




# Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi

Araştırma Makalesi

## İnsan serum albümin nanopartikül/surfaktant polimer temelli sensör ile metil paratyonun enzimsiz elektroanalizi

 Gülçin BOLAT<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Kimya Bölümü, Fen Fakültesi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE

\* Sorumlu yazarın e-posta adresi: gbolat@hacettepe.edu.tr

DOI: 10.29130/dubited.797428

### ÖZET

Bu çalışmada, insan serum albümin nanopartiküller (HSA NP) ve elektrobiriktirilmiş yüzey aktif polisetiltrimetil amonyum bromür p(CTAB) film kaplı grafit elektrotlar (PGE) tehlikeli bir çevresel kirletici olan metil paratyonun (MP) hassas ve seçici tespiti için elektrokimyasal sensör olarak kullanıldı. Elde edilen HSA NP/p(CTAB)/PGE mikroskopik ve elektrokimyasal olarak karakterize edildi. Diferansiyel puls voltmetri (DPV) tekniği ile MP için elde edilen doğrusal çalışma aralığı 0,01-0,1  $\mu$ M ve gözlenebilme sınırı ise 6 nM olarak tespit edildi. MP tespiti için geliştirilen enzim kullanımı gerektirmeyen ve basit hazırlama stratejisine sahip HSA NP/p(CTAB) tabanlı elektrokimyasal sensör, çevre koruma ve gıda güvenliği açısından izleme sürecini de basitleştirme potansiyeline sahiptir.

**Anahtar Kelimeler:** Organofosforlu pestisit, Albümin nanopartikül, Surfaktant polimer, Elektroanaliz, Sensör.

## Human serum albumin nanoparticles/surfactant polymer based sensor for the non-enzymatic electroanalysis of methyl parathion

### ABSTRACT

In this study, human serum albumin nanoparticles (HSA NP) and electrodeposited surfactant polycetyltrimethyl ammonium bromide p(CTAB) film coated graphite electrodes (PGE) were utilized as an electrochemical sensor for the sensitive and selective detection of a hazardous environmental pollutant, methyl parathion (MP). The fabricated HSA NP/p(CTAB)/PGE was characterized microscopically and electrochemically. The linear working range obtained for the MP was determined as 0.01-0.1  $\mu$ M and the detection limit as 6 nM by differential pulse voltammetry (DPV) technique. The HSA NP/p(CTAB) based electrochemical sensor developed for MP detection with a simple preparation strategy and did not require the use of enzymes and has the potential to be applied in environmental protection and food safety monitoring processes.

**Keywords:** Organophosphorus pesticide, Albumin nanoparticles, Surfactant polymer, Electroanalysis, Sensor.

# I. GİRİŞ

Pestisitler, ülkemizde ve dünyada tarımsal ürünleri istila eden çeşitli zararlıları kontrol etmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Metil paratyon (MP), organofosforlu bir pestisittir, düşük fiyat ve yüksek aktivitesi nedeniyle tarımsal üretimde yaygın olarak kullanılmaktadır [1]. Zehirli çevresel etkileri olan kalıcı pestisit türü olarak sınıflandırılmasına rağmen, yoğun ve bilinçsizce kullanımları, çevre ve insan sağlığı açısından ciddi risklere neden olmaktadır. Özellikle, yeraltı suyu ve gıda numunelerinin kirlenmesine yol açan organofosforlu pestisitler (OP'ler), güçlü asetil kolinesteraz (AChE) inhibitörleridir [2]. Organofosfor yapısında bileşiklerin akut toksisite mekanizması, sinir dokusunda asetilkolinesteraz enziminin inhibisyonuna neden olmakla beraber, pestisitlerin plazma proteinlerine yüksek bağlanma afinitesi de mevcuttur. MP, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 'Kategori Ia' (aşırı toksik) olarak sınıflandırılan bir organofosfor insektisit sınıfına dahil edilmiştir [3]. MP'nin, nörosinozlardaki enzimlerin inhibisyonuna, sinir uçlarında asetilkolin birikimine, sinapslarda reseptörlerin aşırı uyarılmasına ve sonuçta sinir sisteminin hasar görmesine neden olduğu belirtilmiştir [4]. Bununla beraber, cilt ile temas, inhalasyon veya yutulmaları, ciddi kolinerjik toksisiteye neden olabilmektedir. Avrupa Birliği'ne (AB) göre, içme suyu ve bitki kaynaklı gıdalarda bulunabilecek tek bir pestisit miktarı ve bunların ilgili bileşiklerinin kabul edilebilir maksimum izin verilen konsantrasyonları sırasıyla,  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  ve  $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  'dir [5]. Bu nedenle, gıdalarda MP kalıntılarının tespiti için doğrudan, hassas, hızlı ve güvenilir yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

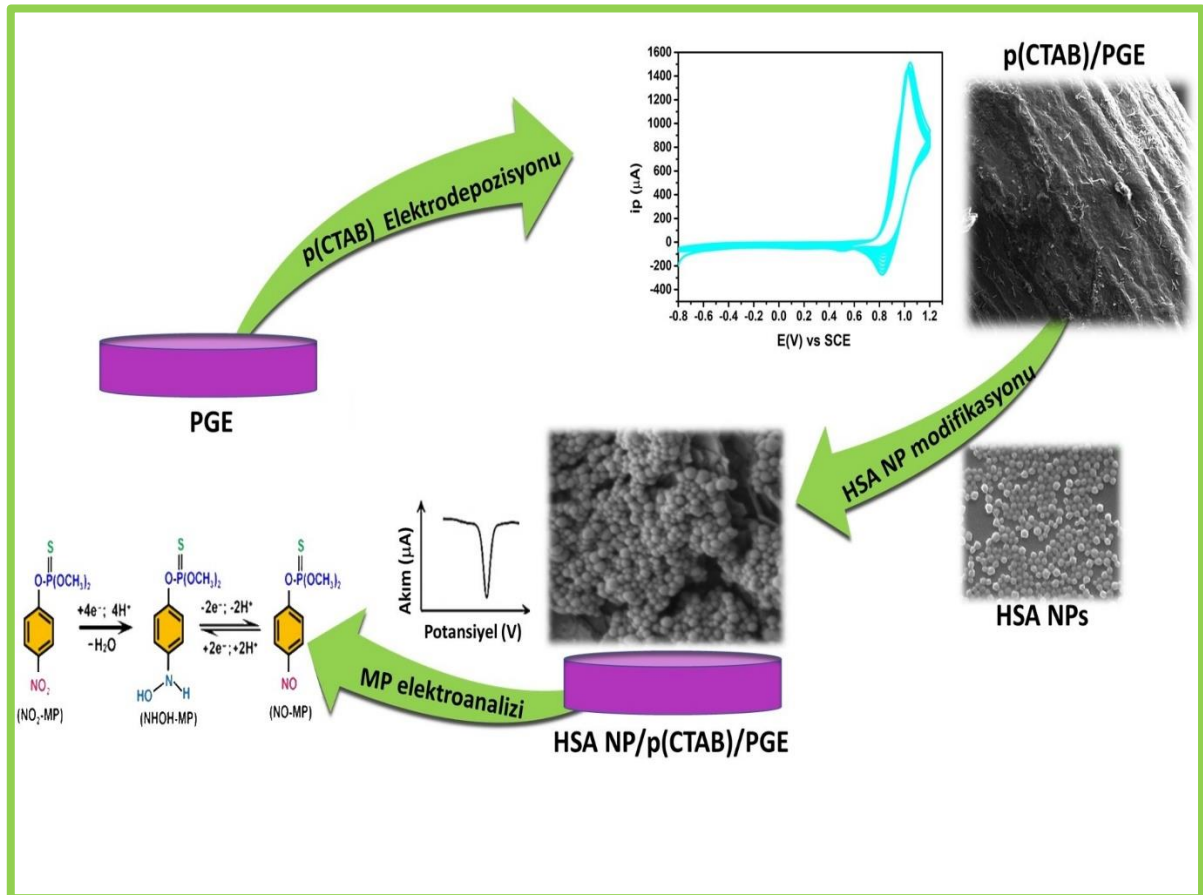
Halihazırda, pestisit tayini için gaz kromatografisi, kütle spektrometresi ve azot-fosfor detektörleri, alev iyonlaşma detektörleri, ultraviyole detektörleri, diyot dizisi detektörü gibi hassas ve spesifik dedektörlere bağlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi gibi çeşitli analitik yöntemler kullanılmaktadır [6–10]. Bu yöntemler yüksek hassasiyet ve doğrulukta analizlere imkan sağlamalarına rağmen, genellikle zaman alıcı karmaşık numune ön işlemleri, yüksek maliyet, eğitimli teknik personel gibi gereksinimlere sahiptir ve yerinde (*in-situ*) analiz için uygun değildir. Elektroanalitik yöntemler hızlı, basit, portatif ve ucuz olmaları nedeniyle MP tespiti için avantajlıdır [11,12]. Literatürde, OP'lerin saptanması için modifiye edilmiş elektrotlara ve AChE'nin enzimatik reaksiyonunun inhibisyonuna dayanan çok sayıda enzim temelli elektrokimyasal biyosensör tasarlanmış ve geliştirilmiştir [13–15]. Bununla birlikte, ortamın enzim gereksinimi büyük ölçüde kritiktir, kullanılan enzimler pahalıdır, ticari olarak temini zor ya da karmaşık saflaştırma aşamaları gerektirir. Sıcaklık, basınç, saklama koşulları ve enzim aktivitesi gibi enzim kullanımı için deneysel koşulların iyi bir şekilde kontrol edilmesi gerekliliği, OP'lerin tespiti için enzim bazlı elektrokimyasal biyosensörlerle çalışmayı zorlaştırır. Bu nedenle, hassas ölçüm ve düşük tespit limitlerine imkan sağlayabilecek özellikte ve OP'leri yüzeylerine adsorplayabilen aktif malzemelerin kullanımıyla enzimatik olmayan elektrokimyasal sensörlerin geliştirilmesi büyük dikkat çekmiştir [16].

