

**YÜZEYDE GÜÇLENDİRİLMİŞ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ
(SERS) TEMELLİ PLATFORMLARIN GELİŞTİRİLMESİ VE
BİYOANALİZLERDE KULLANIMI**

**DEVELOPMENT OF SURFACE ENHANCED RAMAN
SPECTROSCOPY (SERS) BASED SUBSTRATES AND
APPLICATIONS ON BIOANALYSIS**

AKİF GÖKTUĞ BOZKURT

PROF. DR. İSMAİL HAKKI BOYACI

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

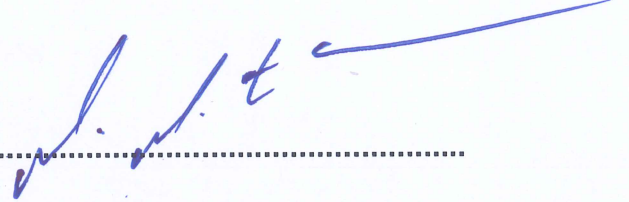
GIDA Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

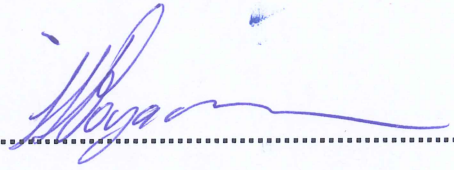
2018

AKİF GÖKTUĞ BOZKURT 'un hazırladığı “Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS) Temelli Platformların Geliştirilmesi ve Biyoanalizlerde Kullanımı” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI** 'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

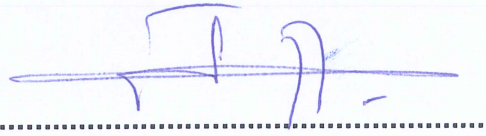
Prof. Dr. Mehmet Mutlu
Başkan



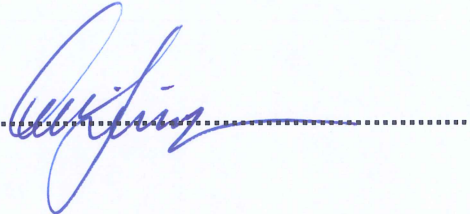
Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı
Danışman



Prof. Dr. Uğur Tamer
Üye



Doç. Dr. Ali Topcu
Üye



Dr. Öğr. Üyesi F. Ceyda Dudak Şeker
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☒ Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☐ Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- ☐ Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

12 / 06 / 2018

Akif Göktuğ Bozkurt

(İmza)

Öğrencinin Adı Soyadı

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırdığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim

12/06/2018

Akif Göktuğ BOZKURT

ÖZET

YÜZEYDE GÜÇLENDİRİLMİŞ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ (SERS) TEMELLİ PLATFORMLARIN GELİŞTİRİLMESİ VE BİYOANALİZLERDE KULLANIMI

Akif Göktuğ BOZKURT

Doktora, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI

Haziran 2018, 121 sayfa

Yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (SERS), analitlerin düşük konsantrasyonlarında belirlenebilmesini sağlayan güçlü bir tekniktir. Metalik nanoyapılar kullanılarak, hedeflenen moleküldeki kimyasal bağların titreşim enerjilerine ait sinyaller zenginleştirilmektedir. SERS tekniğinin uygulanmasında yaygın olarak koloidal nanopartiküllerden ve katı yüzeylerde oluşturulan plazmonik SERS temelli platformlardan faydalanılmaktadır. Bu tez kapsamında, farklı gıda örneklerinde ve biyolojik ortamlarda bulunan biyomoleküllerin tespitine yönelik SERS ölçümlerinde kullanılacak platformlar geliştirilmiş ve hedeflenen moleküller için uygulamaları yapılarak zenginleştirme faktörleri (EF), gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin edilebilir alt sınır (LOQ) değerleri hesaplanmıştır.

SERS temelli platformları oluşturulması için koloidal özellikte çubuk şeklinde altın nanopartiküller (Au-NRs) ve küresel şekilli gümüş nanopartiküller (AgNPs) sentezlenmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonları yapılarak plazmon bandları, şekil ve boyutları belirlenmiştir. Biyoanalizlerde iki farklı teknik kullanılarak; koloidal haldeki nanopartiküllerin süspansiyonları ve altın kaplı cam yüzeyler üzerine nanopartiküllerin

kimyasal ve fiziksel bağlarla immobilize edilmeleri sonucunda üç farklı özellikte SERS temelli platformlar oluşturulmuştur. Bu platformlar Au-NRs, AgNPs ve Au-AgNPs olarak adlandırılmış ve hedeflenen biyomoleküller için geliştirilen biyoanalizlerde kullanılacak şekilde seçilmiştir.

Tez kapsamında askorbik asitin belirlenmesine yönelik SERS aktif işaretçi molekülleri kullanılarak bir yöntem geliştirilmiş ve askorbik aside ait kantitatif değerler hesaplanarak LOD ve LOQ sırasıyla; $1,37 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve $4,56 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur. İşaretçi olarak kullanılan bromkresol yeşili üzerinden hesaplanan EF değeri $1,33 \times 10^9$ olarak bulunmuştur.

Kafeinin analizi için geliştirilen üç farklı SERS temelli platform kullanılarak SERS ölçümleri alınmış ve EF değerleri karşılaştırılmıştır. İçlerinden en iyi performansı gösteren gümüş nanopartiküllerin altın yüzeylere kendiliğinden tek tabaka (SAM) oluşturacak şekilde immobilize olduğu Au-AgNPs yüzeyler kullanılmıştır. Bu platform için EF değeri $6,7 \times 10^9$ olarak hesaplanmıştır. SERS ölçümleri 20X ve 50X mercekleri kullanılarak alınmıştır. Elde edilen spektrumlar üzerinden hesaplanan LOD ve LOQ değerleri; 20X mercek için sırasıyla 0,1904 ve $0,6346 \text{ mg ml}^{-1}$ ve 50X mercek için sırasıyla 0,0678 ve $0,2260 \text{ mg ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Yapay tatlandırıcıların SERS temelli platformlar kullanılarak belirlenebilmesi için asesulfam K, siklamat, sukraloz, aspartam ve sakarine ait spektrumlar alınmış ve EF değerleri her bir platform için hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar üzerinden aspartamın maden sularında yapay tatlandırıcı olarak miktarının belirlenmesine yönelik AgNPs nanopartikülleri kullanılarak SERS temelli bir yöntem geliştirilmiştir. Sade ve meyve aromalı maden sularında LOD değerleri ise sırasıyla; 0,13 ve $0,14 \text{ mg ml}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Aspartam tayinine yönelik geliştirilen yöntem ile birlikte aspartamın içeceklerde yasal sınırı $0,6 \text{ mg ml}^{-1}$ olan miktarın alt ve üst noktalarında kolaylıkla tespit edilebildiği görülmüştür.

Alkalın fosfataz enzimi (ALP) klinik çalışmalarda ve metabolik aktivitelerde elzem bir role sahip olan önemli bir enzimdir. ALP aktivitesinin geliştirilen SERS temelli platformlar ile belirlenmesi için ölçümler alınmış ve 10^{-11} - 10^{-15} M konsantrasyon aralığında yapılan ölçümlerde en iyi performansın Au-NRs nanopartiküllerin kullanılmasıyla alındığı tespit edilmiştir. ALP'nin enzimatik reaksiyonu sonucu ortaya çıkan 5-bromo-4-kloro-3 indol (BCI) ürünün SERS aktif özelliğinden yararlanılmış ve sandviç yapılı immunoassay geliştirilerek *Escherichia coli* bakterisi için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla; 10 ve 30 kob ml^{-1} bulunarak tayin edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Yüzeyde zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi (SERS), altın nanopartikül, gümüş nanopartikül, askorbik asit, yapay tatlandırıcılar, kafein, alkalın fosfataz enzimi, *Escherichia coli*

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF SURFACE ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY (SERS) BASED SUBSTRATES AND APPLICATIONS ON BIOANALYSIS

Akif Göktuğ BOZKURT

Doctor of Philosophy, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI

June 2018, 121 pages

Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) is a powerful technique that enables the determination of analytes at low concentrations. Using the high plasmon resonance of the metallic nanostructures, the signals of the vibrational energies of the chemical bonds belonging to the targeted molecule are enhanced. Colloidal nanoparticles and plasmonic SERS-based platforms formed on solid surfaces were frequently utilized for the application of SERS technique. In this thesis, platforms that can be used in SERS measurements for the determination of biomolecules in different food samples and biological environments were developed. Enhancement factors (EF), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values were calculated for the developed detection platforms of each targeted analyte.

Gold nanorod particles (Au-NRs) and spherically shaped silver nanoparticles (AgNPs) were synthesized to form SERS-based platforms. The characteristics of the synthesized nanoparticles were determined and the plasmon bands, shapes and sizes were determined. Using two different techniques in bioassays; suspension of nanoparticles in colloidal state and

immobilization of nanoparticles on gold-coated glass surfaces by chemical and physical bonds have resulted with three different SERS-based platforms. These platforms were named as Au-NRs, AgNPs and Au-AgNPs and were chosen to be used in bioassays developed for the targeted biomolecules.

In the context of the present thesis, an indirect method was developed by using SERS active reporter molecules for the quantitative determination of ascorbic acid. LOD and LOQ values were found to be $1,37 \mu\text{g ml}^{-1}$ and $4,56 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. The EF value calculated for bromocresol green, that was used as the reporter molecule, was found to be $1,33 \times 10^9$.

SERS measurements were taken and obtained EF values of three different SERS-based platforms were compared in terms of their performance for caffeine analysis. Au-AgNPs surfaces which were constructed by the formation of self assembled monolayer of silver nanoparticles on gold surface showed the best performance for caffeine analysis. The EF value for this platform was calculated as $6,7 \times 10^9$. SERS measurements were taken by using 20X and 50X objectives. LOD and LOQ values calculated from the obtained spectra were 0,904 and 0,6346 mg ml^{-1} for 20X objective and 0,0678 and 0,2260 mg ml^{-1} for 50X objective, respectively.

Spectra of asesulfame K, cyclamate, sucralose, aspartame and saccharin were taken and EF values were calculated for each platform so that artificial sweeteners could be determined using SERS-based platforms. Based on the results obtained, a SERS-based method was developed using AgNPs nanoparticles to determine the amount of aspartame in artificial sweeteners in mineral waters. LOD values in plain and fruit flavored mineral waters were respectively; 0,13, 0,14 mg ml^{-1} . With the developed method, aspartame has been found to be easily detectable at the upper and lower levels of the legal limit of 0,6 mg ml^{-1} in beverages.

Alkaline phosphatase enzyme (ALP) is an important enzyme that plays a significant role in clinical trials and metabolic activities. SERS measurements were taken to determine ALP activity with the developed SERS-based platforms and it was determined that the best performance was obtained using Au-NRs nanoparticles in measurements between 10^{-11} - 10^{-15} M concentration range. The SERS active property of the 5-bromo-4-chloro-3-indole (BCI) product resulting from the enzymatic reaction of the ALP was exploited in this platform. The sandwich immunoassay was developed and LOD and LOQ values were obtained as 10 and 30 cfu ml^{-1} *Escherichia coli*.

Keywords: Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS), gold nanoparticles, silver nanoparticles, ascorbic acid, caffeine, artificial sweeteners, alkaline phosphatase enzyme, *Escherichia coli*

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesi için gerekli ortamı sunan, çalışmamın sonuca ulaştırılmasında ve karşılaştığım güçlüklerin aşılmasında yön gösterici olan değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI'ya

Tez çalışmalarımda yardımlarını ve bilimsel katkılarını esirgemeyen hocalarım Sayın Prof. Uğur TAMER'e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi F. Ceyda DUDAK ŞEKER'e

Bu tez çalışmasını BİDEB 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı (2015/1) ile destekleyen Türkiye Bilimsel Araştırmalar Kurumu (TÜBİTAK)'a

Bana her konuda yardımcı olan, zamanını, desteğini ve tavsiyelerini benden esirgemeyen değerli dostum Araş. Gör. Havva Tümay TEMİZ'e,

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlanmamı sağlayan değerli hocalarım Dr. Deniz BAŞ, Dr. Esra ACAR SOYKUT, Dr. Haslet EKŞİ ve Dr. Özay MENTEŞ'e

Çalışmalarım boyunca yardım ve desteklerinden ötürü Erhan TEMÜR, Beril ÖZBALCI, Özlem TORUN TEMÜR, Gülizar GÖRKEM BÜYÜKGÖZ, Mehmet ŞÖFÖROĞLU, Çiğdem KAĞANOĞLU, E. Kübra TAYYARCAN, Banu SEZER ve Güverte Lab. Ekibine,

Görevli olarak bulunduğum süre zarfında gösterdikleri ilgi ve anlayış için Araş. Gör. Hüseyin Efe GENİŞ, Araş. Gör. Dr. N. Nur KARAÇAĞLAR, Araş. Gör. Dr. Tuğba BULAT, Araş. Gör. Dr. Beyhan Günaydın DAŞAN, H. Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü personeli ve emeği geçen herkese,

Sevgi ve muhabbetleriyle yanımda olan arkadaşlarım Ceren SEDEF, Demet ATAMAN, Aslıhan ÜNÜVAR, Fazilet MIDIK, Merve ERYILMAZ ve Hilal TORUL'a

Bana daima inanan, dualarıyla ve fedakârlıklarıyla yanımda olan sevgili Annem, Babam, Kardeşlerim ve başta sevgili dedem Yasin BOZKURT olmak üzere BOZKURT ailesinin her bir ferdine,

sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Elektromanyetik Radyasyon.....	4
2.2 Raman Saçılımı.....	5
2.3 Raman Spektroskopisi	7
2.3.1 Raman Spektroskopisi Sisteminin Bileşenleri	9
2.4 Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS).....	10
2.5 SERS Temelli Platformlar.....	12
2.5.1 Koloidal Nanopartiküllerin SERS Platformlarında Kullanılması	15
2.5.2 Nanopartiküllerin Yüzeye İmmobilizasyonuyla Oluşturulan SERS Temelli Platformlar	16
2.5.3 Nanoyüzey Fabrikasyonu Yöntemleriyle SERS Temelli Platformların Oluşturulması	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1 Materyal	17
3.1.1 Kimyasal ve Biyokimyasal Malzemeler	17

3.1.2	Tampon Çözeltilerin Hazırlanması	17
3.1.3	Bakterilerin ve Besiyerlerinin Hazırlanması	18
3.2	Yöntem.....	19
3.2.1	Nanopartiküllerin Sentezi	19
3.2.1.1	Gümüş Nanopartiküllerin Sentezi.....	19
3.2.1.2	Altın Nanoçubuk Partiküllerin Sentezi	19
3.2.1.3	Altın Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi.....	20
3.2.2	SERS için Kullanılan Yüzeyler ve Modifikasyonu.....	21
3.2.2.1	Altın Slayt Yüzeylere AgNPs Spotların Oluşturulması	22
3.2.2.2	Altın Slayt Yüzeylere AgNPs'nin Kaplanması	23
3.2.3	Nanopartiküllerin ve Yüzeylerin Karakterizasyonu	25
3.2.3.1	UV-visible Spektrofotometresi.....	25
3.2.3.2	TEM Ölçümü	25
3.2.3.3	Au-AgNPs Yüzeylerin Karakterizasyonu	25
3.2.4	Zenginleştirme Faktörünün (EF) Hesaplanması.....	26
3.2.5	Askorbik Asit Tayinine Yönelik SERS Tabanlı Analizin Geliştirilmesi.....	27
3.2.6	Kafein Tayini için SERS Tabanlı Analizin Geliştirilmesi.....	28
3.2.7	Tatlandırıcıların Tayini için SERS Tabanlı Analizin Geliştirilmesi	29
3.2.7.1	Aspartam Tayini için SERS Tabanlı Analiz Geliştirilmesi	30
3.2.7.2	Aspartamın Maden Suyunda Tayini için Yöntemin Validasyonu	31
3.2.8	ALP Tayini için SERS Tabanlı Analizin Geliştirilmesi	31
3.2.9	<i>Escherichia coli</i> Tayini için SERS Tabanlı İmmunoassayin Geliştirilmesi	32
4.	DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA	36
4.1	Nanopartiküllerin UV-visible Karakterizasyonu.....	36
4.2	Nanopartiküllerin TEM Görüntüleri	38
4.3	Au-AgNPs Yüzeylerin RS Karakterizasyonu	39

4.4	Nanopartikül ve Nanoyüzeylerin Zenginleştirme Faktörleri	40
4.5	SERS Temelli Askorbik Asit Tayini.....	42
4.5.1	Raman Aktif İşaretçi Boyaların RS ve SERS Spektrumları	43
4.5.2	Raman Spektroskopisi İşaretçi Boyalarının Zenginleştirme Faktörlerinin Hesaplanması.....	46
4.5.3	Model Çözelti Oluşturulması ve Analiz Süresinin Optimizasyonu	51
4.5.4	Askorbik Asidin Kalibrasyon Eğrisinin Elde Edilmesi.....	52
4.6	SERS Temelli Kafein Analizi	55
4.6.1	Kafeinin RS Spektrumları ve Farklı pH Değerlerindeki Değişimi	56
4.6.2	Kafeinin SERS Temelli Platformlardaki Spektrumları ve EF Değerleri	58
4.6.3	Kafeinin Kalibrasyon Eğrisinin Elde Edilmesi	61
4.7	Aspartam Analizine Yönelik Geliştirilen SERS Tabanlı Yöntem	65
4.7.1	Yapay Tatlandırıcıların RS Spektrumları.....	66
4.7.2	Yapay Tatlandırıcıların SERS Spektrumları	68
4.7.3	Optimum Süre, pH ve Tamponun Belirlenmesi	74
4.7.4	Maden Suyu İçeriğinin Aspartamın SERS Sinyaline Etkisi.....	77
4.7.5	AgNPs'nin Aspartamın SERS Sinyaline Etkisi	79
4.7.6	Aspartam Miktarının Model ve Gerçek Örneklerde Belirlenmesi	80
4.7.7	Geliştirilen SERS Tabanlı Yöntemin Validasyonu	83
4.8	ALP Tayinine Yönelik Geliştirilen SERS Tabanlı Yöntem	86
4.8.1	ALP'nin Farklı Platformlarda Alınan RS ve SERS Spektrumları.....	87
4.8.2	ALP Konsantrasyonunun Belirlenebilmesi için Kalibrasyon Eğrileri	90
4.9	ALP İşaretli SERS Aktif İmmunoassay Tabanlı <i>Escherichia coli</i> Tayini.....	93
4.9.1	ALP, BCIP ve BCI'nin RS ve SERS Spektrumları.....	94
4.9.2	MNPs-Au ve Au-NRs'nin Optimizasyon ve Modifikasyon Parametreleri	95

4.9.3 Sandviç Yöntemin <i>E. coli</i> Seçiciliğinin Belirlenmesi ve Kalibrasyon Eğrisinin Elde Edilmesi.....	100
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	103
KAYNAKLAR.....	108
ÖZGEÇMİŞ	118



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Raman saçılmasının molekülün titreşim düzeyleri ile olan ilişkisi [14].....	8
Şekil 2.2 Raman Spektroskopisi sistemi ve bileşenleri	9
Şekil 2.3 a) Raman saçılması, b) SERS saçılması molekül-lazer ilişkisi	11
Şekil 3.1 Altın yüzey üzerine oluşturulan AgNPs spotlar	23
Şekil 3.2 1,4 Dithiothreitol molekülünün yapısı [51]	23
Şekil 3.3 Au-AgNPs yüzey ve bileşenleri	24
Şekil 3.4 Bakteri tayini için ALP işaretli sandviç immunomanyetik ayırım (İMA)	33
Şekil 4.1 (a) MNPs-Au, (b) Au-NRs ve (c) AgNPs için UV-visible spektrofotometrede absorbanans spektrumları	37
Şekil 4.2 (a) MNPs-Au, (b) Au-NRs, (c) AgNPs TEM görüntüleri.....	39
Şekil 4.3 Au slayt ve Au-AgNPs yüzeylerin RS spektrumları	39
Şekil 4.4 Küresel AgNPs ve çubuk şekilli Au-NRs partiküllerin yüzey alanlarının hesaplanması	41
Şekil 4.5 SERS spektrumları; a) 1 mM askorbik asit, b) 0,3 mM askorbik asit, c) MES tamponu, d) TLC yüzeyi.....	43
Şekil 4.6 1mM Raman işaretçi boya larına ait a) Raman ve b) SERS spektrumları...	46
Şekil 4.7 Farklı askorbik asit derişimlerinde a) 0,3 b) 0,6 c) 1 d) 3 e) 6 f) 10 mM, A) bromkresol yeşili, B) krezol kırmızı, C) fenol kırmızısına ait SERS spektrumları	50
Şekil 4.8 Zamana bağılı olarak 340 cm ⁻¹ dalga sayısında SERS sinyallerinin değışimi	52
Şekil 4.9 Askorbik asit konsantrasyonlarına bağılı olarak elde edilen SERS sinyal şiddetleri	53
Şekil 4.10 Kafein molekülünün üç boyutlu gösterimi [76].....	56
Şekil 4.11 Kafeine ait a) 0,1 mg ml ⁻¹ , b) 1 mg ml ⁻¹ , c) 10 mg ml ⁻¹ Raman spektrumları	56

Şekil 4.12 10 mg ml ⁻¹ kafeinin, a) pH 7,2 PBS, b) pH 3 sitrat, c) pH 9,8 Tris-HCl tamponunda alınan Raman spektrumları.....	57
Şekil 4.13 a) Altın yüzey, b) 1 mg ml ⁻¹ kafein, c) 1mg ml ⁻¹ kafein ve Au-NRs ait SERS spektrumları.....	59
Şekil 4.14 a) Altın yüzey, b) 1 mg ml ⁻¹ kafein, c) 1mg ml ⁻¹ kafein ve AgNPs ait SERS spektrumları.....	60
Şekil 4.15 a) Altın yüzey, b) 1 mg ml ⁻¹ kafein, c) 1mg ml ⁻¹ kafein ve Au-AgNPs yüzeye ait SERS spektrumları	61
Şekil 4.16 A) 20X mercek kafein Au-AgNPs yüzey, B) 50X mercek Au-AgNPs yüzey	63
Şekil 4.17 Yapay tatlandırıcıların RS spektrumları; a) sukraloz, b) aspartam, c) sakarin, d) siklamat, e) asesulfam K	67
Şekil 4.18 AgNPs kullanılarak elde edilen SERS spektrumları a) aspartam, b) sukraloz, c) sakarin, d)siklamat, e) asesulfam K, f) AgNPs.....	69
Şekil 4.19 Au-AgNPs yüzey kullanılarak elde edilen SERS spektrumları a) sakarin, b) aspartam, c) asesulfam K, d) sukraloz, e) Au-AgNPs yüzey	70
Şekil 4.20 Au-NRs kullanılarak elde edilen SERS spektrumları a) Au-NRs, b) aspartam, c) asesulfam K, d) siklamat, e) sakarin	71
Şekil 4.21 AgNPs ve aspartam kullanılarak 1002 cm ⁻¹ elde edilen sinyal şiddetinin zamanla değişimi.....	74
Şekil 4.22 Farklı pH degerlerindeki tamponların aspartamın 1002 cm ⁻¹ deki SERS sinyali şiddetine etkisi; MES (pH 6,5), PBS (pH 7,4), sitrat (pH 3,5) ve Tris (pH 9,8)	76
Şekil 4.23 Farklı şeker konsantrasyonları aralıklarında 1002 cm ⁻¹ SERS bandında aspartam içeren ve içermeyen sade ve meyve aromalı maden sularının sinyal şiddetinin değişimleri	78
Şekil 4.24 a) meyve aroması, b) sitrik asit, c) % 4'lük glukoz, d) %3'lük fruktoz, e) glukoz/fruktoz 3:2 (h/h), f) glukoz/fruktoz 3:2 (h/h) ve sitrik asit birlikte, g) maden suyu ve h) maden suyu, meyve aroması, sitrik asit, glukoz/fruktoz 3:2 (h/h) karışım halinde alınan SERS spektrumları	79

Şekil 4.25 Aspartam, AgNPs ve aspartam-AgNPs kompleksinin SERS spektrumları	80
Şekil 4.26 Aspartamın (0-1 mg ml ⁻¹) aralığında suda elde edilen kalibrasyon eğrisi.	81
Şekil 4.27 Aspartamın (0-1 mg ml ⁻¹) aralığında sade maden suyunda elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	82
Şekil 4.28 Aspartamın (0-1 mg ml ⁻¹) aralığında meyve aromalı maden suyunda elde edilen kalibrasyon eğrisi	83
Şekil 4.29 ALP enzimatik reaksiyonu sonucu BCIP substratından SERS aktif BCI dimerinin oluşma mekanizması	87
Şekil 4.30 a) BCI (ürün), b) ALP (enzim), c) BCIP (substrat) RS spektrumları	88
Şekil 4.31 a) Au-NRs, b) Au-AgNPs yüzey, c) AgNPs kullanılarak elde edilen BCI (ürün) SERS spektrumları.....	89
Şekil 4.32 AgNPs ile elde edilen ALP konsantrasyonuna bağlı kalibrasyon eğrisi....	90
Şekil 4.33 Au-AgNPs yüzey ile elde edilen ALP konsantrasyonuna bağlı kalibrasyon eğrisi	91
Şekil 4.34 Au-NRs ile elde edilen ALP konsantrasyonuna bağlı kalibrasyon eğrisi ..	92
Şekil 4.35 a) BCI+Au-NRs, b) BCIP+Au-NRs, c) ALP+Au-NRs, d) BCI, e) ALP SERS ve RS spektrumları	94
Şekil 4.36 Au-NRs yüzeyine immobilize edilen ALP konsantrasyonları ve oluşan BCI'nın 600 cm ⁻¹ 'de SERS sinyali şiddeti.	96
Şekil 4.37 Değişen BSA konsantrasyonlarının ALP aktivitesine etkisi	97
Şekil) 4.38 KMNPs-Au: Au-NRs oranının BCI'nın 600 cm ⁻¹ sinyal şiddetine etkisi a) Sadece Au-NRs, b) 1:1 c) 0,2:1 d) 0,1:1.....	99
Şekil 4.39 ALP enzimatik aktivitesine bağlı olarak elde edilen <i>E. coli</i> kalibrasyon eğrisi	102

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 4.1 Raman işaretçi boyaların molekül yapıları ve SERS zenginleştirme faktörleri.....	47
Çizelge 4.2 Askorbik asit tayinine yönelik SERS tabanlı yöntem ile elde edilen istatistiksel parametreler	54
Çizelge 4.3 Askorbik asidin SERS temelli çalışmalarda tespit edilen miktarlarının karşılaştırılması	54
Çizelge 4.4 Bazı gıdalarda ve içeceklerde bulunan kafein miktarları	62
Çizelge 4.5 Au-AgNPs yüzeyde 20X ve 50X mercekle kullanılarak alınan SERS ölçümlerinde kafeine ait kantitatif değerler.....	64
Çizelge 4.6 Yapay tatlandırıcılara ait tatlılık ve günlük kullanım değerleri	66
Çizelge 4.7 Yapay tatlandırıcıların kullanılan AgNPs ve Au-AgNP yüzeylerindeki EF değerleri.....	72
Çizelge 4.8 Meyve aromalı maden suyunda aspartamın SERS ölçümü sonucu geri kazanım değerleri	84
Çizelge 4.9 Geliştirilen aspartam tayini yönteminin gün içi ve günler arası doğruluğu ve tekrarlanabilirliği.....	85
Çizelge 4.10 SERS platformlarının ALP enzimatik aktivite sonucu hesaplanan EF ve R^2 değerleri.....	93
Çizelge 4.11 Farklı bakterilere karşı kullanılan <i>E. coli</i> antikorunun seçiciliği	101

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

11-MUA	: 11-merkaptoundekanoik asit
AgNPs	: Gümüş nanopartikül
Au-AgNPs	: Altın yüzey üzerine gümüş nanopartiküllerin immobilizasyonu
Au-NRs	: Altın nanoçubuk partiküller
BCI	: 5-Bromo-4-kloro-3-indol
ALP	: Alkalın fosfataz enzimi
BSA	: Sığır serum albümini
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
NA	: Mercek açıklık sayısı
R^2	: Determinasyon katsayısı
K	: Potasyum
BCIP	: 5-Bromo-4-kloro-3-indol fosfat
CCD	: Yükten bağımlı aygıt
EDC	: N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodimid hidroklorid
EF	: Zenginleştirme etkisi
h/h	: Hacim/hacim
İMA	: İmmunomanyetik ayırım
kob	: Koloni oluşturan birim
LOD	: Gözlenebilme alt sınırı
LOQ	: Tayin alt sınırı
MES	: 2-morfolinoetanesulfonik asit monohidrat
MNPs-Au	: Altın kaplı manyetik nanopartikül
NHS	: N-Hidroksisüksinimid
PBS	: Fosfat tamponu
RS	: Raman spektroskopisi
SAM	: Kendiliğinden oluşan tek tabaka
SERS	: Yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi
TEM	: Geçişli elektron mikroskobu
TLC	: İnce katmanlı kromatografi kağıdı
UV-Vis	: Mor ötesi-Görünür bölge

1. GİRİŞ

Yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (SERS), plazmonik nanoyapıların üzerinde veya yakınında bulunan moleküllerin, Raman saçılmalarının zenginleşerek yüksek hassasiyetle tanımlanmalarında kullanılan bir titreşim spektroskopisi tekniğidir [1]. Raman sinyallerinin zenginleşmesi elektromanyetik ve kimyasal olarak iki temel mekanizmaya bağlıdır [2, 3]. Elektromanyetik zenginleştirme, metal nanoyapıların sahip olduğu yüzey plazmonik enerjilerinin uyarılması sonucu ortaya çıkmaktadır. Metal nanoyüzeylerde elektromanyetik alanın oluşturduğu üst elektrik alan şiddeti sonucu yüksek halde uyarılmış dipol momenti meydana gelmektedir. Kimyasal zenginleştirme ise metal nanoyapılar ve adsorbe olan molekül arasında meydana gelen yük transferleri sonucu ortaya çıkmaktadır [4]. SERS ölçümlerinde zenginleştirme etkisi (EF); kullanılan plazmonik metal nanoyapıların şekil, boyut, dizilim ve bileşenleri gibi fiziksel özelliklerine bağlı olarak değişmektedir [5]. SERS ölçümleri için zenginleştirme etkisi yüksek, üretimi kolay, ucuz, güvenilir ve hassas sonuçların alınabileceği platformların geliştirilmesi ve uygulamalarda kullanılabilmesi üzerinde yaygın olarak çalışılan konuların başında gelmektedir. Altın ve gümüş, SERS temelli platformlarda en sık kullanılan plazmonik etkisi yüksek metallerdir. Aşağıdan yukarıya (bottom up) veya yukarıdan aşağıya (top down) yöntemleri kullanılarak geliştirilen nanoyapıların SERS aktiviteleri ve buna bağlı olarak zenginleştirme etkileri farklı olmaktadır. Litografi, fiziksel ve kimyasal yolla buhar birikimi (vapor deposition) ve yüzey aşındırma (etching) gibi yukarıdan aşağı metotlar kullanılarak hazırlanan SERS platformlarında yüzeyler üzerinde daha kontrollü nanoyapılar oluşturulması sebebiyle güvenilirlik ve tekrar edilebilirlik düzeyleri yüksek olmaktadır. Bunun yanında yüzey plazmon oluşturma seviyeleri düşüktür ve kullanılan ekipmanların maliyetleri yüksek olmaktadır. Diğer bir yandan ıslak kimya (wet chemistry) yöntemleri kullanılarak sentezlenen kolloidal nanopartiküller kullanılarak oluşturulan SERS temelli yapılarda ise molekül ve plazmonik nanopartiküllerin etkileşimi ve oluşan hot spotların etkisiyle daha hassas tanılama ve yüksek zenginleştirme etkisi gözlenmektedir. Diğer yandan nanopartiküllerin kontrolsüz agregasyonu ve yüzeyde oluşan yapıların düşük homojenizasyonu sonucu SERS sinyallerinde tekrarlanabilirlik konusunda sıkıntılara yol açabilmektedir [6].

