

Araştırma Makalesi - Research Article

Dopamin, NADH ve Askorbik Asitin Elektroyükseltgenmesine Elektrokimyasal Olarak İndirgenmiş Grafen Oksit, Politiyonin ve Altın Nanopartiküllerin Etkisi

Effect of Electrochemically Reduced Graphene Oxide, Polythionine and Gold Nanoparticles on Electrooxidation of Dopamine, NADH and Ascorbic Acid

Melike Bilgi Kamaç^{1*}, Muhammed Altun², Merve Yılmaz³

Geliş / Received: 05/11/2020

Revize / Revised: 17/01/2021

Kabul / Accepted: 17/01/2021

ÖZ

Bu çalışmada, yüzey baskılı karbon elektrotlar (SPCE) elektrokimyasal olarak indirgenmiş grafen oksit (ERGO) ile modifiye edilmiş (SPCE/ERGO), ardından elektropolimerizasyon tekniği ile politiyonin (PTH) filmi SPCE/ERGO'lar üzerinde oluşturulmuştur (SPCE/ERGO/PTH). PTH'nin SPCE/ERGO'lar üzerindeki elektropolimerizasyonu için optimum döngü sayısı belirlenmiştir. SPCE/ERGO/PTH elektrotları üzerinde elektrodepozisyon metodu ile altın nanopartiküller (AuNP) oluşturulmuş ve elde edilen SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotlarının elektrokimyasal karakterizasyonları dönüşümlü voltametri (CV) ile yapılmıştır. Dopamin (DA), nikotinamid adenin dinükleotitin indirgenmiş formu (NADH) ve askorbik asitin (AA) elektroyükseltgenmesine ERGO, PTH ve AuNP'nin elektrokatalitik etkileri incelenmiş ve PTH'nin üç analit için de medyatör olarak rol oynadığı gözlenmiştir. ERGO, PTH ve AuNP'nin birlikte gösterdikleri sinerjik etki ile DA, NADH ve AA'nın anodik pik potansiyelleri negatif yöne kaymış ve anodik pik akımları artmıştır. DA, NADH ve AA'nın difüzyon katsayıları (D) sırasıyla 3.37×10^{-8} , 7.79×10^{-9} ve 1.51×10^{-8} olarak, elektron transfer katsayıları (α) ise sırasıyla 0.327, 0.701 ve 0.373 olarak hesaplanmıştır. pH'nın DA, NADH ve AA'nın elektroyükseltgenmesine etkisi de incelenmiş ve pH arttıkça her üç analit için de anodik pik potansiyellerinin azaldığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler- *Dopamin, NADH, Askorbik Asit, Elektroyükseltgenme*

ABSTRACT

In this study, screen-printed carbon electrodes (SPCE) were modified with electrochemically reduced graphene oxide (ERGO) (SPCE/ERGO), then polythionine (PTH) film was formed on SPCE/ERGO by electropolymerization technique (SPCE/ERGO/PTH). The optimum number of cycles has been determined for the electropolymerization of PTH on SPCE/ERGO. Gold nanoparticles (AuNP) were formed on SPCE/ERGO/PTH electrodes by electrodeposition method and electrochemical characterizations of SPCE/ERGO/PTH/AuNP electrodes were made by cyclic voltammetry (CV). The electrocatalytic effects of ERGO, PTH and AuNP on the

^{1*}Sorumlu yazar iletişim: melikebilgikamac@gmail.com (<https://orcid.org/0000-0002-3381-7522>)

Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı, Çankırı Karatekin Üniversitesi, Çankırı

²İletişim: maltun@gmail.com (<https://orcid.org/0000-0002-0387-1819>)

Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı, Çankırı Karatekin Üniversitesi, Çankırı

³İletişim: mrve0891@gmail.com (<https://orcid.org/0000-0003-3690-2455>)

Kimya Bölümü, Çankırı Karatekin Üniversitesi, Çankırı

electrooxidation of dopamine (DA), nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and ascorbic acid (AA) were investigated, and PTH was observed to play a role as a mediator for three analytes. The anodic peak potentials of DA, NADH and AA shifted in the negative direction, and anodic peak currents increased due to the synergistic effect of ERGO, PTH and AuNP together. The diffusion coefficients (D) of DA, NADH and AA were calculated as 3.37×10^{-8} , 7.79×10^{-9} and 1.51×10^{-8} , respectively, and also the electron transfer coefficients (α) were calculated as 0.327, 0.701 and 0.373, respectively. The effect of pH on the electrooxidation of DA, NADH and AA was also examined, and it was observed that the anodic peak potentials for all three analytes decreased with increasing the pH.

Keywords- Dopamine, NADH, Ascorbic Acid, Electrooxidation

I. GİRİŞ

Dopamin (DA), katekolamin sınıfı içinde en önemli moleküldür ve beyin sisteminde önemli bir rol oynar. Merkezi sinir, renal, hormonal ve kardiyovasküler sistemlerin işlevlerinden sorumludur [1-2]. Anormal DA seviyeleri, şizofreni, Huntington hastalığı, Parkinson hastalığı ve demans gibi çeşitli hastalıklara neden olabilir [3-5]. Nikotinamid adenin dinükleotidin indirgenmiş formu (NADH), insan vücudunda bulunan en önemli koenzimdir. 300'den fazla dehidrojenaz enzimi, organizmaların metabolizmasında rol oynayan bir koenzim olarak NADH'nin yükseltgenmiş formunu (NAD^+) kullanır [6-7]. NADH, dopamin, noradrenalin ve serotonin gibi nörotransmitterlerin hücrel üretimini uyarır. Vücuttaki NADH eksikliği, ATP üretiminin olmaması nedeniyle hücrel düzeyde bir enerji boşluğuna neden olur. Beyindeki ATP miktarı azalırsa dikkat eksikliği ve Alzheimer demansı gibi olumsuz etkilere neden olabilir. Hücredeki aşırı NADH seviyeleri, aşırı enerji üretimi nedeniyle uykusuzluk, kaygı, yorgunluk ve aşırı uyarılma gibi kötü durumlara da yol açabilir [8-9]. Askorbik asit (AA) olarak da bilinen C vitamini, biyolojik sistemler için gerekli olan en önemli suda çözünür lakton moleküllerinden biridir, meyve ve sebzeler gibi birçok bitki materyalinde bulunur. Bitkiler ve birçok memeli tarafından sentezlenebilir, ancak insanlar tarafından sentezlenemez. Kolajen oluşumunda anahtar rol oynar, iyi bir antioksidan görevi görür ve doku hasarını önler [10-11]. Diyetle AA eksikliği çeşitli hastalıklara, diş etlerinin şişmesine, gevşek dişlere ve kemik deformasyonuna neden olur [12]. İskorbüt, anemi, soğuk algınlığı ve kısırlığın tedavisinde kullanılır. İyi antioksidan aktivitesi nedeniyle birçok gıda maddesinde renk, tat ve koku değişikliklerinden korumak için kullanılmaktadır [13]. DA, NADH ve AA'nın elektrokimyasal tayini için birçok sensör geliştirilmiştir [14-16]. Bu analitlerin elektrokimyasal tayini için ilk olarak elektroyükseltgenme özellikleri incelenmelidir.

Fenazin ve fenotiyazin polimerleri, sensör ve biyosensörlerde analitin doğrudan ve/veya dolaylı belirlenmesinde redoks medyatörleri olarak sıklıkla kullanılmaktadır [17-18]. Bu polimerlerin elektrokatalitik özellikleri, birçok analitin yükseltgenme potansiyelini azaltarak sensörün duyarlılığını arttırmakta ve tayin sınırlarını düşürmektedir [19]. Tiyonin (TH), α konumunda iki amino grubu içeren katyonik bir fenotiyazin boyasıdır [20-21]. TH, diğer fenotiyazin boyaları gibi, iletken bir polimer oluşturmak için elektrokimyasal olarak polimerleştirilebilir. Son zamanlarda poli(tiyonin) (PTH), sensör ve biyosensörlerde hem iletken polimer hem de redoks medyatörü olarak kullanılan bir polimerdir [22-24]. Grafen tabakaları yüksek yüzey alanı, yüksek mekanik direnç ve mükemmel iletkenliğe sahip ultra hassas sensörlerin ve biyosensörlerin hazırlanmasında kullanılır [25-26]. Grafen oksit ve indirgenmiş grafen oksit, kolay sentezlenebilirlik, suda iyi çözünebilirlik ve biyoyoumluluk gibi özellikleri nedeniyle biyosensör üretimi, hücrel görüntüleme ve ilaç salımı gibi alanlarda çok çeşitli uygulamalara sahiptir [27-28]. Altın nanopartiküller (AuNP), yüksek yüzey/hacim oranına sahip olması, yüksek anodik potansiyellerde çalışma ihtiyacını ortadan kaldırması ve biyoyoumlu olması gibi özellikleri nedeniyle elektrokimyasal sensör ve biyosensörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır [29-30]. Yüzey baskılı elektrotlar (SPE) serigrafik tekniği ile üretilir. Bu elektrotlar, karmaşık numune ön işlemleri olmadan kullanılabilen sensör ve biyosensörlerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılır [31-32]. SPE'lerin doğrudan yerinde ölçmeye imkan tanınması, tek kullanımlık olacak şekilde hızlı, pratik, düşük maliyetli olması ve hasta başı testlere uygunluk göstermesi gibi birçok avantajı vardır. SPE'lerin nanomalzemeler ve polimerlerle modifikasyonu, sensör ve biyosensörlerin geliştirilmesi için ilgi çekicidir [33-35].