Nanomalzemeler, enzimatik olmayan elektrokimyasal sensörleri üretmek için potansiyel adaylardır. Nanoboyutta malzemeler algılama arayüzü olarak kullanıldığında, geniş hacim/yüzey alanları sayesinde analit immobilizasyonunu kolaylaştırabilir. Ayrıca benzersiz fizikokimyasal özellikleri sayesinde yüksek sinyal/gürültü oranı ile pestisitlerin oldukça spesifik ve hassas analizine olanak sağlar [17].

Biyolojik bileşenlere dayanan biyo-nano arayüzlerin keşfi ve geliştirilmesi kimya, malzeme bilimi ve biyoloji alanında pratik öneme sahiptir. Proteinler, biyolojik olarak kolayca bozunabilme ve metabolize olma ve modifiye edilebilmelerini sağlayan çok sayıda fonksiyonel gruba sahip olmaları ve iyi biyouyumlulukları nedeniyle nanopartikül elde edilmesinde önemli bir çıkış maddesidir ve biyomedikal uygulamalar için verimli bir yol sunar [18]. İnsan vücudunda en bol bulunan insan serum albümin (HSA) proteini, ucuz ve kolay ulaşılabilir olması, toksik olmaması, kolay saflaştırılabilirliği, yüzey fonksiyonel grupları üzerinden kolayca modifiye edilebilirliği nedeniyle nanopartikül üretiminde tercih edilen önemli bir adaydır [19–21]. Pestisitlerin proteinlere bağlanması, ekotoksikoloji ve çevresel risk değerlendirilmesi amacıyla pestisit biyosensörlerinin hazırlanmasında kullanılabilir. Biyosensör deneyleri, kimyasalların hedef organizma üzerindeki toksik etkilerinin ve toksisitenin altında yatan moleküler mekanizmaların ölçülerini sağlayabilir. Silva ve grubu, MP gibi organofosforlu yapıda pestisitlerin HSA ve BSA gibi proteinlere yüksek afinite gösterdiğini bildirmiştir [22].

Albümin temelli nanopartikül hazırlama süreci karmaşık değildir. Bir desolvasyon ve çapraz bağlama tekniği ile bir araya getirildiğinde, protein konsantrasyonu, pH, çözücü gibi parametrelerin kontrolü ile iyi tanımlanmış boyut aralığında (50 ila 300 nm) HSA nanopartiküller (HSA NP'ler) elde edilir [23,24]. Literatürde, teşhis ve hedeflemeye yönelik yüzey işlevselleştirilmiş HSA NP'ler kontrollü salım çalışmalarında ilaç taşıyıcı sistemler ve görüntüleme ajanları olarak kullanılmıştır [25–27]. Çok sayıda işlevsel kimyasal kısım içeren biyoyumlu HSA NP'ler, vücuttaki enzimleri ve nörotransmitter reseptörleri (AChE inhibitörü gibi) hedef alan OP'lerin elektrokimyasal tayini için umut verici etkin bir arayüzey olarak kullanılabilir. Ancak literatürde, HSA NP'ler veya kompozitlerinin herhangi bir elektrokimyasal biyosensör uygulamasına rastlanmamıştır. Ayrıca, yüzey aktif maddeler (surfaktant), elektron transferini hızlandırmak ve elektrot yüzey alanını arttırmak için, elektrokimyasal algılama platformlarında kullanılan başka bir tür malzemedir. Bu bağlamda, nanomateryallerle birleştirilmiş yüksek hassasiyet ve seçicilik gibi üstün özelliklere sahip katyonik bir yüzey aktif madde olan setiltrimetil amonyum bromür (CTAB), mükemmel katalitik aktivite, farklı analitlerin tespitine yönelik biyosensörleri geliştirmek için son zamanlarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır [28,29].

Bu çalışmada HSA NP'ler desolvasyon tekniği ile sentezlendi. HSA NP'lerin polisetiltrimetil amonyum bromür p(CTAB) elektrokaplanmış grafit elektrotlar (PGE) üzerine adsorplanmaları ile OP'li bir pestisit algılanmasına yönelik protein temelli sensör hazırlandı (Şekil 1). Sensör yüzeyi mikroskopik ve elektrokimyasal olarak incelendi. HSA NP/p(CTAB)/PGE, model olarak nitroaromatik bir OP bileşiği olan MP tayini için ilk defa denendi. HSA NP/p(CTAB)/PGE'nin MP için cevabı dönüşümlü voltametri (CV) ve diferansiyel puls voltametri (DPV) teknikleri ile elektrokimyasal olarak incelendi. Hazırlanan nanokompozit bazlı elektrokimyasal sensör OP yapıda pestisitlerin basit, hassas ve seçici tayininde önemli bir fırsat sunmaktadır.



**Şekil 1.** MP'nin elektrokimyasal tayini için HSA NP/p(CTAB)/PGE sensörünün basamak basamak hazırlanması ve ölçüm prensibi.

## **II. MATERYAL VE YÖNTEM**

### **A. KİMYASALLAR VE ÇÖZELTİLER**

Metil paratyon (MP), setiltrimetil amonyum bromür (CTAB), insan serum albümin (HSA), gluteraldehit ve sülfürik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edildi. Borik asit, asetik asit ve fosforik asit Merck (St. Louis, MO, ABD)'ten elde edilmiştir. Tüm kimyasallar analitik saflıkta olup herhangi bir işleme muamele edilmedi.

5,0 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (1:1) çözeltisi 0,1 M KCl içerisinde hazırlandı. 5 mmol L<sup>-1</sup> MP stok çözeltisi etanol içerisinde çözülerek hazırlandı ve çalışma konsantrasyonu aralığında MP çözeltileri Britton-Robinson tampon çözeltisi (BRT) ile seyreltildi. 0,045 mol L<sup>-1</sup> CTAB çözeltisi 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içerisinde hazırlandı.

Elektrokimyasal ölçümlerde destek elektrolit olarak kullanılan 0,1 M Britton-Robinson tampon çözeltisi 0,04 mol L<sup>-1</sup> fosforik asit, 0,04 mol L<sup>-1</sup> asetik asit ve 0,04 mol L<sup>-1</sup> borik asit karıştırılarak ultra saf su içinde hazırlandı ve pH'sı 0,2 M NaOH çözeltisi ile istenilen değere ayarlandı. Çözünmüş oksijeni çözeltilerden uzaklaştırmak için, her elektrokimyasal ölçümden önce 5 dakika boyunca saf azot gazı elektrolit çözeltisinden geçirildi.

### **B. CİHAZLAR**

Dönüşümlü voltametri (CV) ve diferansiyel puls voltametri (DPV) ölçümleri CHI-660C (CHI Instruments) model potansiyostatta üçlü elektrot sisteminde kaydedildi. Çalışma elektrodu olarak çıplak kalem grafit elektrot (PGE) veya HSA NPs/p(CTAB) modifiye PGE, referans elektrot olarak gümüş gümüş klorür (Ag/AgCl) ve karşıt elektrot olarak platin tel kullanıldı. Modifiye elektrotların morfolojisi taramalı elektron mikroskopu (SEM) (Tescan GAIA 3 FIB-SEM/Czech Republic) kullanılarak aydınlatıldı.

### **C. p(CTAB) KAPLI PGE HAZIRLANMASI**

Çalışma elektroduna (PGE) deneyler öncesi herhangi bir elektro/kimyasal ön-işlem uygulanmadı. Tek kullanımlık PGE'ler üzerine p(CTAB) film biriktirilmesi için 0,045 M CTAB içeren 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içerisine daldırılan PGE ile -0,8 V ila 1,2 V potansiyel aralığında (Ag/AgCl'ye karşı) 10 döngü dönüşümlü voltamogram (CV) kaydedildi. Elde edilen elektrot gece boyunca oda sıcaklığında kurutuldu ve p(CTAB)/ PGE olarak adlandırıldı.