Bu tez kapsamında ıslak kimya kullanılarak aşağıdan yukarıya yöntemlerle sentezlenen karakteristik özellikleri farklı kolloidal nanopartiküller üzerinden SERS temelli platformların oluşturulmuş ve biyoanalizlerde kullanılarak karşılaştırmalı olarak hedef moleküllerin kantitatif olarak belirlenmesindeki performanslarının incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla temelde 3 farklı SERS platformu oluşturulmuştur. İlk iki platform kolloidal gümüş ve altın nanopartiküllerin farklı şekil ve boyutlarda sentezlenmesi ve karakterizasyonlarıyla elde edilmiştir. Üçüncü SERS platform ise kolloidal olarak sentezlenen gümüş nanopartiküller kullanılarak altın yüzeylerde kimyasal ve fiziksel yollarla nanopartiküllerin biriktirilmesi sonucu elde edilmiştir. Bu üç platform için; değişen metalik yapıları, boyut ve şekilleri, SERS sinyal şiddetleri ve zenginleştirme etkileri hesaplanarak karşılaştırmalar yapılmıştır.

SERS tekniği kullanılarak gıda, kimya, analitik, biomedikal ve malzeme bilimi gibi pek çok alanda önemli biyoanaliz uygulamaları geliştirilmiştir. Bilinen geleneksel biyoanalizler ile karşılaştırıldığında SERS uygulamalarının avantajlarına bakıldığında; yüzeyde uygulanan SERS hassasiyetinin çok yüksek olması sebebiyle tek bir molekülün belirlenmesi seviyesinde ölçümler alınabilmektedir [7]. SERS sinyalleri sonucu moleküllere ait parmak izi spektrumları biyolojik sistemler içerisinde elde edilebilmekte ve böylece karakteristik olarak tanımlanmaları sağlanmaktadır. Çoklu analiz sistemlerinde birden fazla hedef analit veya molekülün tanımlanmasında ve kantitatif olarak miktarlarının belirlenmesinde SERS kullanılmaktadır [8, 9].

SERS tekniğinin biyoanalizlerde kullanılması, doğrudan hedef molekül üzerinden alınan ölçümlerle veya Raman aktif moleküllerin işaretçi olarak kullanılması sonucu dolaylı ölçümlerle gerçekleştirilmektedir. Doğrudan ölçüm yoluyla hedef moleküllere ait karakteristik parmak izi spektrumları alınabilmektedir. Karmaşık biyolojik sistemlerde bazı durumlarda hedeflenen moleküle ait yeterince yüksek şiddette karakteristik parmak izi spektrumları elde edilemeyebilir. Farklı biyomoleküller birbirlerinin sinyal şiddetlerine girişim yapabilirler veya değişen fiziksel veya kimyasal şartlar yeterli SERS sinyallerinin alınmasını engelleyebilir. Bu durumda kullanılan plazmonik nano yapı yüzeyine veya yakınına biyolojik sistemlerde SERS yönünden güçlü sinyallere sahip işaretçi moleküller kullanılmaktadır. İşaretçi moleküllerden elde edilen sinyaller, geliştirilen yöntemler vasıtasıyla hedeflenen moleküllerin ortamda varlığı durumunda artarak veya azalarak hedeflenen moleküllerin tespiti ve miktar tayini yapılmaktadır.

Bu tez kapsamında geliştirilen SERS temelli platformlar; gıda analizlerinde ve gıda güvenliğinde tespit ve tayin edilmesi önemli olan biyomoleküller, katkı maddeleri, enzim ve bulaşanların miktarlarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Yüksek bir antioksidan kapasitesine sahip olan ve vitamin C olarak bilinen askorbik asidin belirlenmesi için gümüş nanopartiküllerin sentezi sırasında oluşan oksidasyon basamağından yararlanılarak askorbik asidin tespitine yönelik hızlı ve hassas bir yöntem, Raman aktif işaretçi boya molekülleri kullanılarak geliştirilmiştir.

Kafein ve yapay tatlandırıcıların içeceklerde yaygın olarak kullanılması, belirlenen yasal sınır değerleri sebebiyle miktarlarının tespit edilmeleri kritik öneme sahiptir. Tez kapsamında geliştirilen SERS temelli platformlar karşılaştırmalı olarak kullanarak doğrudan hedef moleküllerin parmak izi spektrumlarından elde edilen SERS sinyal şiddetleri üzerinden kafein ve yapay tatlandırıcıların kantitatif olarak belirlenmesine yönelik yöntemler geliştirilmiştir.

Alkalın fosfataz enziminin (ALP) aktivitesi sonucu meydana gelen Raman aktif ürünü işaretçi olarak kullanılarak, SERS temelli platformlarda indirekt ölçümleri alınmıştır. Geliştirilen üç farklı SERS platformundan elde edilen spektrumlar üzerinden ALP konsantrasyonunun belirlenebilmesi için kalibrasyon eğrileri elde edilmiş ve EF değerleri hesaplanarak kendi aralarında karşılaştırılmıştır. ALP konsantrasyonlarının hassas bir şekilde SERS ile doğrudan belirlenebilmesi üzerine ALP metalik nanopartikül üzerine tutuklanması sağlanarak enzimatik aktivitesinden sonra oluşan SERS aktif ürün işaretçi olarak, *E. coli* sayısının belirlenmesine yönelik yöntemde kullanılmıştır.

SERS temelli plazmonik nanoyapılardan oluşan platformların geliştirilmesi ve biyoanalizlerde kullanılmaları sonucunda gıdalarda bulunan farklı özelliklerdeki moleküllerin ve bulaşanların tanımlanmaları ve miktarlarının tespit edilmesiyle SERS uygulamalarında hassas, güvenilir ve seçici yöntemlerin geliştirilmesine katkı sağlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Elektromanyetik Radyasyon

Kızılötesi bölge de dahil olmak üzere tüm dalgalı boyundaki ışık elektromanyetik radyasyon olarak adlandırılmakta ve değişken elektrik ve manyetik alanlardan oluşmaktadır. Elektrik ve manyetik alanlar sürekli sinüsoidal dalga benzeri hareketlerle karakterize edilmektedir. Burada önemli parametreler dalgalı boyu (λ , bir dalgalı nın uzunluğu), frekans (ν , birim zamandaki döngü sayısı) ve dalgalı sayısı ($\tilde{\nu}$, birim uzunluktaki dalgalı sayısı) olarak tanımlanmakta olup aralarındaki ilişki eşitlik (2.1) ile gösterilmiştir.

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu}{\left(\frac{c}{n}\right)} = \frac{1}{\lambda} \quad (2.1)$$

Yukarıdaki bağıntıda c ışık hızını ve n ışığın geçtiği ortamın refraktif indeksini temsil etmektedir. Kuantum teorisine göre radyasyon, bir kaynaktan foton adı verilen kesikli birimler halinde yayımlanmaktadır. Bu fotonun frekansı ν , ve fotonun enerjisi E_p ile temsil edilmektedir. Fotonun frekansı ile enerjisi arasındaki ilişki eşitlik (2.2)'de gösterilmiştir.

$$E_p = h\nu \quad (2.2)$$

Eşitlik (2.2)'de h sembolü Planck sabitini temsil edip değeri 6.6256×10^{-27} erg.s olarak bilinmektedir. Spesifik enerjili fotonlar bir enerji transferi olayının sonucu olarak bir molekül tarafından absorplanabilmekte veya molekülden yayımlanabilmektedir. Bu durum absorpsiyon spektroskopisinde molekülün enerjisinin temel halden spesifik bir uyarılmış hale yükselmesine neden olmaktadır. Tipik olarak bir molekülün rotasyonel (E_{rot}), vibrasyonel (titreşimsel) (E_{vib}) ve elektronik enerjisi (E_{el}) ΔE değeri ile değişmektedir. Aşağıda ΔE değeri ile ilgili eşitlik (2.3) verilmiştir.

$$\Delta E = E_p = h\nu = hc\tilde{\nu} \quad (2.3)$$

Bir fotonun absorplanması sürecinde molekülün enerjisi artmakta ve ΔE pozitif değeri kazanmaktadır. Toplam enerji değeri; rotasyonel, titreşimsel ve elektronik enerjilerinin toplamı olarak ifade edilmekte olup eşitlik (2.4)'de gösterilmiştir.

$$E_T = E_{el} + E_{vib} + E_{rot} \quad (2.4)$$

Kızılötesi ve Raman spektroskopilerinin yoğunlaştırılmış fazdaki ölçümlerinde yalnızca vibrasyonel enerji (E_{vib}) ile ilgilenilmektedir. Yüksek enerjili ışık elektronik enerjide geçişlere sebep olurken düşük enerjili ışık rotasyonel enerjide geçişlere sebep olmaktadır. Gaz fazında ise her iki spektroskopik yöntemin ölçümlerinde de $E_{vib}+E_{rot}$ toplamı göz önünde bulundurulmaktadır.

2.2 Raman Saçılımı

Işığın saçılması olayı; molekül içinde uyarıcı radyasyonun elektromanyetik alanı tarafından indüklenen dipollerin osilasyonu ile üretilen elektromanyetik radyasyon olarak tanımlanabilmektedir. Saçılıma uğrayan fotonlar baskın olarak Rayleigh ve az miktarda Raman saçılımına uğramış ışıktan oluşmaktadır. İndüklenmiş dipol moment, moleküllerin polarlanabilirliklerinin bir sonucu olarak oluşmaktadır. Bu noktada polarlanabilirlik; bir molekülün çevresindeki elektron bulutunun harici bir elektrik alan nedeniyle deformasyona uğrayabilmesi olarak tanımlanmaktadır. Elektromanyetik alan moleküldeki yüklü partiküllerde değişikliğe sebep olarak indüklenmiş dipol moment oluşumuna neden olacaktır.

$$\mu = \alpha E \quad (2.5)$$

Eşitlik (2.5)'de α ; polarlanabilirliği ve E başlangıç elektrik alanını temsil ederken μ indüklenmiş dipol momentini ifade etmektedir. E ve α değerleri zamanla değişiklik gösterebilmektedir. Radyasyonun elektrik alanı zamanın bir fonksiyonu olarak ν_0 frekansı ile salınım göstermekte olup μ dipol momentine sahip molekülün aynı ν_0 frekansındaki salınımına sebep olmaktadır. Bir molekülü polarlanabilirlik değeri belli bir değere sahip olup zamanla çok az değişiklik göstermektedir.

Raman saçılmasının şiddetinin (I_R) bağımlılık gösterdiği parametreler eşitlik (2.6)'da gösterilmiştir.

$$I_R \propto \nu^4 I_0 N (\partial\alpha / \partial Q)^2 \quad (2.6)$$

Yukarıdaki bağıntıda; I_0 başlangıç lazer şiddetini, N saçılıma uğrayan molekül sayısını, ν uyarma lazerinin frekansını, α moleküllerin polarlanabilirliklerini ve Q vibrasyonun miktarını göstermektedir. Verilen bağıntıdan anlaşıldığı gibi Raman sinyali konsantrasyona bağıllık göstermektedir. Bu sayede Raman spektroskopisi ile kantitatif analiz yapılabileceği sonucuna ulaşılmaktadır. Kullanılan lazerin dalgaboyunun azaltılması veya lazer akısının güç yoğunluğunun artırılması yoluyla Raman sinyal

şiddeti artırılabilir. Son olarak, yalnızca molekülün polarlanabilirliğinde bir değişikliğe sebep olabilen moleküler vibrasyonlar Raman aktif özellik göstermektedir. Şayet moleküler bir vibrasyon polarlanabilirlikte herhangi bir değişikliğe sebep olmuyorsa Raman saçılımı gözlenmemektedir. Söz konusu bağıntıda polarlanabilirlikteki değişikliğin vibrasyon miktarına oranının bir diğer deyişle $(\partial \alpha / \partial Q)$ değerinin sıfırdan farklı olduğu kabul edilmektedir.

Raman şiddetini açıklayan bir diğer bağıntı ise polarlanabilirlik ve elektrik alan bileşenlerinin indüklenmiş elektrik dipol moment ile olan ilişkisini açıklamakta olup eşitlik (2.7)'de gösterilmiştir.

$$p = \alpha E \quad (2.7)$$

Eşitlik (2.7)'de E, elektrik alanı ve p indüklenmiş elektrik dipol momentini temsil etmektedir. Mutlak Raman sinyal şiddetleri, polarlanabilirliğin bir türevi olarak ifade edilmektedir ve α' ile gösterilmektedir. Deneysel olarak elastik olmayan Raman saçılması rasgele tüm moleküler oryantasyonlar üzerinden ortalama olarak değerlendirilmektedir. Elastik olmayan Raman saçılması yapan ışığın şiddeti, gelen fotonların akısı ile orantılı olarak değişmekte olup eşitlik (2.8)'de gösterilmiştir.

$$I_{RS} = \sigma_{RS} I_0 \quad (2.8)$$

Burada orantılılık katsayısı; Raman kesit alanı (cross section) σ_{RS} ile gösterilmiştir. Raman kesit alanının birimi cm^2 cinsinden ifade edilmekte ve uyarma frekansının bir fonksiyonu olarak tanımlanmaktadır. Raman kesit alanı, polarlanabilirliğin türevinin karesiyle, saçılma frekansının dördüncü kuvvetiyle orantılı olarak değişmektedir. Eşitlik (2.9) ve (2.10)'da mutlak Raman şiddeti, Raman kesit alanı ve Raman saçılma frekansı arasındaki ilişki gösterilmiştir.

$$\alpha' = (\partial / \partial Q)_0 \quad (2.9)$$

$$\omega_S : \sigma_{RS} = C \omega_S^4 |\alpha'_{mn}|^2 \quad (2.10)$$

Yukarıdaki eşitliklerde m titreşimsel enerji seviyesinden, n titreşimsel enerji seviyesine geçiş için gerekli; C nümerik sabitleri, ω_S , saçılma frekansını ifade etmektedir [10].

2.3 Raman Spektroskopisi

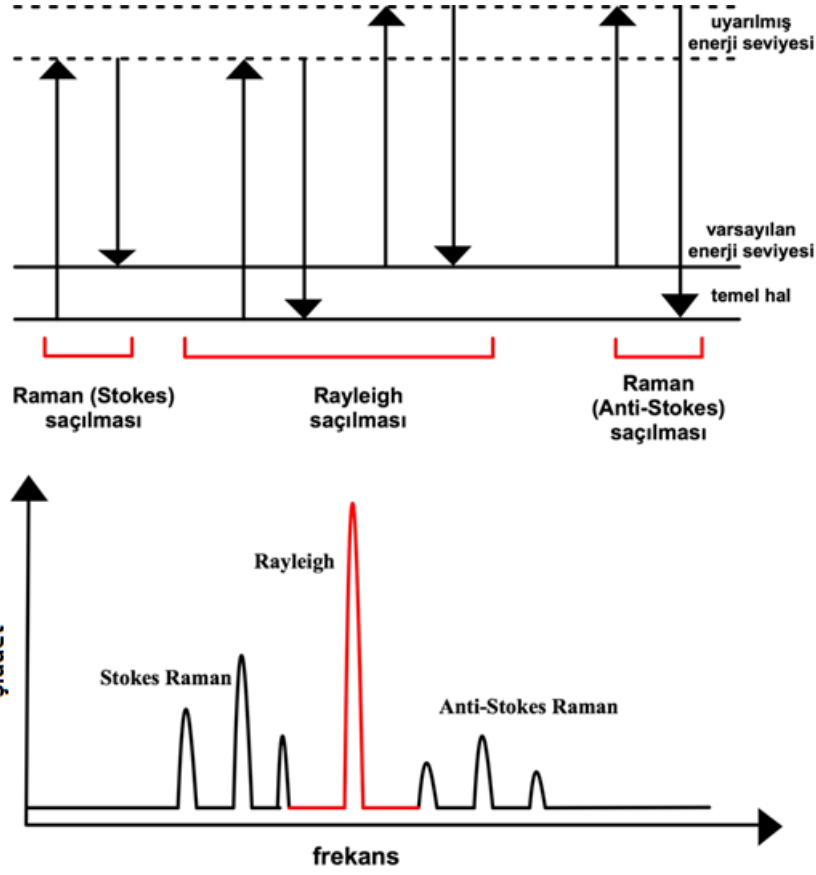
Raman spektroskopisi (RS), yöntemin mucidi olan C.V. Raman'ın onuruna isimlendirilmiş olup tekniğin detaylarının anlatıldığı çalışması K.S. Krishnan ile birlikte ilk olarak 1928 yılında yayınlanmıştır [11].

Raman spektroskopisi çok çeşitli örneklerin analizine imkân sağlayan çok yönlü bir yöntem olarak bilinmektedir. Yöntem, hem nitel hem de nicel analizler için kullanılabilir. Nitel analizlerde Raman saçılması yapan ışığın frekansı ölçülürken, nitel analizler amaçlandığında Raman sinyalinin şiddetinin de ölçülmesi gerekmektedir.

Raman spektroskopisi'nde prensip, saçılan ışığın ölçülmesi olup yöntem Raman Etkisi (Raman Effect)'nin takip edilmesini temel almaktadır. Buna göre, örnek monokromatik bir lazer ışın demetiyle uyarılmakta ve bu ışın örneğin molekülleriyle etkileşmekte ve etkileşim sonucunda ışığın bir kısmı saçılmaya uğramaktadır. Örnekteki moleküllerle etkileşen ışık tüm yönlerde saçılmaya uğramaktadır. Saçılan ışığın çok büyük bir kısmı frekans değişimine uğramamaktadır ve bu tür elastik saçılma olayına Rayleigh saçılması adı verilmektedir. Rayleigh saçılmasında dalgaboyu, uyarıcı kaynağın dalgaboyuyla tamamen aynı olup şiddeti elastik olmayan saçılmaya kıyasla daha fazladır.

Saçılan ışığın çok küçük bir kısmının ise frekansı başlangıçta örnekle etkileşen ışığın frekansından farklı olmaktadır. Bu durum ışığın titreşim halindeki moleküllerle etkileştikten sonra elastik olmayan saçılma yapmasıyla açıklanmaktadır. Raman saçılmasının diğer saçılma türlerinden farkı saçılan ışıktaki gözlemlenen frekans değişimidir. Bu frekans değişimleri, moleküllerdeki titreşim enerji geçişleriyle meydana gelmektedir. Raman spektroskopisi söz konusu bu moleküler titreşimleri takip etmektedir. Elastik olmayan saçılma yapan ışık Raman spektrumunu oluşturmaktadır [12]. Başlangıç frekansı saçılan ışığın frekansından yüksekse Raman spektrumunda Stokes bantları gözlemlenmekte, aksi halde yani saçılan ışığın frekansının yüksek olması durumunda ise Raman spektrumunda anti-Stokes bantları gözlemlenmektedir. Stokes bantları düşük enerjili titreşim seviyesinden yüksek enerjili titreşim seviyesine geçişleri içerdiğinden anti-Stokes bantlarına kıyasla daha yüksek sinyal şiddetine sahip olmakta ve konvansiyonel Raman spektroskopisi ile ölçülebilmektedir. Anti-Stokes bantları ise floresans veren örneklerde ölçülebilmekte çünkü floresans Stokes

bantları ile interferansa neden olmaktadır [13]. Şekil 2.1’de Rayleigh ve Raman saçılmaları için kuantum enerji geçişlerinin gösterildiği Jablonski Diyagramı verilmiştir.



Şekil 2.1 Raman saçılmasının molekülün titreşim düzeyleri ile olan ilişkisi [14]

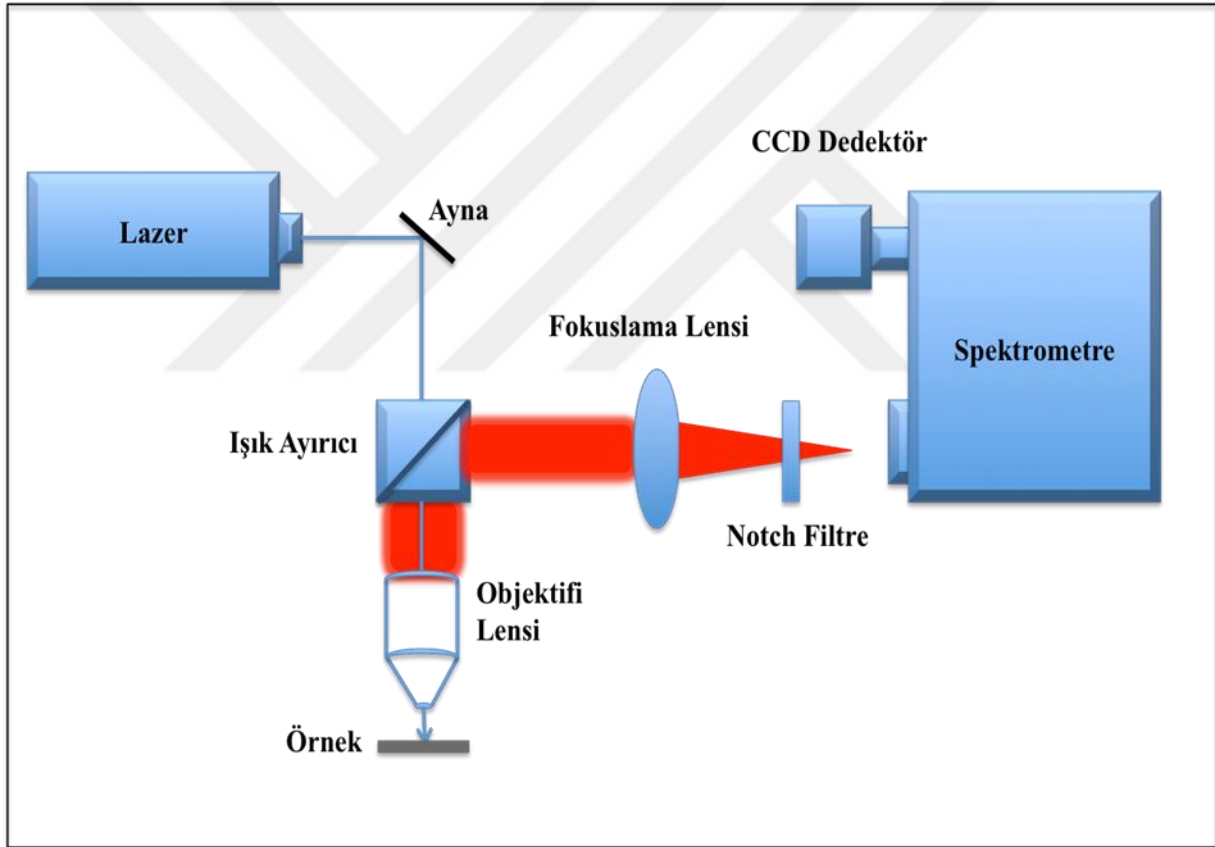
Başlangıçta temel titreşim seviyesinde bulunan moleküller Stokes Raman saçılmasına sebebiyet verirken, başlanıçta uyarılmış enerji seviyesinde bulunan moleküller anti-Stokes Raman saçılmasının gerçekleşmesine sebebiyet vermektedirler. Stokes ve anti-Stokes saçılmaların intensite oranları örneğin mutlak sıcaklığı ve temel hal ile uyarılmış titreşim seviyesi arasındaki enerji seviyesi farkı ile orantılı olarak değişmektedir. Termal dengenin sağlandığı durumda Boltzmann yasası Stokes ve anti-Stokes saçılmaların intensite oranlarını belirlemektedir. Oda sıcaklığı koşullarında pek çok molekül temel halde bulunduğundan Stokes Raman bantları anti-Stokes Raman bantlarına kıyasla çok daha yüksek şiddete sahip olmaktadır.

Molekül tarafından absorplanmayan $h\nu_0$ enerjili bir foton, molekül ile etkileştiğinde saçılma yapmadan önce çok az sayıda foton enerjisinin bir kısmını moleküllere

aktarmakta veya moleküller tarafından çok az sayıda fotona bir miktar enerji aktarılmaktadır. Bu enerji aktarımı olayları sonucunda moleküller fotonla etkileştikten sonra farklı titreşim enerji düzeylerinde bulunmaktadır. Etkileşim sonrasında molekülün titreşim enerjisi artıyorsa Stokes hatları, azalıyorsa anti-Stokes hatları gözlemlenmektedir [15].

2.3.1 Raman Spektroskopisi Sisteminin Bileşenleri

Tipik bir Raman spektroskopisi sistemi Şekil 2.2’de gösterilmiştir; temel olarak lazer kaynağı, numune aydınlatma sistemi ve spektrometreden oluşmaktadır. Raman saçılması düşük şiddetli bir intensiteye sahip olduğundan örneğe yeterli gücün iletilmesi adına ışık kaynağı olarak lazer kullanılmaktadır.



Şekil 2.2 Raman Spektroskopisi sistemi ve bileşenleri

Raman kaymalarının büyüklüğü kullanılan ışık kaynağının dalga boyuna bağımlılık göstermezken Raman saçılması ışık kaynağının dalga boyuna bağımlılık göstermektedir. Moleküler titreşim esnasında molekülün polarlanabilirliğinde bir değişikliğin gözlemlenmesi Raman spektrumunun elde edilebilmesinde önemli bir yere

sahip olmaktadır. Bir molekülün Raman türü saçılma etkileşmesine girebilmesi için molekülün titreşimi sırasında etkileştiği fotonun frekansına eşit frekanslı olarak polarlanabilmesi yani geçici bir dipol momentinin olması gerekmektedir. Asimetrik gerilme titreşimi sırasında molekülün dipol momentinde titreşim ile aynı fazda bir değişme olmaktadır. Bu durum geçici dipol momenti oluşmasını engellemekte ve titreşim sırasında oluşan polarlanabilme değişim frekansı, titreşim frekansı ile uyuşmamaktadır. Bu titreşim türü ise Raman aktif değil, IR aktif olmaktadır [15].

