

Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi Kullanarak Biyosensör Geliştirilmesinin
İncelenmesi

Yücel Koç

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kasım 2021

Investigation of Biosensor Development by using Electrochemical Impedance
Spectroscopy

Yücel Koç

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Chemical Engineering

November 2021

Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi Kullanarak Biyosensör Geliştirilmesinin
İncelenmesi

Yücel Koç

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Proses ve Reaktör Tasarımı Bilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Hüseyin Avcı

Bu tez ESOGÜ BAP tarafından 2018-2065 no'lu proje çerçevesinde desteklenmiştir.

Kasım 2021

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre Doç. Dr. Hüseyin Avcı danışmanlığında hazırlamış olduğum “Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi Kullanarak Biyosensör Geliştirilmesinin İncelenmesi” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın bütün aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri, akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 25/12/2021

Yücel Koç

İmza

ÖZET

Gıda güvenliği ve kalitesi, hızla değişen yemek alışkanlıkları nedeniyle giderek daha önemli hale gelmektedir. Gıda ürünleri içerisinde bulunabilen patojenler, toksinler ve farklı şekillerdeki kirleticiler insanlarda gıda kaynaklı hastalıklara neden olmakta ve ciddi tehditler oluşturmaktadır. Bu tez çalışmasında hayatımızda önemli bir yere sahip deniz ürünlerinde bulunan, insan sağlığı için son derece zararlı olan toksinlerinden olan domoik asit tespiti yapabilen bir elektrokimyasal bazlı biyosensör geliştirilmiştir.

Bu çalışmada öncelikle ekran baskılı altın elektrot (SPGE) ve ekran baskılı karbon elektrotların (SPCE) elektrokimyasal karakterizasyonları elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) kullanılarak yapılmış, daha sonra immobilizasyonu, rejenerasyonu ve seçiciliği incelenmiştir. SPGE kullanarak PBS ve hücre kültür medyası içeren ortamda domoik asit tespit çalışmaları yapılmış ve tayin limitleri (LOD) sırasıyla 2,9 ng/ml ve 4,28 ng/ml olarak bulunmuştur. SPCE'ler kullanarak yaptığımız çalışmalarda ise SPCE yüzeyine altın nanopartikül (AuNP) modifikasyonu yapılmamış ve yapılmış SPCE'ler ile domoik asit tayini yapabilen biyosensörler de geliştirilmiştir. AuNP modifikasyonu yapılmamış ve yapılmış SPCE'ler için domoik asit LOD sırasıyla 9,74 ng/ml ve 3,52 ng/ml olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Türkiye'de endüstrinin yoğun olduğu Marmara denizinden temin edilen hamsi, sardalya, midye ve Karadeniz'den yakalanan hamsi balığındaki domoik asit miktarı geliştirdiğimiz biyosensörler ile tespit edilmiş ve sonuçları ayrıntılı incelenmiştir.

Bu doğrultuda bu tezde aynı zamanda SPE'lerin mikro yüzeysel ve yapısal özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM), atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve enerji dağılımlı X-ışını (EDX) spektroskopisi ile araştırılmıştır. Sonuç olarak, yüksek hassasiyete sahip elektrokimyasal biyosensör başarıyla geliştirilmiş, detaylı elektrokimyasal ve toksin tayin analizleri EIS kullanılarak elde edilmiş ve sonuçlar detaylı olarak incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: biyosensör, elektrokimyasal empedans spektroskopisi, ekran baskılı elektrot, domoik asit

SUMMARY

Food safety and quality have recently become more and more important due to rapidly changing eating habits. Pathogens, toxins, and various types of pollutants that might be found in food products can cause foodborne illnesses and pose serious threats to humans. In this thesis, an electrochemical-based biosensor has been developed to detect domoic acid, one of the toxins found in seafood, which is extremely harmful to the human health.

In this study, electrochemical characterizations of screen-printed gold electrode (SPGE) and screen-printed carbon electrode (SPCE) biosensors were performed using electrochemical impedance spectroscopy (EIS), and then immobilization, regeneration and selectivity were investigated. Using the SPGE, domoic acid was detected in PBS solution and in cell culture medium, respectively with the limit of detection (LOD) values of 2.9 ng/ml and 4.28 ng/ml, respectively. Additionally, a gold nanoparticles (AuNPs) modification was carried out on the SPCE surface, afterwards a biosensor that can detect domoic acid was developed via unmodified and AuNPs modified SPCEs. LOD of domoic acid with unmodified and modified by AuNPs of SPCE surfaces were determined as 9.74 ng/mL and 3.52 ng/mL, respectively. In addition, the amount of domoic acid in anchovies, sardines, mussels in the Sea of Marmara of Turkey's heavy industrial areas and anchovy in the Black Sea were investigated and the results were examined in detail.

Accordingly, in this thesis, microsurface and structural properties of SPEs were also investigated by using scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), and energy-dispersive X-ray (EDX) spectroscopy techniques. As a result, a highly sensitive and selective electrochemical biosensor was successfully developed, and detailed electrochemical analysis and toxin detection were performed using EIS method.

Keywords: biosensor, electrochemical impedance spectroscopy, screen printed electrode, domoic acid

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	vi
SUMMARY.....	vii
TEŞEKKÜR.	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. BİYOSENSÖRLER.....	2
2.1. Biyosensörlerin Temel Bileşenleri.....	2
2.2. Biyosensörlerin Sınıflandırılması	3
2.2.1. Elektrokimyasal biyosensörler.....	3
2.2.2. Optik biyosensörler.....	4
2.2.3. Piezoelektrik biyosensörler.....	4
2.2.4. Enzimatik biyosensörler.....	5
2.2.5. DNA ve RNA biyosensörleri.....	6
2.3. Biyosensörlerin Avantajları ve Dezavantajları.....	7
3. GIDA GÜVENLİĞİ VE DOMOİK ASİT	9
4. ELEKTROKİMYASAL EMPEDANS SPEKTROSKOPİSİ (EIS)	12
4.1. Eşdeğer Devre Modelleri ve Elemanları.....	15
4.1.1. Elektrolit direnci.....	16
4.1.2. Şarj transfer direnci.....	16
4.1.3. Çift tabaka kapasitansı	17
4.1.4. Sabit faz elemanı.....	17
5.MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
5.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Malzemeler	19
5.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Elektrotlar	19
5.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar.....	20
5.3.1. Potensiyostat cihazı	20
5.3.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM).....	21
5.3.3. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM).....	21
5.4. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar.....	22
5.5. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar.....	23

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
6.BULGULAR VE TARTIŞMA	25
6.1. Ekran Baskılı Elektrotların Elektrokimyasal Analizi.....	25
6.1.1. Ekran baskılı altın elektrotun elektrokimyasal analizi.....	25
6.1.2. Ekran baskılı karbon elektrotun elektrokimyasal analizi	29
6.2. Ekran Baskılı Elektrotların Yüzey Karakterizasyonu	53
6.2.1. Ekran baskılı altın elektrotun yüzey karakterizasyonu	53
6.2.1.1. <u>Ekran baskılı altın elektrotun SEM analizi sonuçları</u>	53
6.2.1.2. <u>Ekran baskılı altın elektrotun EDX analizi sonuçları</u>	54
6.2.1.3. <u>Ekran baskılı altın elektrotun AFM analizi sonuçları</u>	57
6.2.2. Ekran baskılı karbon elektrotun yüzey karakterizasyonu.....	59
6.2.2.1. <u>Ekran baskılı karbon elektrotun SEM analizi sonuçları</u>	59
6.2.2.2. <u>Ekran baskılı karbon elektrotun EDX analizi sonuçları</u>	61
6.2.2.3. <u>Ekran baskılı karbon elektrotun AFM analizi sonuçları</u>	65
6.3. Ekran Baskılı Altın Elektrot Yüzeyine Altın Nanopartikül Modifikasyonun Elektrokimyasal Analizi ve Karakterizasyonu.....	66
6.4. Ekran Baskılı Karbon Elektrot Yüzeyine Karbon Nanopartikül Modifikasyonun Elektrokimyasal Analizi ve Karakterizasyonu.....	67
6.5. Ekran Baskılı Altın Elektrotun Yüzeyinin Biyofonksiyonelleştirilmesi ve Domoik Asit Tayini.....	70
6.6. Ekran Baskılı Karbon Elektrotun Yüzeyinin Biyofonksiyonelleştirilmesi ve Domoik Asit Tayini.....	73
6.7. Ekran Baskılı Elektrotların Yüzeylerinin Rejenerasyonu	76
6.8. Ekran Baskılı Elektrotların Seçiciliği	77
6.9. Çeşitli Deniz Canlılarındaki Domoik Asit Tayini.....	81
7. SONUÇ VE ÖNERİLER	84
KAYNAKLAR DİZİNİ	86

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Biyosensörlerin genel şematik gösterimi.....	2
2.2. Optik biyosensörlerin şematik gösterimi.....	4
2.3. Piezoelektrik biyosensörlerin şematik gösterimi.....	5
2.4. Enzimatik biyosensörlerin şematik gösterimi.....	6
2.5. DNA biyosensörlerin şematik gösterimi.....	6
3.1. Domoik asitin kimyasal yapısı.....	9
3.2. Nanomalzemelerle modifiye edilmiş ekran baskılı elektrotların (NM-SPE) ve ön işleme tabi tutulmuş SPE'lerin optimizasyonu ve domoik asit tespit çalışmalarının şematik gösterimi	11
4.1. Elektrokimyasal sistemlerde en çok kullanılan eşdeğer devre modellerinin gösterimi.....	15
4.2. Elektrokimyasal sistemlerde en çok kullanılan eşdeğer devre modellerinin gösterimi.....	15
4.3. Elektrokimyasal sistemlerde en çok kullanılan eşdeğer devre modellerinin gösterimi.....	15
5.1. Ekran baskılı elektrotlar, a) ekran baskılı karbon elektrot, b) ekran baskılı altın elektrot.....	20
5.2. a) Gamry Reference 3000 potentiostat/galvanostat/ZRA cihazı, b) Faraday kafesi içerisinde düzeneğe yerleştirilmiş elektrot ve konnektör.....	20
5.3. Hitachi Regulus 8230 marka FE-SEM-EDX cihazı.....	21
5.4. Ambios Q-Scope 350 marka AFM cihazı.....	21
5.5. SPGE üzerine AuNP modifikasyonunun şematik gösterimi.....	23
5.6. Ekran baskılı karbon elektrot üzerine AuNPs modifikasyonunun şematik gösterimi, a) pozitif yüklenmiş elektrot yüzeyi, b) AuNPs modifiye edilmiş elektrot yüzeyi.....	24
6.1. a) SPGE kullanılarak farklı derişimlerdeki $K_3Fe(CN)_6$ ve 0,1 M KCl inkübe edilmesi sonucu 0,1 Hz ile 10 kHz frekans aralığında elde edilen Nyquist grafiği, b) eşdeğer elektrik devre modeli.....	25
6.2. SPGE üzerine ayrı ayrı inkübe edilen redoks problemlerinin empedans yanıtları, a) R_e , elektrolit direnci, b) R_{ct} , şarj aktarım direnci, c) Q, kapasitans değeri, d) α , yüzey pürüzlülük değeri ve akım dağılımı, e) A_w , Warburg empedansı katsayısı.	26

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
6.3. a) elde edilen döngüsel voltamogramın pik akımlarını ve pik potansiyellerinin gösterimi, b) döngüsel voltametri ile SPCE arayüzü arasındaki elektron transferinin şematik gösterimi.	30
6.4. $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$ ve $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks problemlerinin $-0,3$ V ve $0,5$ V potansiyel aralığında ve 100 mV/s tarama hızında elde edilen döngüsel voltamogramları, a) $0,01$ mM, b) $0,1$ mM, c) 1 mM, d) 10 mM, e) 100 mM.	31
6.5. SPCE'nin elektrot ile elektrolit ara yüzeyindeki elektron transferinin, eşdeğer elektrik devresi ile birlikte şematik gösterimi.	33
6.6. Eşdeğer devre modelleri; a) Warburg elemanı içeren, b) Warburg elemanı içermeyen modellerin gösterimi	34
6.7. a) SPCE kullanılarak farklı derişimlerdeki $K_3Fe(CN)_6$ inkübe edilmesi sonucu $0,1$ Hz ile 10 kHz frekans aralığında elde edilen Nyquist grafiği, b) yüksek frekans bölgesinin yakınlaştırılmış Nyquist grafiği.	35
6.8. $K_3Fe(CN)_6$ 'nin farklı derişimlerdeki empedans yanıtlarının iki farklı model ile ayrıntılı incelemesi, a) 100 mM $K_3Fe(CN)_6$, b) 10 mM $K_3Fe(CN)_6$, c) 1 mM $K_3Fe(CN)_6$, d) $0,1$ mM $K_3Fe(CN)_6$, e) $0,01$ mM $K_3Fe(CN)_6$, i) Nyquist grafiği ii) Bode grafiği, iii) R_s elektrolit direnci, iv) R_{ct} şarj aktarım direnci, v) Q , kapasitans değeri, vi) α , sabit faz elemanı katsayısı, vii) A_w , warburg empedansı katsayısı.....	36
6.9. a) SPCE kullanılarak farklı derişimlerdeki $K_4Fe(CN)_6$ inkübe edilmesi sonucu $0,1$ Hz ile 10 kHz frekans aralığında elde edilen Nyquist grafiklerinin karşılaştırılması, b) yüksek frekans bölgesinin yakınlaştırılmış Nyquist grafiği.....	40
6.10. $K_4Fe(CN)_6$ 'nin farklı derişimlerdeki empedans yanıtlarının iki farklı model ile ayrıntılı incelemesi, i) Nyquist grafiği; a) 100 mM $K_4Fe(CN)_6$, b) 10 mM $K_4Fe(CN)_6$, c) 1 mM $K_4Fe(CN)_6$, d) $0,1$ mM $K_4Fe(CN)_6$, e) $0,01$ mM $K_4Fe(CN)_6$ ve içerisinde A ve B devre mod modellerine göre fit dataları, ii) $K_4Fe(CN)_6$ 'nin Bode grafiği, Kramers-Kronigin test edilmesi. Nyquist grafiği empedans yanıtları; iii) R_s elektrolit direnci, iv) R_{ct} şarj aktarım direnci, v) Q , kapasitans değeri, vi) α , sabit faz elemanı katsayısı, vii) A_w , warburg empedansı katsayısı.	41
6.11. a) SPCE kullanılarak farklı derişimlerdeki $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ inkübe edilmesi sonucu $0,1$ Hz ile 10 kHz frekans aralığında elde edilen Nyquist grafiklerinin karşılaştırılması, b) yüksek frekans bölgesinin yakınlaştırılmış Nyquist grafiği.	45

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sekil

Sayfa

- 6.12. $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 'nin farklı derişimlerdeki empedans yanıtlarının iki farklı model ile ayrıntılı incelemesi, i) Nyquist grafiği; a) 100 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, b) 10 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, c) 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, d) 0,1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, e) 0,01 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ ve içerisinde A ve B devre modellerine göre fit dataları, ii) Bode grafiği of $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, Kramers-Kronigin test edilmesi. Nyquist grafiği empedans yanıtları; iii) R_s elektrolit direnci, iv) R_{ct} şarj aktarım direnci, v) Q, kapasitans değeri, vi) α , sabit faz elemanı katsayısı, vii) A_w , warburg empedans katsayısı.....46
- 6.13. $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$ ve $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks problemlerinin empedans sonuçlarının eşdeğer devre modeline göre modellenmesi sonucu elde edilen regresyon sonuçları; a) R_s , Elektrolit direnci, b) R_{ct} , Şarj transfer direnci, c) Q, CPE sabiti, d) α , CPE katsayısı, e) Warburg elemanı katsayısı..... 50
- 6.14. a) İşlem görmemiş, b) biyofonksiyonelleştirilmiş, c) rejenerasyon ve d) tekrardan biyofonksiyonelleştirilmiş SPGE'ye ait SEM görüntülerinin karşılaştırılması; i) referans elektrot, ii) çalışma elektrot, iii) karşıt elektrot. 54
- 6.15. a) ve b) işlem görmemiş, c) ve d) biyofonksiyonelleştirilmiş, e) ve f) rejenerasyon ve g) ve h) tekrardan biyofonksiyonelleştirilmiş durumdaki SPGE'nin SEM ve EDX analiz sonuçlarının karşılaştırılması; i) çalışma elektrotu, ii) karşıt elektrot, iii) referans elektrot..... 55
- 6.16. a) İşlem görmemiş, b) biyofonksiyonelleştirilmiş, c) rejenerasyon ve d) tekrardan biyofonksiyonelleştirilmiş SPGE'nin çalışma elektrotlarının AFM görüntüleri..... 58
- 6.17. a) İşlem görmemiş, b) biyofonksiyonelleştirilmiş, c) AuNPs/SPCE ve d) biyofonksiyonelleştirilmiş AuNPs/SPCE'ye ait SEM görüntülerinin karşılaştırılması; i) referans elektrot, ii) çalışma elektrot, iii) karşıt elektrot..... 60
- 6.18. a) işlem görmemiş, b) biyofonksiyonelleştirilmiş, c) AuNPs/SPCE ve d) biyofonksiyonelleştirilmiş AuNPs/SPCE durumdaki SPGE'nin SEM ve EDX analiz sonuçlarının karşılaştırılması; i) karşıt elektrotu, ii) çalışma elektrot, iii) referans elektrot..... 62
- 6.19. a) işlem görmemiş ve b) biyofonksiyonelleştirilmiş SPCE'nin çalışma elektrotlarının AFM görüntüleri..... 65

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
6.20. SPGE'nin bare ve 30,60, 90,120 ve 150 s AuNPs modifikasyonu sonrası 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ redoks probu inkubasyonu sonucu 10 kHz – 0,1 Hz frekans aralığındaki elde edilen Nyquist grafiğinin görüntüsü, b) Nyquist grafiği için eşdeğer randles devre modeli, c) R_{ct} katsayısı, e) Warburg elemanı katsayısı.....	66
6.21. a) Farklı biriktirme sürelerinde (50 s ile 400 s) 1 mM $K_3(Fe(CN)_6)/K_4(Fe(CN)_6)$ (PBS içerisinde) redoks probu kullanılarak elde edilen döngüsel voltamogramlar. b) Farklı biriktirme sürelerinde (50 s ile 400 s) 0,5 M H_2SO_4 redoks probu kullanılarak elde edilen döngüsel voltamogramlar, c) AuNPs modifikasyonu sonrası SPCE ve bare SPCE'nin 0,5 M H_2SO_4 redoks probu kullanılarak elde edilen döngüsel voltamogramlar, d) Farklı biriktirme sürelerinde katodik şarj değişimlerini gösteren histogram.....	68
6.22. a) işlem görmemiş ve b) AuNPs modifikasyonu yapılmış SPCE'nin çalışma elektrot bölgesinin SEM görüntüsü.	69
6.23. SPGE'nin immobilizasyon prosesinin şematik gösterimi: a) işlem görmemiş, b) SAM tabakasının oluşturulması, c) streptavidin, d) mAb-DA, e) hedef DA'nın yakalanması.....	70
6.24. SPGE'nin EIS yöntemi ile farklı DA konsantrasyonlarında 10 kHz – 0,1 Hz frekans aralığındaki; PBS ve hücre kültür ortamındaki Nyquist grafiği (a ve d), R_{ct} değişimlerinin (b ve e) ve kalibrasyon grafiklerinin (c ve f) karşılaştırılması.....	72
6.25. SPCE'nin immobilizasyon prosesinin şematik gösterimi: a) işlem görmemiş, b) yüzey aktivasyonu, c) SAM tabakasının oluşturulması, d) streptavidin, e) mAb-DA, f) hedef DA'nın yakalanması.....	74
6.26. SPCE'nin immobilizasyon prosesinin şematik gösterimi: a) işlem görmemiş, b) yüzey aktivasyonu, c) AuNP modifikasyonu d) SAM tabakasının oluşturulması, e) streptavidin, f) mAb-DA, g) hedef DA'nın yakalanması.....	75
6.27. SPCE'nin EIS yöntemi ile farklı DA konsantrasyonlarında 10 kHz – 0,1 Hz frekans aralığındaki; a) SPCE'nin Nyquist grafiği, b) AuNP/SPCE Nyquist grafiği, c) SPCE'nin R_{ct} değerleri, d) AuNP/SPCE'nin R_{ct} değerleri, e) SPCE'nin kalibrasyon grafiği, f) AuNP/SPCE'nin kalibrasyon grafiği.....	75
6.28. a) İşlem görmemiş SPGE'nin SEM görüntüsü, b) rejenerasyon işlemi uygulanmış SPGE'nin çalışma elektrot bölgesinin enine kesitinin SEM görüntüsü ve c) empedans yanıt sonuçları.....	77
7.29. Kimyasal yapıları, aspartik asit (A), domoik asit (B) ve L-glutamik asit (C).....	77

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 7.30. Ekran baskılı altın elektrotun seçiciliği; a) Nyquist formatında sunulan SPGE'nin PBS ve domoik aside empedans tepkilerinin karşılaştırılması, b) eşdeğer devre modellemesi ile elde edilen domoik asit-mAb, PBS ve domoik asidin yük transfer direnç değerleri, c) Nyquist formatında sunulan aspartik asit ve domoik asit için empedans tepkileri, d) eşdeğer devre modellemesi ile elde edilen domoik asit mAb, aspartik asit ve domoik asidin yük transfer direnç değerleri, e) glutamik asit için empedans tepkileri ve Nyquist formatında sunulan glutamik asit ve domoik asit için empedans tepkileri, (f) eşdeğer devre modellemesi ile elde edilen domoik asit-mAb, glutamik asit ve domoik asitin yük transfer dirençleri.....77
- 6.31. Marmara bölgesinden temin edilen hamsi balığının ekstraksiyonunun şematik gösterimi; a) deniz ürünleri, b) blender, c) homojenizatör, d) santrifüj, e) 0,22 µm filtreli şırınga, f) filtreden geçirilerek elde edilen deniz canlısı ekstraksiyonu. 81
- 6.32. SPGE kullanılarak EIS yöntemi ile deniz canlılarında DA tespiti için 10 kHz-0,1 Hz frekans aralığındaki elde Nyquist grafiği ve R_{ct} değerleri. 83

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
6.1. Empedans verileri için eşdeğer elektrik devresindeki simülasyon değerleri.	29
6.2. Farklı derişimdeki $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$ ve $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks problarının döngüsel voltametri sonuçları.....	32
6.3. SPCE kullanılarak farklı derişimlerdeki $K_3Fe(CN)_6$ inkübe edilmesi sonucu 0,1 Hz ile 10 kHz frekans aralığında elde edilen Nyquist grafiklerinin modellenmesi sonucu elde edilen data sonuçlarının karşılaştırılması.....	39
6.4. SPCE kullanılarak farklı derişimlerdeki $K_4Fe(CN)_6$ inkübe edilmesi sonucu 0,1 Hz ile 10 kHz frekans aralığında elde edilen Nyquist grafiklerinin modellenmesi sonucu elde edilen data sonuçlarının karşılaştırılması.....	44
6.5. SPCE kullanılarak farklı derişimlerdeki $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ inkübe edilmesi sonucu 0,1 Hz ile 10 kHz frekans aralığında elde edilen Nyquist grafiklerinin modellenmesi sonucu elde edilen data sonuçlarının karşılaştırılması.	49
6.6. SPGE'nin SEM/EDX analizi sonuçlarının karşılaştırması.	57
6.7. SPGE'nin SEM/EDX analizi sonuçlarının karşılaştırması.....	64

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
Ag	Gümüş
Al	Alüminyum
C	Karbon
Hz	Hertz
Ig	İmünoglobulin
K	Potasyum
kHz	Kilohertz
mAb	Monoklonal antibody
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mV/s	Milivolt/saniye
ng	Nanogram
S	Kükürt
N	Azot
R	Direnç
V	Volt
Z	Empedans
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
ω	Açısal Frekans
Ω	Ohm

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
AC	Alternatif Akım
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
ASP	Amnesik Kabuklu Zehirlenmesi
AuNPs	Altın Nano Partikülleri
SPGE	Ekran Baskılı Altın Elektrotlar
SPCE	Ekran Baskılı Karbon Elektrotlar
Cdl	Çift Tabaka Kapasitansı
CPE	Sabit Faz Elemanı
WE	Çalışma Elektrot
CE	Karşı Elektrot
RE	Referans Elektrot
CV	Döngüsel Voltametri
DA	Domoik Asit
DI	İyonları alınmış
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	Ribonükleik Nükleik Asit
EDX	Enerji Yayılımlı X Işını
EIS	Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi
FAO	Gıda Tarım Örgütü
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
EDC	N-(3-Dimetil aminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorür
NHS	N-Hidroksisüksinimit

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Modern dünyada gıda güvenliği ve kalitesi, hızla değişen yemek alışkanlıkları nedeniyle giderek daha önemli hale gelmektedir. Diğer taraftan, hızla kirlenen deniz ve su kaynakları sadece biyolojik çeşitliliği değil tüm hayatı olumsuz etkilemektedir. Yapılan araştırmalar, ilginç bir şekilde gıda kaynaklı salgın vakalarında, balık ürünlerinin ilk sırada olduğunu gözler önüne sermektedir. Balık ve deniz ürünleri, protein açısından zengin olup yağ içerikleri oldukça düşüktür. Bununla birlikte deniz ürünlerinin ve balıkların tüketimi birçok yemek kültürünün önemli bir parçası olmaktadır. Türkiye'de deniz ürünleri avcılığında deniz balıklarının üretim miktarlarına bakıldığında ilk sırada hamsi yer alırken ikinci sırada ise sardalya yer almaktadır. Gıda Ürünleri içerisinde bulunabilen patojenler, toksinler ve farklı şekillerdeki kirleticiler insanlarda gıda kaynaklı hastalıklara neden olmakta ve ciddi tehditler oluşturmaktadır. Günümüzde, bazı balık ve kabuklu deniz ürünleri domoik asit (DA) ve metil civa gibi bazı toksik maddelerin yüksek oranda bulunduğu belirtilmektedir. Deniz toksinlerinde DA, fitotoksinler grubunda yer alır ve suda çözünen güçlü nörotoksinlerdendir. DA belirli bir miktarın üzerinde tüketildiğinde baş dönmesine, baş ağrısına, nöbetlere, komaya ve hatta ölüme neden olabilmektedir. Bu ve buna benzer toksinleri belirlemek amacıyla bazı gelişmiş araçlar ve eğitimli personel gerektiren geleneksel tespit yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler zaman alıcı, zahmetli ve düşük verimlidir.

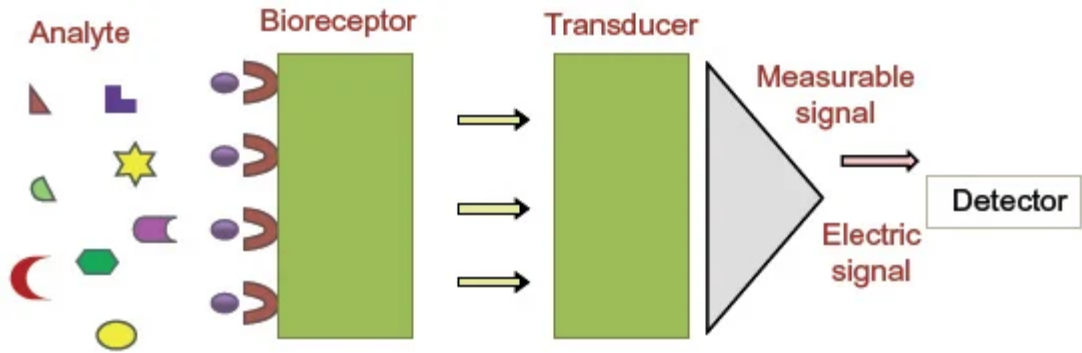
Bu doğrultuda bu tezde ekran baskılı elektrotların (SPE) elektrokimyasal karakterizasyonu, immobilizasyonu ve rejenerasyonu incelenmiş ve geliştirilen biyosensör ile hassas bir şekilde domoik asit tayini başarılı bir şekilde yapılmıştır. Ekran baskılı altın elektrot (SPGE) ve ekran baskılı karbon elektrot (SPCE)'nin yüzey fonksiyonelleştirmesi yapılmış, yüzeyde oluşan tabakalar elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ve döngüsel voltametri (CV) yöntemi ile incelenmiştir. SPE'lerin mikro yüzeysel ve yapısal özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM), atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve enerji dağılımlı X-ışını (EDX) spektroskopisi ile araştırılmıştır. Sonuç olarak, yüksek hassasiyet ve seçicilikte geliştirilen ve modifiye edilen biyosensörün detaylı elektrokimyasal analizi ve toksin tayin analizinin sonuçları çalışmamızda detaylı olarak incelenmiştir.

2. BİYOSENSÖRLER

Biyosensör teknolojisinin başlangıcı 1962 yılında Leland C. Clark'ın enzim elektrotunu geliştirmesiyle başlamıştır (Clark vd., 1962). Biyosensör terimi ise ilk olarak 1977 yılında araştırma sözlüğünde kullanılmıştır (Arora, 2013). Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC)'a göre biyosensör tanımı hedeflenen biyomolekülün bir dönüştürücü yardımı ile elektriksel sinyallere dönüştüren biyoanalitik bir cihazdır (Sun vd., 2010; Faridbod vd., 2014). Biyosensörler, patojenlerin, proteinlerin ve hedeflenen analitlerin hızlı tespit edilebilmesi için taşınabilir, çabuk sonuç verebilen, düşük maliyetli araçlardır (Koç vd., 2021a). Küresel biyosensör pazarı ekonomik olarak gittikçe artan bir değere sahip olmakla birlikte ve tüketici, sağlık ve endüstriyel testlerde sürekli gelişen disiplinlerarası araştırma alanıdır (Goode vd., 2015).

2.1. Biyosensörlerin Temel Bileşenleri

Biyosensörler kimyasal ve/veya biyolojik olarak tespit edilebilen bir sinyali elektrik sinyaline dönüştüren kimyasal ve/veya fiziksel dönüştürücü kullanarak entegre biyolojik bir algılama malzemesi içeren bir cihazdır (Banica, 2012). Biyosensörün temel bileşenlerinin şematik olarak gösterimi Şekil 2.1'de görülebilmektedir.



Şekil 2.1. Biyosensörlerin genel şematik gösterimi (Kumar ve Neelam, 2016).

Analit ve biyomolekül arasında gerçekleşen kimyasal reaksiyonun gerçekleştiği sensör platformu, bir dönüştürücünün yüzeyidir (Ciucu, 2014). Dönüştürücü, enerjiyi başka bir kimyasal enerjiye yani istenilen bir elektrik sinyaline dönüştürmektedir. Ayrıca elde edilen sinyali elektronik devrede kullanabilmek için sinyali kullanılabilir bir hale getirmek için de sinyali işlemektedir (Evtugyn vd., 1998; Karube ve Nomura, 2000).

2.2. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler kullanılan dönüştürücü türü, immobilizasyon tekniği gibi çeşitli parametreler dikkate alınarak sınıflandırılmaktadır. Elde edilen sinyali kimyasal, optik, kütle veya sıcaklık değişimi gibi tekniklerle dönüştürücü, elektrik sinyaline dönüştürmektedir. Çeşitli dönüştürücü türlerine ve/veya dönüştürülen sinyallere bağlı olarak, biyosensörler başlıca şu şekilde ayrılabilir: elektrokimyasal, optik, termal, piezoelektrik vb. gibi alt başlıklarda sınıflandırılabilmektedir (Kauffman, 2002; Faridbod vd., 2014).

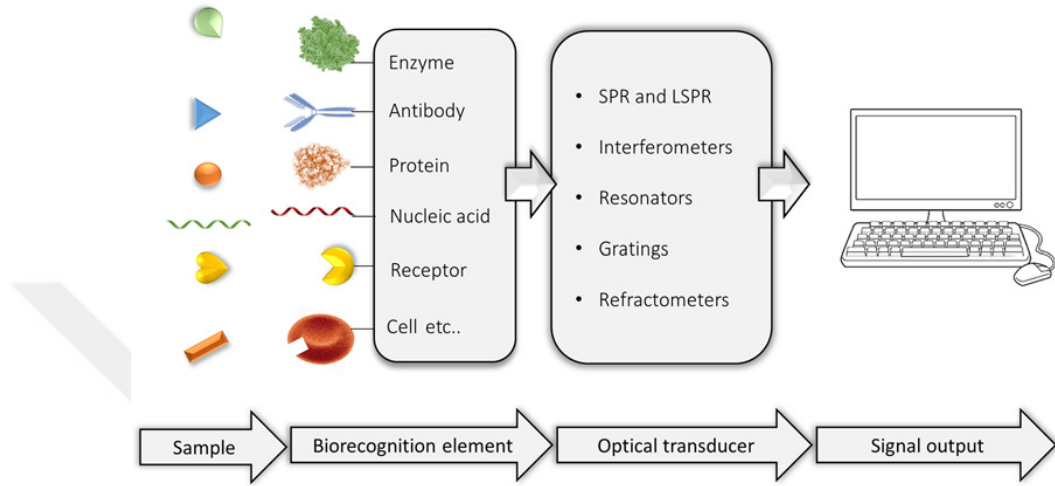
2.2.1. Elektrokimyasal biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, biyomolekül ile analit arasında gerçekleşen reaksiyonun elektrotların yüzeyinde kimyasal bir değişiklik ürettiğinde elektrik sinyali üretmektedir (Ho vd., 1999; Magalhaes vd., 1998). Elektrokimyasal biyosensörler farklı ölçüm tekniklerine alt başlıklara ayrılmaktadır. Bunlar amperometrik, kronoamperometri, potansiyometri, voltametrik ve impedimetrik gibi ölçüm tekniklerine göre sınıflandırılabilir.

Amperometrik elektrokimyasal biyosensörler, sabit uygulanan bir potansiyel altında biyokimyasal reaksiyondaki bir elektroaktif türün yükseltgenmesinden veya indirgenmesinden kaynaklanan akımın sürekli olarak ölçülmesine dayalı bir teknik olmaktadır (Eggins, 2002; Lippa vd., 2001). Kronoamperometrik elektrokimyasal biyosensörler, başka bir amperometrik teknik ile çalışan, elektrota kare dalga potansiyelinin uygulandığı ve kararlı haldeki yani sabit durumdaki akımının zamanın bir fonksiyonu olarak ölçüldüğü bir tekniktir. Potansiyometrik elektrokimyasal biyosensörler, sistemdeki hücre akımı sıfır olduğunda iki elektrot arasındaki elektriksel potansiyel farkının ölçülmesi tekniğine dayalı bir tekniktir (Chaubey vd., 2002; Orazio vd., 2003). Voltametrik elektrokimyasal biyosensörler, bir potansiyelin değiştirilmesi ve ardından ortaya çıkan akımın ölçülmesi yoluyla analitin miktarı ve varlığı hakkında bilgilerin elde edildiği bir tekniktir. Bir potansiyeli değiştirmenin birçok yolu olduğundan, voltametri yöntemlerinin kendi içerisinde de birçok alt başlıkta ölçüm teknikleri içermektedir.

2.2.2. Optik biyosensörler

Optik biyosensörler, optik ölçüm prensibini kullanan, bir ışık kaynağının beraberinde belirli niteliklere haiz bir ışık demeti meydana getirerek ve fotodedektörle birlikte algılayarak sensörün algılama merkezine yönlendirip işleyen biyosensörlere denir (Leatherbarrow vd., 1999).

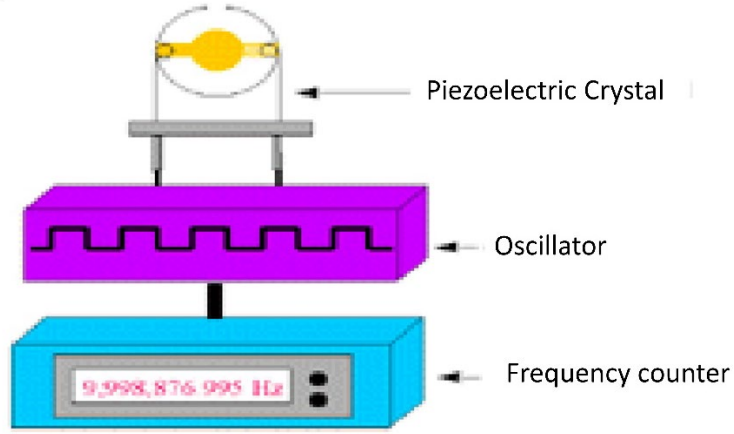


Şekil 2.2. Optik biyosensörlerin şematik gösterimi (Estrela vd., 2016).

Optik biyosensörler, ekipmanın elektriksel olmayan, dışarıda müdahale dilemeyen güvenli bir şekilde algılanma mekanizmasına sahip biyosensörlerdir. Diğer sensörlere ek olarak faydalı yanı genellikle referans sensörlerine ihtiyaç duymamasıdır, çünkü karşılaştırmalı sinyal, örnekleme sensöründe benzer bir ışık kaynağı kullanılarak üretilebilmektedir (Damborsky vd., 2016).

2.2.3. Piezoelektrik biyosensörler

Piezoelektrik biyosensörler, afinite etkileşimi kaydı yasasını esas alarak çalışan sensörlerdir. Piezoelektrik platformu, bir piezoelektrik kristalin yüzeyindeki sıçraması nedeniyle salınım dönüşümü yasası üzerinde çalışan sensörlerdir (Pohanka, 2018). Piezoelektriklik veya piezoelektrik etki, bir malzemenin mekanik olarak gerildiğinde voltaj üretme yeteneğini ifade eden fiziksel bir olgu olduğu bilinmektedir (Hess vd., 2013).

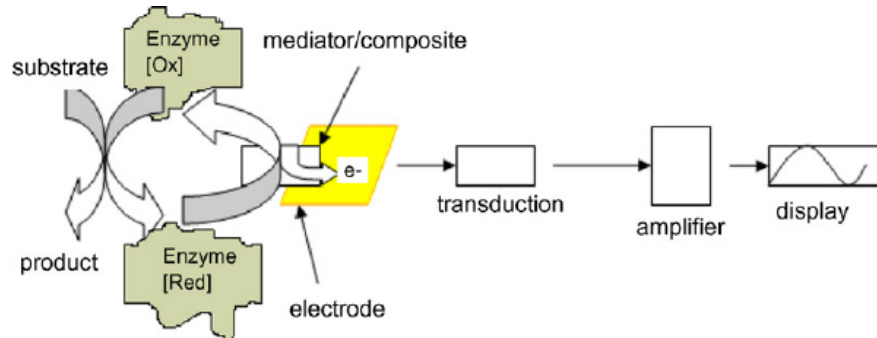


Şekil 2.3. Piezoelektrik biyosensörlerin şematik gösterimi (Choudhary vd., 2015).

Piezoelektrik biyosensörler gün geçtikçe kullanımı artan ve popüler bir tekniktir. Piezoelektrik biyosensörlerde kuvars kristal mikrobals (QCM) platformu, QCM'nin elektronik cihazlarda yaygın olarak kullanılması ve ticari olarak yaygınlaşmasından dolayı piezoelektrik immünosensör oldukça popülerdir (Pohanka, 2018).