### **D. İNSAN SERUM ALBÜMİN NANOPARTİKÜLLERİN (HSA NP) HAZIRLANMASI**

İnsan serum albümin nanopartikülleri (HSA NP), Langer ve grubunun bildirdiği kontrollü desolvasyon yöntemine göre hazırlandı [30]. Bunun için, 50 mg mL<sup>-1</sup> albümin çözeltisi ultra saf suda hazırlandı. HSA sulu çözeltisine bir organik çözücü eklendiğinde, karışımın dielektrik sabiti azalır ve daha küçük partiküler yapının oluşmasını sağlar. Bunun için, albümin solüsyonuna sabit karıştırma hızında (550 rpm) etanol eklendi. Desolvasyon işlemi solüsyonun rengi bulanıklaşana kadar devam ettirildi. Ardından nanopartiküllerin çapraz bağlanması için gluteraldehit (% 8) eklendi. Protein kaynaklı nanopartikülleri stabilize etmek için gluteraldehit yaygın olarak kullanılır [30,31]. Çözelti, 24 saat 600 rpm sabit karışma hızı ile oda ısısında karıştırıldı. Son aşamada ise elde edilen süspansiyon 12000 rpm'de 30 dakika santrifüjlendi ve ardından elde edilen nanopartiküller ultrasaf su ile 3 kez yıkandıktan sonra liyofilizatörde dondurularak kurutuldu. HSA NP'ler 50 ile 100 nm dolayında ortalama büyüklüğe sahip küresel formda elde edildi.

## **E. HSA NP/p(CTAB)/PGE’NİN HAZIRLANMASI**

p(CTAB) elektrokaplanmış PGE, HSA NP süspansiyonuna 1 saat boyunca daldırıldı ve ardından kurutuldu. MP tayininde kullanılacak bu sensör, HSA NP/p(CTAB)/PGE olarak isimlendirilmiştir. HSA NP/p(CTAB)/PGE’nin performansının değerlendirilmesinde, modifikasyon sırasında HSA NP immobilizasyon süresinin incelenmesi MP’nin voltametrik cevabı üzerindeki etkisinin araştırılmasında önemli bir adımdır. En yüksek MP pik akımı, 60 dak HSA NP adsorpsiyonu ile elde edildi. Daha uzun immobilizasyon sürelerinde ise daha fazla nanopartikül yüklenmesi sonucu elektrot direncini arttırarak yüzeyin stabilitesinin azalmasına neden olduğundan, pik akımlarında azalma gözlemlendi.

## **F. HSA NP/p(CTAB)/PGE İLE MP İÇİN ELEKTROKİMYASAL ÖLÇÜMLER**

MP’nin elektrokimyasal özellikleri HSA NP/p(CTAB)/PGE ile CV ve DPV teknikleri kullanılarak araştırıldı.

Dönüşümlü voltamogramlar (CV) 10 µM MP içeren N<sub>2</sub> gazına doymuş BRT destek elektrolit sisteminde 0,6 V ila -0,9 V (Ag/AgCl’ye karşı) aralığında 50 mV s<sup>-1</sup> tarama hızında gerçekleştirildi.

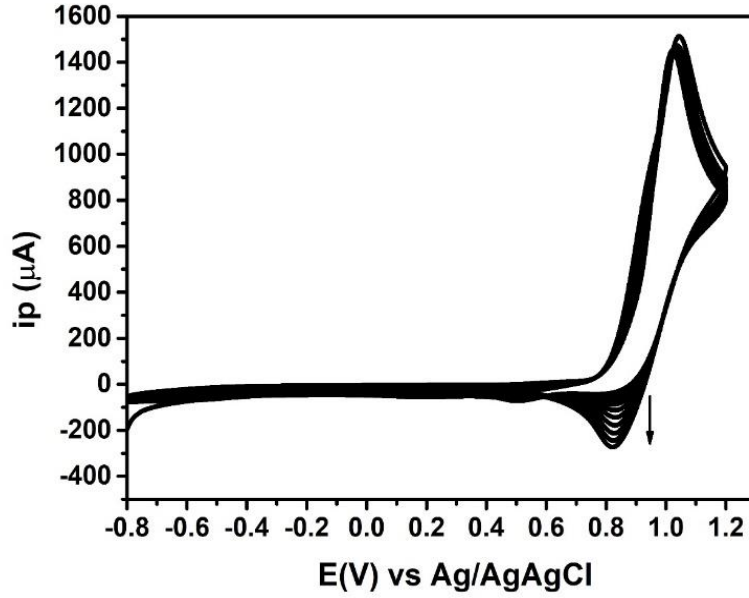
Diferansiyel puls voltametri (DPV) ölçümleri ise farklı derişimlerde MP içeren N<sub>2</sub>’ye doymuş BRT (optimum, pH 4.0) içine daldırılan HSA NP/p(CTAB)/PGE ile (optimum, 90 s) sabit karıştırma hızında ön-derişirme yapıldıktan sonra 0 V ile -1,0 V (Ag/AgCl’ye karşı) aralığında, 50 ms puls süresi, 50 mV puls yüksekliği, 4 mV puls genliği parametreleri kullanılarak elde edildi.

## **III. BULGULAR VE TARTIŞMA**

HSA NP/p(CTAB)/PGE yüzeyin hazırlanması ve MP’nin tespiti için yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ve ilgili tartışmalar aşağıda ayrıntılı bir biçimde verildi.

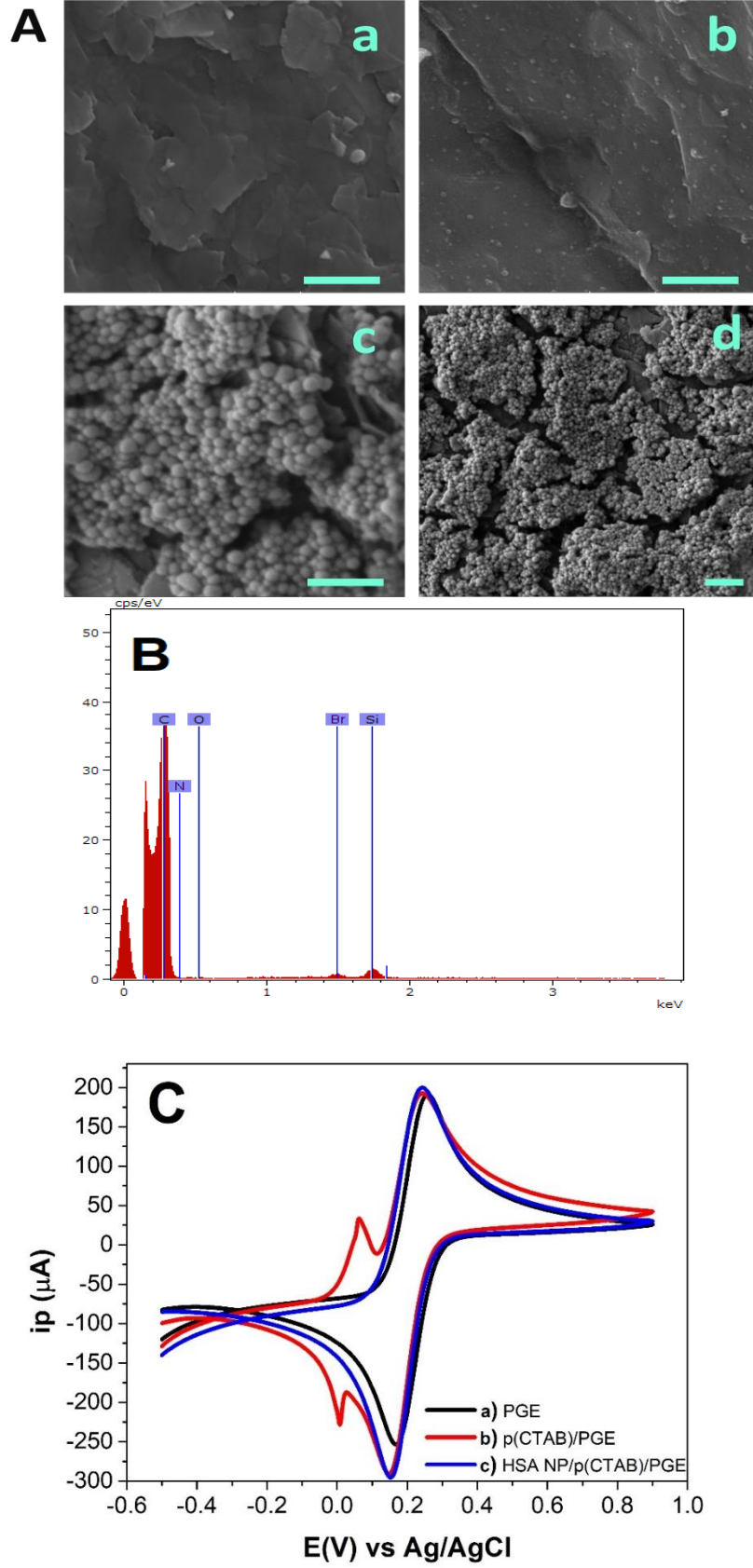
### **A. CTAB ELEKTROBİRİKTİRİLMESİ VE HSA NP/p(CTAB)/PGE KARAKTERİZASYONU**

Kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrotların hazırlanması ve elektrot yüzeylerinde polimerik film geliştirilmesinde dönüşümlü voltametri (CV) yöntemi yaygın olarak kullanılır. Şekil 2, 0,045 M CTAB içeren 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisinde daldırılan PGE üzerine CTAB elektrobiriktirilmesini gösteren 10 döngü dönüşümlü voltamogramı göstermektedir. CTAB derişimi kritik misel konsantrasyonunun üzerinde tutulduğunda (1 mM) ve asidik ortamda elektrot yüzeyi elektropolimerleştirilmiş CTAB (p(CTAB) ile kaplanabilir [29,32]. Gerçekleşen proseste, anodik yönde 1,05 V’da (Ag/AgCl’ye karşı) bir yükseltgenme piki ve geri döngüde ise 0,85 V’da (Ag/AgCl’ye karşı) indirgenme piki elde edildi. Elektrobiriktirme sırasındaki elde edilen elektrokimyasal davranış, CTAB’ın camı karbon elektrot üzerine elektropolimerizasyonun incelendiği Zhang ve grubunun rapor ettiği çalışma ile uyumludur [29]. Literatürde, bu işlemin, elektroyükseltgenme yoluyla CTAB’nin kuvvetli hidrofobik grafit yüzeyi üzerindeki ardışık elektrokimyasal interkalasyonundan kaynaklandığı bildirilmiştir [32]. Elektrokimyasal depozisyon esnasında döngü sayısı arttıkça indirgenme pik akımlarının arttığı ve grafit yüzeyde sarı bir film oluşumu gözlemlendi. Ardından, p(CTAB) fonksiyonelleştirilmiş arayüzeye HSA NP’ler fiziksel adsorpsiyon ile bağlandı.