Bir molekülün simetrik özellik gösterip göstermemesi hangi vibrasyonlarının Raman ve Kızılötesi spektroskopilerinde aktif olup olmadığını göstermektedir. Genel olarak simetrik ve faz-ıç (in-phase) vibrasyonlar ile polar olmayan gruplar Raman spektroskopisi ile en kolay çalışılabilen gruplar olmaktadır. Bunun aksine asimetrik ve faz-dışı (out-of-phase) vibrasyonlar ile polar gruplar ise Kızılötesi Spektroskopisi ile daha kolay çalışılabilir. Bir molekülün simetriklik özelliği üzerinden sınıflandırılması molekül yapısı ile vibrasyonel spektrumu arasındaki ilişkinin anlaşılabilmesini kolaylaştırmaktadır [16].

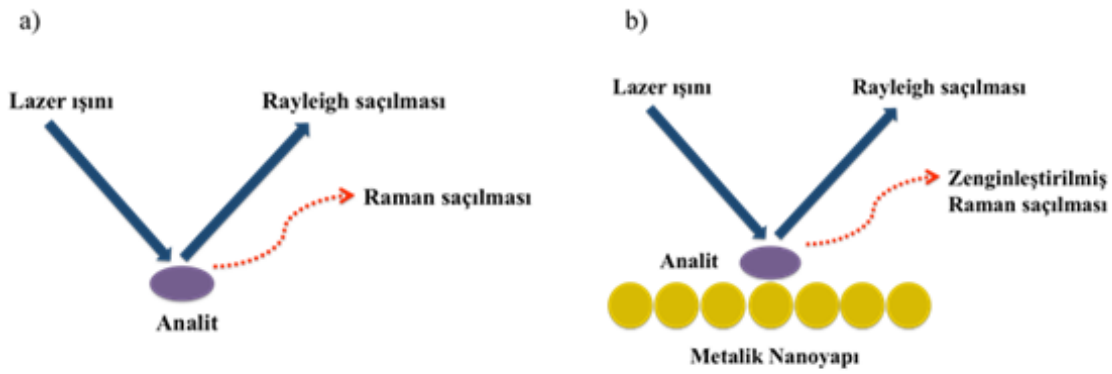
Suyun Raman saçılması düşük olduğundan, Raman spektroskopisi kullanılarak analiz edilecek örneklerde su ideal bir çözücü görevi görebilmektedir. Cam malzemelerin örnek hücresi, ayna ve lens gibi optik ekipmanlarda kullanımı Raman spektrofotometrelerinde uygun olmaktadır [17].

2.4 Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS)

Raman spektroskopisi moleküllerin özgül olarak tanımlanmasında kullanılan önemli bir analitik yöntemdir. Temel olarak; bilinmeyen kimyasal bir örneğin bir lazer kaynağı kullanılarak uyarılmasına dayanmaktadır. Örnek üzerine gönderilen ışığın bir kısmı örnek tarafından absorbe edilmekte, bir kısmı lazerin dalga boyu ile aynı dalga boyunda olmak üzere saçılmaya uğramakta bunların yanında küçük bir kısmı ise analiz edilen moleküldeki titreşimsel geçişlere bağlı olarak farklı dalga boylarında elastik olmayan saçılmaya uğramaktadır. Farklı moleküller farklı titreşim modlarına sahip olduğundan, elastik olmayan saçılma yapan ışığa ait Raman spektrumu analiz edilen moleküle özgül olan “moleküler parmakizinin” bir analogu olarak değerlendirilmektedir. Bu derecede yüksek bir özgüllüğe sahip olmasına rağmen, elastik olmayan saçılma sürecinin çok düşük verimle gerçekleşmesi ve dolayısıyla elde edilen sinyallerin nispeten zayıf

olması nedeniyle geleneksel Raman spektroskopisi sınırlı bir kullanıma sahip olabilmektedir [18].

Raman spektroskopisine ait söz konusu probleme yaklaşık otuz yıl önce SERS yönteminin geliştirilmesiyle alternatif çözümler aranmıştır. SERS yönteminde hedef molekülün analizi gümüş, altın veya bakır gibi metalik bir yüzeyde veya çözelti ortamında çapı uyarma ışığının dalgaboyundan çok çok küçük olan bir nanopartikül varlığında gerçekleştirilmektedir. Söz konusu yüzey veya partikül, ışık ile uyarıldığında yüzey plazmon modu uyarılmakta ve hedef molekülün çevresindeki elektromanyetik enerji lokal olarak çoğaltılmakta ve bu sayede elastik olmayan saçılma yapan ışığın şiddeti önemli oranda arttırılmaktadır. Bu etki Şekil 2.3'de gösterilmiştir. Lazer ve analitin etkileşimi sonucu meydana gelen saçılma sonucu, Raman sinyallerinde gözlemlenen toplam artış oranı 10^{14} kat gibi yüksek oranlara çıkabilmektedir [19].



Şekil 2.3 a) Raman saçılması, b) SERS saçılması molekül-lazer ilişkisi

Gözlemlenen bu etki genel olarak kimyasal etki ve elektromanyetik etki olmak üzere iki temel kavram üzerinden açıklanmaktadır. Elektromanyetik etki mekanizması; iletkenlik (kondüksiyon) bant elektronlarının metal bir yüzeydeki osilasyonu (dalgalanma/salınım) sonucunda saçılan foton sayısının artışı olarak açıklanmaktadır. Bir diğer deyişle uyarıcı ışık, yüzey elektronlarıyla etkileşme yoluyla plazmon oluşumunu sağlamaktadır [20]. Pürüzsüz bir yüzeydeki plazmon enerjisi yüzeye bağlı halde bulunmaktadır. Saçılmanın gerçekleşmesi için yüzeyin, plazmona dik bir bileşen oluşturmak adına, pürüzlü hale getirilmesi gerekmektedir. Böylece, uygun bir şekilde pürüzlü hale getirilmiş yüzeyde plazmon oluşturulabilmektedir. Plazmon enerjisi, analitin molekülleri içerisinde Raman sürecinin gerçekleşmesini sağlamakta, ardından enerji yeniden plazmona aktarılmakta ve Raman süreci sırasında çekirdeğe aktarılan

enerji nedeniyle frekansı değişime uğratarak saçılan ışık spektrometre ile saptanmaktadır. Elektromanyetik etki mekanizması aşağıda üç temel basamak ile özetlenmiştir;

1. Seçilen uyarıcı ışığın bir plazmonu uyarıp saçılmayı sağlayabilmesi adına uygun şekilde pürüzlü hale getirilmiş yüzey üzerine analitin adsorbe edilmesidir.
2. Plazmon enerjisinin adsorbe edilmiş moleküle aktarılması ve Raman sürecinin molekülün içerisinde gerçekleşmesidir.
3. Çekirdeğe transfer edilen miktardan daha az miktardaki enerjinin plazmona geri aktarılması ve dalgaboyu değişimine uğramış ışığın yüzeyden saçılmasıdır [21].

Kimyasal mekanizma ise genellikle analit ve metal yüzey arasında gerçekleşen güçlü bir elektron eşleşmesi sırasındaki yük transferi durumu ile açıklanmaktadır [22]. Bu mekanizmada, molekül bir yük-transfer kompleksi oluşturmak adına metal yüzeye bağlı halde bulunmaktadır. Uyarıcı ışık, bir elektron-boşluk çifti oluşturmak adına metal ile etkileşmekte ve enerji bu yeni metal aracılığıyla molekülün bağlarına aktarılmaktadır. Ardından Raman süreci, analit içerisinde gerçekleşmekte ve enerji saçılmanın gerçekleşmesi adına yeniden metale aktarılmaktadır [21].

Her iki mekanizmada da tayin edilmesi hedeflenen analitin SERS aktif substrat üzerine adsorbe edilmesi gerekmektedir. Ardından substrat lazer ile uyarılmakta ve saçılan ışık Raman spektrometresi ile analiz edilmektedir. Yapılan pek çok deneysel çalışma ile her iki mekanizmanın da SERS etkisinin elde edilmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Bunun yanında genel olarak elektromanyetik etki mekanizmasının kimyasal etki mekanizmasına kıyasla sinyal şiddetinin artırılmasında daha büyük bir role sahip olduğu belirtilmektedir [23].

2.5 SERS Temelli Platformlar

Geçtiğimiz yüz yılda gıdanın kimyasal analizi 'ıslak kimya' temelli laboratuvar metodlarından başta kromatografik ve spektroskopik yöntemler olmak üzere modern analitik enstrümental tekniklerin kullanımına doğru gelişim göstermiştir. Enstrümentasyon, teknoloji ve data analizinde sağlanan sürekli gelişmeler otomasyon, ölçüm süresi, ölçüm hassasiyeti ve kesinliği gibi parametrelerde önemli iyileşmelerin elde edilmesine imkan tanımıştır [24]. Gıda analizlerinde iki kilometre taşından ilki 1952

yılında gaz kromatografisinin (GC) icat edilmesi [25], ikincisi ise 1967 yılında yüksek performanslı sıvı kromatografisinin (HPLC) icat edilmesi olarak kabul edilmektedir [26]. GC ve HPLC gıda analizlerinde sıklıkla kullanılan altın standard analitik araçlar olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemler özgül piklerin moleküler karakteristiklerinin tanımlanmasını sağlayan UV-Vis spektrofotometre, nükleer manyetik rezonans veya kütle spektrometresi gibi yöntemlerle kombine edildiğinde sağlanan fayda daha da arttırılmaktadır [27-29]. Söz konusu bu yöntemler uzman personel ihtiyacı, karmaşık ve zaman alıcı örnek hazırlama basamakları gerektirmesi, analizlerin yalnızca laboratuvar koşullarında gerçekleştirilebilir olması ve büyük boyutta görüntüleme imkanı tanımaması gibi temel dezavantajlara sahiptir. Bu sebeplerle gıda endüstrisinin ihtiyaç duyduğu pekçok gıda analizinde basit, hızlı, taşınabilir ve hassasiyeti yüksek alternatiflere ihtiyaç duyulmaktadır.

Kızılötesi/Infrared ve Raman spektroskopisi gibi Vibrasyonel/Titreşimsel spektroskopik yöntemler 20. yüzyılın başlarında hızlı ve örnekte hasar yaratmayan yöntemler olarak gıda analizlerinde kullanılmaya başlanmıştır. Bu kapsamda çoğunlukla hammaddenin tanımlanması ve kalite kontrolü çalışmaları yürütülmüştür. Sinyallerinin zayıf olması, floresans interferansı ve ekimpanın masraflı olması gibi dezavantajları nedeniyle Raman spektroskopisi Kızılötesi spektroskopisine kıyasla gıda analizlerinde daha az kullanılmıştır [30]. Diğer yandan, su molekülleri çok zayıf Raman saçılması yapmakta ve bu sayede daha az interferansa sebep olmaktadır. Kızılötesi Spektroskopisinde su moleküllerine ait kuvvetli bantlar gözlemlendiğinden suyun neden olduğu interferans çok daha fazla olmaktadır. Raman spektroskopisinde su sinyallerinden kaynaklanan girişimin daha az olması avantaj sağlamaktadır [31].

SERS yönteminin geliştirilmesiyle Raman spektroskopisinin gıda analizlerindeki kullanımı kapsam olarak genişlemiştir [32]. SERS yönteminde soymetaller kullanılarak oluşturulan nanoyapıların Raman saçılım sinyallerinde yüksek oranlarda artış sağlanabildiği ve floresans sinyallerinin baskılanabildiği gösterilmiştir [33]. 1990'ların son yıllarından itibaren SERS teknikleri özellikle gıda kontaminantlarının belirlenmesi amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde ise gıda bileşenlerinin analizinin yanı sıra kimyasal ve mikrobiyolojik kontaminantlar ile gıda katkı maddelerinin belirlenmesi amacıyla SERS yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır [34].

SERS tabanlı gıda analizlerinde iyi performans gösteren bir SERS substratının kullanımı anahtar görevi görmektedir. Hassasiyet ve tekrarlanabilirlik kimyasal analizlerin en önemli iki önemli parametresi olarak tanımlanmaktadır. Kantitatif analizlerde uniform ve tekrarlanabilir bir substrat, özellikle iz analizlerde ve görüntüleme analizlerinde tekrarlanabilir sinyallerin alınması açısından büyük öneme sahiptir.

En sık kullanılan SERS aktif substratlar çapları 10 ile 200 nm arasında değişen altın veya gümüş kolloid tabanlı substratlardır. Bunlar, yüksek miktarlardaki üretimin kolay ve ucuz olmasının yanısıra ticari olarak da erişilebilme gibi avantajlara sahiptir. Bu kapsamda yürütülen çalışmalarda LOD değerleri 2 ppb ile 10 ppm arasında değişmekte ve kolloidlerin boyutu, analitlerin kimyasal yapısı, örnek hazırlama yöntemi ve analiz prosedürü gibi parametrelere bağlılık göstermektedir. Kolloidlerin SERS substratı olarak kullanımındaki temel dezavantaj sinyallerin tekrarlanabilirliğinin düşük olmasıdır. Kolloidler katı bir yüzey üzerinde kurutulduğunda nanopartiküller rasgele agregre olma eğiliminde olduğundan noktadan noktaya sinyal varyasyonları çok yüksek olabilmektedir. Kolloid tabanlı substratların geliştirilmesindeki gelişmeler ile çok bileşenli nanopartiküller üretilmektedir [35, 36].

İyi bir SERS substratı en kuvvetli plazmon rezonansını sağlayan bir diğer deyişle en yüksek sinyal zenginleştirmesini sağlayan yüzeyler olarak tanımlanmaktadır. Bu noktada substratın yüzeyinin her noktasında uniform bir zenginleştirme sağlaması ile yüzeyde sağlanan zenginleştirmenin yüksek oranda varyasyon içermesi arasında farklar bulunmaktadır. İkinci durumda çok yüksek zenginleştirmenin sağlandığı lokalize olmuş belirli noktalar 'hot-spotlar' bulunmaktadır [37]. Bu noktalar özellikle tek bir molekülün tespitinde büyük önem arzetmektedir. İlk durum ise uygulamalarda tekrarlanabilirliğin elde edilmesi adına daha çok tercih edilmektedir.

SERS zenginleştirmesi, substratın rezonant olarak cevabından kaynaklandığı için tipik olarak dalgaboyuna bağımlılık göstermekte uyarma ışığının dalgaboyuna göre değişmektedir. Bu nedenle her substrat yalnızca kısıtlı bir uyarma dalgaboyu aralığında iyi bir zenginleştirme sağlayacaktır. Pek çok SERS substratı, moleküler Raman saçılması deneylerinde kullanılmak üzere genellikle görünür/yakın kızıl ötesi (400-1000 nm) bölgede kullanılabilecek şekilde tasarlanmaktadır [38].

SERS substratlarının üretiminde genellikle altın veya gümüş nanoyapılar kullanılmaktadır. Bu yapılar görünür/yakın kızıl ötesi bölgede iyi bir plazmon rezonansı sağlayacak doğru optik özelliklere sahip olmaları nedeniyle tercih edilmektedir [33].

SERS substratlarının üretiminde genel olarak üç temel yaklaşım vardır; kolloidal halde sentezlenmiş metalik nanopartiküllerin kullanılması, katı yüzeylere kolloidal nanopartiküllerin fiziksel veya kimyasal yollarla immobilizasyonu ve son olarak yukarıdan aşağı üretim yöntemlerinin (nanolitografi) kullanılarak nanoyüzeylerin fabrikasyonudur [39].

2.5.1 Kolloidal Nanopartiküllerin SERS Platformlarında Kullanılması

Nanopartikül terimi 1-100 nm aralığında boyuta sahip parçacıkları ifade etmek için kullanılmaktadır. Nanopartiküller çok küçük boyutlara sahip olmaları nedeniyle birim hacimde yüksek yüzey alanına sahiptirler. Partikül yüzeylerinde ve yüzeye yakın bölgelerde fazla miktarda atom bulunmakta ve kuantum etkisi görülmektedir. Nanopartiküller ıslak kimya yöntemleriyle metaller, metal oksitler, silikatlar, organik ve karbon gibi farklı materyaller kullanılarak morfolojik olarak; küre, çubuk, silindir ve tüp gibi farklı şekil ve boyutlarda üretilmektedirler [40]. Farklı materyal, boyut ve şekillere sahip nanopartiküllerin plazmonik rezonanslarının değişmesiyle SERS uygulamalarında yaygın bir şekilde sinyallerin zenginleştirilmesinde kullanılmaktadırlar. Metalik nanopartiküllerin biraraya gelerek oluşturdukları güçlü lokal plazmonik rezonansları sebebiyle SERS substratları olarak doğrudan hedef moleküllerin tayinine yönelik kullanılabilmektedirler. Nanopartiküllerin örnekler ile karıştırılması aşamasında agregasyon görülebilmekte ve bu durum tekrarlanabilir sonuç alınmasını engelleyebilmektedir. Dinamik bir ortamda farklı sentez yöntemlerine göre zeta potansiyelleri ve yük dengeleri değişen nanopartiküller hedef moleküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre modifiye edilebilmekte ve bu sayede molekül-nanopartikül etkileşimi yüksek SERS sinyallerinin oluşacağı en ideal seviyeye çıkarılabilmektedir [4, 41]. Metalik nanopartiküllerin SERS sinyallerini zenginleştirme etkisindeki yüksek performansları, kararlı yapıları ve kolay sentezlenebilmeleri sebebiyle SERS temelli platformların oluşturulmasında sıklıkla kullanılmaktadırlar.

2.5.2 Nanopartiküllerin Yüzeğe İmmobilizasyonuyla Oluşturulan SERS Temelli Platformlar

Metalik nanopartiküllerin SERS uygulamalarında kullanılmaya başlamasıyla birlikte tekrarlanabilirlik sorunun ortadan kaldırılması amacıyla katı yüzeyler üzerine kolloidal nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal yollarla immobilize edilerek SERS temelli platformlar oluşturulmuştur [42]. Nanopartiküllerin yüzeylere kimyasal olarak bağlanabilmesi için bifonksiyonel moleküller kullanılmaktadır. Bu moleküllerin iki ucunda bulunan fonksiyonel gruplar yardımıyla bir taraftan yüzeğe bağlanırken diğer ucuyla da nanopartiküllere bağlanarak katı yüzeyler üzerinde kolloidal nanopartiküllerin biriktirilmelerini sağlamaktadır. SERS temelli bu platformların oluşturulması sırasında; kullanılan katı yüzeyler üzerindeki fonksiyonel gruplar, yüzeylerin nanopartiküllerle etkileştirilme süreleri, nanopartiküllerin konsantrasyonları ve yüzeğe biriktirilmelerine yardımcı tampon, adsorbent, yüzey gerilim ajanları ve tuz konsantrasyonu gibi etmenler elde edilen platformun SERS zenginleştirme etkisini etkilemektedir. Yüzeylerde nanopartiküllerin biriktirilmesi sonucu kolloidal haldeki nanopartikül süspansiyonlarında SERS ölçümlerinde görülen düşük tekrarlanabilirlik ve hedef molekülle etkileşim ortamlarının optimizasyonu gibi dezavantajların ortadan kaldırılması hedeflenmiştir [43].

2.5.3 Nanoyüzey Fabrikasyonu Yöntemleriyle SERS Temelli Platformların Oluşturulması

Nanoyüzeylerin fabrikasyonunda önceki iki yöntemin aksine yukarıdan aşağıya yöntemler kullanılarak SERS platformları oluşturulmaktadır. Litografik yöntemler başta olmak üzere en sık kullanılan yöntemler elektron ışın litografisi (EBL), buhar ile nanopartikül birikimi, elektrokimyasal biriktirmedir [44]. Kullanılan bu yöntemlerde elde edilen SERS temelli platformların plazmonik özellikleri yüzeylerde oluşturulan; nanoboşluklar, nanotepecikler, nano-arrayler ve nanoçukurların birbirleri arasındaki mesafelerinin, büyüklüklerinin veya çaplarının değişmesiyle SERS zenginleştirmelerini de etkilemektedir [45]. Kullanılan plazmonik metal nanomateryale göre fabrikasyonu yapılan SERS platformuyla daha kontrol edilebilir ve homojen bir yüzey elde edilmektedir [46].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kimyasal ve Biyokimyasal Malzemeler

Hidrojen tetrakloroaurat (HAuCl_4), perklorik asit (HClO_4), hekzadesiltrimetil-amonyum bromid (CTAB), L-askorbik asit (AA) ve trisodyum sitrat dehidrat, demir(II) sülfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), demir(III) klorid (FeCl_3), Ethylenediaminetetraasetik asit (EDTA) Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Almanya) firmasından, N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodimid hidroklorid (EDC), 11 merkaptoundekanoik asit (11-MUA), 2-morfolinoetanesulfonik asit monohidrat (MES), hidroksilaminhidroklorür ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$), %99,5 D-(+)- glukoz, D-(-)- fruktoz, Tris hidroklorit, 5-bromo 4-kloro 3-indol fosfat disodyum (BCIP), kafein, sodyum siklamat, sodyum sakkarin, aspartam, asesülfam K, sukraloz, bromkresol yeşili, bromkresol moru, Kongo kırmızısı, metil mavi, metil kırmızı, alizarin, brillant yeşili, krezol kırmızı ve fenol kırmızısı Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından, Tween 20 AppliChem, Biochemica (Darmstadt, Almanya) firmasından, saf etanol, gümüş nitrat (AgNO_3), sodyum borhidrür (NaBH_4) ve di-sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından, avidin, N-Hidroksisüksinimid (NHS) Pierce Biotechnology (Bonn, Almanya) firmasından, aseton, sodyum hidroksit (NaOH) potasyum klorür (KCl), sodyum klorür (NaCl), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), sitrat tamponu J.T.Baker (Deventer, Hollanda), Biotin işaretli *E. coli* antikoru Fitzgerald Industries International Inc.(Acton-MA, ABD), alkalın fosfataz Biozyme Laboratories (San Diego, ABD), LB Agar (Lennox) ve LB Broth (Lennox) Laboratories Conda S.A. (Madrid, İspanya) firmasından temin edilmiştir. Bütün çözeltiler ultra saf su ($18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) ile hazırlanıp kullanılmıştır.

3.1.2 Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

Analizler sırasında fosfat tampounu (PBS), MES tamponu, Tris-HCl tamponu ve sitrat tamponu kullanılmıştır.

Fosfat tamponu (67 mM, pH 7,4) Na_2HPO_4 ve KH_2PO_4 kullanılarak ve içerisine NaCl ve KCl tuzları ilave edilerek hazırlanmaktadır. Tween 20 içeren fosfat tamponu için, hazırlanan pH 7,4 olan fosfat tamponunununa % 0,5 (h/h) oranında Tween 20 ilave edilmiştir. Hazırlanan tampon otoklavda 121°C 'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

MES tamponu (0,05 M, pH 6,5) 2-morfolinoetanesulfonik asit mono hidrat ile hazırlanmakta olup pH'sı derişik NaOH ile ayarlanmıştır. Hazırlanan tampon 0,45'lik mikrofiltreden geçirilerek steril hale getirilmiştir. Yapay tatlandırıcı ve şekerli örneklerde kullanılan MES tamponu % 0-30 (h/h) glukoz/fruktoz aralığında değişen oranlar ile modifiye edilerek gıda matrisinden gelecek girişimler engellenmiştir.

Tris-HCl tamponu 0,05 M ve pH 9,8 olarak hazırlanmış ve ALP enziminin aktivasyonu için kullanıldığı zaman 0,05 M MgCl₂ ilave edilmiştir.

Sitrat tamponu 50 mM sodyum sitrat dihidrat kullanılarak pH 3,5 olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.1.3 Bakterilerin ve Besiyerlerinin Hazırlanması

Escherichia coli, *Salmonella enteritidis* ve *Enterobacter aerogenes* bakterileri Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Kültür Koleksiyonu'ndan tedarik edilmiştir.

LB Broth *E. coli*, *Salmonella* ve *E. aerogenes*'in geliştirilmesinde kullanılmıştır. LB Broth'un ticari olarak hazırlanmış karışımından 30 gram tartılarak, 1 l damıtık su içinde çözdürülmüştür. Hazırlanan besiyeri, test tüplerine 5'er ml olacak şekilde dağıtılarak otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Besiyerini içeren tüpler buzdolabında +4°C'de muhafaza edilmiş ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmiştir.

LB Agar, *E. coli*, *Salmonella* ve *E. aerogenes*'in seçici katı besiyerine inokülasyonunda ve yüzeye yayma yöntemi sonucunda elde edilen kolonilerin sayımında kullanılmıştır. LB-Agar hazır karışımından 35 gram tartılarak, 1 l damıtık su içinde çözdürülmüştür. Hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrası, besiyeri Petri kutularına dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır. Besiyerleri içeren Petri kutuları ters olarak buzdolabında muhafaza edilmiş ve kullanım öncesi yüzeyleri kurutulmuştur.

E. coli K-12, *Salmonella* ve *E. aerogenes* kültürü ana stok olarak kabul edilip bu mevcut ana stoktan 5 ml ye 50 µl olacak şekilde ekim yapılarak bakterilerin 37°C'de 18 saat boyunca çoğalması sağlanmıştır. Deney için gerekli olan dilüsyonlar ana stok kullanılarak hazırlanan yeni stok üzerinden yapılmıştır. Seri dilüsyon hazırlama işleminden önce stoktan alınan 1 ml çözelti içerisindeki bakterinin gelişmesi için kullanılan besiyerinin uzaklaştırılması 10 dakika 8000 dev/dk santrifüj ile sağlanmış ve

bu işlemle birlikte yapılan diğer 3 ardışık yıkamada PBS tamponu kullanılmıştır. Yıkama işlemi sonrasında 10^8 kob ml^{-1} 'den başlayarak ardışık 7 seri bakteri dilüsyonu hazırlanarak kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Nanopartiküllerin Sentezi

SERS uygulamalarında karakteristik dalgasayıları takip edilen moleküllerin sinyal şiddetlerinin artırılması veya zenginleştirilmesi için plazmonik etkiye sahip metal nanoyapılar kullanılmaktadır [47]. Nano boyutlu yapılardan oluşan partikül veya yüzeyler; moleküllerle farklı şekil, boyut ve oranda sentezlenerek etkileştirilmektedir. Metal nanopartiküller içerisinde altın ve gümüş biyolojik ve kimyasal uygulamalarda geniş ve yaygın bir kullanım alanı elde etmişlerdir. Tez kapsamında SERS uygulamaları için farklı boyut ve şekil özelliklerinde gümüş ve altın nanopartiküller sentezlenmiştir.

3.2.1.1 Gümüş Nanopartiküllerin Sentezi

Kolloidal gümüş nanopartiküller, Leopold yöntemi [48] esas alınarak hidroksilamin hidroklorürün ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) indirgeyici ajan olarak kullanılmasıyla sentezlenmiştir. $3,3 \times 10^{-3}$ M NaOH çözeltisi ve 0,01 M AgNO_3 çözeltisi saf su kullanılarak iki ayrı beherde hazırlanır. $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ den $1,5 \times 10^{-4}$ mol alınarak, beherde hazırlanan 90 ml NaOH çözeltisinin içine eklenir ve manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırmaya devam edilir.

Önceden hazırlanan AgNO_3 çözeltisinden bir deney tüpüne 10 ml alınarak hızlı bir şekilde beherdeki çözeltinin içine dökülür ve karışması sağlanır. Hızlı bir şekilde berrak çözeltinin koyu gri ve metalik yeşil renk aldığı görülür. Bu durumda kolloidal gümüş nanopartiküllerin sentezi gerçekleştirilmiş olur. Sentezlenen kolloidal gümüş nanopartiküller kullanılmadan önce karanlıkta ağzı kapalı bir şekilde 15 dakika boyunca oksidasyondan muhafaza edilmiştir. Sentezlenen gümüş nanopartikül tez metni içerisinde AgNPs olarak kısaltılmıştır.

3.2.1.2 Altın Nanoçubuk Partiküllerin Sentezi

SERS ölçümlerinde plazmon etkisinin artırılması ve altın yüzeylerin biyokimyasal modifikasyonlar için uygun özellikler göstermesi nedeniyle boy/en oranı anizotropik

olacak şekilde nanopartikülleri yüksek verimde sentezlenmiştir. Altın nanoçubuk partiküllerin (Au-NRs) sentezinde tohum büyütme yöntemi esas alınmıştır [49].

Tohum çözeltisi için, temiz bir viyal içerisinde 7,5 ml 0,1 M CTAB ve 250 µl 0,01 M HAuCl₄ karıştırılır. Buz banyosunda soğutulmuş hazırlanan 600 µl 0,01 M NaBH₄ hızlı bir şekilde viyalin içerisine aktarılır ve 5 dk süre bekletilerek tohum çözeltisi olarak kullanılacak küresel nanopartiküllerin meydana gelmesi sağlanır.

