



Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi

Araştırma Makalesi

Amin Fonksiyonlu Karbon Nanotüp, Kalay Oksit Nanopartikül ve Diamin Oksidaz Temelli Triptamin Biyosensörü

 Ceren KAÇAR^{a,*},  Berna DALKIRAN^a

^a Kimya Bölümü, Fen Fakültesi, Ankara Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE

* Sorumlu yazarın e-posta adresi: cerenkacar@gmail.com

DOI: 10.29130/dubited.602777

ÖZET

Bu çalışmada amino fonksiyonlu çok duvarlı karbon nanotüp ($\text{NH}_2\text{-MWCNT}$) ve kalay oksit nanopartikül (SnO_2) ile modifiye edilmiş perde baskılı karbon elektrotlara (SPCE) dayanan amperometrik triptamin biyosensörü geliştirildi. Diamin oksidaz (DAO) enzimi $\text{NH}_2\text{-MWCNT-SnO}_2\text{/SPCE}$ yüzeyine N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) karbodiimide (EDC) ve N-hidroksi süksinimide (NHS) kullanılarak kovalent bağlama yöntemi ile immobilize edildi. Hazırlanan elektrot yüzeyi, enzimlerin yüzeyden uzaklaşmasını engellemek ve girişim etkilerini azaltmak amacıyla son olarak Nafyon ile kaplandı. Biyosensörün yüzey morfolojisi, elektrokimyasal özellikleri ve analitik performansı taramalı elektron mikroskobu (SEM), dönüşümlü voltametri (CV), elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ve kronoamperometri yöntemleri kullanılarak incelendi. Geliştirilen biyosensör ile triptamin için elde edilen doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilirlik sınırı ve duyarlık sırası ile $2,0 \times 10^{-6} - 2,5 \times 10^{-3}$ M, $6,0 \times 10^{-7}$ M ve $6,52 \mu\text{A mM}^{-1}$ olarak bulundu. Hazırlanan biyosensörün tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirliğinin oldukça iyi olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Biyojenik amin, Triptamin, Biyosensör, Karbon nanotüp, Kalay oksit nanopartikül

Tryptamine Biosensor Based on Amino-Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes, Tin Oxide Nanoparticles and Diamine Oxidase

ABSTRACT

In this study, amperometric tryptamine biosensor based on amino functionalized multiwalled carbon nanotubes ($\text{NH}_2\text{-MWCNT}$) and tin oxide nanoparticles (SnO_2) modified screen-printed carbon electrode (SPCE) was developed. Diamine oxidase (DAO) enzyme was covalently immobilized onto $\text{NH}_2\text{-MWCNT-SnO}_2\text{/SPCE}$ surface via (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) chemistry. The resulting electrode surface was finally covered with Nafion in order to prevent enzyme leakage from the surface and minimize the effect of interferences. The surface morphology, electrochemical behaviour and analytical performance of the biosensor was investigated by scanning electron microscopy (SEM), cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and chronoamperometry methods. Linear working range, limit of detection and sensitivity of the developed biosensor was found to be $2.0 \times 10^{-6} - 2.5 \times 10^{-3}$ M, 6.0×10^{-7} M ve $6.52 \mu\text{A mM}^{-1}$, respectively. Biosensor also showed high repeatability and reproducibility.

Keywords: Biogenic amine, Tryptamine, Biosensor, Carbon nanotube, Tin oxide nanoparticle

I. GİRİŞ

Biyojenik aminler bazı serbest amino asit ve proteinlerin enzimatik dekarboksilasyonu sonucunda oluşan düşük mol kütleli organik bileşiklerdir [1]. Bu bileşikler, özellikle protein bakımından zengin olan balık ve balık ürünleri, et ve et ürünleri, peynir ve diğer mandıra ürünleri ve bira, şarap gibi çeşitli fermente içeceklerde yaygın olarak bulunur [2]. Gıdaların işlenmesi ya da uygun şartlarda saklanmaması gibi durumlarda mikroorganizmalar tarafından hızla üretilen biyojenik aminler gıda bozulma göstergesi olarak kullanılabilir [3]. Yüksek oranlarda biyojenik amin içeren gıdaların tüketilmesi baş ağrısı, soğuk terleme, yüksek ya da düşük kan basıncı, mide bulantısı, kalp çarpıntısı, ani ateş basmaları ve daha ciddi durumlarda ölümle sonuçlanabilen sağlık problemlerine yol açabilir [4, 5]. Bu sebeple biyojenik amin tayini hem klinik açıdan hem de gıda endüstrisi açısından büyük öneme sahiptir.

Gıdalarda yaygın olarak bulunan biyojenik aminlerden birisi olan triptamin, triptofanın dekarboksilasyonu sonucu sentezlenir [6]. Yüksek oranda triptamin içeren gıdaların tüketilmesinin yüksek tansiyona yol açabileceği bildirilmiştir [1]. Triptaminin memelilerin beyin dokusunda eser miktarlarda bulunduğu ve nöromodülatör veya nörotransmitter olarak görev yaptığı da rapor edilmiştir [7]. Bu nedenle, triptamin tayini için hızlı, güvenilir, pratik ve ekonomik analiz yöntemlerinin geliştirilmesi önemlidir. Triptamin tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografi [8], sıvı kromatografi/tandem kütle spektrometri [9], iyon kromatografi [10], kapiler zone elektroforez [11] gibi pek çok yöntem geliştirilmiştir. Ancak, bu yöntemlerin genellikle uzun ön hazırlama aşamaları gerektirme, konusunda uzman personele ihtiyaç duyulması, pahalı ve zaman alıcı olma gibi dezavantajları vardır. Hızlı, pratik, ucuz, seçici ve yüksek hassasiyetle ölçüme imkân veren elektrokimyasal biyosensörler triptamin tayini için iyi bir alternatiftir ve literatürde triptamin tayini için geliştirilmiş çeşitli (biyo)sensörler mevcuttur [1, 12, 13]. Son yıllarda triptamin tayini için yapılan çalışmalarda ise, karbon nanomateryallerin kullanımına dayalı bazı sensörler göze çarpmaktadır [14, 15].