**Şekil 2.** 0,1 M  $H_2SO_4$  içerisinde grafit elektrot üzerine p(CTAB) kaplanmasını gösteren dönüşümlü voltamogram ( $E_i$ ): -0,8 V,  $E(E_f)$ : 1,2 V (vs. Ag/AgCl). Tarama hızı (SR): 100  $mV s^{-1}$ .

Modifikasyon sırasında yüzeyin morfolojik değişimini gösteren SEM görüntüleri Şekil 3A'da verildi. Modifiye edilmemiş PGE'nin tabakalı grafit yüzeyinin (Şekil 3A.a), misel benzeri p(CTAB) filmi ile homojen olarak kaplandığı ve pürüzlü bir yapı sergilediği anlaşıldı. (Şekil 3A.b). Nanopartiküllerin yüzeye yerleşmesinin ardından, Şekil 3A.c-d'de sırasıyla yüksek ve düşük büyütme oranlarında HSA NP/p(CTAB) kaplı PGE yüzeylere ait SEM görüntüleri verildi. Polimerik film üzerine adsorplanan HSA NP'ler ise yaklaşık 100 nm çapında üç-boyutlu oldukça düzgün küresel yapısını korurken yüzeyde tek tabaka ve homojen olarak dağıldığı görülmüştür. Modifiye edici filmin kimyasal bileşimi, Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDS) kullanılarak değerlendirildi. PGE kil ve grafit içeriğine bağlı olarak başlıca C, O, Si'den oluşur. EDX analizinde (Şekil 3B), C, O, N ve Br varlığı, PGE üzerinde biriktirilen p(CTAB) filmin kimyasal bileşimini doğruladı. Modifikasyon aşamaları esnasında sensör platformunun elektrokimyasal davranışı ve yüzeyin iletkenliği ise  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  redoks çözeltisi kullanılarak CV ile incelendi (Şekil 3C). Çıplak PGE'ye göre (Şekil 3C.a) yüzeye iletken p(CTAB) filmin elektrodepozisyonu (Şekil 3C.b) redoks çiftinin katodik pik akımında artışa neden olmuştur. Randles-Sevcik denklemine göre, yüzeye kaplanan film yapısının efektif yüzey alanını arttığı anlaşılmıştır [14]. Elde edilen yanıtın artan Fe(III)/Fe(II) redoks prosesinin yanısıra yapıda bulunan bromür iyonlarının redox davranışına neden olduğu şeklinde yorumlandı. Literatürde, benzer voltametrik davranış, farklı malzemelerle birleştirilmiş CTAB modifiye elektrotlarda da elde edilmiştir [28]. Bu film üzerine iletken olmayan HSA NP kaplanması ise, bu elektroda ait CV'de 0 V (Ag/AgCl'ye karşı) civarında  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  redoks çiftine ait olmayan tersinir pikin yok olmasına neden oldu ve efektif yüzey alanının yüksek kalmasını sağladı. Böylelikle, elde edilen elektriksel olarak iletken ve analit adsorpsiyonuna imkan sağlayabilecek özellikte HSA NP/p(CTAB)/PGE yüzeyin OP pestisit tayini için uygun olacağı anlaşıldı ve sensör performansı MP kullanılarak incelendi.



**Şekil 3.** (A) SEM görüntüleri; (a) Modifikasyon öncesi PGE, (b) p(CTAB) kaplı PGE, (c-d) yüksek ve düşük büyütmede HSA NP/p(CTAB) kaplı PGE yüzeyler (1  $\mu\text{m}$  skala). (B) p(CTAB) kaplı PGE 'nin EDX analizi. (C) 0,1 M KCl içeren 5,0 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  redoks çözeltisindeki CV diyagramları: (a) çıplak PGE, (b) p(CTAB) kaplı PGE, (c) HSA NP/p(CTAB) kaplı PGE (Tarama hızı: 50  $\text{mV s}^{-1}$ ).

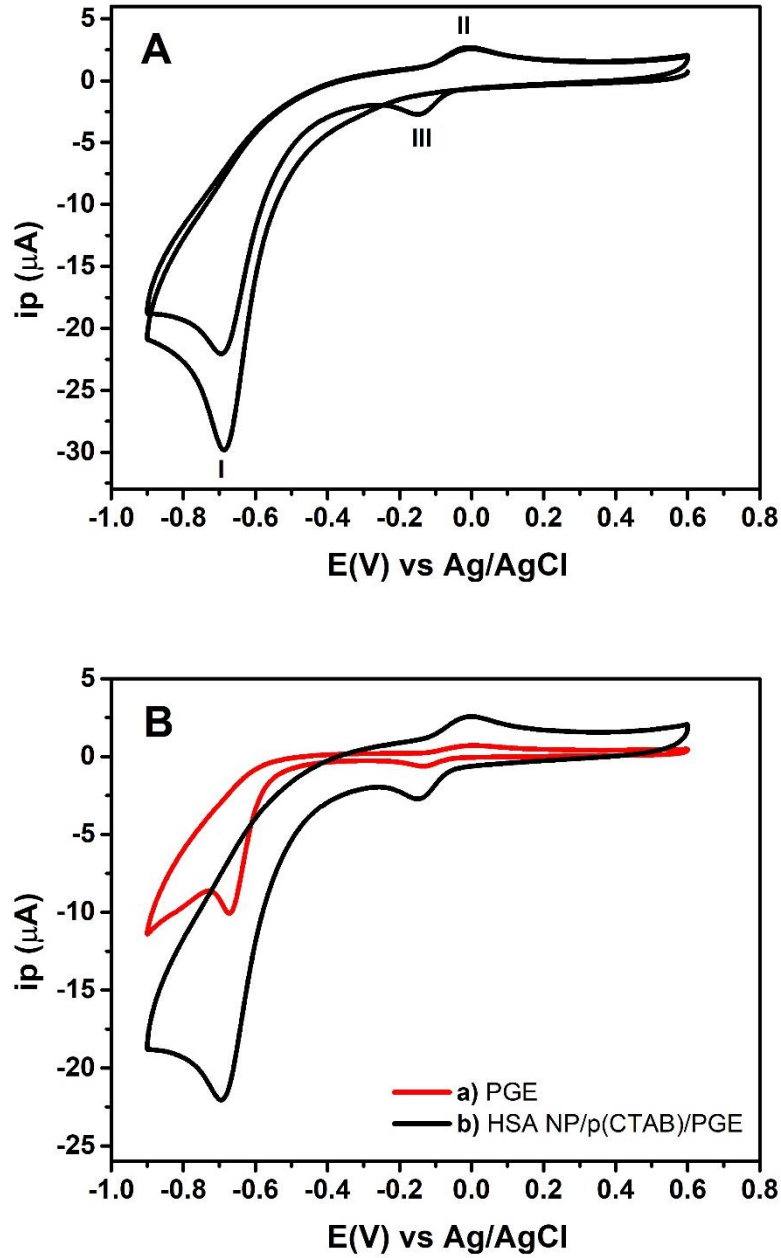


## B. HSA NP/P(CTAB) KAPLI PGE İLE MP'NİN VOLTAMETRİK DAVRANIŞI

Albüminin iyi tanımlanmış birincil yapısı ve yüksek miktarda yüklü amino asit içeriği (örneğin lizin) nedeniyle, albümin bazlı nanopartiküller, diğer bileşiklere gerek kalmadan pozitif veya negatif yüklü moleküllerin elektrostatik adsorpsiyonuna imkan verebilir [33,34]. Pestisitlerin izlenmesi için hızlı, verimli ve sürekli bir elektrokimyasal analiz metodu geliştirmek amacıyla MP'nin voltametrik davranışını incelemek için öncelikle N<sub>2</sub>'ye doymuş BRT ortamında CV uygulandı. Şekil 4A'da verilen, HSA NP/p(CTAB) modifiye elektrotta elde edilen 2 döngü dönüşümlü voltamogramda gösterildiği gibi, 10 µM MP ilk katodik döngü sırasında nitro grubunun (-NO<sub>2</sub>) hidroksilamine (-NHOH) indirgenmesi sonucu -0,69 V'da (I) (Ag/AgCl'ye karşı) keskin tersinmez katodik bir pik sergiledi. Buna göre, ilk döngüde sadece bir indirgenme ve yükseltgenme varlığı, ikinci döngüde ise, ara ürünün indirgenmesine denk gelen ek bir indirgenme piki gözlemlendi. Tekrarlayan döngü sırasında, bu pik akımında bir azalış, ayrıca nitroso (-NO) ve hidroksilaminin redoksuna denk gelen -0,025 V (II) ve -0,180 V (III) 'te ise bir çift yarı-tersinir pik gözlemlendi [35] (Şekil 1). -0.69 V'da gözlenen indirgenme pik akımının ikinci döngüden itibaren azalması, MP'nin elektrokimyasal reaksiyon süresince tüketilmesi ve reaksiyon ürününün yüzeye adsorplanmasından kaynaklanır [35,36]. Bu redoks pikleri nitroaromatik bileşikler için bildirilmiş diğer çalışmalarla uyumludur [36]. Görülebileceği gibi, HSA NP/p(CTAB)'ın, MP'nin immobilizasyonu ve elektrokimyasal algılanmasında önemli bir rol oynayabileceği anlaşıldı.

