldesi için kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. Grafen genellikle Cu (Bakır), Ru (Rutenyum), Ir (İridyum) ve Ni (Nikel) gibi metaller üzerinde bu yöntem ile büyütülebilmektedir. Bu yöntemle tek tabaka halindeki grafit veya grafen çoğu metal yüzeyler üzerinde büyütülebilmektedir. Ancak çoğu uygulama grafenin bir yalıtkan üzerinde bulunması ve eğer grafen bir metal yüzeyinde büyütülürse uygun alttaşa transfer olmasını gerektirir. CVD yönteminde en çok kullanılan metal alttaş Cu (Bakır)'dır. Bakır aşındırılması kolay, ucuz ve grafen ile etkileşiminin kimyasal değil sadece fiziksel düzeyde olduğu bir metaldir.

1.6.1.4.Kimyasal Ayrıştırma Yöntemi (Liquid-Phase Exfoliation-Sıvı Fazdan Ayırma Yöntemi)

Bu teknik grafenin büyük miktarlarda üretilebilmesi için en etkili yöntemdir. Grafit tabakalarının boşluğuna sitrik asit gibi kimyasal maddeler eklenerek grafitin oksitlenme ile tabakalarına ayrıştırılması gerçekleştirilebilmektedir. Bu noktada elde edilen malzeme grafen oksit olduğu bilinmekte ve yapısındaki oksitlerden ötürü dielektrik özellik göstermektedir. Oksitlerin yapıdan uzaklaştırılması ile bu maddeye iletkenlik özellik tekrar kazandırılabilmektedir. Bunun için termal veya kimyasal gibi farklı teknikler kullanılarak indirgenme işlemi uygulanır. Grafen oksit; Brodie'nin nitrik asit ve potasyum nitrat karışımıyla grafit tozunu etkileştirdiği 1860'dan beri bilinmektedir. 1898'de, Staudenmaier reaksiyon üzerinde biraz değişiklikler yapmış, klorat ekleme ve konsantre sülfürik asit yerine nitrik asit buharı kullanarak bu yöntemi geliştirmiştir. Prosesteki bu küçük değişiklik özellikle daha pratik ve tek bir reaksiyonda çoğunlukla oksitlenmiş GO'in üretimini sağlamıştır. 1958'de Hummer bugün de yaygın olarak kullanılan metodu bulmuştur. Sonuç olarak tek ve çoklu tabakalı ve iletken grafen elde edilir. Ancak elde edilen grafenlerin boyutları diğer metotlar ile karşılaştırıldığında küçük kalmaktadır.

1.6.2. Grafen Oksit

Grafen üretiminde kaydırma yöntemi, epitaksiyel büyütme yöntemi, silisyum karbon yöntemi ve kimyasal indirgeme yöntemi en yaygın kullanılan yöntemler arasında sıralanabilmektedir. (Park, S.vd.). Grafenin daha ucuz ve basit olarak sentezi kimyasal indirgeme yöntemiyle sağlanabilmektedir (Ersoy M.S.vd.). Bu yöntemde grafitin kimyasal yükseltgenme işlemiyle oluşan ve hidroksil (-OH), epoksi (-COC), karbonil (-C=O), karboksil (-COOH) gibi fonksiyonel grupları yapısında bulunduran bileşiklere grafen oksit (GO) denilmektedir. Bu fonksiyonel gruplar sayesinde GO hidrofilik bir yapı halini almaktadır (Hsiao, M.C.vd.)

Bu yapıların, elektronik uygulamalarda kullanımının kısıtlanmasının nedeni ise GO'nun iletkenliğini düşürmesidir. GO'daki fonksiyonel grupların indirgenme işlemi ile uzaklaştırılarak indirgenmiş grafen oksit (RGO) yapısına dönüştürülmesi gerekmektedir. Hidrazin hidrat ve sodyum borhidrür gibi kimyasallar indirgenme işlemi için başlıca kullanılan indirgeyicilerdir (Pei, S.vd.).

1.6.3. İndirgenmiş Grafen Oksit

Grafen tabakaları, yüksek yüzey alanı, fark edilebilir mekanik direnci ve mükemmel iletkenliği ile ultra hassas sensör ve biyosensörlerin hazırlanmasında kullanılmaktadır (Cai vd. (2012)). Grafen oksit ve indirgenmiş grafen oksitin, kolay sentezlenebilmesi, suda iyi çözünebilmesi, biyo uyumluluğu ve yüksek yüzey alanı nedeniyle biyosensör üretimi, hücresel görüntüleme ve ilaç salınımı gibi alanlarda potansiyel uygulamaları vardır (Liu vd., 2010; Shan vd., 2009; Wang vd., 2009). Grafen oksitin kimyasal olarak indirgenmesi ile indirgenmiş grafen oksit (RGO) hazırlanır. İndirgenmiş grafen oksitin yüzeyinde –COOH, -OH ve $–NH_2$ grupları bulunmaktadır (Mao vd., 2012). Grafen ve grafen oksit ile birlikte RGO da, sensör ve biyosensörlerde elektronik iletkenliği artırmak için ve biyomateryalin immobilizasyonu için kullanılmaktadır (Jia vd., 2014; Li vd., 2016). RGO, NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı elektrokimyasal tayininde daha önce kullanılmamıştır.

1.7. Kaynak Özetleri

Enzim temelli biyosensörlerin geliştirilmesinde büyük oranda, dehidrojenaz veya oksidaz enzimleri kullanılmaktadır. Dehidrojenaz temelli biyosensörlerde analit konsantrasyonu ile orantılı olarak üretilen elektroaktif tür NADH koenzimidir. Oksidaz temelli biyosensörlerde analit konsantrasyonu ile orantılı olarak üretilen elektroaktif tür ise H_2O_2'dir. Bu nedenle dehidrojenaz ve oksidaz temelli biyosensörlerin geliştirilmesinde NADH ve H_2O_2'nin etkili bir şekilde amperometrik tayini oldukça önemlidir (Gorton, 1986). Wang vd. (2001), yüzey baskılı elektrotları glukoz oksidaz ve glukoz dehidrojenaz enzimleri ile modifiye ederek geliştirdikleri iki enzim sistemli glukoz biyosensörüyle, glukoz tayinini tayinini daha düşük maliyetle ve tek kullanımlık olarak gerçekleştirmişlerdir. Hem NADH hem de H_2O_2'i içeren biyolojik proseslerle ilgili bazı çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar; H_2O_2 tarafından katalizlenen NADH'nin yükseltgenmesini (Hogg ve Jago, 1970), ampleks kırmızı ile H_2O_2 tayini üzerine NADH'nin girişim etkisini (Votyakova ve Reynolds, 2004), O_2'yi H_2O_2'ye indirgeyen NADH-oksidaz varlığında NADH'nin yükseltgenmesini (Jiang ve Bommarius, 2004; Radoi ve., 2007) içermektedir. NADH'nin yükseltgenmesinin ve H_2O_2'nin indirgenmesinin eş zamanlı tayini, hem oksidaz hem de dehidrojenaz temelli ikili biyosensörlerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır (Baskar vd., 2012). NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı tayini için preanodized yüzey baskılı elektrotların politiyoninin modifiye edilmesi ile bifonksiyonel sensör geliştirilmiştir (Baskar vd., 2012). Lin vd., (2013) poliksantürenik asit, flavin adenin dinükleotit ve fonksiyonalize çok duvarlı karbon nanotüp ile modifiye edilmiş camsı karbon elektrotları kullanarak NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı elektrokimyasal tayinini gerçekleştirmişlerdir. Ensafi vd. (2016) NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı amperometrik tayini için, exfoliated grafen oksitin üzerini kobalt ferrit ile dekore etmişlerdir. Literatürde NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı elektrokimyasal tayinine yönelik başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu konuda literatür boşluğu bulunmaktadır.

Önerdiğimiz çalışmada indirgenmiş grafen oksit modifiyeli ikili yüzey baskılı elektrotlar (RGO-SPCE), PNR ve AuNP ile modifiye edilerek RGO-SPCE/PNR/AuNP elektrotları hazırlanacak ve NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı elektrokimyasal tayininde

kullanılacaktır. Bu amaçla ilk olarak, nötral kırmızı elektropolimerizasyon yöntemiyle polimerleştirilerek indirgenmiş grafen oksit modifiyeli yüzey baskılı elektrotlar (RGO-YBE) üzerine modifiye edilecek ve RGO-SPCE/PNR elektrotları hazırlanmış olacaktır. RGO-SPCE/PNR elektrotlarının yüzeyi layer-by-layer (LBL) yöntemi ile AuNP ile modifiye edilerek RGO-SPCE/PNR/AuNP elektrotları hazırlanacaktır. RGO-YBE/PNR/AuNP elektrotları NADH ve H_2O_2'nin ayrı ayrı tayininde kullanılarak optimum çalışma koşulları (optimum pH, optimum çalışma potansiyeli, doğrusal çalışma aralığı) belirlenecektir. RGO-SPCE/PNR/AuNP elektrotları kullanılarak optimum çalışma şartlarında NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı elektrokimyasal tayini yapılacaktır. Literatürde, NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı elektrokimyasal tayininde RGO-SPCE elektrotlarının, PNR ve AuNP'nin, kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma, NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı elektrokimyasal tayinine yönelik literatür boşluğunu dolduracaktır. NADH'nin yükseltgenmesinin ve H_2O_2'nin indirgenmesinin eş zamanlı tayini, hem oksidaz hem de dehidrojenaz temelli ikili biyosensörlerin geliştirilmesine de yardımcı olacaktır. Tek kullanımlık ve düşük maliyetli yüzey baskılı elektrotlardan yola çıkarak hazırlanacak biyosensörler, kullanım pratikliği avantajına da sahip olacaktır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan kimyasallar

İndirgenmiş grafen oksit (RGO), hidrojen peroksit (H_2O_2), nötral kırmızı (NR), kolloidal altın nanoparçacık çözeltisi (10 nm), indirgenmiş nikotin amid adenin dinükleotitin sodyum tuzu (NADH), dopamin hidroklorür (DA), L-askorbik asit (AA) ve ürik asit (UA) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), potasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4), potasyum klorür (KCl), dimetil formamid (DMF), hidroklorik asit (HCl, % 37'lik), sodyum hidroksit (NaOH) ve potasyum nitrat (KNO_3) Merck firmasından temin edilmiştir. Kullanılan tüm kimyasallar yüksek analitik saflıktadır.

2.1.2. Kullanılan cihazlar

Elektrokimyasal ölçümler Dropsens µStat 400 Bipotentiyostat/Galvanostat ile gerçekleştirilmiştir. İstenilen pH'da tampon çözelti hazırlamak için, standart tampon çözeltilerle kalibre edilmiş Mettler Toledo pH-metre kullanılmıştır. Batch şartlarda amperometrik tayin sırasında çözeltiyi istenilen hızda karıştırmak için manyetik karıştırıcı kullanılmıştır. Katı kimyasalların tartımı için Precia XR 2055M-DR 0,01 mg duyarlı elektronik terazi kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan ultra saf su Millipore Milli-Q Direct Q-3 ultra saf su cihazından elde edilmiştir. SPCE elektrotlarının SEM görüntüleri JEOL SEM-7100-EDX cihazı ile ÇOBİLTUM tarafından yapılmıştır.

2.1.2.1.Elektrokimyasal ölçüm sistemi

Deneylerde voltametri, kronoamperometri gibi çeşitli elektrokimyasal metotların çalışılabildiği Dropsens µStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat elektrokimyasal ölçüm

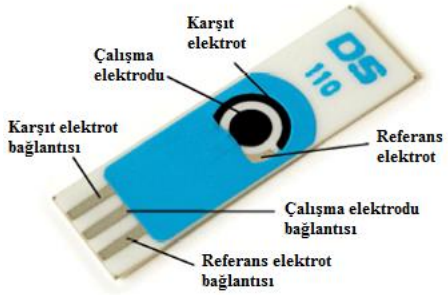
sistemi kullanılmıştır (Şekil 2.1). Bilgisayar kontrollü olan Dropsens µStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat cihazının sinyalleri DropView 8400 yazılımı ile değerlendirilmiştir.



Şekil 2.1. Dropsens µStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat

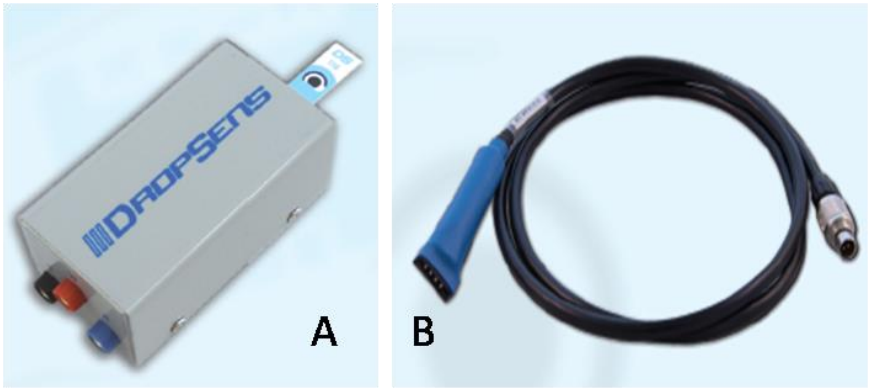
2.1.3. Kullanılan elektrotlar, hücreler ve konnektörler

DropSens firmasından temin edilmiş tek kullanımlık yüzey baskılı karbon elektrotlar ve yüzey baskılı ikili karbon elektrotlar kullanılmıştır. Yüzey baskılı karbon elektrodu (SPCE) çalışma elektrodu (4 mm) ve yardımcı elektrodu karbondan, referans elektrodu ise pseudo Ag/AgCl (0,1 M KCl)'dan oluşmaktadır. Yüzey baskılı ikili karbon elektrodunun (SPCDE), çalışma elektrodu (2 mm) ve yardımcı elektrodu karbondan, referans elektrodu ise pseudo Ag/AgCl (0,1 M KCl)'dan oluşmaktadır. Yüzey baskılı elektrotların yapısı Şekil 2.2'te verilmiştir.



Şekil 2.2. Yüzey baskılı karbon ve yüzey baskılı ikili karbon elektrotların yapısı

Elektrotların Dropsens µStat 400 Bipotentiostat/Galvanostata bağlantısı DropSens'ten temin edilmiş konnektörler ile sağlanmıştır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Yüzey baskılı elektrotlar için sensör konnektör çeşitleri A) Damlamalı analizler için kutu şeklinde B) Kesikli analiz için kablo şeklinde

Elektrokimyasal ölçümlerde, kesikli analiz için metil metakrilattan yapılmış elektrokimyasal hücre kullanılmıştır (Şekil 2.4). Elektrokimyasal hücre 5-8 mL gibi büyük hacimli çözeltiler ve karıştırma şartları için uygundur.



Şekil 2.4. Yüzey baskılı elektrotlar için elektrokimyasal hücre

2.2. Metot

2.2.1. Elektrot yüzeyinin temizlenmesi ve aktivasyonu

SPCE elektrotlarının yüzeylerinin temizlenmesi ve aktivasyonu için 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde + 1,8V'da 300 s boyunca potansiyel uygulanarak elektrokimyasal ön işlem uygulanmıştır (Bilgi ve Ayranci, 2016; Sahin, 2013; Sahin ve Ayranci, 2015).

2.2.2. Destek elektrolit tampon çözeltisinin hazırlanması

Deneylerde destek elektrolit olarak 0,1 M KCl içinde, KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 kullanılarak hazırlanan 50 mM fosfat tamponu kullanılmıştır. Destek elektrolit hazırlanırken üzerine 1 M NaOH veya 1 M HCl ilave edilerek pH ayarlaması yapılmıştır. Deneylerde kullanılan tüm çözeltiler fosfat tampon sistemi içerisinde hazırlanmıştır.

2.2.3. SPCE'lerin RGO ile modifikasyonu

RGO'nun SPCE yüzeyine modifikasyonu için Layer by layer (LBL) yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla 0,5 mg RGO ve 1mL DMF:H_2O (1:1) karışımına 3 saatlik sonikatör uygulamasıyla kararlı ve homojen bir süspansiyon hazırlanmıştır. Disperse edilmiş RGO'dan SPCE'lerin çalışma elektrodunun (WE) yüzeyine 1 µL damlatılmış ve karanlıkta kapalı ortamda oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır (Bilgi ve Ayranci, 2016; Sahin, 2013; Sahin ve Ayranci, 2015). Daha sonra ultra saf su ile elektrotların yüzeyi temizlenmiş ve yüksek saflıktaki Ar gazı ile kurutulmuştur. RGO ile modifiye edilen SPCE ve SPCDE'ler sırasıyla SPCE/RGO ve SPCDE/RGO şeklinde kısaltılmıştır.

2.2.4. SPCE/RGO üzerinde PNR'nin hazırlanması

0,1 M KNO_3 içeren 0,025 M pH 5,5 fosfat tamponu içerisinde 1,0 mM monomer nötral kırmızı çözeltisi hazırlanmıştır. Döngüsel voltammetri uygulanarak SPCE/RGO üzerinde nötral kırmızının elektropolimerizasyonu, dolayısıyla da PNR oluşumu sağlanmıştır. Döngüsel voltammetri, -1,1 V ile + 0,9 V potansiyel aralığında 50 $mV.s^{-1}$ tarama hızında 15 döngü uygulanarak gerçekleştirilmiştir (Barsan ve Brett 2008; Bilgi ve Ayranci, 2016; Sahin, 2013; Sahin ve Ayranci, 2015). Daha sonra ultra saf su ile elektrotların yüzeyi temizlenmiş ve yüksek saflıktaki Ar gazı ile kurutulmuştur. PNR ile modifiye edilen SPCE/RGO ve SPCDE/RGO'lar sırasıyla SPCE/RGO/PNR ve SPCDE/RGO/PNR şeklinde kısaltılmıştır.