Bu çalışmada, yüzey baskılı karbon elektrotlar (SPCE), ERGO, PTH ve AuNP ile modifiye edilmiş ve hazırlanan SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotlarının elektrokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotları üzerinde DA, NADH ve AA'nın elektroyükseltgenmesine ERGO, PTH ve AuNP'nin elektrokatalitik etkileri ve pH'nın etkisi incelenmiştir. DA, NADH ve AA'nın difüzyon katsayıları (D)

ve elektron transfer katsayıları (α) hesaplanmıştır. Literatürde SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotları ile DA, NADH ve AA'nın elektroyükseltgenmesinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

II. MATERYAL VE YÖNTEM

A. Materyal

Dopamin (DA), nikotinamid adenin dinükleotitin indirgenmiş formu (NADH), askorbik asit (AA), grafen oksit (GO), tiyonin (TH), kloroaurik asit (HAuCl_4), potasyum heksosiyanoferat ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) potasyum heksosiyanoferit ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$) ve sodyum hidroksit (NaOH) Sigma-Aldrich firmasından, potasyum klorür (KCl), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4), asetik asit (CH_3COOH), sodyum asetat (CH_3COONa), dimetil formamid (DMF), hidroklorik asit (HCl, %37'lik) ise Merck firmasından tedarik edilmiştir. Kullanılan tüm kimyasallar yüksek analitik saflıktadır. Deneylede Millipore Milli-Q Direct Q-3 ultra saf su cihazından elde edilen su kullanılmıştır. İstenilen pH'da tampon çözelti hazırlamak için, standart tampon çözeltilerle kalibre edilmiş Mettler Toledo pH-metre kullanılmıştır.

B. Elektrokimyasal Ölçümler

Tek kullanımlık yüzey baskılı karbon elektrotlar (SPCE) DropSens (Oveido, İspanya) firmasından temin edilmiştir. SPCE'lerin çalışma elektrotu (4 mm) ve karşıt elektrotu karbondan, referans elektrotu ise Ag/AgCl'den (0.1 M KCl) oluşmaktadır. Elektrotların potansiyostata (Dropsens μStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat, Oveido, İspanya) bağlantısı DropSens'ten temin edilen konnektörler ile sağlanmıştır. Tüm elektrokimyasal ölçümler, cihazın sinyalleri DropView 8400 yazılımı ile değerlendirilen bilgisayar kontrollü Dropsens μStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat ile gerçekleştirilmiştir. SPCE elektrotlarının yüzeylerinin temizlenmesi ve aktivasyonu için 50 mM pH 7.5 fosfat tamponu içerisinde +1.8 V'da 300 s boyunca potansiyel uygulanarak elektrokimyasal ön işlem uygulanmıştır [14-15, 35]. Elektrokimyasal ölçümler ve deneyler en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

C. SPCE/ERGO/PTH/AuNP Elektrotunun Hazırlanması

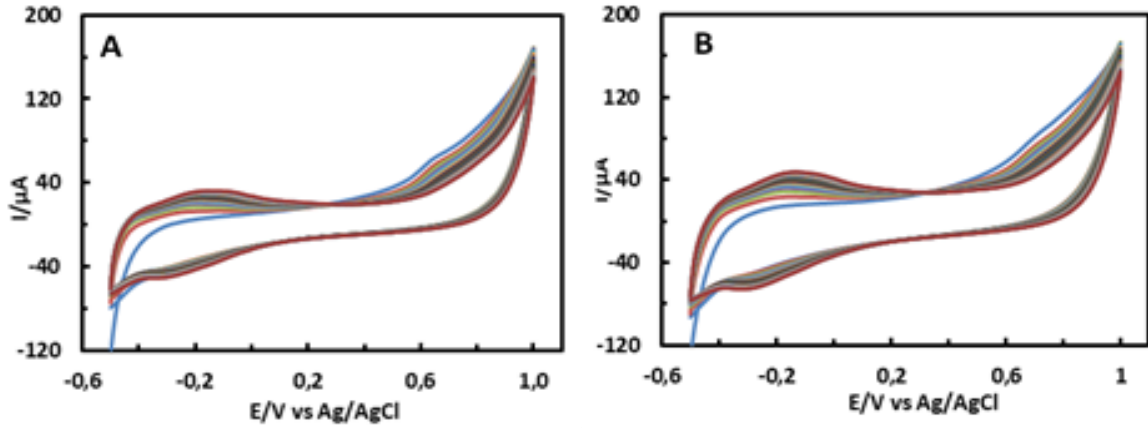
1.0 mg GO ve 1.0 mL DMF:H₂O (1:1) karışımına 2 saatlik sonikatör uygulamasıyla kararlı ve homojen bir süspansiyon hazırlanmıştır. Elektrokimyasal olarak indirgenmiş grafen oksit (ERGO) SPCE'ler yüzeyinde hazırlanması için, elektrotların yüzeyine hazırlanan GO süspansiyonundan 70 μL damlatılmış ve 0.0 V ile -1.5 V potansiyel aralığında 50 mV s^{-1} tarama hızında 15 döngü dönüşümlü voltametri uygulanmıştır (SPCE/ERGO) [36]. SPCE/ERGO'ların üzerinde PTH oluşumu için, 50 mM pH 7.5 fosfat tamponunda hazırlanan 1 mM tiyonin çözeltisine -0.5 V ile +1 V potansiyel aralığında 50 mV s^{-1} tarama hızında 20 döngü dönüşümlü voltametri uygulanmıştır [37]. SPCE/ERGO/PTH'lerin üzerinde AuNP'nin hazırlanması için 4 mM HAuCl_4 (50 mM pH 7 fosfat tamponu, 0.1 M KCl) çözeltisine 50 mV s^{-1} tarama hızında -1.3 V ile -0.2 V potansiyel aralığında 10 döngü dönüşümlü voltametri uygulanmıştır [38]. Her bir modifikasyon basamağından sonra, elektrotların yüzeyi ultra saf su ile yıkanmış ve yüksek saflıktaki argon gazı ile kurutulmuştur.

III. BULGULAR VE TARTIŞMA

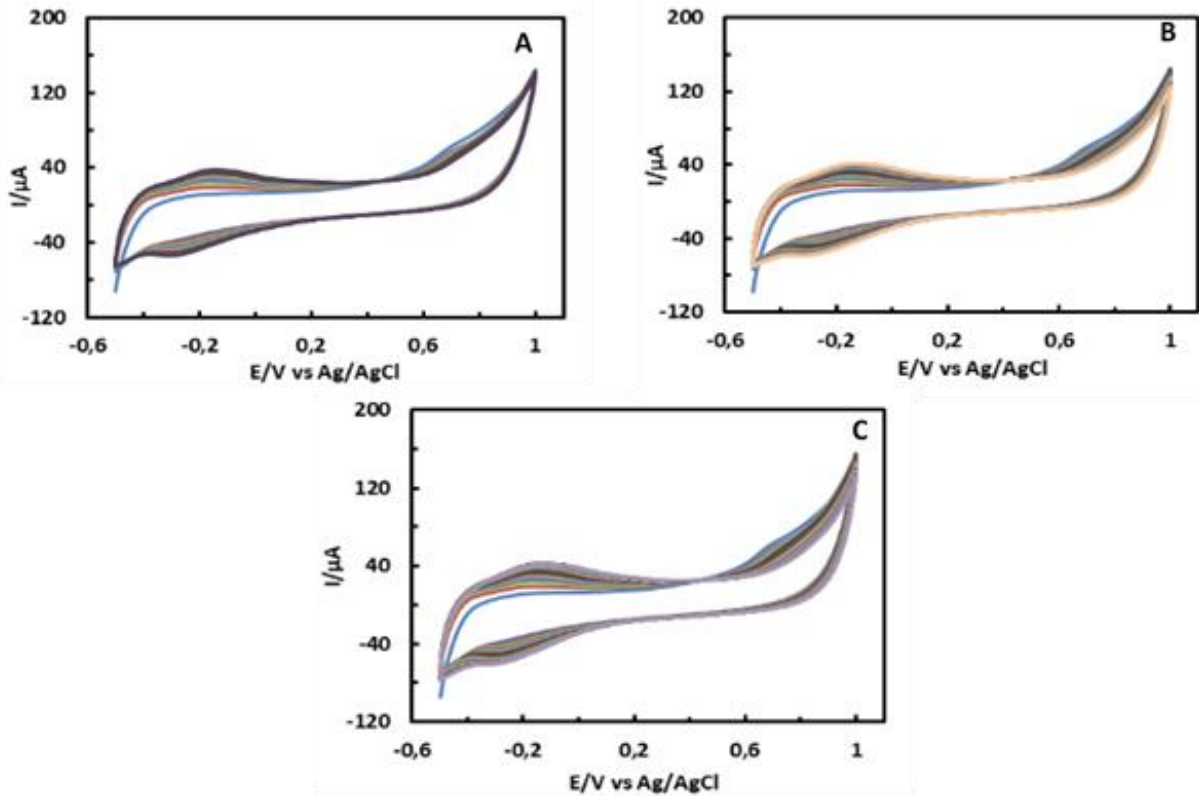
A. SPCE ve SPCE/ERGO Elektrotları Üzerinde Tiyoninin Elektropolimerizasyonu

PTH filminin yalın SPCE ve SPCE/ERGO üzerine biriktirilmesi, 1 mM tiyonin içeren 50 mM PBS (fosfat tamponu, pH = 7.5) çözeltisine -0.5 ile +1.0 V potansiyel aralığında 50 mV s^{-1} tarama hızında 20 döngü dönüşümlü voltametri uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir. PTH filminin oluşumu ve büyümesi için elektrota ön anodizasyon işlemi uygulanmalıdır. Bu işlem uygulandığında elektrot yüzeyinde pozitif bir yük birikir ve tiyonin katyon radikalleri oluşur [39]. Bu çalışmada SPCE'lere +1.8 V potansiyel 300 sn uygulanarak elektrot yüzeyinde pozitif yük biriktirilmiştir. Dönüşümlü voltametri ile elektrot yüzeyinde PTH filmi oluşturmak için gereken pozitif potansiyelin en az +0.8 V olması gerektiği bildirilmiştir. +0.8 V'nin altındaki potansiyelerde, TH'nin löko-TH'ye sadece 2 elektronlu indirgenmesi gözlenir ve tiyonin polimerleşmez [40]. Şekil 1A ve 1B'de yalın SPCE ve SPCE/ERGO üzerinde PTH'nin elektropolimerizasyonu sırasında elde edilen dönüşümlü voltamogramlar verilmiştir. Katyon radikalının oluşumu için gerekli olan TH monomerinin tersinmez oksidasyon piki, her iki elektrotta da yaklaşık +0.70 V'de gözlenmiştir. TH monomerinin tersinmez oksidasyon pikinin çeşitli elektrotlarda daha yüksek potansiyellerde gözlendiği rapor edilmiştir [18, 40] Çalışmamızda SPCE elektrotlarına elektrokimyasal ön işlemin uygulanması, PTH filminin oluşması için gerekli olan TH monomerinin tersinmez oksidasyon pik potansiyelini azaltmıştır. Tiyoninin elektropolimerizasyonu sırasında her iki elektrotta da PTH'nin redoks çifti (-0.15 V'da anodik pik potansiyeli, Epa, -0.30 V'da katodik pik potansiyeli, Epc) gözlenmiştir. Döngü

sayısı arttıkça anodik ve katodik pik akımları da artmış ve polimer filmi büyümüştür. Elde edilen sonuçlara göre elektrot yüzeyinde PTH filmi oluşturulmuştur [22, 41]. Politiyoninin pik akımlarındaki bu artış yalın SPCE'ye göre SPCE/ERGO'da daha fazladır. Tiyoninin elektropolimerizasyonu için SPCE/ERGO elektrotunun daha uygun olduğu sonucuna varılabilir. Bu durum, indirgenmiş grafen oksidin mükemmel elektronik özelliklerine ve elektrotun elektroaktif yüzey alanını artırmasına bağlanabilir. Bu sonuçlar, çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT) ile modifiyeli elektrotlar üzerinde PTH'nin hazırlanması ile benzerdir [42-43].