Büyütme çözeltisi için ayrı bir viyalde, 4,75 ml 0,1 M CTAB, 1 ml 0,01 M HAuCl₄ ve 60 µl 4x10⁻³ M AgNO₃ çözeltileri karıştırılarak koyu turuncu renkli bir karışım elde edilmiştir. 250 µl 0,1 M AA bu karışıma eklenerek iyice karıştırılmış, sonuçta renksiz büyütme çözeltisi elde edilmiştir. Tohum çözeltisinden 5 µl alınarak viyalde hazırlanan büyütme çözeltisine oda sıcaklığında eklenmiş ve 3 saat bekletilerek altın nanoçubuk partiküllerin oluşması sağlanmıştır. Süre sonunda elde edilen nanopartiküllerin rengi mor ve pembe arası olarak gözlenmiştir.

3.2.1.3 Altın Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi

Altın kaplı manyetik nanopartiküllerin (MNPs-Au) sentezlenmesinin amacı manyetik ayırım sırasında kullanılabilmesi ve nano boyuttaki özelliklerinden yararlanarak yüzey modifikasyonlarının yapılabilmesidir. Bu sayede bakterileri yakalayıcı ve ortamdaki ayırıcı bir prop olarak kullanılan antikörlerin nanopartikül yüzeylerine bağlanmaları gerçekleştirilebilmektedir. Sentez yöntemi iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada; manyetik çekirdeği oluşturacak olan manyetit (Fe₃O₄) nanopartiküller hazırlanmıştır [50]. Kullanılan yöntem gerekli değişiklikler yapılarak takip edilmiştir. 1,28 M FeCl₃ ve 0,64 M FeSO₄.7H₂O deiyonize suda çözölmüş ve 1 M NaOH hazırlanan bu demir çözeltisi içerisine eklenerek 40 dk karıştırılmıştır. Siyah çökelti manyetik olarak toplanarak deiyonize su ile üç kere yıkanmış ve ardından 2 M HClO₄ ile 3 saat boyunca karıştırıcıda bekletilmiştir. Bu işlem ile oluşan asidik ortamı gidermek için deiyonize su ile üç kere 20 dakika 10000 dev/dk santrifüjle yıkama yapılmıştır. Santrifüj ile yıkama işlemi sonunda manyetit demir nanopartiküller azot gazı altında kurutularak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

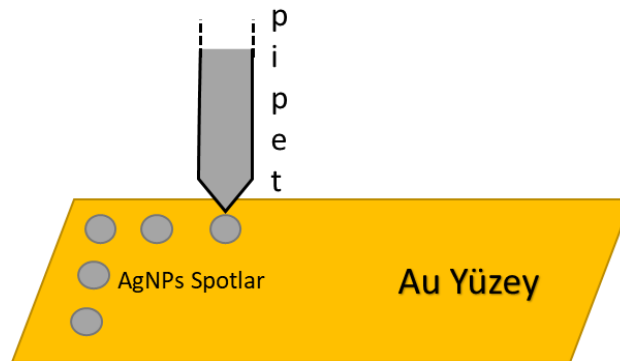
Sentezin ikinci aşamasında manyetit nanopartiküllerin üzeri CTAB varlığında çekirdek@kabuk yapıyı sağlayacak şekilde altın ile kaplanmıştır. 10 mg Fe₃O₄ tartılarak 5 ml deiyonize suda çözölmüş ve 1M NaOH çözeltisi içinde

Sentezlenen AgNPs kullanılarak altın slayt yüzeylere biriktirilmesi sağlanmış ve bu sayede gümüş nano yapılardan oluşam yüzeyler elde edilmiştir. Yüzeylere gümüş nanopartiküllerin biriktirilmesi iki farklı yöntem kullanılarak oluşturulmuştur.

3.2.2.1 Altın Slayt Yüzeylere AgNPs Spotların Oluşturulması

Ticari olarak satın alınan altın yüzeyler; 76,2x25,4x0,7 mm ölçülerinde ve cam üzerine altın (50 nm kalınlığında) kaplı slaytlar olarak temin edilmiştir. Sentezlenen AgNPs 8 dakika süreyle 8000 dev/dk santrifüj edilerek üst faz 1/10 oranında santrifüj edilen tüp içerisinde bırakılarak 10 kat (10x) ve üst faz 1/20 oranında santrifüj edilen tüp içerisinde bırakılarak 20 kat (20x) derişik hale getirilmiştir.

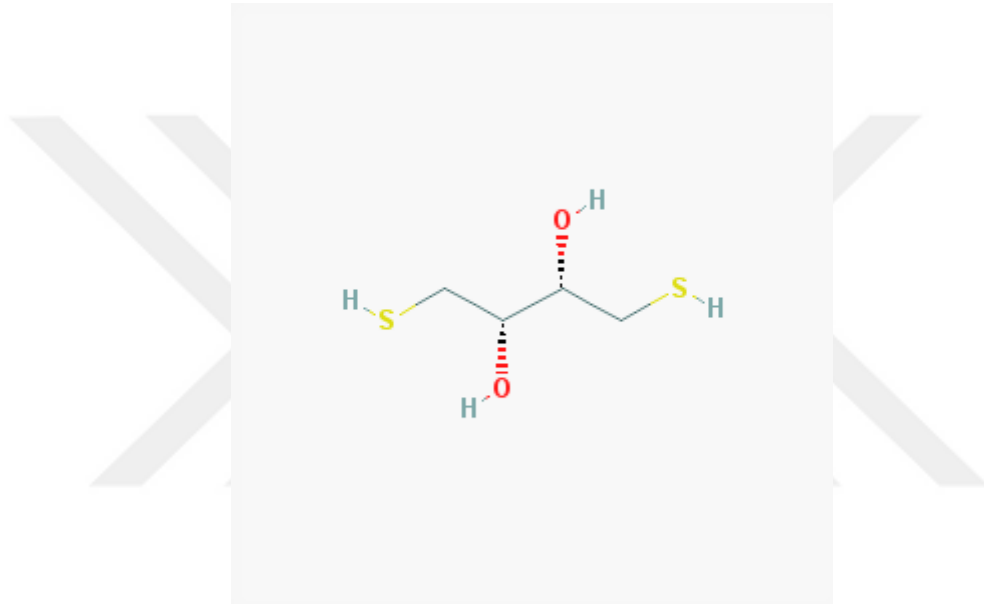
SERS ölçümleri sırasında test edilmek istenen analit için optimize edilen AgNPs derişimine göre, pipet yardımıyla 1 µl derişik hale getirilen 10x veya 20x AgNPs altın yüzeylere aktararak oda koşullarında kurutulmuş ve SERS ölçümlerinin alınacağı altın üzerinde gümüş spotlar oluşturulmuştur. Ölçüm alınacak her bir örnek için tek bir spot kullanılmıştır. Altın slaytlar üzerindeki spotların üzerine örneklerden 1 µl alınarak pipet yardımıyla damlatılmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutma aşamasından sonra her bir analit için belirlenen koşullarda yüzeylerden SERS ölçümleri alınmıştır. Yüzey üzerinde oluşturulan gümüş spotlara analitlerin damlatılıp ölçümlerin alınmasından sonra; % 30 H₂O₂ ve % 37 H₂SO₄ çözeltileri 1:3 (h/h) hazırlanarak oluşturulan piranha çözeltilisinde, organik kalıntıların ve bulaşların uzaklaştırılması için 15 dk bekletilmiştir. Süre sonunda altın slaytlar çözeltiden çıkarılmış ve deiyonize su ile yıkandıktan sonra kurutulmuştur. Şekil 3.1'de AgNPs'nin altın yüzeylere pipet yardımıyla 1 µl aktarılması sonucu oluşan spotlar gösterilmektedir. Bu işlem sonucunda altın slaytların yeniden kullanılması sağlanarak, yüzeylerine uygun derişimde hazırlanan AgNPs'den damlatılarak gümüş spotlar oluşturulmuştur.



Şekil 3.1 Altın yüzey üzerine oluşturulan AgNPs spotlar

3.2.2.2 Altın Slayt Yüzeylere AgNPs'nin Kaplanması

Altın ve gümüş nanoyapıların SERS ölçümlerinde yüksek plazmonik etkilerinden yararlanabilmek ve nanoyüzeylerin lazer saçılımını çoğaltarak ölçüm sırasında sinyali takip edilen moleküllerin hesaplanan EF değerlerini artırmasından dolayı altın slayt yüzeylere, sentezlenen gümüş nanopartiküller kontrollü bir şekilde kaplanmıştır. Bu maksatla altın ile güçlü bir bağ yapan thiol gruplu kısa zincirli 1,4-dithiothreitol (DTT) kullanılmıştır. Şekil 3.2'de moleküler yapısı gösterilmiştir.



Şekil 3.2 1,4 Dithiothreitol molekülünün yapısı [51]

DTT'nin yapısı incelendiğinde iki ucunda S-H bağlarının olduğu ve 4 karbonlu kısa bir zincir yapısında olduğu görülmektedir. Bu sayede bir ucunda bulunan S-H grupları vasıtasıyla altın yüzeyde Au-S bağları oluşturarak yüzeyde kendiliğinden oluşan tek tabakalı (SAM) bir yapı meydana getirmektedir. Altın yüzeyde SAM ile meydana gelen inorganik kısa zincirli (4C atomluk) yapının diğer ucunda açıkta bekleyen S-H grubuyla ise sentezlenen AgNPs reaksiyona girerek Ag-S bağları oluşturmaktadır. Yüzeyde Au ve Ag atomlarından oluşan bu iki tabakalı yapının, S-H bağlarıyla yaptıkları Au-S ve Ag-S bağlanma enerjileri (E_b) sırasıyla; -6,79 ve -2,22 kcal mol⁻¹ olduğu belirtilmiştir [52]. Altın yüzey üzerine AgNPs'nin kararlı bir şekilde bağlanmasını sağlayan SAM yapısının kullanılmasıyla farklı örnekler ve çözeltiler için kullanılabilir, EF değeri ve

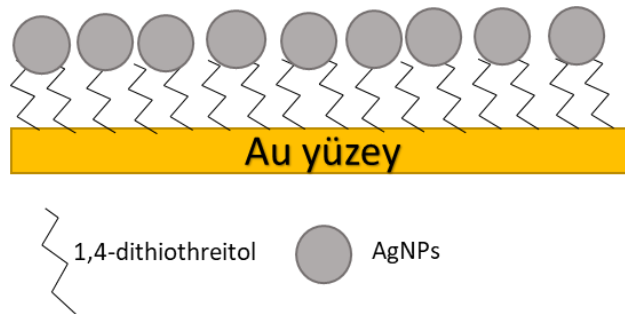
plazmonik etkisi sentezlenen nanopartiküllerle karşılaştırıldığında daha yüksek bir SERS temelli platform elde edilmiştir.

Altın kaplı cam slaytlar 5x5 mm ölçülerinde kesilerek kullanılmıştır. Kesilen yüzeyler öncelikle piranha çözeltisinde 15 dk süreyle bekletilmiş ve deiyonize su ile yıkanıp kurutulduktan sonra kullanılmıştır.

Sentezlenen AgNPs'nin altın yüzeye spesifik olarak bağlanmasını sağlayabilmek ve yüzeyi gümüş nanopartiküllerle örtmek için sırasıyla aşağıdaki işlemler takip edilmiştir;

i. 50 mM 1,4-dithiothreitol (DTT) deiyonize suda bir beher içerisinde hazırlanmış ve içerisine belirtilen ölçülerde kesilen altın slaytlar konularak 12-18 saat aralığında karıştırıcıda bekletilmiştir. Karıştırıcıda bekleme süresi sonunda beher içerisinden alınan yüzeyler deiyonize su içerisinde 3 defa yıkanarak fazla miktarda yüzeye bağlanmadan kalan DTT'nin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu işlemlerin sonucunda yüzeyde SAM ve açıkta kalan bir diğer ucunda ise gümüş nanopartikülün bağlanmasını sağlayacak fonksiyonel S-H grubunun oluşması sağlanmıştır.

ii. Uygun bir beher içerisine üzerine SAM oluşturulan altın slaytlar alınmıştır. Daha sonra 13,3 mM ve 150 µl KNO₃ çözeltisi ve 20 kat derişik halde (20x) AgNPs 50 µl eklenmiş ve karıştırıcıda 300 dev/dk, 18 saat bekletilmiştir. Süre sonunda altın slaytların yüzeyi deiyonize su ile üç kere yıkanmış ve azot gazı altında kurutularak kullanılmıştır. Hazırlanan yüzeylerin bileşenleri Şekil 3.3'de şematize edilerek gösterilmiştir. Elde edilen yüzeyler Au-AgNPs olarak kısaltılmıştır.



Şekil 3.3 Au-AgNPs yüzey ve bileşenleri

3.2.3 Nanopartiküllerin ve Yüzeylerin Karakterizasyonu

3.2.3.1 UV-visible Spektrofotometresi

Sentezlenen Au-NRs, MNPs-Au ve AgNPs nanopartiküllerin absorpsiyon spektrumları fotodiyot dedektörüne sahip Agilent 8453 UV-visible spektrofotometre (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, ABD) ile ölçülmüştür. Sentezlenen nanopartiküller santrifüj yardımıyla 8000 dev/dk ve 10 dk süreyle çöktürölüp üst faz uzaklaştırılmıştır. Kalan çökelti halindeki partiküllerin üzerine deiyonize su önceki hacimleri oranında eklenmiştir.

UV-Visible spektrofotometresinde nanopartiküllerin absorpsiyon dalgaboyları görünür bölgede olacağı için polistiren makro küvetler kullanılmıştır. Ölçümlerden önce deiyonize su ile kör alınmıştır. Kör olarak hazırlanan deiyonize suya ait absorbans değeri sıfırlandıktan sonra her bir nanopartikülden 100 µl alınarak yeni polistiren makro küvetlere aktarılmıştır. Son hacimde 2 ml olacak şekilde kalan hacim deiyonize suyla tamamlanmıştır. 300-900 nm aralıkta absorbans okumaları her bir nanopartikül için ayrı küvetlerde sırasıyla gerçekleştirilmiş ve elde edilen spektrumlar kaydedilmiştir.

3.2.3.2 TEM Ölçümü

Nanopartiküller sentezlendikten sonra şekil ve boyutlarının karakterizasyonu için Geçişli elektron mikroskobu (TEM) kullanılmıştır. Manyetik çekirdek ve altın kabuk yapısında sentezlenen MNPs-Au, tohum çözeltisi içerisinde izotropik yapıdan anizotropik yapıya büyütme çözeltisi içerisinde geçiş yapan çubuk şekilli Au-NRs'nin ve hidroksilamin hidroklorür indirgeyici ajanı kullanılarak sentezlenen küresel şekilli AgNPs'nin şekil morfolojileri ve boyutları incelenmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin her birinden 10 µl alınarak karbon-formvar kaplı bakır gritler üzerine aktarılmıştır. 10 dakika süreyle kurumaları beklendikten sonra FEI Tecnia Tecnai Spirit BioTWIN (FEI Company, Oregon, ABD) TEM'de 120 kV de çalışılmıştır. Örneklerin görüntüleri alınıp, dijital ortama aktarılmıştır.

3.2.3.3 Au-AgNPs Yüzeylerin Karakterizasyonu

Altın yüzeylere DTT kullanılarak oluşturulan SAM yapısının ucundaki fonksiyonel S-H grubu kullanılarak yüzeylere bağlanan AgNPs birikimi DeltaNu Examiner Raman Mikroskop sistemi (Laramie, Wyoming, ABD); 785 nm lazer kaynağı ve CCD dedektör

kullanılarak alınmıştır. 20X objektif kullanılarak, 15 saniye süreyle 100 mW lazer gücünde RS kullanılarak AgNPs'nin yüzeylere biriktirilmeden önce ve SAM yapıldıktan sonra biriktirilmesi takip edilmiştir. Elde edilen spektrumlardan Ag iyonlarının yüzeyde bulunan DTT ve altın ile yaptığı bağlara karakteristik dalga sayılarında sinyal şiddetleri belirlenmiştir.

Takip edilen dalga sayılarındaki sinyal şiddeti üzerinden, kullanım öncesi altın yüzeye ait spektrum ve AgNPs'nin üzerine biriktirilmesi sonrası elde edilen spektrum karşılaştırılarak Au-AgNPs yüzeylerin karakterizasyonu yapılmıştır.

3.2.4 Zenginleştirme Faktörünün (EF) Hesaplanması

Sentezlenen nanopartiküllerin ve oluşturulan SERS aktif yüzeylerin analizi yapılan ve takip edilen moleküllere ait belirli dalga sayısındaki sinyal şiddetlerinin çoğalma derecesinin ölçülebilir bir şekilde ifadesi önemli bir parametredir. SERS zenginleştirme faktörü (Enhancement Factor, EF) olarak ifade edilen bu parametreyi; bütün koşullar her iki ölçüm içinde geçerli kalmak koşuluyla, aynı molekül için SERS ölçümünden elde edilen sinyal şiddetiyle SERS etkisini oluşturan nanoyapının ortadan kaldırılarak ölçülen RS sinyal şiddetinin oranı olarak tanımlayabiliriz.

Farklı karakterizasyon özelliklerine sahip SERS ölçümleri için kullanılan nanoyapıların EF değerlerinin hesaplanarak karşılaştırılmaları, analizi yapılmak istenen molekülün hassas ve etkin bir şekilde tayin etmek için kullanılması gereken nanoyapının seçilmesini sağlamaktadır.

EF'nin hesaplanabilmesi için aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır;

$$EF = (I_{SERS} / N_{SERS}) / (I_{Raman} / N_{Raman}) \quad (3.1)$$

I_{SERS} ölçümü yapılan molekülün belirlenen karakteristik dalgasayısındaki SERS sinyal şiddetini ve I_{Raman} ise ölçümü yapılan molekülün belirlenen karakteristik dalgasayısındaki Raman sinyal şiddetini ifade etmektedir. N_{SERS} ve N_{Raman} ise SERS ve Raman ölçümlerinin yapıldığı alandaki veya hacimdeki molekül sayısını ifade etmektedir. Eşitlik (3.1) kullanılarak, tez kapsamında farklı şekil ve boyutlarda sentezlenen gümüş ve altın nanopartiküllerin ve yüzeylerin EF değerleri hesaplanmıştır.

3.2.5 Askorbik Asit Tayinine Yönelik SERS Tabanlı Analizin Geliştirilmesi

RS'de aktif özelliğe sahip olmalardan dolayı işaretçi olarak kullanılan pH indikatörleri ve boyalar, metalik nanoyapılar ile birlikte SERS ölçümleri alındığında sahip oldukları parmak izi spektrumlarının sinyal şiddeti artmakta ve karakteristik bağlarının gözlemlendiği dalga sayısındaki bandlarda zenginleşme gerçekleşmektedir. Gıda bileşenlerinin analizinde RS molekülleri işaretçi olarak kullanılır ve dolaylı olarak analit ve işaretçi arasında korelasyon kurularak SERS tabanlı farklı analitik yöntemler geliştirilebilir. Askorbik asitin kantitatif olarak SERS ile belirlenebilmesi için RS işaretçilerinin SERS spektrumlarından elde edilen sinyaller ve askorbik asit konsantrasyonları değişimi arasında bir korelasyon aranmıştır. Askorbik asitin sulu çözeltilerinde gümüş nitrat ile etkileşimi sonucu Ag^+ iyonlarını indirgemesiyle gümüş koloidal nanoparçacıklar oluşmaktadır. Değişen askorbik asit konsantrasyonlarına bağlı olarak oluşan gümüş nanoparçacıkların boyut ve miktarları da değişmektedir. Bu yolla sentezlenen AgNPs'nin SERS etkisini değişen askorbik asit konsantrasyonlarına bağlı olarak izleyebilmek için RS işaretçilerinin yüksek aktif özelliklerinden yararlanılmıştır. Her bir işaretçinin sahip olduğu parmak izi spektrumuna ait karakteristik dalga sayıları belirlenmiştir.

Askorbik asit tayininde kullanılabilecek en uygun işaretçinin seçilebilmesi için mevcut işaretçilerin parmak izi spektrumlarına göre EF değerleri eşitlik (3.1) kullanılarak hesaplanmıştır.

Bromkresol moru, bromkresol yeşili, Kongo kırmızısı, litmus, metil mavi, metil kırmızı, alizarin, brillant yeşili, kresol kırmızı, fenol kırmızısı, RS işaretçi molekülleri olarak başlangıçta kullanılmıştır. Her bir işaretçi deiyonize suda ve pH 6,5 50 mM MES tamponunda 1 mM konsantrasyonda olacak şekilde ayrı ayrı hazırlanmıştır.

Askorbik asit standart çözeltisi, 1 mg ml⁻¹ stok çözelti olacak şekilde deiyonize suda çözündürülmüş ve vortekslenmiştir. Ultrasonik su banyosunda degaze işlemi yapıldıktan sonra Raman ölçümleri için uygun konsantrasyonlarda dilüsyonları hazırlanmıştır. Ölçümler sırasında karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Gümüş nitrat ($AgNO_3$) standart çözeltisi 10 mM konsantrasyonda stok olarak deiyonize su içinde hazırlanmıştır.

Bu amaçla bromkresol moru, bromkresol yeşili, Kongo kırmızısı, metil mavi, metil kırmızı, alizarin, brillant yeşili, kresol kırmızı, fenol kırmızısı, oluşan 10 farklı Raman işaretçisinin TLC yüzeylerinde Raman spektrumları DeltaNu Examiner Raman Mikroskop sistemi; 785 nm lazer kaynağı ve CCD dedektör kullanılarak alınmıştır.

Deiyonize suda hazırlanmış işaretçiden 1 µl alınmış ve pipetle yüzeylere damlatılıp kurutulduktan sonra Raman ölçümleri 20X objektif kullanılarak, 15 saniye süreyle 100 mW lazer gücünde yapılmıştır. Aynı parametreler kullanılarak ölçümler SERS yöntemi için tekrarlanmıştır. Bu maksatla sabit konsantrasyonda askorbik asit ve 1 mM konsantrasyondaki işaretçiler ile ayrı olacak şekilde eppendorflarda karıştırılmış ve üzerlerine 0,01 M AgNO₃ çözeltisi ilave edilmiştir. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra pipet yardımıyla 1 µl alınarak TLC üzerine damlatılıp kurutularak ölçümleri alınmıştır. SERS ölçümü sonrası işaretçilere ait zenginleşen dalgasayıları belirlenmiş ve her bir işaretçi boya için EF değerleri hesaplanmıştır.

Model çözelti; MES tamponunda hazırlanmış 1 mM Raman işaretçisinden 100 µl, 10 mM AgNO₃ çözeltisinden 100 µl ve standart askorbik asit çözeltisinden ölçümü yapılacak konsantrasyondan 200 µl Raman kuvvetlerine alınarak hazırlanmıştır. SERS ölçümleri 785 nm lazer kaynağı, 30 saniye süreyle 100 mW lazer gücünde gerçekleştirilmiştir.

3.2.6 Kafein Tayini için SERS Tabanlı Analizin Geliştirilmesi

Kafein çözeltisi RS ve SERS ölçümleri için, sitrat, PBS ve Tris tamponlarında 0,1, 1 ve 10 mg ml⁻¹ konsantrasyonlarında hazırlanarak kullanılmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden deney sırasında ölçümü yapılan konsantrasyona göre dilüsyonları yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlara bağlı olarak kafeine ait karakteristik dalga sayısındaki sinyal şiddetlerinin değişimlerini gösteren spektrumlar kaydedilmiştir. Farklı pH değerlerinin RS spektrumlarından elde edilen karakteristik dalga sayılarındaki sinyallerin değişimlerini inceleyebilmek için kafein çözeltisi; sitrat, PBS ve Tris-HCl tamponlarında 10 mg ml⁻¹ olacak şekilde hazırlanarak ölçümleri alınmıştır. Elde edilen RS spektrumları belirlenen dalgasayısındaki sinyal değişimlerine göre incelenmiş ve tamponların pH değerlerinin etkisi karşılaştırılmıştır.

Sentezlenen nanopartiküllerin ve nano yüzeylerin kafein tayininde kullanılarak SERS temelli ölçümlerin alınabilmesi için Au slayt yüzeyleri kullanılmıştır. Au-NRs ve AgNPs

nanopartiküllerinden ayrı ayrı 1 µl alınıp Au slayt üzerinde farklı noktalara damlatılmış ve kurutulmuştur. Kafein ölçümü için kullanılacak olan 1 mg ml⁻¹ konsantrasyonunda belirlenen tamponda hazırlanmış kafein çözeltisi, 1 µl pipet yardımıyla kurutulmuş olan nanopartiküllü noktalara aktarılmıştır. Au-AgNPs yüzeylerde SERS ölçümü, 1 mg ml⁻¹ konsantrasyonda hazırlanan kafeinden pipet yardımıyla 1 µl alınarak yüzeye damlatılıp kurutulması sonrası alınmıştır. Nanopartiküllerin ve yüzeylerin SERS ölçümleri 20X mercek kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen spektrumlar üzerinden kafeine ait 555 cm⁻¹ dalgasayısındaki sinyal şiddeti takip edilerek EF değerleri hesaplanmıştır.

Kafein analizi için kullanılacak tampon çözeltisinin ve nanoyapının belirlenmesiyle, 0,1-1 mg ml⁻¹ aralığındaki konsantrasyonlarda hazırlanan kafein çözeltilerinin SERS ölçümleri 20X ve 50X mercekler kullanılarak alınmıştır. Elde edilen spektrumlar üzerinden kafeine ait 555 cm⁻¹ dalgasayısındaki konsantrasyona bağlı sinyal değişimleri takip edilerek kalibrasyon eğrileri çıkarılmış ve LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır.

RS ve SERS spektrumları; DeltaNu Examiner Raman Mikroskop sistemi; 785 nm lazer kaynağı, 20x ve 50x mercekler, 15 saniye 100 mW lazer gücü ve CCD dedektör kullanılarak alınmıştır.

3.2.7 Tatlandırıcıların Tayini için SERS Tabanlı Analizin Geliştirilmesi

Yapay tatlandırıcı olarak; sodyum siklamat, sodyum sakkarin, aspartam, asesülfam K ve sukraloz kullanılmıştır. Standart çözeltilerinin hazırlanması maksadıyla deiyonize suda çözündürülerek 10 mg ml⁻¹ konsantrasyonunda stok çözeltileri hazırlanmış ve ileriki uygulamalarda dilüsyonlar halinde seyreltilerek kullanılmak üzere +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

Ticari olarak satılan farklı markalara ait doğal maden suyu örnekleri sade ve meyve aromalı olacak şekilde satın alınmıştır. Meyve aromalı maden sularının etiket içeriğinde glukoz, fruktoz, sitrik asit ve meyve aromasının olduğu belirtilmiştir. Çilek aromalı maden suları gerçek örnek uygulamalarında kullanılmak üzere seçilmiş ve hazırlanan sitrat, MES, PBS, Tris-HCl tamponlarıyla birlikte kullanılmıştır.

Gerçek örnek denemelerinde, satın alınan maden sularının içeriğinde bulunan maddelerin deney ölçümlerine etkisini incelemek amacıyla maden sularına dışarıdan

ilek aroması, sitrik asit ve toplam şeker içeriği %10'luk olacak şekilde glukoz/fruktoz (3:2 h/h) karışımı eklenmiştir.

Maden suları deneylerden önce, ultrasonik su banyosunda degaze edilmiş ve CO₂ gazı uzaklaştırılmıştır.

Sodyum siklamat, sodyum sakkarin, aspartam, asesülfam K ve sukraloz için hazırlanan stok zelteler kullanılarak 0,1 mg ml⁻¹ ile 10 mg ml⁻¹ aralığında değişen konsantrasyonlarda RS lümleri alınmıştır. Bu amaçla küvetlere, 200 l hacimde tatlandırıcılar hazırlanan konsantrasyonlarda konulmuş ve DeltaNu Examiner Raman Mikroskop sistemi; 785 nm lazer kaynağı 20 saniye süreyle 100 mW lazer gücünde ölçümleri alınmıştır. SERS lümleri için öncelikle sentezlenen AgNPs 8 dk süreyle 8000 dev/dk santrifüj yapılmış ve 10 kat (10x) veya 20 kat (20x) derişik hale getirilmiştir. Raman küvetlerine ölçüm için; hazırlanan nanopartikülden 20 l, kullanılan tampon çözeltisinden 80 l ve tatlandırıcılardan 100 l ilave edilerek her bir tatlandırıcı için hacim ölçümleri sonucunda SERS spektrumları alınmıştır. Tampon zeltisi pH dengesini sağlamak ve tatlandırıcı-nanopartikül arasında oluşan kompleksin stabilitesini korumak için kullanılmaktadır.