2.2.5. SPCE/RGO/PNR'lerin AuNP ile modifikasyonu

SPCE/RGO/PNR'ların WE yüzeyine kolloidal altın nanoparçacık çözeltisinden (AuNP) (10 nm) 4 µL damlatılmıştır. Karanlıkta, kapalı ortamda kuruyuncaya kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir (Serafin vd 2011; Bilgi ve Ayranci, 2016; Sahin, 2013; Sahin ve Ayranci, 2015). Daha sonra ultra saf su ile elektrotların yüzeyi temizlenmiş ve yüksek saflıktaki Ar gazı ile kurutulmuştur. AuNP ile modifiye edilen SPCE/RGO/PNR ve SPCDE/RGO/PNR'ler sırasıyla SPCE/RGO/PNR/AuNP ve SPCDE/RGO/PNR/AuNP şeklinde kısaltılmıştır.

2.2.6. Elektrokimyasal ölçümler

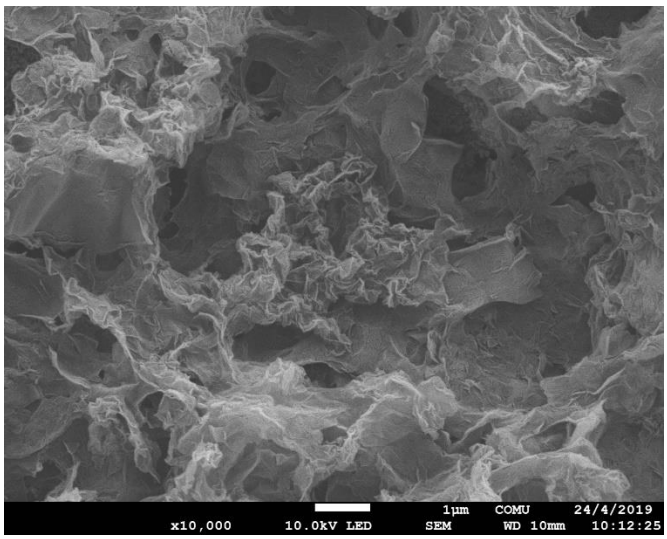
Kesikli analiz 9 mL fosfat tamponu içeren hücre içerisinde yapılmıştır. Kronoamperometrik ölçümler karıştırma şartları altında yapılmıştır. Amperometrik tayinde sabit akım elde edildiğinde analit ilavesi yapılmış ve ölçülen akım potantiostat tarafından kaydedilmiştir. Damlamalı analiz ise, elektrot yüzeyine 50 µL analit ilavesi ile gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

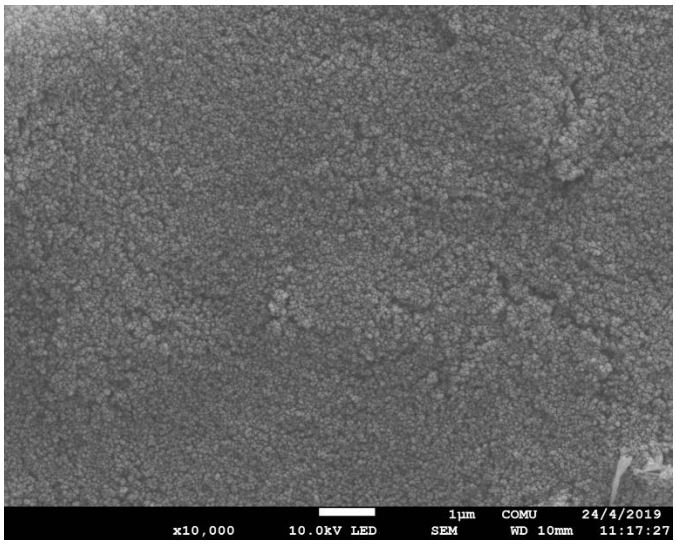
3.1. SPCE'ler üzerine indirgenmiş grafen oksitin modifikasyonu

SPCE'ler üzerine RGO'nun modifikasyonu LBL yöntemi ile yapılmıştır. Hazırlanan RGO/SPCE ve yalın SPCE elektrotlarının SEM görüntüleri alınmış ve sırasıyla Şekil 3.1(A) ve 3.1(B)'de verilmiştir.

A)



B)



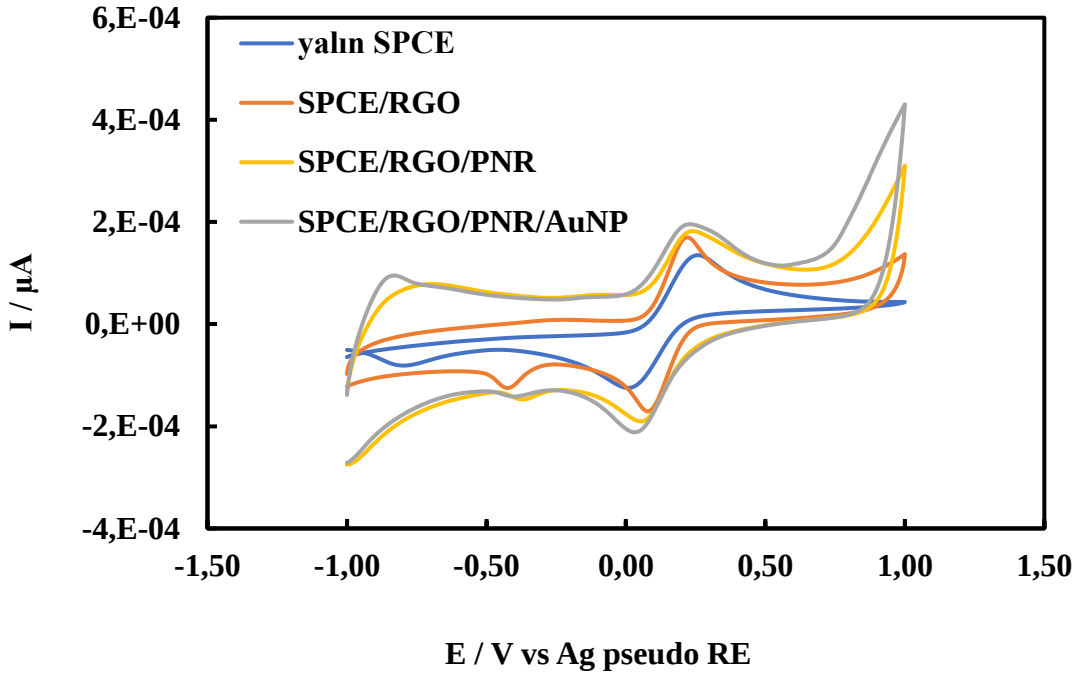
Şekil 3.1. SPCE/RGO (A) ve yalın SPCE (B) elektrotlarının SEM görüntüleri

Şekil 3.1(A)'da RGO'nun katmanlı, buruşuk yüzeyli ve birbirine benzer, rasgele dağılmış ince katmanlar ve dağınık halde üst üste binmiş yapısı gözlenmiştir ve bu görüntüler literatürle uyumludur. (A. Shalaby VD. 2015, Tiyek vd. 2016). Bu sonuçlar, SPCE yüzeyine RGO'nun başarılı bir şekilde modifiye edildiğini açıkça göstermektedir.

3.2. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun elektrokimyasal karakterizasyonu

SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun formülasyonunda yer alan nanomateryaller ve iletken polimerin etkisini incelemek için, SPCE, SPCE/RGO, SPCE/RGO/PNR ve SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrotlarının 5 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (0,1 M KCl içinde) çözeltisinde -1,0 V ile +1,0 V potansiyel aralığı ve 50 $mV.s^{-1}$ tarama hızında döngüsel voltamogramları alınmış ve elde edilen voltamogramlar Şekil 3.2'de verilmiştir. Voltamogramlardan elde edilen anodik pik potansiyelleri (Epa), katodik pik potansiyelleri (Epc), anodik pik akımları (Ipa) ve katodik pik akımları (Ipc) Çizelge 3.1'de verilmiştir. Elektrot formulasyonunda RGO'nun yer alması ile anodik ve katodik pik akımlarının arttığı ve pik potansiyelleri arasındaki farkın daraldığı görülmektedir. RGO, elektronik iletkenliği ve elektrokimyasal reaksiyonun tersinirliğini artırmıştır. SPCE/RGO formulasyonuna PNR'nin girmesi ise, RGO'da olduğu gibi anodik ve katodik pik akımlarını artırmıştır. Elektrot formülasyonunda RGO ve PNR'nin birlikte bulunması, sinerjik bir etki yaratarak, elektronik iletkenliği ve duyarlığı oldukça artırmıştır. Bu sinerjik etki şöyle açıklanabilir. RGO'nun formülasyonda bulunması elektroaktif yüzey alanını ve bunun sonucu olarak da elektronik iletkenliği artırmıştır. RGO'nun sp^2 karbonlarından oluşan hidrofobik yan duvarlarına ve π-konjuge yapılarına sahip olması, PNR'nin aromatik halkasında bulunan π-π konjuge yapıları ile, π-π elektronik ve hidrofobik etkileşim yapmasına neden olmuştur. PNR ve RGO arasındaki bu etkileşim sonucu elektronik iletkenlik, sinerjik bir etkiyle artmıştır. Elektronik iletkenliğin artışıyla da elektron transfer hızı ve faradik cevabı artırmıştır. SPCE/RGO/PNR formulasyonunda AuNP'nin yer alması ile anodik ve katodik pik akımlarının daha da arttığı anlaşılmaktadır. Anodik pik potansiyellerinin negatif yönde, katodik pik potansiyellerinin ise pozitif yönde kaydığı görülmüştür. AuNP'nin göstermiş olduğu etki, RGO ve PNR'ye göre daha az olmasına rağmen, RGO, PNR ve AuNP'nin elektrot formulasyonunda birlikte yer alması sinerjik bir etki göstermiş,

elektrodun elektroaktif yüzey alanını artırarak elektronik iletkenliği ve elektrodun tersinirliğini artırmıştır.



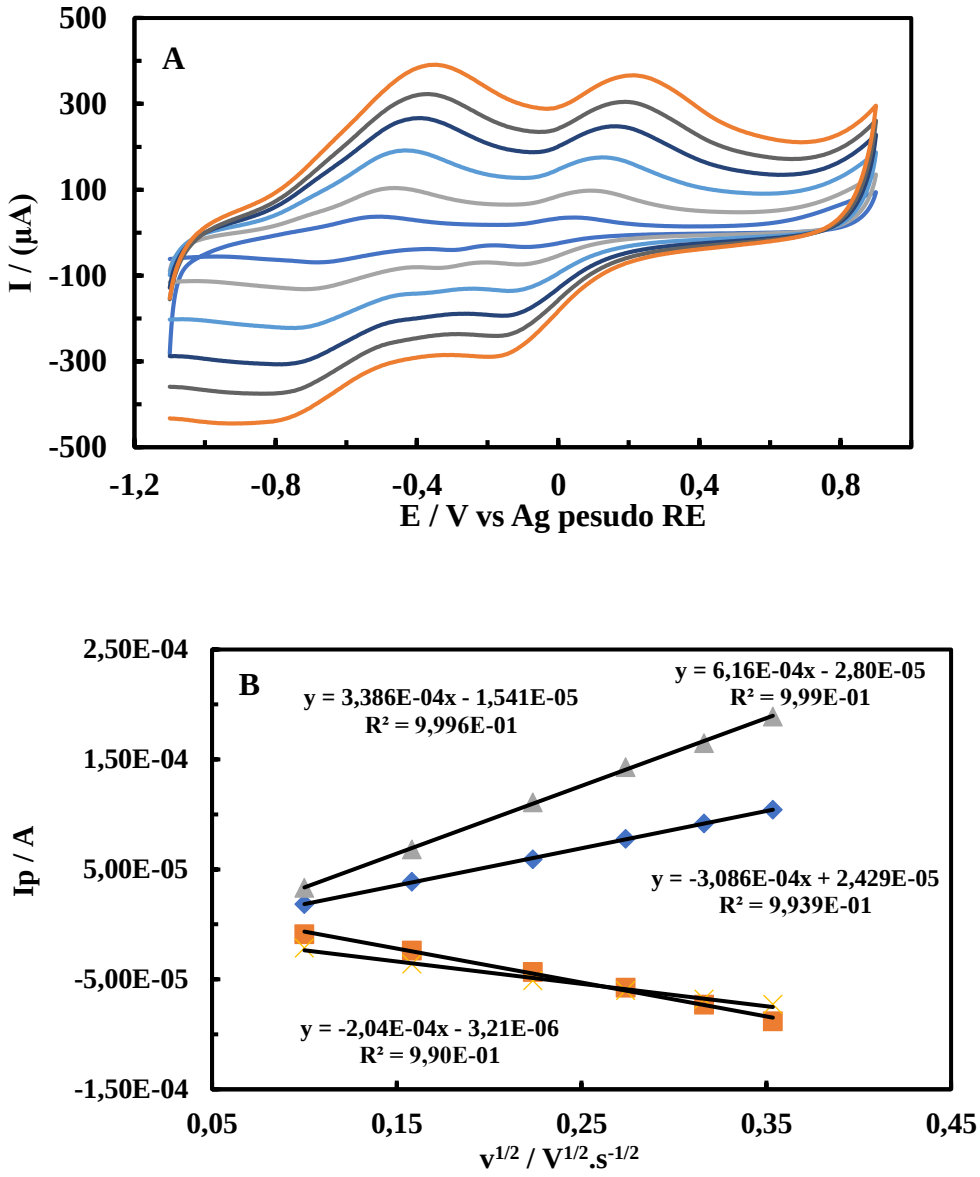
Şekil 3.2. SPCE, SPCE/RGO, SPCE/RGO/PNR ve SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrotlarının 5 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (0,1 M KCl içinde) çözeltisindeki -1,0 V ile +1,0 V potansiyel aralığı ve 50 $mV.s^{-1}$ tarama hızında elde edilen döngüsel voltamogramları

Çizelge 3.1. Şekil 3.2'de verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen Epa ve Ipa değerleri

Elektrot türü	Epa (V)	Ipa (µA)	Epc (V)	Ipc (µA)
SPCE	0,258	135	0,008	-124,8
SPCE/RGO	0,221	169,8	0,078	-170,7
SPCE/RGO/PNR	0,240	182,1	0,054	-190,2
SPCE/RGO/PNR/AuNP	0,230	195,7	0,032	-211,7

SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun elektrokimyasal davranışını daha ayrıntılı incelemek için, tampon çözeltide -1,1 V ile +0,9 V potansiyel aralığında farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltamogramları alınmış ve Şekil 3.3 (A)'da verilmiştir. Tarama hızının karekköküne karşı döngüsel voltamogramlardan elde edilen edilen anodik I, anodik II, katodik I ve katodik II pik akımlarının grafikleri çizilmiş ve Şekil 3.3 (B)'de

verilmiştir. Tarama hızı arttıkça anodik ve katodik pik akımlarının arttığı elde edilen döngüsel voltamogramlardan görülmektedir. Anodik ve katodik pik akımlarındaki bu artışın tarama hızının karekökü ile doğrusal olduğu grafiklerden elde edilen doğruların denkleminden anlaşılmaktadır. Tarama hızının karekökünün anodik ve katodik pik akımları ile daha doğrusal olması, SPCE/RGO/PNR/AuNP'ler üzerinde gerçekleşen elektrokimyasal prosesin difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir.