Nanomateryaller, üstün özelliklerinden dolayı, son yıllarda biyosensör geliştirme çalışmalarında yaygın biçimde kullanılmaktadır [16]. Sadece karbon atomu içeren silindirik şeklindeki bir karbon allotropu olan ve S. Iijima (1991) tarafından keşfedilen karbon nanotüpler bu nanomateryallerden birisidir [17]. Karbon nanotüpler, mekanik sağlamlık, kimyasal kararlılık, yüksek en/boy (uzunluk/çap) oranı, iyi elektriksel ve termal iletkenlik, hızlı elektron aktarımı, biyouyumluluk, kolay modifiye edilebilirlik gibi pek çok üstün özelliklere sahiptir [18]. Literatürde karbon nanotüplerin kullanıldığı biyosensörlerin geleneksel katı elektrotlara dayanan biyosensörlerle kıyaslandığında daha yüksek duyarlık, daha düşük gözlenebilme sınırları ve daha hızlı elektron aktarım kinetikleri gibi üstün özelliklere sahip olduğu ve biyosensörün performans özelliklerini geliştirdiği rapor edilmiştir [19-21].

Kalay oksit oda sıcaklığında 3,6 eV'luk geniş bir bant boşluğuna sahip yarı iletken bir metal oksittir [22]. SnO₂ nanopartiküller ise ucuz olmaları, kimyasal kararlılıklarının yüksek olması ve uygun elektriksel özellikler göstermeleri nedeni ile pek çok biyosensör uygulamasında kullanılmaktadır [23-26]. Ayrıca, SnO₂'nin karbon nanomalzemelerle oluşturulan nanokompozitlerinin saf SnO₂'den çok daha iyi bir performans gösterdiği rapor edilmiştir [27].

Bu çalışmada, triptamin tayini için yukarıda özellikleri açıklanan NH₂-MWCNT ve SnO₂ nanopartiküller kullanılarak tek kullanımlık perde-baskılı karbon elektrotlara (SPCE) dayanan biyosensör geliştirilmesi amaçlandı. Modifikasyonda kullanılan nanomalzemelerin sinerjik bir etki ile geliştirilecek biyosensörün duyarlık, kararlılık, gözlenebilme sınırı, çalışma aralığı gibi performans faktörlerini iyileştireceği düşünüldü. Elektrot modifikasyonunda kullanılan maddelerin yüzey morfolojisine ve elektrodun elektrokimyasal özelliklerine etkileri belirlendi. Ayrıca, elektrodun optimum çalışma koşulları belirlenerek bu koşullar altında triptamin için performans özellikleri araştırıldı.

II. MATERYAL VE YÖNTEM

A. KULLANILAN KİMYASALLAR

Diamin oksidaz (DAO, E.C. 1.4.3.22, Porcine kidney), kalay(IV) oksit nanopartikül, kitosan, Nafyon® (düşük mol kütleli alifatik alkollerdeki kütlece %5'lik çözeltisi), N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) karboimid (EDC), N-hidroksi süksinimid (NHS), potasyum ferrisiyanür, potasyum hekzasiyanoferrat ve triptamin Sigma Aldrich; hidroklorik asit ve potasyum klorür Merck; sodyum hidroksit, sodyum dihidrojenfosfat-2-hidrat, sodyum monohidrojen fosfat-7-hidrat Riedel-de Haën ve NH₂-MWCNT Cheap Tubes Inc. firmalarından temin edildi. Tüm çözeltiler ultra saf su kullanılarak hazırlandı ve ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Hazırlanan elektrotların elektrokimyasal özelliklerini aydınlatmak için 100 mM KCl içeren 5,0 mM K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] (1:1) çözeltisi içinde dönüşümlü voltametri (CV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ölçümleri yapıldı.

B. CİHAZLAR VE ÖLÇÜMLER

Elektrokimyasal ölçümleri gerçekleştirmek için Metrohm Autolab elektrokimyasal analiz sistemi (Eco-Chemie, Utrecht, The Netherlands) ve BASi C3 hücre standı (Bioanalytical Systems, Inc., USA) kullanıldı. Biyosensör yapımında kullanılan SPCE'ler Dropsens firmasından temin edildi. Kullanılan SPCE'ler bir karbon çalışma elektrodu (çap: 4 mm), bir Ag referans elektrot ve bir karbon karşıt elektrottan oluşur. Elektrotların yüzey morfolojisini incelemek için taramalı elektron mikroskobu (SEM, FEI, Quanta 450 FEG) kullanıldı.

C. DAO/NH₂-MWCNT-SnO₂/SPCE BİYOSENSÖRÜNÜN HAZIRLANMASI

Derişimi 10 mg mL⁻¹ olan kitosan çözeltisi (CS), 0,05 g kitosanın 5,0 mL 0,10 M pH 5,0 asetat tamponunda çözülerek oda sıcaklığında 4 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılması ile hazırlandı. 15'er mg SnO₂ ve NH₂-MWCNT tartılarak 1,0 mL kitosan çözeltisine (15 mg mL⁻¹) eklendi ve 4 saat ultrasonik banyoda bekletilerek homojen bir karışım elde edilmesi sağlandı. Bu karışım 3 µL alınarak SPCE yüzeyine damlatıldı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Elde edilen modifiye elektrot yüzeyi 3 µL EDC (50 mM)-NHS (200 mM) karışımı ile muamele edilip 5 µL DAO'nun immobilize edilmesiyle DAO/NH₂-MWCNT-SnO₂/SPCE biyosensörü oluşturuldu. Son olarak, enzimlerin yüzeyden uzaklaşmasını engellemek ve girişim etkilerini azaltmak için, hazırlanan elektrot yüzeyi nafyon ile kaplandı.

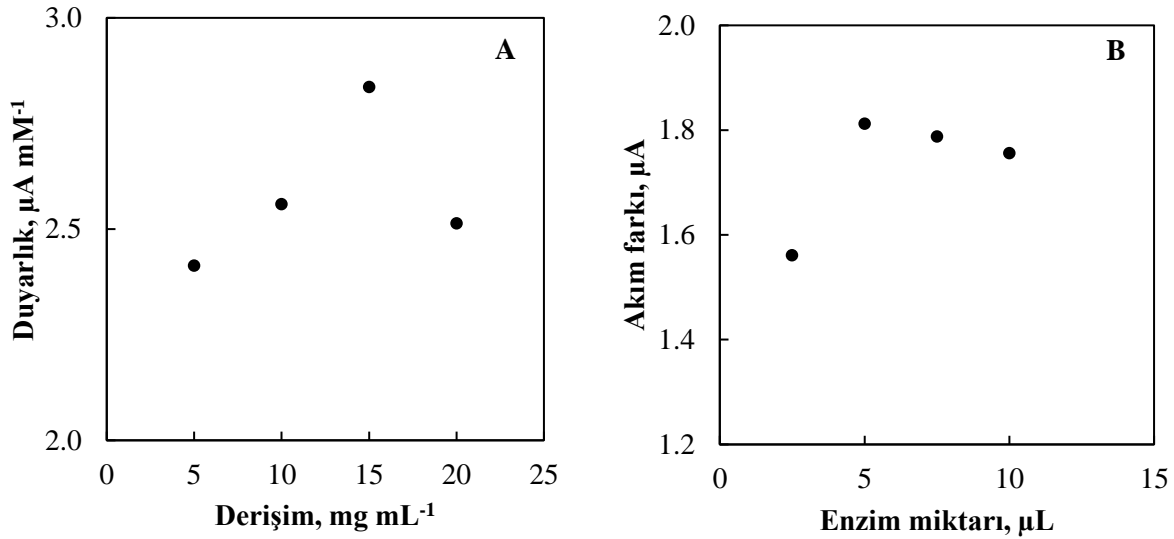
III. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

DAO/NH₂-MWCNT-SnO₂/SPCE biyosensörü ile yapılan çalışmalardan elde sonuçlar ve ilgili tartışmalar aşağıda ayrıntılı biçimde verildi.