2.2.4. Enzimatik biyosensörler

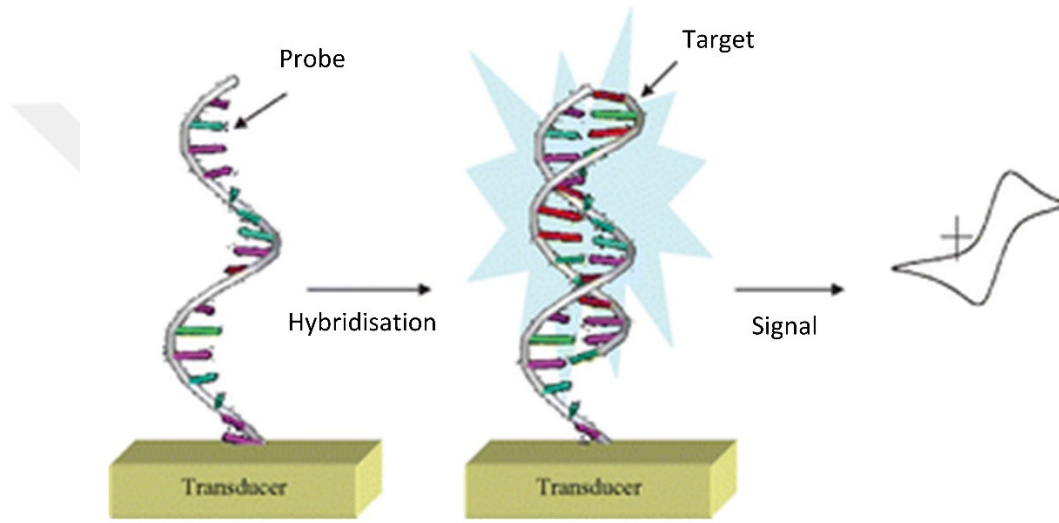
Enzimatik ve/veya enzim sensörleri, hedef analitin konsantrasyonuyla orantılı bir sinyal üretmek için bir dönüştürücü kullanarak bir enzimi birleştirmek için kullanılan sensörlerdir. Enzimler bulundukları ortamda katıldıkları kimyasal tepkimelerden ölçülebilir birçok reaksiyon ürünü meydana getirmektedirler. Bu meydana getirdikleri reaksiyon ürünlerini (elektron, ışık, ısı ve proton) biyoreseptör olarak kullanan biyosensörlerdir.



Şekil 2.4. Enzimatik biyosensörlerin şematik gösterimi (Sarma vd., 2008).

2.2.5. DNA ve RNA biyosensörleri

DNA-RNA biyosensörleri bulaşıcı ve genetik hastalıkların hızlı, basit ve düşük maliyetli analizi için nükleik asit tanımlama tekniklerine dayalı olarak geliştirilen biyosensörlerdir. Ayrıca savunma, gıda, klinik, çevresel vb. alanlarda kullanımı gittikçe artmaktadır.



Şekil 2.5. DNA biyosensörlerin şematik gösterimi (Odenthal vd., 2007)

Enzim ve antikorlardan farklı olarak, nükleik asit katmanlarının tanınması, tespit edilmesini önceleyerek geliştirilen biyosensörlerdir. Normal hibridizasyon yöntemi ile karşılaştırıldığında, bu biyosensörler istenilen sonuçlara basit, daha ucuz ve daha hızlı bir şekilde ulaşma konusundaki muazzam potansiyelleri nedeniyle polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi yöntemlerin yanında son yıllarda tercih sebebidir. Ayrıca, bu sensörler artırılmıştır, ancak sensör teknolojilerini, tespit planlarını, analitik ve prosedürler için enstrümantasyonları geliştirmek için temel araştırma hala gerekli olmaktadır (Kavita, 2017, Rafique vd., 2019).

2.3. Biyosensörlerin Avantajları ve Dezavantajları

Biyosensör teknolojilerindeki son zamanlardaki gelişmeler kısa sürede sonuç, doğruluk ve maliyet açısından geleneksel yöntemlere göre tercih sebebi olmuştur. Genel modern biyosensörler, mikro ve nanofabrikasyon teknolojilerinden ve optik, elektriksel ve mekanik dönüştürücüler dahil olmak üzere çeşitli algılama stratejilerinden yararlanılarak geliştirilirler. Klinik ihtiyaca rağmen, biyosensörlerin araştırma laboratuvarlarından klinik uygulamalara glikoz sensörleri hariç sürekli kullanılmaması dikkate değer bir gözlem olarak görülmektedir. Biyosensör geliştirirken üstesinden gelinmesi gereken zorluklar arasında numunenin hazırlanması, sistemin entegrasyonu ve çevre koşullarının etkisi gibi temel zorluklar karşılanması muhtemeldir. Mikroakışkan teknolojisi ile entegre olan biosensörlerin özellikle sağlık ve gıda sektöründe istenen analitin teşhisine fayda sağlama potansiyeli on yıllardır gösterilmiş olsa da doğrudan entegre çipler hastanelerde ya da fabrikalarda tek metot olarak kullanılmamaktadır. Teknolojik temel bakış açısı, sağlanan faydaları en üst düzeye çıkararak, farklı bulaşıcı virüsler veya bakteriler için idrar, kan, tükürük gibi geniş bir klinik numune yelpazesini kullanabilen entegre mikroakışkan biosensörler geliştirmektir.

Biyosensörlerin avantajlarını maddeler halinde incelediğimizde;

- Geniş limit aralığında cevap verebilmesi,
- Yüksek stabilite,
- Düşük maliyet,
- Küçük boyutlar,
- Hızlı yanıt,
- Hedeflenen analite karşı seçicilik,
- Taşınabilir sistem,

Biyosensörlerin dezavantajlarını maddeler halinde incelediğimizde ise;

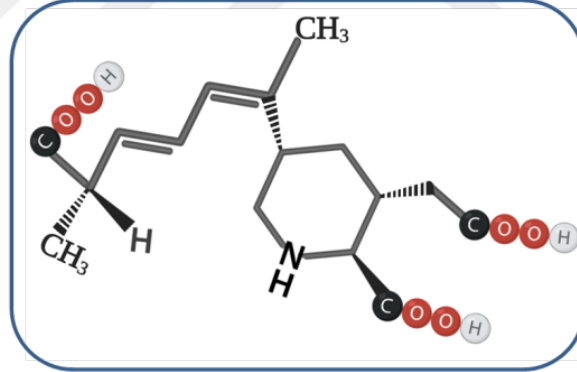
- Biyosensör hazırlamanın uzun sürebilmesi,
- Biyokomponentlerin ömürlerinin sınırlı olması,
- Geliştirilen biyosensörleri steril tutabilme zorluğu,
- Çevresel etkilerden etkilenebilmesi,

Sonuç olarak biyosensörler gelişen teknolojiyle birlikte sürekli kendini bir üst noktaya taşımasıyla diğer analitik yöntemlerin yerini almaya aday teknolojilerden biri olarak görölmektedir. Klinik, savunma, gıda vb. alanlarda artan ihtiyacı karşılayabilmek için geleneksel yöntemlerden farklı olarak dezavantajları minimize edilerek sağladığı yüksek avantajlar nedeniyle önümüzdeki yıllarda vazgeçilmez bir teknoloji olması beklenmektedir.



3. GIDA GÜVENLİĞİ VE DOMOİK ASİT

Gün geçtikçe beslenme alışkanlıklarındaki hızlı değişimler sebebiyle gıda güvenliği büyük önem kazanmaktadır. Diğer yandan toksinler, patojenler ve çevresel kirleticiler gıda kaynaklı hastalıklara neden olmakta ve insanlar için ciddi tehdit oluşturmaktadır. Sonuç olarak, 2015 yılında küresel gıda güvenliğine ayrılan bütçe 2,5 milyar dolar iken, 2023 yılı sonuna kadar 24,6 milyar dolar olması beklenmektedir (Koç vd., 2021a). Diğer yandan, hızla kirlenen deniz ve su kaynakları sadece biyolojik çeşitliliği değil tüm hayatı olumsuz etkilemektedir. Yapılan araştırmalar, ilginç bir şekilde gıda kaynaklı salgın vakalarında, balık ürünlerinin ilk sırada olduğunu gözler önüne sermektedir. Balık ve deniz ürünleri, protein açısından zengin olup yağ içerikleri oldukça düşüktür. Bununla birlikte deniz ürünlerinin ve balıkların tüketimi birçok yemek kültürünün önemli bir parçasıdır. Türkiye'de avcılığı en çok yapılan deniz balıklarının üretim miktarlarına bakıldığında ilk sırayı hamsi alırken ikinci sırada ise sardalya bulunmaktadır (Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2017).



Şekil 3.1. Domoik asitin kimyasal yapısı.

Domoik asit (DA) fitotoksin grubu içerisinde olup suda çözünebilen nörokimyasal süreçleri inhibe eden, kısa süreli hafıza kaybına, beyin hasarına ve ciddi vakalarda insanlarda ölüme neden olan bir nörotoksindir (Clayden vd., 2005). DA üç adet karboksil (-COOH) grubu içeren, tadı ve kokusu olmayan bir nörotoksindir. DA insan beyninin hipokampus bölgesine etki eder ve beyindeki bu bölge, insanın hafızasına, yön bulmasına ve iç organların fonksiyonlarının kontrolünde rol oynadığından insan sağlığı açısından tüketilmesi büyük zarara yol açabilir. Deniz toksinlerinde bulunan DA, nörotoksin olan ve suda çözünebilen

fitotoksinler grubunda yer almakta olup, bugüne kadar yapılan çalışmalarda, midye, midye, jilet, yengeç, istakoz, sardalya ve hamsi gibi balıkların bir kısmında olduğu görülmüştür. Deniz ürünlerinin temizlenmesi ve pişirilmesi bu toksinleri yok etmez veya ortadan kaldırmaz. DA ve izomerleri belirli bir miktarın üzerinde tüketildiğinde, insanlarda kabuklu deniz hayvanı zehirlenmesinden (ASP), bulantı, kusma, ishal, karında rampalar, baş dönmesi, baş ağrısı, yönelim bozukluğu, nöbetlerden kaynaklanan hafıza bozukluklarına (kısa süreli veya kalıcı hafıza kaybı) neden olabilir (Jeffery vd., 2004). Biyosensörlerin geliştirilmesi için en önemli itici güçlerden biri, toksik kimyasalların tespiti için artan taleptir. Bu nedenle, çeşitli sensör teknolojisi yöntemleri geliştirilmiştir (Wan vd., 2015). Toksinlerin analizi şu anda yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), sıvı kromatografi-kütle spektroskopisi (LC-MS), ince tabaka kromatografisi ve ELISA gibi immünokimyasal yöntemler ile gerçekleştirilmektedir (Kania vd., 2003). Bu yöntemler pahalı ve büyük malzeme tüketimi, kapsamlı numune temizliği, sık sistem bozulması gibi bazı önemli dezavantajları vardır (Berre vd., 2006; Zhang vd., 2017). Bu neden gıda güvenliği için gerçekleştirilmesi gereken toksin analizinde yüksek hassasiyet, seçicilik, hızlı analiz, karmaşık yapılar içerisinde analiz olanağı ve mikro boyutlarda cihaz elde edilebilmesi gibi özellikleri nedeniyle elektrokimyasal biyosensörlerin diğer teknolojilere kıyasla çok yaygın olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Shah vd., 2003).

Biyosensör geliştirme çalıştırmalarında birçok farklı platformlarda ve farklı ölçüm teknikleri kullanarak hedef analiti tespit etmeye yönelik sensör çalışmaları bulunmaktadır. Kullanılan teknikler ve platform hedef analitin tespitinde ve tespit edilen miktarında farklılıklara neden olmaktadır. Aşağıda domoik asit tespiti için yapılmış çalışmalar özetlenmiştir.

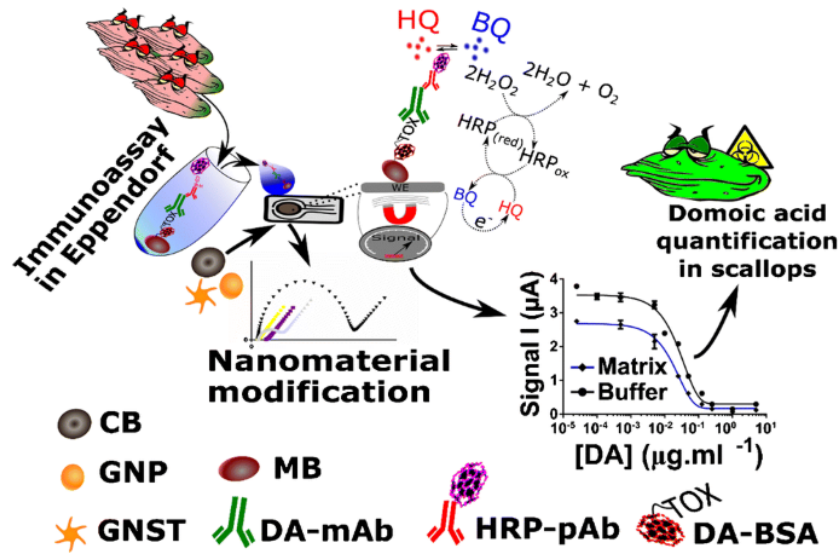
Traynor vd., yapmış oldukları çalışmada optik biyosensörler olarak yüzey plazmon rezonans (SPR) yöntemi kullanarak DA'ya karşı tavşan poliklonal antikoru kullanılarak DA tespit çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. CM5 çip kullanılarak gerçekleştirmiş oldukları çalışmada tayin limitini (LOD) 1,06 µg/g olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir (Traynor vd., 2006). Colas vd., yapmış oldukları çalışmada da aynı şekilde yüzey plazmon rezonans (SPR) yöntemi kullanarak biyosensör geliştirmişlerdir. N-F2 glass çip kullanılan çalışmada oldukça düşük olarak tayin limitini (LOD) 0.1 ng/mL olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir (Colas vd., 2016).

Bir başka çalışma olan Micheli vd., ise diferansiyel puls voltametrisi (DPV) kullanarak kabuklu deniz canlılarındaki domoik asit tayini için immünosensör geliştirmişlerdir. Elektrot malzemesi olarak grafit ekran baskılı elektrot kullanılan çalışmada tayin limitini (LOD) 5 ng/mL olarak bulmuşlardır (Micheli vd., 2004).

Zuki vd., yapmış oldukları başka çalışmada döngüsel voltametri (CV) kullanarak domoik asit tayini için biyosensör geliştirmişlerdir. Elektrot malzemesi olarak altın ekran baskılı elektrot kullanılan çalışmada tayin limitini (LOD) 0,02378 g/mL olarak belirlemişlerdir (Zuki vd., 2019).

Marques vd., yapmış oldukları çalışmada biyo-alan etkisi iletimi yöntemi kullanarak domoik asit tayini için biyosensör geliştirmişlerdir. Karbon nanotüplere dayalı tek kullanımlık alan etkili transistörler kullanılarak yapılan çalışmada tayin limitini (LOD) 10 ng/L olarak rapor etmişlerdir (Marques vd., 2017).

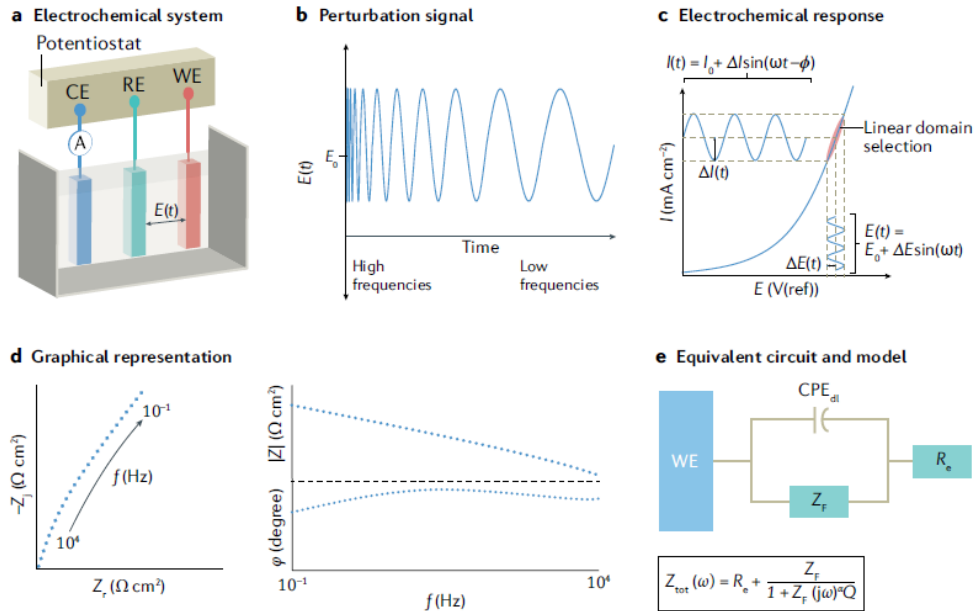
Nelis vd., yapmış oldukları çalışmada elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) yöntemi kullanılarak biyosensör geliştirmişlerdir. Şekil 3.2.'de de görüleceği üzere ekran baskılı elektrotlar ve modifiye edilmiş ekran baskılı elektrotlar kullanılarak olarak tayin limitini (LOD) 0.4 ng/mL olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir (Nelis vd., 2020).



Şekil 3.2. Nanomalzemelerle modifiye edilmiş ekran baskılı elektrotların (NM-SPE) ve ön işleme tabi tutulmuş SPE'lerin optimizasyonu ve domoik asit tespit çalışmalarının şematik gösterimi (Nelis vd., 2020).

4. ELEKTROKİMYASAL EMPEDANS SPEKTROSKOPİSİ

Elektrokimyasal Empedans spektroskopisi (EIS), sistemin periyodik olarak küçük genlikteki alternatif akım (AC) sinyaline karşı oluşturduğu elektrik tepkisini incelemektedir. Sistem içerisinde ölçümler farklı frekanslarda gerçekleştirilir, bu nedenle spektroskopi adı verilir). EIS analizi yapılacak numune genellikle elektrotlara bağlanır ve ölçümler sonrasında empedans sonuçları elde edilmektedir (Lvovich, 2012; Yüksekaya, 2017). EIS, elektrot/elektrolit ara yüzey özelliklerinin özelliklerini araştırmak için etkili bir teknik olarak kabul edilmektedir (Athey vd., 1995). Bunlara ek olarak, EIS güvenilir karakterizasyon ve optimizasyon tekniği olarak kullanılabilir (Samie ve Arvand, 2020). EIS yöntemi, hızlı ve basit olma avantajına sahip olmasının yanı sıra, ölçüm sırasında/sonrasında sensör davranışını değiştirmez. Bu nedenle, EIS, sensör özelliklerini incelemek için invazif olmayan ve etkili bir araç olarak tanımlanabilmektedir. EIS uygun şartlar altında ölçüm alındığında sensör sistemlerindeki elektrokimyasal olayları karakterize etmek için önemli ve etkili bir yöntemdir (Koç vd., 2021a). EIS, doğrusal zamanla değişmeyen sistemlerin analizinde yaygın olarak kullanılan transfer fonksiyonu ölçümüdür (Orazem ve Tribollet, 2017).



Şekil 4.1. Elektrokimyasal sistemlerde EIS ölçümü için gerekli adımların şematik gösterimi, a) elektrokimyasal sistem, b) pertürbasyon sinyali, c) elektrokimyasal cevap, d) grafiksel gösterim, e) eşdeğer elektrik devresi ve modeli (Wang vd., 2021).

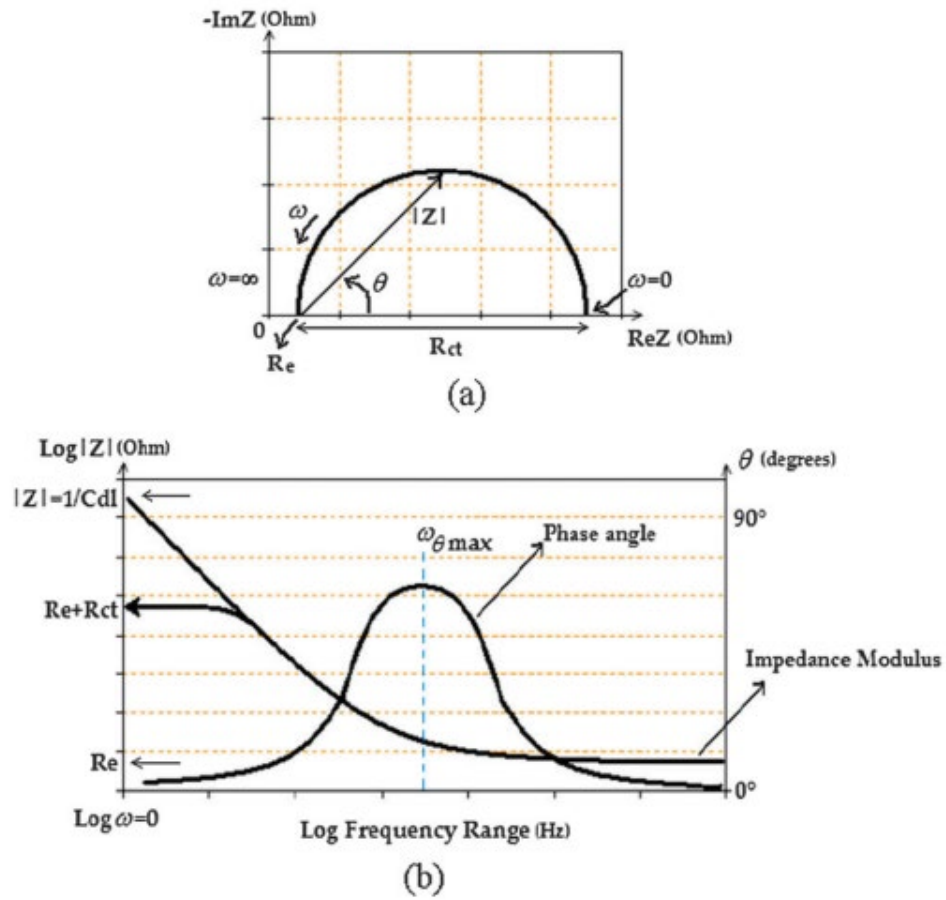
Şekil 4.1’de elektrokimyasal sistemlerde EIS ölçümü almak için ayrıntılı şematik gösterilmiştir. Şekil 4.1 a’da elektrokimyasal sistem için, çalışma elektrotu (WE), karşıt elektrot (CE) ve referans elektrotu (RE) içeren bir sistem kurulmalıdır. Çalışma elektrotu ile referans elektrot arasına bir potansiyel $E(t)$ uygulanır ve ortaya çıkan akım karşıt elektrotta (CE) ölçülür. Şekil 4.1 b’de gösterilen periyodik bir pertürbasyon sinyali WE ve RE arasında yüksek frekanslardan düşük frekanslara doğru genlik potansiyel (AE) uygulanır ve duruma karşı verilen elektrokimyasal tepki lineer alanda Şekil 4.1 c’de gösterilmiştir. Şekil 4.1 d ve e’de empedans verileri gösteri Nyquist veya Bode diyagramlarıyla yapılmaktadır ve eşdeğer elektrik devresi ile modellenerek temsil edilmektedir (Wang vd., 2021).

Elektrokimyasal sistemi farklı frekanslarda uyarmak için küçük genlik potansiyel kullanır. Sistemin tepkisini (akım veya potansiyel) ölçerek, bir transfer fonksiyonu hesaplanır. Bir elektrokimyasal hücre durumunda sistemin elektrokimyasal empedansı (Z) şu şekilde ifade edilebilir (Orazem ve Tribollet, 2017);

$$Z_{(\omega)} = \frac{V_{(\omega)}}{I_{(\omega)}} = \left| \frac{V_{(\omega)}}{I_{(\omega)}} \right| (\cos \phi(\omega) + j \sin \phi(\omega)) = Z_r + j Z_j \quad (4.1)$$

$$\omega = 2\pi f \quad (4.2)$$

Denklem 4.1 ve denklem 4.2’deki ω açısal frekansı ifade etmektedir. ω , hertz birimiyle ifade edilen frekansa (f) bağlı olarak ifade edilmektedir. Denklem 4.1’deki ϕ giriş ve çıkış sinyalleri arasındaki faz açısıdır ve j ise -1’e eşit olan sanal sayıyı ifade etmektedir. Potansiyel (V) ve akım (I) değişkenleri, sinüzoidal bir fonksiyonun genliğini ve fazını açıklayan karmaşık zamanla değişmeyen sayılardır. Denklem 4.1’de de gösterildiği gibi elektrokimyasal empedans (Z_{ω}), frekansa bağımlı gerçek empedans (Z_r) ve sanal empedansı (Z_j) içeren bir karmaşık sayı olarak belirtilebilir (Orazem ve Tribollet, 2017; Wang vd., 2021).

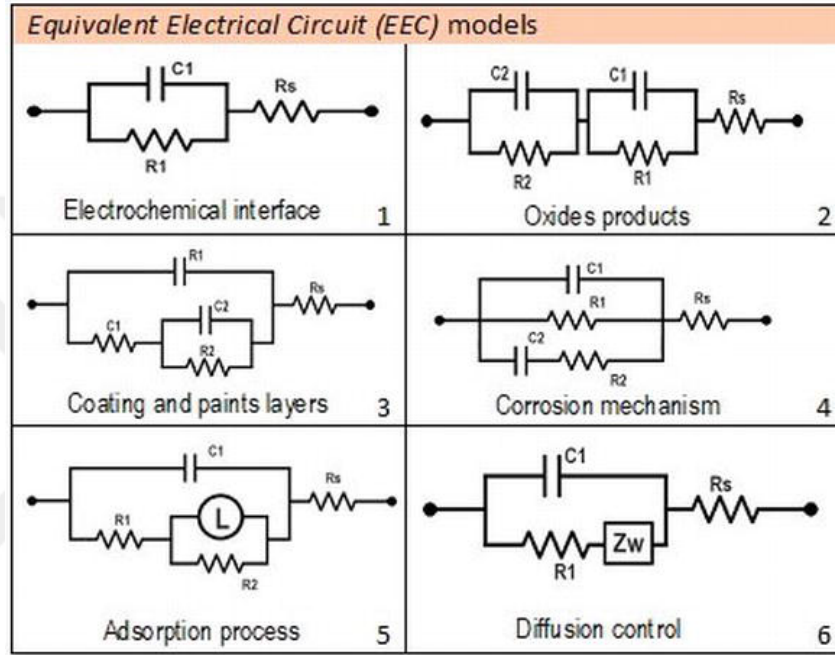


Şekil 4.2. EIS ölçümlerinde empedans yanıtlarının gösterimi, a) Nyquist grafiği ve b) Bode grafiği (Benetton vd., 2012)

Şekil 4.2’de empedans cevaplarının Nyquist ve Bode grafiklerinin gösterimi görülmektedir. Şekil 4.2 a’daki Nyquist grafiğinde, x eksenini empedansın gerçekte kısmını (Z_r) ve y eksenini ise empedansın sanal kısmını (Z_i) olarak x-y düzleminde konumlandırılmıştır. X ekseninin ilk kestiği nokta yani yüksek frekans limiti elektrolit direncini (R_e), oluşan yarım çemberin çapı da şarj aktarım direncini (R_{ct}) ifade eder. Şekil 4.2 b’de ise Bode grafiği görülmektedir. Bode grafiğinde, y ekseninde bağımsız bir değişken olarak faz açısı (γ) ve empedans modülü ($|Z|$) ve z ekseninde ise frekans değerleri içerir.

4.1. Eşdeğer Devre Modelleri ve Elemanları

Eşdeğer devre modellemesi, deneysel çıktıları bir eşdeğer devre modeline uydurarak çeşitli alt parametrelerle analiz yapmaya yardımcı olan elektrik devreleridir. Eşdeğer devreler ve devre elemanları, elektrokimyasal sistemin kimyasal ve fiziksel özelliklerinin analiz edilmesi ve anlaşılması için büyük önem arz etmektedir. (Yüksekkaya, 2017).



Şekil 4.3. Elektrokimyasal sistemlerde en çok kullanılan eşdeğer devre modellerinin gösterimi (Hernandez vd., 2020).

Şekil 4.3'te farklı elektrokimyasal sistemlerde en çok kullanılan eşdeğer devre modelleri görülmektedir. Her sistem için ve uygulanacak yöntem için uygun eşdeğer devre modeli belirlenmesi gerekmektedir. Elektrokimyasal ara yüzey değişimlerini araştırma için kullanılan eşdeğer devre modeli, elde edilen empedans yanıtlarına göre modifiye edilebilmektedir. Buradan da anlaşılacağı üzere her sistem için tek bir model uygulanması mümkün olmadığı durumlarda modeli modifiye ederek empedansın yanıtını en uygun yorumlanmasını sağlayacak model ile modellenmesi elzem olduğu görülmektedir.

4.1.1. Elektrolit direnci

Elektrolit direnci (R_e , R_s) bir başka deyişle omik direnç, elektrolit bir çözeltide çözeltiden iyonlar transferinde elektron akışını engellemesi sonucu ortaya çıkan dirençtir. Referans elektrot tarafından analiz sonucunda kaydedilen voltaj ile giriş ve çıkış voltajlarını karşılaştırarak elektrolit direnci belirlenmektedir. Bir başka tanımla R_e elektrot ile elektrolit çözeltisi arasında meydana gelen temas direncini ifade eder. R_e değeri, Nyquist grafiğinin yüksek frekans bölgesinde x ekseninin (Z_{real}) kestiği noktanın hesaplanmasıyla elde edilmektedir (Orazem ve Tribollet, 2008). Elektrolit çözeltisinin derişim, iyon tipi, sıcaklık ve aktif elektrot alanı gibi çeşitli özellikleri omik dirence etki etmektedir. Bu nedenle çözeltinin özellikleri ve çevresel faktörlerin etkisiyle değişen elektrolit direnci, elektrokimyasal hücre empedansını doğrudan etkilemektedir (Koç vd., 2021a). Elektrokimyasal hücrenin iyon taşıyıcı aktif elektrot alan sabit kabul edildiğinde R_e , denklem 4.3'te şu şekilde gösterilmiştir (Lvovich, 2012);

$$R = \rho \frac{l}{A} \quad (4.3)$$

Denklem 4.3'te, R elektrolit direncini, ρ öz direnci, l paralel elektrotlar arasındaki mesafeyi, A ise sabit elektrot alanını ifade etmektedir. Bununla birlikte, ideal koşullarda elektrolit direncini matematiksel olarak tam hesaplaması yapılamayabilir. Bu nedenle denklem 4.3'te direnci denklemi yalnızca üretilen direncin bir tahmini olarak geçerlidir. Deneysel elektrolit direnci direnci tüm ortam dirençlerinin, malzeme özelliklerinin etkisi katılarak EIS çıktılarının uygun model ile modellenerek hesaplanması en uygun yöntemdir. (Koç vd., 2021a; Lvovich, 2012)

4.1.2. Şarj transfer direnci

Elektrot ile elektrolit ara yüzeyinde meydana gelen yük aktarımı genellikle elektrokimyasal reaksiyonlardan kaynaklanmaktadır. Ara yüzeydeki elektrokimyasal reaksiyonlar, yük transfer reaksiyonları olarak tanımlanmaktadır. Başka bir deyişle, elektrot ile elektrolit ara yüzeyindeki şarj transfer direncinin (R_{ct}) nedeni şarj transfer reaksiyonlarıdır (Orazem ve Tribollet, 2008). Elektrokimyasal sensörler için, yük transfer

direnci, immobilizasyon işlemi sırasında elektrotlar üzerindeki yüzey katmanlarının tanımlanmasını sağlamaktadır. Şarj transfer direnci, elektrolitteki iyonların elektrota hareket etmesiyle elde edilmiştir. Şarj aktarımı sonucu, bir başka deyişle yük aktarımının sonucu olarak meydana gelen akım akışı ile aktarılan iyonların derişimine, elektrokimyasal reaksiyonlardan kaynaklanan potansiyele ve reaksiyonun ürünlerine bağlıdır. EIS analizi sonucu elde edilen Nyquist grafiğinde yüksek frekanslı bölgedeki yarım çemberin çapına eşittir (Orazem ve Tribollet, 2008; Koç vd. 2021b).

4.1.3. Çift tabaka kapasitansı

Elektrota ve onu çevreleyen elektrolit arasındaki ara yüzde elektriksel bir çift katman bulunmaktadır. Elektrot üzerindeki iyonlar ve elektrottaki elektronlar nedeniyle bu çift tabaka oluşturmaktadır. Bu iki yük katmanı birbirinden çok kalın bir dielektrik ile ayrıldığından bir kapasitör oluşturmakta ve çift katmanlı kapasitans olarak adlandırılmaktadır. Çift katmanlı kapasitansın değeri birçok değişkene bağlı olmaktadır. Bunlar elektrotun potansiyeli, sıcaklık, iyonik konsantrasyonlar, iyon türleri, oksit katmanları, elektrotun pürüzlülüğü gibi birçok etkene bağlı olmaktadır (Orazem ve Tribollet, 2008; Yüksekaya, 2017; Luo ve Davis, 2013).

4.1.4. Sabit faz elemanı

Sabit faz elemanı (CPE), çift katmanın davranışının kusurlu bir kapasitörü olarak modelleyen eşdeğer bir elektrik devresi bileşenidir. Çift katmanlı kapasitans ideal bir kapasitör olarak modellenmiştir ve bu model homojen yüzeyler için kullanılmaktadır. Yüzey homojen olmayan, pürüzlü ya da gözenekli yüzey olduğunda ideal kapasitör modeli deneysel verilere tam olarak uymamaktadır. Bu durum sabit faz elemanı (CPE) kullanılarak ile modellenenilmektedir. Z_{CPE} , denklem 4.4'te gösterilmiştir (Orazem ve Tribollet, 2008).

$$Z_{CPE} = \frac{1}{Q(j\omega)^a} \quad (4.4)$$

$$0 \leq a \leq 1 \quad (4.5)$$

CPE, homojen olmayan, pürüzlü ve/veya gözenekli arayüzler için gerçek çift katmanlı kapasitansın bir ölçüsüdür. Denklem 4.4'te, Q ideal bir, α CPE'nin davranışını temsil eden ampirik bir sabitti ve ω , açısal frekansı ifade etmektedir. Denklem 4.5'te ise a değeri 1 olduğunda ideal pürüzsüz davranışı gösterirken, 0 olduğunda ise saf direnci tanımlamaktadır (Orazem ve Tribollet, 2008).



5. MATERYAL VE YÖNTEM

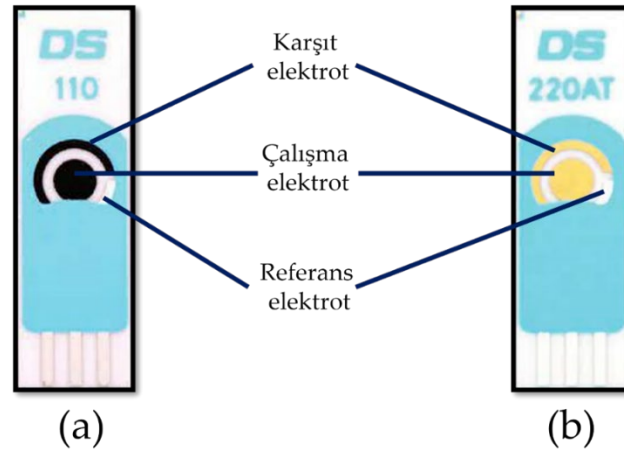
Bu tez çalışmasında toksin analizi yapabilen yüksek hassasiyette ve düşük tayin limitine sahip elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir. Elektrokimyasal biyosensör geliştirmede ekran baskılı altın ve karbon elektrotlar kullanılmıştır. Elektrotların öncelikle elektrokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. Daha sonra ise biyofonksiyonelleştirilmesi, rejenerasyonu ve geliştirilen biyosensör yüzeyleri ile domoik asit tayin analizleri yapılmıştır.

5.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan domoik asit (DA) Fluorochem'den, N-(3-Dimetil aminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorür (EDC), 11-Merkaptoundekanoik asit (11-MUA), N-Hidroksisüksinimit (NHS), GmbH'den elde edilmiştir. Monoklonal anti-Domoik asit (anti DA-mAb), Inycom Biotech'ten satın alınmıştır. Streptavidin, glutamik asit, aspartik asit, etanol, Altın (III) klorür trihidrat (HAuCl_4), potasyum ferrisiyanür ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), potasyum ferrosiyanür ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$) sırasıyla Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir.

5.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Elektrotlar

Deneysel çalışmalarda dropsens marka ekran baskılı altın elektrot (DRP-220AT) ve ekran baskılı karbon elektrot (DRP-110) kullanılmıştır. Her bir ekran baskılı elektrot, $133 \times 10 \times 0,5$ mm boyutlarında seramik bir alt tabaka üzerinde yerleşik durumdadır. Ekran baskılı altın elektrotların çalışma ve karşıt elektrotu altın, referans elektrotu ise gümüştür. Ekran baskılı karbon elektrotların ise çalışma ve karşıt elektrotu karbon, referans elektrotu gümüştür. Ekran baskılı altın ve karbon elektrotların çalışma elektrot bölgesinin alanı $0,1256 \text{ cm}^2$ 'dir. Şekil 5.1'de ekran baskılı altın ve karbon elektrotlar gösterilmiştir.



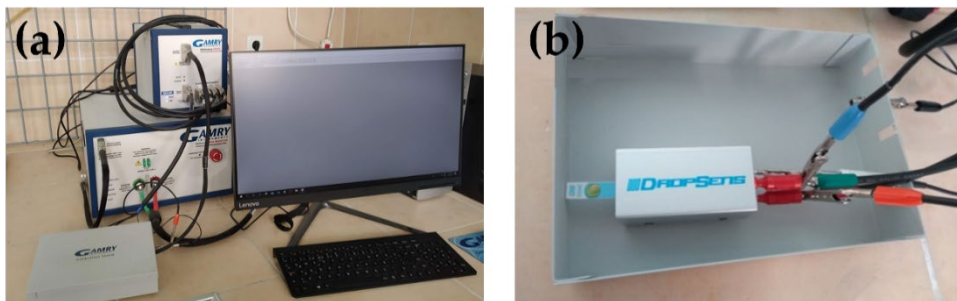
Şekil 5.1. Ekran baskılı elektrotlar, a) ekran baskılı karbon elektrot, b) ekran baskılı altın elektrot.

5.3. Deneyel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

5.3.1. Potensiyostat cihazı

Tüm elektrokimyasal ölçümler Gamry Framework ve Gamry Echem Analyst programları eşliğinde Gamry Reference 3000 potentiostat/galvanostat/ZRA cihazında yapılmıştır.

Şekil 5.2’de elektrokimyasal ölçümlerin yapıldığı potensiyostat cihazı ve Faraday kafesi içerisinde yerleştirilmiş deney düzeneği bulunmaktadır. Şekil 5.2 b’de Faraday kafesi içerisinde yerleştirilmiş ekran baskılı elektrot bağlantı cihazı ve bağlantı cihazına takılmış ekran baskılı elektrot gözükmemektedir.