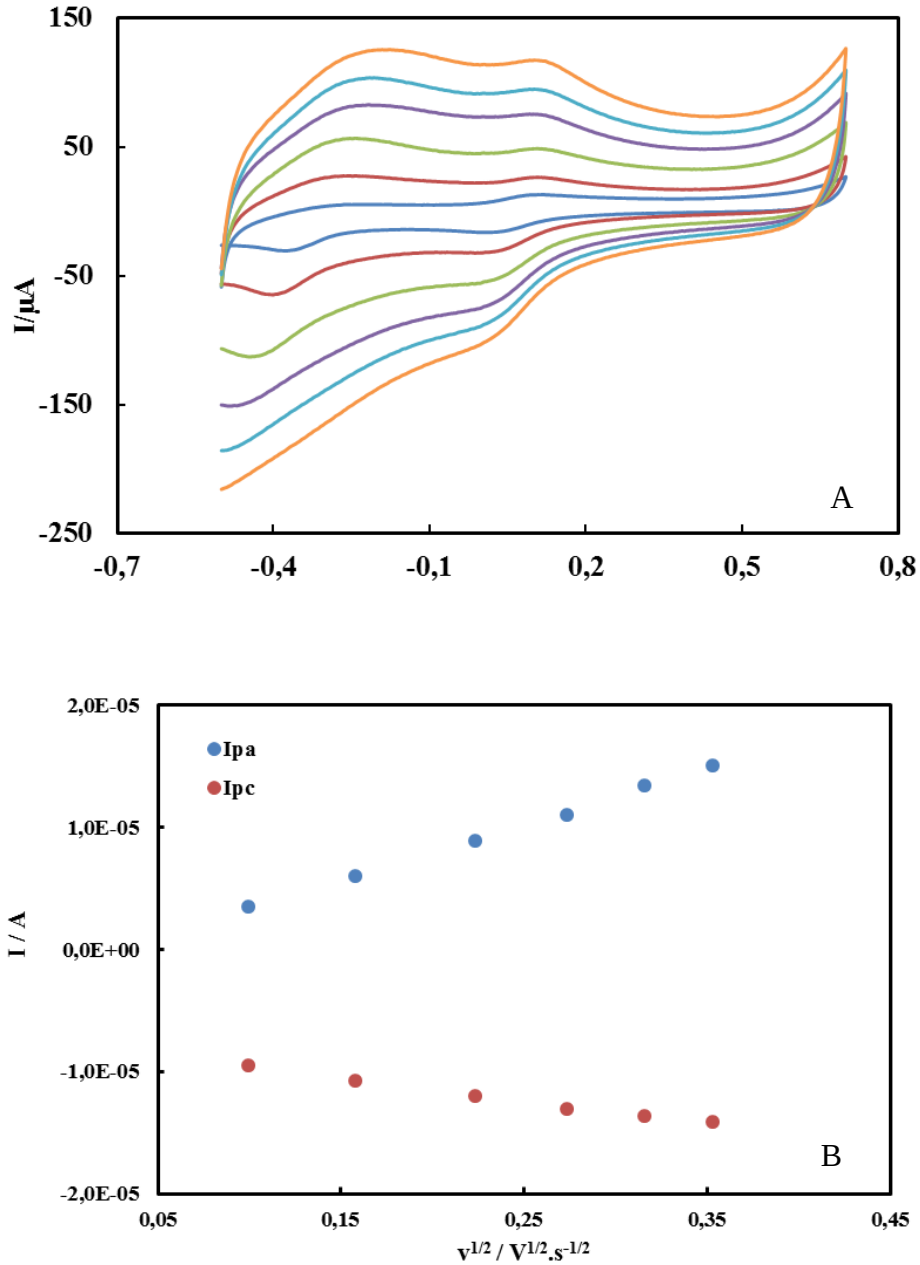
Şekil 3.3. A) SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun tampon çözeltide - 1,1 V ile + 0,9 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 10, 25, 50, 75, 100, 125 $mV.s^{-1}$, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızının karekökü grafikleri

SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrotlarının elektroaktif yüzey alanının değerini hesaplamak için, difüzyon kontrollü elektrokimyasal proses için uygun bir eşitlik olan Randles-Sevcik eşitliğinden yararlanılmıştır:

$$\dot{I}_p = 2{,}96x10^5 n^{3/2} A_{ea} D^{1/2} C v^{1/2} \quad (3.1)$$

Burada i_p yükseltgenme pik akımı, A_{ea} elektroaktif alan (cm^2), D elektroaktif türlerin difüzyon katsayısı ($cm^2.s^{-1}$), n transfer edilen elektronların sayısı, v potansiyel tarama hızı ($V.s^{-1}$) ve C çözeltideki redoks türlerinin konsantrasyonu ($mol.cm^{-3}$)'dur (Brett-Oliveira-Brett 1993).

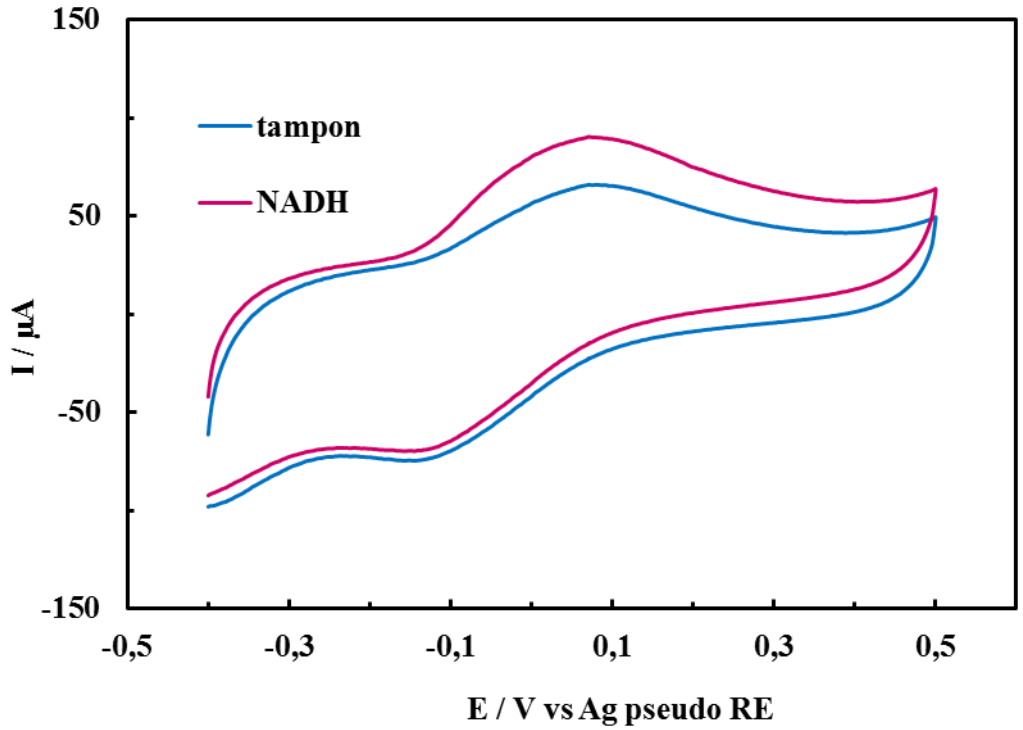
Eşitlik 3.1'i kullanabilmek için ilk olarak SPCE/RGO/PNR/AuNP'ye 10-125 $mV.s^{-1}$ tarama hızı aralığında, 0,1 M KCl destek elektrolit çözeltisinde, 1 mM potasyum ferrisiyanür varlığında -0,5 V ile +0,7 V arasında dönüşümlü voltametri uygulanmıştır. Elde edilen voltamogramlar Şekil 3.4A verilmiştir. Bu voltamogramların gösterdiği anodik ve katodik pik akımlarının tarama hızının karekökünе karşı grafikleri de Şekil 3.4B de verilmiştir. Buradan hem anodik hem de katodik pik akımlarının 10-125 $mV.s^{-1}$ tarama hızı aralığında tarama hızının kareköküyle mükemmel bir doğrusallık gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu da, SPCE/RGO/PNR/AuNP'ler üzerinde potasyum ferrisiyanürün elektro-yükseltgenme ve indirgenmesinin difüzyon kontrollü bir proseste gerçekleştiğini göstermektedir. $Fe(CN)_6^{3-}$ çözeltisinin difüzyon katsayısı ($7{,}63x10^{-6}$)'dır (Bark ve Faulkner 2001). Şekil 3.3B'deki grafiğin doğru denkleminden ve eşitlik 3.1'den yararlanılarak SPCE/RGO/PNR/AuNP'nin elektroaktif yüzey alanı 0,0558 cm^2 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.4. A) SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun 1 mM $K_3Fe(CN)_6$ içerisinde – 0,5 V ile + 0,7 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 10, 25, 50, 75, 100, 125 $mV.s^{-1}$, 0,1M KCl) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızının karekökü grafikleri

3.3. NADH'nin SPCE/RGO/PNR/AuNP Elektrotları Üzerinde Elektrokimyasal Davranışı

NADH'nin SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrotları üzerindeki elektrokimyasal davranışını incelemek için, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu (0,1 M KCl) içerisinde 1 mM NADH varlığında ve yokluğunda döngüsel voltametri uygulanmış ve elde edilen voltamogramlar Şekil 3.5'de verilmiştir.



Şekil 3.5. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun 50 mV s^{-1} tarama hızında 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda (0,1 M KCl) -0,4 V ile +0,5 V potansiyel aralığında 5 mM NADH varlığında ve yokluğundaki döngüsel voltamogramı

RGO üzerinde hazırlanmış PNR medyatörünün etkisiyle NADH varlığında anodik pik akımı önemli oranda artarken (34,238 µA'den 49,768 µA'e), katodik pik akımı azalması (22,195 µA'den 20,928 µA'e) NADH'nin elektrokimyasal davranışı için karakteristik bir özelliktir (Pariente vd 1996). NADH varlığında I_{pa} / I_{pc} oranı 2,34 iken NADH yokluğunda bu oran 1,54'e düşmektedir. Bu sonuçlar NADH'nin, PNR tarafından yükseltgendiğini belirtmektedir. NADH'nin anodik ve katodik pik potansiyelleri sırasıyla 74 mV ve -114 mV'dur. RGO, PNR ve AuNP'nin elektrot formulasyonunda

birlikte yer alması NADH'nin elektroyükseltgenmesinde hem sinerjik bir etki göstererek elektrodun elektroaktif yüzey alanını artırarak elektronik iletkenliği ve elektrodun tersinirliğini artırmış, hem de NADH'nin elektroyükseltgenmesinde elektrokatalitik etki göstererek pik potansiyellerinin değerini azaltmıştır. NADH'nin yükseltgenmesindeki daha düşük anodik pik potansiyeli, NADH'nin elektroyükseltgenmesi için özellikle PNR'nin elektrokatalitik etki sergilediğini belirtmektedir. NADH varlığında yükseltgenme pik akımının artması, NADH'nin çözeltiden elektrot yüzeyine doğru difüzlenerek yükseltgendiğini ve buna karşın yüzeydeki PNR'nın indirgendiğini gösterir. Bu elektrokimyasal işlem zinciri şöyle formülize edilebilir:

$$PNR_{(ind)} \longrightarrow PNR_{(yüks)} + 2H^+ + 2e^- \quad (3.2)$$

$$NADH + PNR_{(yüks)} \longrightarrow NAD^+ + PNR_{(ind)} \quad (3.3)$$

Modifiye edilmiş elektrot tarafından NADH'nin tüm yükseltgenmesi;

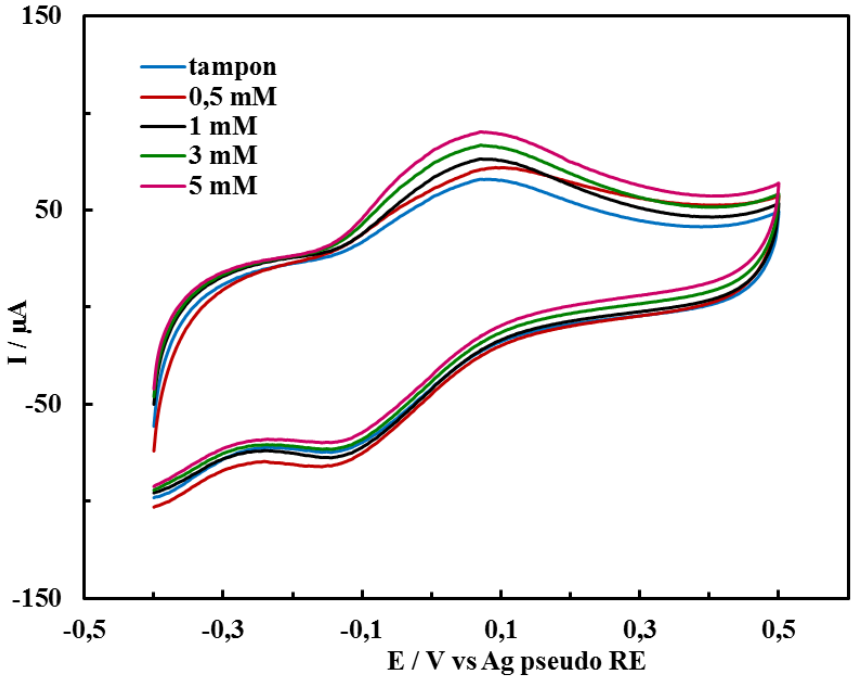
$$NADH \longrightarrow NAD^+ + H^+ + 2e^- \quad (3.4)$$

Bu reaksiyonlar incelendiğinde, PNR'nin NADH'nin yükseltgenmesinde medyatör olarak etki gösterdiği anlaşılmaktadır. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun, NADH'ye karşı gösterdiği yüksek elektrokatalitik aktivite ve yüksek elektronik iletkenlik şu şekilde açıklanabilir:

Elektrokimyasal ön işlem uygulanmış SPCE elektrodunun yüzeyinde, karbonun yükseltgenmesi ile karboksil, hidroksil ve kinon-hidrokinon grupları oluşur (Şahin ve Ayrancı, 2015; Bilgi ve Ayrancı, 2016). İndirgenmiş grafen oksitin yüzeyinde –COOH, -OH ve $–NH_2$ grupları bulunmaktadır (Mao vd 2012 by Tubitak ref). SPCE üzerine RGO'nun modifiye edilmesiyle ise, SPCE ve RGO yüzeyinde bulunan elektroaktif fonksiyonel gurpların arasında oluşan hidrofilik etkileşimler ile yüksek elektroaktif yüzey alanına sahip bir elektrot yüzeyi elde edilir. SPCE/RGO üzerinde NR'nin elektropolimerizasyonu ile PNR filmi oluşur. PNR filminin yapısında bulunan ∏∏∏

konjuge yapıları, RGO'da bulunan ∏ konjuge yapıları ile ∏∏-∏ elektronik etkileşimini ve hidrofobik etkileşim yapar. Böylece SPCE/RGO/PNR elektrodunda elektron transfer hızı oldukça artar ve faradik cevap kuvvetlenir (Şahin ve Ayrancı, 2015; Bilgi ve Ayrancı, 2016). SPCE/RGO/PNR elektrodunun AuNP ile modifikasyonu sonrasında, AuNP'ler ile elektrot yüzeyindeki PNR'nin $-NH_2$ grupları arasında da bir etkileşim olacaktır. Böylelikle çalışmamızda hazırlamış olduğumuz SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun elektronik iletkenliği oldukça yüksektir. AuNP'nin biyouyumluluk özelliği ise, NADH'nin redoks reaksiyonunda uyumlu bir mikroçevre yaratır.

SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun NADH'ye karşı olan voltametrik cevabında NADH konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. Bunun için 50 mM pH 7,0 (0,1 M KCl) tamponunda hazırlanmış NADH'nin farklı konsantrasyonları için döngüsel voltametri uygulanmış ve sonuçlar Şekil 3.6'da verilmiştir. Burada, NADH konsantrasyonu arttıkça anodik pik akımlarının da arttığı görülmektedir.



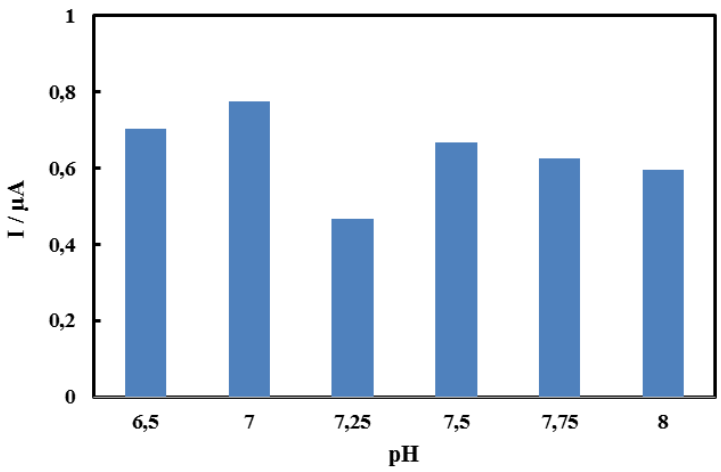
Şekil 3.6. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun değişen NADH konsantrasyonlarında (0,5 mM - 5 mM) -0,4 V ve +0,9 V potansiyel aralığındaki dönüşümlü voltamogramları (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl; tarama hızı: 50 $mV.s^{-1}$)

3.4. Amperometrik NADH Tayinine İlişkin Bulgular

Çalışmamızda hazırladığımız SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun NADH'nin yükseltgenmesine karşı gösterdiği yüksek elektrokatalitik etki ve yüksek duyarlık bu elektrodun NADH'nin amperometrik tayininde RGO üzerinde hazırlanan PNR'nin medyatör olarak sensörde kullanılması açısından bir yeniliktir. Bu bölümde, SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun NADH'nin amperometrik tayininde sensör olarak kullanımı ile ilgili yapmış olduğumuz çalışmalardan bahsedilecektir.

3.4.1. pH optimizasyonu

NADH'nin ani bozulmasından dolayı yüksek alkali ve asitli çözeltilerde kararsız olduğu bilinmektedir (Lowry ve Passonneau 1971). NADH'nin elektroyükseltgenmesinde SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodun sensör özelliklerini araştırmak için, +0,20 V'da NADH'nin amperometrik tayini gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, NADH'nin sensör özelliklerinde pH etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 100 µM NADH varlığında farklı pH'lardaki (6,5-8,2) 50 mM fosfat tamponları kullanılarak +0,20 V potansiyelde akımlar ölçülmüştür. Ölçülen akım değerlerine karşılık pH değerlerinin grafiği Şekil 3.7'de verilmiştir.