Tris HCl, PBS, sitrat ve MES tamponları ölçümler sırasında kullanılmış ve en iyi sonuçların alındığı tampon gerçek örnek denemelerinde kullanılmak üzere modifiye edilmiştir. Modifiye işleminde ise gerçek örneklerden gelebilecek şeker konsantrasyonunu karşılayabilmek ve SERS sinyallerine etkisini engellemek için % 0-30 arasında glukoz:fruktoz karışımı (3:2) h/h oranında tamponlara ilave edilmiştir.

Yüzey lmleri için Au slayt yüzeyler zerind geliştirilen Au- AgNPs yüzeyde ölçümler alınmıştır. SERS lm yapılacak tatlandırıcıdan 1 l alınarak kurutulan Au-AgNPs yüzey üzerine damlatılmış ve Raman Mikroskop sistemi; 785 nm lazer kaynağı, 20x objektif 30 mm spot alanında, 20 saniye 100 mW lazer gücü ve CCD dedektör kullanılarak ölçümler alınmıştır. Au-AgNPs yüzeyinde ise doğrudan ölçümü yapılacak tatlandırıcıdan 1 l alınarak belirtilen koşullarda SERS spektrumları elde edilmiştir. Her bir tatlandırıcıya ait EF, eşitlik (3.1)'e göre hesaplanmıştır.

3.2.7.1 Aspartam Tayini için SERS Tabanlı Analiz Geliştirilmesi

Aspartam tayini için geliştirilen yöntemde ise; 0-1 mg ml⁻¹ aralığında beş farklı (0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0) konsantrasyondan elde edilen kalibrasyon eğrileri çizilmiştir.

Kalibrasyon eğrileri; model örnek, sade maden suyu ve meyve aromalı maden suyuna sonradan ilave edilen aspartam konsantrasyonlarının SERS ile belirlenmesiyle elde edilmiştir. Raman kuvvetlerine; 10x AgNPs 100 µl, 75 µl modifiye edilmiş tampon ve 75 µl ölçümü yapılacak aspartam konsantrasyonu eklenmiştir. Karışımın son hacmi 250 µl olacak şekilde ayarlandıktan sonra oluşan kompleksin kararlılığını gözlemlemek için süre-sinyal şiddeti, aspartam için belirlenen 1002 cm⁻¹ dalgasayısında Raman ölçüm parametreleri uygulanarak takip edilmiştir.

3.2.7.2 Aspartamın Maden Suyunda Tayini için Yöntemin Validasyonu

Yapılan analizlerin doğrusalılık, duyarlılık, kesinlik ve doğruluk parametreleri yöntemin validasyonu için hesaplanmıştır. Doğrusallığı tanımlamak için aspartam konsantrasyonları (0-1 mg ml⁻¹) ve 1002 cm⁻¹ dalgasayısındaki bandın sinyal şiddeti arasındaki ilişki kullanılmıştır ve doğrusalılık tespiti basit doğrusal regresyon analizi yapılarak bulunmuştur. Determinasyon katsayısı (R²), değişkenlerden elde edilen SERS sinyallerinin açıklanmasında kullanılmıştır. Aspartamın tayini için kalibrasyon eğrisi IUPAC (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği) standardına göre [53] su, meyve aromalı ve aromasız maden sularında çıkarılarak, yöntemin belirleme sınırı (LOD) ve ölçüm sınırı (LOQ) hesaplanmıştır. IUPAC metoduna göre,

$$LOD = 3 \cdot Sb/b \quad (3.2.)$$

$$LOQ = 10 \cdot Sb/b \quad (3.3.)$$

eşitlikleri kullanılmıştır. Burada Sb, SERS sinyallerinin standart sapmalarını ve b ise kalibrasyon eğrisinin eğimini ifade etmektedir. Gün içi ve günler arası kesinliğin ortaya konulması için örneklere 0,6 mg ml⁻¹ aspartam ilave edilmiştir. Gün içi ölçümlerde deneyler 4 defa aynı gün fakat farklı zamanlarda tekrar edilmiştir. Günler arası ölçümlerde ise deneyler 5 farklı günde tekrarlanmıştır. Gün içi ve günler arası ölçümlerde SPSS 16.0 istatistik programı (SPSS, Chicago, IL, ABD) kullanılarak tek yön ANOVA yapılmıştır. İstatistiksel olarak farklılık için p<0,05 değeri kabul edilmiştir.

3.2.8 ALP Tayini için SERS Tabanlı Analizin Geliştirilmesi

ALP enzimi standart çözeltisi -20°C'de muhafaza edilmiştir. Konsantrasyonu 19 mg protein ml⁻¹ olan standart enzim çözeltisi, 10⁻⁷ M olacak şekilde MES tamponunda stok çözelti olarak hazırlanmıştır. Enzim aktivasyonu çalışmaları için oda sıcaklığında MES tamponundan seri dilüsyonlar halinde kullanılacak enzim çözeltisi hazırlanmıştır.

Substratı olarak kullanılan BCIP, Tris-HCl tamponunda 0,3 mg ml⁻¹ konsantrasyonda hazırlanarak enzim çözeltisiyle etkileştirilmiştir.

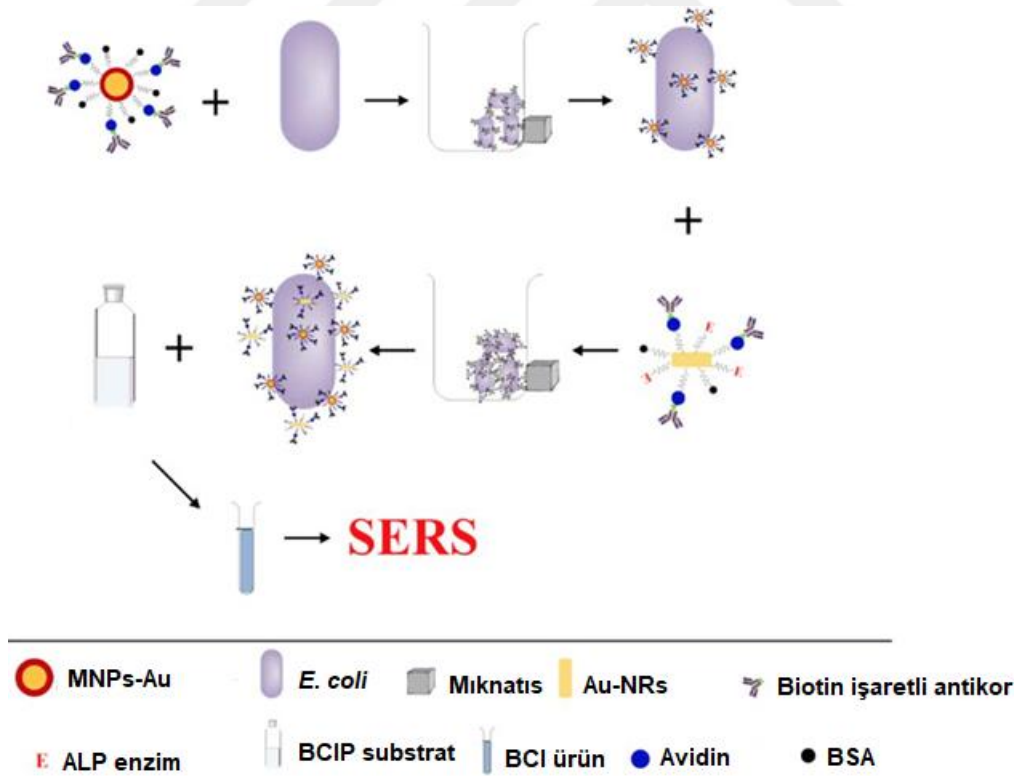
Sentezlenen Au-NRs, AgNPs nanopartikülleri ve Au-AgNPs yüzeyler kullanılarak ALP aktivitesinin tayini için SERS ölçümleri alınmıştır. Stok olarak hazırlanan ALP enzim çözeltisinden dilusyonlar MES tamponunda 10⁻¹¹-10⁻¹⁵ M aralığındaki konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. ALP aktivitesi sonucunda oluşan ürünün 5-bromo-4-kloro-3-indol (BCI) 600 cm⁻¹'de karakteristik bandı vardır. Her bir nanopartikül ve yüzey için elde edilen spektrumlarda BCI'ye ait karakteristik 600 cm⁻¹ dalga sayısındaki sinyal şiddeti kullanılarak SERS temelli platformların EF değerleri eşitlik (3.1)'e göre hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır.

Hazırlanan her bir derişimdeki ALP, substratı olan 0,3 mg ml⁻¹ BCIP ile Tris-HCl tamponunda 1 saat etkileştirilmiş ve ürünü olan mavi renkli SERS aktif BCI dimerinin oluşması beklenmiştir. Daha sonra hacimde ölçümler alabilmek için Raman küvetlerine sırasıyla 190 µl AgNPs eklenmiş ve enzim reaksiyon hacminden 10 µl alınarak küvetlerin 200 µl son hacimde Raman spektroskopisinde ölçümleri alınmıştır. Aynı işlem Au-NRs için de tekrar edilmiştir. Hazırlanan Au-AgNPs yüzeyler için ise 1 µl enzim reaksiyon hacminden alınan örnek damlatılmış ve DeltaNu Examiner Raman Mikroskop sistemi; 785 nm lazer kaynağı, 20x ve 50x objektifler, 15 saniye 100 mW lazer gücü ve CCD dedektör kullanılarak alınmıştır.

3.2.9 *Escherichia coli* Tayini için SERS Tabanlı İmmunoassayın Geliştirilmesi

SERS temelli immunoassay prosedürü, MNPs-Au'nun analiz sırasında seçici olarak çalışılan ortamdan hedef mikroorganizmanın manyetik separasyonunu gerçekleştirmesi için kullanılması ve ALP'nin sentezlenen Au-NRs üzerine fonksiyonel gruplar oluşturulduktan sonra modifiye edilerek enzimatik aktivitesinin kullanılması sağlanmıştır. Hedef mikroorganizmanın MNPs-Au tarafından üzerinde bulunan seçici antikoru vasıtasıyla yakalanması ve manyetik özelliği kullanılarak ayrılması sonucunda, Au-NRs'de üzerinde ALP ve hedef mikroorganizmayı seçici olarak yakalayacak antikoru olduğu halde bir araya getirilerek sandviç yapıyı tamamlamaları sağlanmış ve bakteri tayinine yönelik SERS tabanlı biyoanalizi oluşturmak için kullanılmıştır.

Sandviç yapı tamamlandıktan sonra ALP işaretli Au-NRs'nin enzimatik aktivite gösterebilmesi için BCIP substratı $0,3 \text{ mg ml}^{-1}$ olacak şekilde sandviç yapı üzerine gönderilmiştir. Enzimatik aktivite sonucunda açığa çıkan BCI ürününün 600 cm^{-1} dalga sayısındaki sinyal şiddeti SERS ölçümü yapılarak takip edilmiştir. Enzim aktivitesi doğrudan Au-NRs sayısına bağlı olacağı ve Au-NRs'nin ortamda bulunma miktarını ise, üzerinde modifiye edilen antikorların daha önceden manyetik ayırım sonucu MNPs-Au tarafından yakalanan hedef mikroorganizmalara bağlanarak oluşturduğu sandviç yapı sağlamaktadır. Elde edilen BCI enzimatik ürününe ait 600 cm^{-1} dalga sayısındaki sinyal şiddeti hedef mikroorganizma sayısı ile ilişkilendirilmiştir. Model örnek sisteminde bilinen farklı konsantrasyonlarda *E. coli* dilüsyonları kullanılarak sandviç yapı oluşturulmuş ve sistemin enzimatik reaksiyon sonucunda elde edilen SERS sinyal şiddetleri ölçülmüştür. Bu sonuçlara bağlı olarak farklı miktarlarda *E. coli* tayini için kalibrasyon eğrisi çıkarılmıştır. Şekil 3.4'de geliştirilen SERS tabanlı immunomanyetik sandviç yapıdaki deney sistemi gösterilmiştir.



Şekil 3.4 Bakteri tayini için ALP işaretli sandviç immunomanyetik ayırım (İMA)

Kullanılan MNPs-Au ve Au-NRs'nin hazırlanışı ve yüzeylerinin modifikasyon aşamaları sırasıyla şu şekilde gerçekleştirilmiştir;

Altın yüzeyler üzerinde etkin bir şekilde SAM oluşturmak için; alkil zincirleri üzerindeki fonksiyonel gruplarından yararlanmak ve altın ile yaptığı Au-S güçlü bağı nedeniyle alkantiyollerden 11- merkaptoundekanoik asit (11-MUA) ile çalışılmıştır. Sentezlenen her iki MNPs-Au ve Au-NRs ayrı olarak, saf etanolde hazırlanan 0,05 M 11-MUA ile etkileştirilmiş ve 18 saat karıştırıcıda bekletilmiştir. Bu sayede altın-tiyol bağları kurularak nanopartiküllerin üzerinde fonksiyonel karboksil grupları oluşturulmuştur. Süre sonunda manyetik olan MNPs-Au neodyum mıknatıs vasıtasıyla viyal çeperinde toplanmış ve MES tamponuyla üç defa yıkanmıştır. Au-NRs ise 7000 dev/dk 5 dakika süreyle santrifüj yapılarak üç defa MES tamponuyla yıkanmıştır.

Partiküllerin yüzey aktivasyonunu gerçekleştirmek için MES tamponu içerisinde 0,05 M NHS ve 0,2 M EDC çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti, yüzeylerine SAM uygulanan nanopartiküller ile 20 dk karıştırıcıda bekletilerek yüzeyde amin reaktif NHS esterleri oluşturulmuştur. Süre sonunda ortamdaki EDC/NHS çözeltisini uzaklaştırmak için MES tamponu ile üç kere yıkama yapılmıştır. Yıkama işlemi MNPs-Au için dışarıdan uygulanan manyetik alan ile partiküllerin toplanması, partikül içermeyen berrak kısmın uzaklaştırılması ve sonrasında MES tamponu ile karıştırılması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Au-NRs yıkamaları ise 7000 dev/dk 5 dakika süreyle santrifüj yapılarak üç defa MES tamponuyla yıkanmıştır.

Manyetik separasyonda kullanılacak olan MNPs-Au için, partiküllerin yüzeyleri üzerinde aktif hale getirilen karboksil gruplarına kovalent bağ ile avidinin bağlanması gerçekleştirilmiştir. Bunun için 0,5 mg ml⁻¹ avidin MES tamponu içerisinde çözülüp 40 dakika karıştırıcıda MNPs-Au ile etkileştirilmiştir. Süre sonunda uygun yıkama prosedürü tekrar edilmiştir. Bu işlemin devamında avidin ile bağlanmayan karboksil gruplarının kapatılması ve spesifik olmayan bağlanmaları engellemek üzere blokasyon için 1 mg ml⁻¹ BSA kullanılarak 1 saat süreyle karıştırıcıda MES tamponunda bekletilmiştir.

SERS işaretçi olarak ALP'nin Au-NRs yüzeylerine aktif hale getirilen karboksil gruplarına kovalent olarak bağlanabilmesi için 0,5 mg ml⁻¹ avidin ile birlikte aynı anda gönderilmiş ve 30 dk süreyle karıştırıcıda bekletilmiştir. Yıkama prosedürü uygulandıktan sonra BSA ile açıkta kalan grupların blokasyonu için 1 saat süreyle

etkileştirilmiştir. Au-NRs yüzeylerine bağlanacak ALP ve BSA konsantrasyonlarının optimizasyonu için sırasıyla 10^{-8} - 10^{-11} M ve 0-4 mg ml⁻¹ aralığında MES tamponunda çalışılmıştır.

Biyotin işaretli *E. coli* antikorunun ayrı ayrı MNPs-Au ve Au-NRs yüzeylerine avidin üzerinden bağlanabilmesi için 67 mM PBS tamponu pH 7,4 de kullanılarak 0,1 mg ml⁻¹ biotin işaretli antikor hazırlanmıştır. Partiküllerle 40 dk etkileştirilerek biotin-avidin etkileşimi ($K_d=10^{-15}$ M) üzerinden antikorun nanopartiküllerin yüzeylerine bağlanması sağlanmıştır. Süre sonunda PBS tamponuyla yıkama prosedürü uygulanmıştır.

Bakterilerin spesifik olarak yakalanması ve manyetik olarak seperasyonu için, MNPs-Au ile $1,7 \times 10^1$ - $1,7 \times 10^6$ kob ml⁻¹ aralığında *E. coli*, PBS tamponunda 40 dk süreyle etkileştirilmiştir. Süre sonunda mıknatıs ile viyal çeper duvarında toplanan partiküller 3 kez PBS ve 3 kez PBST tamponuyla yıkama yapılarak spesifik bağlanmayan *E. coli* bakterileri uzaklaştırılmıştır.

Sandviç yapıyı tamamlamak ve SERS sinyalinin ALP aktivasyonu ile alınacağı Au-NRs'nin yakalanan bakterilere spesifik olarak üzerindeki antikorlar ile tutunması için hazırlanan MNPs-Au ve Au-NRs bir viyalde karıştırılmış ve 37°C, 40 dk süreyle karıştırıcıda bekletilmiştir. Süre sonunda mıknatıs ile viyal çeper duvarında toplanan partiküller 3 kez PBS ve 3 kez PBST tamponuyla yıkama yapılarak spesifik olarak bağlanmayan Au-NRs uzaklaştırılmıştır.

Tris-HCl tamponunda 0,3 mg ml⁻¹ hazırlanan ALP'nin substratı BCIP, yıkama prosedüründen sonra oluşturulan sandviç yapıya eklenmiş ve 1 saat süreyle ALP'nin aktivitesi sonucu substratı olan BCIP'i parçalayarak SERS aktif BCI dimerlerinin oluşması beklenmiştir. Süre sonunda enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği viyalden 200 µl hacimde örnek alınarak Raman küvetine konulmuş ve SERS ölçümü yapılmıştır.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

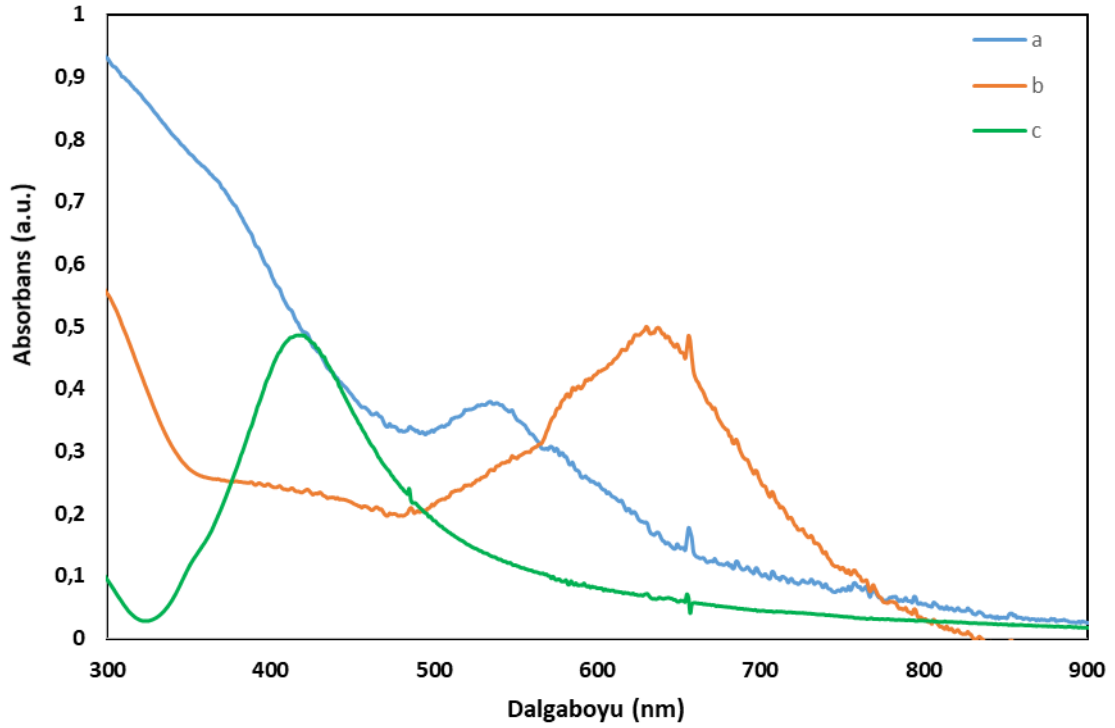
4.1 Nanopartiküllerin UV-visible Karakterizasyonu

Nanopartikül terimi 1-100 nm aralığında boyuta sahip parçacıkları ifade etmek için kullanılmaktadır. Nanopartiküller çok küçük boyutlara sahip olmaları nedeniyle birim hacimde yüzey alanları büyüktür. Partikül yüzeylerinde ve yüzeye yakın bölgelerde bulunan atomların yoğunluğu kuantum etkisinin görülmesini ortaya çıkarmaktadır. Nanopartiküller farklı kimyasal yapıya sahip materyallerden üretilmektedirler. Bu materyaller arasında metaller, metal oksitler, silikatlar, organik ve karbon materyaller ile biyomoleküller yer almaktadır. Nanopartiküller morfolojik olarak; küre, silindir, disk, levha, tüp gibi çok farklı şekillerde bulunabilmektedir [40].

Altın ve gümüş gibi metalik nanopartiküller optik özellikleri sayesinde spektroskopik temelli birçok analitik uygulamanın geliştirilmesinde kullanılmaktadırlar. Optik uyarılmalarda metalik nanopartiküllerin yüzeylerinde meydana gelen bölgesel elektromanyetik alan zenginleşmeleri, farklı optik tekniklerde hassasiyetin artmasını sağlamaktadır [54]. Metalik nanopartiküllerin bu özelliklerinden faydalanılarak SERS uygulamalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [55]. Bu tez kapsamında sentezlenen metalik nanopartiküller sırasıyla;

MNPs-Au, manyetik çekirdeği manyetit (Fe_3O_4) ve kabuk yapısı altından oluşan küresel şekilli bir nanopartiküldür. MNPs-Au manyetik özelliği kullanılarak hedef analit ve mikroorganizmaların dışarıdan uygulanan manyetik alan etkisiyle bulundukları ortamdan ayrışmalarını sağlayacak yakalayıcı prob olarak kullanılmıştır. Seçici olarak hedef bakteri ve analitlerle etkileşebilmesi için yüzey altın ile kaplanarak çekirdek@kabuk yapı oluşturulmuştur. MNPs-Au, altın yüzeyi fonksiyonel gruplarla modifiye edilerek kullanılmıştır. Au-NRs, çubuk şeklinde altın nanopartiküllerdir. Hedeflenen moleküllerin altın yüzeylerine seçici olarak bağlanmasında kullanılmıştır. AgNPs, küresel şekilli gümüş nanopartiküllerdir. Şekil ve boyut özelliklerinin plazmon rezonansı, dielektrik ve elektromanyetik etkileri artırması sebebiyle Au-NRs nanopartikülleri gibi SERS ölçümlerinde zenginleştirici nanopartikül olarak kullanılmıştır.

Yapılan çalışmalarda kullanılan MNPs-Au, Au-NRs ve AgNPs nanopartiküllerin karakterizasyonu için UV-visible spektrofotometrede ölçüm alınmıştır. Gümüş ve altının optik özelliğinden yararlanılarak sentezlenen nanopartiküllerin absorpsiyon spektrumlarından şekilleri hakkında bilgi sahibi olunmaktadır. Şekil 4.1’de küresel AgNPs, MNPs-Au ve çubuk şeklinli Au-NRs nanopartiküllere ait görünür bölgede UV spektrumları verilmiştir.



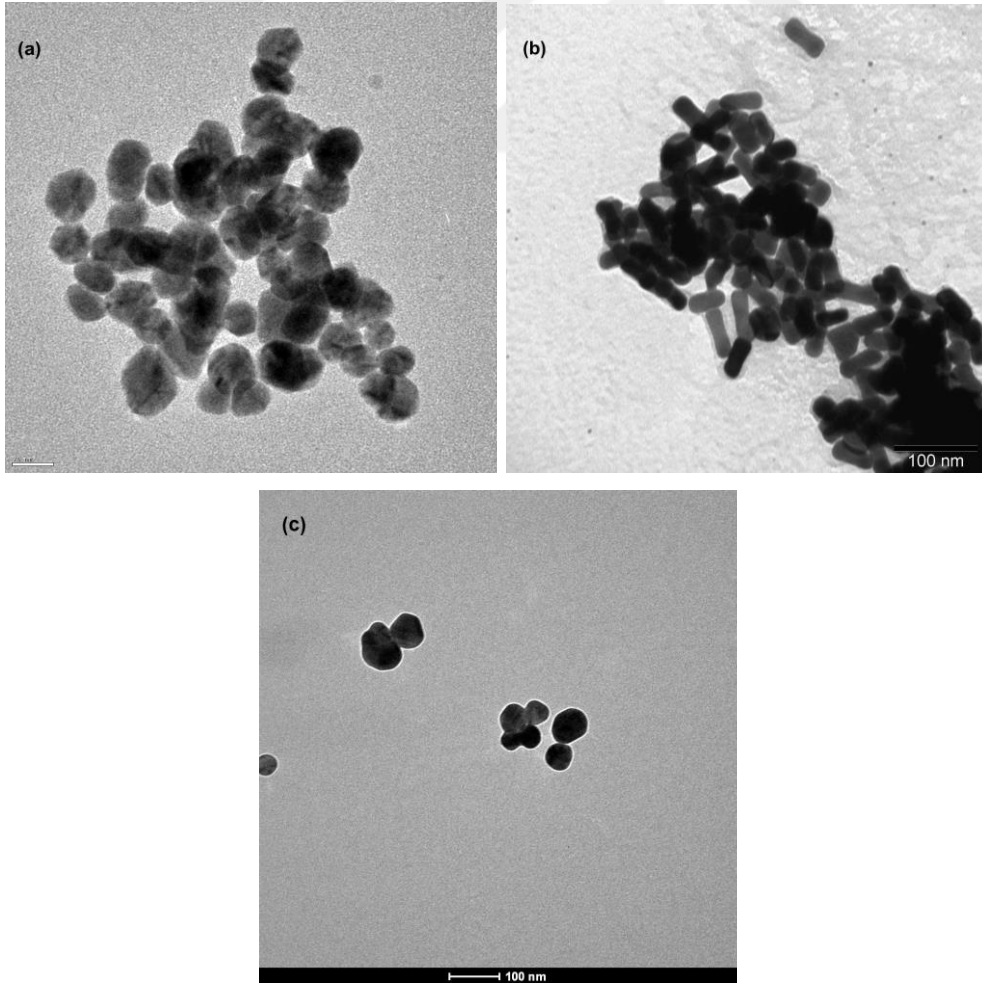
Şekil 4.1 (a) MNPs-Au, (b) Au-NRs ve (c) AgNPs için UV-visible spektrofotometrede absorpsiyon spektrumları

Küresel altın ve gümüş nanopartiküller çaplarına ve dielektrik çevreye bağlı olarak yalnız bir plazmon bandı verirler. MNPs-Au ve AgNPs için plazmon salınımı küresel simetriden dolayı izotropiktir. Altın ve gümüş olarak sentezlenen farklı iki küresel nanopartiküllerde tek bir plazmon bandı gözlenmiştir. Ölçülen plazmon bantları MNPs-Au için 535 nm’de, AgNPs için 410 nm maksimum absorpsiyon değerlerinde gözlenmiştir. Çubuk şeklindeki Au-NRs altın nanopartiküller küresel şeklindeki nanopartiküller gibi tek bir plazmon bandına sahip olmayıp iki farklı plazmon bandı vardır. Au-NRs’nin küresel şekle sahip olan nanopartiküller gibi tek bir plazmon bandına sahip olmaması, çubuk şeklindeki altın atomlarının farklı eksenlerinde anizotropik uzaysal yönelmeye sahip olduğunun göstergesidir. Şekil 4.1’den

anlaşılacağı üzere Au-NRs'un enine plazmon bandına ait maksimum absorbands değeri 525 nm'de, boyuna ait plazmon bandı ise 636 nm'de ölçölmüştür. Altın ve gümüş nanopartiköllerin plazmon rezonansları, partiköllerin boyut ve şekil özelliklerine göre değışmektedir. Bu nedenle üç partikölün plazmon bantlarının dalga boyları arasında farklılık gözlenmiştir.