Şekil 5.2. a) Gamry Reference 3000 potentiostat/galvanostat/ZRA cihazı, b) Faraday kafesi içerisinde düzeneğe yerleştirilmiş elektrot ve bağlayıcı.

5.3.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

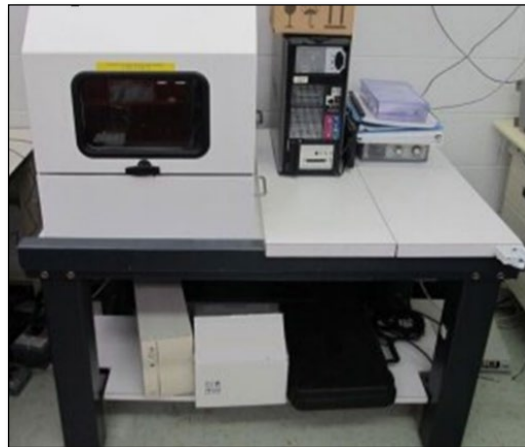
Deneyisel çalışmalarda SPGE ve SPCE'lerin yüzey morfolojik ve mikro yapısal özelliklerini incelemek için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi bünyesinde bulunan taramalı Hitachi Regulus 8230 Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) cihazı ile karakterize edilmiştir. Şekil 5.3'te görülmekte olan SEM cihazına entegre şekilde bulunan Enerji Dağılımlı X Işını Spektroskopisi (EDX) cihazı ile elemental analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.3.Hitachi Regulus 8230 marka FE-SEM-EDX cihazı.

5.3.3. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)

Deneyisel çalışmalarda SPGE ve SPCE'lerin yüzeylerindeki pürüzlülük değeri ve maksimum-minimum noktalar arası farkları görmek için Ambios Q-Scope 350 marka atomik kuvvet mikroskobu (AFM) kullanılmıştır.



Şekil 5.4.Ambios Q-Scope 350 marka AFM cihazı.

5.4. Ekran Baskılı Altın ve Karbon Elektrot Yüzeylerinin Biyofonksiyonelleştirilmesi

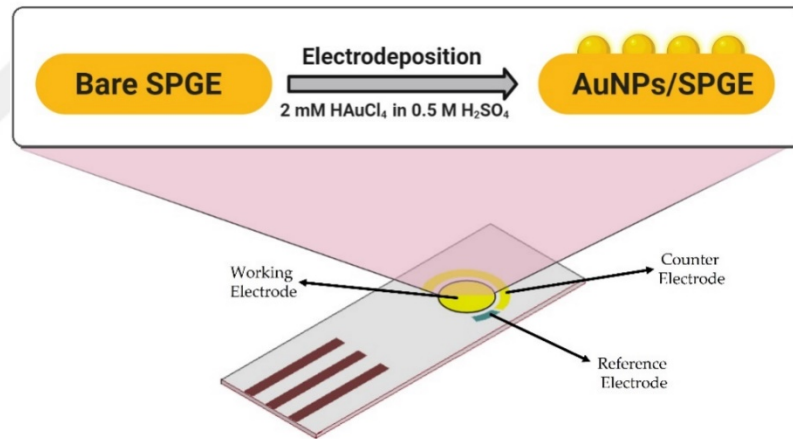
Elektrot yüzeyine, kimyasal madde ve moleküllerin kendiliğinden ya da dışarıdan bir etkiyle tutturularak istenilen aktifliğe getirilmesine biyofonksiyonelleştirilmesi denir. Biyofonksiyonelleştirilen elektrot yüzeyine bir reaktifin çeşitli etkilerle tutturulması ve modifiye yüzeye reaktifin davranışının kazandırılmasıyla yeni elektrot yüzeyleri tasarlanabilmekte, pek çok elektro-analitik problem çözülebilmekte, yeni analitik uygulama ve sensör çalışmalarının geliştirilmesi mümkün olabilmektedir (Zhang vd., 2017; Shin vd., 2016)

Ekran baskılı altın elektrot yüzeyine öncelikle 1 saat boyunca 10 mM derişiminde 11-MUA inkübe edilmesiyle kendiliğinden oluşan tek tabakalı (SAM) yüzey oluşumu sağlanmıştır. SAM oluşumu, karboksil içeren tiyollerin yüzeyde oluşmasını sağlamaktadır. Daha sonra yüzey etanol ile yıkanmış ve bağlanmamış tiyolleri uzaklaştırmak için PBS ile durulanmıştır. Daha sonra streptavidin, NHS/EDC varlığında karbodiimid reaksiyonu yoluyla 11-MUA'ya immobilize edilmiştir. Karbodiimid reaksiyonu, 50 mM EDC ve 50 mM NHS'nin 1:1 oranında 50 mM sitrik asit tamponu (pH=4.5) içinde 30 dakika boyunca inkübasyonu ile oluşmaktadır. Daha sonra 1 saat boyunca 1,25 µg/mL derişimindeki streptavidin inkübasyonu yapıldı. PBS içinde 1,25 µg/mL derişimindeki biyotinlenmiş antikolar (mAb-DA), inkübasyon yoluyla streptavidin üzerine bağlanması sağlanmıştır. Müteakiben dört farklı derişimdeki (0,01 ng/mL; 0,09 ng/mL; 0,9 ng/mL ve 4 ng/mL) domoik asit (DA) inkübasyonu yapılarak biyofonksiyonelleştirme işlemi tamamlanmıştır.

Ekran baskılı karbon elektrotun biyofonksiyonelleştirilmesinde ise karbon çalışma elektrotu üzerine SAM bağlanabilmesi için elektrot yüzeyi öncelikle aktifleştirme işlemine tabi tutulmuştur. Aktifleştirme işlemi asetat tampon çözeltisi (pH=4.6) kullanılarak 0 ile 1,6 V potansiyel altında, 100 mV/s tarama hızında, döngüsel voltametri yöntemiyle elektrot yüzeyde -COOH grupları oluşturulmuştur. Daha sonra elektrot yüzeyinde ekran baskılı altın elektrottaki gibi modifikasyon aşamaları uygulanarak biyofonksiyonelleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir.

5.5. Ekran Baskılı Altın ve Karbon Elektrot Yüzeylerine Altın Nanopartikül Modifikasyonu

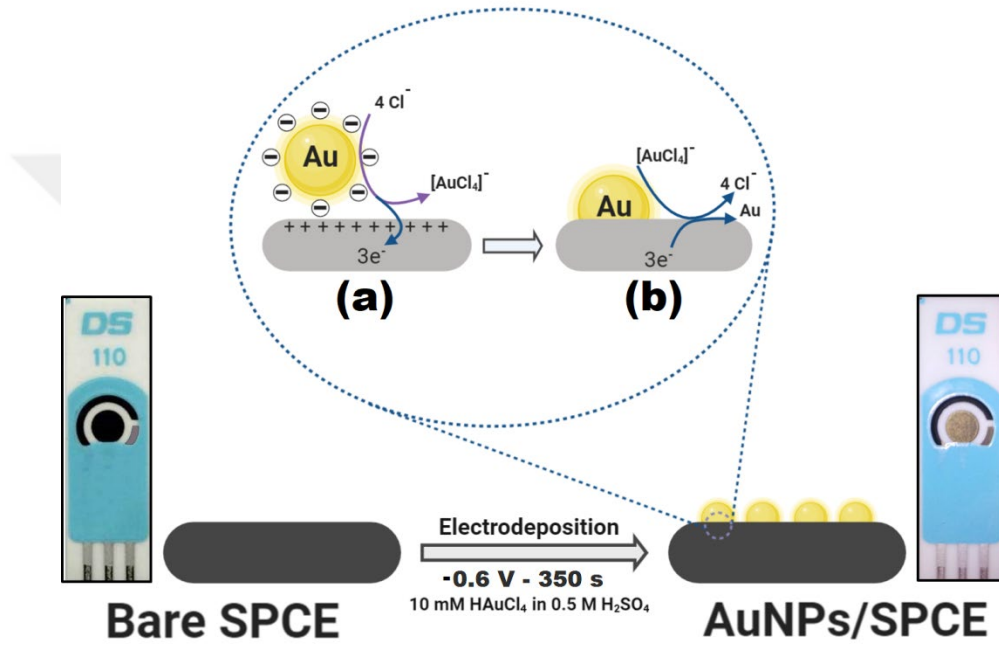
Ekran baskılı elektrotların altın nanopartikül (AuNP) modifikasyonu ile daha iyi ve spesifik SPGE ve SPCE yüzeyi elde etmek için modifiye edilmiştir. İlk olarak, $-0,6$ V uygulanan potansiyel altında pozitif bir elektrot yüzeyi elde etmek için elektrot yüzeyinde $0,5$ M H_2SO_4 çözeltisi ile yüzey aktivasyonu gerçekleştirilmiştir. AuNPs modifikasyonu $0,5$ M H_2SO_4 içerisinde hazırlanan 2 mM $HAuCl_4$ derişimindeki çözelti SPGE üzerine eklenerek $-0,3$ V potansiyel altında optimum modifikasyon süresini belirlemek için 30 s, 60 s, 90 s, 120 s ve 150 s elektrobiriktirme süreleri EIS ile belirlenmiştir. Modifikasyondan sonra bağlanmamış AuNP'ler, sırasıyla ultra saf su ve etanol ile yıkanarak yüzeyden uzaklaştırılmıştır. Şekil 5.5'te AuNP modifikasyonunun SPGE üzerinde şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 5.5. SPGE üzerine AuNP modifikasyonunun şematik gösterimi.

Ekran baskılı karbon elektrotun yüzeyi de AuNP modifikasyonu yapılarak elektrot yüzeyi daha spesifik hale getirilmiştir. Ekran baskılı altın elektrotta olduğu gibi öncelikle elektrot yüzeyi $0,5$ M H_2SO_4 çözeltisi ile $-0,6$ V potansiyel altında pozitif elektrot yüzeyi elde etmek için muamele edilmiştir. $0,5$ M H_2SO_4 içerisinde hazırlanan 10 mM $HAuCl_4$ çözeltisi kullanılarak elektrobiriktirme ile $-0,6$ V potansiyel altında belirlenen optimum sürede AuNP modifikasyonu yapılmıştır. Modifikasyon sonrasında yüzey ultra saf su ve etanol ile yıkanarak, 12 saat boyunca nem olmayan ortamda bekletilerek kuruması sağlanmıştır. Şekil 5.6'da SPCE yüzeyine AuNPs modifikasyonun şematik

olarak gösterimi bulunmaktadır. Şekil 5.6.'da elektrot yüzeyi H_2SO_4 ile muamelesi sonrası pozitif yüklenerek altın nanopartiküllerin yüzeye daha iyi modifikasyonu sağlanmıştır. 0,5 M H_2SO_4 içerisinde hazırlanmış olan 10 mM HAuCl_4 çözeltisine uygulanan $-0,6$ V potansiyelde AuNP'ler, yüzeyden çıkan kabarcıkların ara boşluklarında birikir ve uygulanan potansiyel nedeniyle yüzeyden uzaklaşan kabarcıklar sayesinde AuNP'ler yüzeye modifiye olur. Bağlanmamış AuNP'ler ve çözeltiden kalan atıklar elektrot yüzeyinden ultra saf su ve etanol ile temizlenerek uzaklaştırılması sağlanmıştır.



Şekil 5.6. Ekran baskılı karbon elektrot üzerine AuNPs modifikasyonunun şematik gösterimi, a) pozitif yüklenmiş elektrot yüzeyi, b) AuNPs modifiye edilmiş elektrot yüzeyi.

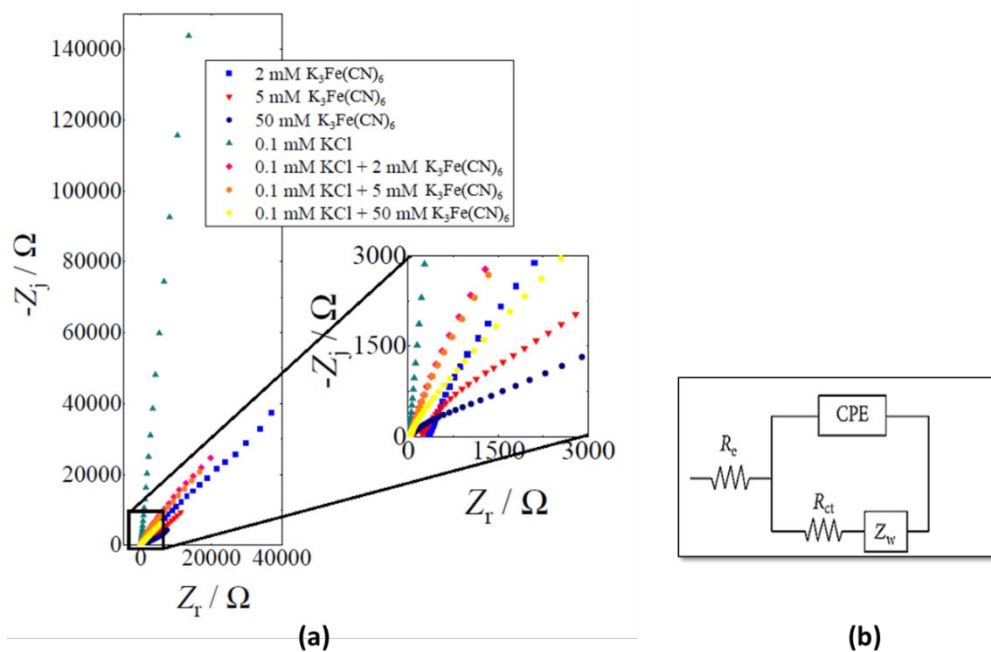
6. BULGULAR VE TARTIŞMA

6.1. Ekran Baskılı Elektrotların Elektrokimyasal Analizi

Ekran baskılı elektrotların elektrolit ile elektrot ara yüzeyinin incelenmesinde, kütle transfer oranlarının ölçülmesinde ve elektrot reaksiyonlarının incelenmesinde biyosensör geliştirme aşamaları öncesinde yapılması elzem bir analizdir. SPGE ve SPCE'nin elektroanalitik performansını ölçmek ve karakterize etmek için farklı redoks problemleri kullanılmıştır.

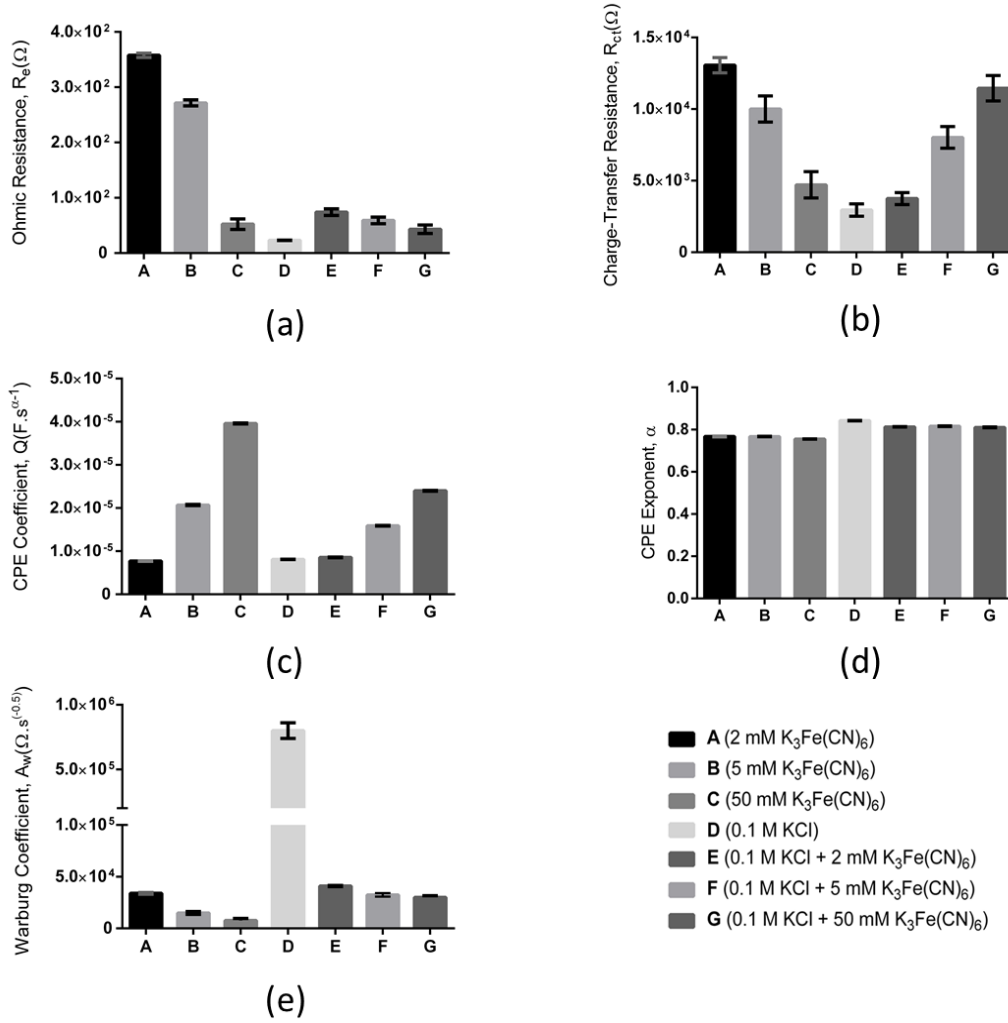
6.1.1. Ekran baskılı altın elektrotun elektrokimyasal analizi

Ekran baskılı altın elektrotun elektroanalitik performansını ölçmek ve karakterize etmek için Şekil 6.1'de görüldüğü üzere geniş kapsamda yedi farklı redoks probu kullanılmıştır. Hazırlanan redoks problemleri SPGE'lerin üzerine inkübe edilerek 0,1 Hz ile 10 kHz frekans aralığında EIS analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen empedans cevaplarının Nyquist formatında gösterimi Şekil 6.1'de gösterilmiştir.



Şekil 6.1. a) SPGE kullanılarak farklı derişimlerdeki $K_3Fe(CN)_6$ ve 0,1 M KCl inkübe edilmesi sonucu 0,1 Hz ile 10 kHz frekans aralığında elde edilen Nyquist grafiğı, b) eşdeğer elektrik devre modeli.

Şekil 6.1’de görüleceği üzere $K_3Fe(CN)_6$ ’ün farklı derişimlerinin ve KCl ile oluşturduğu eş hacimdeki çözeltilerinin elektrokimyasal tepkisi görülmektedir. Elde edilen empedans cevaplarının Nyquist grafiği şeklinde $K_3Fe(CN)_6$ probuna KCl çözeltisi eklenildikten sonra daha yüksek derecede difüzyon etkisi gösterdiği gözlemlenmiştir.



Şekil 6.2. SPGE üzerine ayrı ayrı inkübe edilen redoks problemlerinin empedans yanıtları, a) R_e , elektrolit direnci, b) R_{ct} , şarj aktarım direnci, c) Q , kapasitans değeri, d) α , yüzey pürüzlülük değeri ve akım dağılımı, e) A_w , Warburg empedansı katsayısı.

Empedans yanıtlarının Şekil 6.1 b’de gösterilen eşdeğer elektrik devre modeli ile modellenmesi sonucu elde edilen eşdeğer devre bileşenlerinin değerleri Şekil 6.2’de gösterilmiştir. Elektrolit direnci, elektrokimyasal empedans ölçümüyle elde edilen sistemin önemli bir özelliğidir. Kullanılan redoks probunun direnci konsantrasyon, iyon tipi, sıcaklık ve akım taşıyan elektrot alanına bağlı olarak değişmektedir (Orazem ve Tribollet, 2017).

$K_3Fe(CN)_6$ çözeltisinin derişimi arttıkça elektrolit direncinin azaldığı Şekil 6.2 a'da görölmektedir. $K_3Fe(CN)_6$ 'ün derişimi arttıkça çözeltinin ihtiva ettiği iyon sayısının artması ve buna bağılı olarak artan iyonların yük transfer direncini azaltması elektrolit direncindeki azalmanın nedeni olarak gösterilebilir. Aynı zamanda 0,1 M KCl çözeltisi ile birlikte $K_3Fe(CN)_6$ çözeltilerin elektrolit dirençleri incelendiğinde KCl'nin, farklı derişimlerdeki $K_3Fe(CN)_6$ çözeltilerinin elektrolit direncini azalttığı görölmüştür. Diğer bir deyişle, bu azalma KCl çözeltisi ile birlikte bulunan $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisinin daha fazla iyon barındırmasından kaynaklanmaktadır.

Elektrot yüzeyindeki reaksiyonların tayininde ve immobilizasyon aşamasında yüzey katmanlarının algılanmasında şarj aktarım direnci (R_{ct}) önemli bir devre elemanıdır. $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisinin derişimi arttıkça şarj aktarım direncinin azaldığı Şekil 6.2. b'de görölmektedir. Bunun nedeni olarak artan derişimle birlikte iyonların elektrot yüzeyine adsorplanma direncinin düşmesi gösterilebilmektedir. 0,1 M KCl'nin, $K_3Fe(CN)_6$ ile oluşturduğu çözeltilerin şarj aktarım direncine etkisi incelendiğinde KCl çözeltisinin farklı derişimlerdeki $K_3Fe(CN)_6$ çözeltilerinin şarj aktarım direncini düşürdüğü görölmüştür. Ayrıca KCl ile $K_3Fe(CN)_6$ birlikte bulunduğu çözeltilerde $K_3Fe(CN)_6$ çözeltilerinin derişimi arttıkça şarj aktarım dirençlerinin arttığı gözlemlenmiştir.

Kapasitans değeri (Q), elektrokimyasal sistemlerde sabit faz elemanın (CPE) katsayısını temsil etmektedir. Şekil 6.2. c'de $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisinin derişimi arttıkça kapasitans değerinin arttığı görölmüştür. $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisinin derişimi arttıkça çözelti içerisindeki iyonların kapasitif etkiyi arttıracak şekilde konumlanması Q değerinin artışına neden olarak gösterilebilmektedir. 0,1 M KCl'nin, $K_3Fe(CN)_6$ ile yaptığı çözeltilerin Q değerleri incelendiğinde KCl'nin Q değerlerini azalttığı görölmüştür. KCl çözeltisinde bulunan iyonların, elektrot yüzeyinin iyon çekebilme özelliğini azaltmış olabileceği Q değerlerinde görülen bu azalmanın nedeni olarak gösterilebilmektedir.

Sabit faz elemanı katsayısı olan α değeri elektrot yüzeyindeki akım dağılımı ve yüzey pürüzlülüğü hakkında bilgi vermektedir. α terimi $0 < \alpha < 1$ aralığında bir değere sahip olmakla birlikte genellikle 0,5 ile 1 arasında bir değer almaktadır. İdeal 1 değerini aldığı

Q değeri çift tabaka kapasitansı olarak davranış göstermekte ve elektrot yüzeyindeki akım dağılımı homojen olmaktadır (Orazem ve Tribollet, 2017). Şekil 6.2. d’de $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisinin farklı derişimlerinde α değerin 0,7 ile 0,8 arasında değışirken, 0,1 M KCl çözeltisinin ve 0,1 M KCl’nin $K_3Fe(CN)_6$ ile yaptığı çözeltilerin α değlerinin yaklaşık olarak 0,9 olduğı belirlenmiştir. α değleri arasında görülen bu farklılık, farklı iyonların elektrot yüzeyindeki akım dağılımını etkilediğini göstermektedir. Diğer taraftan KCl çözeltisinin, elektrot yüzeyindeki akım dağılımını daha homojen bir hale getirdiğı sonucuna ulaşılabilir.

Şekil 6.2 e’de görülen Warburg empedansı katsayısı elektrot içerisinde gerçekleşen iyon difüzyonunun bir göstergesidir. Diğer bir deyişle, Warburg empedansı sistemin kütle transferine karşı gösterdiği direnci göstermektedir. KCl’nin Warburg empedansının diğer redoks problemlerinden gözle görülür bir şekilde yüksek olduğı gözlemlenmiştir. Bunun nedeni olarak KCl çözeltisindeki K^+ iyonlarının elektron verici olarak suda yüksek çözünme enerjisine sahip olması gösterilebilir. Bu nedenle KCl’nin ihtiva ettiğı K^+ iyonlarının etkisi ile difüzyon direncini arttırıcı özellikte olduğı belirlenmiştir. Aynı zamanda $K_3Fe(CN)_6$ ’nin derişimi arttıkça Warburg empedansı değerin azaldığı gözlemlenmiştir. Buradan derişim artışıyla çözücü olan su içerisinde artan iyon yoğunluğunun difüzyon direncini azalttığı sonucu çıkarılabilmektedir.

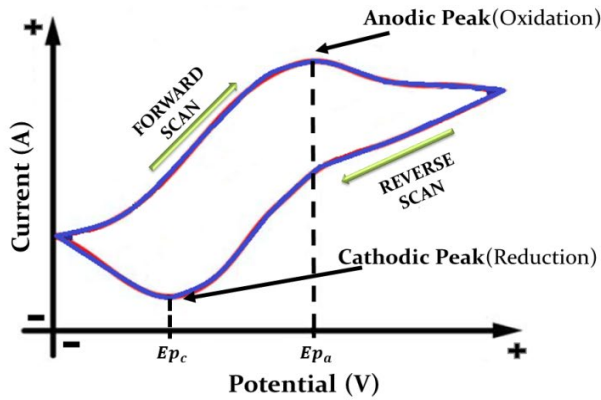
Çizelge 6.1. Empedans verileri için eşdeğer elektrik devresindeki simülasyon değerleri.

Redoks Problemleri	R_e, Ω	R_{ct}, Ω	$Q, \mu F s^{a-1}$	α	$A_w, \Omega s^{-0.5}$
2 mM $K_3Fe(CN)_6$ (A)	337,73±3,91	13064±532,38	7,70±0,09	0,768±0,0018	33885±770,58
5 mM $K_3Fe(CN)_6$ (B)	281,60±5,52	10005±910,84	21±0,15	0,767±0,0040	14953±1285,50
50 mM $K_3Fe(CN)_6$ (C)	52,36±9,53	4712±918,10	39,60±0,13	0,756±0,0030	7653,30±1960,86
0,1 M KCl (D)	23,25±0,31	2952,70±428,50	8,10±0,06	0,843±0,0072	799920±60793,92
0,1 M KCl + 2 mM $K_3Fe(CN)_6$ (E)	74,28±6,04	3752,20±419,22	8,60±0,07	0,813±0,0014	41046±538,06
0,1 M KCl + 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ (F)	59,19±6,11	8024,80±752,16	16±0,07	0,816±0,0020	32395±1700,99
0,1 M KCl + 50 mM $K_3Fe(CN)_6$ (G)	43,27±7,70	11452±887,90	24±0,09	0,811±0,0019	30015±1692,05

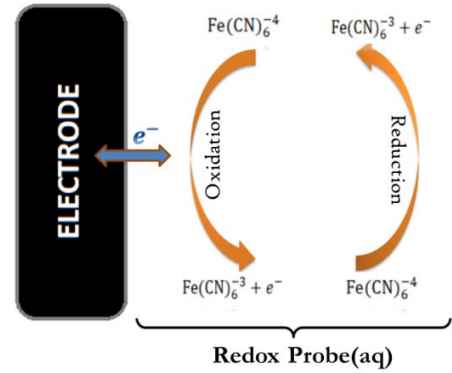
6.1.2. Ekran baskılı karbon elektrotun elektrokimyasal analizi

Ekran baskılı karbon elektrotun elektroanalitik performansını ölçmek ve karakterize etmek için CV ve EIS gibi iki farklı elektrokimyasal teknik kullanılmıştır. Bu yöntemler SPCE'leri karakterize etmek için kullanılan, redoks problemlerinin elektrokimyasal davranışlarını ve özelliklerini aydınlatmak için sıklıkla kullanılan elektroanalitik bir yöntemdir. SPCE'nin elektroanalitik performansını ölçmek için 100 mM, 10 mM, 1mM, 0,1 mM ve 0,01 mM derişimlerinde $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$ ve $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks problemleri kullanılmıştır.

SPCE ile redoks problemleri arasındaki elektrokimyasal etkileşimi anlayabilmek ve redoks problemlerinin derişiminin etkisini değerlendirebilmek için döngüsel voltametri analizi gerçekleştirilmiştir. Döngüsel voltametri yönteminde belirli bir voltaj aralığı ve tarama hızında SPCE'nin çalışma elektrotu bölgesine uygulanan potansiyel ile pozitif (anodik) ve negatif (katodik) yönde taramasıyla yapılmaktadır. Belirli bir potansiyel aralığı boyunca tarandıkça çalışma elektrotu bölgesindeki anodik ve katodik akımların oluşmasıyla döngüsel voltamogramlar elde edilmektedir (Koç vd. 2021).



(a)

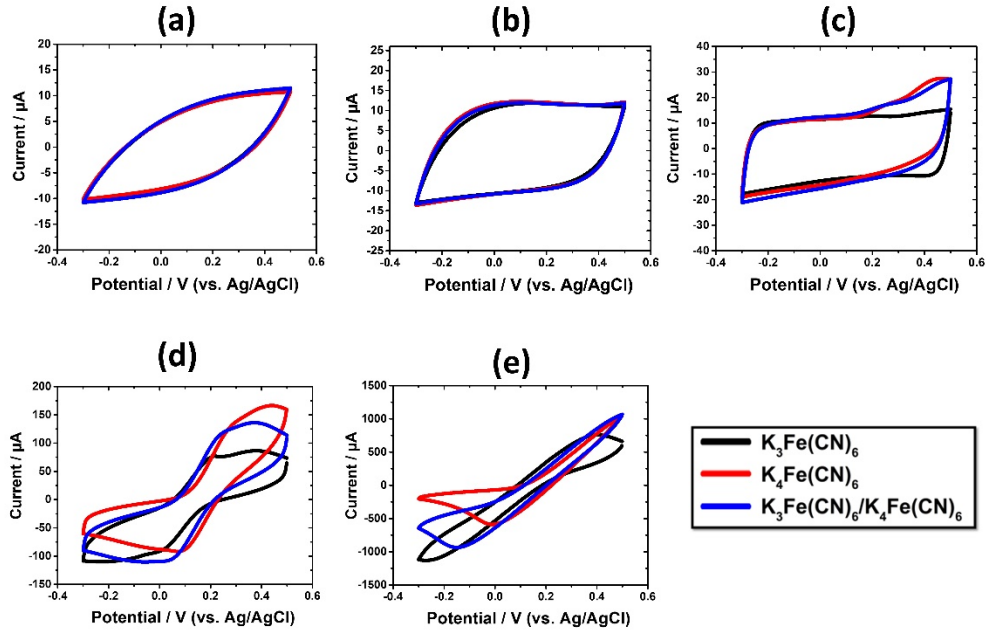


(b)

Şekil 6.3.a) elde edilen döngüsel voltamogramın pik akımlarını ve pik potansiyellerinin gösterimi, b) döngüsel voltametri ile SPCE arayüzü arasındaki elektron transferinin şematik gösterimi.

Redoks problemlerinin elektrot yüzeyi arasında meydana gelen indirgenme/yükseltgenme reaksiyonları Şekil 6.3'te şematik olarak gösterilmiştir. SPCE'nin ve redoks problemlerinin elektroanalitik analizi iyi elektron verdiği bilinen $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$ ve $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks problemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Redoks problemlerinin sulu ortamda ayrılan $Fe(CN)_6^{4-}$ pozitif potansiyel (yükseltgenme) yönünde tarama yapıldığında, $Fe(CN)_6^{3-}$ 'ye yükseltgenir ve anodik pik oluşturmaktadır. Negatif potansiyel (indirgenme) yönünde ters tarama yapıldığında ise $Fe(CN)_6^{3-}$, $Fe(CN)_6^{4-}$ 'ye indirgenir ve katodik pik oluşturur;





Şekil 6.4. $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$ ve $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks problemlerinin $-0,3$ V ve $0,5$ V potansiyel aralığında ve 100 mV/s tarama hızında elde edilen döngüsel voltamogramları, a) $0,01$ mM, b) $0,1$ mM, c) 1 mM, d) 10 mM, e) 100 mM.

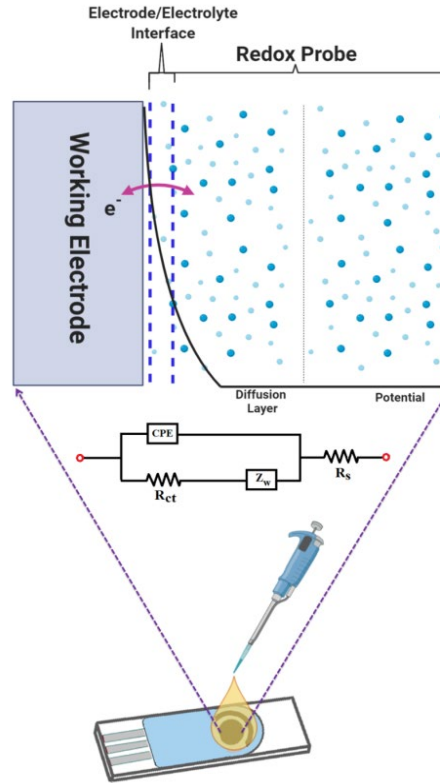
Şekil 6.4'te beş farklı derişimdeki ($0,01$ mM, $0,1$ mM, 1 mM, 10 mM ve 100 mM) $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$ ve $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks problemlerinin döngüsel voltamogramları görülmektedir. Şekil 6.4 a, b ve c'de redoks problemlerinin döngüsel voltamogramları incelendiğinde tam anodik ve katodik pik vermediği neredeyse dikdörgensel şekiller oluşturduğu ve elektrokimyasal sistemin sahte bir kapasitif davranış gösterdiği gözlemlenmiştir. Görüleceği üzere her bir redoks probleminin derişimin artmasıyla aynı potansiyel aralığında akım değerinin de arttığı gözlemlenmiştir. Şekil 6.4 b'de $0,1$ mM derişimindeki redoks problemlerinin her birinin $0,01$ mM derişimindeki redoks problemleriyle benzer görünüm gösterdiği görülmekle birlikte, $0,01$ mM derişimindeki redoks problemlerine göre anodik ve katodik pik bölgelerinin az da olsa oluşmaya başladığı görülmektedir. Çizelge 6.2'de de görüleceği üzere $0,1$ mM derişiminde sadece anodik pik oluşturduğu ve katodik pik vermediği görülmüş ve anodik pik değerleri birbirine oldukça yakın olduğu görülmüştür. Şekil 6.4 c'de 1 mM derişimindeki redoks problemleri incelediğimizde her birinin benzer görünüm göstermediği görülmekle birlikte $K_4Fe(CN)_6$ ve $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 'nin $K_3Fe(CN)_6$ 'ye göre pozitif potansiyel yönünde taramada anodik piklerinin daha büyük olduğu görülmüştür. Şekil 6.4 d'de 10 mM derişimindeki redoks problemlerinin döngüsel

voltamogramlarını incelendiğinde anodik ve katodik piklerin net olarak oluştuğu gözlemlenmiştir. Çizelge 6.2’de de görüleceği üzere daha düşük derişimler gözlemlenmeyen katodik pik 10 mM derişiminde gözlemlenmiştir. Diğer taraftan, Çizelge 6.2’de de görüleceği üzere hem anodik hem de katodik piklerin derişim arttıkça arttığı gözlemlenmiştir. Şekil 6.4 e’de 100 mM derişimindeki redoks problemlerinin sonuçlarına bakıldığında ise $K_3Fe(CN)_6$ ’de sadece anodik pik gözlemlenirken, katodik pik oluşmamıştır. $K_4Fe(CN)_6$ ve $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ ’de ise sadece katodik pik oluştuğu, anodik pik ise oluşmadığı görülmüştür. Ayrıca yükseltgenme ve indirgenme sonucu elde edilen anodik ve katodik pik oranı redoks sisteminin ne kadar tersinir olduğu hakkında bilgi verebilmektedir (Koç vd. 2021b).

Çizelge 6.2.Farklı derişimdeki $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$ ve $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks problemlerinin döngüsel voltametri sonuçları.

Redoks Problemleri	$I_{P(a)}, \mu A$	$I_{P(c)}, \mu A$	$E_{P(a)}, mV$	$E_{P(c)}, mV$	$n = I_{P(a)} / I_{P(c)}$
100 mM $K_3Fe(CN)_6$	758,5	-	401,3	-	-
10 mM $K_3Fe(CN)_6$	82,2	-114,10	374,3	-230,6	0,72
1 mM $K_3Fe(CN)_6$	12,67	-	208,9	-	-
0,1 mM $K_3Fe(CN)_6$	11,83	-	167,9	-	-
0,01 mM $K_3Fe(CN)_6$	-	-	-	-	-
100 mM $K_4Fe(CN)_6$	-	-583,60	-	-9,1	-
10 mM $K_4Fe(CN)_6$	122,80	135,30	449,1	69,9	0,90
1 mM $K_4Fe(CN)_6$	28,34	-	444,2	-	-
0,1 mM $K_4Fe(CN)_6$	12,24	-	100,8	-	-
0,01 mM $K_4Fe(CN)_6$	-	-	-	-	-
100 mM $K_3Fe(CN)_6 / K_4Fe(CN)_6$	-	-985,50	-	-156,8	-
10 mM $K_3Fe(CN)_6 / K_4Fe(CN)_6$	135,3	-111,00	372,8	-64,5	1,21
1 mM $K_3Fe(CN)_6 / K_4Fe(CN)_6$	20,45	-	281,5	-	-
0,1 mM $K_3Fe(CN)_6 / K_4Fe(CN)_6$	11,94	-	106,1	-	-
0,01 mM $K_3Fe(CN)_6 / K_4Fe(CN)_6$	-	-	-	-	-

EIS yöntemi kullanılarak yapılan analizde, SPCE'nin elektrot ara yüzeyinde meydana gelen elektrokimyasal davranış incelenmiştir. SPCE'nin elektrot ile elektrolit ara yüzeyindeki yük transfer kinetiğini ve elektroanalitik performansını araştırmak için CV yönteminde olduğu gibi beş farklı derişimdeki $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$ ve $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks problemleri kullanılmıştır.

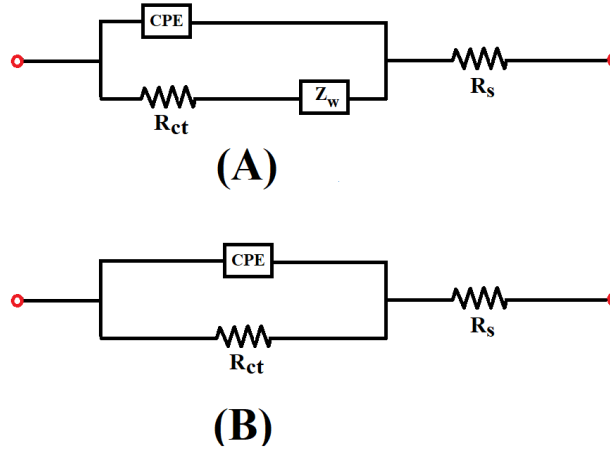


Şekil 6.5. SPCE'nin elektrot ile elektrolit ara yüzeyindeki elektron transferinin, eşdeğer elektrik devresi ile birlikte şematik gösterimi.