A. YÜZEY BİLEŞİMİNİN OPTİMİZASYONU

Elektrot yüzey bileşiminin optimize edilmesi biyosensörün analitik karakteristiklerinin geliştirilmesi açısından büyük öneme sahiptir. Bu sebeple, SPCE yüzeyinin modifiye edilmesinde kullanılan karbon nanotüp ve metal oksit nanopartiküllerin miktarları optimize edildi. Bu amaçla, SnO₂ ve NH₂-MWCNT'nin her biri 5; 10; 15 ve 20 mg olacak şekilde alınan tartımların 1,0 mL CS'de dağıtılması ile hazırlanan NH₂-MWCNT-SnO₂-CS kompozit malzeme kullanılarak SPCE'ler modifiye edildi ve bu yüzeye DAO enzimi immobilize edilerek oluşturulan biyosensörlerin triptamin duyarlığına bakıldı. Elde edilen duyarlıklar nanomalzeme derişimlerine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 1.A). En yüksek duyarlığın, 15 mg mL⁻¹ SnO₂ ve NH₂-MWCNT içeren karışım kullanılarak hazırlanan elektrot ile elde edildiği görüldü. Bu değerler yüzey bileşimi için optimum miktar olarak kabul edildi ve DAO/NH₂-MWCNT-SnO₂/SPCE biyosensörünün hazırlanmasında kullanıldı.

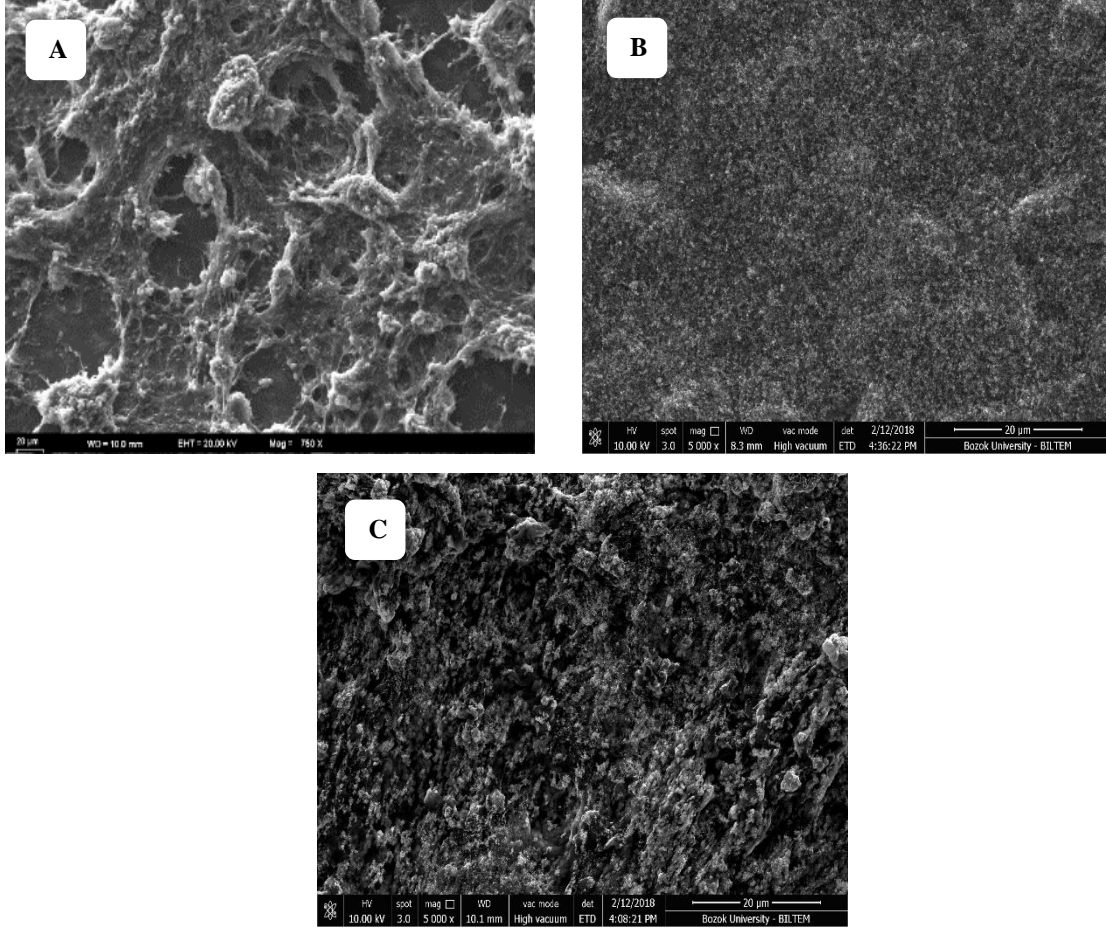
İlgili biyosensörde enzim miktarını optimize etmek için ITONP/PB/SPCE'lerin yüzeyine 2,5; 5; 10 ve 15 μL DAO enzimi çözeltisi (20 mg mL^{-1}) immobilize edilerek hazırlanan 4 farklı biyosensörün sabit triptamin derişimde ölçülen amperometrik akım cevapları kaydedildi ve enzim miktarına karşı grafiğe geçirildi (Şekil 1.B). Biyosensör yüzeyindeki enzim miktarı 2,5 μL 'den 5 μL 'ye çıkarken akım cevabının önemli ölçüde arttığı; daha fazla enzim immobilizasyonunda ise, akım cevabının bir miktar düştüğü gözlemlendi. Elde edilen sonuçlardan, 5 μL DAO enzimi kullanılarak hazırlanan biyosensör ile en yüksek akım cevabının elde edilmesi ve fazla miktarda enzim harcanmasının uygun olmaması nedeniyle, diğer tüm çalışmalarda bu enzim miktarı ile hazırlanan biyosensörler kullanıldı.