Şekil 4B'den anlaşıldığı üzere, modifiye edilmemiş PGE'ye göre (Şekil 4B.a), yüzeyde HSA NP/p(CTAB) varlığı (Şekil 4B.b) MP için daha gelişmiş elektrokimyasal sinyal elde edildiği belirlendi. Burada, MP'ye karşı cevabın yüksek oluşu protein temelli nanopartikül (HSA NP) ve yüzey aktif temelli kompozit tabakası (p(CTAB)) bileşiminin sağladığı iyi iletkenlik ve geniş etkili yüzey alanlarına atfedildi. MP'nin plazma proteini olan HSA'ya yüksek afinite bağlanma bölgesinin, bu molekülün hidrofobik boşluk bölgesinde bulunan tek triptofanı üzerinden olduğu açıklanmıştır ve hidrofobik kuvvetlerin, pestisit-albümin kompleksinin oluşumu üzerinde önemli bir etkisi olabileceği bildirilmiştir [22].





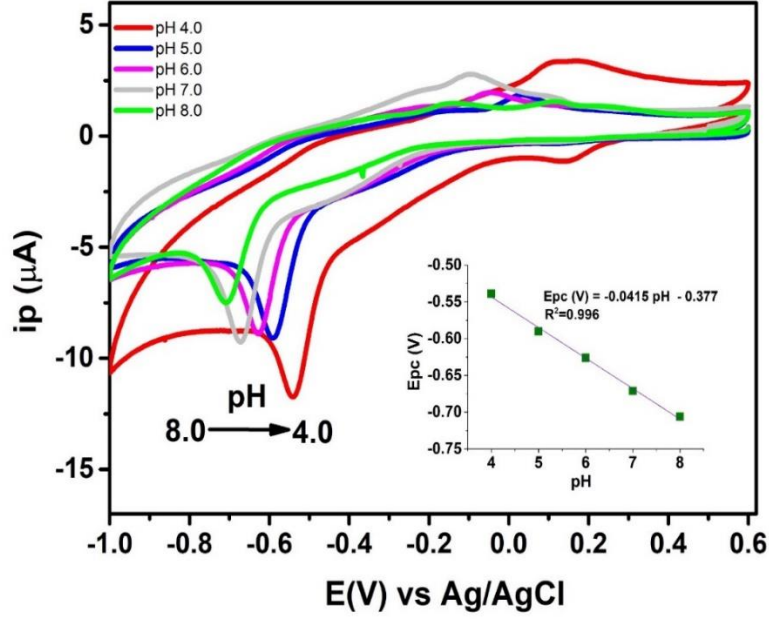
**Şekil 4.**  $10 \mu\text{M}$  MP içeren BRT (pH 7.0) içerisinde (A) HSA NP/p(CTAB)/PGE ile elde edilen ilk 2 döngüye ait dönüşümlü voltamogramlar ve (B) Modifiye edilmemiş PGE (a) ve HSA NP/p(CTAB) modifiye PGE (b) ile elde edilen dönüşümlü voltamogramlar. ( $E_i$ ): 0,6 V, ( $E_f$ ): -0,9 V. Tarama hızı (SR):  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

### C. MP'NİN VOLTAMETRİK CEVABINA PH'NIN ETKİSİ

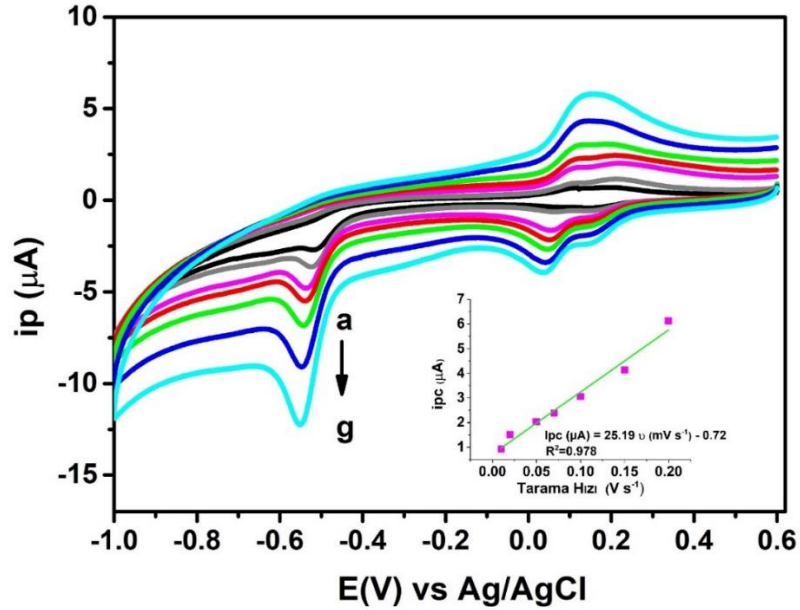
Şekil 5,  $10 \mu\text{M}$  MP varlığında, değişen pH'larda (4,0-8,0 arasında) BRT çözeltilerinde HSA NP/p(CTAB)/PGE'de elde edilen tersinmez MP pik potansiyeline ( $E_{pc}$ ) karşı pik akımlarını ( $I_{pc}$ ) gösteren CV eğrilerini göstermektedir. MP'nin indirgenmesinde  $\text{H}^+$  katılımına bağlı olarak en gelişmiş sinyal pH 4,0'de elde edildiği sonucuna varıldı. Bazı ortamların ise MP'nin bozunmasına ve akım şiddetinin azalmasına neden olduğu belirlendi [37]. Bu nedenle pH 4,0 BRT ortamı, sonraki deneyler için optimal bir koşul olarak kabul edildi. Ayrıca, tersinmez katodik pik potansiyeli ile pH arasında lineer bir cevap elde edildi:

$$E_{pc} (\text{V}) = -0,0415 \text{ pH} - 0,377 \quad (R^2 = 0.996) \quad (1)$$

Bu denklemin 41,5 mV/pH'lık eğim değeri Nernst denkleminin (-0,0592 pH) tipik değerine yakındır. Bu ise, MP'nin elektro-indirgenme ve yükseltgenmesinde elektron ve proton sayısının eşit olarak aktarıldığını gösterir [38].



Şekil 5. 10 μM MP içeren farklı pH'larda BRT çözeltilerinde (pH 4,0-8,0) HSA NP/p(CTAB)/PGE'de elde edilen CV eğrileri. (içteki grafik: pH'ya karşı Epc grafiği.)



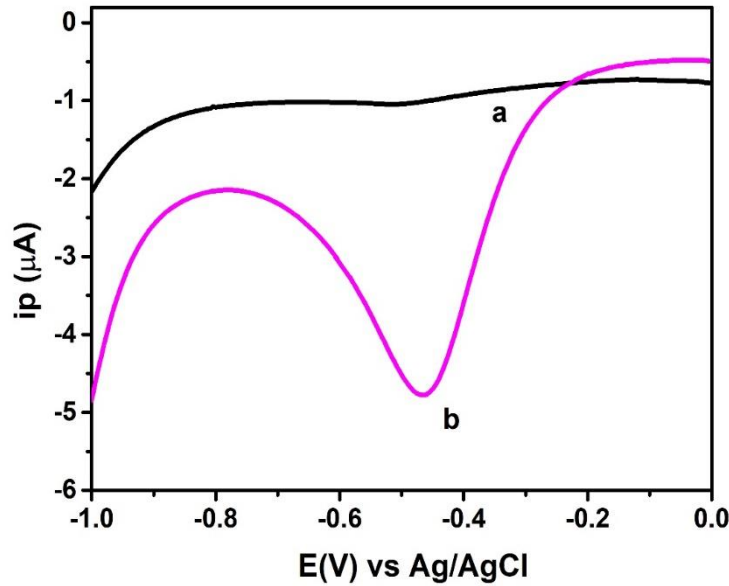
Şekil 6. 10 μM MP içeren pH 4,0 BRT çözeltisinde HSA NP/p(CTAB)/PGE'de farklı tarama hızlarında (10-200 mVs<sup>-1</sup>) elde edilen CV eğrileri. (içteki grafik: Tarama hızına karşı akım (ipc) grafiği).