4.2 Nanopartiköllerin TEM Görüntöleri

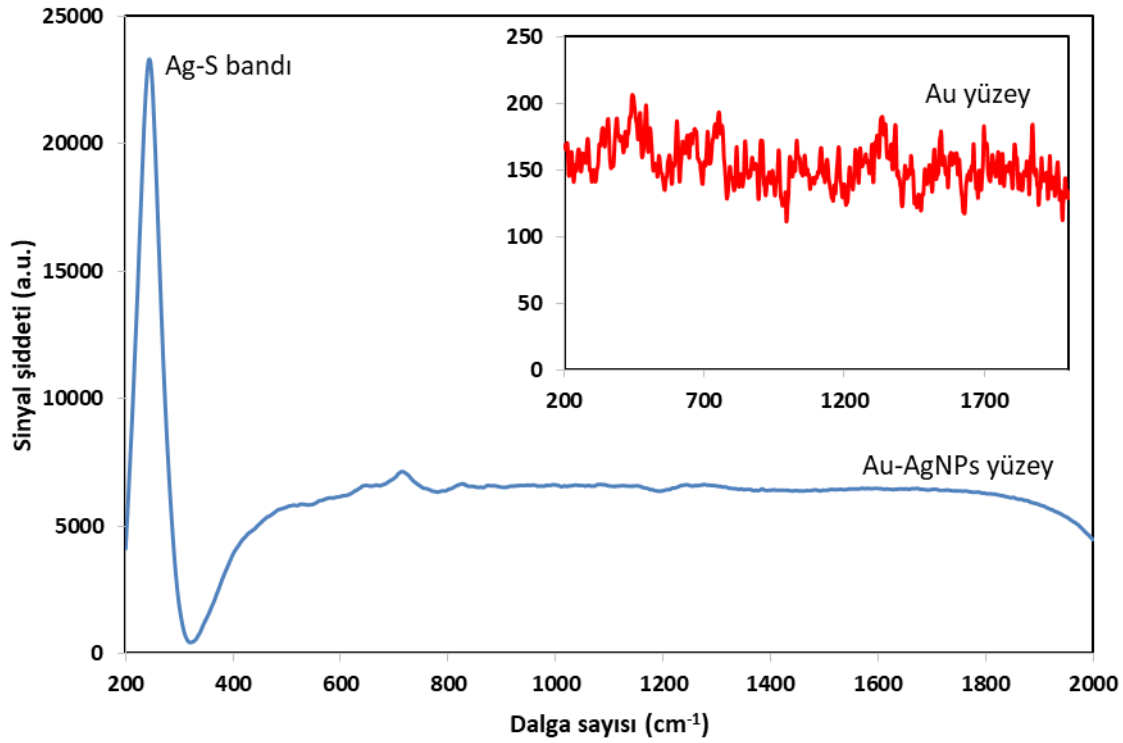
Sentezlenen nanopartiköllerin boyutlarının ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için TEM görüntöleri alınmıştır. Sentezlenen MNPs-Au ve AgNPs'nin küresel özelliklere, Au-NRs'un ise çubuk şeklinde olması beklenmektedir. şekil 4.2'de MNPs-Au, AgNPs ve Au-NRs'un TEM görüntöleri verilmiştir. TEM görüntöleri incelendiğinde MNPs-Au ve AgNPs'nin izotropik özellikte ve küresel şekilde oldukları Au-NRs'un ise anizotropik yapıda çubuk şeklinde olduğu görölmektedir. MNPs-Au'in yaklaşık olarak çapı 18 nm, AgNPs'nin çapı yaklaşık 40 nm ve Au-NRs'un boyunun ortalama uzunluğu yaklaşık 50 nm ve eninin 10 nm oldukları görölmektedir.



Şekil 4.2 (a) MNPs-Au, (b) Au-NRs, (c) AgNPs TEM görüntüleri

4.3 Au-AgNPs Yüzeylerin RS Karakterizasyonu

Altın kaplı cam slaytlar 5x5 mm ölçülerinde kesilerek kullanılmıştır. Kesilen yüzeyler öncelikle piranha çözeltisinde 15 dk süreyle bekletilmiş ve deiyonize su ile yıkanıp kurutulduktan sonra 50 mM 1,4-DDT çözeltisinde 18 saat bekletilerek yüzeylerinde SAM yapısının oluşması sağlanmıştır. Sentezlenen Ag-NPs nanopartikülleri oluşturulan SAM yapıları kullanılarak Altın slayt üzerine biriktirilmiş ve bu sayede Au-AgNPs yüzeylerin oluşması sağlanmıştır. Şekil 4.3'de Au-AgNPs yüzeylerin Au slaytlar üzerinde AgNPs nanopartiküllerinin biriktirilmenden öncesi ve sonrasında alınan RS spektrumları verilmiştir.



Şekil 4.3 Au slayt ve Au-AgNPs yüzeylerin RS spektrumları

AgNPs nanopartiküllerinin SAM oluşturulan yüzeyde biriktirilmeleri sonucu, 200-250 cm^{-1} dalga sayısında karakteristik metal-S bağlarının titreşimlerine ait bandlar görülmektedir [56]. SAM oluşturmak için kullanılan 1,4-DDT sayesinde altın yüzeyin ucundaki tiyol bağları ve yüzeyde biriktirmek amacıyla gönderilen AgNPs nanopartikülleri arasında Ag-S bağları meydana gelmiştir. RS ölçümleri sonucu 240

cm⁻¹ dalga sayısında Ag-S bağlarının titreşim bandlarına ait yüksek sinyal şiddeti gözlenmiştir.

4.4 Nanopartikül ve Nanoyüzeylerin Zenginleştirme Faktörleri

Kullanılan Raman sisteminin lazer spot çap değerini (S) [57] hesaplamak için;

$$S=(1,22*\lambda)/NA \quad (4.1)$$

Eşitliği kullanılmıştır. Kullanılan objektif 20X ise nümerik açıklık sayısı (NA) 0,40, 50X objektifte ise NA 0,75'dir. Kullanılan lazerin dalgaboyu ise (λ) 785 nm'dir. Buradan lazer spot çapı 20X objektif için; 2,4 μ m ve 50X objektif için 1,28 μ m bulunmuştur. Lazer alanını (A_{LASER}) hesaplayabilmek için;

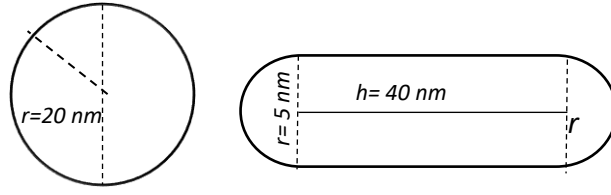
$$A_{LASER}= \pi r_{lazer}^2 \quad (4.2)$$

Eşitliği kullanılarak 20X ve 50X objektifler için sırasıyla 4,52x10⁶ nm² ve 1,28 x10⁶ nm² bulunmuştur. Lazer alanı içerisinde kalan nanopartikül sayısı (N_{NPS}) için;

$$N_{nps}= A_{LASER}/A_{NPka} \quad (4.3)$$

Eşitliği kullanılmıştır. Nanopartikül kesit alanı (A_{NPka}) sentezlenen AgNPs, Au-NRs ve SERS yüzeyi olarak kullanılan Au-AgNPs için TEM ölçümlerinden elde edilen sonuçlara göre hesaplanmıştır. AgNPs'nin çapının 40 nm, Au-NRs'nin ise kısa kenarı 10 nm ve uzun kenarı 50 nm olduğu görülmektedir. Nanopartikül kesit alanı (A_{NPka}) sırasıyla gümüş nanopartiküller için 1256 nm² ve altın çubuk için 500 nm² olarak hesaplanmıştır. 20X ve 50X objektifte alınan ölçümler için eşitlikte kullanılarak, N_{NPS} değeri AgNPs için sırasıyla 3598 adet ve 1019 adet, AuNRs için sırasıyla 9040 adet ve 2560 adet olarak bulunmuştur. Nanopartiküller ve nanoyüzeyler için kesit alanı doğrudan TEM ölçümlerinde belirlenen değerler olarak alındığı için EF hesaplamalarında geliştirilen platformlara ait olabilecek maksimum değerler elde edilmiştir.

Ölçüm esnasında kullanılan AgNPs küre şeklinde ve Au-NRs çubuk şeklinde olduğu için her bir partikülün yüzey alanı (A_{NPS}) şekil 4-4'de gösterilen çap ve uzunluk değerleri kullanılarak hesaplanmıştır;



Şekil 4.4 Küresel AgNPs ve çubuk şekilli Au-NRs partiküllerin yüzey alanlarının hesaplanması

$$A_{\text{AgNPs}} = 4\pi r^2 \text{ ve } A_{\text{Au-NRs}} = 4\pi r^2 + 2\pi rh \quad (4.4)$$

Eşitliği kullanılarak iki nanopartiküle ait yüzey alanları hesaplanmıştır. Eşitlik (4.4) kullanılarak yapılan hesaplama sonucu A_{AgNPs} 5024 nm² ve $A_{\text{Au-NRs}}$ 1570 nm² bulunmuştur. ile sırasıyla SERS ölçümlerinde oluşan plazmon alanının (A_{plazmon}) hesaplanabilmesi için;

$$A_{\text{plazmon}} = N_{\text{NPs}} * A_{\text{NPs}} \quad (4.5)$$

Eşitliği kullanılmıştır. A_{plazmon} değeri AgNPs için 20X ve 50X objektif kullanımında sırasıyla; $1,81 \times 10^7$ nm² ve $5,12 \times 10^6$ nm² olarak hesaplanmıştır. Au-NRs için 20X ve 50X objektif kullanımında A_{plazmon} değeri sırasıyla, $1,42 \times 10^7$ nm² ve $4,02 \times 10^6$ nm² olarak hesaplanmıştır. Plazmon alanı bölgesinde bulunan molekül sayısının (N_{SERS}) belirlenebilmesi için;

$$N_{\text{SERS}} = A_{\text{plazmon}} / A_{\text{molekül}} \quad (4.6)$$

Eşitliği kullanılmıştır. Raman ve SERS ölçümleri alınan her bir işaretçi molekülün alanı ($A_{\text{molekül}}$) literatürden alınarak N_{SERS} değerleri hesaplanmıştır. Raman ölçümlerinde kullanılan örneklerle ait molekül sayısı (N_{Raman}) değeri ise;

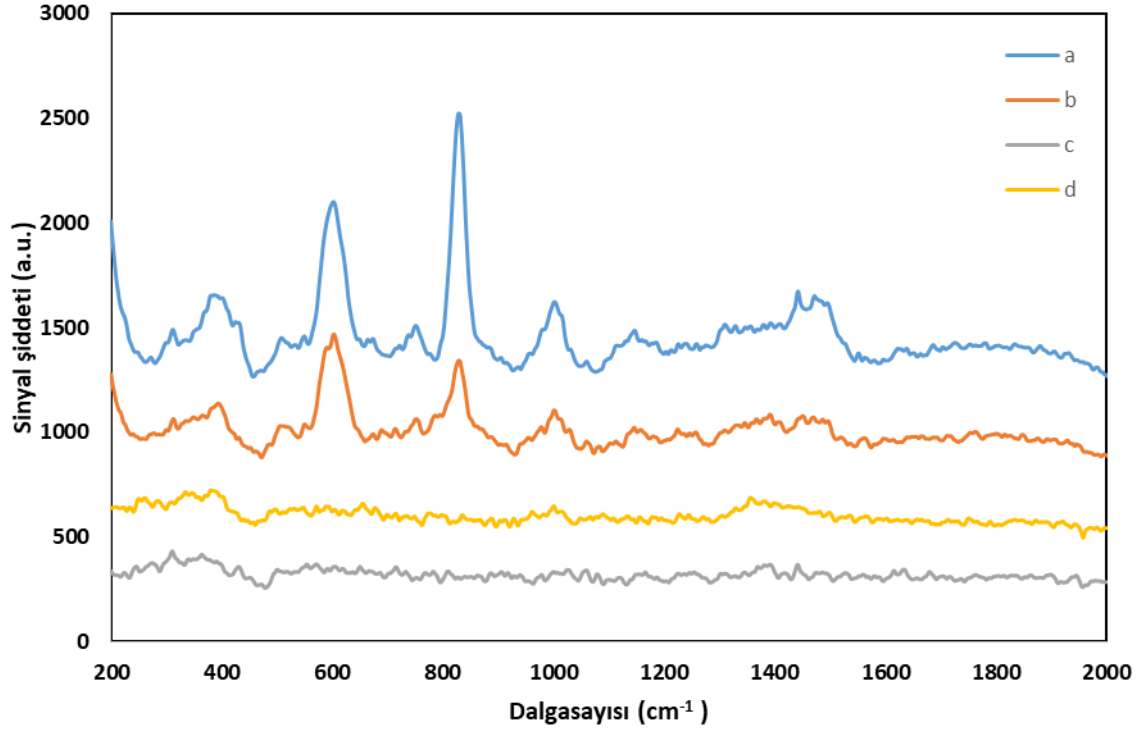
$$N_{\text{Raman}} = M * N_A * V_{\text{örnek}} \quad (4.7)$$

Eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır. Burada M, ölçümü yapılan maddenin molaritesi, N_A Avagadro sayısı ve $V_{\text{örnek}}$ kullanılan hacmi ifade etmektedir. EF değerlerinin hesaplanmasında anlaşıldığı üzere kullanılan partiküllerin şekilleri ve boyutlarının önemli olduğu görülmektedir. Sentezlenen küresel gümüş nanopartiküllerin altın nanoçubuk partiküllere göre plazmon oluşturduğu alan daha fazla olduğu anlaşılmaktadır. Bu sayede daha çok sayıda molekülün SERS plazmon alanında kalarak zenginleşmesini sağlamaktadır. Kullanılan 20X objektifin 50X objektife göre her iki nanopartikül için plazmon alanı daha yüksek hesaplanmıştır.

4.5 SERS Temelli Askorbik Asit Tayini

Güçlü bir antioksidan kapasitesine sahip olan ve doğal olarak pek çok meyvede bulunan askorbik asit (C vitamini) miktarının belirlenmesine yönelik SERS temelli bir yöntem kurgulanarak optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Askorbik asidin indirgeyici ve zayıf asidik özelliğinden yararlanılarak AgNO_3 çözeltisiyle karıştırılması sonucu kolloidal gümüş nanopartiküllerinin sentezlenmesi sağlanmıştır. Metalik nanopartiküllerin yüzeylerinde gösterdikleri plazmon rezonansı sayesinde uyarıcı olarak gönderilen 785 nm dalgaboyuna sahip lazer ile uyarılan moleküllerin titreşim enerji seviyelerini oluşturan bağlar arasında bir rezonans etkileşimi oluşmakta ve bu sayede lazeri oluşturan fotonların enerji seviyeleri değişime uğrayarak saçılmaktadır. Saçılan lazer fotonlarının dedektör tarafından toplanarak, belirlenen dalgasayılarında meydana gelen sinyal şiddeti değişimlerinin belirlenmesiyle fotonun etkileştiği moleküllere ait spektrumlar elde edilmektedir.

Askorbik asit miktarını belirleyebilmek için 1 mM askorbik asit ve 10 mM AgNO_3 çözeltilerinin bir arada bulunduğu çözeltinin, kontrol amacıyla MES tamponunun ve yüzey olarak kullanılan TLC kâğıdın SERS ölçümleri alınmıştır. Şekil 4.5'de elde edilen spektrumlar gösterilmiştir. SERS ölçümleri sonucu askorbik aside ait elde edilen spektrum incelendiğinde 835 cm^{-1} dalgasayısında L- askorbik asidin sulu çözeltilerinde halkalı yapısına ait karakteristik güçlü gerilme bandı gözlenmiştir [58]. Askorbik asidin $1025 - 1043 \text{ cm}^{-1}$ 'de C-C gerilme ve O-H eğilme bandlarına ait sinyal şiddetlerinin zayıf olduğu gözlenmektedir [59]. Ayrıca ortamda bulunan tampon çözeltisi içinde çözünen askorbik aside ait OH gruplarının düzlem dışına eğilme bandları 607 cm^{-1} 'de gözlenmektedir [58]. Tampon olarak kullanılan MES veya yüzey olarak kullanılan TLC kâğıttan herhangi bir girişimde bulunabilecek seviyede ve aralıkta sinyalin gelmediği görülmektedir.



Şekil 4.5 SERS spektrumları; a) 1 mM askorbik asit, b) 0,3 mM askorbik asit, c) MES tamponu, d) TLC yüzeyi

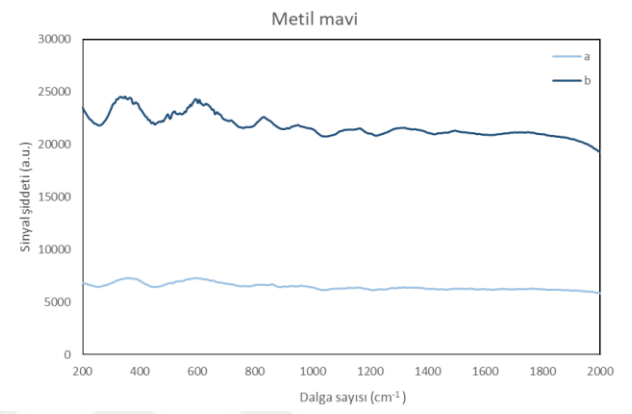
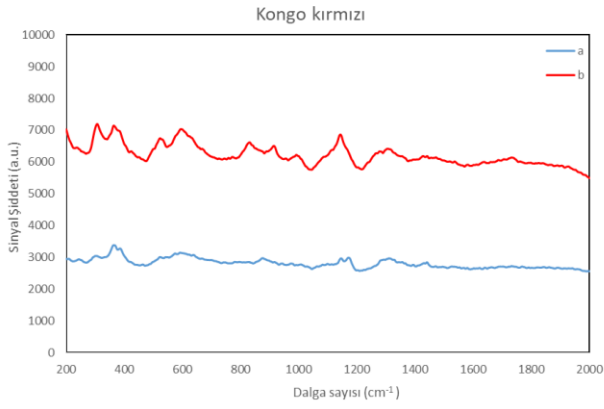
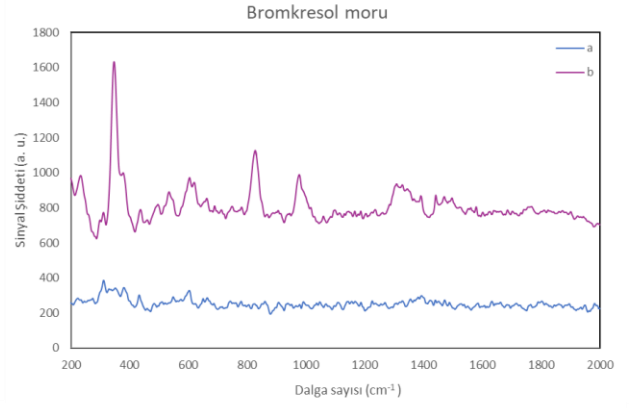
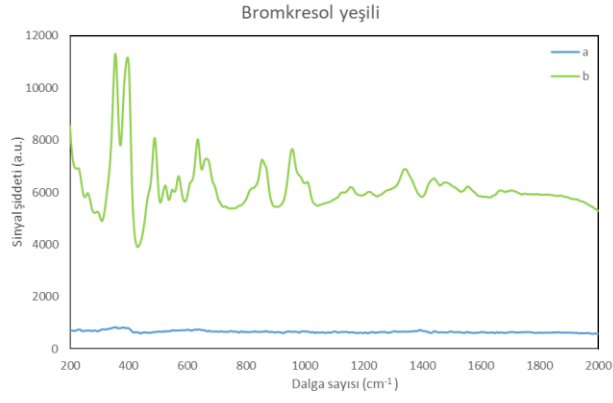
Askorbik asidin 0,3 mM hazırlanan çözeltisinden alınan SERS ölçümünde ise karakteristik bandlarına ait sinyal şiddetlerinin konsantrasyona bağlı olarak azaldığı görülmektedir. Bu durumda daha düşük konsantrasyonlarda askorbik asit miktarı belirlenmek istendiğinde direkt askorbik asidin karakteristik bandları üzerinden SERS ile tayin edebilmenin zor olacağı anlaşılmaktadır.

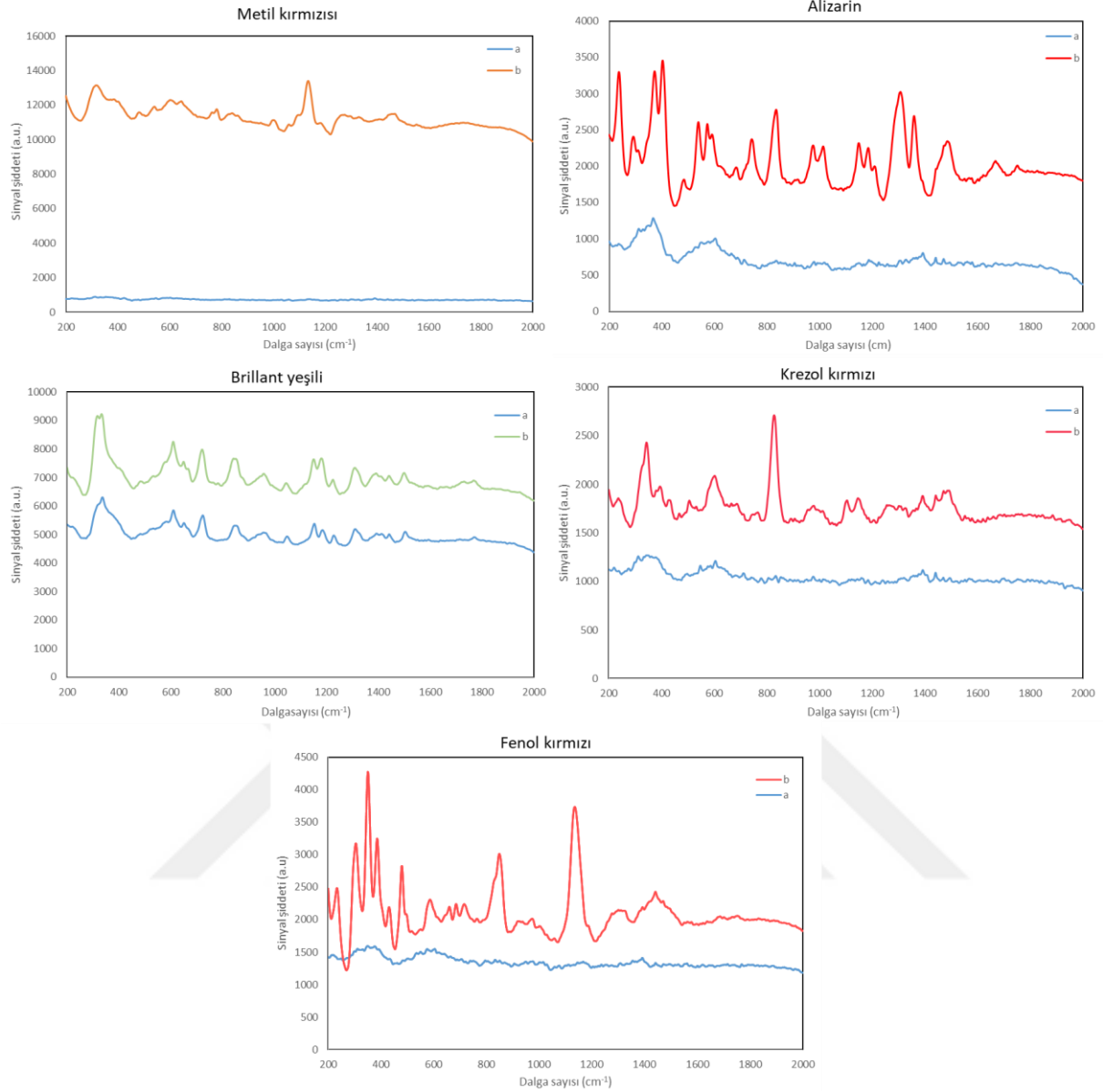
Düşük konsantrasyonlarda askorbik asidin miktar tayinini yapabilmek için SERS etiketleri üzerinden, dolaylı olarak tespit edilecek analitin değişen konsantrasyonlarına bağlı olarak işaretlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla bir sonraki adımda, Raman işaretçisi olarak yaygın bir şekilde kullanılan pH işaretçileri ve boyaları kullanılarak en uygun işaretçi boyanın seçilmesi için Raman ve SERS spektrumları alınmıştır.

4.5.1 Raman Aktif İşaretçi Boyaların RS ve SERS Spektrumları

RS işaretçilerinin yüksek rezonans etkiye ve kutuplanabilirliğe sahip olmaları sebebiyle Raman saçılımlarına ait simetrik titreşim enerjileri de yüksektir. RS işaretçisi olarak kullanılan boyalar, uyarılma dalga boyu ve absorpsiyon bandının örtüşmesi sonucu yüksek elektron rezonans etkisine sahip olmaktadır [60]. Bu durum düşük

konsantrasyonlarında çalışabilme imkânı sağlamaktadır. Eppendorfta 1 mM konsantrasyonda hazırlanan bromkresol yeşili, bromkresol moru, Kongo kırmızı, metil mavi, metil kırmızısı, alizarin, brillant yeşili, krezol kırmızı ve fenol kırmızı işaretçilerinin öncelikle TLC üzerine damlatılarak RS spektrumları alınmıştır. Hazırlanan 1 mM askorbik asit ve 0,01 M AgNO_3 'ün her bir Raman işaretçisinin hazırlandığı eppendorfta karıştırılması sonucu askorbik asit tarafından indirgenen Ag^+ iyonları, kolloidal nanoparçacıkları oluşturmaktadır. Karışım vorteksle karıştırıldıktan sonra 1 μl alınıp TLC üzerine damlatılmış ve RS işaretçilerine ait SERS sinyalleri elde edilmiştir. Şekil 4.6'da her bir Raman işaretçisine ait spektrumlar gösterilmiştir. Elde edilen spektrumlar incelendiğinde işaretçi boyaların Raman bandlarına ait sinyal şiddetlerinin ölçülen 1mM konsantrasyon için düşük olduğu görülmektedir. SERS ile alınan ölçümlerde ise işaretçi boyaların karakteristik bantlarına ait sinyallerin şiddetlerinin arttığı görülmektedir. Askorbik asidin AgNO_3 'ü indirgemesi sonucu oluşan kolloidal gümüş nanopartiküllerin lazer ile etkileşimiyle açığa çıkan plazmon rezonansı sonucu, işaretçi boyaların moleküler bağları arasında titreşim enerjileri artmıştır. Bu sayede enerji seviyelerinde ki değişimler her bir bağ için karakteristik bandlarında sinyal şiddetinin artmasını sağlamıştır.





Şekil 4.6 1mM Raman işaretçi boyalarına ait a) Raman ve b) SERS spektrumları

4.5.2 Raman Spektroskopisi İşaretçi Boyalarının Zenginleştirme Faktörlerinin Hesaplanması

Raman işaretçisi olarak kullanılan boyalardan; bromkresol yeşili, Kongo kırmızısı, metil mavi, metil kırmızısı, alizarin, brilliant yeşili, kresol kırmızısı, fenol kırmızısı ve bromkresol morun Raman ve SERS spektrumları elde edildikten sonra EF'leri ayrı ayrı hesaplanmıştır. Zenginleştirme faktörü (EF) eşitlik (3.1)'den hesaplanmıştır.

$$EF = (I_{SERS}/N_{SERS}) / (I_{Raman}/N_{Raman})$$

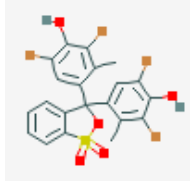
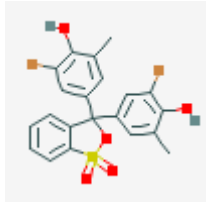
RS ve SERS ölçümleri alınan her bir işaretçi moleküllerin alanı ($A_{\text{molekül}}$) literatürden alınarak N_{SERS} değerleri hesaplanmıştır. Raman ölçümlerinde kullanılan işaretçilere ait molekül sayısı (N_{Raman}) değeri ise;

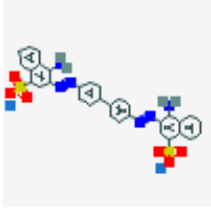
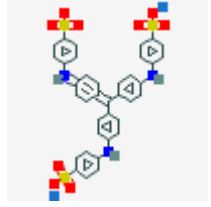
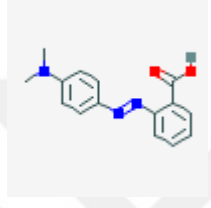
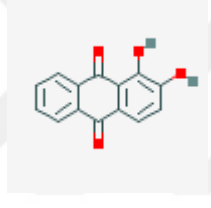
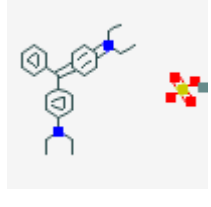
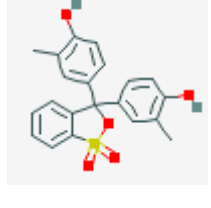
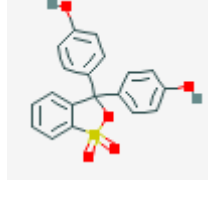
$$N_{\text{Raman}} = M \cdot N_A \cdot V_{\text{örnek}} \quad (4.7)$$

Eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır. Raman ölçümlerinde kullanılan işaretçi örneklerin hacmi ($V_{\text{örnek}}$) 1 μl ve Molariteleri (M) 10^{-3} M olduğu için N_{Raman} değerleri $6,02 \times 10^{14}$ olarak hesaplanmıştır.