Ekran baskılı elektrotta elektron aktarım mekanizması elektrolit ile elektrot ara yüzeyindeki elektriksel iyonların bir taşıyıcıdan diğerine aktarıldığı geçişi ifade etmektedir. Elektrot, elektrolite göre pozitif yüke sahip olduğunda negatif iyonlar ara yüzey bölgesine çekilerek, elektrot yüzeyine absorbe olmaktadır. Bu transfer mekanizması Şekil 6.5'teki elektrot ile elektrolit ara yüzeyinin illüstrasyonu eşdeğer devre modeli ile birlikte gösterilmiştir.

SPCE'nin özelliklerinin EIS yöntemi kullanılarak eşdeğer devre modelleri ile modellenmesiyle analiz edilmektedir. Bu eşdeğer devre modellerindeki devre elemanları

direnç, indüktör ve kapasitör gibi devre elemanlarından oluşmaktadır. EIS verilerini analiz etmek için iki farklı devre modeli kullanılmış ve kullanılan eşdeğer devre modelleri Şekil 6.6'da verilmiştir.



Şekil 6.6. Eşdeğer devre modelleri; a) Warburg elemanı içeren, b) Warburg elemanı içermeyen modellerin gösterimi

Şekil 6.6'da kullanılan eşdeğer devre modelinde; R_s ya da R_e gösterilen elektrolit direncini, R_{ct} yük transfer direncini, CPE (Q , α) sabit faz elemanını, Z_w warburg devre elemanını ifade etmektedir (Orazem ve Tribollet, 2017). Bu devre elemanlarının empedans tepkileri denklem 6.3'teki matematiksel modeller kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Z_1 = R_s = R_e, \quad Z_{CPE} = \frac{1}{Q(j\omega)^\alpha}, \quad Z_3 = R_{ct}, \quad Z_4 = Z_w = \frac{A_w}{\sqrt{j\omega}} \quad (6.3)$$

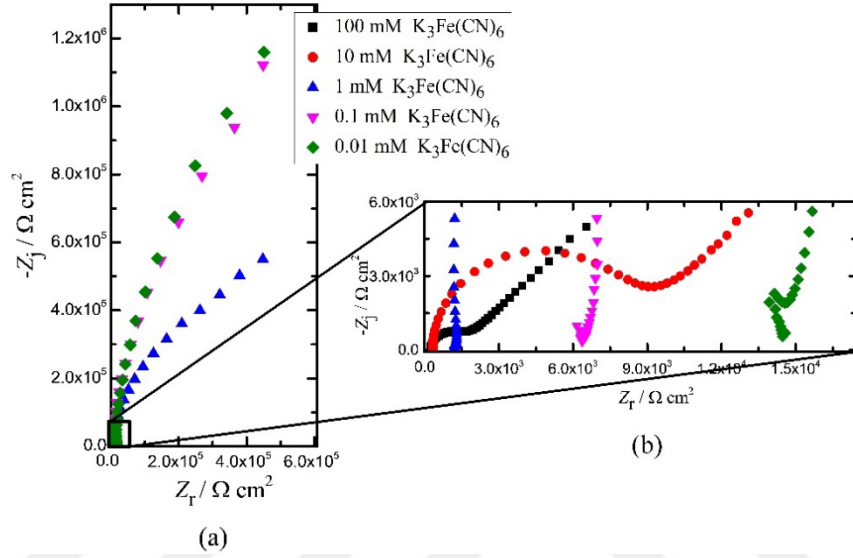
Her bir EIS verisi Şekil 6.6'daki iki devre modeli kullanılarak modellenmiştir. Warburg devre elemanını içeren model A için matematiksel hesaplama denklem 6.4'te verilmiştir.

$$\Sigma Z = Z_1 + \left[\frac{1}{Z_2} + \frac{1}{Z_3 + Z_4} \right]^{-1} = R_s + \frac{R_{ct} + Z_w}{1 + (j\omega)^\alpha (R_{ct} + Z_w) Q} \quad (6.4)$$

Warburg devre elemanını içermeyen model B için matematiksel hesaplama ise denklem 6.5'te verilmiştir.

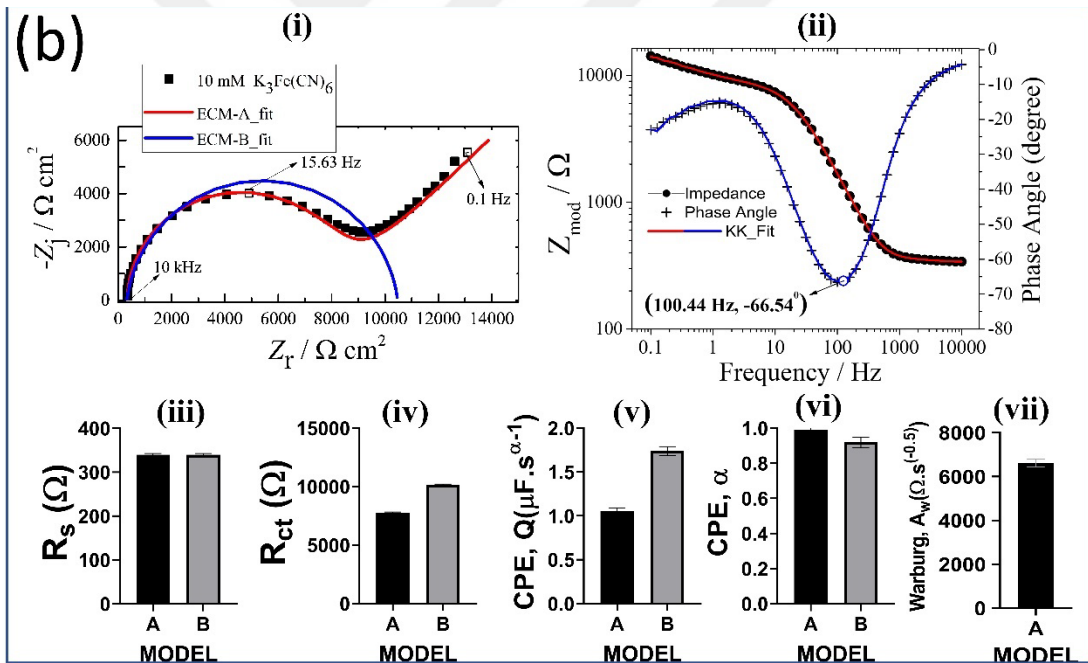
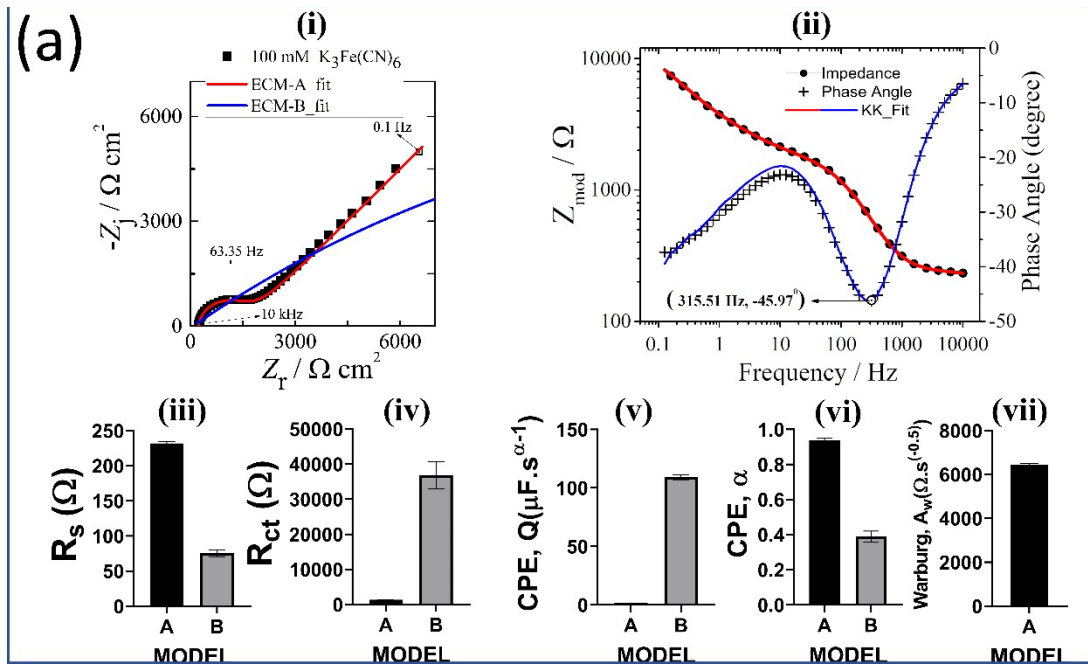
$$\Sigma Z = Z_1 + \left[\frac{1}{Z_2} + \frac{1}{Z_3} \right]^{-1} = R_s + \frac{R_{ct}}{1+(j\omega)^\alpha(R_{ct})Q} \quad (6.5)$$

SPCE'nin üzerine farklı derişimlerde (0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM, 10 mM ve 100 mM) deiyonize su içerisinde hazırlanmış $K_3Fe(CN)_6$ kullanılarak, 10 kHz - 0,1 Hz frekans aralığında alınan ölçümlerde elde edilen Nyquist grafiğı Şekil 6.7'te verilmiştir.

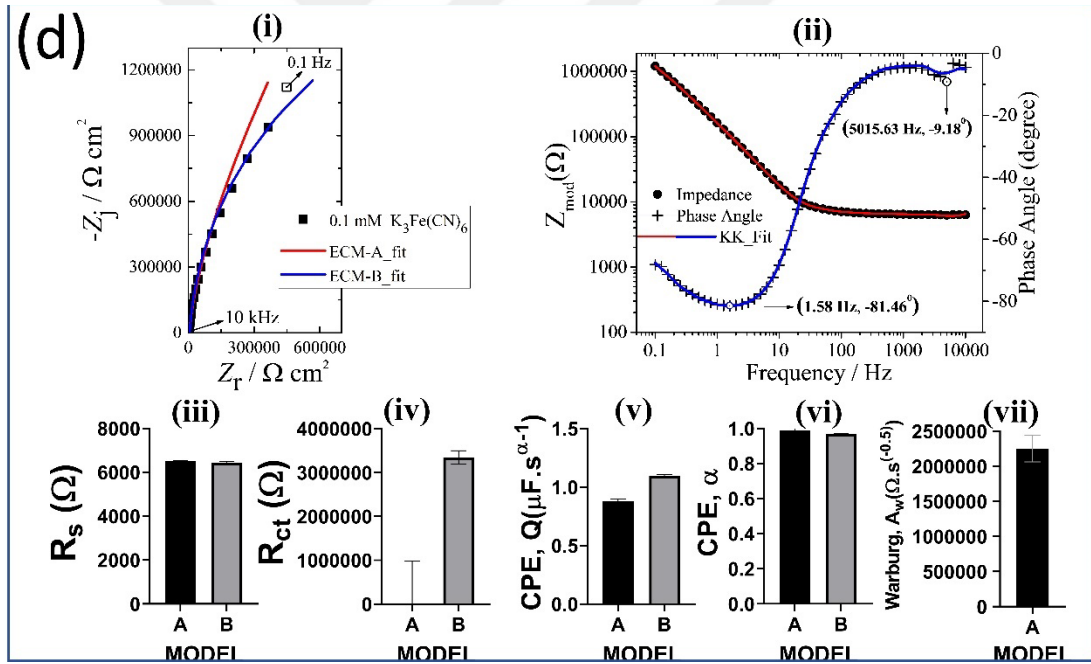
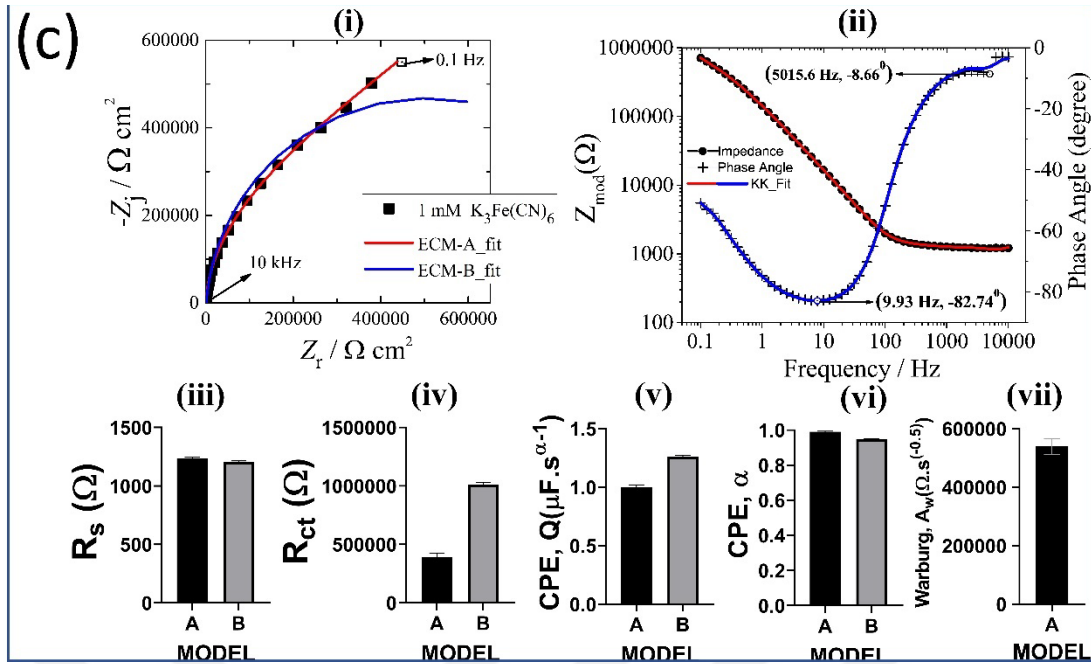


Şekil 6.7. a) SPCE kullanılarak farklı derişimlerdeki $K_3Fe(CN)_6$ inkübe edilmesi sonucu 0,1 Hz ile 10 kHz frekans aralığında elde edilen Nyquist grafiğı, b) yüksek frekans bölgesinin yakınlaştırılmış Nyquist grafiğı.

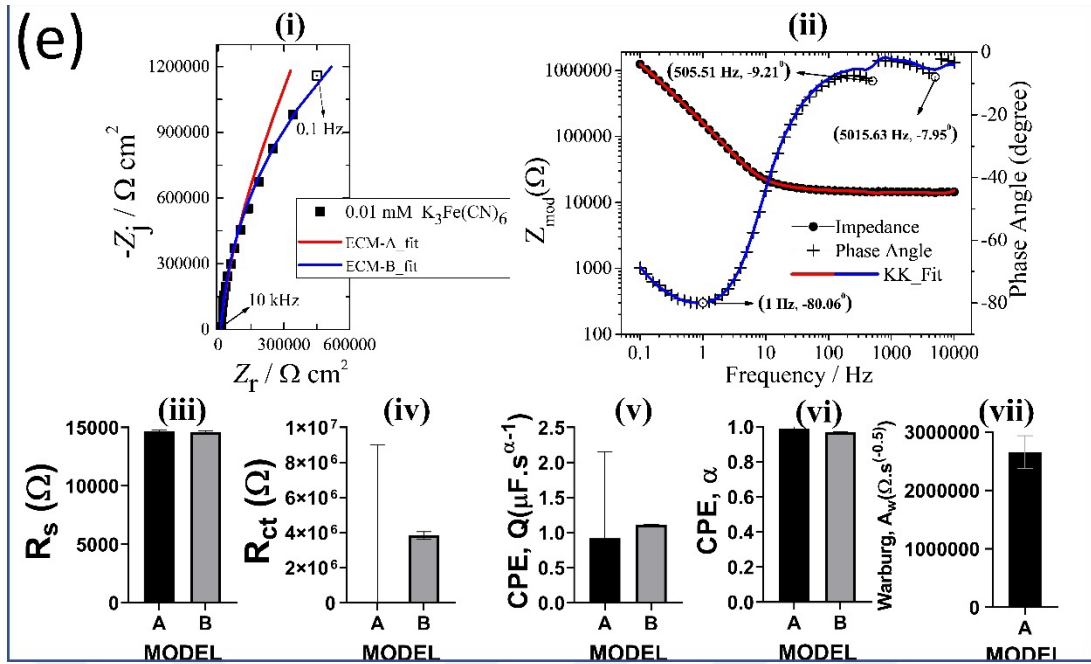
Şekil 6.7'de $K_3Fe(CN)_6$ 'nın farklı derişimlerdeki empedans yanıtları gösterilmiştir. İki farklı model ile ayrıntılı incelemesi Şekil 6.8'de yapılmıştır.



Şekil 6.8. $K_3Fe(CN)_6$ 'nin farklı derişimlerdeki empedans yanıtlarının iki farklı model ile ayrıntılı incelemesi, a) 100 mM $K_3Fe(CN)_6$, b) 10 mM $K_3Fe(CN)_6$, c) 1 mM $K_3Fe(CN)_6$, d) 0,1 mM $K_3Fe(CN)_6$, e) 0,01 mM $K_3Fe(CN)_6$, i) Nyquist grafiğı ii) Bode grafiğı, iii) R_s elektrolit direnci, iv) R_{ct} şarj aktarım direnci, v) Q , kapasitans değeri, vi) α , sabit faz elemanı katsayısı, vii) A_w , warburg empedansı katsayısı.



Şekil 6.8. $K_3Fe(CN)_6$ 'nin farklı derişimlerdeki empedans yanıtlarının iki farklı model ile ayrıntılı incelemesi, a) 100 mM $K_3Fe(CN)_6$, b) 10 mM $K_3Fe(CN)_6$, c) 1 mM $K_3Fe(CN)_6$, d) 0,1 mM $K_3Fe(CN)_6$, e) 0,01 mM $K_3Fe(CN)_6$, i) Nyquist grafiğı ii) Bode grafiğı, iii) R_s elektrolit direnci, iv) R_{ct} şarj aktarım direnci, v) Q , kapasitans değeri, vi) α , sabit faz elemanı katsayısı, vii) A_w , warburg empedansı katsayısı (devam)



Şekil 6.8. $K_3Fe(CN)_6$ 'nin farklı derişimlerdeki empedans yanıtlarının iki farklı model ile ayrıntılı incelemesi, a) 100 mM $K_3Fe(CN)_6$, b) 10 mM $K_3Fe(CN)_6$, c) 1 mM $K_3Fe(CN)_6$, d) 0,1 mM $K_3Fe(CN)_6$, e) 0,01 mM $K_3Fe(CN)_6$, i) Nyquist grafiğı ii) Bode grafiğı, iii) R_s elektrolit direnci, iv) R_{ct} şarj aktarım direnci, v) Q , kapasitans değeri, vi) α , sabit faz elemanı katsayısı, vii) A_w , warburg empedansı katsayısı (devam)

Şekil 6.8 a'da 100 mM $K_3Fe(CN)_6$ 'nin iki farklı modele göre fit edilmesi sonucunda elde edilen Nyquist grafiğı, kramers kronik uygunluğu test edilmiş Bode grafiğı ve modellere göre elde edilmiş data sonuçları bulunmaktadır. Nyquist grafiğı incelendiğinde 100 mM $K_3Fe(CN)_6$ 'nin önce yarım çember daha sonra lineer difüzyon (kütle transferi) olduğu, bode grafiğı incelendiğinde kramers kroniğe uygun olduğu görülmektedir. Nyquist grafiğı warburg devre elemanını içeren model A ile fit edildiğinde ham dataya uygun olduğu görülmüş ve model B'ye göre empedans sonuçlarında hata oranlarının daha az olduğu görülmüştür. 100 mM $K_3Fe(CN)_6$ 'nin empedans verisinin fit edilmesi için uygun modelini model A olduğu saptanmıştır. Şekil 6.8 b'de 10 mM $K_3Fe(CN)_6$ 'nin Nyquist grafiğı incelendiğinde önce yarım çember oluşturduğu sonra lineer difüzyon gözlemlendiği ve bode grafiğinin kramers kroniğe uygun olduğu görülmüştür. Nyquist grafiğinin iki farklı modele göre fit edilmesi sonucu model A'ya göre fit edildiğinde ham datayı tam olarak fit ettiği görülmektedir. Empedans sonuçları incelendiğinde, her iki modelde de hata oranının düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle 10 mM $K_3Fe(CN)_6$ 'yi model A'nın uygun şekilde fit etmesinden dolayı doğru modelin model A olduğu belirlenmiştir. Şekil 6.8 c'de 1 mM $K_3Fe(CN)_6$ 'nin Nyquist grafiğı incelendiğinde tam bir yarım çember oluşmadığı, bode grafiğı incelendiğinde ise başlangıç frekansı 10000 Hz'den 5015,6 Hz'e kadar bozulmalar

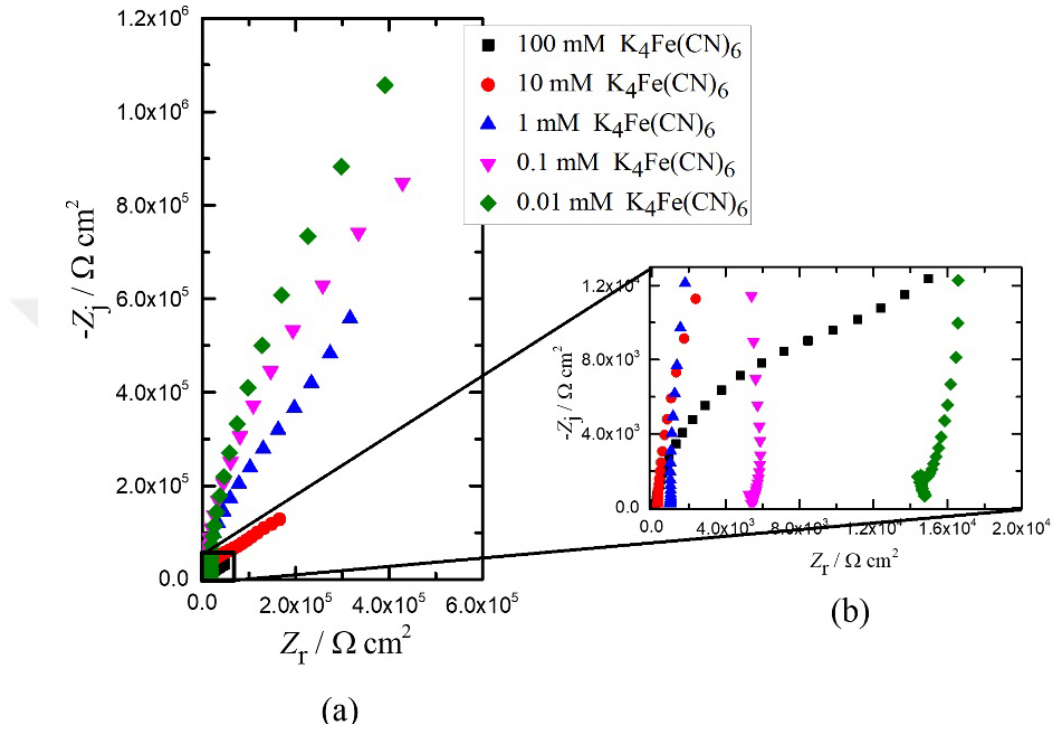
olduğu görülmüştür. İki farklı modele göre fit edildiğinde model A ile daha uygun fit edildiği görülmektedir. Şekil 6.8 d’de 0,1 mM $K_3Fe(CN)_6$ ’nin Nyquist grafiği incelendiğinde yarım çember oluşmadığı, bode grafiği incelendiğinde ise tekrar başlangıç frekansı 10000 Hz’den 5015,6 Hz’e kadar bozulmalar olduğu gözlemlenmiştir. Empedans sonuçları incelendiğinde, açık olarak model B’nin hata oranının daha az olduğu görülmüştür. Bu nedenle 0,1 mM $K_3Fe(CN)_6$ ’nin modellenmesinde uygun modelin model B olduğu görülmüştür. Şekil 6.8 e’de 0,01 mM $K_3Fe(CN)_6$ ’nin Nyquist grafiği incelendiğinde yarım çember oluşmadığı, bode grafiği incelendiğinde ise başlangıç frekansı 10000 Hz’den, 505,51 Hz’e kadar bozulmalar olduğu görülmüştür. Modelleme sonucu elde edilen empedans verileri incelendiğinde ise hata oranı az olan model B’nin uygun fit modeli olduğu görülmüştür.

Çizelge 6.3. SPCE kullanılarak farklı derişimlerdeki $K_3Fe(CN)_6$ inkübe edilmesi sonucu 0,1 Hz ile 10 kHz frekans aralığında elde edilen Nyquist grafiklerinin modellenmesi sonucu elde edilen data sonuçlarının karşılaştırılması.

Redoks Problemleri	Model	R_s, Ω	R_{ct}, Ω	$Q, \mu F s^{a-1}$	α	$A_w, \Omega s^{-0.5}$
100 mM $K_3Fe(CN)_6$	A	232±2,68	1362±27,35	1,50±0,12	0,94±0,01	6439,15±76,29
	B	75,42±4,62	36770±3876	109,2±2,17	0,39±0,003	-
10 mM $K_3Fe(CN)_6$	A	339,7±3,07	7740±90,43	1,05±0,04	0,99±0,005	6618,13±172,61
	B	339,7±3,07	10150±70,93	1,74±0,05	0,92±0,003	-
1 mM $K_3Fe(CN)_6$	A	1235±8,98	393900±32120	1,002±0,02014	0,99±0,004	539956,80±26484,71
	B	1206±8,09	1011000±18910	1,263±0,01137	0,95±0,002	-
0,1 M $K_3Fe(CN)_6$	A	6500±46,09	21000±961800	0,8771±0,2104	0,99±0,013	2252759,631±189142,5
	B	6444±36,45	3348000±150300	1,098±0,009589	0,96±0,003	-
0,01 M $K_3Fe(CN)_6$	A	14670±111,9	4949±8983000	0,9193±1,296	0,99±0,014	2653223,67±282569,38
	B	14600±77,15	3846000±207900	1,112±0,01009	0,97±0,003	-

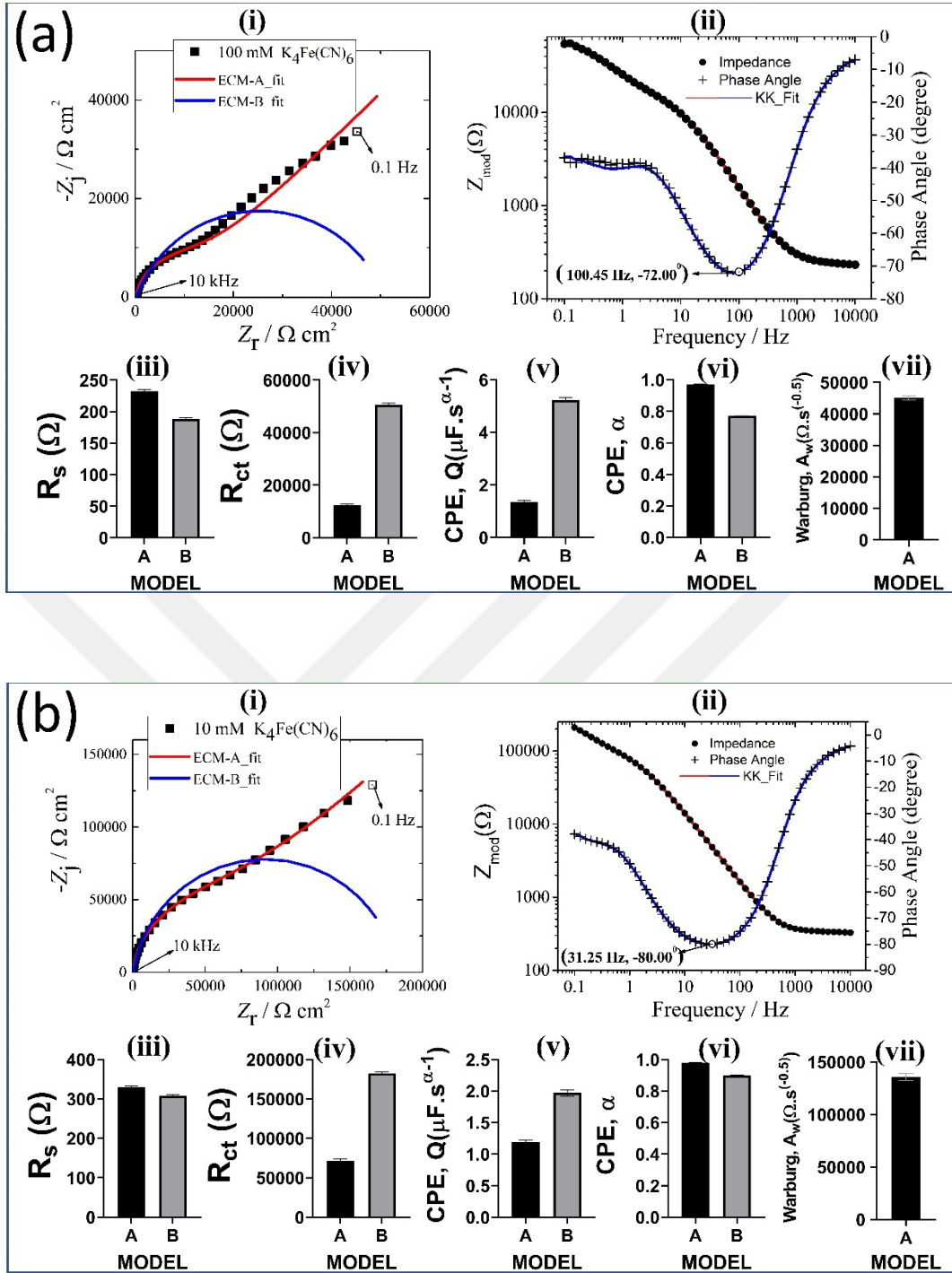
Şekil 6.7’deki Nyquist grafiğinin iki farklı devre modeline göre modellenmesi sonucu elde edilen Çizelge 6.3’deki sonuçlardaki hata oranları incelendiğinde 100 mM, 10 mM ve 1 mM derişimi için uygun eşdeğer devre modelinin A, 0,1 mM ve 0,01 mM derişimdeki redoks problemleri için ise uygun eşdeğer devre modelinin B olduğu tespit edilmiştir.

Bir diğerk redoks probu ise $K_4Fe(CN)_6$ 'tür. SPCE'nin üzerine farklı derişimler deiyonize su içerisinde hazırlanmış (0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM, 10 mM ve 100 mM) $K_4Fe(CN)_6$, kullanılarak 10 kHz – 0,1 Hz frekans aralığında alınan ölçümlerde elde edilen Nyquist grafiğı Şekil 6.9.'te verilmiştir.

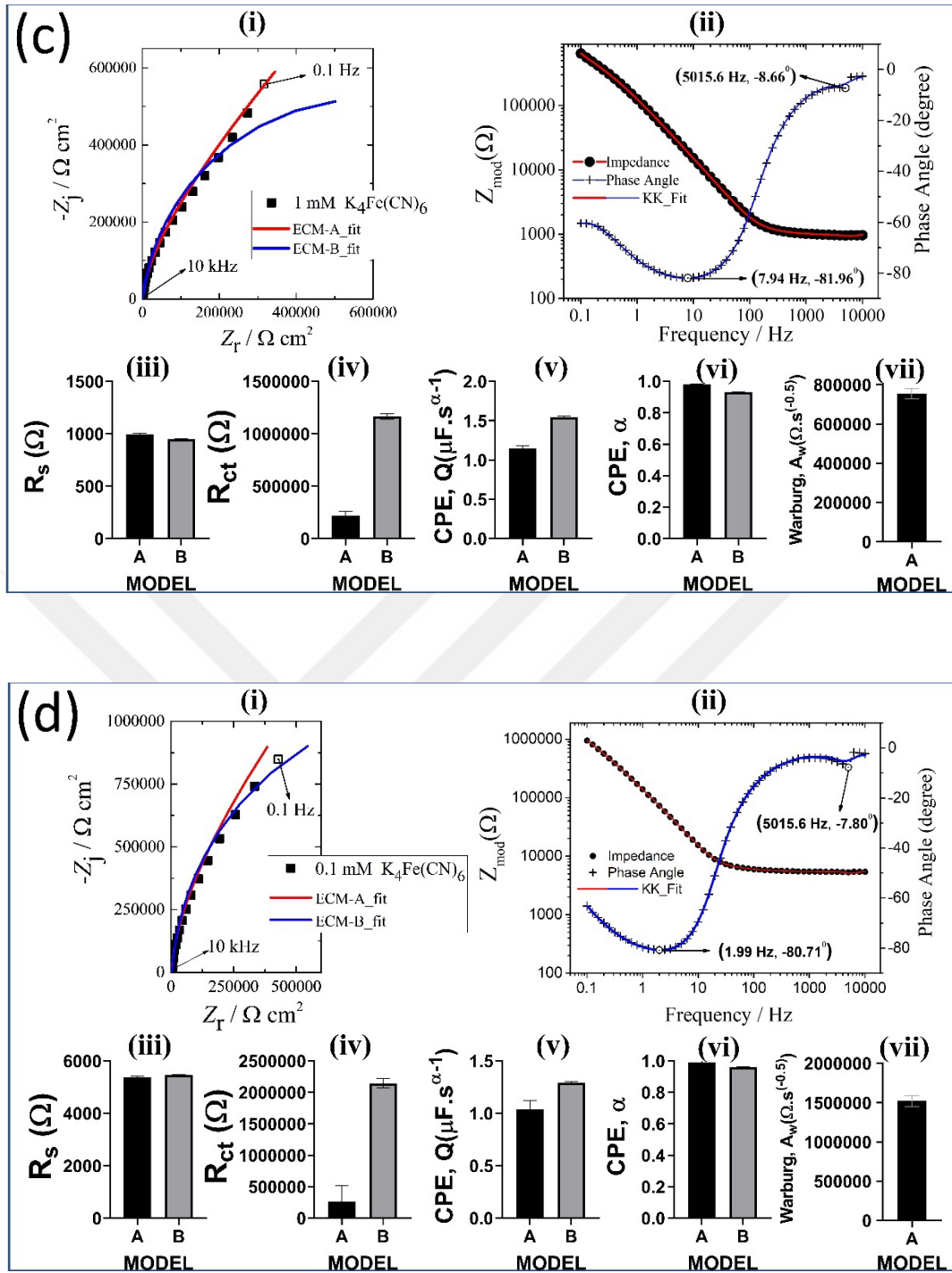


Şekil 6.9. a) SPCE kullanılarak farklı derişimlerdeki $K_4Fe(CN)_6$ inkübe edilmesi sonucu 0,1 Hz ile 10 kHz frekans aralığında elde edilen Nyquist grafiklerinin karşılaştırılması, b) yüksek frekans bölgesinin yakınlştırılmış Nyquist grafiğı.

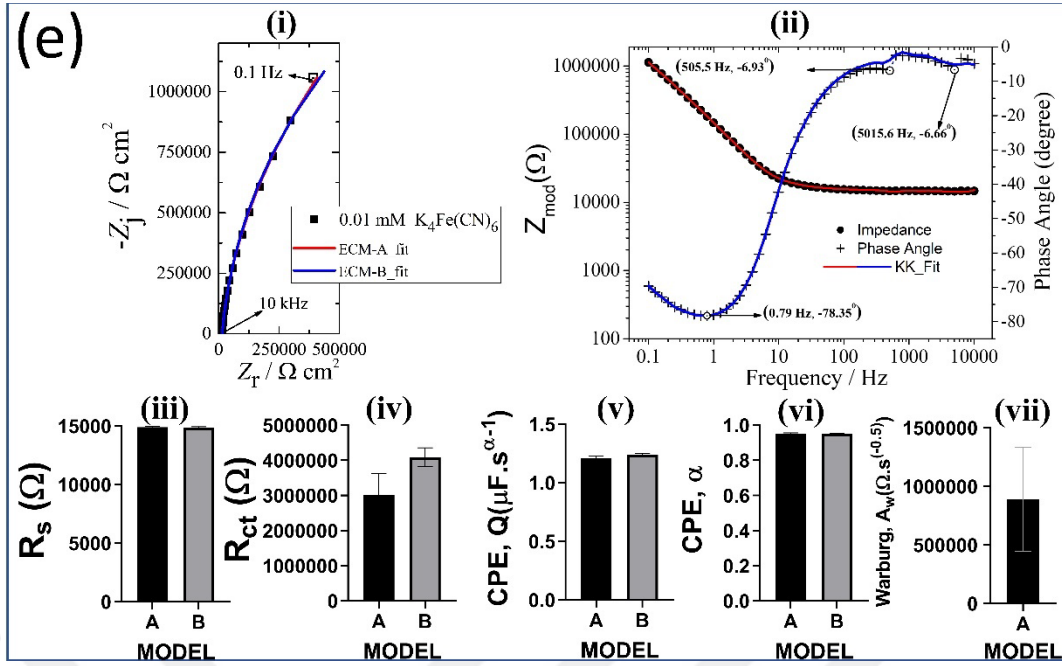
Şekil 6.9'da $K_4Fe(CN)_6$ 'nin farklı derişimlerdeki empedans yanıtları gösterilmiştir. İki farklı model ile ayrıntılı incelemesi Şekil 6.10'da yapılmıştır.



Şekil 6.10. $K_4Fe(CN)_6$ 'nin farklı derişimlerdeki empedans yanıtlarının iki farklı model ile ayrıntılı incelemesi, i) Nyquist grafiğı; a) 100 mM $K_4Fe(CN)_6$, b) 10 mM $K_4Fe(CN)_6$, c) 1 mM $K_4Fe(CN)_6$, d) 0,1 mM $K_4Fe(CN)_6$, e) 0,01 mM $K_4Fe(CN)_6$ ve içerisinde A ve B devre modellerine göre fit dataları, ii) $K_4Fe(CN)_6$ 'nin Bode grafiğı, Kramers-Kronigin test edilmesi. Nyquist grafiğı empedans yanıtları; iii) R_s elektrolit direnci, iv) R_{ct} şarj aktarım direnci, v) Q , kapasitans değeri, vi) α , sabit faz elemanı katsayısı, vii) A_w , warburg empedansı katsayısı.