Şekil 1. DAO/ NH_2 -MWCNT- SnO_2 /SPCE'nin (A) triptamin duyarlığına nanomalzeme miktarının (NH_2 -MWCNT: SnO_2 oranı 1 olarak alındı) ve (B) akım cevabına enzim miktarının etkisi

B. YÜZEY MORFOLOJİSİ

Taramalı elektron mikroskobu, biyosensör hazırlama aşamalarında kullanılan modifikasyon malzemelerinin yüzey morfolojisine etkilerini incelemek için yaygın olarak kullanılır. Şekil 2'de (A) NH_2 -MWCNT/SPCE, (B) SnO_2 /SPCE ve (C) NH_2 -MWCNT- SnO_2 /SPCE modifiye elektrotlara ait SEM görüntüleri verildi. Bu görüntüler incelendiğinde, CS içinde dağıtılan NH_2 -MWCNT ve SnO_2 nanopartiküllerin elektrot yüzeyinde homojen biçimde dağıldığı ve herhangi bir kümelenme olmadığı gözlemlendi. Literatürde, karbon nanotüpler için Görüntü A'dakine benzer yapıların gözlemlendiği çalışmalar rapor edilmiştir [28]. Görüntü B ayrıntılı biçimde incelendiğinde, SnO_2 nanopartiküllere ait olduğu düşünülen küçük yuvarlak yapılar görülmektedir. Görüntü C'de ise NH_2 -MWCNT- SnO_2 karışımının hem SPCE yüzeyinde homojen biçimde dağıldığı hem de nanopartiküllerin karbon nanotüpler arasına girerek enzim immobilizasyonu için son derece uygun olan gözenekli bir yapı oluşturduğu görüldü. Böyle gözenekli bir yapı, elektrodun yüzey alanını da arttıracığından daha fazla enzimin elektrot yüzeyine immobilize edilebilmesi açısından da büyük öneme sahiptir.



Şekil 2. SEM görüntüleri: (A) $\text{NH}_2\text{-MWCNT/SPCE}$ ($20\ \mu\text{m}$; $\text{EHT}=20.00\ \text{kV}$; $\text{Mag}=750\ \text{X}$), (B) $\text{SnO}_2\text{/SPCE}$ ($20\ \mu\text{m}$; $\text{EHT}=10.00\ \text{kV}$; $\text{Mag}=5000\ \text{X}$) ve (C) $\text{NH}_2\text{-MWCNT-SnO}_2\text{/SPCE}$ ($20\ \mu\text{m}$; $\text{EHT}=10.00\ \text{kV}$; $\text{Mag}=5000\ \text{X}$)