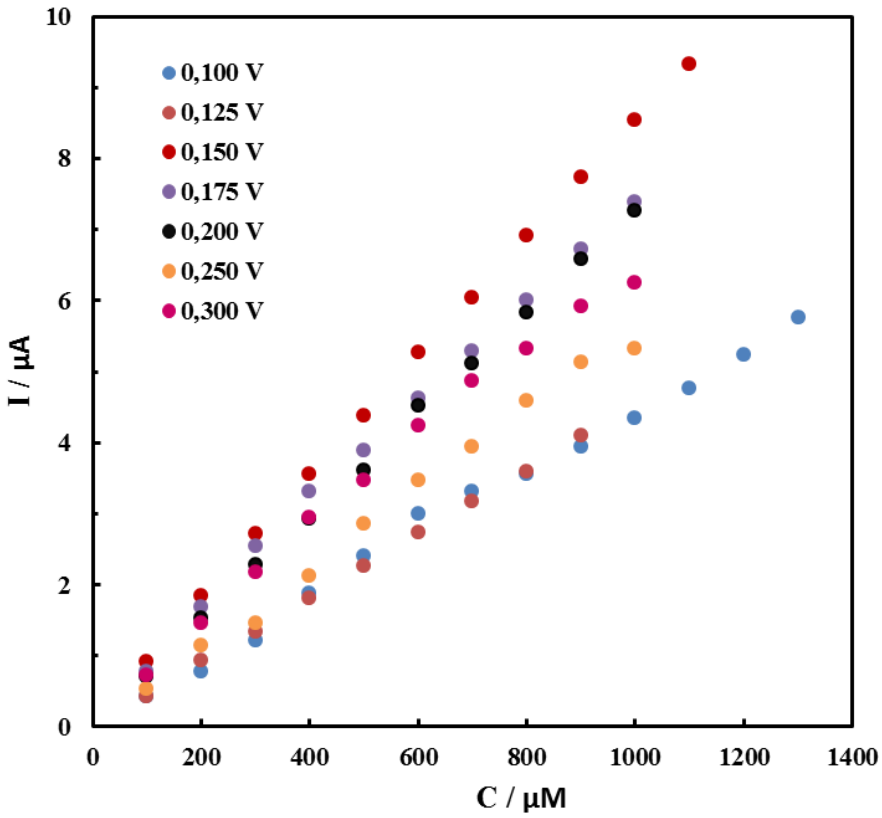


Şekil 3.7. Farklı pH'lardaki 100 µM NADH çözeltisinin, SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodu kullanılarak elde edilen akım-pH grafiği

Elde edilen eğrilerden, yüksek duyarlıkla NADH sensörü kullanılarak NADH'nin tayini için optimum pH 7,0 olarak belirlenmiştir. Çalışmanın bundan sonraki kısmında 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu kullanılmıştır.

3.4.2. Çalışma potansiyelinin optimizasyonu

Çalışmanın bu kısmında, SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörlerinin NADH'nin tayini için farklı potansiyellerde gösterdiği amperometrik yanıtlar incelenmiştir. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile NADH'nin amperometrik tayini pH 7,0'de 0,100 V, 0,125 V, 0,150 V, 0,175 V, 0,200 V, 0,250 V ve 0,300 V potansiyellerinde yapılmıştır. Elde edilen amperogramlardan yararlanılarak akım-konsantrasyon grafikleri çizilmiştir (Şekil 3.8). Bu grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.8. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörlerinin farklı potansiyellerde (0,100 V, 0,125 V, 0,150 V, 0,175 V, 0,200 V, 0,250 V ve 0,300 V) NADH derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

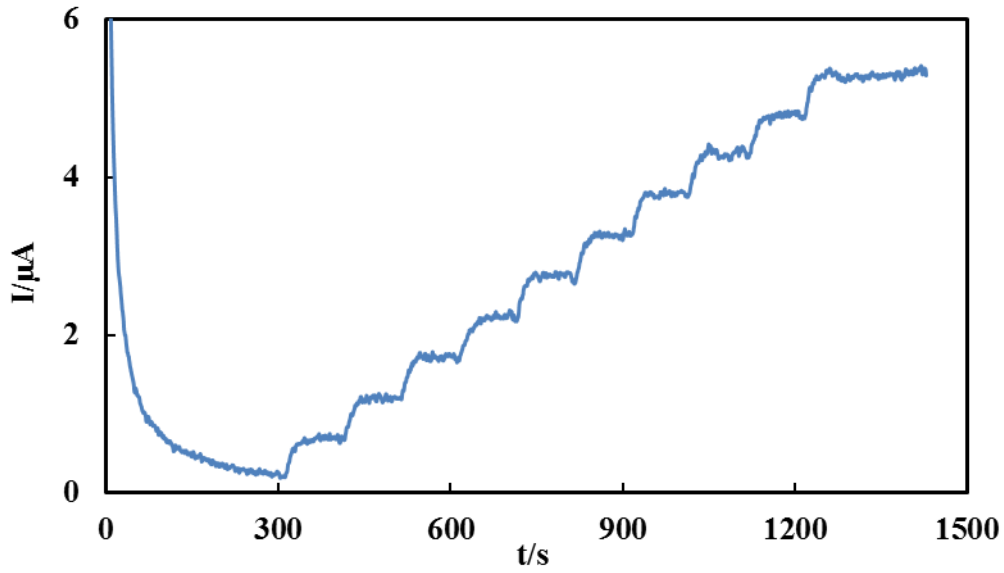
Çizelge 3.2. Şekil 3.8'de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayıları değerleri

Çalışma potansiyeli / V	Duyarlık / ($\mu A.mM^{-1}$)	Korelasyon katsayısı (r)
0,100	4,50	0,9994
0,125	4,54	0,9999
0,150	8,39	1,00
0,175	7,19	0,9989
0,200	7,25	0,9997
0,250	5,81	0,9988
0,300	6,48	0,9987

En yüksek duyarlık ve korelasyon katsayısı +0,150 V potansiyelde elde edilen doğrunun denkleminden elde edildiği için optimum çalışma potansiyeli +0,150 V olarak belirlenmiştir. Çalışmanın bundan sonraki kısmında amperometrik tayin +0,150 V'da gerçekleştirilmiştir.

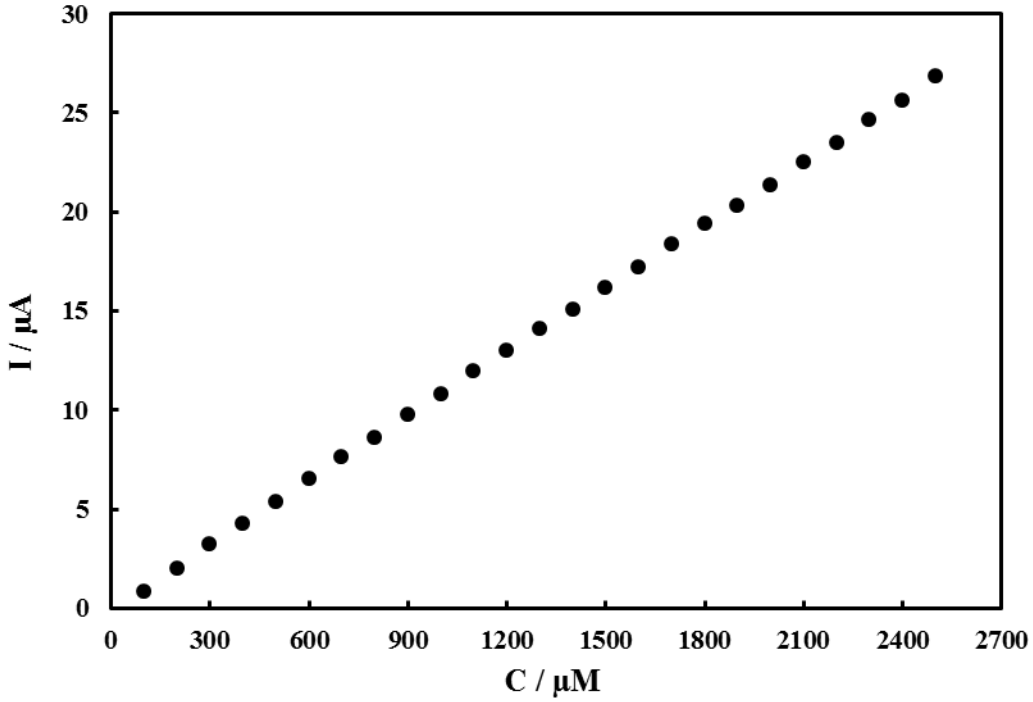
3.4.3. Analitiksel karakterizasyon

SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodu ile NADH'nin amperometrik tayini, içerisinde 9 ml 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu bulunan elektrokimyasal hücrede, çözeltinin sabit hızda sürekli karıştırıldığı şartlarda +0,150 V'da gerçekleştirilmiştir. Akım kararlı hale geldikten sonra, 100 µM NADH elektrokimyasal hücreye ardışık olarak katılmıştır. Kararlı hal akım cevabı ölçülmüş ve zamana karşı akım değerleri potantiyostat tarafından kaydedilmiştir. Şekil 3.9'da NADH'nin amperometrik tayini için elde edilen örnek bir kronoamperogram verilmiştir. NADH ilavesiyle zamanla akımda bir artış olduğu kronoamperogramdan anlaşılmaktadır.



Şekil 3.9. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunda 100 µM NADH'nin ardışık katımı ile elde edilen örnek bir kronoamperogram (+0,150 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

NADH konsantrasyonu ile artan akım değerleri kullanılarak NADH'nin kantitatif tayini yapılabilir. Amperometrik tayini sonucu kronoamperogramlardan elde edilen akım değerlerinin NADH'nin konsantrasyonuna karşı çizilen grafiği Şekil 3.10'da verilmiştir. NADH miktarının artması ile akım değerleri de doğru orantılı olarak artmıştır.



Şekil 3.10. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile NADH derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (+0,25 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

NADH'nin amperometrik tayini için kullanılan SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün analitiksel karakterizasyonu için duyarlık, bağıl standart sapma, tayin ve gözlemlenebilme sınırı ve tekrarlanabilirlik gibi parametreler belirlenmiş ve Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. NADH'nin amperometrik tayini için SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile elde edilen analitiksel parametreler

Tespit limiti	4,57 µM
Tayin sınırı	15,2 µM
Doğrusal aralık	15,2 ile 2500 µM
Duyarlık	10,72 µA.mM^{-1}
Tekrarlanabilirlik	RSD %1,93 (n=10), 100 µM NADH

Çizelge 3.3 incelendiğinde, SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün duyarlığının oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Duyarlığın yüksek olması, elektroaktif yüzey alanının ve elektronik iletkenliğin artmasıyla, elektron transferinin hızlı olması

nedeniyledir. +0,150 V'da 100 µM NADH biyosensörünün tekrarlanabilirliği test edilmiş ve bağıl standart sapma (R.S.D.) %1,93 olarak hesaplanmıştır. Tekrarlanabilirlik için hesaplanan RSD değeri, 10 tekrara kadar NADH'nin amperometrik tayininin iyi olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.4. Literatürde çeşitli materyallerle modifiye edilmiş elektrotlar ile NADH'nin amperometrik tayini için elde edilen elektroanalitik karakterizasyonlar

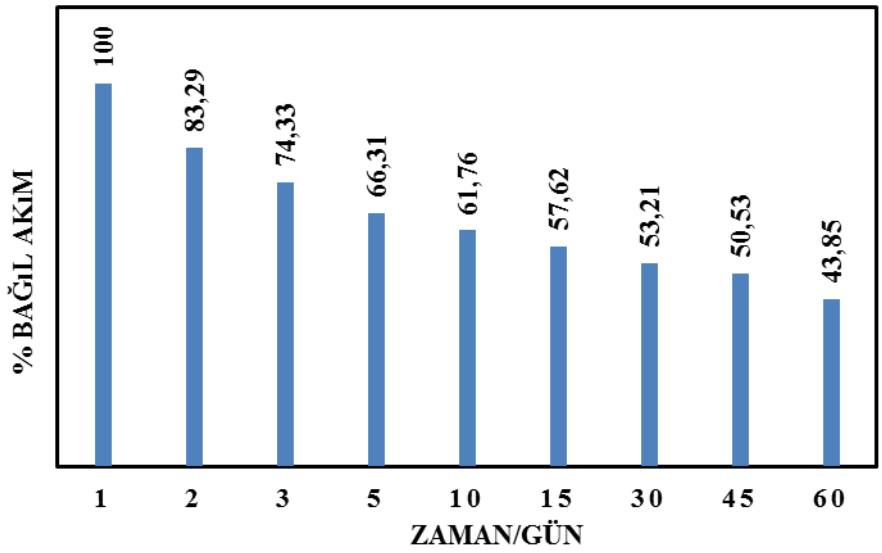
Elektrot	**Çalışma potansiyeli (V)**	**Duyarlık (µA / mM)**	**Lineer aralık (µM)**	**Tespit limiti (µM)**	**Referans**
SPCE/PB	-0,05V	336	1-100	0,5	F,Ricci et al. (2005)
PANI/MWCNT/GCE	0,35V	222,3	10-180	5	K,Lin et al. (2011)
Au-RGo/Chit/GCE	0,35V	12	1,5-320	1,2	H.C Chang et al.(2011)
GN-AuNRs/GCE	0,4	10,27 27,07	20-160 160-480	6	L.Li et al. (2013)

SPCE, Yüzey baskılı elektrot; PB,Prusya mavisi; PANI,polianilin; MWCNT,çok duvarlı karbon nanotüp; GCE,camsı karbon elektrot; Chit,kitosin; RGO,indirgenmiş grafen oksit;

Literatürde çeşitli materyallerle modifiye edilmiş elektrotlar ile NADH'nin amperometrik tayini için elde edilen elektroanalitik karakterizasyonlar Çizelge 3.4'de verilmiştir.

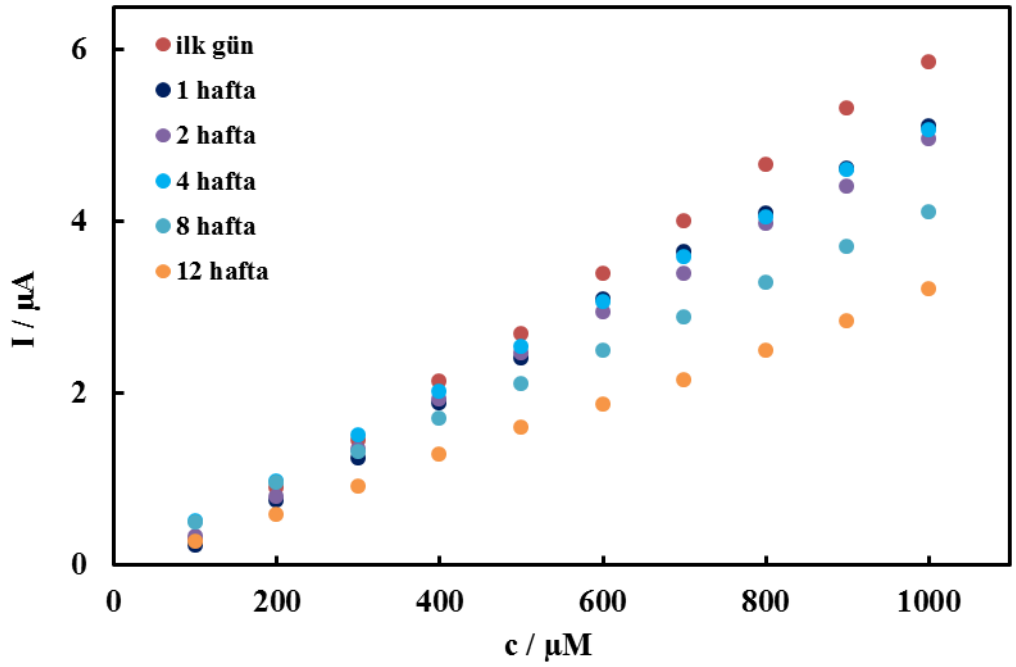
SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün uygulama kararlılığı, 100 µM derişiminde NADH çözeltisinin +0,150 V potansiyelde 60 gün boyunca aralıklarla akımların ölçülmesi ile test edilmiştir. 60 gün boyunca NADH için biyosensör cevabının ilk günkü akıma göre yüzde bağıl akım değerleri Şekil 3.11'de verilmiştir. Başlangıçta NADH için biyosensörün amperometrik cevabı 2. günün sonunda %16,29, 10. günün sonunda %38,24, 30. günün sonunda %46,79 ve 60. günün sonunda ise %56,15 oranında azalmıştır. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün uygulama kararlılığı ilk kullanımdan sonra azalmış olsa da, 60. güne kadar NADH için amperometrik yanıt vermiştir. Bu sonuçlardan, tek kullanımlık olarak hazırlanan bir biyosensör için, bu

uygulama kararlılığının iyi olduğu ve biyosensör formulasyonunda bulunan RGO, PNR ve AuNP'nin biyosensörün uygulama kararlılığını arttırdığı sonucuna varılabilir.