Şekil 6.10. $K_4Fe(CN)_6$ 'nin farklı derişimlerdeki empedans yanıtlarının iki farklı model ile ayrıntılı incelemesi, i) Nyquist grafiğı; a) 100 mM $K_4Fe(CN)_6$, b) 10 mM $K_4Fe(CN)_6$, c) 1 mM $K_4Fe(CN)_6$, d) 0,1 mM $K_4Fe(CN)_6$, e) 0,01 mM $K_4Fe(CN)_6$ ve içerisinde A ve B devre modellerine göre fit dataları, ii) $K_4Fe(CN)_6$ 'nin Bode grafiğı, Kramers-Kronigin test edilmesi. Nyquist grafiğı empedans yanıtları; iii) R_s elektrolit direnci, iv) R_{ct} şarj aktarım direnci, v) Q , kapasitans değeri, vi) α , sabit faz elemanı katsayısı, vii) A_w , warburg empedansı katsayısı (devam)



Şekil 6.10. $K_4Fe(CN)_6$ 'nin farklı derişimlerdeki empedans yanıtlarının iki farklı model ile ayrıntılı incelemesi, i) Nyquist grafiğı; a) 100 mM $K_4Fe(CN)_6$, b) 10 mM $K_4Fe(CN)_6$, c) 1 mM $K_4Fe(CN)_6$, d) 0,1 mM $K_4Fe(CN)_6$, e) 0,01 mM $K_4Fe(CN)_6$ ve içerisinde A ve B devre modellerine göre fit dataları, ii) $K_4Fe(CN)_6$ 'nin Bode grafiğı, Kramers-Kronigin test edilmesi. Nyquist grafiğı empedans yanıtları; iii) R_s elektrolit direnci, iv) R_{ct} şarj aktarım direnci, v) Q , kapasitans değeri, vi) α , sabit faz elemanı katsayısı, vii) A_w , warburg empedansı katsayısı (devam)

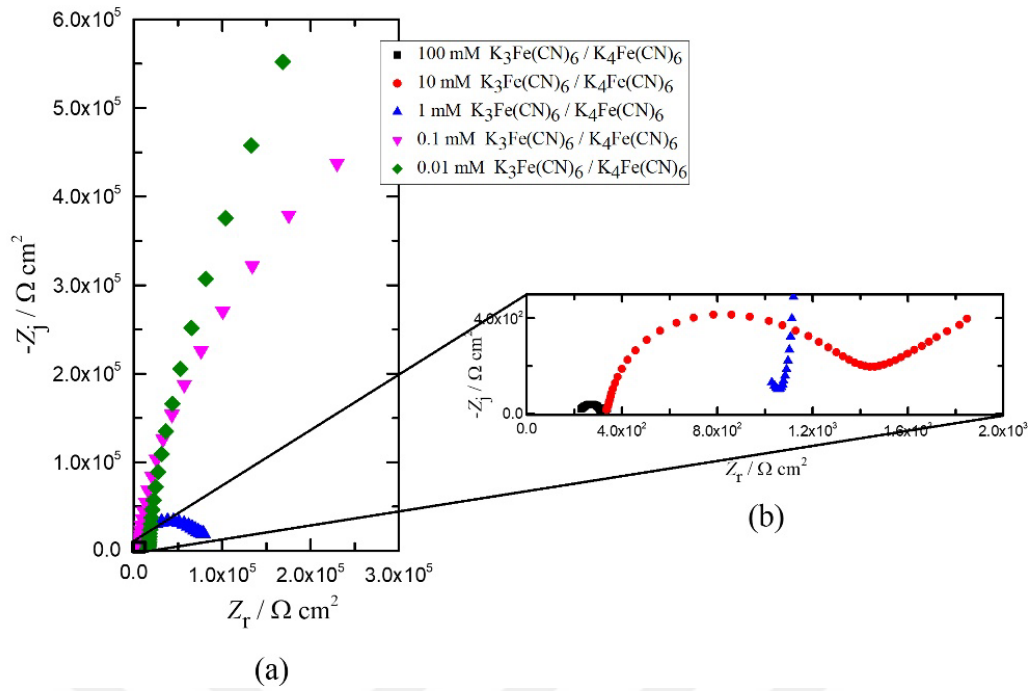
Şekil 6.10'da farklı derişimlerdeki $K_4Fe(CN)_6$ 'nin iki farklı modele göre fit edilmesi sonucunda elde edilen Nyquist grafiğı, kramers kronik uygunluğı test edilmiş Bode grafiğı ve modellere göre elde edilmiş data sonuçları bulunmaktadır. Şekil 6.10 a, b ve c'de sırasıyla 100 mM, 10 mM ve 1 mM $K_4Fe(CN)_6$ 'nin Nyquist grafiğı $K_3Fe(CN)_6$ 'de de olduğı gibi önce yarım çember daha sonra lineer difüzyon gösterdiği ve empedans sonuçlarındaki hata oranlarına göre model A'nın uygun model olduğı görülmüştür. Şekil 6.10 d ve e'de sırasıyla 0,1 mM ve 0,01 mM $K_4Fe(CN)_6$ 'nin Nyquist grafiğı incelendiğinde ise $K_3Fe(CN)_6$ 'de de olduğı gibi tam bir yarım çember ve lineer difüzyon oluşmadığı ve empedans sonuçlarındaki hata oranlarına göre model B'nin uygun model olduğı görülmüştür. Bode grafiğikleri incelendiğinde ise kramers kroniğe uygun olduğı ve düşük derişimlerde (1 mM, 0,1 mM, 0,01 mM) başlangıç frekanslarında bozulmalar $K_3Fe(CN)_6$ 'de olduğı gibi tekrarladığı görülmektedir.

Çizelge 6.4. SPCE kullanılarak farklı derişimlerdeki $K_4Fe(CN)_6$ inkübe edilmesi sonucu 0,1 Hz ile 10 kHz frekans aralığında elde edilen Nyquist grafiklerinin modellenmesi sonucu elde edilen data sonuçlarının karşılaştırılması.

Redoks Problemleri	Model	R_s, Ω	R_{ct}, Ω	$Q, \mu F s^{a-1}$	α	$A_w, \Omega s^{-0.5}$
100 mM $K_4Fe(CN)_6$	A	232,5±2,33	12490±387,3	1,36±0,05	0,97±0,005	45065,34±660,85
	B	188,2±2,21	50660±568,3	5,24±0,08	0,77±0,002	-
10 mM $K_4Fe(CN)_6$	A	329,8±2,91	71060±2766	1,19±0,03	0,98±0,003	136054,42±3315,29
	B	308,2±2,65	182400±2060	1,97±0,05	0,90±0,002	-
1 mM $K_4Fe(CN)_6$	A	996,1±7,50	216600±43200	1,144±0,04	0,98±0,005	754716,98±26514,77
	B	947,3±6,60	1164000±27120	1,54±0,02	0,93±0,002	-
0,1 M $K_4Fe(CN)_6$	A	5378±37,22	265900±249200	1,04±0,08	0,99±0,014	1521838,38±69502,92
	B	5459±30,89	2144000±74050	1,29±0,01	0,96±0,003	-
0,01 M $K_4Fe(CN)_6$	A	14900±87,89	3011000±607500	1,21±0,02	0,95±0,006	890471,95±444601,62
	B	14870±78,81	4089000±268300	1,24±0,01	0,95±0,003	-

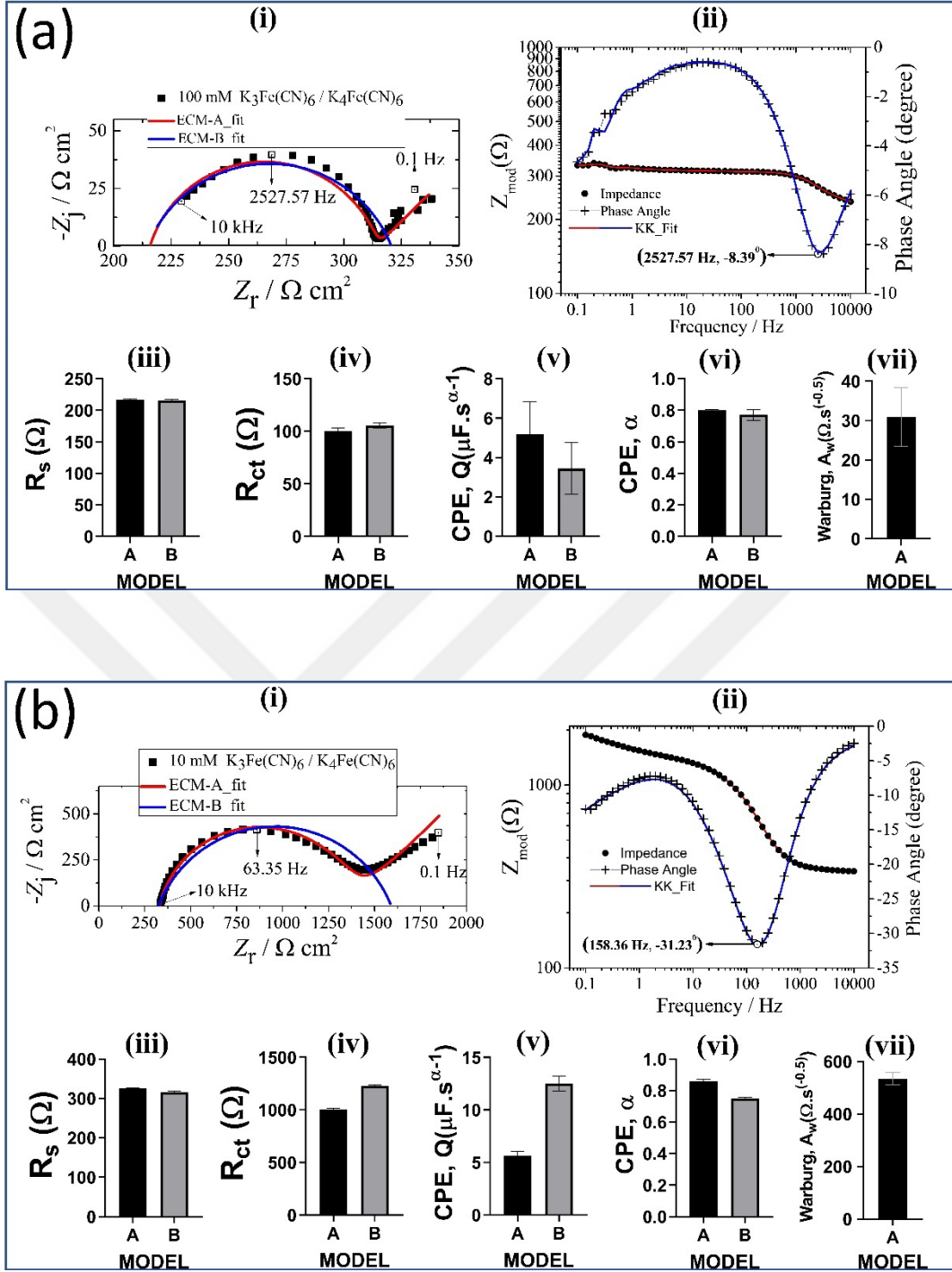
Şekil 6.9'daki Nyquist grafiğinin modellenmesi sonucu elde edilen Çizelge 6.4'deki sonuçlardaki hata oranları incelendiğinde $K_3Fe(CN)_6$ 'te olduğu gibi $K_4Fe(CN)_6$ 'te de 100 mM, 10 mM ve 1 mM derişimi için uygun eşdeğer devre modelinin A, 0,1 mM ve 0,01 mM derişimdeki redoks problemlerinin de ise uygun eşdeğer devre modelinin B olduğu tespit edilmiştir.

Bir diğer redoks probu ise $K_3Fe(CN)_6$ ve $K_4Fe(CN)_6$ 'den eş hacimde alınarak oluşturulan $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks problemleridir. SPCE'nin üzerine farklı derişimler deiyonize su içerisinde hazırlanmış (0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM, 10 mM ve 100 mM) $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, kullanılarak 10 kHz - 0,1 Hz frekans aralığında alınan ölçümlerde elde edilen Nyquist grafiği Şekil 6.11'te verilmiştir.

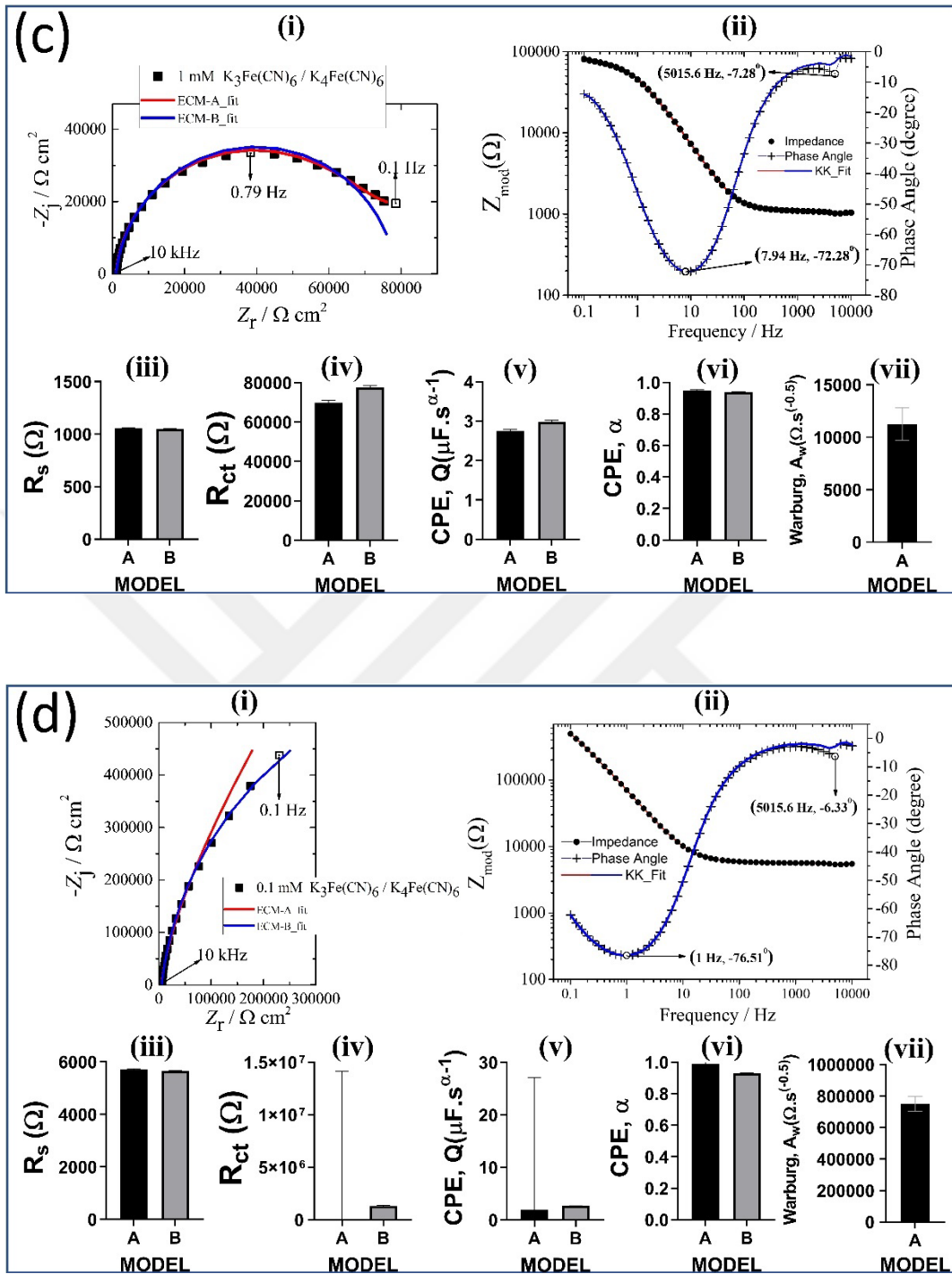


Şekil 6.11. a) SPCE kullanılarak farklı derişimlerdeki $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ inkübe edilmesi sonucu 0,1 Hz ile 10 kHz frekans aralığında elde edilen Nyquist grafiklerinin karşılaştırılması, b) yüksek frekans bölgesinin yakınlaştırılmış Nyquist grafiğı.

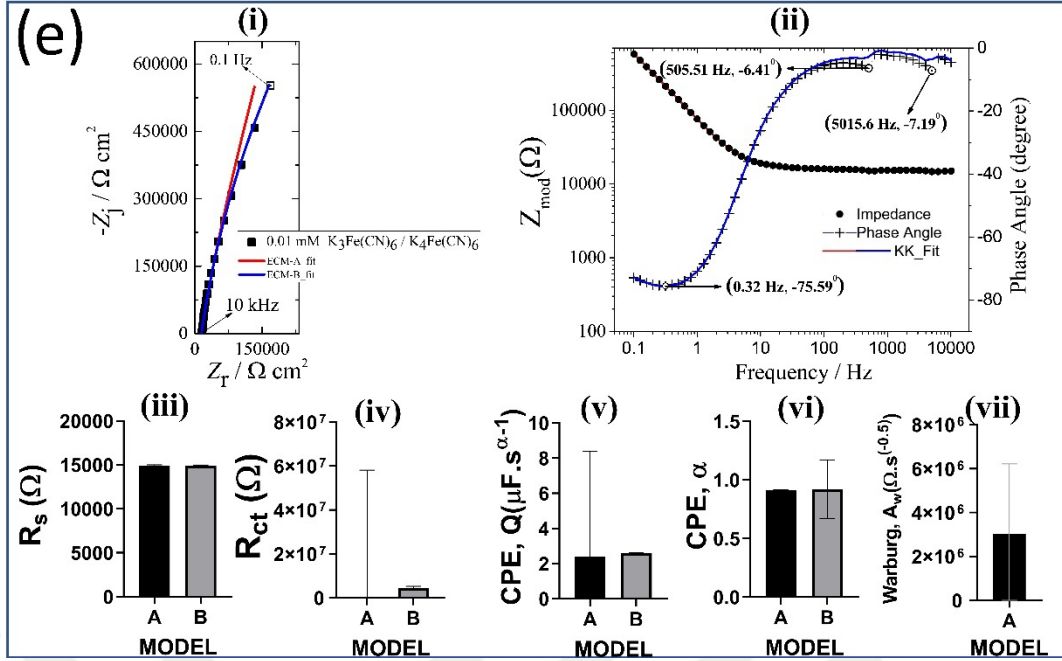
Şekil 6.11.'de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 'nin farklı derişimlerdeki empedans yanıtları gösterilmiştir. İki farklı model ile ayrıntılı incelemesi Şekil 6.12'de gösterilmiştir.



Şekil 6.12. $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 'nin farklı derişimlerdeki empedans yanıtlarının iki farklı model ile ayrıntılı incelemesi, i) Nyquist grafiğı; a) 100 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, b) 10 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, c) 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, d) 0,1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, e) 0,01 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ ve içerisinde A ve B devre modellerine göre fit dataları, ii) $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 'nin Bode grafiğı, Kramers-Kronigin test edilmesi. Nyquist grafiğı empedans yanıtları; iii) R_s elektrolit direnci, iv) R_{ct} şarj aktarım direnci, v) Q , kapasitans değeri, vi) α , sabit faz elemanı katsayısı, vii) A_w , warburg empedansı katsayısı.



Şekil 6.12. $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 'nin farklı derişimlerdeki empedans yanıtlarının iki farklı model ile ayrıntılı incelemesi, i) Nyquist grafiğı; a) 100 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, b) 10 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, c) 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, d) 0,1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, e) 0,01 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ ve içerisinde A ve B devre modellerine göre fit dataları, ii) $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 'nin Bode grafiğı, Kramers-Kronigin test edilmesi. Nyquist grafiğı empedans yanıtları; iii) R_s elektrolit direnci, iv) R_{ct} şarj aktarım direnci, v) Q , kapasitans değeri, vi) α , sabit faz elemanı katsayısı, vii) A_w , warburg empedansı katsayısı (devam)



Şekil 6.12. $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 'nin farklı derişimlerdeki empedans yanıtlarının iki farklı model ile ayrıntılı incelemesi, i) Nyquist grafiğı; a) 100 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, b) 10 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, c) 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, d) 0,1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, e) 0,01 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ ve içerisinde A ve B devre modellerine göre fit dataları, ii) $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 'nin Bode grafiğı, Kramers-Kronigin test edilmesi. Nyquist grafiğı empedans yanıtları; iii) R_s elektrolit direnci, iv) R_{ct} şarj aktarım direnci, v) Q , kapasitans değeri, vi) α , sabit faz elemanı katsayısı, vii) A_w , warburg empedansı katsayısı (devam)

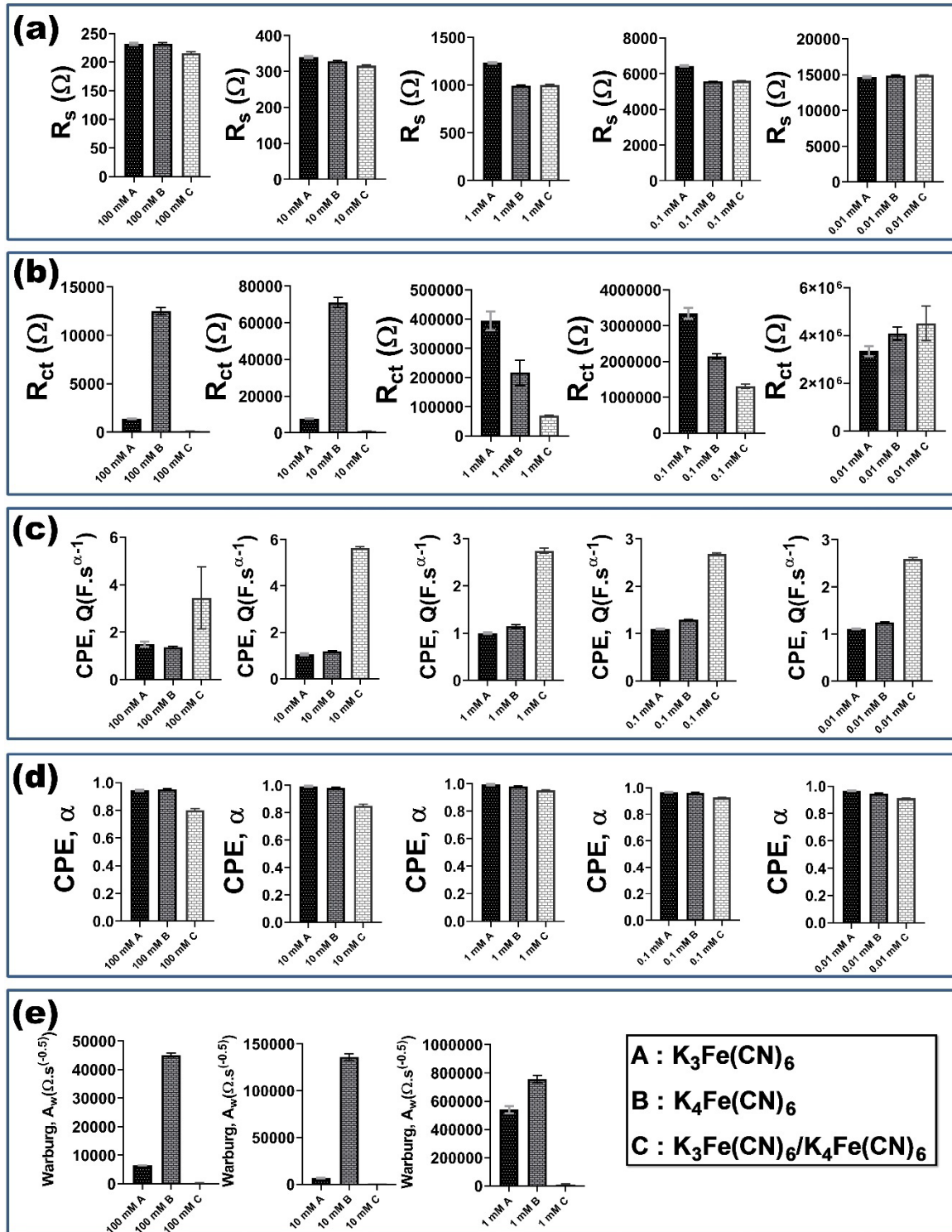
Şekil 6.12'deki farklı derişimlerdeki $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 'ün iki farklı modele göre fit edilmesi sonucunda elde edilen Nyquist grafiğı, kramers kronik uygunluğu test edilmiştir. Bode grafiğı ve modellere göre elde edilmiş data sonuçları bulunmaktadır. Şekil 6.12 a, b ve c'de sırasıyla 100 mM, 10 mM ve 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 'nin Nyquist grafiğı $K_3Fe(CN)_6$ ve $K_4Fe(CN)_6$ 'ye göre yarım çemberinin tam bir yarım çembere daha çok benzediğı görülmüştür. Şekil 6.12 a'da 100 mM Nyquist ve bode grafiğı incelendiğinde bitiş frekanslarında bozulmalar olduğu görülmüştür. Buna rağmen elde edilen empedans sonuçları hata oranlarına incelendiğinde göre model A'nın uygun model olduğu görülmüştür. Şekil 6.12 b'de 10 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ Nyquist ve bode grafiğı incelendiğinde kramers kroniğe uygun olduğu empedans sonuçlarına göre model A'nın uygun olduğu görülmüştür. Şekil 6.12 c'de 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ Nyquist grafiğı incelendiğinde sadece yarım bir çember oluşturduğu ve lineer difüzyonun görülmediğı görülmüştür. Bode grafiğı incelendiğinde ise kramers kroniğe uygun olduğu ama diğer çözeltilerde olduğu gibi başlangıç frekansı 10000 Hz'den, 5015,6 Hz'e kadar bozulmalar olduğu görülmüştür. Elde edilen empedans sonuçları incelendiğinde göre model A'nın

uygun model olduğu görülmüştür. Şekil 6.12 d ve e’de sırasıyla 0,1 mM ve 0,01 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ ’nin Nyquist grafiği incelendiğinde ise $K_3Fe(CN)_6$ ve $K_4Fe(CN)_6$ ’de de olduğu gibi tam bir yarım çember ve lineer difüzyon oluşmadığı ve empedans sonuçlarındaki hata oranlarına göre model B’nin uygun model olduğu görülmüştür. Bode grafikleri incelendiğinde ise kramers kroniğe uygun olduğu ve başlangıç frekanslarında bozulmaların tekrarladığı görülmektedir.

Çizelge 6.5. SPCE kullanılarak farklı derişimlerdeki $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ inkübe edilmesi sonucu 0,1 Hz ile 10 kHz frekans aralığında elde edilen Nyquist grafiklerinin modellenmesi sonucu elde edilen data sonuçlarının karşılaştırılması.

Redoks Problemleri	Model	R_s, Ω	R_{ct}, Ω	$Q, \mu F s^{a-1}$	α	$A_w, \Omega s^{-0.5}$
100 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$	A	216,3±1,78	100,2±2,98	5,19±1,66	0,80±0,004	30,92±7,50
	B	215,5±1,68	105,7±2,56	3,45±1,31	0,77±0,033	-
10 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$	A	325±2,33	1002±13,34	5,64±0,43	0,86±0,011	534,19±23,51
	B	316,2±2,25	1225±11,18	12,51±0,7	0,75±0,008	-
1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$	A	1053±5,93	69820±1361	2,75±0,05	0,95±0,004	11243,53±1558,72
	B	1048±5,416	77640±802,5	2,98±0,04	0,94±0,003	-
0,1 M $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$	A	5702±38,39	130,2±14170000	1,92±25,22	0,99±0,120	750187,55±46401,32
	B	5652±26,28	1310000±61750	2,68±0,03	0,93±0,003	-
0,01 M $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$	A	14930±78,08	3583±58160000	2,40±5,98	0,91±0,004	303490,37±3178587,14
	B	14920±66,92	4510000±732000	2,59±0,03	0,92±0,251	-

Şekil 6.12’deki Nyquist grafiğinin modellenmesi sonucu elde edilen Çizelge 6.5’deki sonuçlardaki hata oranları incelendiğinde $K_3Fe(CN)_6$ ’te ve $K_4Fe(CN)_6$ ’te de olduğu gibi $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ ’te de 100 mM, 10 mM ve 1 mM derişimi için uygun eşdeğer devre modelinin A, 0,1 mM ve 0,01 mM derişimdeki redoks problemlerinin de ise uygun eşdeğer devre modelinin B olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 6.13. $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$ ve $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks problemlerinin empedans sonuçlarının eşdeğer devre modeline göre modellenmesi sonucu elde edilen regresyon sonuçları; a) R_s , Elektrolit direnci, b) R_{ct} , Şarj transfer direnci, c) Q , CPE sabiti, d) α , CPE katsayısı, e) Warburg elemanı katsayısı.

Elektrolit direnci (R_s ya da R_e), redoks probu ile SPCE arasında meydana gelen temasın direncini ifade etmektedir. Redoks probunun cinsine, konsantrasyonuna, iyon yapısına, sıcaklık ve aktif elektrot alanına göre değişim göstermektedir. R_s değeri Nyquist grafiğinin x ekseninin (Z_{real}), yüksek frekans bölgesindeki kesişmeyle elde edilmektedir (Orazem ve Tribollet, 2017). Her üç redoks probunun kendi içerisindeki derişimin azalması, R_s değerinin artmasına neden olmuştur. Redoks problemlerinin derişimlerinin azaldıkça, ohmic dirençteki artış düşük konsantrasyonun etkisi olduğu görülmüştür. Şekil 6.13 a'da üç farklı redoks probunun aynı derişimlerdeki R_s değerleri görülmektedir. R_s değerleri incelendiğinde 100 mM, 10 mM derişimlerinde yüksek elektrolit direnci $K_3Fe(CN)_6$ 'da daha sonra $K_4Fe(CN)_6$ ve en düşük $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ olduğu görülmüştür. Derişim 1 mM ve 0,1 mM olduğunda ise $K_4Fe(CN)_6$ ve $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 'nın çok yakın R_s değeri gösterirken, $K_3Fe(CN)_6$ tekrar en yüksek R_s değerine sahiptir. Derişim 0,01 mM olduğunda ise tüm redoks problemlerinin birbirine yakın ohmic dirence sahip olduğu görülmektedir. Sonuç olarak yüksek derişimlerde R_s değeri sırasıyla $K_3Fe(CN)_6$ ve $K_4Fe(CN)_6$ 'nin, $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 'den yüksek olduğu, derişim düştükçe birbirine yakın olduğu görülmüştür.

Yük transfer direnci (R_{ct}), elektrot/elektrolit arayüzeyinde meydana gelen reaksiyonları tanımlayan dirençtir. Yük transfer direncindeki farklılıklar, SPCE üzerinde meydana gelen elektrokimyasal reaksiyonlardaki değişimden ortaya çıkabilir (Koç vd. 2021b). Tüm redoks problemlerinin kendi içerisindeki derişim azaldıkça R_{ct} değerinin arttığı görülmüştür. Bunun nedeni ise artan derişimle, iyonların elektrot yüzeyine adsorplanma direncini düşürmesidir. Şekil 6.13 b'de $K_3Fe(CN)_6$ ve $K_4Fe(CN)_6$ redoks problemlerinin, $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks problemlerine göre her bir derişimdeki R_{ct} değeri aynı azalış ve artışı göstermemektedir. 100 mM, 10 mM derişimlerinde en yüksek R_{ct} değerinin $K_4Fe(CN)_6$ olduğu görülürken, 1 mM ve 0,1 mM derişimlerinde $K_3Fe(CN)_6$ olduğu görülmektedir. 0,01 mM derişimde ise hata payları dikkate alınırsa üç redoks probunda da R_{ct} değeri birbirine yakın değerdedir. Bunun nedeninin bare SPCE'nin, üzerinde herhangi bir immobilizasyon ile katman oluşmadan R_{ct} değerleri farklı redoks problemlerinde aynı elektrokimyasal tepkiyi vermemesidir.

CPE katsayısı (Q), elektrokimyasal sistemlerde kapasitans değerine karşılık gelen sabit faz elemanının katsayısıdır (Orazem ve Tribollet, 2017). Her üç redoks probunun kendi içerisindeki derişimin azalması ile kapasitansın(Q) azaldığı görülmüştür. Bunun nedeni derişim arttıkça çözelti içerisindeki iyonların karşı karşıya gelme durumu ve ihtimali

arttığından dolayı kapasitansı arttırmıştır. Şekil 6.13 c’de üç farklı $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$ ve $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks problemlerinin her beş derişiminde de en yüksek kapasitans değeri $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ ’de daha sonra ise sırasıyla $K_3Fe(CN)_6$ ve $K_4Fe(CN)_6$ ’de olduğu görülmektedir. Buradan da anlaşılacağı üzere $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ ’da iki farklı redoks probu ihtiva ettiğinden dolayı iyonların karşı karşıya gelme ihtimalinin daha da yüksek olması her derişimde $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ ’nin kapasitans değerinin diğer redoks problemlerinden daha yüksek çıkmasını sağlamıştır.

CPE’nin bir bileşeni olan α , elektrot yüzeyindeki akım dağılımı ve yüzey pürüzlülüğü hakkında bilgi vermektedir. Genel olarak α değeri $0 < \alpha < 1$ arasında değer aldığı ifade edilse de genellikle 0,5 ile 1 arasında değer alır. İdeal 1 değerini aldığında CPE katsayısı (Q) değeri çift tabaka kapasitansı olur ve elektrot yüzey akım dağılımı homojen varsayılır (Orazem ve Tribollet, 2017). Şekil 6.13 d’de üç farklı $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$ ve $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks problemlerinin α değerleri incelendiğinde derişim düştükçe, α değerinin de düştüğü görülmektedir. Bunun nedeninin derişim düşüşü ile iyi yüzey akım dağılımı göstermediği anlaşılmaktadır. Warburg elemanı (A_w, W), çözeltiden ara yüzeye bağlı olarak oluşan akımın empedansından kaynaklı, difüzyonu belirten empedanstır. Warburg empedansı, sistemin kütle transferine karşı gösterdiği dirençtir. Şekil 6.13 e’de $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$ ve $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks problemlerinin model A ile modellenen 100 mM, 10 mM ve 1 mM derişimindeki A_w değeri karşılaştırıldığında en yüksek değerler sırasıyla $K_4Fe(CN)_6$, $K_3Fe(CN)_6$, $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ şeklindedir.

Elde edilen CV ve EIS sonuçları incelendiğinde, CV analizinde SPCE’nin düşük derişimlerde anodik ve katodik oluşturmadağı, 10 mM derişimindeki redoks problemlerinde ise hem anodik hem de katodik pik oluşturduğundan en uygun derişimin 10 mM olduğu görülmüştür. EIS sonuçları incelendiğinde Nyquist grafiklerinden de görüleceğı üzere 100 mM, 10 mM derişimlerinde önce yarım çember oluşturup daha sonra difüzyona geçtiğı gözlemlenmiştir. Derişim düştükçe yarım çemberin ortadan kalktığı gözlemlenebilmektedir. Bu nedenle derişim değıştikçe kullanılacak eşdeğer devre modelinin de değışebileceğı gösterilmiş ve hangi derişimlerdeki hangi redoks problemleri ile çalışılmasının doğru olacağı hakkında detaylı bir inceleme yapılmıştır.

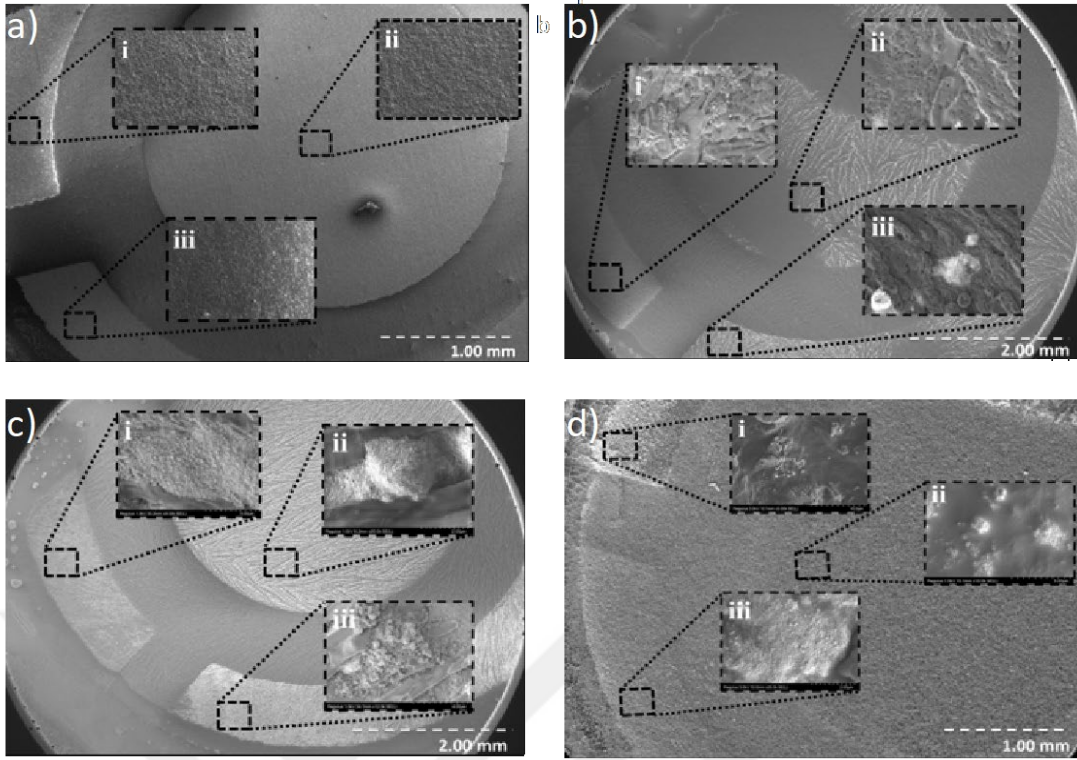
6.2. Ekran Baskılı Elektrotların Yüzey Karakterizasyonu

6.2.1. Ekran baskılı altın elektrotun yüzey karakterizasyonu

SPGE'nin yüzey karakterizasyonu SEM, EDX ve AFM analizleri yapılarak gerçekleştirilmiştir.