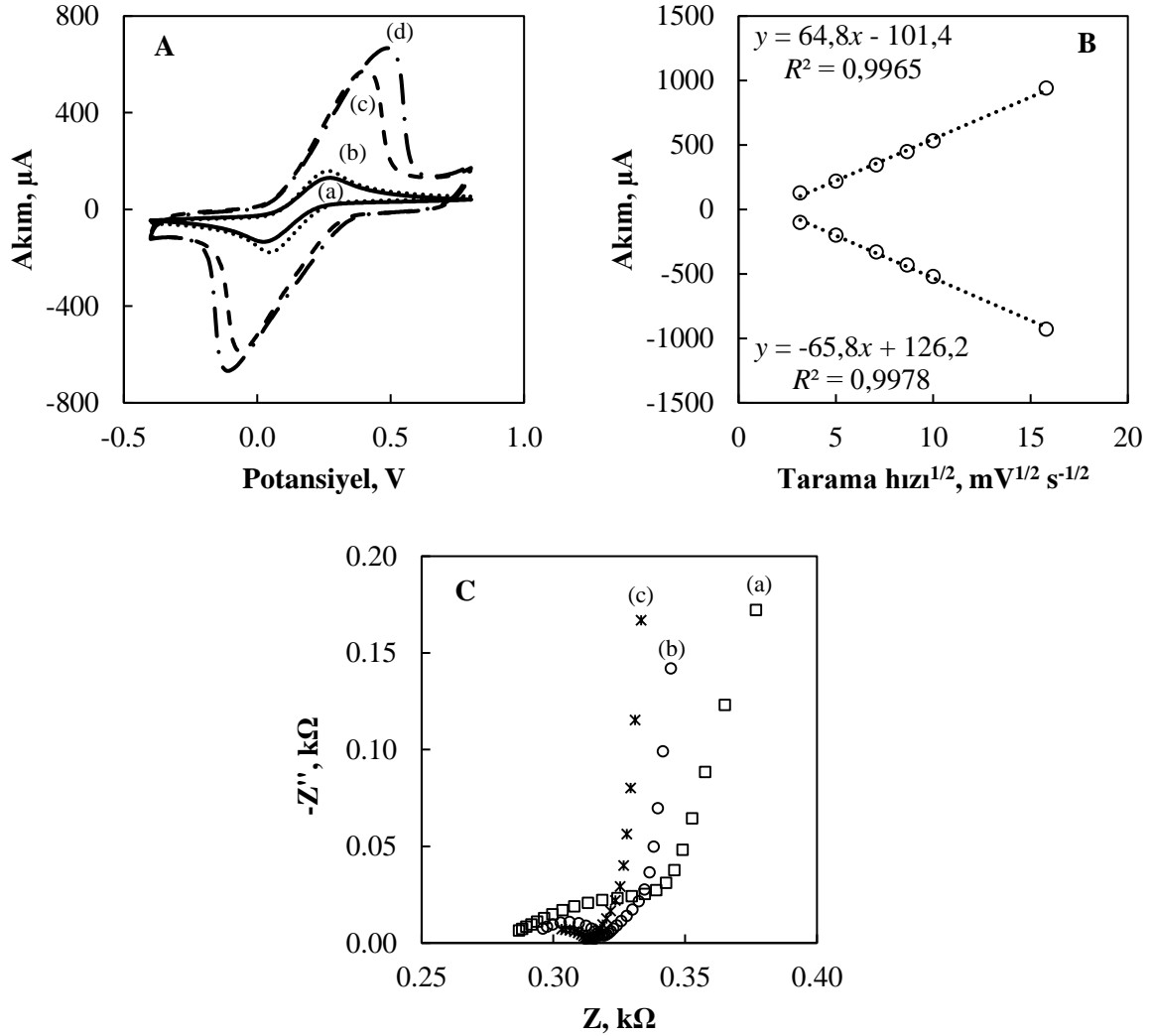
C. ELEKTROKİMYASAL KARAKTERİZASYON

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks probunun dönüşümlü voltamogramı yüzeyi modifiye edilmiş elektrotların özelliklerini araştırmak için uygun bir araçtır. Bu çalışmada (a) SPCE, (b) $\text{SnO}_2\text{/SPCE}$, (c) $\text{NH}_2\text{-MWCNT/SPCE}$ ve (d) $\text{NH}_2\text{-MWCNT-SnO}_2\text{/SPCE}$ 'lerin $5,0\ \text{mM}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ içeren $100\ \text{mM}$ KCl çözeltisinde dönüşümlü voltamogramları alındı (Şekil 3A). Bu dört voltamogramda da $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çiftine ait tersinir pikler gözlemlendi. SPCE yüzeyi SnO_2 nanopartikülleri ile modifiye edildiğinde, pik akımlarının bir miktar arttığı ancak, ΔE_p değerinin biraz düştüğü belirlendi. Yüzey $\text{NH}_2\text{-MWCNT}$ ile modifiye edildiğinde, pik akımlarının SPCE ve $\text{SnO}_2\text{/SPCE}$ ile elde edilen akımlarla kıyaslandığında, önemli ölçüde arttığı gözlemlendi. Bu durum, $\text{NH}_2\text{-MWCNT}$ 'lerin redoks probu ve elektrot arasında elektron aktarımını kolaylaştırdığı şeklinde yorumlandı. En yüksek pik akımı ise, $\text{NH}_2\text{-MWCNT-SnO}_2\text{/SPCE}$ ile elde edildi. SPCE yüzeyi sadece SnO_2 nanopartikülleri ile modifiye edildiğinde akımın önemli ölçüde artmaması; ancak, SnO_2 nanopartikülleri ve $\text{NH}_2\text{-MWCNT}$ kullanılarak oluşturulan $\text{NH}_2\text{-MWCNT-SnO}_2\text{/SPCE}$ 'nin pik akımının artması, bu iki malzemenin bir arada kullanılmasının sinerjik bir etki gösterdiği desteklemektedir.

$\text{NH}_2\text{-MWCNT-SnO}_2\text{/SPCE}$ 'nin elektron aktarım mekanizmasını aydınlatmak amacıyla, bu elektrodun $5,0\ \text{mM}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ içeren $100\ \text{mM}$ KCl çözeltisinde $-0,40\ \text{V}$ ile $+0,80\ \text{V}$ aralığında $10\ \text{mVs}^{-1}$ 'den $250\ \text{mVs}^{-1}$ 'e kadar değişen farklı tarama hızlarında voltamogramları alındı ve pik akımları tarama hızının kareköküne karşı grafiğe geçirilerek Şekil 3B'de verildi. Şekil incelendiğinde, anodik ve katodik pik

akımlarının tarama hızının karekökü ile doğrusal olarak değiştiği görüldü ve bu durum elektrot yüzeyinde elektron aktarım mekanizmasının difüzyon kontrollü olduğu şeklinde yorumlandı [29].

Elektrotların yüzey iletkenliğinin belirlenmesinde elektrokimyasal empedans spektroskopisi yönteminden yararlanıldı. Şekil 3C, (a) SnO₂/SPCE, (b) NH₂-MWCNT/SPCE ve (c) NH₂-MWCNT-SnO₂/SPCE'lerin 5,0 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} içeren 100 mM KCl çözeltisinde elde edilen Nyquist eğrilerini göstermektedir. Eğriler incelendiğinde, dönüşümlü voltametri sonuçları ile uyumlu olduğu, modifiye edilmemiş SPCE'nin elektron aktarım direnci daha yüksek iken SPCE yüzeyinin SnO₂ veya NH₂-MWCNT ile modifiye edilmesinin direnci düşürdüğü ve en düşük direncin NH₂-MWCNT-SnO₂/SPCE ile elde edildiği görüldü.



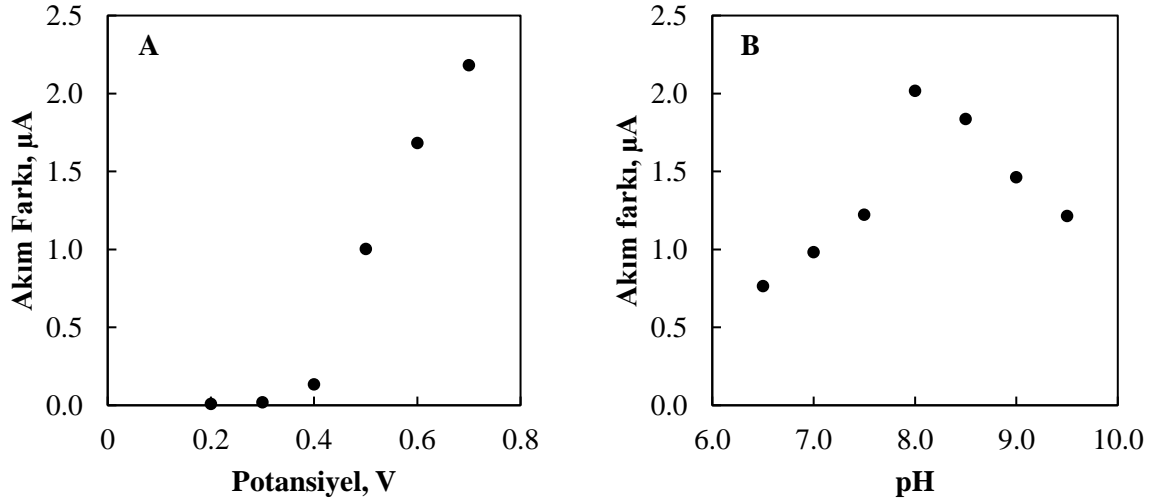
Şekil 3. (A) Dönüşümlü voltamogramlar: (a) SPCE, (b) SnO₂/SPCE, (c) NH₂-MWCNT/SPCE ve (d) NH₂-MWCNT-SnO₂/SPCE. (B) NH₂-MWCNT-SnO₂/SPCE ile farklı tarama hızlarında elde edilen pik akımlarının tarama hızının kareköküne karşı grafiği. (C) Nyquist eğrileri: (a) SnO₂/SPCE, (b) NH₂-MWCNT/SPCE ve (c) NH₂-MWCNT-SnO₂/SPCE (5,0 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} içeren 100 mM KCl çözeltisinde)

D. ÇALIŞMA KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

DAO/NH₂-MWCNT-SnO₂/SPCE'nin optimum çalışma potansiyeli ve çalışma ortamının pH'sı aşağıda anlatıldığı gibi belirlendi.