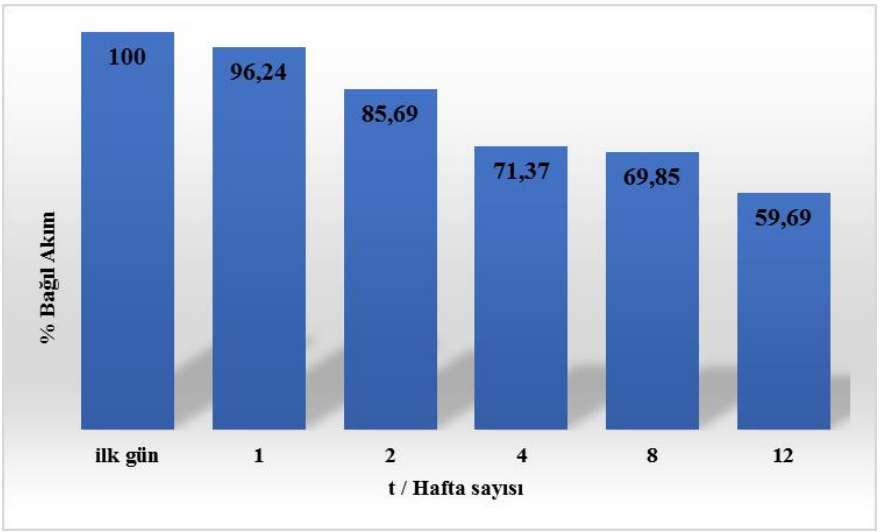


Şekil 3.11. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün 100 µM NADH derişimine karşı elde edilen yüzde bağıl akım değerleri-gün sayısı grafiği (+0,150 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

Çalışma şartlarında geliştirilen biyosensörün depolama kararlığını belirlemek için, hazırlanan biyosensörler +4°C'de sabit nem ortamında bekletilmiştir. Daha sonra bu biyosensörler ile sırasıyla 16. hafta boyunca +0,150 V'da amperometrik NADH tayini yapılmıştır. Amperometrik tayin sonucu elde edilen akım-konsantrasyon grafiği ve akım değerleri-hafta sayısı grafiği sırasıyla Şekil 3.12 ve Şekil 3.13'de verilmiştir. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün 12. haftaya kadar NADH'ye karşı yanıt verdiği görülmektedir. %Bağıl akım verileri incelendiğinde NADH'nin ilk gün analizine kıyasla biyosensörün amperometrik cevabı 1. haftanın sonunda %11,66, 4. haftanın sonunda %18,21 ve 8. haftanın sonunda %36,58 oranında azalmıştır. 16. haftanın sonunda yapılan amperometrik tayinde ise akım kararlılığının azalması nedeniyle düzgün bir yanıt alınamamış ve bu nedenle veriler grafiklerde verilmemiştir. Biyosensörün 12. haftanın sonunda duyarlığının % 48,72'sini koruduğu görülmektedir.



Şekil 3.12. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün farklı depolama zamanlarında 100 µM NADH derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (+0,150 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)



Şekil 3.13. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün 100 µM DA derişimine karşı elde edilen akım değerleri-hafta sayısı grafiği (+0,150 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

3.4.4 Girişim Testi

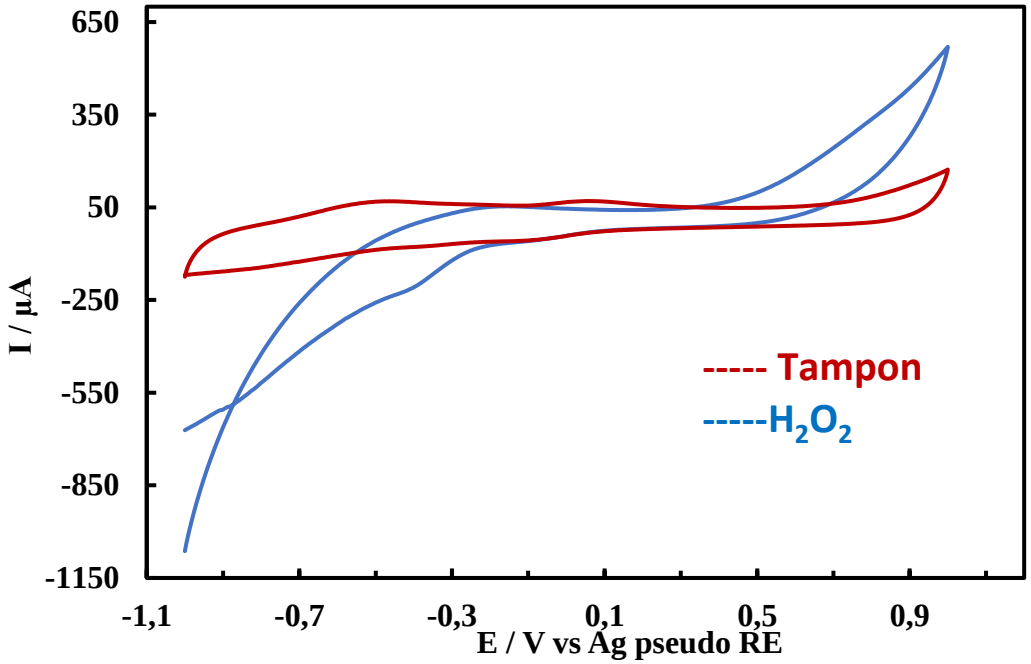
NADH'nin SPCE/RGO/PNR/AuNP sensörleri ile amperometrik tayini, girişim yapan türlerin etkisini incelemek için, askorbik asit (AA), ürik asit (UA), dopamin (DA) ve H_2O_2 varlığında yapılmıştır. NADH'nin +0,150 V'daki amperometrik tayinine AA ve DA girişim yaparken, UA ve H_2O_2 girişim yapmamıştır.

3.4.5 Gerçek numune analizi

Geliştirdiğimiz NADH biyosensörleri gerçek numune analizinde kullanılmıştır. Merk firmasında satın alınan insan kan serumu numunesi 1:100 oranında pH 7.4 tampon çözelti ile seyreltilmiştir. Kan serumu numunesine bilinen konsantrasyonda NADH ilave edilerek NADH içeren yapay kan serumu numuneleri hazırlanmıştır. 100 µM NADH içeren kan serumu numunelerinin SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile amperometrik tayini +0,150 V'da üç kez tekrarlanarak yapılmıştır. Yapılan analiz sonucuna göre deneysel olarak hesaplanan NADH konsantrasyonu 102,3 ± 0,15 ve geri kazanım %102,3 olarak bulunmuştur.

3.5. SPCE/RGO/PNR/AuNP Elektrotları Üzerinde H_2O_2'nin Elektrokimyasal Davranışı

H_2O_2'nin SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrotları üzerindeki elektrokimyasal davranışını incelemek için, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu (0,1 M KCl) içerisinde 1 mM H_2O_2 varlığında ve yokluğunda döngüsel voltametri uygulanmış ve elde edilen voltamogramlar Şekil 3.14'de verilmiştir.



Şekil 3.14. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun 50 mV s^{-1} tarama hızında 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda (0,1 M KCl) -1,0 V ile +1,0 V potansiyel aralığında 10 mM H_2O_2 varlığında ve yokluğundaki döngüsel voltamogramı

H_2O_2 yokluğunda tampon çözeltide sadece elektrot formulasyonunda yer alan PNR'nin pikleri gözlenmekte iken H_2O_2 varlığında -0,4 V'da belirgin bir indirgenme piki gözlenmiştir. H_2O_2 yokluğunda Epc ve Ipc değerleri sırası ile -0,358 V ve -1,579 µA iken, 10 mM H_2O_2 varlığında bu değerler sırasıyla -0,40 V ve -19,256 µA olarak gözlenmiştir. H_2O_2 varlığında indirgenme pik akımının artması, H_2O_2'nin çözeltiden elektrot yüzeyine doğru difüzlenerek indirgendiğini ve buna karşın yüzeydeki PNR'nın yükseltgendiğini gösterir. Bu elektrokimyasal işlem zinciri şöyle formülize edilebilir:

$$PNR_{(yüks)} + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow PNR_{(ind)} \quad (3.5)$$

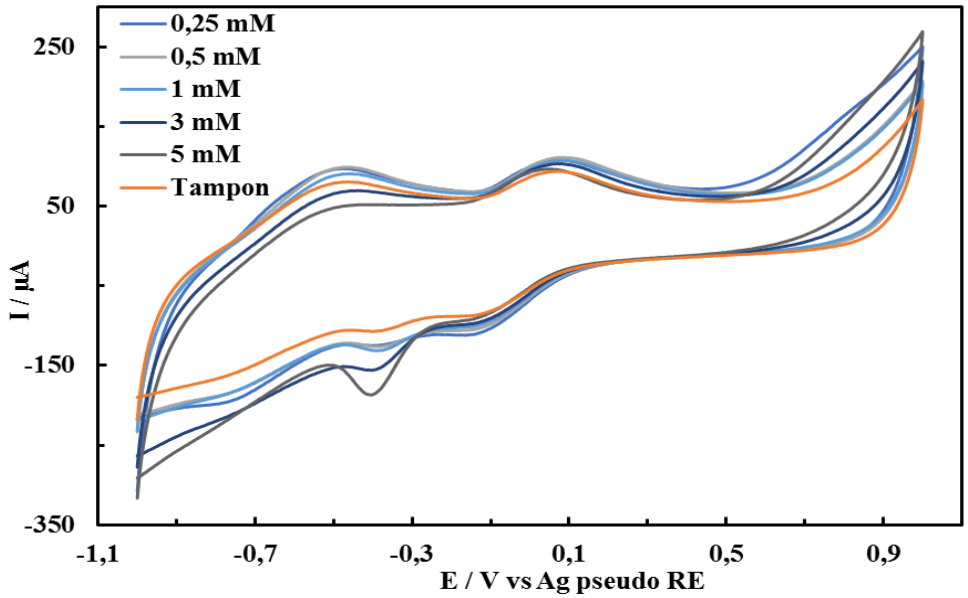
$$H_2O_2 + PNR_{(ind)} \longrightarrow H_2O + PNR_{(yüks)} \quad (3.6)$$

Modifiye edilmiş elektrot tarafından H_2O_2'nin tüm indirgenmesi;

$$H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2O \quad (3.7)$$

Bu reaksiyonlar incelendiğinde, PNR'nin H_2O_2'nin indirgenmesinde medyatör olarak etki gösterdiği anlaşılmaktadır.

SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun H_2O_2'ye karşı olan voltametrik cevabında H_2O_2 konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. Bunun için 50 mM pH 7,0 (0,1 M KCl) tamponunda hazırlanmış H_2O_2'nin farklı konsantrasyonları için döngüsel voltametri uygulanmış ve sonuçlar Şekil 3.15'de verilmiştir. Burada, H_2O_2 konsantrasyonu arttıkça katodik pik akımlarının da arttığı görülmektedir.



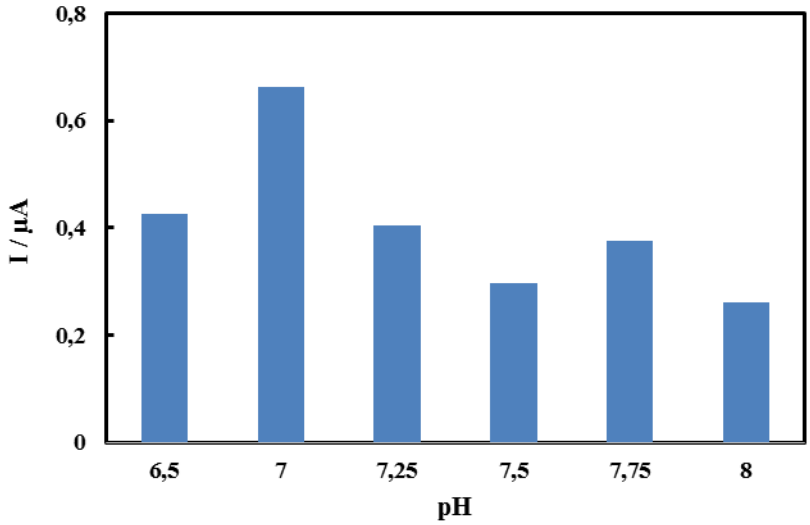
Şekil 3.15. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun değişen H_2O_2 konsantrasyonlarında (0,25 mM - 5 mM) -1,0 V ve +1,0 V potansiyel aralığındaki döngüsel voltamogramları (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl; tarama hızı 50 $mV.s^{-1}$)

3.6. Amperometrik H_2O_2 Tayinine İlişkin Bulgular

3.6.1. pH optimizasyonu

H_2O_2'nin elektroindirgenmesinde H_2O_2 elektrodun sensör özelliklerini araştırmak için, -0,45 V'da H_2O_2'nin amperometrik tayini gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, H_2O_2'nin sensör özelliklerinde pH etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 100 µM H_2O_2 varlığında farklı

pH'lardaki (6,5-8,2) 50 mM fosfat tamponları kullanılarak -0,45 V'da potansiyelde akımlar ölçülmüştür. Ölçülen akım değerlerine karşılık pH değerlerinin grafiği Şekil 3.16'da verilmiştir.

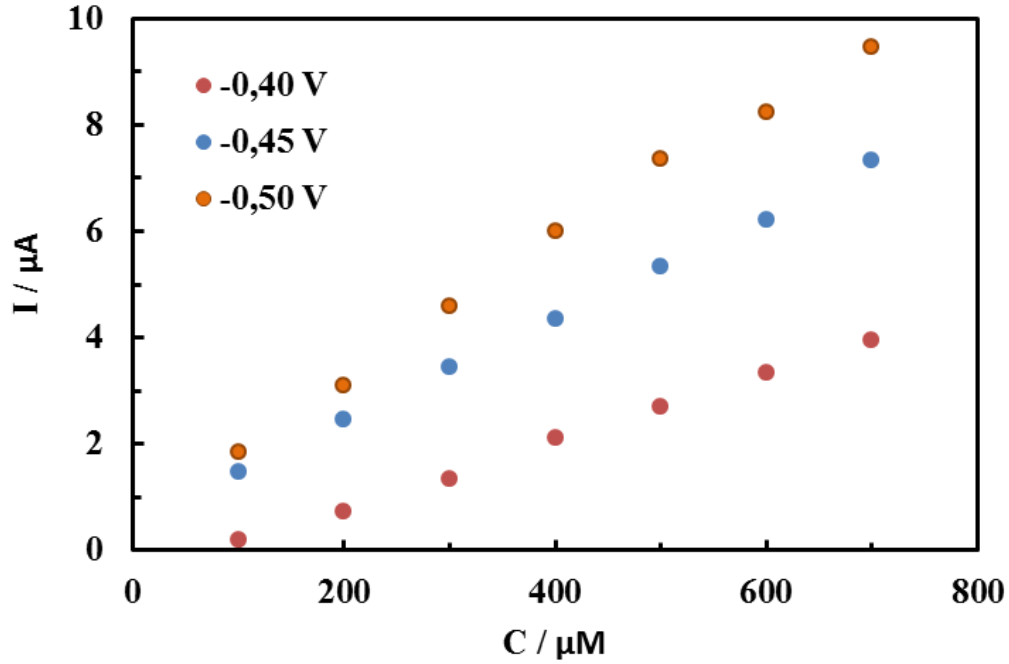


Şekil 3.16. Farklı pH'lardaki 100 µM H_2O_2 çözeltisinin, SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodu kullanılarak elde edilen akım-pH grafiği

Elde edilen eğrilerden, yüksek duyarlıkla -0,45 V'da SPCE/RGO/PNR/AuNP sensörü kullanılarak -0,45 V'da'nin tayini için optimum pH 7,0 olarak belirlenmiştir. Çalışmanın bundan sonraki kısmında 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu kullanılmıştır.

3.6.2. Çalışma potansiyelinin optimizasyonu

Çalışmanın bu kısmında, SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörlerinin H_2O_2'nin tayini için farklı potansiyellerde gösterdiği amperometrik yanıtlar incelenmiştir. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile H_2O_2'nin amperometrik tayini pH 7,0'de, -0,40 V, -0,45 V ve -0,50 V potansiyellerinde yapılmıştır. Elde edilen amperogramlardan yararlanılarak akım-konsantrasyon grafikleri çizilmiştir (Şekil 3.17). Bu grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri Çizelge 3.5'de verilmiştir.



Şekil 3.17. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörlerinin farklı potansiyellerde (-0,40 V, -0,45 V ve -0,50 V) H_2O_2 derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

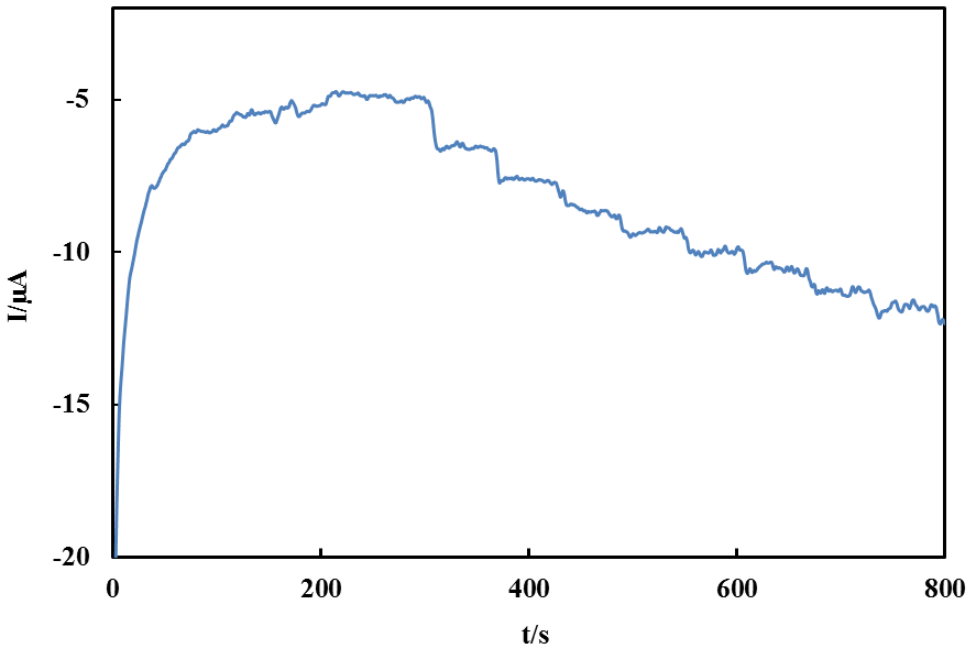
Çizelge 3.5. Şekil 3.17'de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayıları değerleri

Çalışma potansiyeli / V	Duyarlık / ($\mu A.mM^{-1}$)	Korelasyon katsayısı (r)
-0,40	6,36	0,9992
-0,45	9,61	0,9997
-0,50	12,84	0,9978

En yüksek duyarlık -0,50 V potansiyelde elde edilen doğrunun denkleminden elde edilmiş olmasına rağmen, korelasyon katsayısı en düşüktür. Amperometrik tayin sırasında ise -0,40 V ve -0,45 V'da akım kararlılığı en yüksek iken, -0,50 V'da ise analit konsantrasyonu arttıkça akım kararlılığı azalmıştır. Akım kararlılığı ve korelasyon katsayısı göz önüne alındığında, optimum çalışma potansiyeli -0,45 V olarak belirlenmiştir.