6.2.1.1 Ekran baskılı altın elektrotun SEM analizi sonuçları

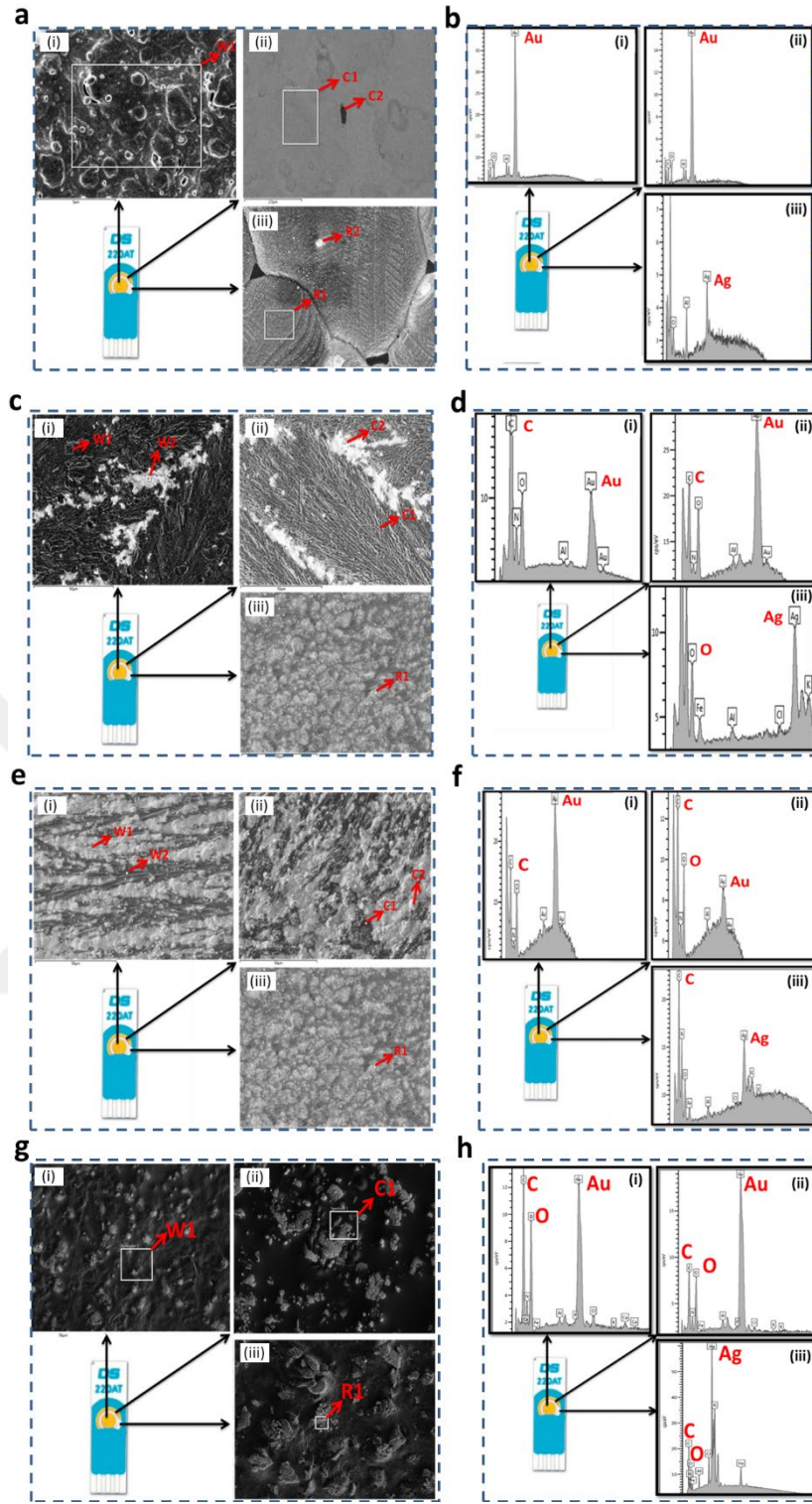
SPGE'nin yüzey morfolojisindeki değişimleri belirlemek için Şekil 6.14'te işlem görmemiş (bare) SPGE'nin genel görüntüsü bulunmaktadır. SPE'nin üç ayrı bölgesi için SEM analizi yapılmıştır. Bu bölgeler şekilde görüleceği üzere *i* ile belirtilen referans elektrotu, *ii* ile belirtilen çalışma elektrotunu ve *iii* ile belirtilen ise karşıt elektrotun SEM görüntülerini göstermektedir. Görüntüler incelendiğinde immobilizasyon aşamasında yüzey katmanlarının oluşacağı ve reaksiyonların gerçekleştiği çalışma elektrotunun (*ii*) yüzey morfolojisinin kısmen düzgün olduğu ve bazı gözenekli yapıların olduğu anlaşılmaktadır. *i* ve *iii*'te de benzer yüzey morfolojilerinin olduğu hatta *i*'de bazı dalgalanmaların olduğu görülmektedir. Kullanılan bu ticari elektrotlarda yüzey morfolojilerinin tam olarak düzgün olmaması elde edilecek olan biyosensörlerin seçicilik ve hassasiyet ölçümlerinde olumsuz etkiye bulunacakları kuşkusuzdur. Üretici firma bilgilerine göre, SPE'nin çalışma ve karşıt elektrotu altın, referans elektrotu ise gümüştür. Daha sonrasında elektrot yüzeyinde yapılan biyofonksiyonelleştirme işlemi ile meydana gelen değişiklikler irdelenmiştir (Şekil 6.14 b'de). Elde edilen biyosensörün yüzey morfolojisi incelendiğinde ve bare elektrot ile karşılaştırıldığında biyofonksiyonelleştirme işleminin büyük oranda başarılı olduğu görülmektedir. Bu değişiklikler EDX analizinde ortaya konulmuştur. Daha sonrasında yapılan rejenerasyon işlemi sonucunda elde edilen SEM görüntüleri Şekil 6.14. c'de görülmektedir. Görüntüler incelendiğinde rejenerasyon işlemi ile birlikte elektrot yüzeyi biyofonksiyonelleştirilmiş yüzeye göre değişimi açık bir şekilde görülmektedir. Burada özellikle bare haldeki SPGE'ye göre çalışma elektrotu bölgesinin işlem görmüş olduğu net olarak gözlemlenmiştir.



Şekil 6.14. a) İşlem görmemiş, b) biyofonksiyonelleştirilmiş, c) rejenerasyon ve d) tekrardan biyofonksiyonelleştirilmiş SPGE'ye ait SEM görüntülerinin karşılaştırılması; i) referans elektrot, ii) çalışma elektrot, iii) karşıt elektrot.

6.2.1.2. Ekran baskılı altın elektrotun EDX analizi sonuçları

SPGE'nin yüzey yapılarının farklı şartlar altındaki değişimlerini incelemek için kimyasal haritalama ve elementel analizleri EDX analizi yapılarak sonuçları Şekil 6.15 'te verilmiştir.



Şekil 6.15. a) ve b) işlem görmemiş, c) ve d) biyofonksiyonelleştirilmiş, e) ve f) rejenerasyon ve g) ve h) tekrardan biyofonksiyonelleştirilmiş durumdaki SPGE'nin SEM ve EDX analiz sonuçlarının karşılaştırılması; i) çalışma elektrotu, ii) karşıt elektrot, iii) referans elektrot

Kullanılan ticari elektrotların yüzey yapılarının farklı şartlar altındaki değişimlerini incelemek için kimyasal haritalama ve elementel analizleri yapılmıştır. Şekil 6.15'te görüleceği üzere SPGE'nin üç farklı elektrot bölgesinin EDX analizi yapılmıştır. Şekil 6.16 a-i ve Şekil 6.15 b-i ile gösterilen işlem görmemiş çalışma elektrotunun W1 bölgesinin EDX analizi yapıldığında büyük oranda yaklaşık %95 Au, %2 oranında C, %1 oranında Al ve yaklaşık %1 oranında O olduğu görülmüştür. Bu durum beklenildiği gibi tüm reaksiyonların büyük oranda gerçekleşeceği çalışma elektrotu bölgesinin yüksek oranda altın olduğu görülmüş ve az miktarda karbon ve alüminyum içerdiği anlaşılmıştır. Karşıt elektrotun C1 bölgesinin EDX analizi yapıldığında elde edilen sonuçların çalışma elektrotu bölgesine benzer olduğu görülmektedir (Şekil 6.15 a-ii, b-ii ve Çizelge 6.6). Bununla birlikte, Şekil 6.16 a-iii ile gösterilen referans elektrotun R1 bölgesinin EDX analizi yapıldığında yaklaşık %86 oranında Ag, %9 oranında Al ve %5 oranında O olduğu görülmüştür (Şekil 6.16 b-iii, Çizelge 6.6). Kullanılan SPGE referans elektrot bölgesinin yüksek oranda gümüş olduğu görülse de Al ve O miktarının yüksekliği dikkat çekmektedir. Şekilde diğer bölgelerden daha açık ve parlak renkte görülen R2 ile gösterilen bölgenin EDX analizi yapıldığında ise Ag ile birlikte yüksek oranda O (%11,5), Al (%10) ve C (%7) ihtiva ettiği görülmüştür. R2 bölgesinin analizinden anlaşılabileceği üzere diğer bölgelerden daha fazla oksijen görülmesi SPE'nin ticari bir ürün olmasından kaynaklı çevre şartlarının etkisiyle bölgesel oksitlenme görüldüğü anlaşılmıştır. Oksitlenmeyi engellemek için SPE'ler desikatöre konularak çevre şartlarından kaynaklanan olumsuz etkiler minimize edilmiştir.

Şekil 6.15 c ve d'de görüleceği üzere biyofonksiyonelleştirilmiş SPGE'nin üç farklı elektrot bölgesinin EDX analizi yapılmıştır. Çalışma elektrotunun W1 bölgesinin EDX analizi yapıldığında beklenildiği gibi biyofonksiyonelleştirme işlemi sonucunda yüksek oranda C, O ve N olduğu görülmüştür (Şekil 6.15. c-i, d-i ve Çizelge 6.6). SPE'nin çalışma elektrot bölgesinin bare elektrotta görülen yüksek miktarda Au'nin biyofonksiyonelleştirme sonrasında başarılı bir şekilde kaplandığı aynı zamanda anlaşılmaktadır. Diğer taraftan, Şekil 6.15 c-i'de daha açık renkte görülen W2 bölgesinin EDX analizi yapıldığında nispeten Au oranının daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. Bu sonuç biyofonksiyonelleştirme aşamasında çalışma elektrotunun bazı bölgelerinde immobilizasyonun tam anlamıyla başarılı bir şekilde oluşmadığını göstermektedir. Yine benzer şekilde karşıt elektrotun C1 bölgesinin EDX analizi yapıldığında koyu renkli yerlerde altına az rastlanılmakla birlikte C2 ile gösterilen açık renkli bölgede Au oranının yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 6.16 c-ii, d-ii ve Çizelge 6.6). Referans elektrotun R1 bölgesinde Ag ve Al miktarı düşmekle beraber O, C ve N içeriklerinde artma meydana gelmiştir (Şekil 6.15 c-iii, d-iii ve Çizelge 6.6). Ayrıca bu

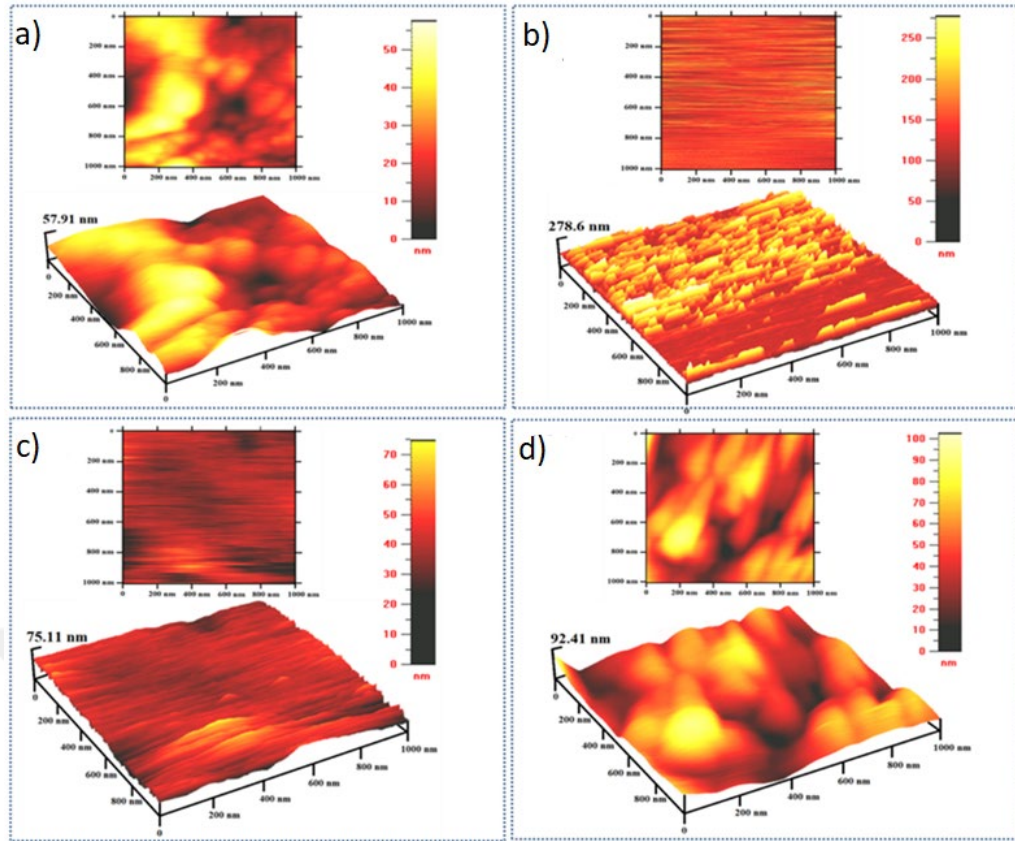
bölgede K ve Fe'ye rastlanmıştır. Bunun en önemli sebeplerinden birinin biyofonksiyonelleştirme aşamasında ölçümleri almak için kullanılan $K_3Fe(CN)_6$ redoks probundan olabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 6.6. SPGE'nin SEM/EDX analizi sonuçlarının karşılaştırması.

Örnekler	Çalışma Elektrot				Karşıt Elektrot				Referans Elektrot		
	Au (%)	C (%)	Al (%)	O (%)	Au (%)	C (%)	Al (%)	O (%)	Ag (%)	Al (%)	O (%)
Bare	95	2	1	1	95	3	1	1	86	9	5
Biyofonksiyonelleştirilmiş	59	33	-	4	87	8	1	3	43	1	8
Rejenerasyon	88	8	-	3	50	29	3	15	49	1	7
Tekrar biyofonksiyonelleştirilmiş	49	29	-	12	67	20	1	8	30	1	18

6.2.1.3. Ekran baskılı altın elektrotun AFM analizi sonuçları

Şekil 6.16'da SPGE'nun bare, biyofonksiyonelleştirilmiş, rejenerasyonu yapılmış ve tekrar biyofonksiyonelleştirilmiş durumlarının örnekleme yapılarak elde edilen AFM görüntüleri bulunmaktadır.



Şekil 6.16. a) İşlem görmemiş, b) biyofonksiyonelleştirilmiş, c) rejenerasyon ve d) tekrardan biyofonksiyonelleştirilmiş SPGE'nin çalışma elektrotlarının AFM görüntüleri.

Şekil 6.16'da SPGE'nin işlem görmemiş, biyofonksiyonelleştirilmiş, rejenerasyonu yapılmış ve tekrar biyofonksiyonelleştirilmiş durumlarının örnekleme yapılarak elde edilen AFM görüntüleri bulunmaktadır. AFM analizinde maksimum-minimum noktalar arasındaki farkın Şekil 6.16 a'da görülen bare SPGE'nin 57,91 nm, Şekil 6.16. b'de görülen biyofonksiyonelleştirilmiş SPGE'nin 278,6 nm, Şekil 6.16 c'de görülen rejenerasyonu yapılmış SPGE'nin 78,11 nm ve tekrar biyofonksiyonelleştirilmiş (Şekil 6.16 d) SPGE'nin 92,41 nm olduğu görülmüştür. Ayrıca pürüzlülük (RMS roughness) değerlerine bakılacak olursa sırasıyla Şekil 6.16 a'da görülen bare SPGE'nin 10,9 nm, Şekil 6.17 b'de görülen biyofonksiyonelleştirilmiş SPGE'nin 18,2 nm, Şekil 6.16 c'de görülen rejenerasyonu yapılmış SPGE'nin 12,1 nm ve tekrar biyofonksiyonelleştirilmiş (Şekil 6.16 d) SPGE'nin 12,4 nm olduğu anlaşılmaktadır. Bare SPGE biyofonksiyonelleştirilince maksimum-minimum noktalar arası farkın ve pürüzlülük değerinin artması biyofonksiyonelleştirme işleminin başarılı bir şekilde yapıldığını göstermektedir. Ayrıca biyofonksiyonelleştirme aşamasında bare SPE'nin tepe bölgelerinin immobilizasyon sonucundaki molekül bağlanması ile yükselerek bu değerleri arttırdığı da düşünülebilir. Daha sonra

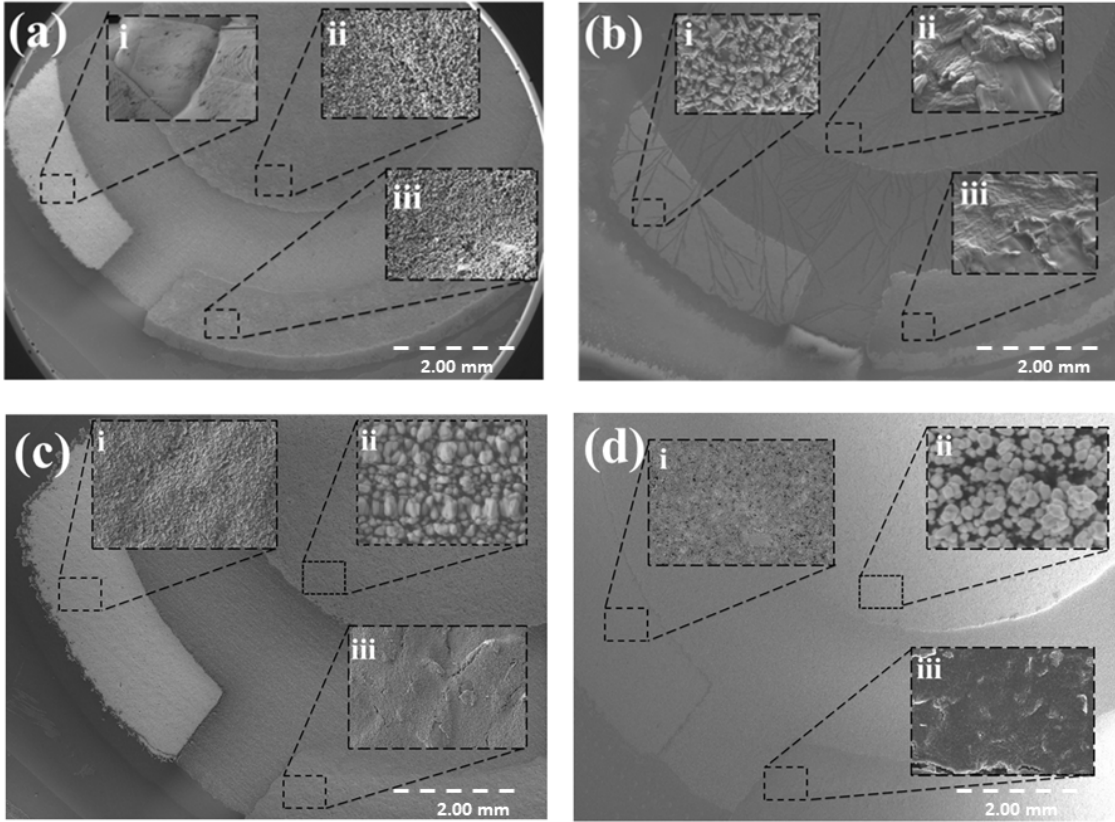
biyofonksiyonelleştirilen SPGE'nin yüzeyindeki katmanlar rejenerasyon aşaması ile kaldırılmıştır. Rejenerasyon aşaması sonrasında maksimum-minimum noktalar arası farkın ve pürüzlülük değerinin biyofonksiyonelleştirilen elektrotta göre düşmesi yüzeyindeki katmanların kaldırıldığını göstermektedir. Rejenerasyon aşaması sonrasında elektrot tekrar biyofonksiyonelleştirilme aşamaları uygulanmış ve uygulama sonucunda maksimum-minimum noktalar arası farkın ve pürüzlülük değerinin rejenerasyon yapılmış elektrotta göre çok az da olsa yükseldiği görülmüştür. Burada biyofonksiyonelleştirmeye göre değerin düşük olması istediğimiz katmanlı ve düzgün yapının tam anlamı ile oluşmadığını göstermektedir.

6.2.2. Ekran baskılı karbon elektrotun yüzey karakterizasyonu

SPCE'nin yüzey karakterizasyonu SEM, EDX ve AFM analizleri yapılarak gerçekleştirilmiştir.

6.2.2.1. Ekran baskılı karbon elektrotu SEM analizi sonuçları

Şekil 6.17'de bare, biyofonksiyonelleştirilmiş, AuNPs modifiye edilmiş ve AuNPs modifiye edilerek biyofonksiyonelleştirmiş SPCE'nin SEM görüntüsü bulunmaktadır. SPE'nin üç ayrı bölgesi için SEM analizi yapılmıştır. Bu bölgeler şekilde görüleceği üzere 'i' ile belirtilen referans elektrotu, 'ii' ile belirtilen çalışma elektrotunu ve 'iii' ile belirtilen ise karşıt elektrotun SEM görüntülerini göstermektedir. Üretici firma bilgilerine göre, SPE'nin çalışma ve karşıt elektrotu karbon, referans elektrotu ise gümüştür.



Şekil 6.17. a) İşlem görmemiş, b) biyofonksiyonelleştirilmiş, c) AuNPs/SPCE ve d) biyofonksiyonelleştirilmiş AuNPs/SPCE'ye ait SEM görüntülerinin karşılaştırılması; i) referans elektrot, ii) çalışma elektrot, iii) karşıt elektrot.

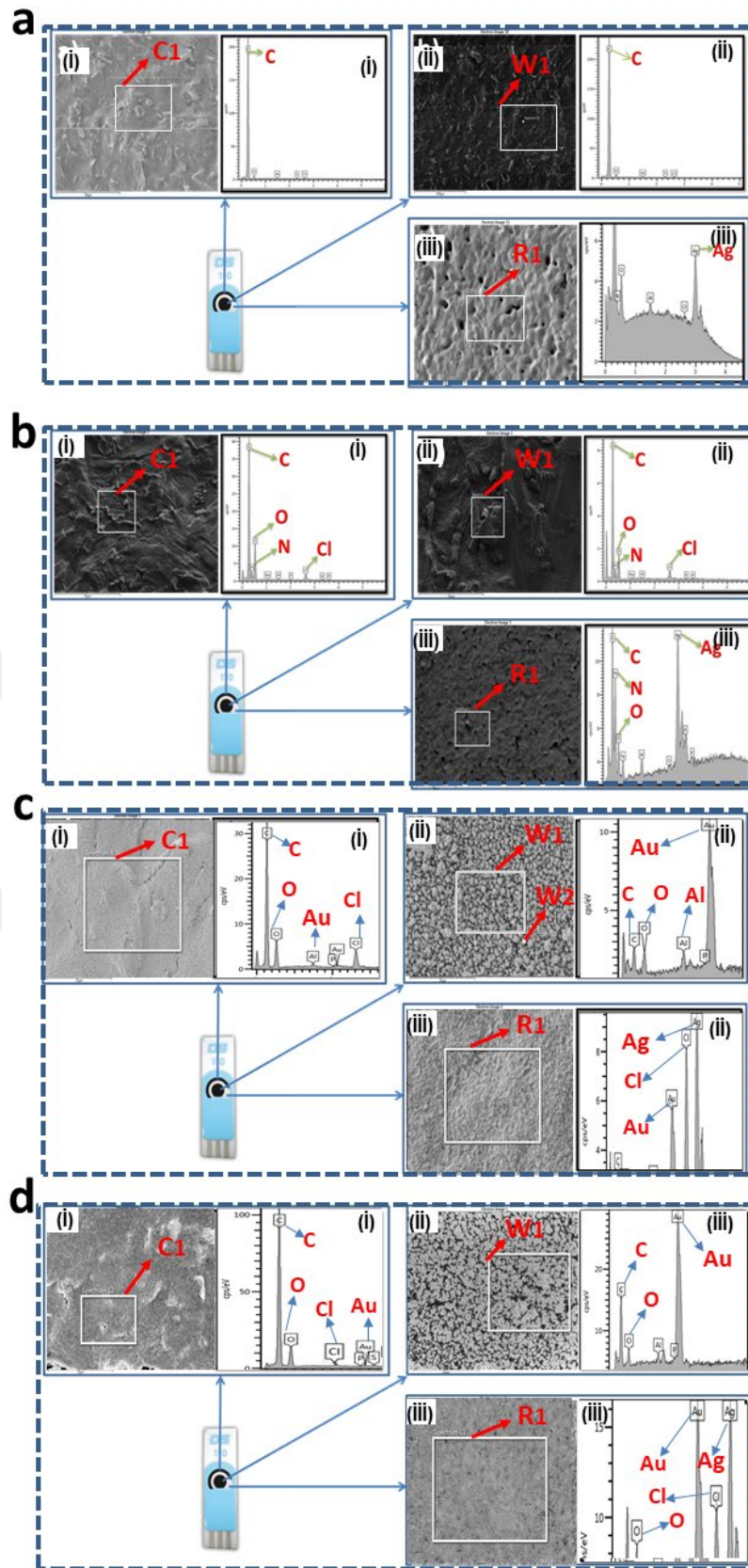
Şekil 6.17 a'da bare SPCE'nin SEM analizi incelendiğinde biyofonksiyonelleştirme aşaması öncesinde yüzey katmanlarının oluşacağı ve reaksiyonların gerçekleşeceği çalışma elektrotunun (Şekil 6.17 a-ii) yüzey morfolojisinin kısmen homojen ve gözenekli bir yapıya sahip olduğu anlaşılmaktadır. Karşıt elektrot (Şekil 6.17 a-iii) bölgesinde ise çalışma elektrot bölgesi kadar homojen görünüm göstermese de benzer bir görünüm gösterdiği görülmektedir. Referans elektrot (Şekil 6.17 a-i) yüzeyinin diğer iki yüzey görüntüsüne göre gözenek içermeyen tek bir tabakadan oluştuğu görülmektedir. Bu tek tabaka üzerinde farklı bir elementin olduğu ve dalgalı bir yapıda olduğu görülmektedir. Şekil 6.17 b'de biyofonksiyonelleştirilmiş SPCE'nin SEM analizi incelendiğinde elektrot yüzeyinde yapılan biyofonksiyonelleştirme işlemi ile meydana gelen değişiklikler görülmektedir. Elde edilen biyosensörün yüzey morfolojisi incelendiğinde ve bare elektrot (Şekil 6.17 a) ile karşılaştırıldığında çalışma elektrot yüzeylerinde biyofonksiyonelleştirme işleminin büyük oranda başarılı olduğu düşünülmektedir. Özellikle çalışma elektrot (Şekil 6.17 b-ii) bölgesinde açık olarak katmansal yapının oluştuğu görülmektedir. Referans elektrot (Şekil 6.17 b-i) bölgesinin ise biyofonksiyonelleştirme işlemi sonrasında Ag tabakasının bare

elektrodun referans bölgesine Şekil 6.17 a-i) göre taneli bir yapıya dönüşerek morfolojisinin değiştiği açık bir şekilde görülmektedir. Bunun nedeninin SPCE'nin yüzey aktifleştirmesi sırasında 1,6 V potansiyel değerinde gerçekleştirilen dönüşümlü voltametri sırasında referans elektrotun değişime uğrayabileceği olduğu düşünülmektedir. Yüksek potansiyel değerlerinde ($>+1,18$ V) referans elektrot yüzeyinde yükseltgenme meydana gelebilmektedir. Ayrıca, dönüşümlü voltametri tekniği geleneksel olarak sıklıkla kullanılan bir yöntem olmasına karşın kullanılan numunede hasarlara neden olabileceği bilinmektedir.

Şekil 6.17 c'da AuNPs modifiye edilmiş SPCE'nin SEM analizi incelendiğinde AuNPs modifikasyonu sonrası çalışma elektrotunun (Şekil 6.17 c-ii) yüzeyinde AuNPs'ler net olarak gözlemlenmektedir. Karşıt elektrotta AuNPs modifikasyonu sonrası görünüm açısından bare elektrota göre gözenekli yapının gitti görülmektedir (Şekil 6.17 c-iii). Referans elektrot incelendiğinde, karşıt elektrotta olduğu gibi gözenekli yapının gitti görülmekle birlikte EDX analizinde de incelendiğinde yüzeye belirli miktarda Au modifikasyonu olduğu görülmüştür (Şekil 6.17 c-i). Şekil 6.17. d'da AuNPs modifikasyonu sonrası biyofonksiyonelleştirilmiş AuNPs/SPCE'nin SEM analizi incelendiğinde biyofonksiyonelleştirme sonrası AuNPs/SPCE'nin çalışma elektrotunun (Şekil 6.17 c-ii) yüzeyinde AuNPs'ler net olarak gözlemlenirken yüzeyinin biyofonksiyonelleştirme ile değiştiği görülebilmektedir. Karşıt ve referans elektrotta biyofonksiyonelleştirilmiş AuNPs/SPCE'nin görüntüsünün AuNPs modifikasyonu sonrası görünüm açısından ile belirgin bir fark arz etmediği ve bare elektrota göre gözenekli yapının gitti görülmektedir (Şekil 6.17 d-iii ve d-i).

6.2.2.2. Ekran baskılı karbon elektrotun EDX analizi sonuçları

SPCE'nin yüzey morfolojisini incelemek için elementel analizleri EDX analizi yapılarak sonuçları Şekil 6.18'de verilmiştir.



Şekil 6.18. a) işlem görmemiş, b) biyofonksiyonelleştirilmiş, c) AuNPs/SPCE ve d) biyofonksiyonelleştirilmiş AuNPs/SPCE durumdaki SPGE'nin SEM ve EDX analiz sonuçlarının karşılaştırılması; i) karşıt elektrotu, ii) çalışma elektrot, iii) referans elektrot.

Şekil 6.18'de görüleceği üzere SPCE'nin üç farklı elektrot bölgesinin EDX analizi yapılmıştır. Şekil 6.18 a-ii ile gösterilen işlem görememiş (bare) çalışma elektrotunun W1 bölgesinin EDX analizi yapıldığında büyük oranda yaklaşık %96 C, %3 oranında O ve yaklaşık %1 oranında Cl olduğu görülmüştür. Bu durum beklenildiği gibi tüm reaksiyonların büyük oranda gerçekleşeceği çalışma elektrotu bölgesinin yüksek oranda karbon olduğu görülmüştür. Karşıt elektrotun C1 bölgesinin EDX analizi yapıldığında elde edilen sonuçların çalışma elektrotu bölgesine benzer olduğu görülmektedir (Şekil 6.18 a-i ve Çizelge 6.7). Bununla birlikte, Şekil 6.18. a-iii ile gösterilen referans elektrotun R1 bölgesinin EDX analizi yapıldığında yaklaşık %94 oranında Ag, %2 oranında C ve %2 oranında O olduğu görülmüştür (Şekil 6.18 a-iii, Çizelge 6.7). Bu durum da beklenildiği gibi referans elektrotun yüksek oranda Ag içerdiğini göstermektedir.

Şekil 6.18 b'de görüleceği üzere biyofonksiyonelleştirilmiş SPCE'nin üç farklı elektrot bölgesinin EDX analizi yapılmıştır. Çalışma elektrotunun W1 bölgesinin EDX analizi yapıldığında beklenildiği gibi biyofonksiyonelleştirme işlemi sonucunda yüksek oranda O, Cl ve N olduğu görülmüştür (Şekil 6.18 b-ii ve Çizelge 6.7). SPCE'nin çalışma elektrot bölgesinin bare elektrotta görülen yüksek miktarda C'nin biyofonksiyonelleştirme sonrasında düşmesiyle yüzeyin başarılı bir şekilde kaplandığı anlaşılmaktadır. Yine benzer şekilde karşıt elektrotun C1 bölgesinin EDX analizi yapıldığında çalışma elektrotunda olduğu gibi O ve N grupların olduğu görülmüştür. (Şekil 6.18 b-i ve Çizelge 6.7). Referans elektrotun R1 bölgesinde Ag miktarı düştüğü ve beraberinde O, C ve N bileşenlerinde artma meydana gelmiştir (Şekil 6.18 b-iii ve Çizelge 6.7).

Şekil 6.18 c'de görüleceği üzere AuNPs modifikasyonu sonrası AuNPs/SPCE'nin üç farklı elektrot bölgesinin EDX analizi yapılmıştır. Çalışma elektrotunun W1 bölgesinin EDX analizi yapıldığında modifikasyon öncesi sıfır olan altın oranının modifikasyon %83 oranında Au ile kaplandığı görülmektedir. Başlangıçta %96 olan C oranının AuNPs modifikasyonu sonrasında %12 oranına düştüğü görülmektedir. Buradan da görüleceği üzere AuNPs modifikasyonunun başarılı ile gerçekleştiğini göstermektedir. Çalışma elektrotunun da W2 ile gösterilen AuNP'ler hedeflenerek EDX analizi yapıldığında %87 oranında Au içerdiği görülmektedir (Şekil 6.18 c-ii ve Çizelge 6.7). Yine benzer şekilde karşıt elektrotun C1 bölgesinin EDX analizi yapıldığında Au oranının %1 gibi eser miktarda görüldüğü %12 Cl ve %8 O ihtiva ettiği görülmektedir (Şekil 6.18 c-i ve Çizelge 6.7). Referans elektrotun R1 bölgesinde %58 Ag ve beraberinde %22 Au, %3 C ve %2 O ihtiva ettiği görülmüştür (Şekil 6.18 b-iii ve Çizelge 6.7).

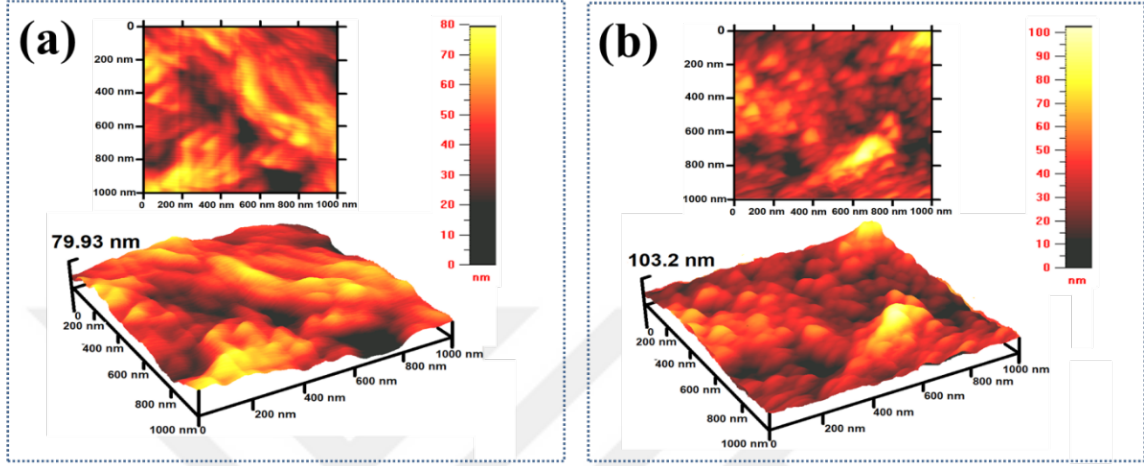
Şekil 6.18. d’de AuNPs modifikasyonu sonrası biyofonksiyonelleştirilmiş AuNPs/SPCE’nin üç farklı elektrot bölgesinin EDX analizi yapılmıştır. Çalışma elektrotunun W1 bölgesinin EDX analizi yapıldığında AuNPs modifikasyon sonrası %83 oranında Au içerirken, biyofonksiyonelleştirme sonrası bu oranın %73 Au olduğu görülmüştür (Şekil 6.18 d-ii ve Çizelge 6.7). Yine benzer şekilde karşıt elektrotun C1 bölgesinin EDX analizi yapıldığında C oranının %82’ye yükseldiği ve %12 N, %4 O ve %1 Au ihtiva ettiği görülmektedir (Şekil 6.18. d-i ve Çizelge 6.7). Referans elektrotun R1 bölgesinde %51 Ag ve beraberinde %34 Au, %5 O, %1 C ve %1 N ihtiva ettiği görülmüştür (Şekil 6.18. b-iii ve Çizelge 6.7).

Çizelge 6.7. SPGE’nin SEM/EDX analizi sonuçlarının karşılaştırması.

Örnekler	Çalışma Elektrot					Karşıt Elektrot					Referans Elektrot				
	Au (%)	C (%)	N (%)	O (%)	Cl (%)	Au (%)	C (%)	N (%)	O (%)	Cl (%)	Au (%)	Ag (%)	C (%)	O (%)	N (%)
Bare SPCE	-	96	0	3	1	-	96	0	3	1	-	94	2	2	0
Biyofonksiyonelleştirilmiş SPCE	-	68	9	20	3	-	70	12	14	2	-	55	13	8	16
AuNPs/SPCE	83	12	-	0	-	1	77	12	-	8	22	58	3	2	-
Biyofonksiyonelleştirilmiş AuNPs/SPCE	73	24	1	3	-	1	82	12	1	4	34	51	1	5	1

6.2.2.3. Ekran baskılı karbon elektrotun AFM analizi sonuçları

Şekil 6.19’da SPCE’nun bare ve biyofonksiyonelleştirilmiş durumlarının örnekleme yapılarak elde edilen AFM görüntüleri bulunmaktadır.

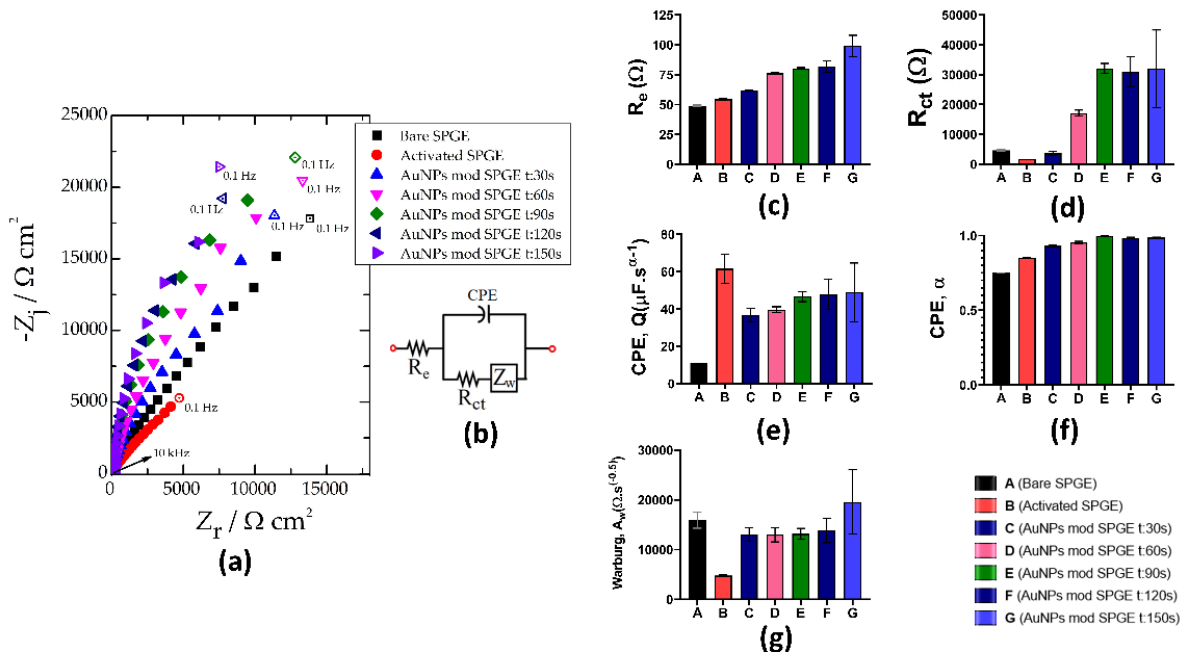


Şekil 6.19. a) işlem görmemiş ve b) biyofonksiyonelleştirilmiş SPCE’nin çalışma elektrotlarının AFM görüntüleri.

Şekil 6.19’da SPCE’nin işlem görmemiş (bare) ve biyofonksiyonelleştirilmiş durumlarının AFM analizinde maksimum-minimum noktalar arasındaki farkın Şekil 6.19 a’da görülen bare SPCE’nin 79,93 nm, Şekil 6.19 b’de görülen biyofonksiyonelleştirilmiş SPCE’nin 103,2 nm, olduğu görülmüştür. Ayrıca pürüzlülük değerlerine bakılacak olursa sırasıyla Şekil 6.19 a’da görülen bare SPCE’nin 12,1 nm, Şekil 6.19 b’de görülen biyofonksiyonelleştirilmiş SPCE’nin 13,4 nm olduğu anlaşılmaktadır. Bare SPCE, biyofonksiyonelleştirilince tepe bölgelerinin immobilizasyon sonucundaki molekül bağlanması ile yükselerek maksimum-minimum noktalar arası farkın ve pürüzlülük değerinin artması biyofonksiyonelleştirme işleminin başarılı bir şekilde yapıldığını göstermektedir.