#### D. MP'NİN VOLTAMETRİK CEVABINA TARAMA HIZININ ETKİSİ

Şekil 6, HSA NP/p(CTAB)/PGE ile pH 4,0 BRT'de tarama hızının MP'nin pik akımı ( $I_p$ ) üzerindeki etkisini incelemek için  $10-200 \text{ mVs}^{-1}$  aralığında kaydedilen voltammogramları göstermektedir. Katodik pik akımlarının, tarama hızı ile doğrusal olarak artması, MP'nin indirgenme kinetiğinin adsorpsiyon kontrollü davranış gösterdiği şeklinde yorumlandı [39]. Ayrıca, artan tarama hızıyla pik potansiyellerindeki kayma, indirgenme reaksiyonunun tersinmez olduğunu gösterdi.

#### E. HSA NP/P(CTAB)/PGE'NİN MP TESPİTİ İÇİN ANALİTİK PERFORMANSI

HSA NP/p(CTAB)/PGE üzerinde MP'nin elektrokimyasal davranışı CV ile aydınlatıldıktan sonra MP'nin hassas tayini için diferansiyel puls voltametri (DPV) elektrokimyasal kantitatif yöntem olarak uygulandı DPV, çok sayıda elektroaktif bileşiğin belirlenmesi için kullanılan kapasitif akıma karşı arttırılmış sinyal/gürültü oranı avantajını sunan hassas elektroanalitik tekniklerden biridir [40]. BRT (pH 4,0) içerisinde  $0,1 \mu\text{M}$  MP'nin  $0 \text{ V}$  ila  $-1,0 \text{ V}$  potansiyel aralığındaki diferansiyel puls voltametik yanıtı  $-0,460 \text{ V}$ 'de (Ag/AgCl'ye karşı) keskin ve iyi tanımlanmış bir pik sergiledi (Şekil 7). MP içermeyen BRT'de alınan voltamogramda ise bu pike rastlanmadı.



**Şekil 7.** HSA NP/p(CTAB)/PGE'de (a) MP içermeyen ve (b)  $0,1 \mu\text{M}$  MP içeren pH 4,0 BRT'de alınan DPV eğrileri. ( $E_i$ ):  $0 \text{ V}$ , ( $E_p$ ):  $-1,0 \text{ V}$ . Puls süresi :  $50 \text{ ms}$ , puls yüksekliği:  $50 \text{ mV}$ , puls genliği:  $4 \text{ mV}$ , puls süresi:  $5 \text{ s}$ . Önderiştirme:  $90 \text{ s}$ .

Şekil 8A, MP'nin kantitatif analizi için artan derişimlerde pestisit içeren çözeltide kaydedilen tipik DPV piklerini göstermektedir. Ölçülen pik akım değerleri, MP'nin  $0,01$  ila  $0,1 \mu\text{M}$  arasında derişimleri için doğrusallık gösterdi (Şekil 8B).

Elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiğinin denklemi;

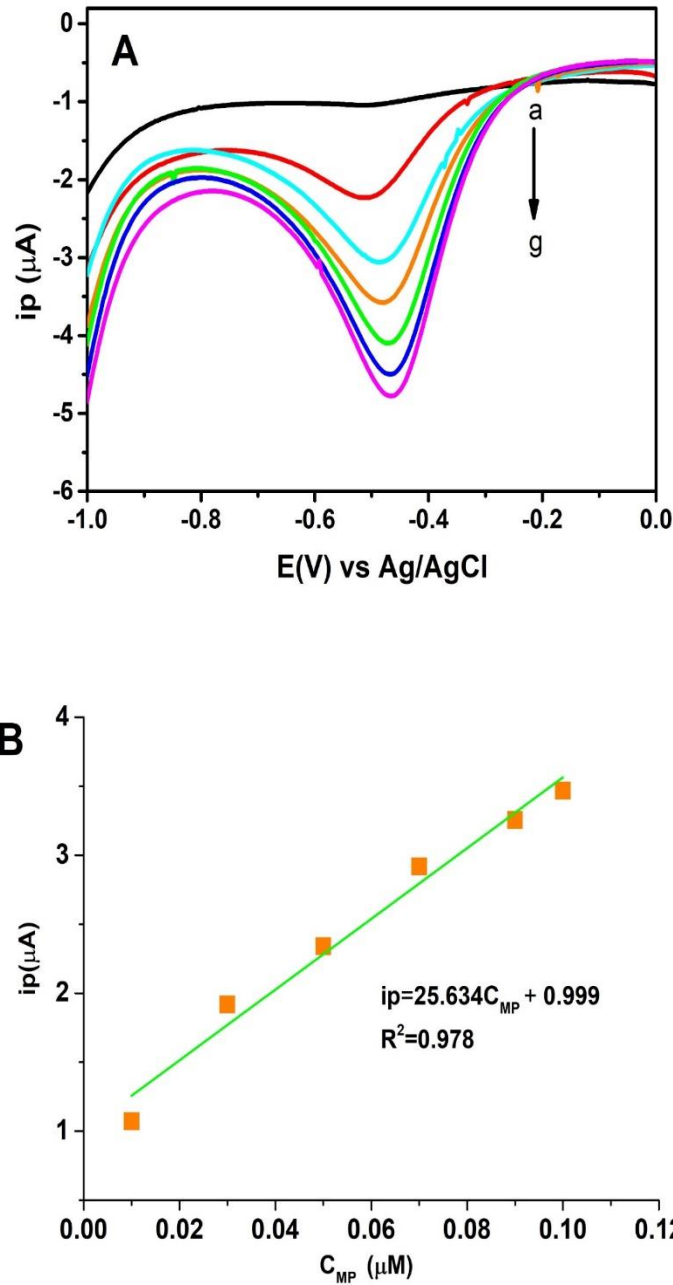
$$I (\mu\text{A}) = 25,63(\mu\text{M}) + 0,9998 \quad (R^2 = 0,98) \quad (2)$$

Gözlenebilme sınırı (LOD) ise  $6 \text{ nM}$  olarak hesaplandı;

$$\text{LOD} = 3 \times s_b / m \quad (3)$$

s: boş çözeltide alınan voltammogramların standart sapma değeri ( $n=3$ )

m: kalibrasyon grafiğinin eğimi.



**Şekil 8.** (A) HSA NP/p(CTAB)/PGE’de farklı konsantrasyonlarda MP içeren (a-f: 0,01- 0,1  $\mu\text{M}$ ) pH 4,0 BRT’de alınan DPV eğrileri. (Diğer parametreler Şekil 7 ile aynıdır.) (B) MP için doğrusal kalibrasyon grafiği.

HSA NP/p(CTAB)/PGE’nin MP için elde edilen analitik performansı, literatürde MP’nin tayininde kullanılan diğer enzimatik ve enzimatik olmayan farklı nanomalzemelerle rapor edilmiş bazı sensörler ile karşılaştırılması Tablo 1’de özetlendi. Anlaşıldığı üzere geliştirilen sensör, MP için geniş bir doğrusal çalışma aralığı ve oldukça düşük bir gözlenebilirlik sınırı değeri gösterdi ve bu sonuçlar literatürde rapor edilmiş diğer çalışmalarla kıyaslanabilir düzeydedir. Dolayısıyla, geliştirilen HSA NP/p(CTAB)/PGE sensörün hazırlama kolaylığı, düşük maliyeti ve MP’ye yüksek afinitesi, MP’nin enzim gerektirmeyen hızlı ve hassas elektrokimyasal tayini için oldukça elverişlidir.

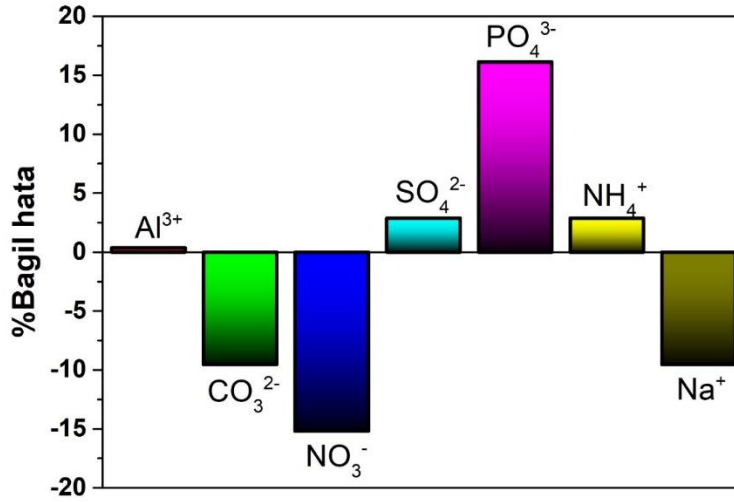
**Tablo 1.** MP tayini için önerilen sensörün rapor edilen diğer elektrokimyasal sensörlerle karşılaştırılması.