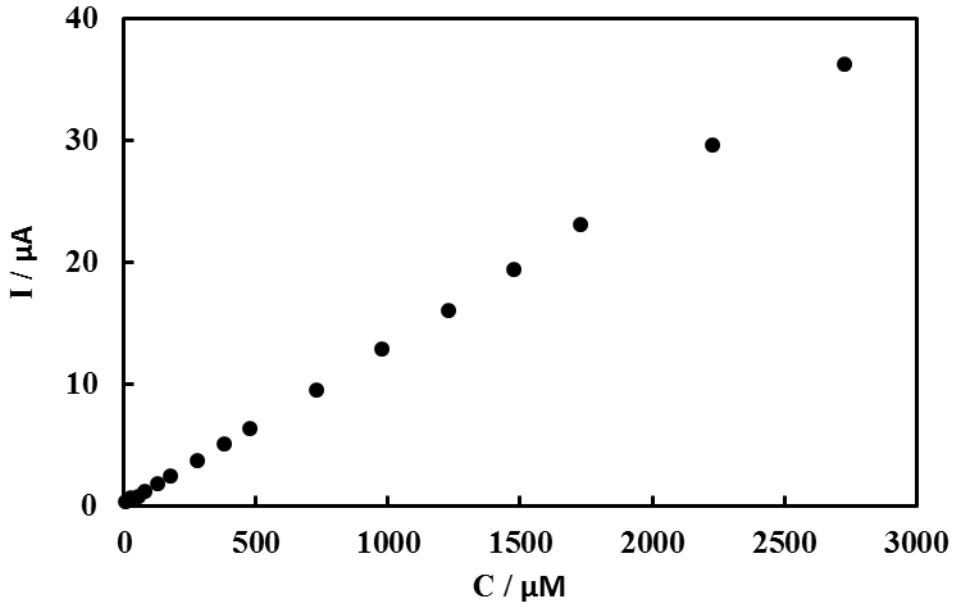
3.6.3. Analitiksel karakterizasyon

SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodu ile H_2O_2'nin amperometrik tayini, içerisinde 9 ml 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu bulunan elektrokimyasal hücrede, çözeltinin sabit hızda sürekli karıştırıldığı şartlarda -0,45 V'da gerçekleştirilmiştir. Akım kararlı hale geldikten sonra, farklı 100 µM H_2O_2 elektrokimyasal hücreye ardışık olarak katılmıştır. Kararlı hal akım cevabı ölçülmüş ve zamana karşı akım değerleri potantiyostat tarafından kaydedilmiştir. Şekil 3.20'de H_2O_2'nin amperometrik tayini için elde edilen örnek bir kronoamperogram verilmiştir. H_2O_2 ilavesiyle zamanla akımda bir artış olduğu kronoamperogramdan anlaşılmaktadır.



Şekil 3.18. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunda 100 µM H_2O_2'nin ardışık katımı ile elde edilen örnek bir kronoamperogram (+0,25 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

H_2O_2 konsantrasyonu ile artan akım değerleri kullanılarak H_2O_2'nin kantitatif tayini yapılabilir. Amperometrik tayini sonucu kronoamperogramlardan elde edilen akım değerlerinin H_2O_2'nin konsantrasyonuna karşı çizilen grafiği Şekil 3.19'de verilmiştir. H_2O_2 miktarının artması ile akım değerleri de doğru orantılı olarak artmıştır.



Şekil 3.19. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile H_2O_2 derişimine karşı elde edilen akım grafikleri - 0,45 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

H_2O_2'nin amperometrik tayini için kullanılan SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün analitiksel karakterizasyonu için duyarlık, bağıl standart sapma, tayin ve gözlemlenebilme sınırı ve tekrarlanabilirlik gibi parametreler belirlenmiş ve Çizelge 3.6'de verilmiştir.

Çizelge 3.6. H_2O_2'nin amperometrik tayini için SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile elde edilen analitiksel parametreler

Tespit limiti	6,35 µM
Tayin sınırı	21,16 µM
Doğrusal aralık	21,16 µM – 2730 µM
Duyarlık	13,2 µA. mM^{-1}
Tekrarlanabilirlik	RSD %1,70 (n=10), 100 µM H_2O_2

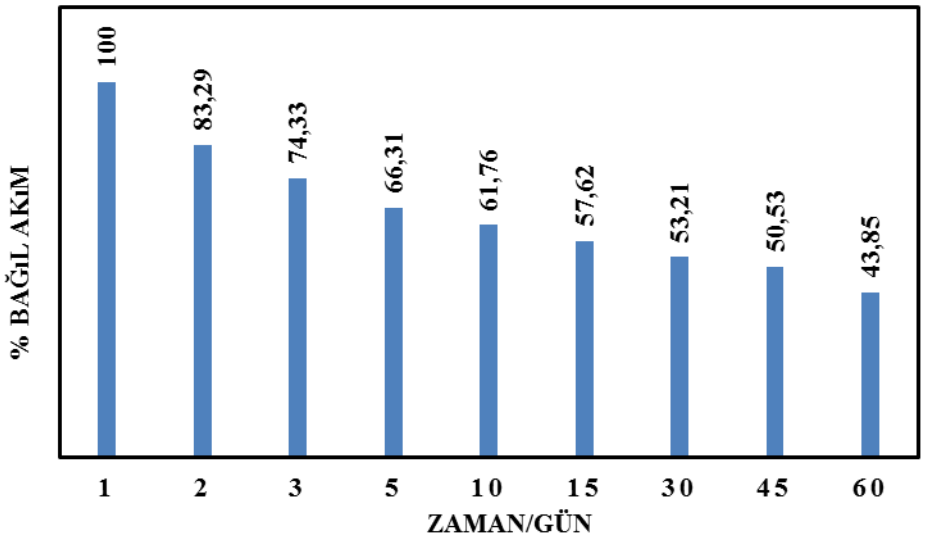
Çizelge 3.6 incelendiğinde, SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün duyarlığının oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Duyarlığın yüksek olması, elektroaktif yüzey alanının ve elektronik iletkenliğin artmasıyla, elektron transferinin hızlı olması nedeniyledir. -0,45 V'da 100 µM H_2O_2'nin biyosensörünün tekrarlanabilirliği test edilmiş ve bağıl standart sapma (R.S.D.) %1,70 olarak hesaplanmıştır. Tekrarlanabilirlik

için hesaplanan RSD değeri, 10 tekrara kadar H_2O_2'nin amperometrik tayininin iyi olduğunu göstermektedir. Literatürde çeşitli materyallerle modifiye edilmiş elektrotlar ile H_2O_2'nin amperometrik tayini için elde edilen elektroanalitik karakterizasyonlar Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Literatürde çeşitli materyallerle modifiye edilmiş elektrotlar ile NADH'nin amperometrik tayini için elde edilen elektroanalitik karakterizasyonlar

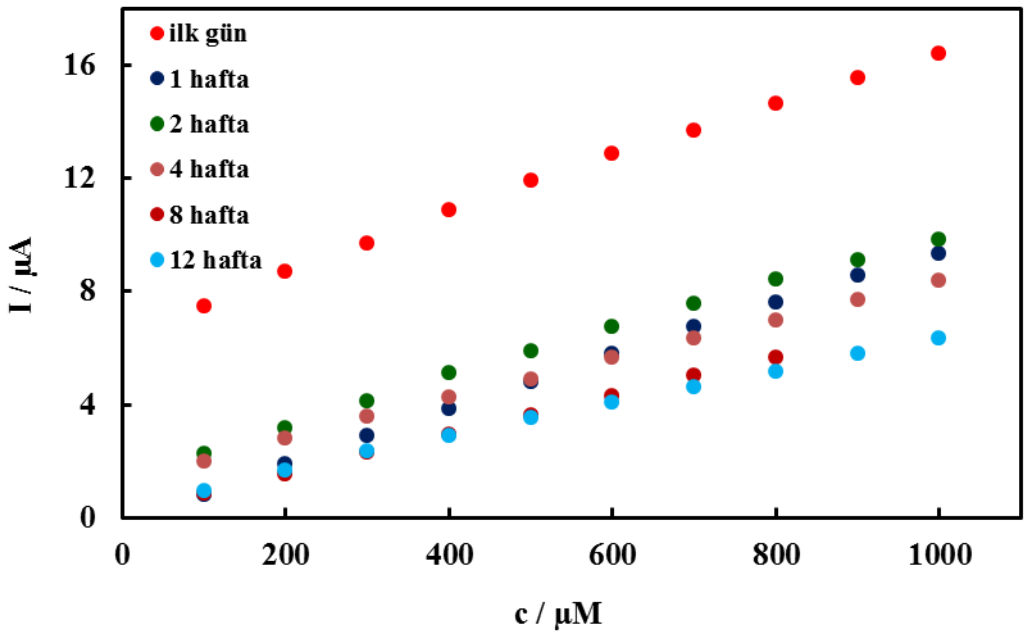
Elektrot	**Çalışma potansiyeli (V)**	**Duyarlık (µA/mM)**	**Lineer aralık (µM)**	**Tespit limiti (µM)**	**Referans**
SPCE/PB	-0,05	357	1-1000	0,50	F,Ricci et al. (2005)
PANI/MWCNT/GCE	-0,35	18,75	29,4-2205	9,20	K,Lin et al. (2011)
PDDA-t-GO-Pd/GCE	-0,10	-	10-10000	0,22	J,M,You et al. (2012)
Au-TiO2/GN/GCE	-	-	10-200	0,70	L.Li et al. (2013)

SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün uygulama kararlılığı, 100 µM derişiminde H_2O_2 çözeltisinin -0,45V potansiyelde 60 gün boyunca aralıklarla akımların ölçülmesi ile test edilmiştir. 60 gün boyunca DA için biyosensör cevabının ilk günkü akıma göre yüzde bağıl akım değerleri Şekil 3.20'de verilmiştir. Başlangıçta H_2O_2 için biyosensörün amperometrik cevabı 2. günün sonunda %16,71, 10. günün sonunda %38,24, 30. günün sonunda %46,79 ve 60. günün sonunda ise %56,15 oranında azalmıştır. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün uygulama kararlılığı ilk kullanımdan sonra azalmış olsa da**,** 60. güne kadar H_2O_2 için amperometrik yanıt vermiştir. Bu sonuçlar NADH sensörü ile alınan sonuçlarla benzerlik göstermiştir. Tek kullanımlık olarak hazırlanan bir biyosensör için, bu uygulama kararlılığının iyi olduğu ve biyosensör formulasyonunda bulunan RGO, PNR ve AuNP'nin biyosensörün uygulama kararlılığını arttırdığı sonucuna varılabilir.

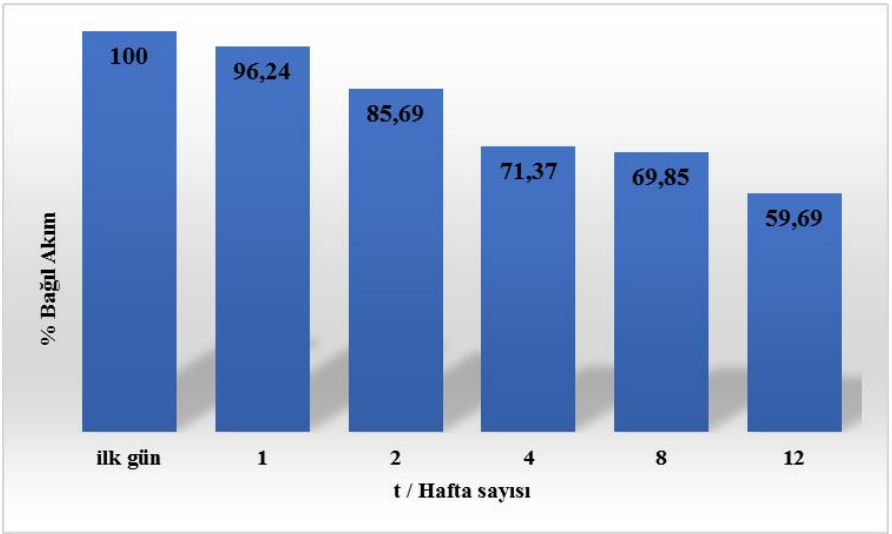


Şekil 3.20. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün 100 µM H_2O_2 derişimine karşı elde edilen yüzde bağıl akım değerleri-gün sayısı grafiği (-0,45 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

Çalışma şartlarında geliştirilen biyosensörün depolama kararlığını belirlemek için, hazırlanan biyosensörler +4°C'de sabit nem ortamında bekletilmiştir. Daha sonra bu biyosensörler ile sırasıyla 16. hafta boyunca -0,45 V'da amperometrik H_2O_2 tayini yapılmıştır. Amperometrik tayin sonucu elde edilen akım-konsantrasyon grafiği ve akım değerleri-hafta sayısı grafiği sırasıyla Şekil 3.21 ve Şekil 3.22'de verilmiştir. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün 12. haftaya kadar H_2O_2'ye karşı yanıt verdiği görülmektedir. %Bağıl akım verileri incelendiğinde H_2O_2'nin ilk gün analizine kıyasla biyosensörün amperometrik cevabı 1. haftanın sonunda %3,26, 4. haftanın sonunda %28,63 ve 8. haftanın sonunda %30,15 oranında azalmıştır. 16. haftanın sonunda yapılan amperometrik tayinde ise akım kararlılığının azalması nedeniyle düzgün bir yanıt alınamamış ve bu nedenle veriler grafiklerde verilmemiştir. Biyosensörün 12. haftanın sonunda duyarlığının % 40,31'ini koruduğu görülmektedir.



Şekil 3.21. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün farklı depolama zamanlarında 100 µM H_2O_2 derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (-0,45 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)



Şekil 3.22. SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün 100 µM H2O2 derişimine karşı elde edilen akım değerleri-hafta sayısı grafiği (-0,45 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

3.6.4 Girişim Testi

H_2O_2'nin SPCE/RGO/PNR/AuNP sensörleri ile amperometrik tayini, girişim yapan türlerin etkisini incelemek için, NADH, DA, AA ve UA varlığında yapılmıştır. H_2O_2'nin -0,45 V'daki amperometrik tayinine hiçbir analit girişim yapmamıştır.

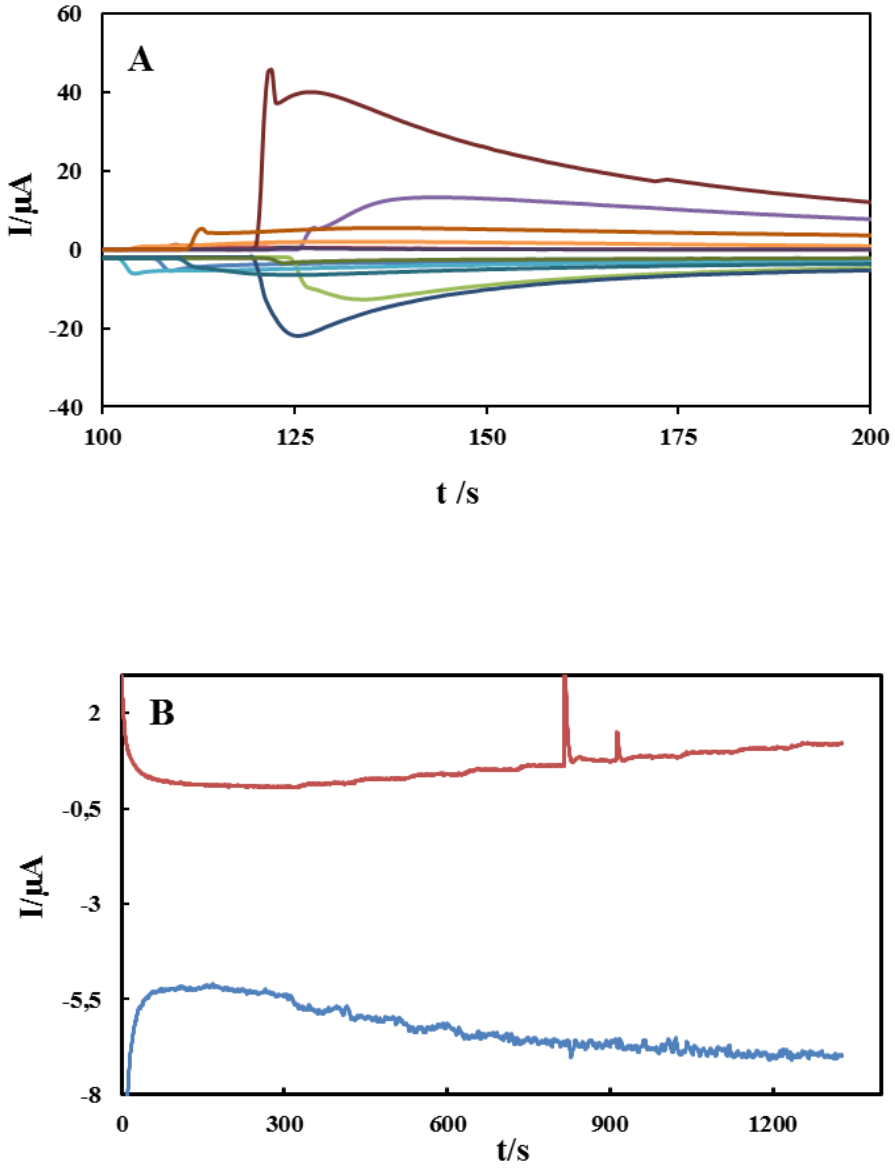
3.6.5 Gerçek numune analizi

Geliştirdiğimiz H_2O_2 biyosensörleri gerçek numune analizinde kullanılmıştır. Merk firmasında satın alınan insan kan serumu numunesi 1:100 oranında pH 7.4 tampon çözelti ile seyreltilmiştir. Kan serumu numunesine bilinen konsantrasyonda H_2O_2 ilave edilerek H_2O_2 içeren yapay kan serumu numuneleri hazırlanmıştır. 100 µM H_2O_2 içeren kan serumu numunelerinin SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile amperometrik tayini -0,45 V'da üç kez tekrarlanarak yapılmıştır. Yapılan analiz sonucuna göre deneysel olarak hesaplanan H_2O_2 konsantrasyonu 101,2 ± 0,12 ve geri kazanım %101,2 olarak bulunmuştur.