6.3. Ekran Baskılı Altın Elektrot Yüzeyine Altın Nanopartikül Modifikasyonun Elektrokimyasal Analizi ve Karakterizasyonu

SPGE'nin elektrokimyasal performansının daha iyi seviyelere çıkarılması için AuNPs kullanılarak yüzey modifikasyonu yapılmıştır. Literatüre bakıldığı zaman AuNPs'nin sonuçların tekrarlanabilirliğinin iyileştirilmesi ve duyarlılığın artırılması için elektrot yüzeyine modifiye edildiği görülmektedir. Altın elektrot 2 mM HAuCl₄ (0,5 M H₂SO₄) çözeltisi ile -0,3 V potansiyel altında 30, 60, 90, 120 ve 150 s modifikasyon süreleri kullanılarak yüzey kaplaması yapılmış ve elektrotlar karakterize edilmiştir.



Şekil 6.20. a) SPGE'nin bare ve 30,60, 90,120 ve 150 s AuNPs modifikasyonu sonrası 5 mM K₃Fe(CN)₆ redoks probu inkubasyonu sonucu 10 kHz – 0,1 Hz frekans aralığındaki elde edilen Nyquist grafiğinin görüntüsü, b) Nyquist grafiği için eşdeğer randles devre modeli, c) R_e , Elektrolit direnci, d) R_{ct} , Şarj transfer direnci, e) Q , CPE sabiti, f) α , CPE katsayısı, g) Warburg elemanı katsayısı.

Elektrolit direnci (R_e) parametresi, yüksek frekans bölgesinde Nyquist grafiğinin gerçek ekseninin (Z_{real}) kestiği noktanın hesaplanmasıyla elde edilmektedir. Şekil 6.20 c'de gösterildiği gibi, elektrolit çözeltileri, konsantrasyonları ve çevre koşulları aynı olmasına rağmen, elektrot yüzeylerindeki AuNP'lerin modifikasyonu nedeniyle biriktirme süresi arttıkça elektrolit dirençleri artıyor gibi görünmektedir. Elektrolit dirençte gözlenen artış, elektrotların aktif alanındaki değişiklikten kaynaklanıyor gibi görünmektedir.

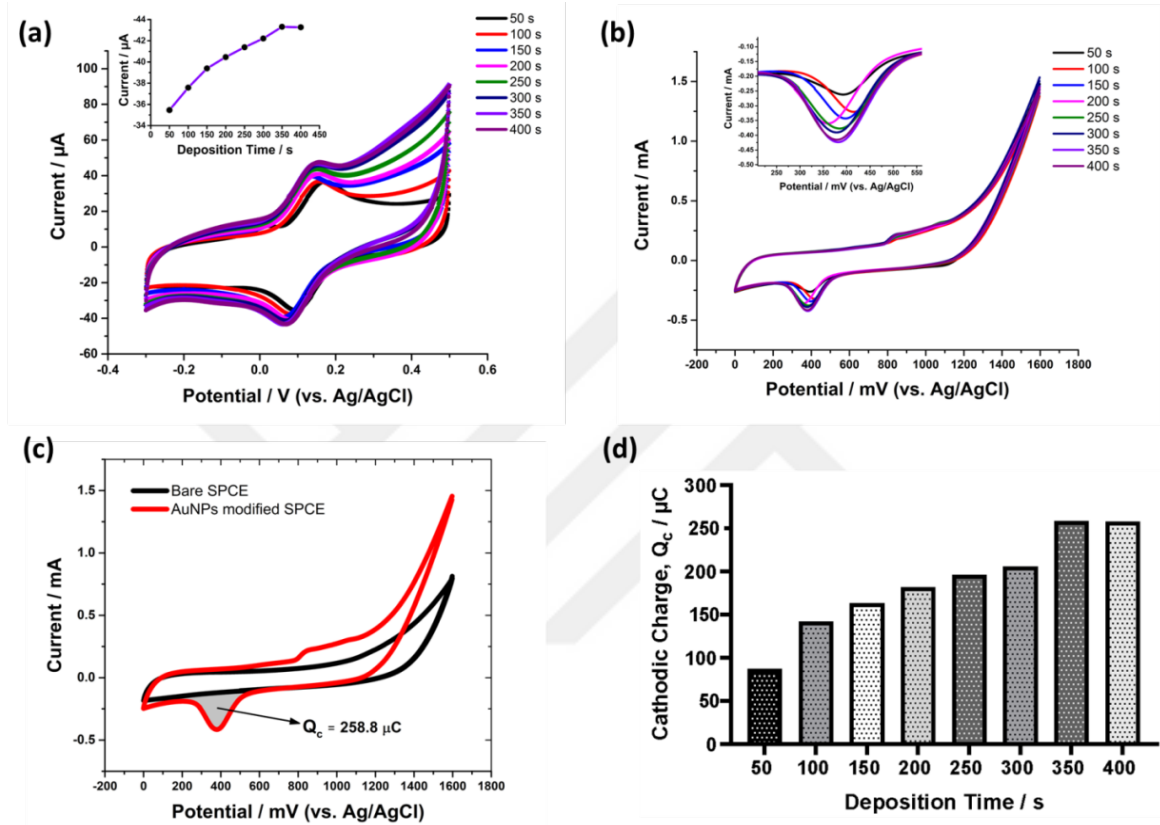
Yüksek frekanslı kapasitif döngünün genişliği ile elde edilen yük transfer direnci (R_{ct}), elektrot/elektrolit arayüzü ile ilgilidir ve genellikle SPGE yüzeylerinde meydana gelen elektrokimyasal reaksiyonlardan kaynaklanmaktadır. Şekil 6.20 d'de gösterildiği gibi, yüzey aktivasyonu nedeniyle SPGE'nin R_{ct} 'sinin azaldığı gözlemlenmiştir. Daha sonra, modifikasyon süresi arttıkça R_{ct} değerinin lineer olarak arttığı ve AuNP'ler 90 s'lik bir modifikasyondan sonra, R_{ct} değerindeki artışın ortadan kalktığı ve en yüksek değerin 90 s'de gözlemlendiği ve ardından 120 s ve 150 s'de civarında bir plato izlediği görülmüştür. Ayrıca 90 s'den sonraki biriktirme sürelerinde R_{ct} değerinin hata payındaki artışın daha da arttığı gözlemlenmiştir.

Şekil 6.20 e'de gösterildiği gibi, AuNP'lerin SPGE yüzeylerine modifikasyonu, CPE katsayısı (Q) ile ilişkili etkin kapasitansta bir artışla sonuçlandığı gözlemlenmiştir. Aktif yüzeyi kapasitans değerlerinde artışa neden olmuştur. Ayrıca biriktirme süresi arttıkça kapasitans değerinin de arttığı gözlemlenmiştir. Ek olarak, kapasitans değerlerinde hata artışı esas olarak daha yüksek biriktirme süreleri ile gözlemlendi. CPE üssü (α), elektrot yüzeylerinin pürüzlülüğünün ve yüzeylerdeki akım dağılımının bir göstergesidir. α genellikle 0,5 ile 1 arasındadır. 1'e yakın bir değer, pürüzlülüğün düşük olduğunu, akımın yüzeye eşit olarak dağıldığını gösterir ve elektrotun kapasitif benzeri bir davranış sergilediği gözlenmektedir (Orazem ve Tribollet, 2017). Şekil 6.20 f'de gösterildiği gibi, AuNP'lerin SPGE yüzeyleri üzerindeki modifikasyonu daha yüksek bir CPE üssü verdiği gözlemlenmiştir. CPE üssü ne kadar yüksek olursa, elektrot üzerindeki yük dağılımı o kadar düzgün olmaktadır. CPE üssünün 90 s'de en yüksek olduğu gözlemlenmiştir. 120 s ve 150 s biriktirme sürelerinde stabil kaldığı gözlemlenmiştir. Warburg empedansı, eşdeğer devre modellemesinde elektrotlarda meydana gelen iyon difüzyonunu ifade etmektedir. Şekil 6.20 g'de gösterildiği gibi, warburg değeri yüzey aktivasyonundan sonra azaldığı ve daha sonra AuNP'lerin modifikasyonu ile tekrar attığı gözlemlenmiştir.

6.4. Ekran Baskılı Karbon Elektrot Yüzeyine Karbon Nanopartikül Modifikasyonun Elektrokimyasal Analizi ve Karakterizasyonu

SPCE yüzeyine modifiye edilecek için optimum modifikasyon süresinin belirlenmesi büyük bir önem arz etmektedir. Modifikasyon sürelerinin fazla uzun olması elektrot yüzeyinde deformasyonlara neden olurken, düşük modifikasyon süreleri ise SPCE yüzeyine

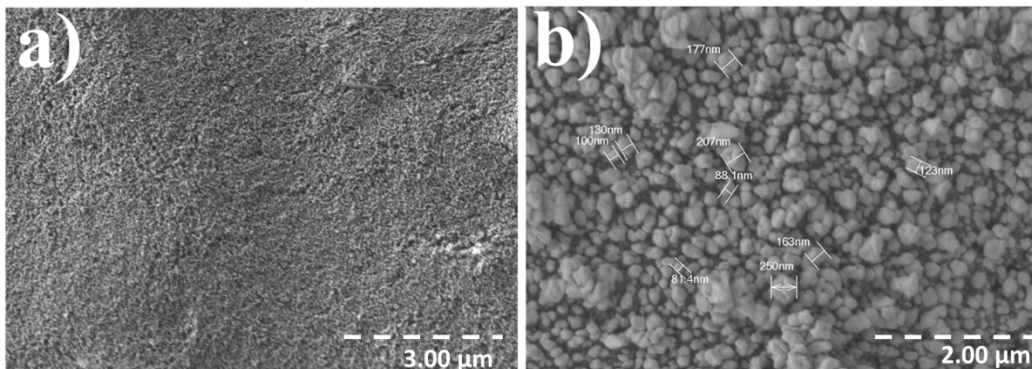
yeteri kadar AuNPs modifiye edilmesinin önüne geçmektedir. Ayrıca uygulanan modifikasyon süreleri ile SPCE yüzey alanının nasıl değiştiğinin belirlenmesi sonraki immobilizasyon işlemlerinin daha sağlıklı yürütmesini sağlamaktadır. Bu nedenle optimum modifikasyon süresinin belirlenmesi sürecim geri kalan basamaklarını etkileyecek bir özellik taşımaktadır.



Şekil 6.21. a) Farklı biriktirme sürelerinde (50 s ile 400 s) 1 mM $K_3(Fe(CN)_6)/K_4(Fe(CN)_6)$ (PBS içerisinde) redoks probu kullanılarak elde edilen döngüsel voltamogramlar. Grafik içerisinde katodik akım ile biriktirme sürelerinin arasındaki ilişkiyi gösteren grafikler, b) Farklı biriktirme sürelerinde (50 s ile 400 s) 0,5 M H_2SO_4 redoks probu kullanılarak elde edilen döngüsel voltamogramlar, c) AuNPs modifikasyonu sonrası SPCE ve bare SPCE'nin 0,5 M H_2SO_4 redoks probu kullanılarak elde edilen döngüsel voltamogramlar, d) Farklı biriktirme sürelerinde katodik şarj değişimlerini gösteren histogram.

Şekil 6.21 a'da SPCE üzerine AuNPs modifikasyonunun 50 ile 400 s'ye kadar değişen biriktirme sürelerinde PBS içerisinde hazırlanan 1 mM $K_3(Fe(CN)_6)/K_4(Fe(CN)_6)$ redoks probu kullanılarak 0 - 0,5 V potansiyellerinde, 150 mV/s tarama hızında elde edilen döngüsel voltametri sonuçları bulunmaktadır. Elde edilen grafikte de görüleceği üzere biriktirme süresi arttıkça anodik ve katodik akım piklerinde artışlar görülmüştür. CV grafiğinin

içerisindeki biriktirme süresine göre değişen katodik akım pikini gösteren grafik bulunmaktadır. Grafikte 50 s'den 300 s'ye kadar katodik akım pikinin doğrusal artış gösterirken 350 ve 400 s'lerde bu artışın sona erdiği ve kararlı hale geldiği gözükmektedir. Bu nedenle SPCE'e üzerine modifiye edilecek AuNPs optimum biriktirme süresi olarak 350 s seçilmiştir. SPCE yüzeyi üzerinde elektro biriktirilmiş AuNP'ler ile değişen modifiye edilmiş SPCE yüzeyi dönüşümlü voltametri kullanılarak 0,5 M H₂SO₄ çözeltisi içinde basit taramayla tahmin edilebilir. Şekil 6. 21 b'de değişen biriktirme sürelerinde 0,5 M H₂SO₄ redoks probu kullanılarak AuNPs varlığı 0-1,6 V potansiyellerinde, 150 mV s⁻¹ tarama hızında elde edilen CV grafiğinde karakterize edilmiş ve biriktirme süresi arttıkça katodik akımda artış görülmüş. Şekil 6. 21 c'de 0,5 M H₂SO₄ redoks probu kullanılarak bare SPCE ve 350 s biriktirme süresi AuNPs modifiye edilmiş SPCE'nin CV grafiği gözükmektedir. Aynı ortam şartları altında alınan ölçümlerde AuNPs modifiye edilmiş SPCE'nin bare SPCE'ye göre elde edilen CV grafiğinde katodik bölgede modifikasyon sonrasında büyük bir geometrik alan oluşturduğu ve bu geometrik alanın büyüklüğü 258,8 µC olarak hesaplanmıştır. AuNPs modifiye edilen SPCE'nin gerçek yüzey alanının hesabında, Au'nun yüzey oksit tek tabakasının azaltılması sırasında tüketilen yük miktarının 386 µC cm⁻² olduğu varsayılmıştır (Rand vd., 1971; Szamocki vd., 2007; Hu vd., 2008). Bu bilgiler eşliğinde SPCE üzerinde AuNPs modifiye edildikten sonraki gerçek aktif yüzey alanının 0,6704 cm² olarak hesaplanmıştır. Şekil 6. 21 d'de değişen biriktirme sürelerinde elde edilen katodik şarj (Q_c) değerlerinin değişimini gösteren bar grafiği gözükmektedir. Bar grafiğinde de görüleceği üzere 350 s olarak seçilen biriktirme süresinin optimum süre olduğu tekrar gösterilmiştir.

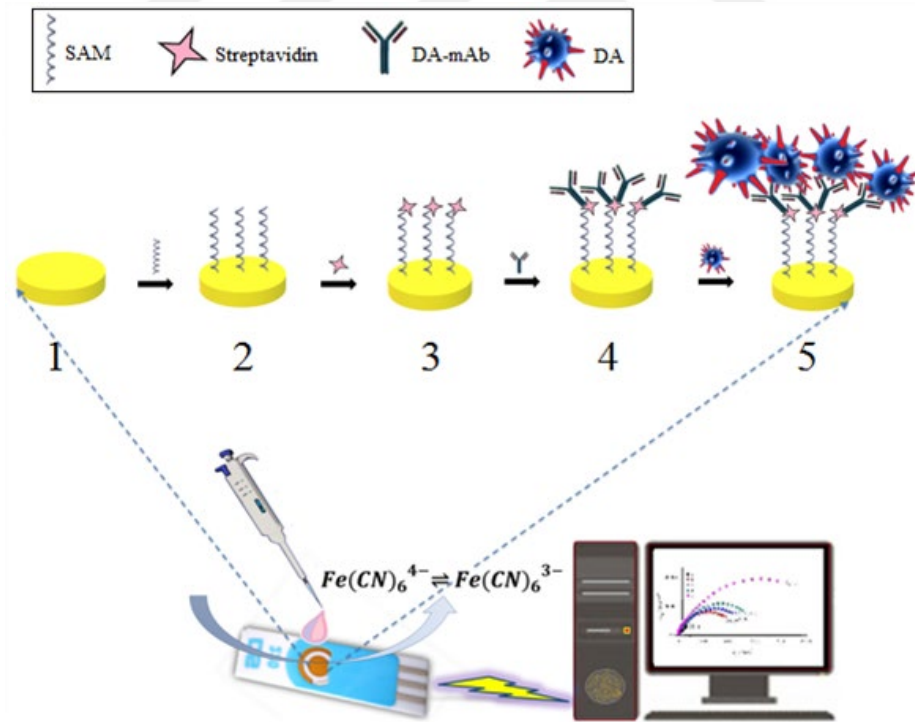


Şekil 6.22. a) işlem görmemiş ve b) AuNPs modifikasyonu yapılmış SPCE'nin çalışma elektrot bölgesinin SEM görüntüsü.

Şekil 6.22’de işlem görmemiş ve AuNPs modifikasyonu sonrası SPCE’nin çalışma elektrot bölgesinin SEM görüntüleri bulunmaktadır. Görüntüler incelendiğinde SPCE’nin çalışma elektrot bölgesine AuNPs modifikasyonu başarılı şekilde gerçekleştirdiği görülmektedir. Altın nanopartüküllerin boyutları 80 ile 250 nm arasında değişmekle birlikte yüzeye modifiye oldukları net olarak gözükmemektedir.

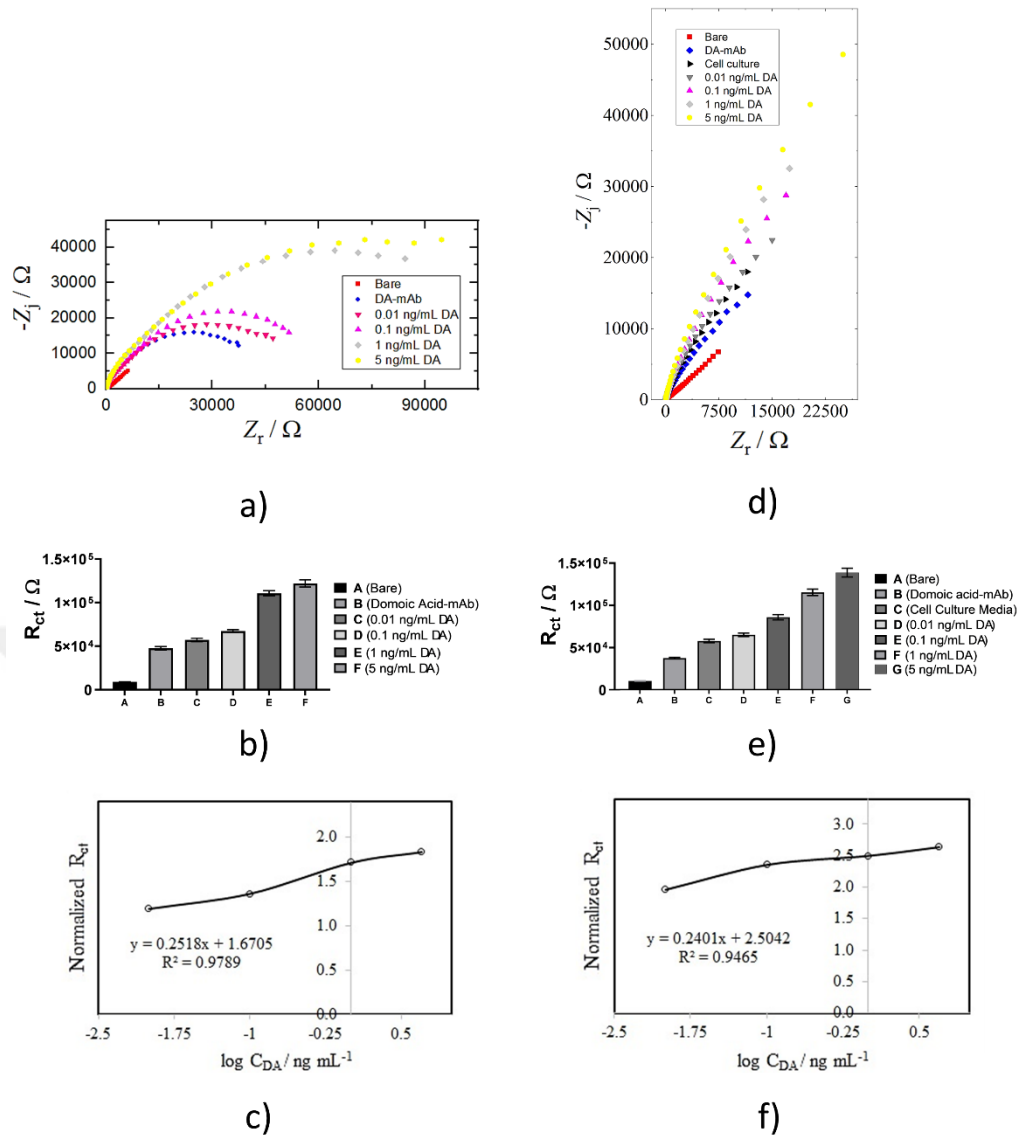
6.5. Ekran Baskılı Altın Elektrotun Yüzeyinin Biyofonksiyonelleştirilmesi ve Domoik Asit Tayini

Elektrot yüzeyine, kimyasal madde ve moleküllerin kendiliğinden ya da dışarıdan bir etkiyle tutturulmasıyla elde edilen elektrotlara immobilizasyonu gerçekleştirilmiş elektrot denir. İmmobilizasyonu gerçekleştirilen elektrotun yüzeyinin spesifik bir maddeye göre biyofonksiyonelleştirilmesiyle biyosensör geliştirilmiştir.



Şekil 6.23. SPGE'nin immobilizasyon prosesinin şematik gösterimi: a) işlem görmemiş, b) SAM tabakasının oluşturulması, c) streptavidin, d) mAb-DA, e) hedef DA'nın yakalanması.

Geliştirilmiş biyosensörün hedef antijeninin yakalanması elektrot yüzeyinin homojen ve başarılı bir şekilde biyofonksiyonelleştirilmesi gerekmektedir. SPGE'nin immobilizasyon sürecine ait basamaklar basitçe Şekil 6.23'te gösterilmiştir. Yaptığımız çalışmada öncelikle elektrot yüzeyi PBS ile temizlendikten sonra 50 mM $K_3Fe(CN)_6$ konularak EIS ölçümü alınmıştır. Bu işlemi takiben elektrotların yüzeyinde tiyol gruplarını oluşturmak için 10 mM SAM çözeltisi (109,18 mg 11-merkeptoundekenoik asit + 50 ml etanol karışımı) eklenip 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Elektrot yüzeyine bağlanmamış SAM moleküllerini yüzeyden uzaklaştırmak için önce etanol daha sonra PBS ile sırasıyla yıkama gerçekleştirilmiştir. Mütakiben, 1:1 oranında 50 mM EDC (9,55 mg EDC + 1 ml sitrik asit tampon çözeltisi) ve 50 mM NHS (5,75 mg NHS + 1 ml sitrik asit tampon çözeltisi) karışım çözeltisi elektrot yüzeyine gönderilerek 30 dakika boyunca inkübasyon yapılmıştır. Bu işlemlerden sonra antikorları yüzeye sabitlemek için ise 1,25 μ g/mL streptavidin çözeltisi ile 1 saat boyunca inkübasyon yapılmıştır. PBS ve yıkama tamponu (1x) ile yüzey yıkaması yapılarak reaksiyona girmemiş moleküller uzaklaştırılmış ve 1,25 μ g/mL PBS içerisinde seyreltilen monoklonal anti-domoik asit antikor çözeltisi elektrot üzerine gönderilerek 1 saat süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Elektrot yüzeyindeki reaksiyona girmemiş moleküller yine yıkama tamponu ve PBS yıkaması ile uzaklaştırılmıştır. Bu aşamadan sonra 50 mM $K_3Fe(CN)_6$ redoks probu ile EIS ölçümleri alınmış ve EIS ölçümünden sonra tekrar PBS ile yıkama yapıp, PBS ve hücre kültür medyası içerisinde dört farklı konsantrasyonda (0,01 ng/mL; 0,09 ng/mL; 0,9 ng/mL ve 4 ng/mL) hazırlanan domoik asit sırasıyla 30 dakika boyunca inkübe edilip her aşama sonrası 50 mM $K_3Fe(CN)_6$ redoks probu ile EIS ölçümleri yapılarak Nyquist grafiği oluşturulmuş ve kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.



Şekil 6.24. SPGE'nin EIS yöntemi ile farklı DA konsantrasyonlarında 10 kHz – 0,1 Hz frekans aralığındaki; PBS ve hücre kültür ortamındaki Nyquist grafiği (a ve d), R_{ct} değişimlerinin (b ve e) ve kalibrasyon grafiklerinin (c ve f) karşılaştırılması.

Elde edilen datalar uygun eşdeğer Randles devresi kullanılarak Gamry Echem Analyst programı kullanılarak modellenmiştir. Şekil 6.24 b ve e'de PBS'li ve hücre kültür medyalı (gerçek biyolojik karmaşık ortamın mimik edilmesi) ortamdaki biyofonksiyonelleştirme sonrası elde edilen empedans yanıtlarının R_{ct} değişimi görülmektedir. Şarj aktarım direncindeki değişim elektrot yüzeyindeki katmanlar ve antikorun, antijeni yakalayıp yakalamadığı hakkında bilgi vermektedir. Görüleceği üzere SPGE'nin yüzeyindeki her bir katman sonrasında R_{ct} değerlerinin arttığı görülmüştür. Görüleceği üzere biyofonksiyonelleştirme aşamasında DA-Mab'ın, DA'yı yakaladığı ve DA derişimi arttıkça, arttığı gözlemlenmiştir. Bu da yapılan biyofonksiyonelleştirme işleminin başarı ile

yapıldığını göstermektedir. Bununla birlikte Şekil 6.24 c ve f'deki kalibrasyon grafiğini oluşturmak için birçok elektrot ile çalışılarak immobilizasyonu yapılmış ve sonuçlar elde edilmiştir. Kullandığımız ticari elektrotların muhtemel farkları göz önüne alınarak R_{ct} normalizasyonu kullanılarak da PBS ve hücre kültür medya içerisinde bulunan hedef analit ortamındaki R^2 değeri sırasıyla 0,9789 ve 0,9465 olarak bulunmuştur. Kalibrasyon denkleminin eğimi biyosensörün hassasiyeti hakkında bilgi vermektedir. PBS'li ve hücre kültür medyalı ortamdaki kalibrasyon denkleminin eğimi sırasıyla 0,2518 ve 0,2401 olarak bulunmuştur. Elde edilen değerler ile hesaplanan LOD (tayin limiti) ve LOQ (tayin sınırı) değerleri denklem 6.5 ve 6.6 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$LOD = 3,3 \times \frac{\sigma}{s} \quad (6.5)$$

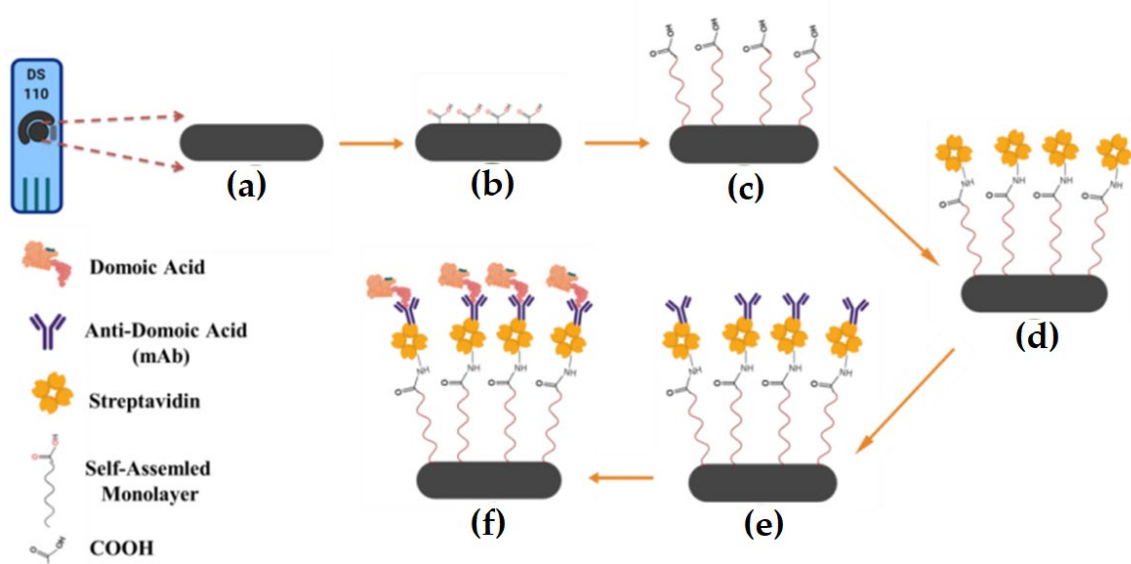
$$LOQ = 10 \times \frac{\sigma}{s} \quad (6.6)$$

Denklem 6.5 ve 6.6'da σ , standart sapmayı, s ise kalibrasyon grafiğinin eğimini ifade etmektedir. Denklem 6.5 ve 6.6 kullanılarak PBS'li ortam için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla değeri 2,93 ng/mL ve 8,88 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Hücre kültür medyalı ortam için ise LOD ve LOQ değerleri sırasıyla değeri 4,28 ng/mL ve 12,97 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Buradan da görüleceği üzere hücre kültür ortamındaki tayin çalışmaları beklenildiği üzere hassasiyeti azalmıştır. Bunun en önemli nedenleri arasında geliştirilen sensörün gerçek uygulamalarda karşılaşılabilecek kompleks ortamın hücre kültür medyasına benzediği ve bu ortamda ihtiva edilen farklı moleküler ağırlıktaki proteinler, serum, aminoasitler, iyonlar, vitaminler, vb. birçok biyolojik bileşenlerin sensörde hassasiyet ve seçiciliği azaltmasıdır.

6.6. Ekran Baskılı Karbon Elektrotun Yüzeyinin Biyofonksiyonelleştirilmesi ve Domoik Asit Tayini

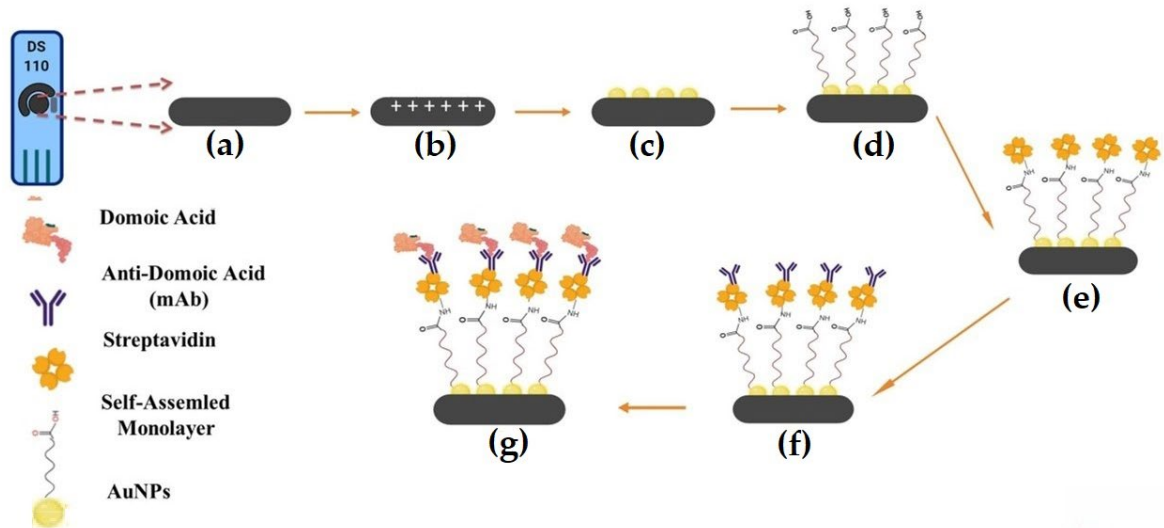
SPCE yüzeyinde immobilizasyon işlemi yapılabilmesi için öncelikle elektrot yüzeyinin aktive edilmesi gerekmektedir. SPCE yüzeyinde asetat tampon çözeltisi (pH ~ 4,6) inkübasyonu yapılarak 0-1,6 V potansiyel aralığında 60 saniye süresince döngüsel voltametri (CV) yöntemi uygulanarak aktivasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Aktivasyon

işlemi ile birlikte karbon elektrotların yüzeyinde karboksil grupları oluşturulmuştur. Böylece yüzeyde oluşan karboksil grupları (-COOH) ile sonraki adımda gerçekleştirilecek bağlanmaların daha kararlı olması amaçlanmıştır. Daha sonra SPGE'nin immobilizasyonunda olduğu SPCE'nin immobilizasyonunda da sırasıyla, SAM, NHS/EDC, mAb-DA ve PBS içerisinde dört farklı konsantrasyonda (0,01 ng/mL; 0,09 ng/mL; 0,9 ng/mL ve 4 ng/mL) hazırlanan domoik asit sırasıyla 30 dakika boyunca inkübe edilip her aşama sonrası 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ redoks probu ile EIS ölçümleri yapılarak Nyquist grafiği oluşturulmuş ve kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Şekil 6.25'te şematik olarak gösterilmiştir.

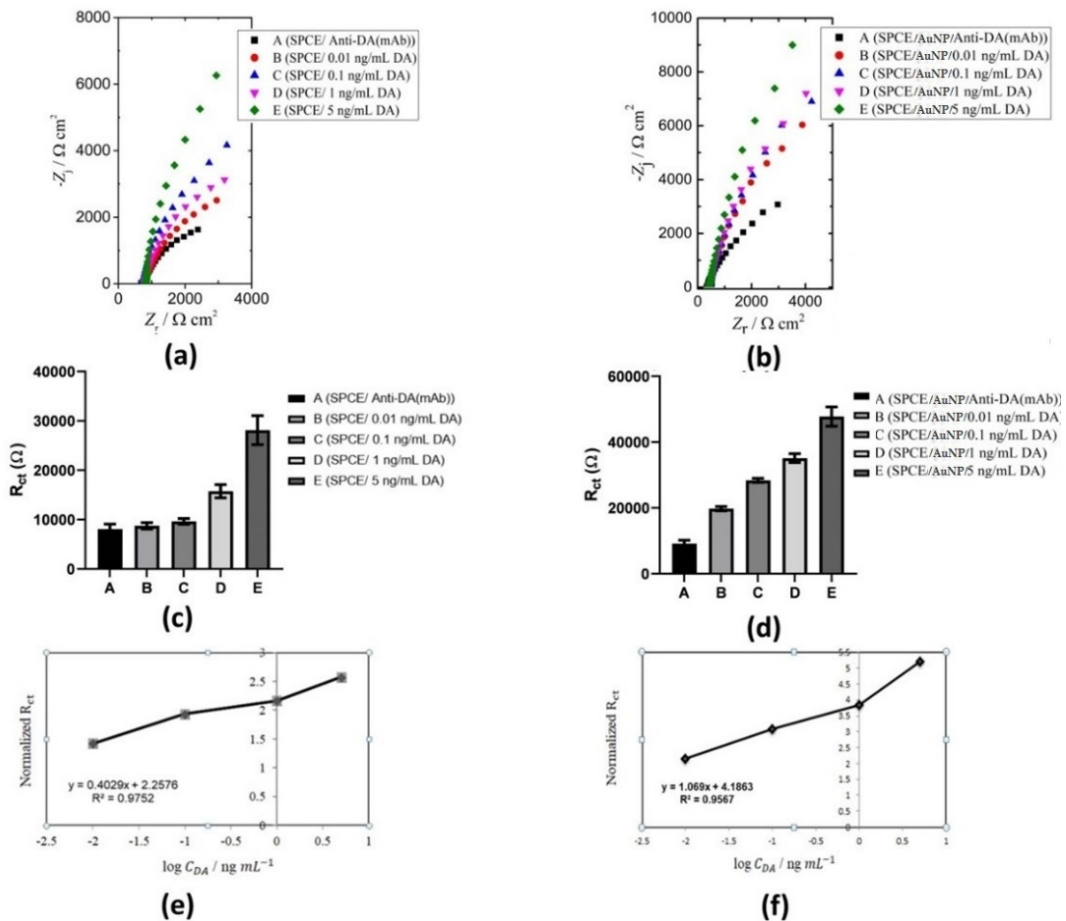


Şekil 6.25. SPCE'nin immobilizasyon prosesinin şematik gösterimi: a) işlem görmemiş, b) yüzey aktivasyonu, c) SAM tabakasının oluşturulması, d) streptavidin, e) mAb-DA, f) hedef DA'nın yakalanması.

SPCE'nin AuNP modifikasyonu sonrası yüzey biyofonksiyonelleştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Şekil 6.26'da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 6.26. SPCE'nin immobilizasyon prosesinin şematik gösterimi: a) işlem görmemiş, b) yüzey aktivasyonu, c) AuNP modifikasyonu d) SAM tabakasının oluşturulması, e) streptavidin, f) mAb-DA, g) hedef DA'nın yakalanması.



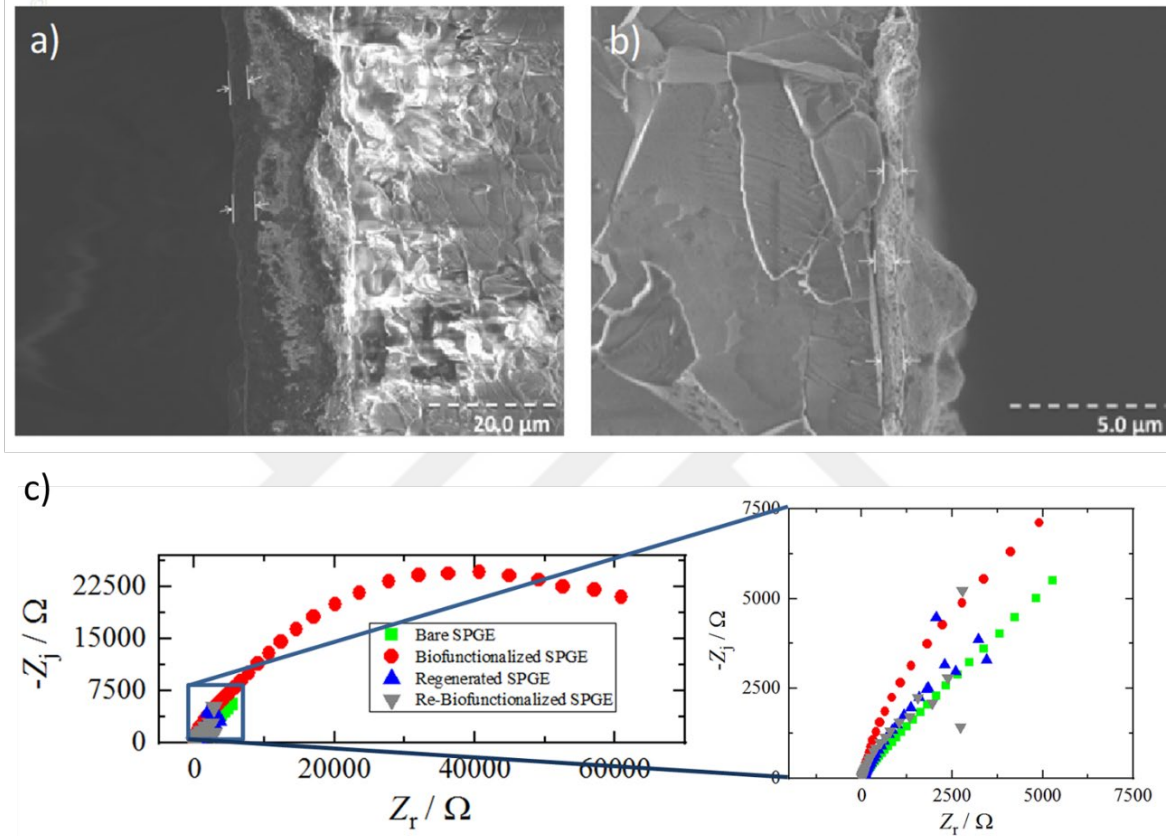
Şekil 6.27. SPCE'nin EIS yöntemi ile farklı DA konsantrasyonlarında 10 kHz – 0,1 Hz frekans aralığındaki; a) SPCE'nin Nyquist grafiği, b) AuNP/SPCE Nyquist grafiği, c) SPCE'nin R_{ct} değerleri, d) AuNP/SPCE'nin R_{ct} değerleri, e) SPCE'nin kalibrasyon grafiği, f) AuNP/SPCE'nin kalibrasyon grafiği.