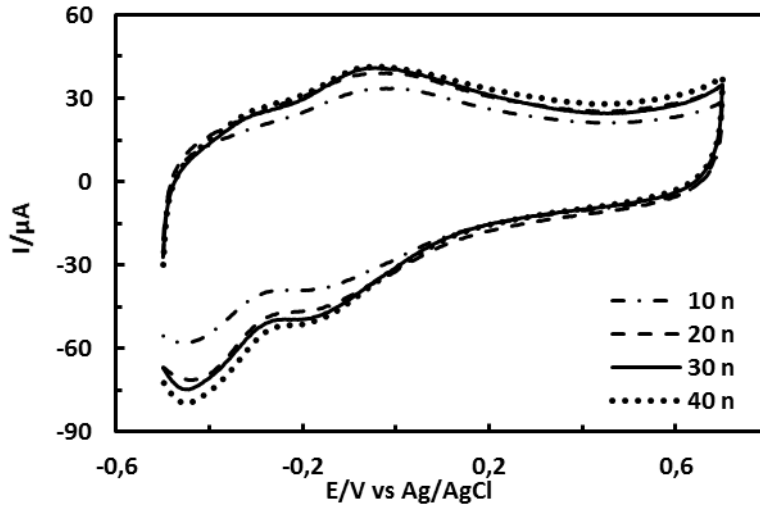


Şekil 1. 1 mM TH'nin SPCE ve SPCE/ERGO üzerindeki elektropolimerizasyonu sırasında elde edilen dönüşümlü voltamogramlar (potansiyel aralığı: -0.5 V ve +1.0 V; tarama hızı: 50 mV s⁻¹, 20 döngü, 50 mM pH 7.5 PBS)



Şekil 2. 1 mM TH'nin SPCE/ERGO üzerindeki elektropolimerizasyonu sırasında elde edilen dönüşümlü voltamogramlar A: 10 döngü; B: 30 döngü; C: 40 döngü (potansiyel aralığı: -0.5 V ve +1.0 V; tarama hızı: 50 mV s⁻¹, 50 mM pH 7.5 PBS)

TH'nin dönüşümlü voltametri tekniği ile polimerizasyonunda, döngü sayısının optimizasyonu çok önemlidir. Döngü sayısı az olduğunda, polimerin elektrot yüzeyindeki film kalınlığı çok ince olur ve beklenen etki gözlenemez. Fazla sayıda döngü uygulandığında ise elektrot yüzeyinde kalın bir film oluşur ve film boyunca difüzyon azalır. Bu durumda sensör ve biyosensörlerin hassasiyeti azalır [34, 44-45]. PTH filminin oluşumundaki döngü sayısını optimize etmek için, farklı döngü sayılarında (10, 20, 30 ve 40) SPCE/ERGO üzerinde TH'nin elektropolimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elektropolimerizasyon sırasında elde edilen dönüşümlü voltamogramlar 20 döngü için Şekil 1B'de, 10, 30 ve 40 döngü için ise sırasıyla Şekil 2A, 2B ve 2C'de verilmiştir. Anodik ve katodik pik akımlarının döngü sayısının artışı ile arttığı, polimerin her döngüde dallanıp büyüdüğü ve elektrot yüzeyine kaplandığı voltamogramlardan anlaşılmaktadır. Şekil 3'te farklı döngü sayılarında hazırlanmış SPCE/ERGO/PTH elektrotlarının fosfat tamponu çözeltisinde elde edilen dönüşümlü voltamogramları verilmiştir. Döngü sayısı 10'dan 20'ye arttıkça anodik ve katodik pik akımları artarken, 20'den 40'a arttıkça pik akımlarında fazla bir değişimin olmadığı gözlenmiştir. Elektrot yüzeyindeki polimerin film kalınlığının döngü sayısı artışı ile giderek artması, elektronların elektrot yüzeyine difüzyonunu azaltmıştır.

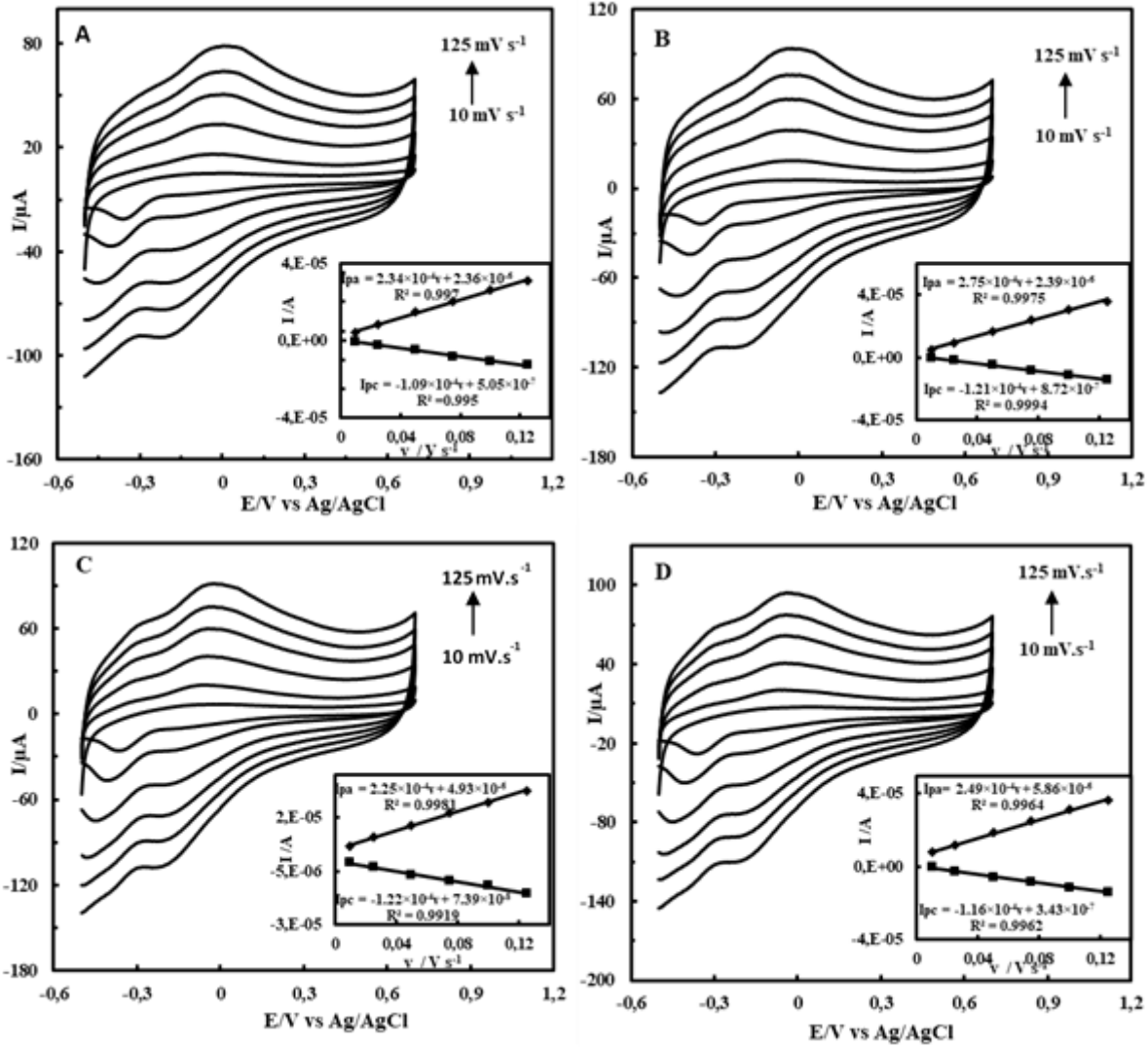


Şekil 3. Farklı döngü sayılarında hazırlanan SPCE/ERGO/PTH elektrotlarının tampon çözeltide -0.5 V ve +0.7 V potansiyel aralığında elde edilen dönüşümlü voltamogramları (döngü sayıları: 10, 20, 30, 40; tarama hızı: 50 mV s⁻¹; 50 mM pH 7.0 PBS, 0,1 M KCl)

PTH'nin elektroaktif bölgelerinin ortalama yüzey konsantrasyonlarını hesaplamak için, farklı döngü sayılarında hazırlanan SPCE/ERGO/PTH elektrotlarının 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu çözeltisinde farklı tarama hızlarında (10, 25, 50, 75, 100 ve 125 mV s⁻¹) dönüşümlü voltamogramları alınmıştır. 10, 20, 30 ve 40 döngü sayılarında hazırlanan SPCE/ERGO/PTH elektrotları için elde edilen voltamogramlar sırasıyla Şekil 4A, 4B, 4C ve 4D'de verilmiştir. Anodik ve katodik pik akımlarının, tarama hızı ile doğrusal olarak arttığı (Şekil 4, iç grafikler) ve elektrokimyasal kinetiğin yüzey kontrollü proses olduğu görülmektedir. Yüzey kontrollü elektrokimyasal proses için SPCE/ERGO elektrotlarının yüzeyindeki PTH'nin elektroaktif bölgelerinin ortalama yüzey konsantrasyonu (Γ), aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır [46]:

$$I_p = n^2 F^2 \nu A \Gamma / 4 R T \quad (1)$$

Burada i_p pik akımını, A elektroaktif yüzey alanını (0.205 cm², [14]), n transfer edilen elektronların sayısını, ν potansiyel tarama hızını (V s⁻¹), T sıcaklığı (293.15 K), R gaz sabitini (8,314 J K⁻¹ mol⁻¹) ve F ise Faraday sabitini (96485 C mol⁻¹) ifade eder. 10, 20, 30 ve 40 döngü sayılarında PTH modifiyeli SPCE/ERGO'lar için Γ değerleri sırasıyla 3.85×10⁻¹⁰, 4.53×10⁻¹⁰, 4.11×10⁻¹⁰ ve 3.71×10⁻¹⁰ mol cm⁻² olarak hesaplanmıştır. En yüksek yüzey konsantrasyonu 20 döngü ile hazırlanmış SPCE/ERGO/PTH elektrotunda elde edildiği için optimum döngü sayısı 20 olarak belirlenmiştir.