Çalışma potansiyelinin biyosensörün duyarlığı üzerine etkisi büyüktür. Bu nedenle, biyosensör ile en iyi duyarlığın elde edilebilmesi için çalışma potansiyelini optimize etmek gerekir. Çalışma potansiyelini belirlemek amacıyla, DAO/NH₂-MWCNT-SnO₂/SPCE'nin 0,10 mM'lık sabit triptamin derişiminde fosfat tamponu çözeltisinde (+0,30)–(+0,70) V aralığında değişen potansiyellerde akım cevabı ölçüldü ve elde edilen akım farkları potansiyele karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.A). Şekil 4 incelendiğinde, akım farklarının +0,50 V'dan itibaren artmaya başladığı görüldü. +0,50; +0,60 ve +0,70 V'da elde edilen kalibrasyon eğrilerinin eğimleri ve doğrusal çalışma aralıkları karşılaştırıldığında, aralarında önemli bir fark olmadığı gözlemlendi ve numunelerde bulunan yükseltgenebilecek türlerin girişim etkilerini azaltabilmek amacı ile DAO/NH₂-MWCNT-SnO₂/SPCE ile +0,50 V'da çalışılmasının uygun olacağı öngörüldü.

Enzimlerin aktivitesi üzerine ortam pH'sının etkisi olduğu bilinmektedir [30]. Bu nedenle, DAO/NH₂-MWCNT-SnO₂/SPCE'nin cevabına çalışma ortamının pH'sının etkisi belirlendi. Bu amaçla, çözelti pH'sı 6,5-9,5 aralığında değiştirilerek 7 farklı fosfat tampon çözeltisi hazırlandı. Sabit derişimde (0,10 mM) triptamin içeren bu çözeltilerde biyosensörün triptamine amperometrik cevabı ölçüldü. Elde edilen akım farklarının pH'ya karşı grafiğe geçirilmesi ile çizilen eğri incelendiğinde (Şekil 4.B), en yüksek akım farkının pH 8,0'de elde edildiği gözlemlendi ve bu değer optimum pH olarak seçildi.

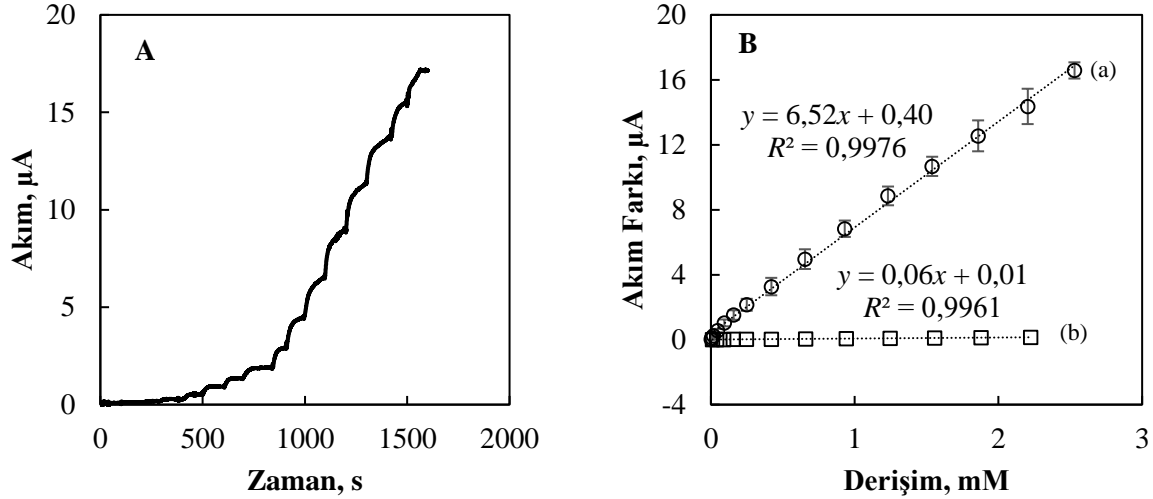


Şekil 4. DAO/NH₂-MWCNT-SnO₂/SPCE akım cevabına (A) çalışma potansiyelinin ve (B) pH'nın etkisi

E. PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

Hazırlanan DAO/NH₂-MWCNT-SnO₂/SPCE'nin duyarlık ve çalışma aralığını belirlemek amacıyla, +0,50 V'da triptamine cevabı, krotoamperometrik yöntemle incelendi (Şekil 5A). Bu yöntemden elde edilen akım farkları triptamin derişimine karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri oluşturuldu (Şekil 5B). Ayrıca, modifikasyon malzemelerinin (NH₂-MWCNT ve SnO₂) bu biyosensörün triptamin cevabını iyileştirip iyileştirmediğini belirlemek için DAO/SPCE elektrodu da hazırlandı ve bu elektrot ile elde edilen kalibrasyon eğrisi de aynı şekil üzerinde verildi. Şekil incelendiğinde, DAO/NH₂-MWCNT-SnO₂/SPCE'nin triptamine 2,0×10⁻⁶–2,5×10⁻³ M aralığında 6,52 µA mM⁻¹ duyarlıkla doğrusal cevap gösterdiği; ancak, modifikasyon malzemeleri kullanılmadan hazırlanan biyosensörün çalışma aralığının daha dar (1,0×10⁻⁵–2,2×10⁻³ M) ve duyarlığının ise oldukça düşük (0,06 µA mM⁻¹) olduğu gözlemlendi. Bu bulguların ışığında, NH₂-MWCNT ve SnO₂ malzemelerinin elektrot modifikasyonunda kullanılmasının biyosensörün triptamin duyarlığı üzerinde oldukça etkin olduğu sonucuna varıldı. DAO/NH₂-MWCNT-SnO₂/SPCE'nin gözlenebilirme sınırı, kalibrasyon eğrisinin en düşük derişimindeki çözeltinin akım farklarının 10 defa ölçülmesi, bu ölçümlerin standart sapmasının (s) hesaplanması ve bu değerin kalibrasyon eğrisinin eğimine (m) bölünmesi ile 3s/m formülünden

$6,0 \times 10^{-7}$ M olarak hesaplandı. Elde edilen çalışma aralığı ve gözlenebilme sınırı değerleri, literatürde triptamin için rapor edilen diamin oksidaz temelli biyosensörlerinki ile karşılaştırıldığında, doğrusal çalışma aralığı ve gözlenebilme sınırı için sırasıyla, 1,4-diaminbenzen ile modifiye edilmiş platin elektrot [13] ile elde edilen $2,0 \times 10^{-5}$ – $5,0 \times 10^{-3}$ M ve $1,0 \times 10^{-5}$ M; selüloz asetat membran, enzimatik membran ve polikarbonat membran ile modifiye edilmiş platin elektrot [31] ile elde edilen $3,5 \times 10^{-5}$ – $1,0 \times 10^{-4}$ M ve $1,8 \times 10^{-6}$ M değerlerinden daha geniş ve daha düşük olduğu görüldü.