Şekil 6.27’de görüleceği üzere SPCE’nin ve AuNP modifiye edilmiş SPCE’nin Nyquist grafiği ve her bir derişim sonrasında eşdeğer R_{ct} değerleri görölmektedir. Her iki biyofonksiyonelleştirme süreci incelendiğinde DA-Mab’ın, DA’yı yakaladığı ve DA derişimi arttıkça, arttığı görölmüştür. Bu da yapılan biyofonksiyonelleştirme işleminin başarı ile yapıldığını göstermektedir. Bununla birlikte Şekil 6.27. e ve f’deki kalibrasyon grafikleri oluşturmak için birden fazla elektrot ile çalışılarak immobilizasyonu yapılmış ve sonuçlar elde edilmiştir. Kullanılan ticari elektrotların muhtemel farkları göz önüne alınarak R_{ct} normalizasyonu kullanılarak hedef analit ortamındaki SPCE ve AuNP/SPCE için R^2 degerleri sırasıyla 0,9752 ve 0,9567 olarak bulunmuştur. Kalibrasyon denkleminin eğimi biyosensörün hassasiyeti hakkında bilgi vermektedir. Kalibrasyon denklemlerinin eğimleri SPCE ve AuNP/SPCE için incelendiğinde sırasıyla 0,4029 ve 1.069 olarak bulunmuştur. Bu da AuNP/SPCE’nin hassasiyetinin daha yüksek olduğu AuNP modifikasyonu ile attığı gözlemlenmiştir. Denklem 6.5 ve 6.6 kullanılarak hesaplanan tayin limiti (LOD) ve tayin sınırı (LOQ), elde edilen değerler ile SPCE ve AuNP/SPCE için LOD değerleri sırasıyla 3,21 ng/mL ve 1,16 ng/mL’dir. SPCE ve AuNP/SPCE için hesaplanan LOQ değerleri sırasıyla 9.74 ng/mL ve 3,52 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu değerler yüksek hassasiyette domoik asit tayininin AuNP modifikasyonu ile daha da arttığı gözlemlenmiştir.

6.7. Ekran Baskılı Elektrotların Yüzeylerinin Rejenerasyonu

Elektrotların uzunca bir süre kullanımı esnasında yüzeyinde moleküllerin immobilizasyonu ve daha sonrasında yapılan rejenerasyon işlemleri büyük önem arz etmektedir. Bu durumda elektrot yüzeyinde kullanılan materyalin (altın, karbon gibi) kalınlığı önemlidir. Yapılan çalışmada ticari olarak temin ettiğimiz işlem görmemiş SPGE’nin çalışma elektrot bölgesinin altın tabaka kalınlığı ölçölmüştür. Bunun için öncelikle, elektrot sıvı azotta bir süre bekletilerek çalışma elektrot bölgesine zarar verilmeden iki parçaya ayrılmıştır. Daha sonrasında farklı bölgelerden elde edilen ölçümler sonucunda ortalama altın kalınlığının 3,58 μm olduğu görölmüş ve farklı bölgeler arasındaki standart sapmasının ise 0,37 μm olduğu hesaplanmıştır (Şekil 6.28). Daha sonrasında rejenerasyon işlemi ile elektrot yüzeyinde bulunan katmanların optimize edilen 0.1 mM H_2SO_4 çözeltisi inkübe edilip döngüsel voltametri yöntemi kullanılarak ortadan kaldırılması hedeflenmiştir. Bu işlem sırasında yüzeydeki moleküller uzaklaştırılırken çalışma elektrot bölgesindeki altın tabakanın da bir miktar uzaklaşarak

kalınlığının ortalama $0,66 \mu\text{m}$ 'ye düştüğü görülmüştür (Şekil 6.28 b'de). Şekil 6.28 c'de empedans yanıtlarında da görüleceği üzere rejenerasyon sonrasında elektrottaki bozulmalar sonucu empedans yanıtları da tekrar immobilizasyona uygun olmadığını göstermektedir. Sonuç olarak altın kalınlığındaki çok yüksek orandaki düşüş ve empedans yanıtları SPGE'nin rejenerasyon ve tekrar kullanım için yeterli derecede iyi olmadığını anlamına gelmektedir.

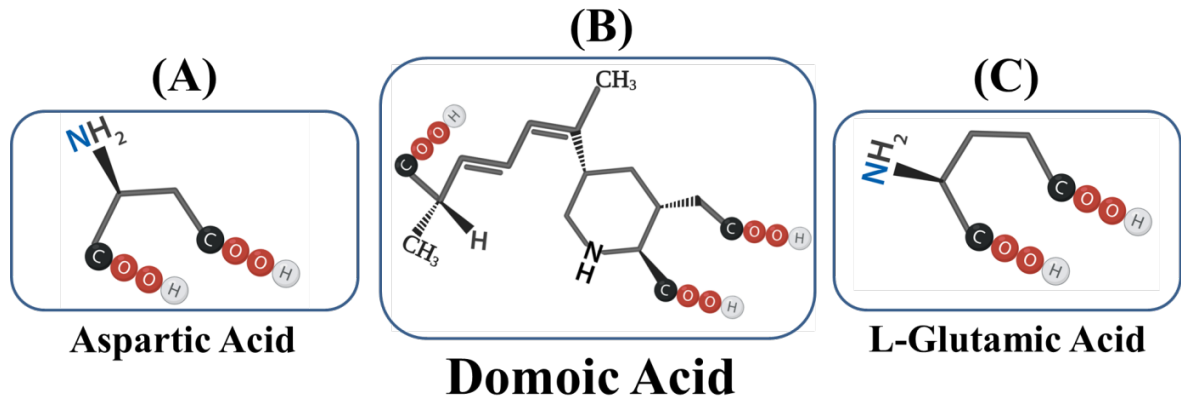


Şekil 6.28. a) İşlem görmemiş SPGE'nin SEM görüntüsü, b) rejenerasyon işlemi uygulanmış SPGE'nin çalışma elektrot bölgesinin enine kesitinin SEM görüntüsü ve c) empedans yanıt sonuçları.

6.8. Ekran Baskılı Elektrotların Seçiciliği

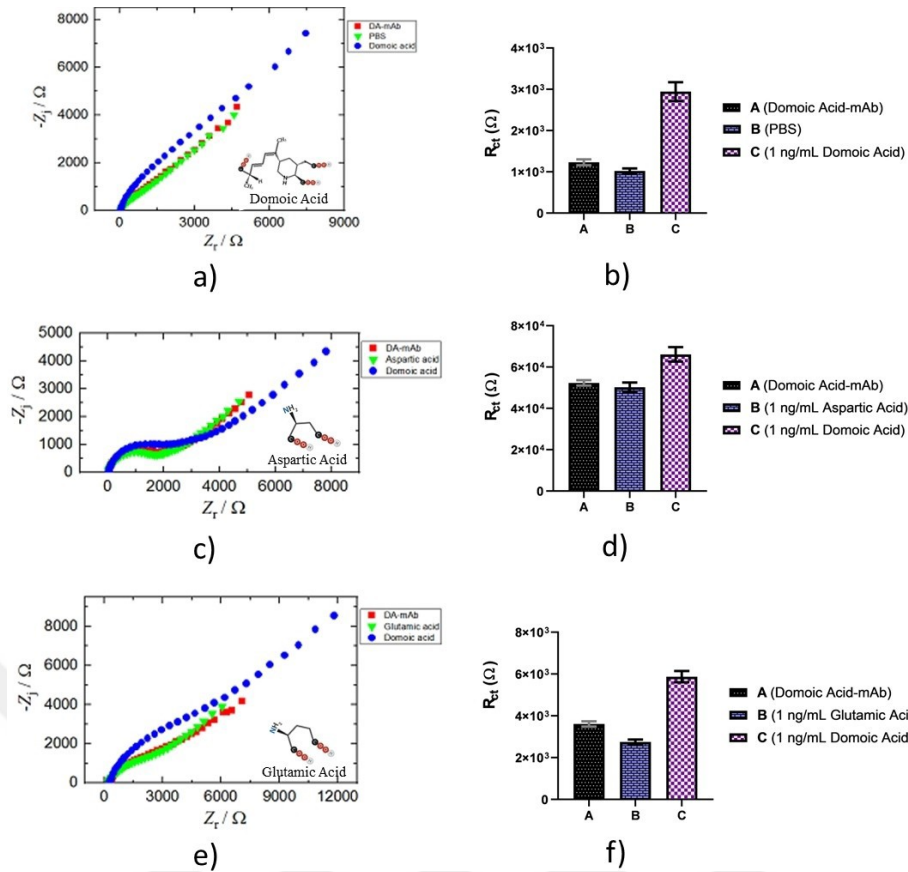
DA fitotoksin grubu içerisinde olup suda çözünebilen nörokimyasal süreçleri inhibe eden, kısa süreli hafıza kaybına, beyin hasarına ve ciddi vakalarda insanlarda ölüme neden olan bir nörotoksindir (Clayden vd., 2005). Aspartik asit, proteinlerin biyosentezinde kullanılan insan vücudu tarafından sentezlenebildiğinden nonesansiyel aminoasitlerdendir (Voet vd., 2016). Glutamik asit L- ve D- izomeri bulunan doğada bulunan hali L- olarak

adlandırılan non esansiyel protein biyosentezinde kullanılan bir aminoasittir (Garattini vd., 2000).



Şekil 6.29. Kimyasal yapıları, aspartik asit (A), domoik asit (B) ve L-glutamik asit (C)

Şekil 6.29’da aspartik asit, domoik asit ve glutamik asitin kimyasal yapıları gösterilmiştir. Aspartik ve L-Glutamik asit kimyasal yapıları itibariyle domoik asitle benzer gruplar bulundurmaktadır. Aspartik ve L-Glutamik asit’te iki adet karboksil (-COOH) grubu içerirken, domoik asit ise üç adet karboksil (-COOH) grubu içermektedir. Geliştirdiğimiz biyosensörlerin sadece Domoik asite seçici olması sensörün seçiciliğinde önemli bir özellik teşkil eder.



Şekil 6.30. Ekran baskılı altın elektrotun seçiciliği; a) Nyquist formatında sunulan SPGE'nin PBS ve domoik aside empedans tepkilerinin karşılaştırılması, b) eşdeğer devre modellemesi ile elde edilen domoik asit-mAb, PBS ve domoik asidin yük transfer direnç değerleri, c) Nyquist formatında sunulan aspartik asit ve domoik asit için empedans tepkileri, d) eşdeğer devre modellemesi ile elde edilen domoik asit mAb, aspartik asit ve domoik asidin yük transfer direnç değerleri, e) glutamik asit için empedans tepkileri ve Nyquist formatında sunulan glutamik asit ve domoik asit için empedans tepkileri, (f) eşdeğer devre modellemesi ile elde edilen domoik asit-mAb, glutamik asit ve domoik asidin yük transfer direnç değerleri.

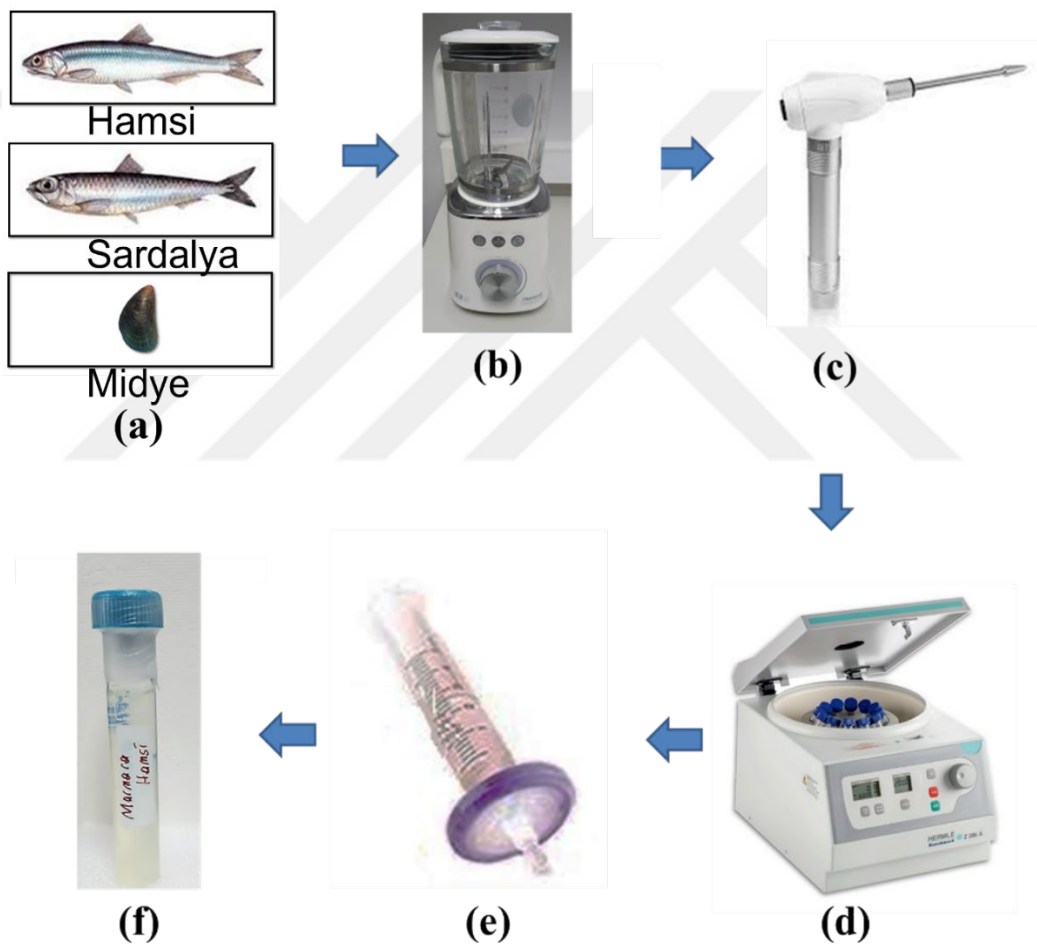
Biyosensörlerin, birden fazla bileşik, bileşen veya interferans içerebilen çözeltilerdeki yalnızca hedef bileşen için seçici olması gerektiğini belirtmek önemlidir. Bu bağlamda aspartik asit ve glutamik asit, domoik aside benzer fonksiyonel gruplara sahip bileşiklerdir. Biyofonksiyonelleştirilmiş SPGE'lerin seçiciliği, PBS, aspartik asit ve glutamik asit varlığında EIS analizi yapılarak ayrıca değerlendirilmiştir. Şekil 6.30'da gösterilen empedans tepkileri Nyquist grafiği olarak ve eşdeğer devre modeli sonucu elde edilen R_{ct} değeri, PBS, aspartik asit ve glutamik asit için ayrı ayrı elde edilmiştir. Bilindiği gibi PBS, sabit bir pH'nın korunmasına yardımcı olmak için su bazlı ve biyolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bir tampon çözeltilidir. Sonuç olarak, literatürde numunenin iyonik gücünü azaltmak ve optimum performansı sağlamak için numunelerin

kısmen PBS ile seyreltilmesi tavsiye edilmektedir (Colas vd., 2016). Sonuçları incelediğimizde Şekil 6. 30 a ve b'de PBS'nin DA-mAb bağlanmadığı R_{ct} değeri incelendiğinde görülebilmektedir.

Şekil 6. 30 c ve e'de, aspartik asit ve glutamik asitin bulunduğu Nyquist grafikleri görülmektedir. Şekil 6. 30 d ve f'de ise eşdeğer devre modeli sonucu elde edilen R_{ct} değeri incelendiğinde yüksek ve orta frekans aralığında domoik asit-mAb'dan sonra eklenen, aspartik asit ve glutamik asitin empedans tepkileri herhangi bir artış gözlemlenmedi. Bu da biyosensörün aspartik asit ve glutamik asite cevap vermediği ve spesifik olmayan bağlanmanın meydana gelmediğini göstermektedir. Bununla birlikte, daha sonra 1 ng/mL DA ilavesi, Şekil 9 b, d ve f'de de gözlemlendiği gibi empedansta bir artışla sonuçlanmıştır. Sonuç olarak aspartik asit ve glutamik asidin yük transfer dirençleri, domoik asit-mAb ve domoik asitten daha düşüktü. Geliştirilen biyosensörünün, güçlü bir antikor-hedef etkileşimi nedeniyle domoik asit için iyi seçicilik gösterdiği gözlemlenmiştir.

6.9. Çeşitli Deniz Canlılarındaki Domoik Asit Tayini

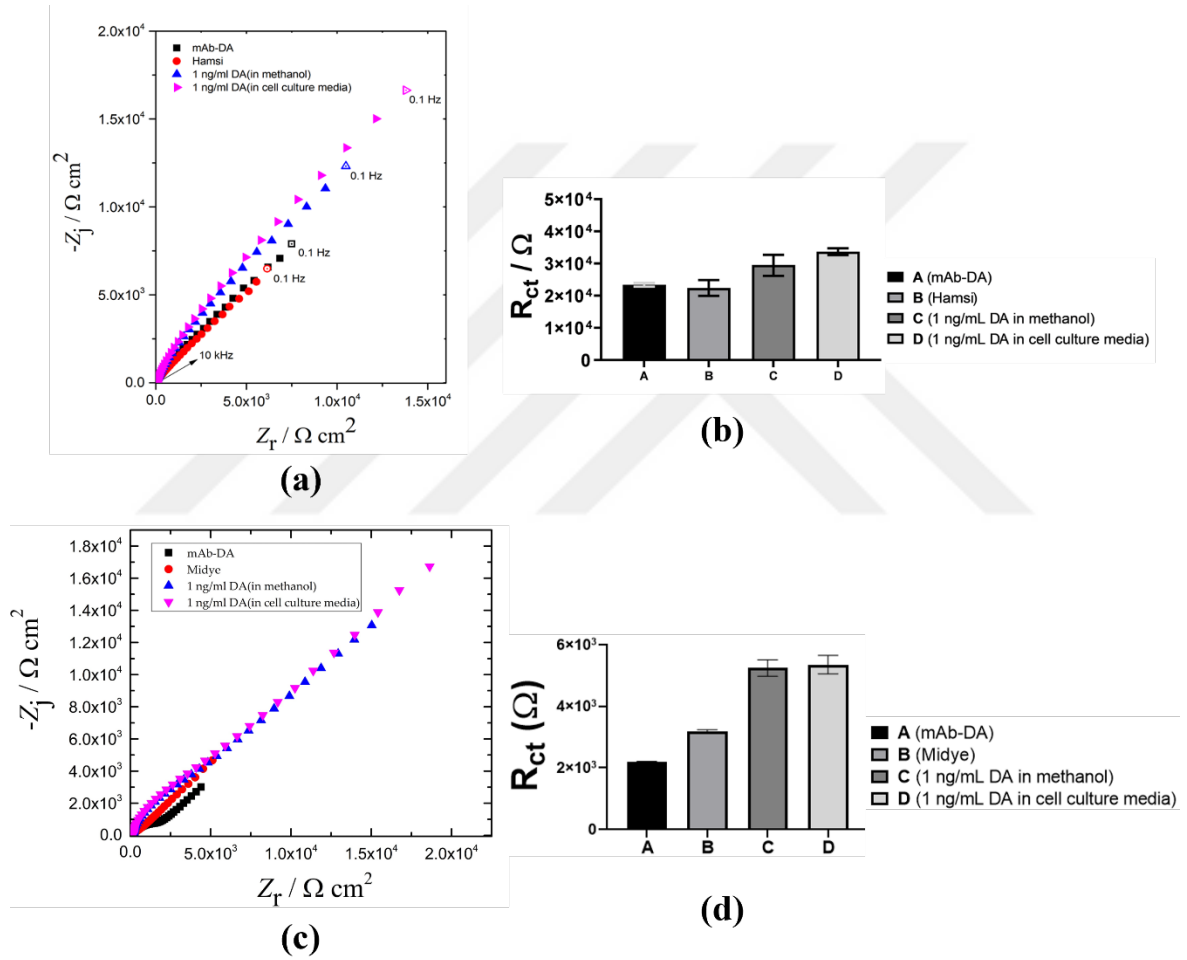
Deniz canlılarındaki domoik asitin tespiti için sanayileşme ve muhtemel kirliliğin yüksek olduğu Marmara bölgesinden 06/02/2020 tarihinde temin edilen deniz ürünleri hamsi, sardalya ve midye, Karadeniz bölgesinden ise hamsi balığı temin edilmiştir.



Şekil 6.31. Marmara bölgesinden temin edilen hamsi balığının ekstraksiyonunun şematik gösterimi; a) deniz ürünleri, b) blender, c) homojenizatör, d) santrifüj, e) 0,22 µm filtrelili şırınga, f) filtreden geçirilerek elde edilen deniz canlısı ekstraksiyonu.

Şekil 6.31’de deniz canlılarının ekstaksiyonun şematik gösterimi bulunmaktadır. Öncelikle temin edilen deniz canlıları küçük parçalara bölünerek, blender ile ufalanması sağlanmıştır. Küçük parçalara ayrılmış deniz canlıları 4 gram şeklinde ayrılarak üzerine 16

mL olan 1:1 metanol/su karışımı içerisine ilave edilerek en az 3 dakika boyunca homojenizatör kullanılarak, homojenize hale getirilmiştir (Ravalli vd., 2013). Daha sonra elde edilen bulamaç 4000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj işlemine tabi tutulmuş ve numune kuru metanol ile uyumlu 0,22 μm 'lik bir filtreden geçirilerek elde edilen özüt deneylerde kullanılmaya hazır hale getirilip 4°C'de saklanmıştır. Elde edilen ekstraksiyon numunelerindeki domoik asit tayin çalışmaları için önceden optimize edilen koşullarda immobilizasyonu yapılmış SPGE'de varlığı araştırılmıştır.



Şekil 6.32. SPGE kullanılarak EIS yöntemi ile deniz canlılarında DA tespiti için 10 kHz-0,1 Hz frekans aralığındaki elde Nyquist grafiği ve R_{ct} değerleri.

Şekil 6.32'da SPGE kullanılarak deniz canlılarında domoik asit varlığı EIS yöntemi ile araştırılmış ve elde edilen datalar uygun eşdeğer Randles devresi kullanılarak Gamry Echem Analyst programı kullanılarak modellenmiştir. Modelleme sonucunda elde edilen R_{ct} değerleri ile domoik asit tayini yapılmıştır. En az üç kere tekrarlanan deneylerde, Domoik

asit mAb üzerine metanol içinde ekstaksiyonu yapılan deniz canlılarının özütü eklenildiğinde sadece midyenin R_{ct} değerinde artış görülmüş, diğer deniz canlılarında görülmemiştir. Şekil 6.24 f'deki kalibrasyon eğrisi kullanılarak midyedeki domoik asit miktarı tespiti için R_{ct} değeri kalibrasyon eğrisindeki denkleme yerleştirilmiş ve 0.589635 ng/ml miktarında domoik asit ihtiva ettiği tespit edilmiştir. Geliştirilen biyosensörün doğruluğunun test edilmesi amacıyla derişimi bilinen metanol ve hücre kültür medyasında 1 ng/mL domoik asit içeren örnek konulunca R_{ct} değerinin arttığı görülmüştür. Bu da biyosensörün başarılı çalıştığını göstermektedir. Sonuç olarak, Marmara bölgesinden temin edilen midyede domoik asit eser miktarda rastlansa da, diğer Marmara bölgesinden elde edilen hamsi ve sardalya balığında ve Karadeniz bölgesinden temin edilen hamsi balığında rastlanmamıştır.



7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında ticari SPE'ler kullanılarak elektrokimyasal karakterizasyon, immobilizasyon, rejenerasyon ve geliştirdiğimiz biyosensör ile yüksek hassasiyet ve duyarlılıkta, ekonomik ve kullanımı kolay bir şekilde domoik asit tayini gerçek ortamında yapılmıştır. Bu çalışmada ayrıca SPE'lerin detaylı elektrokimyasal karakterizasyonları çeşitli redoks problemleri kullanılarak EIS ve CV yöntemleri ile incelenmiş, uygun redoks probunun tespiti ve verdiği elektrokimyasal cevaplar irdelenmiştir. SPGE'nin bare, biyofonksiyonelleştirilmiş, rejenerasyonu yapılmış ve tekrar biyofonksiyonelleştirilmiş örnekleri için SEM, EDX ve AFM analizleri ile yüzeydeki morfolojik değişimler gözlemlenmiştir. SPGE'nin rejenerasyonu ile yüzeyindeki Au miktarının dramatik şekilde azalması ve pürüzlülüğün yüksek derecede artması ile rejenerasyona uygun olmadığı tespit edilmiştir. SPCE'nin bare, biyofonksiyonelleştirilmesi ve AuNPs ile modifikasyonu yapılmış ve sonrasında biyofonksiyonelleştirilmiş örneklerinin SEM, EDX ve AFM analizi yapılarak yüzeydeki değişimler ayrıntılı incelenmiştir. SPCE üzerine AuNPs modifikasyonu sonrası altın nanoparçacıkların çeşitli boyutlarda yüzeye modifiye olduğu görülmüştür.

Diğer taraftan SPGE ve SPCE uygun immobilizasyon protokolleri uygulanarak biyofonksiyonelleştirilmesi sağlanmıştır. SPGE'nin immobilizasyonu sonucu PBS ve hücre kültür medyası ortamındaki domoik asit için ayrı ayrı kalibrasyon grafikleri oluşturularak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. Burada geliştirilen biyosensörün gerçek uygulamalarda karşılaşılabilecek karmaşık biyolojik matrisler içerisinde domoik asit analizi için sığır serum albümini (BSA) içeren hücre kültürü ortamı (içerisinde birçok spesifik olmayan büyük ve düşük moleküler ağırlıklı proteinler, vitamin, iyon, vb.) kullanılmıştır. SPGE'nin immobilizasyonu sonucu PBS içeren ortamda LOD ve LOQ tayin değerleri sırasıyla 2,93 ng/mL ve 8,88 ng/mL'dir. Hücre kültür medyası içeren ortam için ise LOD ve LOQ tayin değerleri sırasıyla değeri 4,28 ng/mL ve 12,97 ng/mL'dir. Beklenildiği üzere BSA içeren hücre kültür ortamında çok sayıda bileşiklerin bulunması LOD ve LOQ değerlerinin yükselmesine sebep olmuştur.

Bununla birlikte, SPCE'nin immobilizasyonu sonucu ise PBS'li ortam içerişindeki domoik asit için LOD ve LOQ tayin değerleri sırasıyla 3,21 ng/mL ve 9,74 ng/mL'dir. SPCE'nin AuNP modifikasyonu sonucu ise LOD ve LOQ tayin değerleri sırasıyla 1,16 ng/mL ve 3,52 ng/mL olarak bulunmuştur. SPGE ve SPCE'nin seçiciliği domoik asitle

benzer grupları bulunan aspartik ve glutamik kullanılarak detaylı olarak incelenmiştir. SPCE'nin seçiciliğinin ilk basamakta yapılan yüzey fonksiyonelleştirilmesi sebebi SPGE kadar iyi olmadığı sonucuna varılmıştır.

Geliştirilen biyosensör ile Türkiye'de tüketimi en yoğun balıklardan olan ve sanayileşme ile birlikte muhtemel kirliliğin yüksek olduğu Marmara ve Karadeniz bölgesinden 06/02/2020 tarihinde temin edilen deniz canlılarındaki domoik asit miktarı incelenmiştir. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda çok büyük ihtimal ile Marmara bölgesindeki hamsi ve sardalyada, Karadeniz bölgesindeki hamside domoik asit ihtiva etmediği tespit edilmiştir. Marmara bölgesinden elde edilen midyede ise 0.589635 ng/ml miktarında domoik asit ihtiva ettiği ama bu miktarın insan sağlığına herhangi bir zararı olmayacağı bilinmektedir (Iverson vd., 1994; Jeffery vd., 2004; Clayden vd., 2005)

Mevcut ticari SPE tabanlı biyosensörlerin sınırlamalarını da kabul etmek önemlidir. Bu bağlamda, bu tür SPE'ler için rejenerasyon kapasitesinin iyi olmaması, yüksek yüzey pürüzlülüğü ve heterojenliği sayesinde ticari SPE'ler kullanılarak oldukça hassas ve uzun vadeli tekrarlanabilir bir kullanım elde etmenin zorlukları da görülmüştür. Burada ticari tek kullanımlık elektrotlardan daha yüksek bir performans elde etmek için rejenerasyon ve daha sonra ticari elektrotların uzun süreli kullanımı konusunda daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, iyi derecede tayin limitlerinde ve seçiciliği yüksek domoik asit varlığı başarılı bir şekilde tespiti, pahalı enstrümantasyon, karmaşık operasyon prosedürleri, uzun tespit süresi ve kalifiye personel gerektirmeden, tek kullanımlık SPE'ler ile toksisite çalışmalarında yaygın uygulamalar bulma potansiyeli olduğu kanıtlanmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Arora, N., 2013, Recent advances in biosensors technology: a review, *Octa Journal of Biosciences*, 1(2).
- Athey, D., Ball, M., McNeil, C. J., & Armstrong, R. D., 1995, A study of enzyme-catalyzed product deposition on planar gold electrodes using electrical impedance measurement. *Electroanalysis*, 7(3), 270-273.
- Banica, F. G., 2012, *Chemical sensors and biosensors: fundamentals and applications*, John Wiley & Sons.
- Basics of EIS: Electrochemical Research-Impedance, 2017, Available: <https://www.gamry.com/application-notes/EIS/basics-of-electrochemical-impedance-spectroscopy/>
- Chaubey, A., Malhotra, B., 2002, Mediated biosensors, *Biosensors and bioelectronics*, 17(6-7), 441-456.
- Choudhary, A.K., Kailash, 2015, Biosensor based on piezoelectric crystal probe, *Advances in Applied Science Research*, 6.
- Ciucu, A. A., 2014, Chemically modified electrodes in biosensing. *Journal of Biosensors & Bioelectronics*, 5(3), 1.
- Clark Jr, L. C., & Lyons, C., 1962, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Annals of the New York Academy of sciences*, 102(1), 29-45.
- Clayden, J., Read, B., & Hebditch, K. R., 2005, Chemistry of domoic acid, isodomoic acids, and their analogues, *Tetrahedron*, 61(24), 5713–5724.
- Clayden, J., Read, B., Hebditch, K. R., 2005, Chemistry of domoic acid, isodomoic acids, and their analogues, *Tetrahedron*, 61(24), 5713–5724.
- Colas, F., Crassous, M. P., Laurent, S., Litaker, R. W., Rinnert, E., Le Gall, E., Compere, C., 2016, A surface plasmon resonance system for the underwater detection of domoic acid. *Limnology and Oceanography: Methods*, 14(7), 456-465.
- D'Orazio, P., 2003, Biosensors in clinical chemistry, *Clinica chimica acta*, 334(1-2), 41-69.
- Eggins, B. R., 2002, *Chemical sensors and biosensors (Vol. 2)*, John Wiley & Sons.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Evtugyn, G. A., Budnikov, H. C., Nikolskaya, E. B., 1998, Sensitivity and selectivity of electrochemical enzyme sensors for inhibitor determination, *Talanta*, 46(4), 465-484.
- Faridbod, F., Ganjali, M. R., Larijani, B., Norouzi, P., Hosseini, M., 2014, Biosensors in endocrinology-Review article.
- Garattini, S., 2000, Glutamic Acid, Twenty Years Later, *The Journal of Nutrition*, 130(4), 901S–909S.
- Goode, J. A., Rushworth, J. V. H., Millner, P. A., 2015, Biosensor regeneration: a review of common techniques and outcomes, *Langmuir*, 31(23), 6267-6276.
- Hees, J., Heidrich, N., Pletschen, W., Sah, R. E., Wolfer, M., Williams, O. A., Ambacher, O., 2012, Piezoelectric actuated micro-resonators based on the growth of diamond on aluminum nitride thin films, *Nanotechnology*, 24(2), 025601.
- Hernández, H. H., Reynoso, A. M. R., González, J. C. T., Morán, C. O. G., Hernández, J. G. M., Ruiz, A. M., González, T., 2020, Electrochemical impedance spectroscopy (EIS): A review study of basic aspects of the corrosion mechanism applied to steels, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*.
- Hu, K., Lan, D., Li, X., Zhang, S., 2008, Electrochemical DNA Biosensor Based on Nanoporous Gold Electrode and Multifunctional Encoded DNA–Au Bio Bar Codes, *Analytical Chemistry*, 80(23), 9124–9130.
- Iverson, F., Truelove, J. 1994, "Toxicology and seafood toxins: domoic acid", *Natural Toxins*, 2(5), 334-339.
- Jeffery, B., Barlow, T., Moizer, K., Paul, S., Boyle, C., 2004, Amnesic shellfish poison, *Food and chemical toxicology*, 42(4), 545-557.
- Kania, M., Kreuzer, M., Moore, E., Pravda, M., Hock, B., Guilbault, G., 2003, Development of polyclonal antibodies against domoic acid for their use in electrochemical biosensors, *Analytical letters*, 36(9), 1851-1863.
- Karube, I., & Nomura, Y., 2000, Enzyme sensors for environmental analysis, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10(1-3), 177-181.
- Kavita, V., 2017, DNA biosensors-a review, *J. Bioeng. Biomed. Sci*, 7(2), 222.
- Koç, Y., Moralı, U., Erol, S., Avcı, H., 2021a, Electrochemical Investigation of Gold Based Screen Printed Electrodes: An Application for a Seafood Toxin Detection, *Electroanalysis*, 33(4), 1033-1048.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Koç, Y., Morali, U., Erol, S., Avci, H., 2021b, Investigation of electrochemical behavior of potassium ferricyanide/ferrocyanide redox probes on screen printed carbon electrode through cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy, *Turkish Journal of Chemistry*, 45(6).
- Le Berre, M., Kane, M., 2006, Biosensor-Based Assay for Domoic Acid: Comparison of Performance Using Polyclonal, Monoclonal, and Recombinant Antibodies, *Analytical letters*, 39(8), 1587-1598.
- Leatherbarrow, R. J., Edwards, P. R., 1999, Analysis of molecular recognition using optical biosensors, *Current opinion in chemical biology*, 3(5), 544-547.
- Luo, X., & Davis, J. J., 2013, Electrical biosensors and the label free detection of protein disease biomarkers, *Chemical Society Reviews*, 42(13), 5944-5962.
- Luppa, P. B., Sokoll, L. J., Chan, D. W., 2001, Immunosensors principles and applications to clinical chemistry, *Clinica chimica acta*, 314(1-2), 1-26.
- Lvovich, V. F., 2012, Impedance spectroscopy: applications to electrochemical and dielectric phenomena, John Wiley & Sons.
- Odenthal, K. J., Gooding, J. J., 2007, An introduction to electrochemical DNA biosensors, *Analyst*, 132(7), 603-610
- Orazem, M. E., Tribollet, B., 2008, *Electrochemical impedance spectroscopy*, New Jersey, 383-389.
- Orazem, M. E., Tribollet, B., 2017, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, 2nd Edition, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
- Pohanka, M., 2018, Overview of piezoelectric biosensors, immunosensors and DNA sensors and their applications, *Materials*, 11(3), 448.
- Rafique, B., Iqbal, M., Mehmood, T., Shaheen, M. A., 2019, Electrochemical DNA biosensors: A review, *Sensor Review*.
- Rand, D. A. J., Woods, R., 1971, The nature of adsorbed oxygen on rhodium, palladium and gold electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 31(1), 29-38.
- Ravalli, A., Dos Santos, G. P., Ferroni, M., Faglia, G., Yamanaka, H., & Marrazza, G., 2013, New label free CA125 detection based on gold nanostructured screen-printed electrode, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 179, 194-200.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Samie, H. A., & Arvand, M., 2020, Label-free electrochemical aptasensor for progesterone detection in biological fluids, *Bioelectrochemistry*, 133, 107489.
- Sarma, Anil., 2008, Recent invention of material Science -enzyme electrode.
- Shin, S. R., Zhang, Y. S., Kim, D. J., Manbohi, A., Avci, H., Silvestri, A., Khademhosseini, A., 2016, Aptamer-based microfluidic electrochemical biosensor for monitoring cell-secreted trace cardiac biomarkers. *Analytical chemistry*, 88(20), 10019-10027
- Sun, X., Zhang, Y., Shen, H., Jia, N., 2010, Direct electrochemistry and electrocatalysis of horseradish peroxidase based on halloysite nanotubes/chitosan nanocomposite film, *Electrochimica Acta*, 56(2), 700-705.
- Svitel, J., ve Katrl, J., 2016, Optical biosensors, *Essays Biochem*, 60, 91-100.
- Szamocki, R., Velichko, A., Holzapfel, C., Mücklich, F., Ravaine, S., Garrigue, P., Kuhn, A. 2007, Macroporous Ultramicroelectrodes for Improved Electroanalytical Measurements, *Analytical Chemistry*, 79(2), 533–539.
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W., 2016, *Fundamentals of biochemistry: Life at the molecular level*.
- Wan, H., Sun, Q., Li, H., Sun, F., Hu, N., Wang, P., 2015, Screen-printed gold electrode with gold nanoparticles modification for simultaneous electrochemical determination of lead and copper, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 209, 336-342.
- Yoon, J. Y., 2016, *Introduction to biosensors: from electric circuits to immunosensors*. Springer.
- Yüksekkaya, M., 2017, Microfluidic biosensors for point of care applications using electrical impedance analysis and portable lensless wide-field microscopy imaging.
- Zhang, Y. S., Aleman, J., Shin, S. R., Kilic, T., Kim, D., Shaegh, S. A. M., ... & Khademhosseini, A., 2017, Multisensor-integrated organs-on-chips platform for automated and continual in situ monitoring of organoid behaviors, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(12), E2293-E2302.