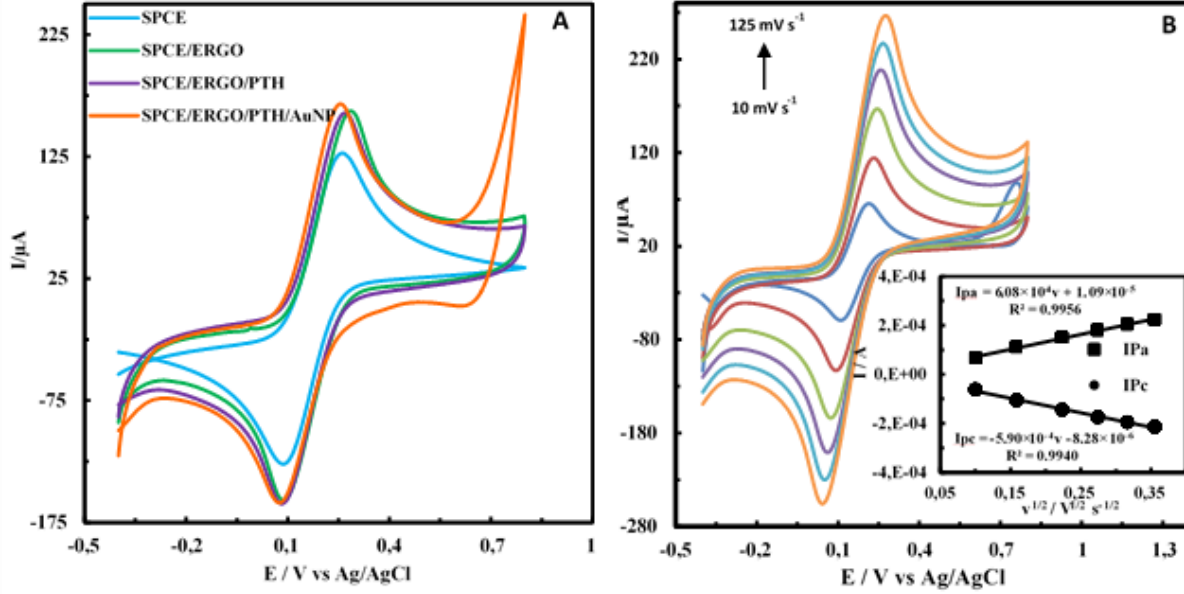


Şekil 4. Farklı döngü sayılarında hazırlanan SPCE/ERGO/PTH elektrotlarının tampon çözeltide farklı tarama hızlarında elde edilen dönüşümlü voltamogramları A: 10 döngü; B: 20 döngü; C: 30 döngü; C: 40 döngü (potansiyel aralığı: -0.5 V ve +0.7 V; tarama hızları: 10, 25, 50, 75, 100 ve 125 mV s⁻¹; 50 mM pH 7.0 PBS, 0,1 M KCl). İç grafikler: dönüşümlü voltamogramlardan elde edilen pik akımları-tarama hızı grafikleri

B. SPCE/ERGO/PTH/AuNP Elektrotunun Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Modifiye edilmiş elektrotların formülasyonunda yer alan ERGO, PTH ve AuNP'nin etkisini incelemek için SPCE, SPCE/ERGO, SPCE/ERGO/PTH ve SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotlarının 5 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} (1 M KCl) çözeltisinde dönüşümlü voltamogramları alınmış ve elde edilen voltamogramlar Şekil 5A'da verilmiştir. Voltamogramlardan elde edilen anodik pik akımı (I_{pa}), katodik pik akımı (I_{pc}), anodik pik potansiyeli (E_{pa}) ve katodik pik potansiyeli (E_{pc}) değerleri ise Tablo 1'de verilmiştir. SPCE üzerine ERGO'nun modifikasyonu ile yalın SPCE elektrotuna göre elektronik iletkenliğin artışıyla birlikte I_{pa} ve I_{pc} değerlerinin arttığı da görülmektedir. ERGO, elektronik iletkenliği artırıcı yönde etki etmiştir. SPCE/ERGO elektrotu yüzeyinde PTH filminin oluşturulmasıyla pik akımlarında gözlenen azalış, PTH'nin elektrot yüzeyine kaplandığını ve polimerin film kalınlığına bağlı olarak difüzyonu azaltıcı yönde etki ettiğini göstermektedir. PTH'nin elektrot formülasyonunda yer almasıyla pik potansiyelleri negatif yöne kaymış ve PTH elektrokatalitik etki göstermiştir. SPCE/ERGO/PTH elektrotu üzerinde AuNP'lerin elektrodepozisyonu ile hazırlanan SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotunda anodik pik akımı artmış, pik potansiyeli ise negatif yöne kaymıştır. Pik potansiyelindeki bu kayma AuNP'nin elektrokatalitik etki gösterdiğini belirtmektedir. ERGO, PTH ve AuNP materyallerinin birlikte elektrot formülasyonunda yer alması sinerjik bir etki göstererek elektronik iletkenliği artırmış, aynı zamanda elektrokatalitik etki de göstermiştir [15, 35, 44]. Şekil 5B'de SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotunun 5 mM

[Fe(CN)₆]^{3-/4-} (1 M KCl) çözeltisinde farklı tarama hızlarında (10, 25, 50, 75, 100 ve 125 mV s⁻¹) elde edilen dönüşümlü voltamogramları yer almaktadır. Tarama hızı arttıkça, I_{pa} ve I_{pc} değerleri de doğrusal olarak artmıştır (Şekil 5B, iç grafikler). Bu durum elektrokimyasal prosesin difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir.



Şekil 5 (A) 5 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} (1 M KCl) çözeltisinde SPCE, SPCE/ERGO, SPCE/ERGO/PTH ve SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotlarının (B) SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotunun farklı tarama hızlarında elde edilen dönüşümlü voltamogramları (tarama hızları: 10, 25, 50, 75, 100 ve 125 mV s⁻¹). İç grafikler: dönüşümlü voltamogramlardan elde edilen pik akımları-tarama hızı grafikleri

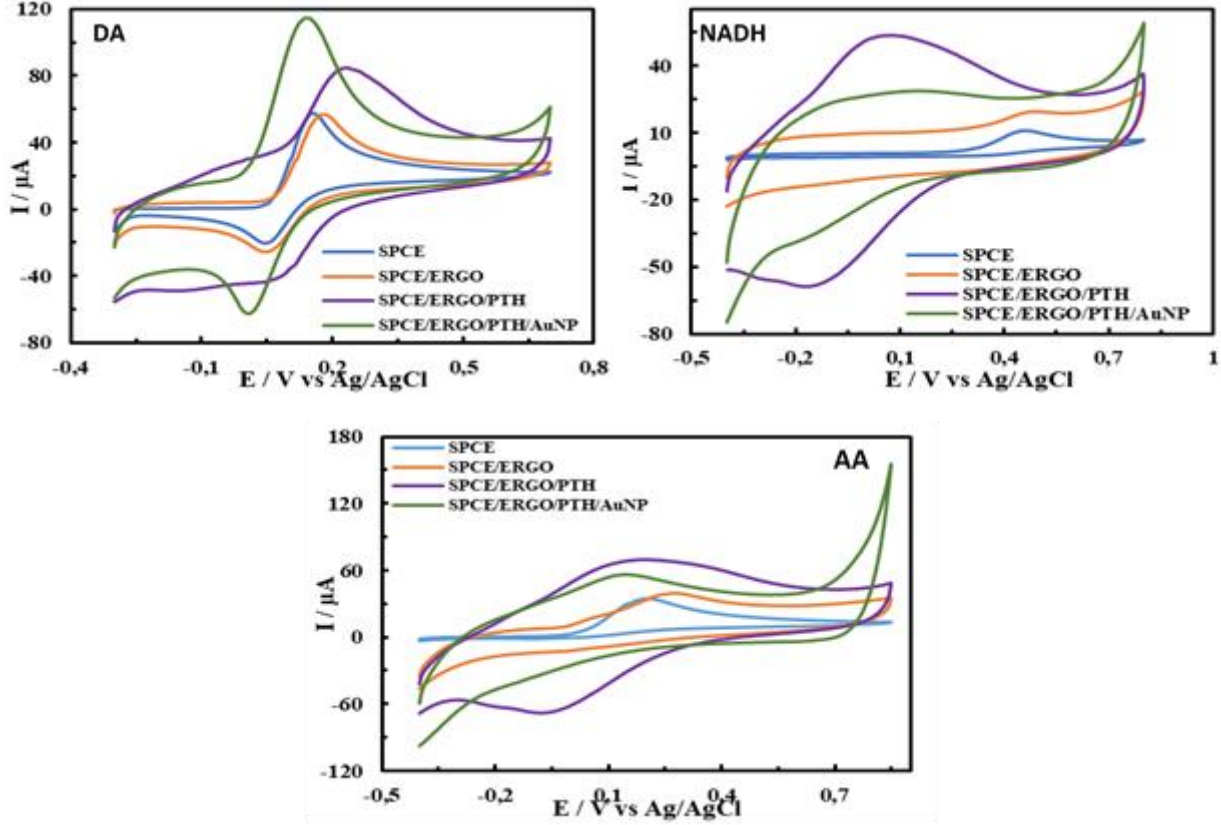
Tablo 1. SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotunun hazırlanma basamaklarında dönüşümlü voltamogramlardan elde edilen E_p ve I_p değerleri