Elektrot	Elektrokimyasal Teknik	MP (Doğrusal Aralık)	LOD	Kaynak
ZrO <sub>2</sub> NPs-GNs/GCE	SWV	0,006-3,08 µM	2,05 nM	[41]
Stearik asit modifiye GCE	DPV	2,07 -12,42 µM	0,95 µM	[40]
Gemini surfaktant-interkale kil-modifiye GCE	SWV	0,4 – 8,5 µM	0,7 nM	[42]
CuO-TiO <sub>2</sub> -dekore GCE	DPV	0-7,60 µM	0,0046 µM	[43]
MIP-IL-EGN/GCE	DPV	0,010-7,0 µM	6 nM	[44]
Au-ZrO <sub>2</sub> -GNs/GCE	SWV	0,0038-9,12 µM	3,8 nM	[37]
BCL@MOF nanofiber/kitosan/GCE	DPV	0,1-38 µM	0,067 µM	[45]
ITO/(GPDDA/GPSS) <sub>1</sub> (AuNP/GPSS) <sub>10</sub>	DPV	1,90-228 µM	2,93 µM	[46]
AChE-Au-PPy/GCE	CV	17,6-412 nM/ 1,7-15,45 µM	6,8 nM	[13]
BSA/AChE-Glu-s-SWCNTs/GCE	SWV	1×10 <sup>-10</sup> M - 5×10 <sup>-6</sup> M	3,75×10 <sup>-11</sup> M	[14]
AChE/SF/MWNTs/GCE	Amperometri	3,5 µM – 2,0 mM	60 nM	[47]
HSA NP/p(CTAB)/PGE	DPV	0,01- 0,1 µM	6 nM	Bu çalışma

Zirkon nanopartikül dekore grafen nanotabakalar (ZrO<sub>2</sub>NPs-GNs); kare dalga voltametri (SWV); diferansiyel puls voltametri (DPV); bakır oksit- titanyum dioksit (CuO-TiO<sub>2</sub>); moleküler baskılı polimer-iyonik sıvı-grafen kompozit film kaplı camı karbon elektrot (MIP-IL-EGN/GCE); camı karbon elektrot üzerinde altın ve zirkon nanokompozit modifiye grafen nanotabakalar (Au-ZrO<sub>2</sub>-GNs/GCE); metal-organik çerçeveler (MOFs); BCL: *Burkholderia cepacia* Lipaz; Grafen Nanoplateletler ve Altın Nanopartiküllerin Katman Tabanlı Filmleri (GPDDA/GPSS)<sub>1</sub>(AuNP/GPSS)<sub>10</sub>; İndiyum kalay oksit (ITO); asetilkolinesteraz-altın-polipirol kaplı camı karbon elektrot (AChE-Au-PPy/GCE); dönüşümlü voltametri (CV); tek duvarlı karbon nanotüp/glutaraldehit çapraz bağlı asetilkolinesteraz sarılmış sıgır serum albümin nanokompozitler (BSA/AChE-Glu-s-SWCNTs/GCE); asetilkolinesteraz/ipek fibroin/çok duvarlı karbon nanotüpler ile modifiye camı karbon elektrot (AChE/SF/MWNTs/GCE).

HSA NP/p(CTAB)/temelli sensörün gün-içi tekrar üretilebilirliği % 6,2 (n=5) bağıl standart sapma (RSD) ile yüksek doğruluk gösterdi.

Algılama seçiciliği, geliştirilen elektrokimyasal sensörün değerlendirilmesinde bir başka önemli parametredir. CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Al<sup>3+</sup>, Na<sup>+</sup> ve NH<sub>4</sub><sup>+</sup> gibi girişim yapabilecek türler, su içinde MP ile bir arada bulunabilir. HSA NP/p(CTAB)/PGE ile DPV ölçümleri, 0,05 µM MP ile aynı ortamda 200-kat fazla derişimde iyon içeren pH 4,0 BRT’de gerçekleştirildi. Diğer iyonlarla bir arada olduğunda, MP için ölçülen pik akımındaki % bağıl değişim Şekil 9’da gösterildiği gibi grafiğe geçirildi. Sensör cevabının % bağıl değişiminin en yüksek % 15 etkiye neden olduğu, bu nedenle türlerin, MP’nin elektrokimyasal tespiti üzerinde neredeyse çok fazla etkiye neden olmadığı anlaşıldı. Bu durum, sensörün MP’nin elektrokimyasal tespiti üzerindeki seçiciliğinin iyi olduğunu gösterdi.



**Şekil 9.** HSA NP/p(CTAB)/PGE ile 0,05 µM MP cevabına farklı iyonların etkisini gösteren bar grafiği (Her iyon için derişim: 10 µM).

## IV. SONUÇ

Özetle bu çalışmada, tek kullanımlık grafit elektrotlar üzerine elektrobiriktirilmiş p(CTAB) tabakası üzerine dekore edilmiş HSA NP'ler ile önemli bir çevresel kirlenici olan MP'nin tayini için bir elektrokimyasal sensör geliştirildi. Yüzeyde bulunan albümin temelli nanopartiküllerin MP'ye yüksek afinitesi ve yüksek adsorplama kapasitesine sahip yüzey aktif madde tabanlı p(CTAB) filmin birarada bulunması MP tayini için sinerjik etki oluşturduğu anlaşılmaktadır. Geliştirilen HSA NP/p(CTAB)/PGE, farklı inorganik iyonların varlığında bile MP'ye karşı geniş doğrusal cevap aralığı, düşük gözlenebilirlik sınırı, iyi hassasiyet ve seçicilik ile mükemmel elektrokatalitik aktivite gösterdi. Geliştirilen sensörün literatürde belirtilen MP tayini için enzimatik ve çeşitli nanomalzemelere dayanan diğer bazı sensörler ile yarışacak özellikte olduğu tespit edildi. İyi bir tekrar üretilebilirlik gösteren bu sensörün MP'nin pratikte hassas, seçici ve yerinde tespiti için kullanılabileceği öngörülmektedir.

**TEŞEKKÜR:** Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (FBA-2019-18385) desteklenmiştir. Yazar ayrıca, faydalı yorumları için Prof. Dr. Serdar Abacı ve Elektrokimyasal Arayüzeyler & Biyomalzemeler Araştırma Grubu'na teşekkür eder.

## V. KAYNAKÇA

- [1] M. Govindasamy, S. Sakthinathan, S. M. Chen, T. W. Chiu, A. Sathiyar, and J. P. Merlin, "Reduced Graphene Oxide Supported Cobalt Bipyridyl Complex for Sensitive Detection of Methyl Parathion in Fruits and Vegetables," *Electroanalysis*, vol. 29, no. 8, pp. 1950–1960, 2017.
- [2] D. M. Maxwell, K. M. Brecht, I. Koplovitz, and R. E. Sweeney, "Acetylcholinesterase inhibition: Does it explain the toxicity of organophosphorus compounds?," *Archives of Toxicology*, vol. 80, no. 11, pp. 756–760, 2006.
- [3] "WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to the WHO

recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification, 2009 edition - International Program on Chemical Safety, World Health Organization [Access: 30-Haz-2020].

- [4] G. M. Benke, K. L. Cheever, F. E. Mirer, and S. D. Murphy, "Comparative toxicity, anticholinesterase action and metabolism of methyl parathion and parathion in sunfish and mice," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 28, no. 1, pp. 97–109, 1974.
- [5] EC Drinking Water Directive 98/83/EC European Commission (1998).
- [6] C. Liu, B. Guo, and J. Xue, "Analytical Methods for Pesticides and Herbicides," *Water Environment Research*, vol. 90, no. 10, pp. 1323–1347, 2018.
- [7] J. Chen, W. T. Zhang, Y. Shu, X. H. Ma, and X. Y. Cao, "Detection of Organophosphorus Pesticide Residues in Leaf Lettuce and Cucumber Through Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction Coupled to Gas Chromatography," *Food Analytical Methods*, vol. 10, no. 10, pp. 3452–3461, 2017.
- [8] Y. Shin, J. Lee, J. Lee, J. Lee, E. Kim, K. H. Liu, H. S. Lee, and J. H. Kim, "Validation of a Multiresidue Analysis Method for 379 Pesticides in Human Serum Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 66, no. 13, pp. 3550–3560, 2018.
- [9] A. V. B. Reddy, Z. Yusop, J. Jaafar, A. B. Aris, Z. A. Majid, K. Umar, and J. Talib, "Simultaneous determination of three organophosphorus pesticides in different food commodities by gas chromatography with mass spectrometry," *Journal of Separation Science*, vol. 39, no. 12, pp. 2276–2283, 2016.
- [10] A. Menezes Filho, F. N. dos Santos, and P. A. de Paula Pereira, "Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC-MS) for the determination of pesticide residues in mangoes," *Talanta*, vol. 81, no. 1–2, pp. 346–354, 2010.
- [11] Y. Zeng, D. Yu, Y. Yu, T. Zhou, and G. Shi, "Differential pulse voltammetric determination of methyl parathion based on multiwalled carbon nanotubes–poly(acrylamide) nanocomposite film modified electrode," *The Journal of Hazardous Materials*, vol. 217–218, pp. 315–322, 2012.
- [12] A. Rhouati, M. Majdinasab, and A. Hayat, "A perspective on non-enzymatic electrochemical nanosensors for direct detection of pesticides," *Current Opinion in Electrochemistry*, vol. 11., pp. 12–18, 2018.
- [13] J. Gong, L. Wang, and L. Zhang, "Electrochemical biosensing of methyl parathion pesticide based on acetylcholinesterase immobilized onto Au–polypyrrole interlaced network-like nanocomposite," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, no. 7, pp. 2285–2288, 2009.
- [14] T. H. V. Kumar and A. K. Sundramoorthy, "Electrochemical biosensor for methyl parathion based on single-walled carbon nanotube/glutaraldehyde crosslinked acetylcholinesterase-wrapped bovine serum albumin nanocomposites," *Analytica Chimica Acta*, vol. 1074, pp. 131–141, 2019.
- [15] N. K. Bakirhan, B. Uslu, and S. A. Ozkan, "The Detection of Pesticide in Foods Using Electrochemical Sensors," in *Food Safety and Preservation*, Elsevier, 2018, pp. 91–141.
- [16] P. Kumar, K. H. Kim, and A. Deep, "Recent advancements in sensing techniques based on functional materials for organophosphate pesticides," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 70, pp. 469–481, 2015.