Şekil 5. (A) DAO/NH₂-MWCNT/SnO₂/SPCE ile triptamin için elde edilen akım zaman grafiği. (B) (a) DAO/NH₂-MWCNT/SnO₂/SPCE ve (b) DAO/SPCE ile triptamin için elde edilen kalibrasyon eğrileri

Söz konusu biyosensörün tekrar kullanılabilirliği; aynı biyosensör kullanılarak çizilen üç kalibrasyon eğrisinin duyarlıklarının bağıl standart sapmasından; tekrar üretilebilirliği ise, aynı yolla hazırlanan üç farklı biyosensör kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrilerinin duyarlıklarının bağıl standart sapmalarının hesaplanması ile değerlendirildi ve bu bağıl standart sapmalar sırasıyla %4,1 ve %5,2 olarak bulundu. Bu değerler söz konusu biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin ve tekrar üretilebilirliğinin oldukça iyi olduğunu gösterdi. Modifiye SPCE'lerin tekrar kullanılabilirliğinin iyi olmasının, NH₂-MWCNT-SnO₂ ile modifiye edilen yüzeye DAO enziminin EDC-NHS kimyasıyla kovalent olarak bağlanması sonucu kullanım sırasında enzimin çözeltiye geçişinin azalmasından kaynaklandığı düşünüldü.

Hazırlanan biyosensörlerin cevabına, çeşitli amino asitlerin girişim etkisi incelendi. Girişim etkileri incelenen bu amino asitler, gıdalarda yaygın olarak bulunan biyojenik aminlerin öncüleridir ve gerçek numunelerde biyojenik aminler ile birlikte bulunabilirler. Girişim çalışmasında, $4,0 \times 10^{-5}$ M triptamin içeren çözeltide DAO/NH₂-MWCNT-SnO₂/SPCE'nin cevabı kronoamperometrik olarak belirlendi ve elde edilen akım farkı değeri 100 kabul edildi. Aynı çözeltiye, Tablo 1'de verilen amino asitlerin aynı derişimde çözeltilerinden art arda ilave edildi ve akım farkı cevapları kaydedildi. Bu akım farkları triptaminin akım farkı ile karşılaştırılarak yüzde girişim hesaplandı (Tablo 1). Pek çok amino asidin girişim etkisinin %10'dan daha küçük olduğu; ancak, elektroaktif özellik gösteren triptofan ve tirozinin ciddi bir girişim etkisi yaptığı belirlendi. Sonuç olarak, bu biyosensör kullanılarak çeşitli numunelerde triptamin tayininin standart katma yöntemi ile yapılabileceği düşünüldü.

Tablo 1. DAO/NH₂-MWCNT-SnO₂/SPCE biyosensörünün cevabına çeşitli türlerin etkisi (Sonuçlar dört ölçümün ortalamasıdır).

Substrat	Girişim, %
Triptamin	100,0
Triptofan	50,3
Histidin	-3,9
Lizin	-3,1
Ornitin	-5,1
Arjinin	-4,9
Tirozin	56,0
Fenilalanin	-9,3

IV. SONUÇ

Bu çalışmada, triptamin tayini için geliştirilecek biyosensörlerde, SPCE yüzeylerinin modifikasyonunda amin fonksiyonlu çok duvarlı karbon nanotüp (NH₂-MWCNT) ve kalay oksit nanopartiküllerin (SnO₂) etkin maddeler olduğu görüldü. Bu matris ortamının diamin oksidaz (DAO) enziminin immobilizasyonu için oldukça iyi olduğu belirlendi. Geliştirilen bu biyosensörün triptamine iyi bir duyarlılıkla geniş bir aralıkta doğrusal cevap verdiği ve bu aralığın literatürde triptamin tayini için DAO enzimine dayanan diğer bazı biyosensörlerden daha geniş olduğu gözlemlendi. İyi bir tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik gösteren bu biyosensörün, standart katma yöntemi ile gıdalarda triptamin tayininde kullanılabileceği değerlendirildi.

TEŞEKKÜR: Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje no: 116Z159).

V. KAYNAKLAR

- [1] X. Xing, S. Liu, J. Yu, W. Lian ve J. Huang, "Electrochemical sensor based on molecularly imprinted film at polypyrrole-sulfonated graphene/hyaluronic acid-multiwalled carbon nanotubes modified electrode for determination of tryptamine," *Biosensors and Bioelectronics*, c. 31, s. 1, ss. 277–283, 2012.
- [2] T. Ramon-Marquez, A. L. Medina-Castillo, A. Fernandez-Gutierrez ve J. F. Fernandez-Sanchez, "Novel optical sensing film based on a functional nonwoven nanofibre mat for an easy, fast and highly selective and sensitive detection of tryptamine in beer," *Biosensors and Bioelectronics*, c. 79, ss. 600–607, 2016.
- [3] B. Bóka, N. Adányi, D. Virág, M. Sebela ve A. Kiss, "Spoilage Detection with Biogenic Amine Biosensors, Comparison of Different Enzyme Electrodes," *Electroanalysis*, c. 24, s. 1, ss. 181–186, 2012.
- [4] J. H. Mah, H. K. Han, Y. J. OH, M. G. Kim ve H. J. Hwang, "Biogenic amines in Jeotkals, Korean salted and fermented fish products," *Food Chemistry*, c. 79, s. 2, ss. 239–243, 2002.
- [5] L. Beneduce, A. Romano, V. Capozzi, P. Lucas, L. Barnavon, B. Bach, P. Vuchot, F. Grieco ve G. Spano, "Biogenic amine in wines," *Annals of Microbiology*, c. 60, s. 4, ss. 573–578, 2010.