	E _{pa} (V)	I _{pa} (µA)	E _{pc} (V)	I _{pc} (µA)
SPCE	0.262	133.3	0.086	-127.9
SPCE/ERGO	0.284	144.7	0.084	-142.9
SPCE/ERGO/PTH	0.266	142.5	0.082	-140.1
SPCE/ERGO/PTH/AuNP	0.252	145.6	0.074	-125.9

C. SPCE/ERGO/PTH/AuNP Elektrotlarında DA, NADH ve AA'nın Elektroyükseltgenmesi

Çalışmanın bu kısmında DA, NADH ve AA'nın SPCE, SPCE/ERGO, SPCE/ERGO/PTH ve SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotları üzerindeki elektrokimyasal davranışları incelenmiştir. Bu amaçla 1 mM DA, NADH ve AA çözeltilerine dönüşümlü voltametri uygulanmıştır. Elde edilen voltamogramlar Şekil 6'da, voltamogramlardan elde edilen I_p ve E_p değerleri ise Tablo 2'de verilmiştir. Yalnız SPCE elektrotunda DA'nın E_{pa} değeri +0.158 V iken SPCE/ERGO elektrotunda bu değer artmıştır (+0.180 V). I_{pa} değeri ise ERGO'nun modifikasyonu ile azalmıştır. SPCE/ERGO/PTH elektrotunda E_{pa} değeri (+0.234 V) artarken, I_{pa} değeri de SPCE/ERGO'da gözlenen I_{pa} değerine göre artmıştır. SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotunda ise E_{pa} (+0.144 V) azalmış, I_{pa} değeri 88.91 µA'ye artmıştır (yaklaşık 2 kat). DA'nın redoks pikleri SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotunda daha belirgindir. Bu sonuçlara göre SPCE/ERGO ve SPCE/ERGO/PTH elektrotları, DA'nın elektroyükseltgenmesinde fazla etki göstermezken, SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotu DA'ya karşı elektrokatalitik etki göstermiştir. GCE/AuNP/PTH elektrotunda DA'nın elektroyükseltgenmesinin incelendiği bir çalışmada PTH ve AuNP'nin sinerjik bir etki göstererek elektroaktif yüzey alanını ve elektron transferini artırdığı bildirilmiştir [47]. Yalnız SPCE'ye göre SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotunda E_{pa} değeri daha düşüktür. Bu etki, elektrot formülasyonunda yer alan SPCE, ERGO ve AuNP'nin sinerjik etkisi ve PTH'nin medyatör olarak görev yapması nedeniyledir. Manyetik kitosan mikroküreler (MCMS) ve PTH ile modifiye edilmiş camısı karbon elektrotlarda (GCE) DA'nın elektroyükseltgenmesinin incelendiği bir çalışmada PTH'nin DA'nın elektroyükseltgenmesinde medyatör olarak rol oynadığı rapor edilmiştir [48]. Tabaka tabaka birleştirilmiş çok

katmanlı RGO ve AuNP ile modifiye edilen GCE'lerde DA'nın elektroyükseltgenmesinin incelendiği başka bir çalışmada ise AuNP ve ERGO'nun birlikte sinerjik etki yaptığı bildirilmiştir [3].



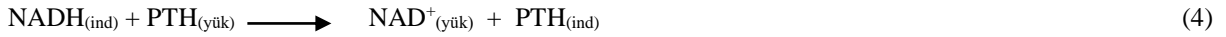
Şekil 6. SPCE, SPCE/ERGO, SPCE/ERGO/PTH ve SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotlarının 1 mM DA, NADH ve AA çözeltilerinde elde edilen dönüşümlü voltamogramları (50 mM pH 7.0 PBS, 0.1 M KCl; tarama hızı: 100 mV s⁻¹)

NADH'nin elektroyükseltgenmesi incelendiğinde, yalın SPCE elektrotunda NADH'nin Epa değeri +0.460 V iken, SPCE/ERGO elektrotunda bu değer +0.466 V'dur. İpa değeri ise SPCE/ERGO elektrotunda azalmıştır. PTH'nin ERGO ile birlikte elektrot formülasyonunda yer almasıyla NADH'nin anodik pik potansiyeli +0.058 V'a azalırken, anodik pik akımı 31.02 µA'e artmıştır. Epa değerindeki 0.408 V'luk azalış ve İpa değerindeki yaklaşık 10 katlık artış, PTH'nin NADH'nin elektroyükseltgenmesinde elektrokatalitik etki gösterdiğini belirtmektedir. NADH'nin elektroyükseltgenmesinde PTH medyatör olarak davranmıştır [49]. ERGO ve PTH ile modifiye edilen GCE'lerde NADH'nin elektroyükseltgenmesinin incelendiği bir çalışmada, PTH ve ERGO'nun NADH'nin elektroyükseltgenmesine sinerjik katalitik bir etki gösterdiği bildirilmiştir [50]. SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotunda NADH'nin Epa değeri +0.122 V'a artmış, İpa değeri de azalmıştır. AuNP, PTH'nin NADH'ye karşı olan medyatör etkisini azaltıcı yönde etki göstermiş olmasına karşın, yalın SPCE'ye göre SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotunda Epa değeri +0.338 V azalmıştır. SPCE/ERGO, NADH'nin elektroyükseltgenmesinde elektrokatalitik etki göstermezken, SPCE/ERGO/PTH ve SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotları NADH'ye karşı elektrokatalitik etki göstermiştir. Yalın SPCE'lerde AA'nın anodik pik potansiyeli +0.268 V'da gözlenirken, SPCE/ERGO'da Epa +0.278 V'da gözlenmiştir ve İpa değeri de azalmıştır. SPCE/ERGO/PTH elektrotunda AA'nın anodik pik potansiyeli +0.188 V'a azalırken, İpa 35.18 µA'e artmıştır (yaklaşık 1.5 kat). Epa'daki azalış ve İpa'daki artış, PTH'nin AA'nın elektroyükseltgenmesinde elektrokatalitik etki yaptığının ve medyatör olarak davrandığının bir göstergesidir. AA'nın SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotundaki Epa değeri +0.122 V'a artarken, İpa değeri biraz azalmıştır. Yalın SPCE'ye göre SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotunda Epa değeri +0.146 V azalmıştır.

Tablo 2. 1 mM DA, NADH ve AA'nın çeşitli elektrot formülasyonlarında dönüşümlü voltamogramlarından elde edilen Ep ve Ip değerleri

Analit	Elektrot formülasyonu	Epa (V)	Ipa (µA)	Epc (V)	Ipc (µA)
DA	SPCE	0.158	51.27	0.046	-27.15
	SPCE/ERGO	0.180	46.7	0.046	-27.25
	SPCE/ERGO/PTH	0.234	50.53	0.068	-25.13
	SPCE/ERGO/PTH/AuNP	0.144	88.91	0.008	-47.77
NADH	SPCE	0.460	7.17	-	-
	SPCE/ERGO	0.466	3.46	-	-
	SPCE/ERGO/PTH	0.058	31.02	-	-
	SPCE/ERGO/PTH/AuNP	0.122	6.68	-	-
AA	SPCE	0.268	29.05	-	-
	SPCE/ERGO	0.278	21.77	-	-
	SPCE/ERGO/PTH	0.188	35.18	-	-
	SPCE/ERGO/PTH/AuNP	0.122	32.14	-	-

DA, NADH ve AA'nın elektroyükseltgenmesine ERGO, PTH ve AuNP'nin etkilerini şu şekilde özetleyebiliriz: ERGO, her üç analit için de elektrokatalitik etki göstermemiştir. PTH'nin ERGO ile birlikte elektrot formülasyonunda yer almasıyla DA, NADH ve AA'nın elektroyükseltgenmesinde elektrokatalitik etki göstermiş ve PTH medyatör olarak davranmıştır. AuNP'nin elektrot formülasyonundaki varlığı NADH'nin elektroyükseltgenmesinde medyatör olarak davranan PTH'nin etkisini azaltırken, DA ve AA'da elektrokatalitik etki göstermiştir. DA, NADH ve AA varlığında anodik pik akımlarının artması, DA, NADH ve AA'nın çözeltiden SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotlarının yüzeyine doğru difüzlenerak yükseltgendiğini ve buna karşın yüzeydeki PTH'nin indirgendüğünü gösterir. Bu elektrokimyasal işlem zinciri şöyle formüle edilebilir:



SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotlarında DA, NADH ve AA'nın tüm yükseltgenme reaksiyonları aşağıda gösterilmiştir.



Tablo 3'de son yıllarda ERGO, PTH ve/veya AuNP ile modifiye edilen elektrotlarda elde edilen DA, NADH ve AA'nın Epa değerleri verilmiştir. Çalışmamızda elde edilen Epa değerlerinin literatürde elde edilen Epa değerlerinden daha düşük potansiyelde olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar ERGO, PTH ve AuNP'nin sinerjik bir etki göstererek DA, NADH ve AA'nın elektroyükseltgenmesinde elektrokatalitik bir etki yaptığını göstermektedir.