Raman işaretçilerinin hesaplanan EF değerleri Çizelge 4.1’de gösterilmiştir. Yukarıda verilen eşitlikler üzerinden yapılan EF hesabı sonucu 10^8 - 10^9 kat sinyal şiddetlerinde zenginleşme olduğu görülmektedir. Raman işaretçisi olarak kullanılan boyaların rezonans Raman ölçüm koşullarında saçılımlarının yüksek olmasından dolayı EF değerleri, plazmonik nanopartiküllerin SERS etkisi sonucu literatürde rapor edilen ortalama 10^4 - 10^6 EF değerlerinden yüksek bulunmuştur [61].

Çizelge 4.1 Raman işaretçi boyaların molekül yapıları ve SERS zenginleştirme faktörleri

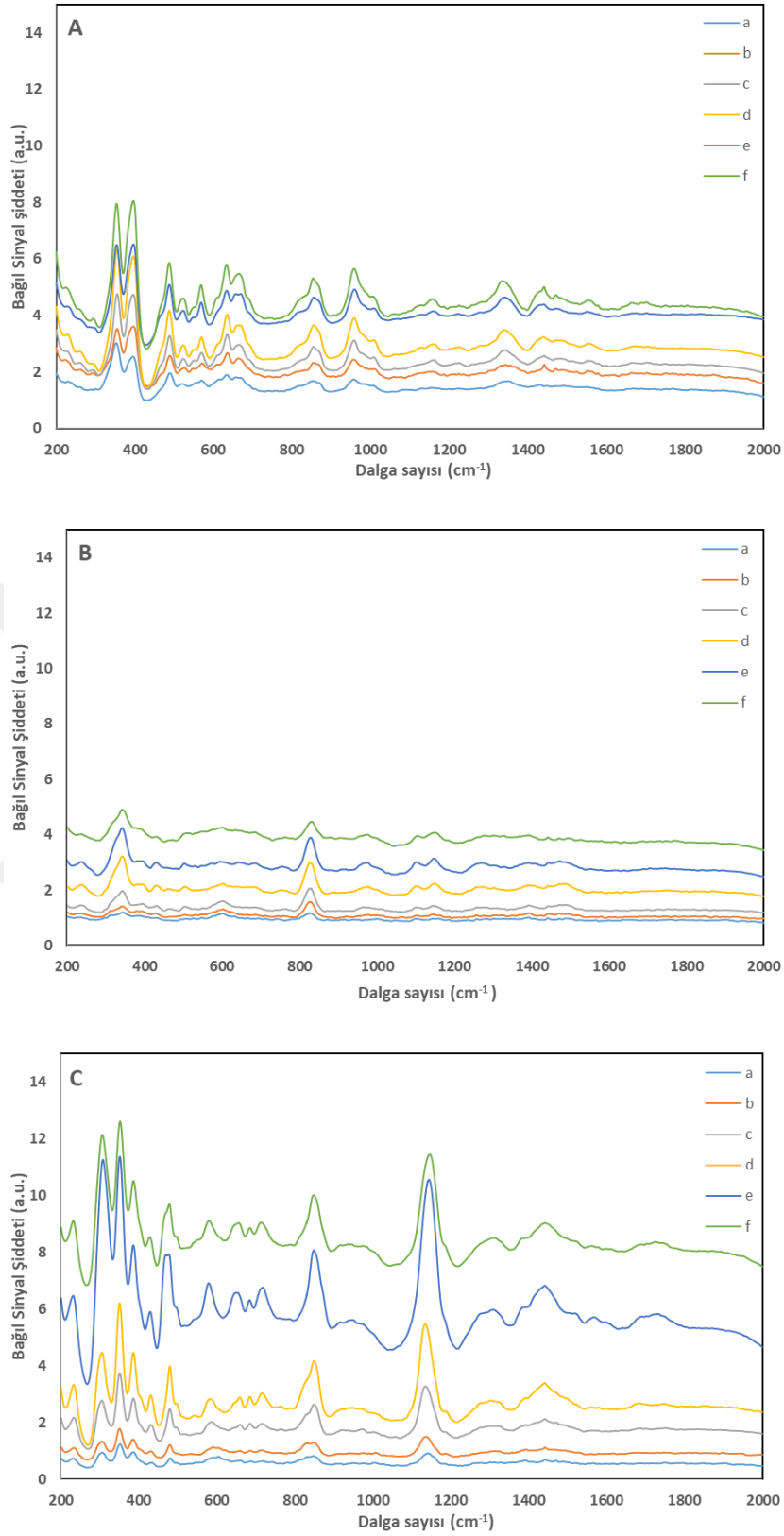
	<u>Molekül yapısı</u> [62]	<u>Molekül alanı (nm²)</u> [62]	<u>Zenginleştirme Faktörü (EF)</u>	<u>Raman ve SERS Dalgasayıları (cm⁻¹)</u>
Bromkresol yeşili		0,92	$1,33 \times 10^9$	@340 cm ⁻¹
Bromkresol moru		0,92	$3,48 \times 10^8$	@347 cm ⁻¹

Kongo kırmızısı		2,33	$2,54 \times 10^8$	@1143 cm^{-1}
Metil mavi		2,30	$3,47 \times 10^8$	@613 cm^{-1}
Metil kırmızısı		0,65	$5,76 \times 10^8$	@1134 cm^{-1}
Alizarin		0,75	$2,1 \times 10^8$	@404 cm^{-1}
Brillant yeşili		0,92	$5,27 \times 10^7$	@611 cm^{-1}
Krezol kırmızı		0,92	$7,87 \times 10^8$	@824 cm^{-1}
Fenol kırmızı		0,92	$6,88 \times 10^8$	@1137 cm^{-1}

Kırmızı= O, Gri= H, Sarı= S, Turuncu=Br, Mavi=N

Raman işaretçi boyalarının her birine aynı konsantrasyonlarda askorbik asit (1 mM) ve AgNO_3 (10 mM) eklenmesi sonucu oluşan koloidal AgNPs sonucu elde edilen SERS spektrumlarından hesaplanan EF değerleri karşılaştırıldığında en yüksek değerlerin; fenol kırmızısı $6,88 \times 10^8$, krezol kırmızısı $7,87 \times 10^8$ ve bromkresol yeşilinde $1,33 \times 10^9$ olduğu görülmektedir. Askorbik asit miktarına bağlı olarak elde edilen SERS sinyal şiddetinin değişimleri fenol kırmızısı, krezol kırmızısı ve bromkresol yeşili için takip edilmiştir. Sülfofitaleyn grubuna ait olan bu üç işaretçi boyanın, askorbik asit konsantrasyonlarının değişimlerine karşı elde edilen SERS spektrumları Şekil 4.7’de gösterilmiştir.





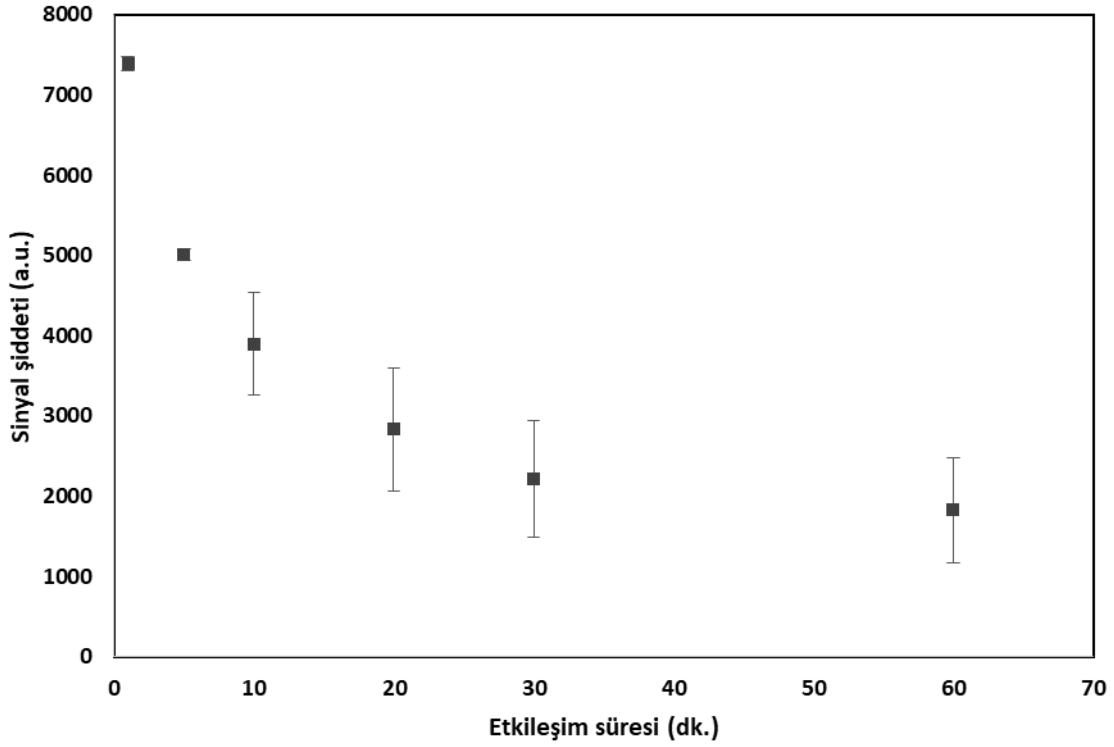
Şekil 4.7 Farklı askorbik asit derişimlerinde a) 0,3 b) 0,6 c) 1 d) 3 e) 6 f) 10 mM, A) bromkresol yeşili, B) krezol kırmızı, C) fenol kırmızısına ait SERS spektrumları

Bromkresol yeşili pH 3,8 altında sarı, pH 5,4 üzerinde ise mavi renge dönüşmektedir. Fenol kırmızısı ve krezol kırmızısı sırasıyla pH 6,8 ve pH 7,2 değerlerinin altında sarı renkli olmaktadır. Bromkresol yeşili literatürde biyomedikal [63, 64], ilaç [65] ve protein analizlerine [66, 67] yönelik geniş bir alanda kullanılmaktadır. Askorbik asidin pK_a değeri 4,17 ve bromkresol yeşili de pK_a değeri 4,7 olup, sulu çözeltilerinde zayıf asit özelliği göstermektedirler. Belirli dalgasayılarında SERS sinyali şiddetinde değişimlerin askorbik asitin farklı konsantrasyonlarının ölçümünde değişimlerin gözlenebilmesi ve bunun yanında bromkresol yeşilinin SERS ölçümlerinde yüksek değerde bir EF'ye sahip olması nedeniyle çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir.

4.5.3 Model Çözelti Oluşturulması ve Analiz Süresinin Optimizasyonu

Bromkresol yeşili 1 mM ve $AgNO_3$ 10 mM derişimde olacak şekilde hazırlanmış ve 1 mM askorbik asit çözeltisi ile 1, 5, 10, 30, 60 dk süreyle karıştırılarak SERS ölçümleri alınmıştır. Elde edilen zamana bağlı 340 cm^{-1} 'de sinyal şiddetlerinin değişimi Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Etkileşim süresi arttıkça sinyal şiddetlerinin düştüğü görülmektedir. Artan sürelerde oluşan çözeltinin kararlılığı bozulduğu anlaşılmaktadır. Askorbik asit ve $AgNO_3$ 'ün karıştırılmasıyla meydana gelen koloidal nanoparçacıkların sürenin artmasıyla; bir araya gelerek yapının büyümesi ve çökmesi sonucu SERS sinyallerinde düşüşe sebep olduğu anlaşılmaktadır.

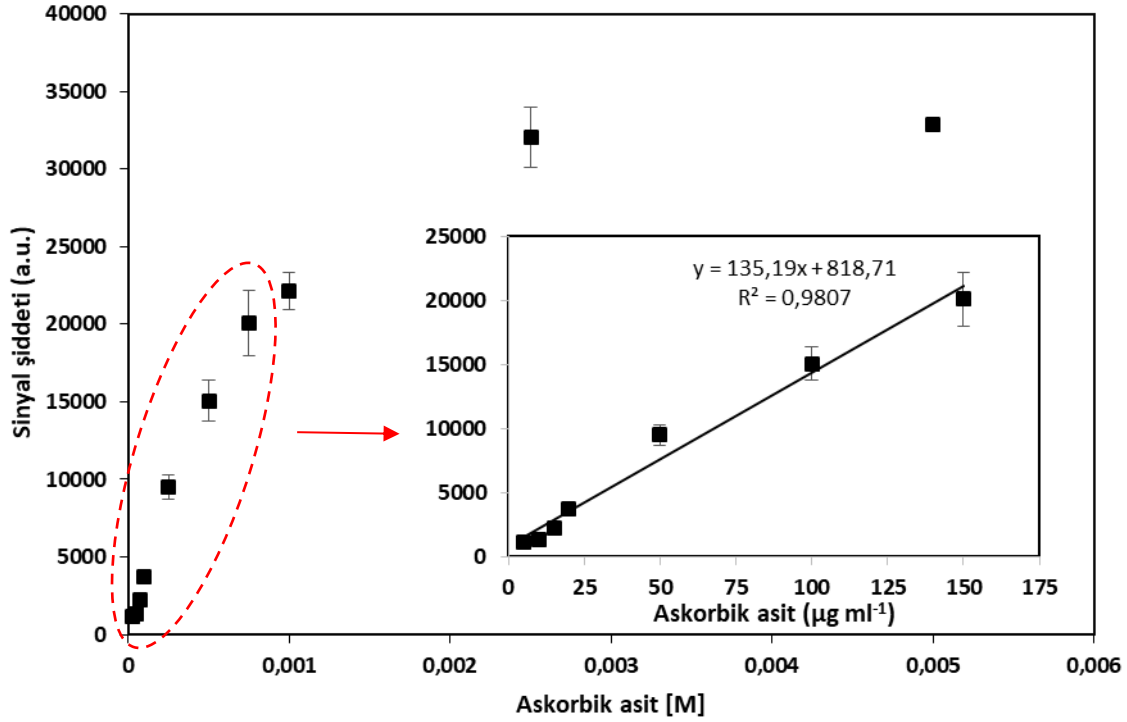
Ölçüm modelimizde hazırlanan çözeltilerin ilk 5 dakika içinde alınan sinyal şiddetlerinin yüksek olduğu ve 10, 20, 30 dakikalarda düştüğü ve standart hatalarının da yükseldiği görülmektedir. Çözeltiler karıştırıldıktan 60 dakika sonra alınan ölçümde ise sinyal seviyesinin sabitlendiği görülmektedir. Askorbik asit tayinin Raman spektrofotometresi kullanılarak hassas, hızlı ve kolay bir şekilde yapılabilmesi için, çözeltiler karıştırıldıktan 1 dakika sonra ölçümlerinin alınmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.8 Zamana bağlı olarak 340 cm^{-1} dalga sayısında SERS sinyallerinin değişimi

4.5.4 Askorbik Asidin Kalibrasyon Eğrisinin Elde Edilmesi

Askorbik asidin $5\text{-}1000\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimlerinde hazırlanan sulu çözeltisinden belirlenen koşullarda alınan SERS ölçümleri sonucu elde edilen sinyal şiddetleri Şekil 4.9'da gösterilmiştir. $2,5\text{ mM}$ ve 5 mM askorbik asit içeren sulu çözeltilerin sinyallerinin yaklaşık aynı değerde oldukları ve artan konsantrasyon değişimlerine karşı eşik değere geldiği görülmektedir. Bu konsantrasyonlardan daha düşük derişimlerde ise sinyal şiddetinin konsantrasyon artışlarına bağlı olarak arttığı görülmektedir.



Şekil 4.9 Askorbik asit konsantrasyonlarına bağlı olarak elde edilen SERS sinyal şiddetleri

Doğrusal aralık olan 5-150 $\mu\text{g ml}^{-1}$ konsantrasyonları arasında çizilen kalibrasyon eğrisi üzerinden hesaplanan kantitatif parametreler Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Elde edilen değerlere bakıldığında R^2 değerinin 0,9807 olduğu görülmektedir. Bromkresol yeşilinin işaretçi olarak seçilmesi sonucu takip edilen 340 cm^{-1} dalgasayısındaki sinyal şiddetlerinin 5-150 $\mu\text{g ml}^{-1}$ aralığında değişen askorbik asit miktarlarına bağlı olarak doğrusal aralıkta değişim göstermiştir. Doğrusal bölgede çizilen kalibrasyon eğrisinden elde edilen parametreler sonucu hesaplanan LOD değeri $1,37\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ ($6,8\text{ }\mu\text{M}$) bulunmuştur.

Çizelge 4.2 Askorbik asit tayinine yönelik SERS tabanlı yöntem ile elde edilen istatistiksel parametreler

Parametreler	Askorbik asit
Doğrusal aralık	5-150 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Eğim	135,19
Determinasyon katsayısı (R^2)	0,9807
LOD	1,37 $\mu\text{g ml}^{-1}$
LOQ	4,56 $\mu\text{g ml}^{-1}$

Geliştirilen SERS temelli yöntem, sulu çözeltilerde çok düşük miktarlarda bulunan askorbik asidin tayinini mümkün hale getirmektedir. Tez kapsamında geliştirilen yöntem sonucunda elde edilen LOD ve LOQ değerlerinin daha önce rapor edilen SERS temelli çalışmalarla karşılaştırılması Çizelge 4.3’de verilmiştir;

Çizelge 4.3 Askorbik asidin SERS temelli çalışmalarda tespit edilen miktarlarının karşılaştırılması

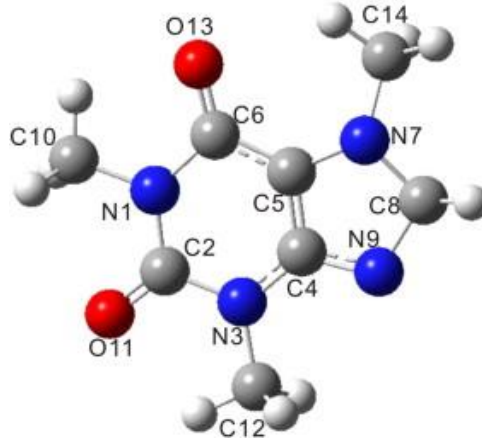
SERS Yüzeyi	Askorbik asit miktarı	Referans
Altın NPs	20 μM	[68]
Gümüş NPs	0,018 μM (LOD)	[69]
Gümüş NPs (yığın)	20 μM (LOD)	[70]
Gümüş@Alimünyum yüzey	20 μM	[71]
AgNPs-TLC yüzey	6,8 μM (LOD)	Tez kapsamında

Askorbik asit çoğu meyve ve sebzelerde 50 mg 100 g^{-1} ve daha fazla oranda bulunmaktadır. Günlük tavsiye edilen tüketim değeri yetişkinler için FDA tarafından 60 mg olarak belirlenmiştir [72]. Kan serumunda askorbik asidin bulunma miktarı 23 $\mu\text{mol l}^{-1}$ olduğunda normal değerleri, 11,4-23 $\mu\text{mol l}^{-1}$ arasında düşük ve 11,4 $\mu\text{mol l}^{-1}$ olduğunda ise yetersiz seviyede olduğunu göstermektedir [73]. Geliştirilen SERS tabanlı askorbik asit analizinde elde edilen LOD ve LOQ değerlerinin, gıdalarda ve

kandaki askorbik asit seviyesinin belirlenmesinde kullanılabileceğini göstermektedir. SERS ile analizi yapılan diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında en iyi sonucun El Zahry ve ark. tarafından yapılan akış hücreli, çoklu analizlerin yapılmasını sağlayan, örnek tutuculu konfokal Raman sistemiyle ölçümler sonucu elde edildiği görülmektedir. Yüzeyde gümüş nanopartikülleri fotokimyasal indirgeyici ajanlar kullanarak sentezlemiş ve iki partikül arasında oluşacak kesit alanlarını optimize ederek “hot spot” oluşumunu sağlamıştır. Bu durum sonucunda yüzey ölçümlerinde askorbik asidi $3,2 \text{ ng ml}^{-1}$ LOD değerinde tespit edebilmiştir [69]. Tayin edilen miktar bu tez kapsamında geliştirilen yöntem ile bulunan $1,37 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ değerinden daha hassas ve düşüktür. Bu sonuca rağmen kurulan sistemin karmaşıklığı ve çok bileşenli olması, saha çalışmalarında kullanılamaz olması, uzmanlık gerektiren ve laboratuvar ortamında nanopartikül sentezlenmesini içeren prosedürü gereği uygulamada dezavantajlar içermektedir. Tez kapsamında geliştirilen askorbik asit tayininin optimizasyon çalışmaları sonucu belirlenen prosedürü takip edildiğinde 3 farklı çözelti; AgNO_3 , işaretçi Raman boyası bromkresol yeşili ve ölçümü yapılacak örnek çözelti hazırlanıp karıştırılmaktadır. Tayin edilecek örnekte bulunan askorbik asit içerikli çözeltinin karıştırılmasından sonra 2 dakika içinde SERS ölçümünde elde edilen sinyal şiddetine karşılık gelen konsantrasyonun hesaplanmasıyla örnek içindeki askorbik asit miktarı belirlenebilmektedir. Geliştirilen yöntemin LOD ve LOQ sonuçları hem gıda hem de sağlık alanında analizlerde tespit edilmesi gereken askorbik asit miktarını belirleyebilmektedir.

4.6 SERS Temelli Kafein Analizi

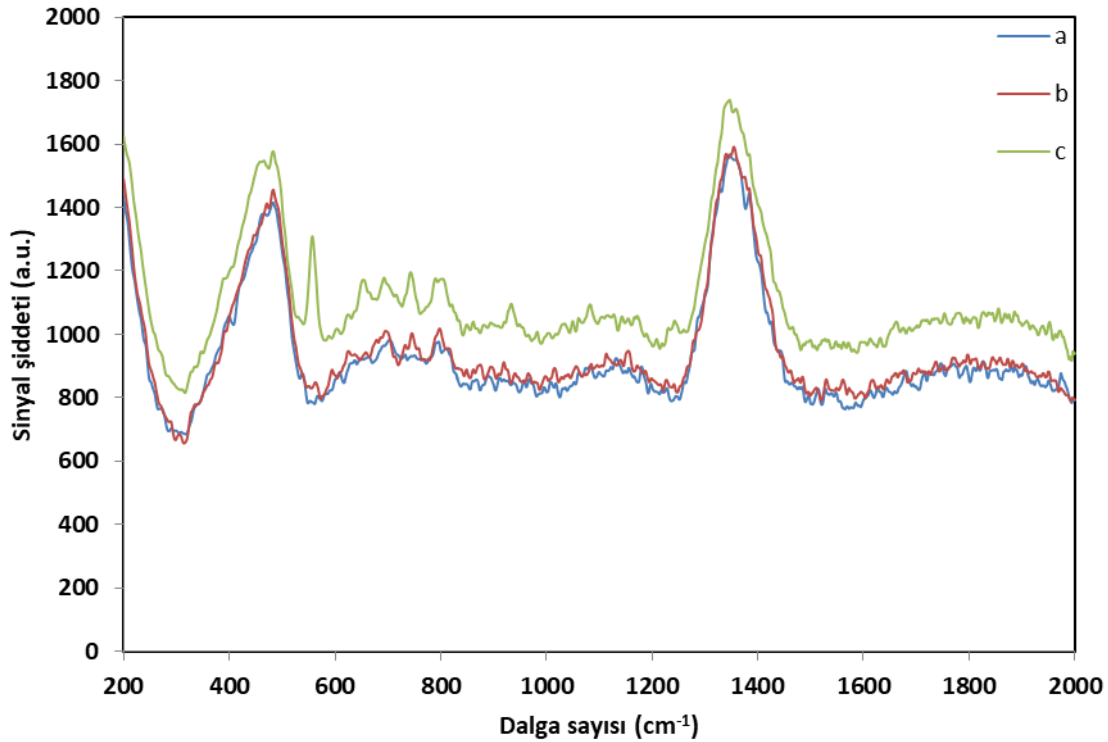
Kafein (1,3,7-trimetil ksantin) alkaloid grubuna ait ve doğal olarak çay, kahve, kakao çekirdeğinde bulunan bir moleküldür. Eczacılık ve ilaç sektöründe yaygın olarak kullanılmakta ve pek çok ağrı kesici ve antimigren ilacının içeriğinde bulunmaktadır. Kafein merkezi sinir sisteminde sinyal iletimini uyaran bir etkiye sahiptir. Bu yüzden son zamanlarda pek çok diyet ürün ve içeceklerde katkı maddesi olarak yer almaktadır. Bu durum alkaloidlerin aşırı tüketilmelerinde istenmeyen yan etkilere sebep olmaktadır. Bu sebeple içeceklerde kafein miktarlarının kimyasal analizleri önemli hale gelmiştir [74, 75]. Kafeinin moleküler yapısı Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10 Kafein molekülünün üç boyutlu gösterimi [76]

4.6.1 Kafeinin RS Spektrumları ve Farklı pH Değerlerindeki Değişimi

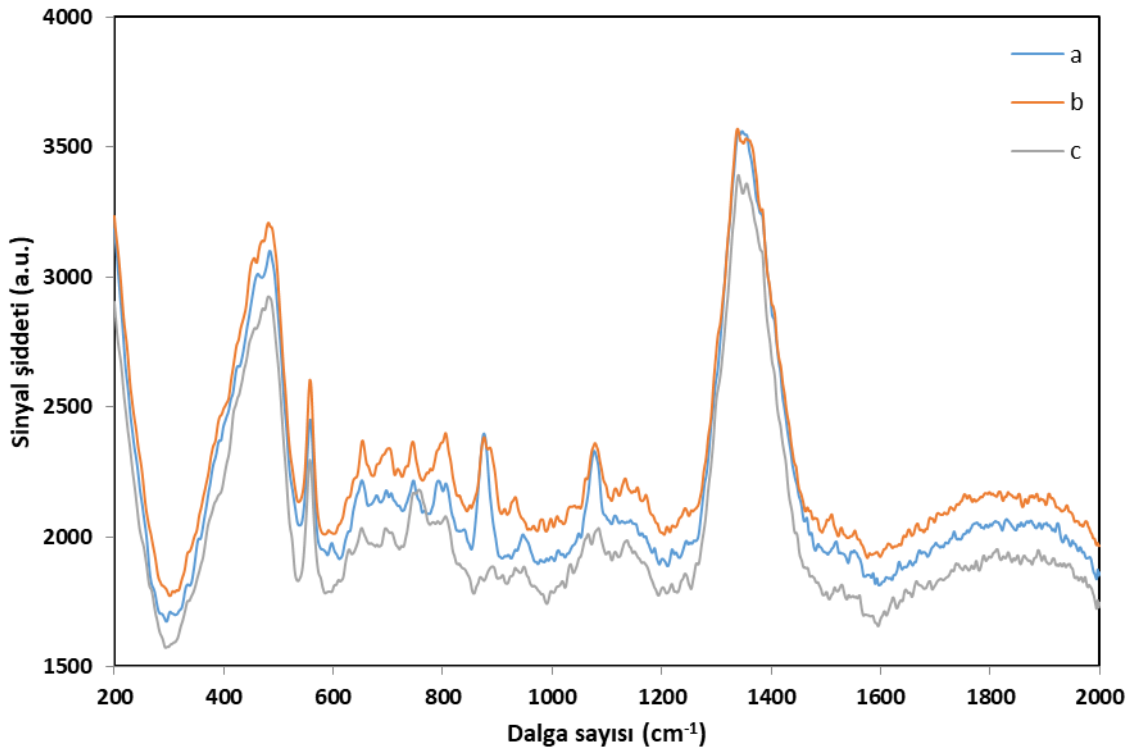
Sentezlenen metalik nanopartiküller ve hazırlanan yüzeylerde kafeinin kantitatif olarak analizi için yöntemler geliştirilmiştir. Öncelikle 0,1, 1, 10 mg ml⁻¹ derişimlerde hazırlanan kafein çözeltisinin Raman spektrumları alınmış ve şekil 4.11’de gösterilmiştir.



Şekil 4.11 Kafeine ait a) 0,1 mg ml⁻¹, b) 1 mg ml⁻¹, c) 10 mg ml⁻¹ Raman spektrumları

Alınan spektrumlar incelendiğinde cam küvetler içinde alınan ölçümler sonucu cama ait iki karakteristik geniş band görülmüştür; 350-450 cm^{-1} dalgasayısındaki band C-C zincir deformasyonuna aittir. 1350 cm^{-1} (880 nm) de görülen band ise camdan gelen yüksek floresans girişimidir. Kafein çözeltisinin konsantrasyonu artırıldığında 10 mg ml^{-1} 'de görülen 555 cm^{-1} 'de meydana gelen sinyal şiddetindeki değişimin ise C–N–CH₃ deformasyonuna ait olduğu anlaşılmaktadır [76].