- [6] H. Tatsumi ve T. Ueda, "Ion transfer voltammetry of tryptamine, serotonin, and tryptophan at the nitrobenzene/water interface," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, c. 655, s. 2, ss. 180–183, 2011.
- [7] X. Meng, W. Guo, X. Qin, Y. Liu, X. Zhu, M. Pei ve L. Wang, "A molecularly imprinted electrochemical sensor based on gold nanoparticles and multiwalled carbon nanotube–chitosan for the detection of tryptamine," *RSC Advances*, c. 4, s. 73, ss. 38649–38654, 2014.
- [8] N. Innocente, M. Biasutti, M., Padovese ve S. Moret, "Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract," *Food Chemistry*, c. 101, s. 3, ss. 1285–1289, 2007.
- [9] G. Sagratini, M. Fernández-Franzón, F. De Berardinis, G. Font, S. Vittori ve J. Mañes, "Simultaneous determination of eight underivatized biogenic amines in fish by solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry," *Food Chemistry*, c. 132, s. 1, ss. 537–543, 2012.
- [10] G. Favaro, P. Pastore, G. Sacconi ve S. Cavalli, "Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by ion chromatography and integrated pulsed amperometric detection on Au electrode," *Food Chemistry*, c. 105, s. 4, ss. 1652–1658, 2007.
- [11] F. Kvasnička ve M. Voldřich, "Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection," *Journal of Chromatography A*, c. 1103, s. 1, ss. 145–149, 2006.
- [12] D. J. E. Costa, A. M. Martínez, W. F. Ribeiro, K. M. Bichinho, M. S. D. Nezio, M. F. Pistonesi, M. C. U. Araujo, "Determination of tryptamine in foods using square wave adsorptive stripping voltammetry," *Talanta*, c. 154, ss. 134–140, 2016.
- [13] D. Compagnone, G. Isoldi, D. Moscone, G. Palleschi, "Amperometric detection of biogenic amines in cheese using immobilised diamine oxidase," *Analytical Letters*, c. 34, s. 6, ss. 841–854, 2001.
- [14] X. Xing, S. Liu, J. Yu, W. Lian, J. Huang, "Electrochemical sensor based on molecularly imprinted film at polypyrrole-sulfonated graphene/hyaluronic acid-multiwalled carbon nanotubes modified electrode for determination of tryptamine," *Biosensors and Bioelectronics*, c. 31, ss. 277–283, 2012.
- [15] X. Meng, W. Guo, X. Qin, Y. Liu, X. Zhu, M. Pei, L. Wang, "A molecularly imprinted electrochemical sensor based on gold nanoparticles and multiwalled carbon nanotube–chitosan for the detection of tryptamine," *RSC Advances*, c. 4, ss. 38649–38654, 2014.
- [16] M. Holzinger, A. Le Goff ve S. Cosnier, "Nanomaterials for biosensing applications: a review," *Frontiers in Chemistry*, c. 2, s. 63, ss. 1–10, 2014.
- [17] S. Iijima, "Helical microtubules of graphitic carbon," *Nature*, c. 354, ss. 56–58, 1991.
- [18] A. T. Lawal, "Synthesis and utilization of carbon nanotubes for fabrication of electrochemical biosensors," *Materials Research Bulletin*, c. 73, ss. 308–350, 2016.
- [19] A. P. Periasamy, Y. J. Chang ve S. M. Chen, "Amperometric glucose sensor based on glucose oxidase immobilized on gelatin-multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode," *Bioelectrochemistry*, c. 80, s. 2, ss. 114–120, 2011.

- [20] Y. C. Tsai ve C. C. Chiu, "Amperometric biosensors based on multiwalled carbon nanotube-Nafion-tyrosinase nanobiocomposites for the determination of phenolic compounds," *Sensors and Actuators B: Chemical*, c. 125, s. 1, ss. 10–16, 2007.
- [21] C. Kaçar, P. E. Erden ve E. Kılıç, "Amperometric L-lysine enzyme electrodes based on carbon nanotube/redox polymer and graphene/carbon nanotube/redox polymer composites," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, c. 409, s. 11, ss. 2873–2883, 2017.
- [22] S. K. Mahadeva ve J. Kim, "Conductometric glucose biosensor made with cellulose and tin oxide hybrid nanocomposite," *Sensors and Actuators B: Chemical*, c. 157, s. 1, ss. 177–182, 2011.
- [23] N. Jia, Q. Zhou, L. Liu, M. Yan ve Z. Jiang, "Direct electrochemistry and electrocatalysis of horseradish peroxidase immobilized in sol–gel-derived tin oxide/gelatin composite films," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, c. 580, s. 2, ss. 213–221, 2005.
- [24] A. A. Ansari, A. Kaushik, P. R. Solanki ve B. E. Malhotra, "Electrochemical cholesterol sensor based on tin oxide-chitosan nanobiocomposite film," *Electroanalysis*, c. 21, s. 8, ss. 965–972, 2009.
- [25] C. Kaçar, P. E. Erden ve E. Kılıç, "Amperometric L-lysine biosensor based on carboxylated multiwalled carbon nanotubes-SnO₂ nanoparticles-graphene composite," *Applied Surface Science*, c. 419, ss. 916–923, 2017.
- [26] Q. Zhou, L. Yang, G. Wang ve Y. Yang, "Acetylcholinesterase biosensor based on SnO₂ nanoparticles–carboxylic graphene–nafion modified electrode for detection of pesticides," *Biosensors and Bioelectronics*, c. 49, ss. 25–31, 2013.
- [27] Z. Wen, Q. Wang, Q. Zhang ve J. Li, "In situ growth of mesoporous SnO₂ on multiwalled carbon nanotubes: A novel composite with porous-tube structure as anode for lithium batteries," *Advanced Functional Materials*, c. 17, s. 15, ss. 2772–2778, 2007.
- [28] S. Aftaba, G. Özçelikay, S. Kurbanoglu, A. Shah, F. J. Iftikhar ve S.A. Özkan, "A novel electrochemical nanosensor based on NH₂-functionalized multi walled carbon nanotubes for the determination of catechol-orto-methyltransferase inhibitor entacapone," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, c. 165, ss. 73–81, 2019.
- [29] X. Wang, Y. Zhanga, C. E. Banks, Q. Chenc ve X. Ji, "Non-enzymatic amperometric glucose biosensor based on nickel hexacyanoferrate nanoparticle film modified electrodes," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, c. 78, ss. 363–366, 2010.
- [30] Ö. Türkarlan, S. Kırıl Kayahan, L. Toppare, "A new amperometric cholesterol biosensor based on poly(3,4-ethylenedioxyppyrole)," *Sensors and Actuators B: Chemical*, c. 136, s. 2, ss. 484–488, 2009.
- [31] R. Draisci, G. Volpe, L. Lucentini, A. Cecilia, R. Federico ve G. Palleschi, "Determination of biogenic amines with an electrochemical biosensor and its application to salted anchovies," *Food Chemistry*, c. 62, s. 2, ss. 225–232, 1998.