Tablo 3. Son yıllarda ERGO, PTH ve/veya AuNP ile modifiye edilen elektrotlarda elde edilen DA, NADH ve AA'nın Epa değerleri

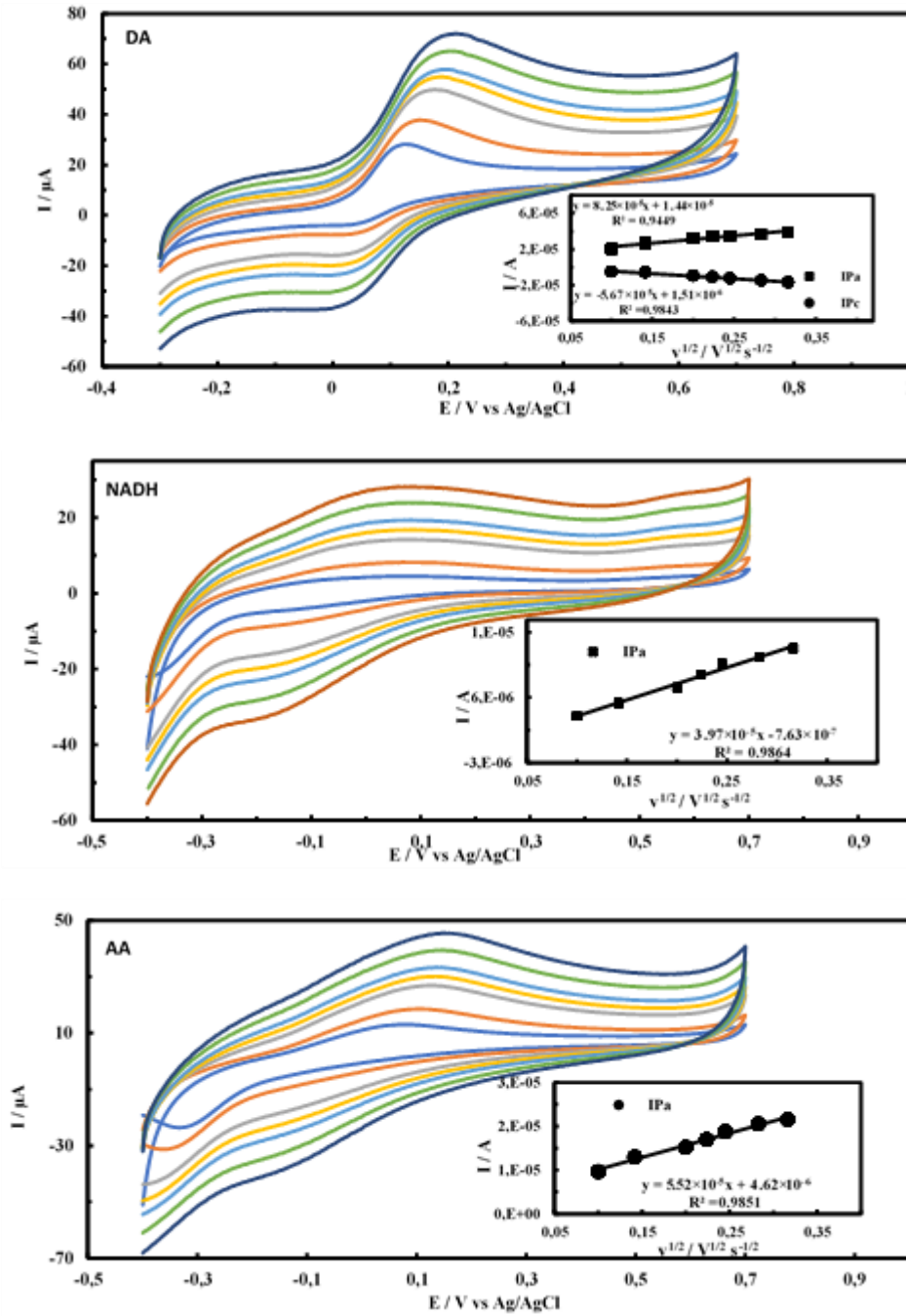
Analit	Elektrot formülasyonu	Epa (V)	Kaynak
DA	GCE/FA/ERGO	0.312	[1]
	GCE/{AuNPs/RGO} ₂₀	0.171	[3]
	GCE/PTH/AuNP	0.450	[47]
	Au/GR-AuAg	0.200	[51]
	SPCE/ERGO/PTH/AuNP	0.144	Bu çalışma
NADH	GCE/ERGO/PTH	0.37	[50]
	GCE/Chitosan/RGO/AuNP	0.36	[52]
	GCE/RGO/AuNP	0.52	[53]
	SPE/PAH/ERGO/AuNP	0.51	[54]
	GCE/CRGO	0.40	[55]
	SPCE/ERGO/PTH/AuNP	0.122	Bu çalışma
AA	GCE/RGO	0.20	[16]
	PIGE/Fc-TH	0.325	[56]
	GCE/AuNP/ERGO/Chitosan	0.27	[57]
	SPCE/ERGO/PTH/AuNP	0.122	Bu çalışma

GCE: camsi karbon elektrot, AuNP: altın nanopartikül, RGO: indirgenmiş grafen oksit, Au: altın elektrot, GR: grafen, AuAg: altın-gümüş kompozit, PTH: politiyonin, SPCE: yüzey baskılı karbon elektrot, ERGO: elektrokimyasal olarak indirgenmiş grafen oksit, PAH: poliiallaminhidroklörür, CRGO: kimyasal olarak indirgenmiş grafen oksit, PIGE: parafin mumu emdirilmiş grafit elektrot, Fc-TH: ferrosen-tiyonin, FA: ferulik asit

Şekil 7'de 1 mM DA, NADH ve AA çözeltilerinin (50 mM pH 7.0 fosfat tamponu, 0.1 M KCl) SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotları üzerinde farklı tarama hızlarında (10, 20, 40, 50, 60, 80 ve 100 mV s⁻¹) elde edilen dönüşümlü voltamogramları verilmiştir. Tarama hızı arttıkça DA'nın yükseltgenme ve indirgenme pik akımları, NADH ve AA'nın ise yükseltgenme pik akımları artmıştır. Voltamogramlardan elde edilen pik akımlarına karşı çizilen tarama hızının karekökü grafikleri (Şekil 7, iç grafikler) doğrusaldır. Bu sonuçlara göre DA, NADH ve AA'nın SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotları üzerindeki elektroyükseltgenmeleri difüzyon kontrollü prostestir [1, 3, 14-15, 49, 53, 57-58]. Difüzyon kontrollü elektrokimyasal prosesler için Randles-Sevcik eşitliği [59] kullanılarak analitlerin difüzyon katsayısı hesaplanabilir. Randles-Sevcik eşitliği kullanılarak 1 mM DA, 1 mM NADH ve 1 mM AA'nın difüzyon katsayıları sırasıyla 3.37×10⁻⁸, 7.79×10⁻⁹ ve 1.51×10⁻⁸ olarak hesaplanmıştır. SPCE/ERGO/PTH/AuNP'lerin yüzeyi ve çözelti arasında meydana gelen DA, NADH ve AA'nın elektroyükseltgenmesi için elektron-transfer katsayısı (α) aşağıdaki eşitlikten bulunabilir [60]:

$$E_p = (RT/2\alpha F) \ln v + \text{sabit} \quad (9)$$

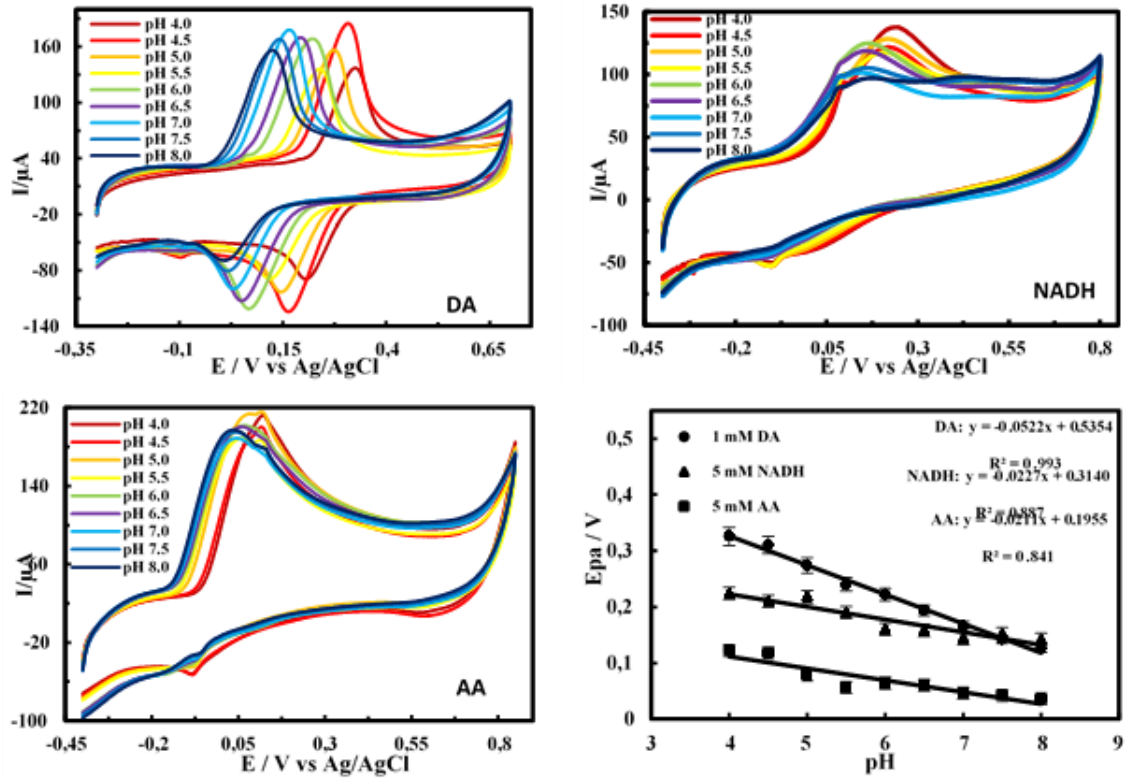
Burada E_p pik potansiyelini, v potansiyel tarama hızını ifade eder. DA, NADH ve AA için anodik pik potansiyelleri tüm tarama hızı aralığında ln v'ye karşı doğrusal olarak değişmektedir. Bu değişim için doğrusal regresyon denklemleri DA, NADH ve AA için sırasıyla E_{pa} = 0.0386 ln v + 0.3035, r = 0.9991; E_{pa} = 0.018 ln v + 0.104, r = 0.9884; E_{pa} = 0.0338 ln v + 0.2207, r = 0.9954 şeklindedir. Eşitlik 9 kullanılarak 1 mM DA, 1 mM NADH ve 1 mM AA için α değerleri hesaplanmış ve bu değerler sırasıyla 0.327, 0.701, 0.373 olarak bulunmuştur.