3.7. NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı amperometrik tayini ve analitiksel karakterizasyonu

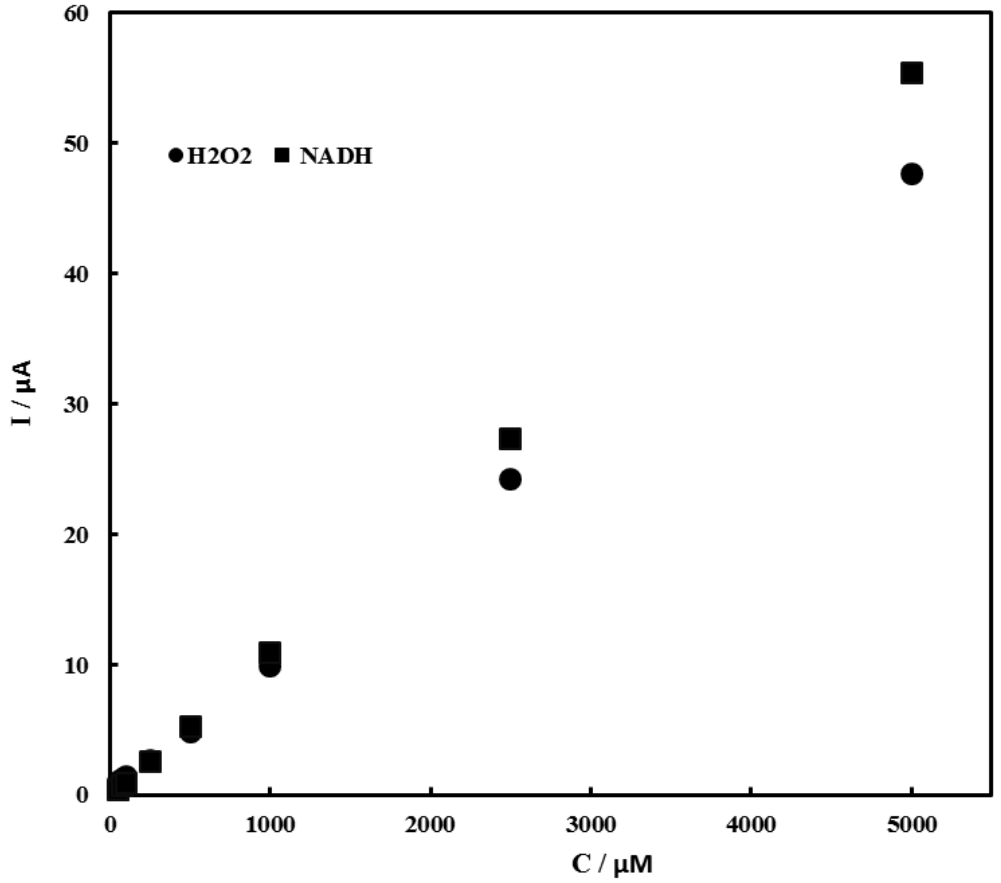
Çalışmamın bu kısmında, önceki bölümlerde elektrokimyasal karakterizasyonları yapılmış olan elektrot formulasyonları kullanılarak ikili SPCDE/RGO/PNR/AuNP elektrotları hazırlanmış ve bu elektrotlar ile NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı amperometrik tayini yapılmıştır. Eş zamanlı amperometrik tayin, önceki bölümlerde NADH ve H_2O_2'nin tayini için belirlenmiş olan optimum çalışma koşullarında gerçekleştirilmiştir. Batch analizlerde NADH ve H_2O_2'nin eşzamanlı amperometrik tayini, içerisinde 9 ml 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu bulunan elektrokimyasal hücrede, çözeltinin sabit hızda sürekli karıştırıldığı şartlarda +0,150 V ve -0,450 V'da gerçekleştirilmiştir. Akım kararlı hale geldikten sonra, sabit konsantrasyonlardaki NADH ve H_2O_2 elektrokimyasal hücreye ardışık olarak katılmıştır. Kararlı hal akım cevabı ölçülmüş ve zamana karşı akım değerleri potantiyostat tarafından kaydedilmiştir.

Damlamalı analizlerde NADH ve H_2O_2'nin eşzamanlı amperometrik tayini ise, elektrot yüzeyine sabit konsantrasyonda 100 µL analitlerin ilavesi ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.23A ve B'de sırasıyla damlamalı analizler ve batch analiz ile NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı amperometrik tayin için elde edilen örnek kronoamperogramlar verilmiştir. NADH ve H_2O_2 konsantrasyonları arttıkça zamanla akımda bir artış olduğu kronoamperogramlardan anlaşılmaktadır.



Şekil 3.23. SPCDE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile NADH ve H2O2'nin a) damlamalı analiz b) batch analiz ile eş zamanlı tayinleri sonucu farklı NADH ve H2O2'nin derişimlerinde elde edilen örnek kronoamperogramlar (+0,15 V ve -0,45 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

Damlamalı analiz ile NADH ve H_2O_2'nin eşzamanlı amperometrik tayini sonucu kronoamperogramlardan elde edilen akım değerlerinin NADH ve H_2O_2'nin konsantrasyonuna karşı çizilen grafiği Şekil 3.24'de verilmiştir. NADH ve H_2O_2 miktarlarının artması ile akım değerleri de doğru orantılı olarak artmıştır.



Şekil 3.24. SPCDE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı tayinleri sonucu NADH ve H_2O_2'nin derişimlerine karşı elde edilen akım grafikleri +0,15 V ve -0,45 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı amperometrik tayini için kullanılan SPCDE/RGO/PNR/AuNP biyosensörünün analitiksel karakterizasyonu için duyarlık, bağıl standart sapma, tayin ve gözlemlenebilme sınırı ve tekrarlanabilirlik gibi parametreler belirlenmiş ve Çizelge 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı amperometrik tayini için SPCE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile elde edilen analitiksel parametreler

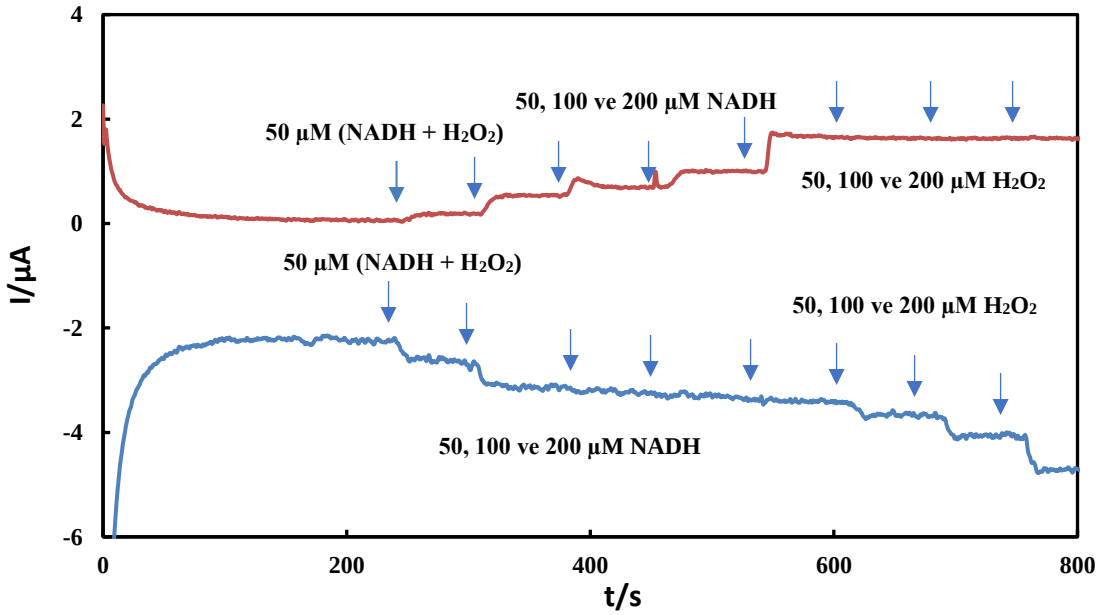
	NADH	H_2O_2
Tespit limiti	5,92 µM	12,5 µM
Tayin sınırı	19,74 µM	41,7 µM
Doğrusal aralık	19,74 µM – 5000 µM	41,7 µM – 5000 µM
Duyarlık	11,1 µA. mM^{-1}	9,47 µA. mM^{-1}
Tekrarlanabilirlik	RSD %2,31 (n=10), 200 µM NADH	RSD %3,26 (n=10), 200 µM H_2O_2

Önceki bölümlerde NADH ve H_2O_2'in amperometrik tayini için literatür karşılaştırması yapılmış ve Çizelge 3.4 ve 3.7'de verilmiştir. NADH ve H_2O_2'in eş zamanlı tayini için sadece bir çalışma bulunmaktadır. Baskar et al.(2012), NADH ve H_2O_2'nin duyarlıkları sırasıyla, 0,34 µA. mM^{-1} ve 0,13 µA. mM^{-1} , tespit limitleri ise sırasıyla 1.74 µM ve 26 µM olarak bulunmuştur.

Önceki bölümlerde, NADH ve H_2O_2 için depolama ve uygulama kararlılığı testleri yapıldığı için, NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı amperometrik tayininde bu testler tekrar yapılmamıştır.

3.7.1. Girişim Testi

NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı amperometrik tayinine, analitlerin birbiri ile girişim yapıp yapmadıklarını incelemek için, sabit konsantrasyondaki analitler tek başlarına ve karışım halinde çözeltiye eklenmiştir. Yapılan ölçüm sonucunda elde edilen kronoamperogram Şekil 3.25'de verilmiştir. 50 µM ve 100 µM NADH ve H_2O_2 karışımının çözeltiye ilavesi ile, eş zamanlı olarak anodik ve katodik pik akımları artmıştır. Sadece 50, 100 ve 200 µM NADH ilavesi ile sadece anodik pik akımlarının arttığı, katodik pik akımlarında herhangi bir artış olmadığı görülmüştür. Sadece 50, 100 ve 200 µM H_2O_2 ilavesi ile sadece katodik pik akımlarında artış olduğu Şekil 3.25'den anlaşılmaktadır. Bu sonuçlar göstermektedir ki, NADH ve H_2O_2'nin birlikte çözeltiye eklenmesi birbirlerine girişim yapmamaktadır.



Şekil 3.25. SPCDE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile NADH ve H_2O_2'nin batch analiz ile eş zamanlı tayin yönteminde analitlerin tek başlarına ve karışım halinde ilavesi ile elde edilen örnek kronoamperogramlar (+0,15 V ve -0,45 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

NADH ve H_2O_2'nin SPCDE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile eş zamanlı amperometrik tayini, girişim yapan türlerin etkisini incelemek için DA, AA ve UA varlığında yapılmıştır. Girişim testi sonuçları, NADH ve H_2O_2'nin sensör özelliklerinin incelendiği bölümdeki sonuçlarla benzer çıkmıştır. +0,15 V'da NADH'nin amperometrik tayinine AA ve DA girişim yaparken, UA girişim yapmamıştır. -0,45 V'daki amperometrik tayinine ise hiçbir analit girişim yapmamıştır.

3.7.2. Gerçek numune analizi

Geliştirdiğimiz ikili NADH ve H_2O_2 biyosensörleri gerçek numune analizinde kullanılmıştır. Merk firmasında satın alınan insan kan serumu numunesi 1:100 oranında pH 7.4 tampon çözelti ile seyreltilmiştir. Kan serumu numunesine bilinen konsantrasyonda NADH ve H_2O_2 ilave edilerek NADH ve H_2O_2 içeren yapay kan serumu numuneleri hazırlanmıştır. 200 µM NADH ve 200 µM H_2O_2 içeren kan serumu numunelerinin SPCDE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile amperometrik tayini +0,15 V ve -0,45 V'da eş zamanlı olarak üç tekrarlı yapılmıştır. Yapılan analiz sonucuna göre

deneysel olarak hesaplanan NADH ve H_2O_2 konsantrasyonları sırasıyla 204,3 ± 0,17 ve 198,1 ± 0,13 geri kazanımları ise sırasıyla %102,2 ve %99,05 olarak bulunmuştur.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

SPCE lerin yüzeyleri RGO'lar ile LBL yöntemi kullanılarak modifiye edilmiştir. RGO modifiyeli elektrotlar SEM ile karakterize edilmiştir. RGO'nun katmanlı, buruşuk yüzeyli ve birbirine benzer, rasgele dağılmış ince katmanlar ve dağınık halde üst üste binmiş yapısı gözlenmiştir ve bu görüntüler literatürle uyumludur. (A. Shalaby VD. 2015, Tiyek vd. 2016).

SPCE/RGO'lar üzerinde önce PNR polimerleştirilerek modifiye edilmiş, sonra AuNP ile modifiye edilmiştir. SPCE/RGO/AuNP elektrotları elektrokimyasal olarak karakterize edilmiştir. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrotlarının NADH ve H_2O_2'ye karşı elektrokatalitik aktivite gösterdiği gözlenmiştir. RGO üzerinde hazırlanmış PNR medyatörünün etkisiyle NADH varlığında anodik pik akımı önemli oranda artarken (34,238 µA'den 49,768 µA'e), katodik pik akımı azalması (22,195 µA'den 20,928 µA'e) NADH'nin elektrokimyasal davranışı için karakteristik bir özelliktir (Pariente vd 1996). NADH varlığında I_{pa} / I_{pc} oranı 2,34 iken NADH yokluğunda bu oran 1,54'e düşmektedir. Bu sonuçlar NADH'nin, PNR tarafından yükseltgendiğini belirtmektedir. NADH'nin anodik ve katodik pik potansiyelleri sırasıyla 74 mV ve -114 mV'dur. RGO, PNR ve AuNP'nin elektrot formulasyonunda birlikte yer alması NADH'nin elektroyükseltgenmesinde hem sinerjik bir etki göstererek elektrodun elektroaktif yüzey alanını artırarak elektronik iletkenliği ve elektrodun tersinirliğini artırmış, hem de NADH'nin elektroyükseltgenmesinde elektrokatalitik etki göstererek pik potansiyellerinin değerini azaltmıştır.

SPCE/RGO/PNR/AuNP'ler ile NADH ve H_2O_2'nin ayrı ayrı amperometrik tayini yapılmış ve bu tayin sonucunda gözlemlenebilme ve tayin sınırı, duyarlık ve tekrarlanabilirlik gibi analitiksel karakterizasyon parametreleri bulunmuştur. Yüksek duyarlık, düşük gözlemlenebilme değeri ve yüksek tekrarlanabilirliğe sahip düşük potansiyelde tayin yapılabilen yeni NADH ve H_2O_2 sensörleri başarıyla geliştirilmiştir.

NADH için yaptığımız analitiksel karaterizasyonlar sonucunda elde edilen tespit limiti 4,57 µM bulunmuştur. F,Ricci et al.(2005) 'nin yapmış olduğu çalışmada 0,5 µM, K,Lin

et al. (2011) yapmış olduğu çalışmada 5 µM, H.C,Chang et al. (2011) yapmış olduğu çalışmada 1,2 µM, L,Li et al.(2013) yaptığı çalışmada ise 6 µM olarak bulmuşlardır.

F,Ricci et al.(2005)' in yaptığı çalışmada optimum pH 7,4 NADH ve H_2O_2 sensörleri için pH optimizasyonu çalışması yapılmış ve optimum pH 7,0 olarak bulunmuştur.

Geliştirilen NADH ve H_2O_2 sensörleri için çalışma potansiyeli optimizasyonu çalışması yapılmış ve optimum çalışma potansiyelleri sırasıyla +0,15 V ve -0,45 V olarak bulunmuştur.

Sensörlerin uygulama kararlılığı için NADH ve H_2O_2'nin ayrı ayrı amperometrik tayinleri yapılmış ve 60. günün sonunda dahi NADH ve H_2O_2'e amperometrik yanıtlar alınmıştır.

Çalışma şartlarında geliştirilen NADH ve H_2O_2 sensörlerinin depolama kararlığını belirlemek için NADH ve H_2O_2 sensörlerinin depolama kararlılığı test edilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde sensörlerin 12.haftada dahil NADH ve H_2O_2'e karşı cevap verildiği görülmüştür.