- [17] F. Arduini, S. Cinti, V. Scognamiglio, and D. Moscone, "Nanomaterials in electrochemical biosensors for pesticide detection: advances and challenges in food analysis," *Microchimica Acta*, vol. 183, no. 7, pp. 2063–2083, 2016.
- [18] S. Sahin, H. Selek, G. Ponchel, M. T. Ercan, M. Sargon, A. A. Hincal, and H. S. Kas, "Preparation, characterization and in vivo distribution of terbutaline sulfate loaded albumin microspheres," *Journal of Controlled Release*, vol. 82, no. 2–3, pp. 345–358, 2002.
- [19] M. Fasano, S. Curry, E. Terreno, M. Galliano, G. Fanali, P. Narciso, S. Notari and P. Ascenzi, "The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin," *IUBMB Life*, vol. 57, no. 12, pp. 787–796, 2005.
- [20] G. Fanali, A. D. Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, and P. Ascenzi, "Human serum albumin: From bench to bedside," *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 33, no. 3, pp. 209–290, 2012.
- [21] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori, "Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review," *The Journal of Controlled Release*, vol. 65, no. 1–2, pp. 271–284, 2000.
- [22] D. Silva, C. M. Cortez, J. Cunha-Bastos, and S. R. W. Louro, "Methyl parathion interaction with human and bovine serum albumin," *Toxicology Letters*, vol. 147, no. 1, pp. 53–61, 2004.
- [23] D. C. Carter and J. X. Ho, "Structure of serum albumin," *Advances in Protein Chemistry*, vol. 45, no. C, pp. 153–176, 1994.
- [24] K. Langer, M. G. Anhorn, I. Steinhauser, S. Dreis, D. Celebi, N. Schrickel, S. Faust, and V. Vogel, "Human serum albumin (HSA) nanoparticles: Reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 347, no. 1–2, pp. 109–117, 2008.
- [25] A. O. Elzoghby, W. M. Samy, and N. A. Elgindy, "Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems," *Journal of Controlled Release*, c. 157, s. 2., ss. 168–182, 2012.
- [26] E. Ertugen, A. Tunçel, and F. Yurt, "Docetaxel loaded human serum albumin nanoparticles; synthesis, characterization, and potential of nuclear imaging of prostate cancer," *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 55, no. 101410, 2020.
- [27] O. Akbal, T. Vural, S. Malekghasemi, B. Bozdoğan, and E. B. Denkbaş, "Saponin loaded montmorillonite-human serum albumin nanocomposites as drug delivery system in colorectal cancer therapy," *Applied Clay Science*, vol. 166, pp. 214–222, 2018.
- [28] M. Hasanzadeh, A. Mohammadzadeh, M. Jafari, and B. Habibi, "Ultrasensitive immunoassay of glycoprotein 125 (CA 125) in untreated human plasma samples using poly (CTAB-chitosan) doped with silver nanoparticles," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 120, pp. 2048–2064, 2018.
- [29] Y. J. Yang, L. Guo, and W. Zhang, "The electropolymerization of CTAB on glassy carbon electrode for simultaneous determination of dopamine, uric acid, tryptophan and theophylline," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 768, pp. 102–109, 2016.
- [30] K. Langer, S. Balthasar, V. Vogel, N. Dinauer, H. Von Briesen, and D. Schubert, "Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 257, no. 1–2, pp. 169–180, 2003.

- [31] S. Das, R. Banerjee, and J. Bellare, "Aspirin Loaded Albumin Nanoparticles by Coacervation: Implications in Drug Delivery," *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, vol. 18, no.2, pp.203-12, 2005.
- [32] K. Kakaei and K. Hasanpour, "Synthesis of graphene oxide nanosheets by electrochemical exfoliation of graphite in cetyltrimethylammonium bromide and its application for oxygen reduction," *Journal of Materials Chemistry A*, vol. 2, no. 37, pp. 15428–15436, 2014.
- [33] C. Weber, C. Coester, J. Kreuter, and K. Langer, "Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 194, no. 1, pp. 91–102, 2000.
- [34] J. Irache, M. Merodio, A. Arnedo, M. Camapanero, M. Mirshahi, and S. Espuelas, "Albumin Nanoparticles for the Intravitreal Delivery of Anticytomegaloviral Drugs," *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 5, no. 3, pp. 293–305, 2005.
- [35] X. Tan, B. Li, K. Y. Liew, and C. Li, "Electrochemical fabrication of molecularly imprinted porous silicate film electrode for fast and selective response of methyl parathion," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, no. 2, pp. 868–871, 2010.
- [36] G. Liu and Y. Lin, "Electrochemical stripping analysis of organophosphate pesticides and nerve agents," *Electrochemistry Commuucations*, vol. 7, no. 4, pp. 339–343, 2005.
- [37] N. Gao, C. He, M. Ma, Z. Cai, Y. Zhou, G. Chang, X. Wang and Y. Heb, "Electrochemical co-deposition synthesis of Au-ZrO<sub>2</sub>-graphene nanocomposite for a nonenzymatic methyl parathion sensor," *Analytica Chimica Acta*, vol. 1072, pp. 25–34, 2019.
- [38] R. Karthik, J. V. Kumar, S. M. Chen, T. Kokulnathan, T.W. Chen, S. Sakthinathan, T.W. Chiu ve V. Muthuraj, "Development of novel 3D flower-like praseodymium molybdate decorated reduced graphene oxide: An efficient and selective electrocatalyst for the detection of acetylcholinesterase inhibitor methyl parathion," *Sensors Actuators, B Chem.*, c. 270, ss. 353–361, 2018.
- [39] W. Yazhen, Q. Hongxin, H. Siqian, and X. Junhui, "A novel methyl parathion electrochemical sensor based on acetylene black-chitosan composite film modified electrode," *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 147, no. 2, pp. 587–592, 2010.
- [40] J. N. Nirmala, A. Kumaravel and M. Chandrasekaran, "Stearic acid modified glassy carbon electrode for electrochemical sensing of parathion and methyl parathion." *Journal of Applied Electrochemistry*, c. 40, pp.1571–1574, 2010.
- [41] J. Gong, X. Miao, H. Wan, and D. Song, "Facile synthesis of zirconia nanoparticles-decorated graphene hybrid nanosheets for an enzymeless methyl parathion sensor," *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 162, no. 1, pp. 341–347, 2012.
- [42] H. L. Tcheumi, I. K. Tonle, E. Ngameni, and A. Walcarius, "Electrochemical analysis of methylparathion pesticide by a gemini surfactant-intercalated clay-modified electrode," *Talanta*, vol. 81, no. 3, pp. 972–979, 2010.
- [43] X. Tian, L. Liu, Y. Li, C. Yang, Z. Zhou, Y. Nie, and Y. Wang "Nonenzymatic electrochemical sensor based on CuO-TiO<sub>2</sub> for sensitive and selective detection of methyl parathion pesticide in ground water," *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 256, pp. 135–142, 2018.
- [44] L. Zhao, F. Zhao, and B. Zeng, "Electrochemical determination of methyl parathion using a

- molecularly imprinted polymer-ionic liquid-graphene composite film coated electrode,” *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 176, pp. 818–824, 2013.
- [45] Z. Wang, B. Ma, C. Shen, and L. Z. Cheong, “Direct, selective and ultrasensitive electrochemical biosensing of methyl parathion in vegetables using *Burkholderia cepacia* lipase@MOF nanofibers-based biosensor,” *Talanta*, vol. 197, pp. 356–362, 2019.
- [46] G. H. S. Rodrigues, C. M. Miyazaki, R. J. G. Rubira, C. J. L. Constantino, and M. Ferreira, “Layer-by-Layer Films of Graphene Nanoplatelets and Gold Nanoparticles for Methyl Parathion Sensing,” *ACS Applied Nano Materials*, vol. 2, no. 2, pp. 1082–1091, 2019.
- [47] R. Xue, T. F. Kang, L. P. Lu, and S. Y. Cheng, “Immobilization of acetylcholinesterase via biocompatible interface of silk fibroin for detection of organophosphate and carbamate pesticides,” *Applied Surface Science*, vol. 258, no. 16, pp. 6040–6045, 2012.