Şekil 7. SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotlarının 1 mM DA, NADH ve AA çözeltilerinde farklı tarama hızlarında elde edilen dönüşümlü voltamogramları (50 mM pH 7.0 PBS, 0.1 M KCl; tarama hızları: 10, 20, 40, 50, 60, 80 ve 100 mV s⁻¹)

DA, NADH ve AA'nın elektroyükseltgenmelerine pH'nın etkisini incelemek için 50 mM derişimde farklı pH'larda (4-8 aralığında) asetat ve fosfat tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir farklı pH'ya sahip tampon çözeltiler kullanılarak 1 mM sabit derişimde DA, NADH ve AA çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilere SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotları kullanılarak 100 mVs⁻¹ tarama hızında dönüşümlü voltametri uygulanmıştır. DA, NADH ve AA için farklı pH'larda elde edilen dönüşümlü voltamogramlar ve anodik pik potansiyellerine karşı pH grafikleri Şekil 8'de verilmiştir. Her üç analit için de Epa değerlerinin pH artışı ile azaldığı hem voltamogramlardan hem de grafiklerden anlaşılmaktadır. Epa değerlerinin kayması, elektroyükseltgenmenin pH'ya bağlı olması nedeniyle [1, 16, 61]. Şekil 8'de verilen Epa-pH grafiklerinden elde edilen doğruların eğimi DA, NADH ve AA için sırasıyla -52.2 mV/pH, -22.7 mV/pH ve -21.1 mV/pH'dır.

DA için elde edilen -52.2 mV/pH değeri Nerst eşitliği için verilen teorik değere yakındır (-59.2 mV/pH, 25 °C'de). Buna göre, SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotunda DA'nın elektroyükseltgenme reaksiyonu protona bağlıdır ve transfer edilen elektron sayısı proton sayısına eşittir [1]. DA'nın elektroyükseltgenmesi 2 elektronlu-2 protonlu prosesi içerir [3]. NADH için elde edilen -22.7 mV/pH değeri ise -59.2 mV/pH teorik değerinin yaklaşık yarısına eşittir. NADH'nin SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotunda elektroyükseltgenmesi 2 elektronlu-1 protonlu prosesi içerir [62]. AA bir diasit (H_2A) olduğu ve 2 basamakta ayrıştığı için ($pK_{a1}=4.1$, $pK_{a2}=11.8$), elektroyükseltgenmesi pH'ya bağlıdır [16, 61]. AA'nın elektrooksidasyonunun 2 elektronlu-2 protonlu prosesi olduğu bilinmektedir [63, 64].



Şekil 8. SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotunun 1 mM DA, 5 mM NADH ve 5 mM AA içeren farklı pH'lardaki tampon çözeltilerinde (0.1 M KCl) elde edilen dönüşümlü voltamogramları (tarama hızı: 100 mV s⁻¹) ve dönüşümlü voltamogramlardan elde edilen anodik pik potansiyeli-pH grafikleri

IV. SONUÇLAR

Bu çalışmada tek kullanımlık yüzey baskılı karbon elektrotlar; ERGO, PTH ve AuNP ile başarılı bir şekilde modifiye edilmiş ve elektrokimyasal karakterizasyonları yapılmıştır. SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotları üzerinde DA, NADH ve AA'nın elektroyükseltgenmelerinde PTH'nin üç analit için de medyatör olarak görev yaptığı belirlenmiştir. DA, NADH ve AA'nın elektroyükseltgenmelerinde ERGO, PTH ve AuNP'nin birlikte sinerjik elektrokatalitik etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. DA, NADH ve AA'nın difüzyon katsayıları (D) sırasıyla 3.37×10^{-8} , 7.79×10^{-9} ve 1.51×10^{-8} olarak, elektron transfer katsayıları (α) ise sırasıyla 0.327, 0.701 ve 0.373 olarak hesaplanmıştır. DA ve AA'nın elektroyükseltgenmesinde gerçekleşen elektrokimyasal prosenin 2 elektronlu-2 protonlu, NADH'nin ise 2 elektronlu-1 protonlu olduğu gözlenmiştir. DA, NADH ve AA'nın elektroyükseltgenmesinin pH'ya bağlı olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada hazırlanan SPCE/ERGO/PTH/AuNP elektrotları ile DA, NADH ve AA'nın elektrokimyasal tayini için tek kullanımlık, düşük maliyetli ve pratik sensör geliştirilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Han, H. S., Seol, H., Kang, D. H., Ahmed, M. S., You, J. M. & Jeon, S. (2014). Electrochemical oxidation and determination of dopamine in the presence of AA using ferulic acid functionalized electrochemically reduced graphene. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 204, 289-296.
- [2] Liu, A., Honma, I. & Zhou, H. (2007). Simultaneous voltammetric detection of dopamine and uric acid at their physiological level in the presence of ascorbic acid using poly (acrylic acid)-multiwalled carbon-nanotube composite-covered glassy-carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(1), 74-80.
- [3] Liu, S., Yan, J., He, G., Zhong, D., Chen, J., Shi, L., Zhou, X. & Jiang, H. (2012). Layer-by-layer assembled multilayer films of reduced graphene oxide/gold nanoparticles for the electrochemical detection of dopamine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 672, 40-44.
- [4] Liu, A., Honma, I. & Zhou, H. (2005). Amperometric biosensor based on tyrosinase-conjugated polysaccharide hybrid film: Selective determination of nanomolar neurotransmitters metabolite of 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in biological fluid. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(5), 809-816.
- [5] Wightman, R. M., May, L. J. & Michael, A. C. (1988). Detection of dopamine dynamics in the brain. *Analytical Chemistry*, 60(13), 769A-793A.
- [6] Bergel, A., Soupe, J. & Comtat, M. (1989). Enzymatic amplification for spectrophotometric and electrochemical assays of NAD⁺ and NADH. *Analytical Biochemistry*, 179(2), 382-388.
- [7] Rusling, J. F. (Ed.). (2003). *Biomolecular films: design, function, and applications*. CRC Press, New York, 499.
- [8] Omar, F. S., Duraisamy, N., Ramesh, K. & Ramesh, S. (2016). Conducting polymer and its composite materials based electrochemical sensor for Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH). *Biosensors and Bioelectronics*, 79, 763-775.
- [9] Gunes, M. & Dilgin, Y. (2019). Flow injection amperometric determination of NADH at a calmagite-modified pencil graphite electrode. *Monatshefte Fur Chemie*, 150(8), 1425-1432.
- [10] Romay, C. H., Armesto, J., Ramirez, D., Gonzalez, R., Ledon, N. & Garcia, I. (1998). Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoyanin from blue-green algae. *Inflammation Research*, 47(1), 36-41.
- [11] Bhagavan, N. V. (2001). *Medical Biochemistry*. 4th ed. Elsevier, Netherlands, 331-363.
- [12] Eitenmiller, R. R., Landen Jr, W. O. & Ye, L. (2016). *Vitamin analysis for the health and food sciences*. CRC press, New York.
- [13] Basu, T. K. & Dickerson, J. W. T. (1996). Vitamin A. *Vitamin A in human health and disease*. Oxon: CAB International, 148-77.
- [14] Altun, M., Bilgi Kamaç, M., Bilgi, A. & Yılmaz, M. (2020). Dopamine biosensor based on screen-printed electrode modified with reduced graphene oxide, polyneutral red and gold nanoparticle. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 100(4), 451-467.
- [15] Bilgi Kamaç, M., Kıymaz Onat, E. & Yılmaz, M. (2020). A new disposable amperometric NADH sensor based on screen-printed electrode modified with reduced graphene oxide/polyneutral red/gold nanoparticle. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 100(4), 419-431.
- [16] de Faria, L. V., Lisboa, T. P., de Farias, D. M., Araujo, F. M., Machado, M. M., de Sousa, R. A., Matos, M. A. C., Munoz, R. A. A. & Matos, R. C. (2020). Direct analysis of ascorbic acid in food beverage samples by flow injection analysis using reduced graphene oxide sensor. *Food Chemistry*, 126509.
- [17] Ghica, M. E. & Brett, C. M. (2010). The influence of carbon nanotubes and polyazine redox mediators on the performance of amperometric enzyme biosensors. *Microchimica Acta*, 170(3-4), 257-265.
- [18] Barsan, M. M., Ghica, M. E. & Brett, C. M. (2015). Electrochemical sensors and biosensors based on redox polymer/carbon nanotube modified electrodes: a review. *Analytica Chimica acta*, 881, 1-23.
- [19] Pauliukaite, R., Ghica, M. E., Barsan, M. M. & Brett, C. M. (2010). Phenazines and polyphenazines in electrochemical sensors and biosensors. *Analytical Letters*, 43(10-11), 1588-1608.
- [20] Tanaka, K., Ikeda, S., Oyama, N., Tokuda, K. & Ohsaka, T. (1993). Preparation of poly (thionine)-modified electrode and its application to an electrochemical detector for the flow-injection analysis of NADH. *Analytical Sciences*, 9(6), 783-789.
- [21] Mi, Q., Wang, Z. W., Chai, C. Y., Zhang, J., Zhao, B. & Chen, C. Y. (2011). Multilayer structured immunosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-wall carbon nanotubes, polythionine, and gold nanoparticles. *Microchimica Acta*, 173(3-4), 459-467.