Geliştirilen sensörlerinin NADH ve H_2O_2'nin ayrı ayrı amperometrik tayinine girişim yapan türlerin etkisi incelenmiştir. NADH'nin +0,150 V'daki amperometrik tayinine AA ve DA girişim yaparken, UA ve H_2O_2 girişim yapmamıştır. H_2O_2'nin amperometrik tayinine ise NADH, DA, AA ve UA analitleri girişim yapmamıştır. Geliştirilen sensörler kan serumu numunelerindeki NADH ve H_2O_2'nin tayininde kullanılmıştır. 100 µM NADH içeren kan serumu numunelerinin SPCE/RGO/PNR/AuNP sensörleri ile yapılan NADH analizi sonucunda, deneysel olarak hesaplanan NADH konsantrasyonu 102,3 ± 0,15 ve geri kazanım %102,3 olarak bulunmuştur. 100 µM H_2O_2 içeren kan serumu numunelerinin SPCE/RGO/PNR/AuNP sensörleri ile yapılan H_2O_2 analizi sonucunda deneysel olarak hesaplanan H_2O_2 konsantrasyonu 101,2 ± 0,12 ve geri kazanım %101,2 olarak bulunmuştur.

SPCDE/RGO/PNR/AuNP'ler ile NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı amperometrik tayinleri sırasıyla +0,15 V ve -0,45 V'da yapılmış ve bu tayin sonucunda gözlemlenebilme ve tayin sınırı, duyarlık ve tekrarlanabilirlik gibi analitiksel karakterizasyon parametreleri bulunmuştur. Yüksek duyarlık, düşük gözlemlenebilme değeri ve yüksek tekrarlanabilirliğe sahip yeni ikili NADH ve H_2O_2 sensörleri başarıyla geliştirilmiştir.

SPCDE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı amperometrik tayini, girişim yapan türlerin etkisini incelemek için DA, AA ve UA varlığında yapılmıştır. +0,15 V'da NADH'nin amperometrik tayinine AA ve DA girişim yaparken, UA girişim yapmamıştır. -0,45 V'daki amperometrik tayinine ise hiçbir analit girişim yapmamıştır. Girişim testi sonuçları, NADH ve H_2O_2'nin sensör özelliklerinin incelendiği bölümdeki sonuçlarla benzer çıkmıştır.

Geliştirdiğimiz ikili NADH ve H_2O_2 biyosensörleri gerçek numune analizinde kullanılmıştır. 200 µM NADH ve 200 µM H_2O_2 içeren kan serumu numunelerinin SPCDE/RGO/PNR/AuNP biyosensörleri ile amperometrik tayini +0,15 V ve -0,45 V'da eş zamanlı olarak yapılmıştır. Yapılan analiz sonucuna göre deneysel olarak hesaplanan NADH ve H_2O_2 konsantrasyonları sırasıyla 204,3 ± 0,17 ve 198,1 ± 0,13 geri kazanımları ise sırasıyla %102,2 ve %99,05 olarak bulunmuştur.

Çalışma sonunda hazırlanan SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun NADH ve H_2O_2'in eş zamanlı tayininde göstermiş olduğu yüksek elektrokatalitik etki, yüksek elektronik iletkenlik, yüksek duyarlılık ve gerçek numune analizleri sonuçları, bu elektrotun NADH ve H_2O_2'in eş zamanlı tayininde biyosensör olarak kullanılması için bir yenilik olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

Armstrong, F.A., Lanon, A.M. 1987. Fast interfacial electron transfer between cytochrome c peroxidase and graphite electrodes promoted by aminoglycosides: novel electroenzymic catalysis of hydrogen peroxide reduction, J. Am. Chem. Soc. 109, 7211–7212.

Baghayeri, M.,Zare, E.N., Namadchian, M. 2013. Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin immobilized on biocompatible poly(styrene-alternative-maleic acid)/functionalized multi-wall carbon nanotubes blends, Sensors Actuators B Chem. 188, 227–234.

Baghayeri, M., Zare, E.N., Lakouraj, M.M. 2014. Novel superparamagnetic PFu-Fe_3O_4 conductive nanocomposite as a suitable host for hemoglobin immobilization, Sensors Actuators B Chem. 202, 1200–1208.

Baghayeri, M., Zare, E.N., Lakouraj, M.M. 2014. A simple hydrogen peroxide biosensor based on a novel electro-magnetic poly(p-phenylenediamine)-Fe_3O_4 nanocomposite, Biosens. Bioelectron. 55, 259–265.

Baghayeri, M., Nazarzadeh Zare, E., Hasanzadeh, R. 2014. Facile synthesis of PSMA-g-3ABA/MWCNTs nanocomposite as a substrate for hemoglobin immobilization: application to catalysis of H_2O_2, Mater. Sci. Eng. C 39, 213–220.

Baghayeri, M., Zare, E.N., Lakouraj, M..M. 2015. Monitoring of hydrogen peroxide using a glassy carbon electrode modified with hemoglobin and a polypyrrole-based nanocomposite, Microchim. Acta 182, 771–779.

Baskar, S., Chang, J., Zen, J. 2012. Simultaneous detection of NADH and H_2O_2 using flow injection analysis based on a bifunctional poly(thionine)-modified electrode, Biosensors and Bioelectronics, 33, 95– 99.

Bilgi, M., Ayrancı, E. 2016. "Biosensor application of screen-printed carbon electrodes modified with nanomaterials and a conducting polymer: Ethanol biosensors based on alcohol dehydrogenase" Sensors and Actuators B: Chemical, 237, 849-855.

Birkmayer, G.D. 1993. NADH the energizing coenzyme. Good Health Guide. Keats Publishing, Los Angeles, pp. 1-2.

Cai, Y.Y., Li, H., Du, B., Yang, M.H., Li, Y., Wu, D., Zhao, Y.F., Dai, Y.X., Wei, Q. 2011. "Ultrasensitive electrochemical immunoassay for BRCA1 using BMIM_BF4 coated SBA-15 as labels and functionalized graphene as enhancer", Biomaterials, 32, 2117–2123.

Castro-Marrero, J., Cordero, M.D., Segundo, M.J., Sáez-Francàs, N., Calvo, N., Román-Malo, L., Aliste, L., Fernández de Sevilla, T., Alegre, J. 2014. Antioxidants & Redox Signaling, 22, 679–685.

Chen, W., Cai, S., Ren, Q.Q., Wen, W. , Zhao, Y.D. 2012. Recent advances in electrochemical sensing for hydrogen peroxide: a review, Analyst 137, 49–58.

Chen, S., Yuan, R., Chai, Y., Hu, F. 2013. Electrochemical sensing of hydrogen peroxide using metal nanoparticles: a review, Microchim. Acta 180, 15–32.

Chi, Q., Dong, S. 1994. Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide coenzymes at Methylene Green-modified electrodes and fabrication of amperometric alcohol biosensors, Anal. Chim. Acta, 285, 125.

Darder, M., Takada, K., Pariente, F., Lorenzo, E., Abruna, H.D. 1999. Dithiobissuccinimidyl propionate as an anchor for assembling peroxidases at electrodes surfaces and its application in a H_2O_2, Anal. Chem. 71, 5530–5537.

Ensafi, A.A., Jafari-Asl, M., Rezaei, B. 2013. A novel enzyme-free amperometric sensor for hydrogen peroxide based on Nafion/exfoliated graphene oxide–Co_3O_4 nanocomposite, Talanta 103, 322–329.

Ensafi, A.A., Alinajafi, H.A., Jafari-Asl, M., Rezaei, B., Ghazaei, F. 2016. Cobalt ferrite nanoparticles decorated on exfoliated graphene oxide, application for amperometric determination of NADH and H_2O_2, Materials Science and Engineering C 60, 276–284.

Ersoy M.S., Dönmez U., Yildiz K., Salan T., Yazici M., Tiyek İ., Alma M.H., (2015), Graphene Applied Textile Materials for Wearable E-Textiles, 5th International Istanbul Textile Congress 2015: Innovative Technologies "Inspire To Innovate, pp. 82-86, 11th -12th September 2015, Istanbul Technical University, Istanbul, Turkey,

Farghali, A.A., Bahgat, M., Rouby, El, W.M.A., Khedr, M.H., 2013. Preparation decoration and characterization of graphene sheets for methyl green adsorption, 555, 193-200.

Gao, Q., Cui, X., Yang, F., Ma, Y., Yang, X., 2003. Preparation of poly(thionine) modified screen-printed carbon electrode and its application to determine NADH in flow injection analysis system, Biosens. Bioelectron. 19, 277–282.

Gorton, L., 1986. Chemically modified electrodes for the electrocatalytic oxidation of nicotinamide coenzymes, J. Chem. Soc., Faraday Trans. I 82, 1245–1258.

Gorton, L., Domínguez, E. 2002. Electrocatalytic oxidation of NAD(P)H at mediator-modified electrodes, Rev. Mol. Biotechnol. 82, 371–392.

He, X., Hu, C., Liu, H., Du, G., Xi, Y., Jiang, Y. 2010. Building Ag nanoparticle 3D catalyst via Na2Ti3O7 nanowires for the detection of hydrogen peroxide, Sensors Actuators B Chem. 144, 289–294.

Hsiao, M.C., Liao, S.H., Lin, Y.F., Wang, C.A., Pu, N.W., Tsai H.M., and Ma, C.C.M., (2011), Preparation and Characterization of Polypropylene-Grafted-Termally Reduced Graphite Oxide with an Improved Compatibility with Polypropylene-Based Nanocomposite, Nanoscala, 3, 1516-1522.

Hogg, D.McC., Jago, G.R., 1970. The oxidation of reduced nicotinamide nucleotides by hydrogen peroxide in the presence of lactoperoxidase and thiocyanate, iodide or bromide, Biochem. J. 117, 791–797.

Hrapovic, S., Liu, Y., Male, K.B., Luong, J.H.T. 2004. Electrochemical biosensing platforms using platinum nanoparticles and carbon nanotubes, Anal. Chem., 1083–1088.

Huang, J., Wang, D., Hou, H., You, T. 2008. Electro spun palladium nanoparticle-loaded carbon nanofibers and their electrocatalytic activities towards hydrogen peroxide and NADH, Adv. Funct. Mater. 18, 441–448.

Jeong, H., Ahmed, M.S., Jeon, S. 2011. Poly-cobalt [tetrakis (o-aminophenyl) porphyrin] nanowire and single-walled carbon nanotube for the analysis of hydrogen peroxide, J. Nanosci. Nanotechnol. 11, 987–993.

Jia, X., Liu, Z., Liu, N., Ma, Z. 2014. "A label-free immunosensor based on graphene nanocomposites for simultaneous multiplexed electrochemical determination of tumor markers" Biosensors and Bioelectronics 53, 160–166.

Jiang, R., Bommarius, A.S., 2004. Hydrogen peroxide-producing NADH oxidase (nox-1) from Lactococcus lactis Tetrahedron: Asymmetry 15, 2939–2944.

Katz, E., Willner, I., Wang, H. 2004. "Electroanalytical and Bioelectroanalytical Systems Based on Metal and Semiconductor Nanoparticles", Electroanal, 16, 19-44.

Kumar, S.A., Chen, S.M. 2007. Electrocatalysis and Amperometric Detection of the Reduced Form of Nicotinamide Adenine Dinucleotide at Toluidine Blue/Zinc Oxide Coated Electrodes, Electroanal. 19, 1952-1958.

Li, W.R., Wu, L.X., Song, X.F., Hu, Y., Wang, S., Li, X., Guo, Z.Y., 2016. "Ultrasensitive and visual detection of squamous cell carcinoma antigen based on a silver-enhanced sandwich immunoassay using AuNPsg-C_3N_4 nanocomposites", Sens. Actuators B 235, 670‑677.

Lin, K., Li, Y., Chen, S. 2013. Electrochemical determination of nicotinamide adenine dinucleotide and hydrogen peroxide based on poly(xanthurenic acid), flavin adenine dinucleotide and functionalized multi-walled carbon nanotubes, Sensors and Actuators B 184, 212– 219.

Liu, C., Alwarappan, S., Chen, Z.F., Kong, X.X., Li, C.Z. 2010. "Membraneless enzymatic biofuel cells based on graphene nanosheets", Biosens. Bioelectron., 25, 1829–1833.

Marcano D.C., Kosynkin D.V., Berlin J.M., Sinitskii A., Sun Z., Slesarev A., Alemany L.B., Lu W. and Tour J.M., (2010), Improved Synthesis of Graphene Oxide, American Chemical Society ACS Nano, 4(8), 4806-4814.

Meng, L., Wu, P., Chen, G., Cai, C., 2008. Low Overpotential Detection of NADH and Ethanol Based on Thionine Single Walled Carbon Nanotube Composite, J. Electrochem. Soc. 155, F231–F236.

Patil, A.J., Vickery, J.L., Scott, T.B., Mann, S. 2009. "Aqueous stabilization and selfassembly of graphene sheets into layered bio-nanocomposites using DNA", Adv.Mater., 21, 3159–3164.

Park, S., and Ruoff, R., (2009), Chemical Methods for The Production of Graphene, Nature Nanotechnology, 4, 217-224.

Paulukaite, R., Brett, C.M.A. 2008. "Poly(neutral red): Electrosynthesis, Characterization, and Application as a Redox Mediator", Electroanal, 20, 1275-1285.

Radoi, A., Compagnone, D., Devic, E., Palleschi, G., 2007. Low potential detection of NADH with Prussian Blue bulk modified screen-printed electrodes and recombinant NADH oxidase from *Thermus thermophilus* Sens. Actuators B 121,501–506.

Ryu S.H., and Shanmugharaj, A.M., (2014), Influence of LongChain Alkylamine-Modified Graphene Oxide on The Crystallization, Mechanical and Electrical Properties of Isotactic Polypropylene Nanocomposites, Chemical Engineering Journal, 244, 553-560.

Sahin, M., Ayrancı, E. 2015. "Electrooxidation of NADH on Modified Screen-Printed Electrodes: Effects of Conducting Polymer and Nanomaterials", Electrochimica Acta, 166, 261–270.

Sahelian, R. NADH supplement benefit, side effects, 5 mg, 10 mg and 20 mg tablets, fatigue. URL: (http://www.raysahelian.com/nadh.html).

Shan, C.S., Yang, H.F., Song, J.F., Han, D.X., Ivaska, A., Niu, L. 2009. “Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on graphene”, Anal. Chem., 81, 2378–2382.

Stankovich, S., Dikin, D.A., Dommett, G.H.B., Kohlhaas, K.M., Zimney, E.J., Stach, E.A., Piner, R.D., Nguyen, S.B.T., Ruoff, R.S. 2006. “Graphene based composite materials”, Nature, 42, 282–286.

Stein, A.E., 2012. Fragmemts: Coping with Attention Deficit Disorde, Routledge, London.

Vogel, A.I. 1989. Textbook of Quantitative Chemical Analysis, Longman, UK.

Votyakova, T.V., Reynolds, I.J., 2004. Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation, Arch. Biochem. Biophys. 431, 138–144.

Yanez-Sedeno, P., Pingarron, J.M. 2005. “Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors”. Anal Bioanal Chem, 382, 884-886.

Zhou Y., Bao Q., Tang L.A.L., Zhong Y., Loh K.P., (2009), Hydrothermal Dehydration For The “Green” Reduced of Exfoliated Grephene Oxide To Graphene and Demonstration of Tunable Optical Limiting Properties, Chemistry of Materials, 21(13), 2950-2956.

Xu, G., Dong, S. 1999. Chemiluminescence determination of luminol and hydrogen peroxide using hematin immobilized in the bulk of a carbon paste electrode, Electroanalysis 11, 1180–1184.

Wang, Y., Lu, J., Tang, L.H., Chang, H.X., Li, J.H. 2009. “Graphene oxide amplified electrogenerated chemiluminescence of quantum dots and its selective sensing for glutathione from thiol-containing compounds”, Anal. Chem., 81, 9710–9715.

Wang, J., Chatrathi, M.P., Ibanez, A., 2001. Glucose biochip: dual analyte response in connection to two pre-column enzymatic reactions, Analyst 126, 1203–1206.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	:	Eda KIYMAZ ONAT
Doğum Yeri	:	ÇANKIRI
Doğum Tarihi	:	13/01/1989
Medeni Hali	:	Evli
Yabancı Dili	:	İngilizce
Adres	:	Aksu Mah. Çelebi Sok. No:61
Tel	:	0.534.074.34.44
E-posta	:	edaakiymaz@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise	:	Çankırı Anadolu Lisesi
Lisans	:	Çankırı Karatekin Üniversitesi
Yüksek Lisans	:	Karatekin Üniversitesi/Fen Bilimleri Ens.

Uluslararası Kongreler:

1. Melike Bilgi Kamac, Eda Kıymaz Onat, Merve Yılmaz, "Electrooxidation of NADH on Screen-Printed Electrode Modified with Gold Nanoparticles/Polyneutralred/Reduced Graphene Oxide". 4th International Congress on Biosensors, Çanakkale, Turkey, 08-11 July 2019, oral presentation.
2. Melike Bilgi Kamac, Merve Yılmaz, Eda Kıymaz Onat "NADH ve H_2O_2'nin eş zamanlı tayini için yeni elektrokimyasal biyosensör sisteminin geliştirilmesi**"**, 2th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Science, Ankara, Turkey, 28-29 June 2019, oral presentation
3. Melike Bilgi Kamac, Merve Yılmaz, Eda Kıymaz Onat "Amperometric H_2O_2 biosensor based on screen-printed electrode modified with reduced graphene oxide,

polyneutralred and gold nanoparticles", 4th International Congress on Biosensors, Çanakkale, Turkey, 08-11 July 2019, poster presentation.