- [22] Ghica, M. E. & Brett, C. M. (2014). Poly (brilliant green) and poly (thionine) modified carbon nanotube coated carbon film electrodes for glucose and uric acid biosensors. *Talanta*, 130, 198-206.
- [23] Martínez-García, G., Pérez-Julián, E., Agüí, L., Cabré, N., Joven, J., Yáñez-Sedeño, P. & Pingarrón, J. M. (2017). An electrochemical enzyme biosensor for 3-hydroxybutyrate detection using screen-printed electrodes modified by reduced graphene oxide and thionine. *Biosensors*, 7(4), 50.
- [24] Ye, Y., Xie, J., Ye, Y., Cao, X., Zheng, H., Xu, X. & Zhang, Q. (2018). A label-free electrochemical DNA biosensor based on thionine functionalized reduced graphene oxide. *Carbon*, 129, 730-737.
- [25] Stankovich, S., Dikin, D. A., Dommett, G. H., Kohlhaas, K. M., Zimney, E. J., Stach, E. A., Piner, R. D., Nguyen, S. T. & Ruoff, R. S. (2006). Graphene-based composite materials. *Nature*, 442(7100), 282-286.
- [26] Patil, A. J., Vickery, J. L., Scott, T. B. & Mann, S. (2009). Aqueous stabilization and self-assembly of graphene sheets into layered bio-nanocomposites using DNA. *Advanced Materials*, 21(31), 3159-3164.
- [27] Wang, Y., Lu, J., Tang, L., Chang, H. & Li, J. (2009). Graphene oxide amplified electrogenerated chemiluminescence of quantum dots and its selective sensing for glutathione from thiol-containing compounds. *Analytical Chemistry*, 81(23), 9710-9715.
- [28] Liu, C., Alwarappan, S., Chen, Z., Kong, X. & Li, C. Z. (2010). Membraneless enzymatic biofuel cells based on graphene nanosheets. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(7), 1829-1833.
- [29] Putzbach, W. & Ronkainen, N. J. (2013). Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: A review. *Sensors*, 13(4), 4811-4840.
- [30] Bilgi, M. & Ayranci, E. (2018). Development of amperometric biosensors using screen-printed carbon electrodes modified with conducting polymer and nanomaterials for the analysis of ethanol, methanol and their mixtures. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 823, 588-592.
- [31] Fanjul-Bolado, P., Hernández-Santos, D., Lamas-Ardiansa, P. J., Martín-Pernía, A. & Costa-García, A. (2008). Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes. *Electrochimica Acta*, 53(10), 3635-3642.
- [32] Wang, J., Tian, B., Nascimento, V. B. & Angnes, L. (1998). Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks. *Electrochimica Acta*, 43(23), 3459-3465.
- [33] Lee, S. X., Lim, H. N., Ibrahim, I., Jamil, A., Pandikumar, A. & Huang, N. M. (2017). Horseradish peroxidase-labeled silver/reduced graphene oxide thin film-modified screen-printed electrode for detection of carcinoembryonic antigen. *Biosensors and Bioelectronics*, 89, 673-680.
- [34] Bilgi, M., Sahin, E. M. & Ayranci, E. (2018). Sensor and biosensor application of a new redox mediator: Rosmarinic acid modified screen-printed carbon electrode for electrochemical determination of NADH and ethanol. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 813, 67-74.
- [35] Bilgi Kamac, M., Kiymaz Onat, E. & Yilmaz, M. (2020). A novel non-enzymatic amperometric H₂O₂ sensor based on screen-printed electrode modified with reduced graphene oxide, polyneutralred and gold nanoparticles. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 100(4), 408-418.
- [36] Yu, Z., Sun, S. & Huang, M. (2016). Electrodeposition of gold nanoparticles on electrochemically reduced graphene oxide for high performance supercapacitor electrode materials. *Int. J. Electrochem. Sci*, 11(5), 3643-3650.
- [37] Yang, R., Ruan, C., Dai, W., Deng, J. & Kong, J. (1999). Electropolymerization of thionine in neutral aqueous media and H₂O₂ biosensor based on poly (thionine). *Electrochimica Acta*, 44(10), 1585-1596.
- [38] Karaboğa, M. N. S. & Sezgintürk, M. K. (2019). Cerebrospinal fluid levels of alpha-synuclein measured using a poly-glutamic acid-modified gold nanoparticle-doped disposable neuro-biosensor system. *Analyst*, 144(2), 611-621.
- [39] Yang, R., Ruan, C., Dai, W., Deng, J. & Kong, J. (1999). Electropolymerization of thionine in neutral aqueous media and H₂O₂ biosensor based on poly (thionine). *Electrochimica Acta*, 44(10), 1585-1596.
- [40] Gao, Q., Cui, X., Yang, F., Ma, Y. & Yang, X. (2003). Preparation of poly (thionine) modified screen-printed carbon electrode and its application to determine NADH in flow injection analysis system. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(3), 277-282.
- [41] Feng, H., Wang, H., Zhang, Y., Yan, B., Shen, G. & Yu, R. (2007). A direct electrochemical biosensing platform constructed by incorporating carbon nanotubes and gold nanoparticles onto redox poly (thionine) film. *Analytical Sciences*, 23(2), 235-239.
- [42] Mai, N., Liu, X., Zeng, X., Xing, L., Wei, W. & Luo, S. (2010). Electrocatalytic oxidation of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide at carbon ionic liquid electrode modified with polythionine/multi-walled carbon nanotubes composite. *Microchimica Acta*, 168(3-4), 215-220.

- [43] Deng, C., Chen, J., Nie, Z., Yang, M. & Si, S. (2012). Electrochemical detection of nitrite based on the polythionine/carbon nanotube modified electrode. *Thin Solid Films*, 520(23), 7026-7029.
- [44] Sahin, M. & Ayranci, E. (2015). Electrooxidation of NADH on modified screen-printed electrodes: effects of conducting polymer and nanomaterials. *Electrochimica Acta*, 166, 261-270.
- [45] Qu, F., Yang, M., Chen, J., Shen, G. & Yu, R. (2006). Amperometric Biosensors for Glucose Based on Layer-by-Layer Assembled Functionalized Carbon Nanotube and Poly (Neutral Red) Multilayer Film. *Analytical Letters*, 39(9), 1785-1799.
- [46] Bard, A. J. & Faulkner, L. R. (2001). Fundamentals and applications. *Electrochemical Methods*, 2(482), 580-632.
- [47] Zhao, C., Jiang, Z., Cai, X., Lin, L., Lin, X. & Weng, S. (2015). Ultrasensitive and reliable dopamine sensor based on polythionine/AuNPs composites. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 748, 16-22.
- [48] Lai, G., Liu, Y., Yu, A., Han, D. & Zhang, H. (2013). Simultaneous sensitive determination of dopamine and uric acid in the presence of excess ascorbic acid with a magnetic chitosan microsphere/thionine modified electrode. *Analytical Letters*, 46(10), 1525-1536.
- [49] Liu, Y., Zhang, H. L., Lai, G. S., Yu, A. M., Huang, Y. M. & Han, D. Y. (2010). Amperometric NADH biosensor based on magnetic chitosan microspheres/poly (thionine) modified glassy carbon electrode. *Electroanalysis*, 22(15), 1725-1732.
- [50] Li, Z., Huang, Y., Chen, L., Qin, X., Huang, Z., Zhou, Y., Meng, Y., Li, J., Huang, S., Liu, Y., Wang, W., Xie, Q. & Yao, S. (2013). Amperometric biosensor for NADH and ethanol based on electroreduced graphene oxide–polythionine nanocomposite film. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 181, 280-287.
- [51] Pruneanu, S., Biris, A. R., Pogacean, F., Socaci, C., Coros, M., Rosu, M. C., Watanabe, F. & Biris, A. S. (2015). The influence of uric and ascorbic acid on the electrochemical detection of dopamine using graphene-modified electrodes. *Electrochimica Acta*, 154, 197-204.
- [52] Chang, H., Wu, X., Wu, C., Chen, Y., Jiang, H. & Wang, X. (2011). Catalytic oxidation and determination of β -NADH using self-assembly hybrid of gold nanoparticles and graphene. *Analyst*, 136(13), 2735-2740.
- [53] Govindhan, M., Amiri, M. & Chen, A. (2015). Au nanoparticle/graphene nanocomposite as a platform for the sensitive detection of NADH in human urine. *Biosensors and Bioelectronics*, 66, 474-480.
- [54] Istrate, O. M., Rotariu, L., Marinescu, V. E. & Bala, C. (2016). NADH sensing platform based on electrochemically generated reduced graphene oxide–gold nanoparticles composite stabilized with poly (allylamine hydrochloride). *Sensors and Actuators B: Chemical*, 223, 697-704.
- [55] Immanuel, S. & Sivasubramanian, R. (2020). Electrochemical studies of the oxidation of NADH on chemically reduced graphene oxide nanosheets modified glassy carbon electrode. *Materials Chemistry and Physics*, 123015.
- [56] Devendiran, M., Kumar, K. K. & Narayanan, S. S. (2018). Amperometric Determination of ascorbic acid and riboflavin using ferrocene/thionin bimediator modified electrode. *Int JS Res Sci Technol*, 4, 628-634.
- [57] Szoke, A., Zsebe, Z., Turdean, G. L. & Muresan, L. M. (2019). Composite Electrode Material Based on Electrochemically Reduced Graphene Oxide and Gold Nanoparticles for Electrocatalytic Detection of Ascorbic Acid. *Electrocatalysis*, 10(5), 573-583.
- [58] Chethana, B. K. & Naik, Y. A. (2012). Electrochemical oxidation and determination of ascorbic acid present in natural fruit juices using a methionine modified carbon paste electrode. *Analytical Methods*, 4(11), 3754-3759.
- [59] Brett, C. M. A & Brett, A. Maria Oliveira. (1993). *Electrochemistry: principles, methods, and applications*. Oxford: Oxford University Press.
- [60] Harrison, J. A. & Khan, Z. A. (1970). The oxidation of hydrazine on platinum in acid solution. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 28(1), 131-138.
- [61] Liu, B., Luo, L., Ding, Y., Si, X., Wei, Y., Ouyang, X. & Xu, D. (2014). Differential pulse voltammetric determination of ascorbic acid in the presence of folic acid at electro-deposited NiO/graphene composite film modified electrode. *Electrochimica Acta*, 142, 336-342.
- [62] Mie, Y., Yasutake, Y., Ikegami, M. & Tamura, T. (2019). Anodized gold surface enables mediator-free and low-overpotential electrochemical oxidation of NADH: A facile method for the development of an NAD⁺-dependent enzyme biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 288, 512-518.
- [63] Fernández, L. & Carrero, H. (2005). Electrochemical evaluation of ferrocene carboxylic acids confined on surfactant–clay modified glassy carbon electrodes: oxidation of ascorbic acid and uric acid. *Electrochimica Acta*, 50(5), 1233-1240.

- [64] Habibi, B., Jahanbakhshi, M., & Pournaghi-Azar, M. H. (2011). Differential pulse voltammetric simultaneous determination of acetaminophen and ascorbic acid using single-walled carbon nanotube-modified carbon–ceramic electrode. *Analytical Biochemistry*, *411*(2), 167-175.