Kafeinin farklı içeceklerde bulunması nedeniyle, analizi yapılan çözeltiye göre değişen pH aralıklarında bulunabilmektedir. Örneğin organik sıvılarda, kan plazmasında nötr pH değerine yakınken, mide asidinde pH değeri 2 civarındır [77]. Kafeinin Raman sinyallerinin farklı pH değerlerinde elde edilen sinyal şiddetlerinin değişimini tespit edebilmek amacıyla Tris-HCl pH 9,8, PBS pH 7,2 ve sitrat tamponu pH 3 olacak şekilde 10 mg ml^{-1} kafein çözeltileri hazırlanarak Raman sinyallerinin değişimleri takip edilmiştir. Şekil 4.12'de 3 farklı tampon ve pH değerinde elde edilen Raman spektrumları gösterilmiştir.



Şekil 4.12 10 mg ml^{-1} kafeinin, a) pH 7,2 PBS, b) pH 3 sitrat, c) pH 9,8 Tris-HCl tamponunda alınan Raman spektrumları

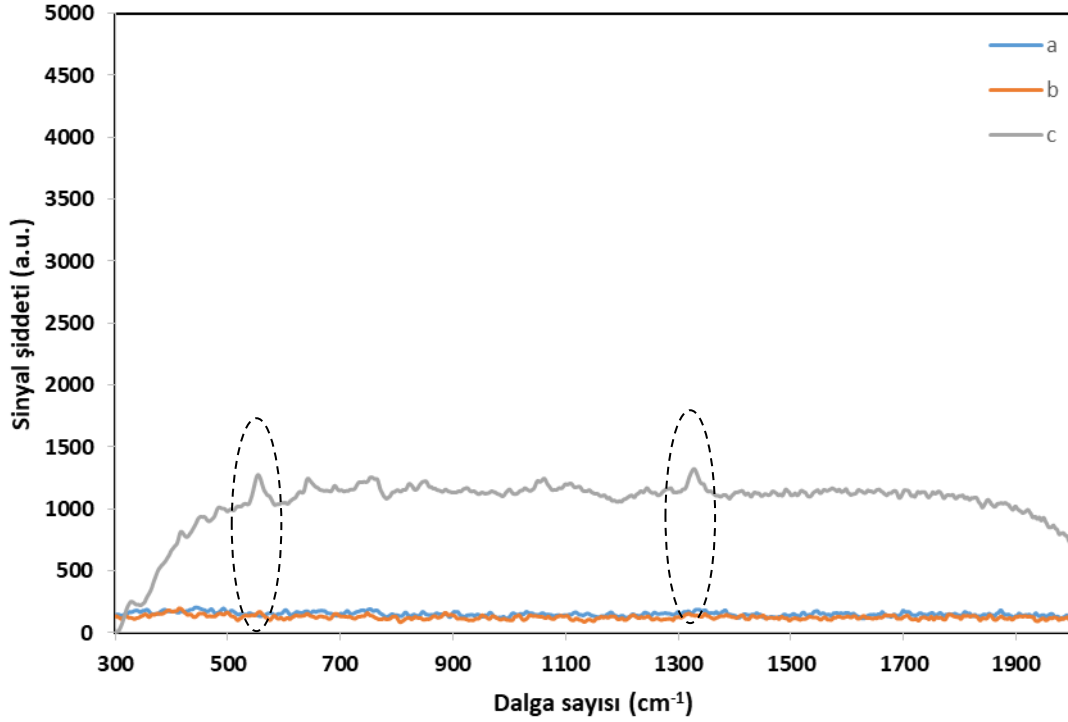
Kafeinin farklı pH aralıklarında alınan Raman sinyalleri incelendiğinde, 555 cm^{-1} 'de gözlenen karakteristik bandının sinyal şiddetinin değerinin üç farklı asidik, nötr ve alkali

pH değerlerinde değişmediği görülmektedir. Kafein molekülünün sulu çözeltilerinde farklı pH değerlerinde moleküler konformasyonunda bir farklılığının olmadığı ve elektronegatifliğinin değişmemesi sebebiyle Raman sinyal şiddetlerinde bir değişimin gerçekleşmediği gösterilmiştir [76]. Alkali ve asidik pH değerlerinde ise gümüş nanopartiküllerin stabilitelerinin bozulup kararsız yapıda bulunmaları sebebiyle, kafein molekülü ve gümüş arasında oluşan zayıf elektron bağları sebebiyle SERS sinyal şiddetlerinde büyük farklılıklar ve değişimler olmaktadır [78]. Bu durum SERS sonucu alınan sinyal şiddeti değerlerinde tekrarlanabilirlik ve standart hatayı etkilemektedir. Gümüş kolloidal partiküllerin ve moleküller arasında kurulan elektron bağların kararlı yapıda kalabilmeleri için nötr pH değerlerinde SERS ölçümlerinin alınmasına karar verilmiştir.

4.6.2 Kafeinin SERS Temelli Platformlardaki Spektrumları ve EF Değerleri

Karakteristik olarak 555 cm^{-1} 'de görülen kafeine ait karakteristik bandın Raman sinyal şiddetinin güçlü olması nedeniyle SERS temelli ölçümler sırasında bu bandın takip edilmesine karar verilmiştir. Sentezlenen Au-NRs, AgNPs ve AgNPs-Au yüzeylerde kafeinin 555 cm^{-1} 'de sinyal şiddeti takip edilerek EF değerleri hesaplanmıştır.

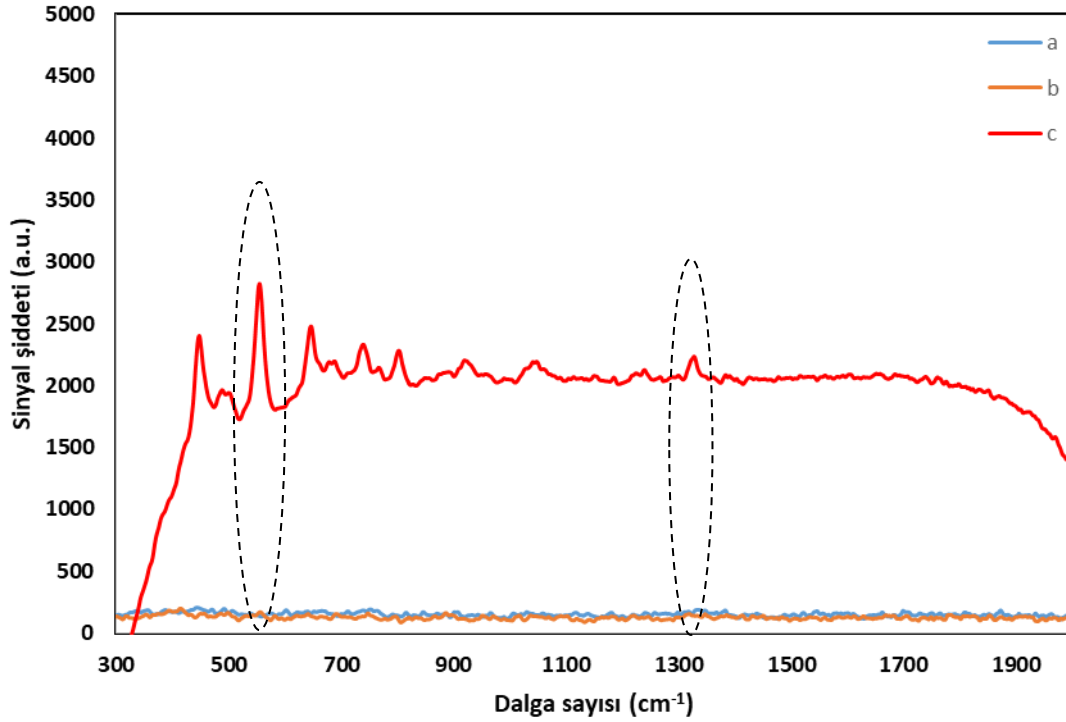
1 mg ml^{-1} kafein çözeltisi sırasıyla Au yüzeye $1\text{ }\mu\text{l}$ damlatılarak ve Au-NRs ile karıştırıldıktan sonra yüzeye $1\text{ }\mu\text{l}$ damlatılarak SERS ölçümü alınmıştır. Şekil 4.13'de elde edilen spektrumlar gösterilmiştir. Alınan spektrumlar incelendiğinde yüzey olarak kullanılan ticari altın slayt üzerinden herhangi bir karakteristik bandın gelmediği ve kafeinin 555 cm^{-1} 'deki sinyal şiddetine girişim yapmadığı görülmektedir.



Şekil 4.13 a) Altın yüzey, b) 1 mg ml⁻¹ kafein, c) 1mg ml⁻¹ kafein ve Au-NRs ait SERS spektrumları

Hazırlanan 1 mg ml⁻¹ kafein çözeltisi, ticari olarak satın alınmış Au yüzeye doğrudan damlatıldığında elde edilen spektrum incelendiğinde Raman sinyalinin hazırlanan konsantrasyonda çok düşük olduğu ve sinyal/gürültü oranında ayırt edilemeyecek bir değerde kaldığı anlaşılmaktadır. Sentezlenen Au-NRs kullanılarak elde edilen kafeine ait SERS spektrumu incelendiğinde, Kafeine ait takip ettiğimiz 555 cm⁻¹ bandında sinyal şiddetinin arttığı görülmektedir. Ayrıca yine imidazol halkasının 1327 cm⁻¹'de gerilme titreşimine ait sinyal şiddetinde de artış görülmektedir. Eşitlik (3.1)'den, Au-NRs kullanılarak elde edilen spektrumlardan EF değeri hesaplandığında 1,04x10⁹ bulunmuştur.

Sentezlenen AgNPs kullanılarak elde edilen 1 mg ml⁻¹ kafeine ait SERS spektrumu Şekil 4.14'de gösterilmiştir. Kafeine ait 555 cm⁻¹'de C–N–CH₃ deformasyonu ve 1327 cm⁻¹'de imidazol halkasına ait bandların sinyal şiddetlerinin arttığı gözlenmiştir. Eşitlik (3.1) kullanılarak hesaplanan EF değeri AgNPs için, 1,55x10⁹ olarak bulunmuştur.

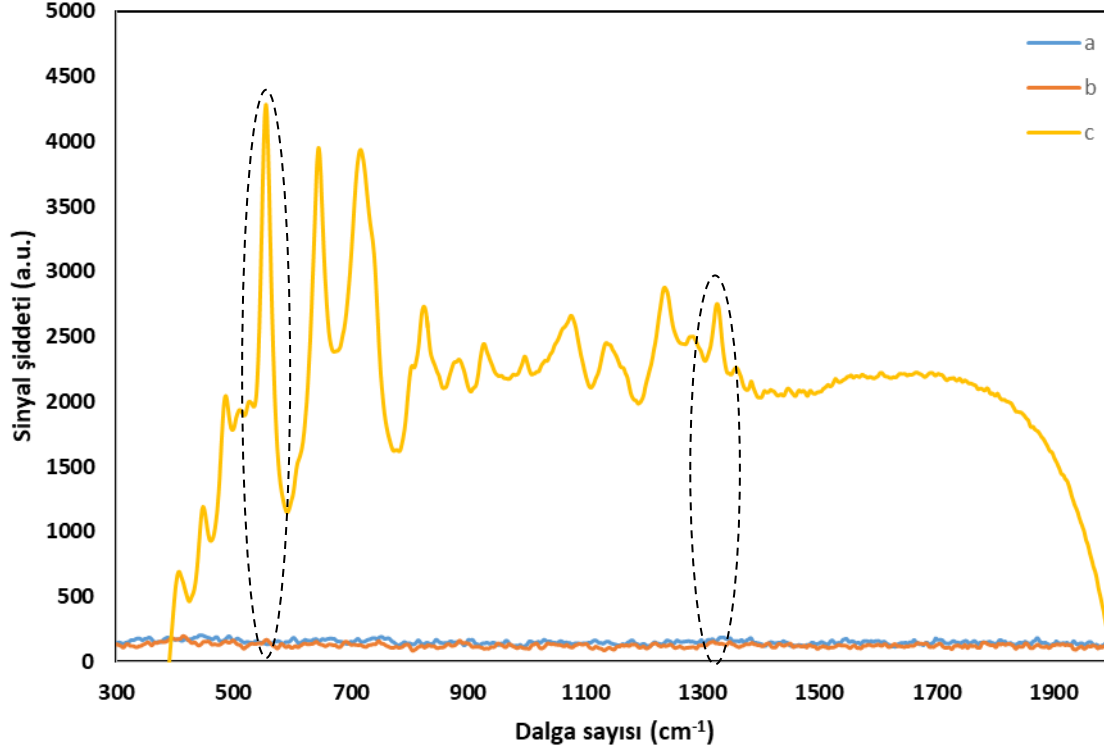


Şekil 4.14 a) Altın yüzey, b) 1 mg ml⁻¹ kafein, c) 1mg ml⁻¹ kafein ve AgNPs ait SERS spektrumları

Ticari olarak satın alınan altın yüzeyler üzerine AgNPs indirgenerek oluşturulan Au-AgNPs yüzey üzerine 1 µl damlatılan 1mg ml⁻¹ kafein çözeltisinin alınan SERS spektrumu Şekil 4.15’de gösterilmiştir. Gümüş nanopartiküllerin yığınlar halinde altın yüzeye çöktürülerek biriktirilmesi sonucu oluşan Au-AgNPs yüzeyin, kafeine ait 555 cm⁻¹ ait sinyal şiddetinin diğer nanopartiküller ile elde edilen SERS sinyal şiddetlerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Eşitlik (3.1) kullanılarak yapılan EF hesaplamasında 6,7x10⁹ değeri bulunmuştur.

Au-AgNPs yüzeylerde ve AgNPs sentezinde kullanılan ve elde edilen gümüş nanopartiküller aynı karakterizasyon özelliklerine sahip olmalarına karşın farklı SERS platformları için kullanıldıklarında EF değerleri ve analit için elde edilen SERS sinyal şiddetlerinin değiştiği gözlenmektedir. Bu değişimin sebebi gümüş nanopartiküllerin altın yüzeyde kovalent bağlanarak yığın halde biriktirilen gümüş nanoyapıların daha pürüzlü bir yüzey meydana getirmesidir. Pürüzlü yüzeyler lazer saçılmasının artmasını sağlayarak, tespit edilmek istenen analite ait moleküller ve plazmon rezonansının oluşturacak nanoyapılar arasında bulunan boşluklar (hot spots) yardımıyla enerji seviyesini molekülün titreşim yapan bağlarına aktarmaktadır [79]. Uygulanan lazer

frekansı ile moleküllerin titreşim bandlarına ait frekans arasında ne kadar fark olursa gözlenen sinyal şiddetinin artışı veya azalışı aynı oranda gerçekleşmektedir [80].



Şekil 4.15 a) Altın yüzey, b) 1 mg ml⁻¹ kafein, c) 1mg ml⁻¹ kafein ve Au-AgNPs yüzeye ait SERS spektrumları

1 mg ml⁻¹ kafein çözeltisinin Au-NRs, AgNPs ve Au-AgNPs yüzeylerden elde edilen sinyal şiddetleri üzerinden hesaplanan EF değerleri sırasıyla; 1,04x10⁹, 1,55x10⁹ ve 6,7x10⁹ olarak bulunmuştur. Altın yüzeyde SAM oluşturulduktan sonra S-H bağı kullanılarak gümüş nanopartiküllerin biriktirilmesiyle meydana gelen Au-AgNPs yüzeylerin diğer nanopartiküller ile hesaplanan EF değerleri karşılaştırıldığında daha yüksek değere sahip olduğu görülmektedir. Kafein tayinin daha hassas ve düşük konsantrasyonlarda yapılabilmesi için EF değeri diğer kullanılan nanopartiküllere göre daha yüksek çıkan Au-AgNPs yüzeyleri kullanılmıştır.

4.6.3 Kafeinin Kalibrasyon Eğrisinin Elde Edilmesi

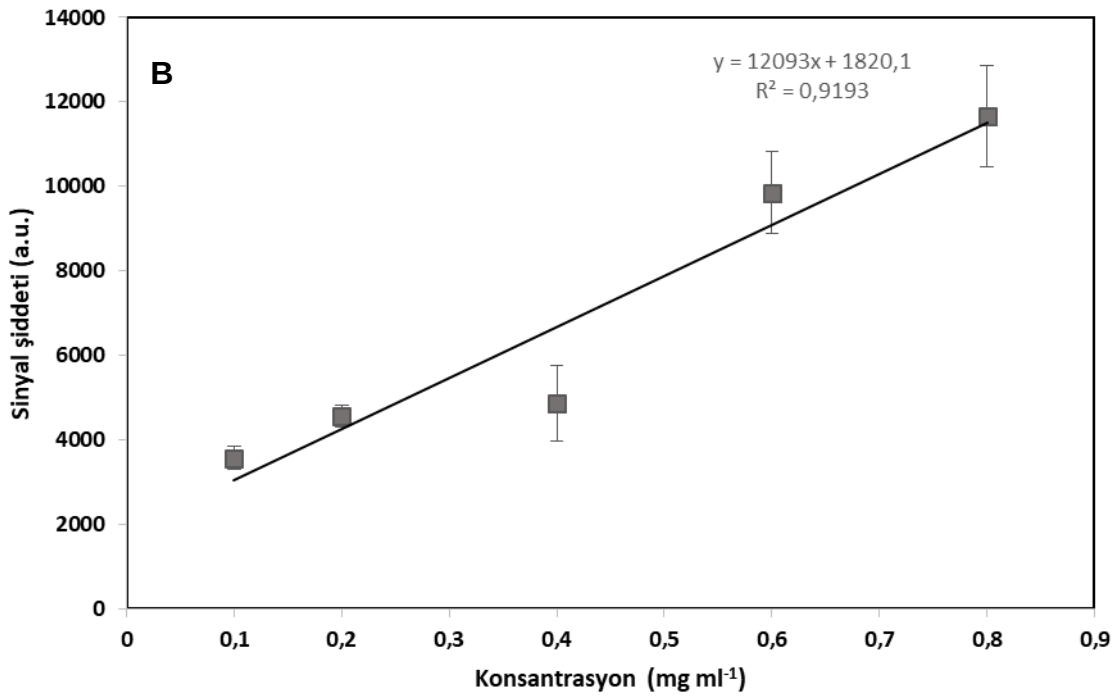
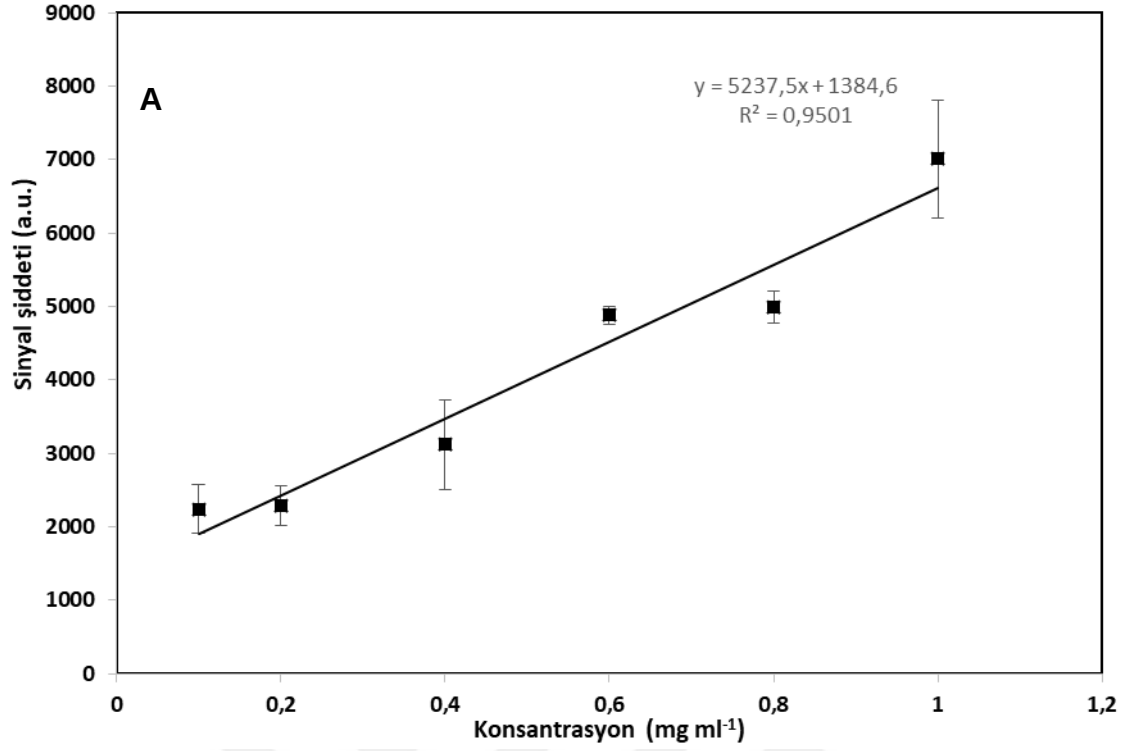
Gıda ve içeceklerin kafein içerikleri Çizelge 4.4'de gösterilmiştir. Günlük olarak en sık tüketilen kahve, çay, gazlı içecekler ve enerji içeceklerinin içerdiği kafein miktarları incelendiğinde 0,1 ve 1 mg ml⁻¹ konsantrasyonları arasında değiştiği görülmektedir.

Çizelge 4.4 Bazı gıdalarda ve içeceklerde bulunan kafein miktarları

Bulunduğu Gıda	Kafein (mg)	Servis edilen miktar
Kahve	102-200	235 ml
Çay	40-120	235 ml
Gazlı içecekler	71*	335 ml
Enerji içecekleri	50-300	250 ml
Çikolatalar	9-30	45 g

*FDA tarafından belirlenen içeceklerde bulunması gereken üst sınır

Bu aralıktaki konsantrasyon değerleri dikkate alınarak, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1 mg ml⁻¹'den oluşan altı farklı derişiminde, PBS tamponunda kafein çözeltileri hazırlanmıştır. EF değeri en yüksek bulunan Au-AgNPs yüzeyleri kullanılarak 20X ve 50X mercek ile SERS ölçümleri alınmış ve konsantrasyona bağlı elde edilen sinyal şiddetlerinin değişimine ait sonuçlar Şekil 4.16'da gösterilmiştir. İki farklı mercek kullanılarak aynı yüzeyden elde edilen sinyal şiddetlerinin farklı olduğu görülmektedir. Her iki mercek ile alınan ölçümler sonucunda çizilen kalibrasyon eğrileri incelendiğinde, doğrusal aralığın 20X mercek için 0,1-1 mg ml⁻¹ konsantrasyonları arasında sağlandığı, 50X mercek için ise 0,1-0,8 mg ml⁻¹ konsantrasyonları arasında sağlandığı görülmektedir. 50X mercek ile alınan 1 mg ml⁻¹ kafein konsantrasyonunda ani bir düşüş görülmektedir ve bu durum doğrusal etkiyi bozduğu için kalibrasyon aralığına alınmamıştır.



Şekil 4.16 A) 20X mercek kafein Au-AgNPs yüzey, B) 50X mercek Au-AgNPs yüzey

Çizelge 4.5’de 20X ve 50X merceleri kullanılarak Au-AgNPs yüzeyler üzerinden elde edilen kafeine ait 555 cm⁻¹ dalga sayısındaki sinyal şiddeti değerlerinin

konsantrasyona bağılı olarak değişimi sonucunda elde edilen kantitatif değerler gösterilmiştir.

Çizelge 4.5 Au-AgNPs yüzeyde 20X ve 50X mercek kullanılarak alınan SERS ölçümlerinde kafeine ait kantitatif değerler.

Parametreler	20X mercek	50X mercek
Doğrusal aralık	0-1 mg ml ⁻¹	0-0,8 mg ml ⁻¹
Eğim	5237,5	12903
Determinasyon katsayısı (R ²)	0,950	0,919
LOD	0,190 mg ml ⁻¹	0,069 mg ml ⁻¹
LOQ	0,635 mg ml ⁻¹	0,226 mg ml ⁻¹

20X ve 50X mercek kullanılarak alınan ölçümlerde kafein miktarlarının SERS sinyal değişimleri üzerinden R² değerleri karşılaştırıldığında 0,950 ve 0,919 değerleri elde edilmiştir. Doğrusal aralığının geniş olması ve kafein miktarlarını çözelti içinde % 95 doğruluk oranında tahmin edilebilmesi açısından 20X mercek kullanılarak alınan ölçümlerin avantajlı olduğu görülmektedir. 50X mercek ile alınan ölçümlerde %91 doğruluk oranında kafein çözeltilerinin gerçek konsantrasyonları hesaplanabilirken, LOD ve LOQ değerlerinin sırasıyla 0,069 ve 0,226 mg ml⁻¹ olarak bulunmuştur. 20X mercek kullanılarak elde edilen LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,190 ve 0,635 mg ml⁻¹ olarak bulunmuştur. 50X mercek kullanılarak alınan ölçümlerde daha hassas ve düşük konsantrasyon değişimlerinin tayin edilebildiği görülmektedir. İki farklı mercek kullanılarak SERS ölçümleri alınan aynı yüzey ve kafein konsantrasyonuna ait kantitatif değerlerin değişiminde etkili olan değişken merceklerdeki NA değerinin farklılığıdır. SERS ölçümleri sırasında kullanılam mikroskoba ait 20X ve 50X mercekler için NA değeri sırasıyla; 0,40 ve 0,75 olarak gösterilmiştir. Farklı NA değerleri, lazer ışık demetinin Gausyan dağılımına göre yayılmasıyla lazerin saçılımına bağılı olarak elektrik alan enerjisinde (E_f) değişimlere sebep olmaktadır [81]. Lazerin yoğunluğu radyal merkezden uzaklaştıkça azalırken buna bağılı olarak elektrik alan enerjisi düşmektedir. Saçılan fotonların kullanılan merceğin NA değerine göre toplanma açıları değişmektedir. Yüksek değerli NA mercekleriyle yapılan SERS ölçümlerinde, dik açiya

yakın bir şekilde dielektrik yüzeyler ve lazer arasında dik bir açıda polarlanmanın oluşmasını sağlamaktadır [82]. Yüzey ile lazer ışık demeti arasında oluşan açılarının farklılığı elde edilen SERS sinyal şiddetlerinin değerini etkilemektedir [83].

4.7 Aspartam Analizine Yönelik Geliştirilen SERS Tabanlı Yöntem

Alkolsüz içeceklerin ve şeker içerikli meyveli içeceklerin 20. Yüzyılın ikinci yarısından sonra insanların günlük diyetleri içerisinde yaygınlaşmasıyla birlikte aşırı kilo alımı, diabetes, hiper tansiyon, kalp-damar ve kanserle ilişkili hastalıklarda artış olduğu rapor edilmiştir [84-86].

Kalorisi yüksek olan ve günlük tüketimde ihtiyaç fazlasının vücuda alınmasıyla birlikte meydana gelen hastalıklar nedeniyle yüksek kaloriye sahip glukoz, fruktoz ve sukroza karşı kalori değeri olamayan, aynı zamanda gıda sanayinde maliyetlerin düşürülmesi amacıyla yapay tatlandırıcıların kullanıldığı gıda ve içecekler ön plana çıkmaya başlamıştır [87].

Yaygın olarak kullanılan ve FDA tarafından onaylanan yapay tatlandırıcılar; sakarin, aspartam, asesulfam K, sukraloz ve neotamdır. [88].

Yapay tatlandırıcıların sukroza göre tatlılık derecelerinin yüksek olması, çok düşük miktarlarda kullanılması ve kalori değerlerinin olmayışı üreticiler ve tüketiciler tarafından kullanımını popüler hale getirmektedir. Doğal olarak dışarıda gıda ve içeceklerde bulunmadıklarından veya vücut içerisinde sentezlenmedikleri için sağlık üzerine etkileri araştırmacılar tarafından sürekli araştırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda yapay tatlandırıcılar ile kanser ve diğer metabolitik hastalıklar arasında bir ilişkinin varlığı belirgin olarak saptanmamıştır [89, 90].

Yapay tatlandırıcıların EFSA ve FDA tarafından belirli miktarlarda günlük kullanım değerleri belirlenmiştir. FDA tarafından onaylanmış yapay tatlandırıcılara ait tatlılık derecesi ve günlük kullanım sınır değerleri Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. Siklamat FDA tarafından onaylanmayan ama sıklıkla kullanılan bir diğer yapay tatlandırıcıdır. Sukroza göre tatlılık derecesi 30'dur ve kullanıldığı gıdalarda diğer tatlandırıcılarla eş değer tatlılık oranına sahip olabilmesi için çok fazla miktarda içerisine katılmalıdır.

Çizelge 4.6 Yapay tatlandırıcılara ait tatlılık ve günlük kullanım değerleri

Yapay Tatlandırıcılar	Tatlılık derecesi (Sukroza göre)	Kabul edilen günlük kullanım değeri
Sukraloz ($C_{12}H_{19}Cl_3O_8$)	300	5 mg kg ⁻¹
Aspartam ($C_{14}H_{18}N_2O_5$)	180	50 mg kg ⁻¹
Sakarin ($C_7H_5NO_3S$)	300	18 mg kg ⁻¹
Asesulfam K ($C_4H_4KNO_4S$)	200	15 mg kg ⁻¹

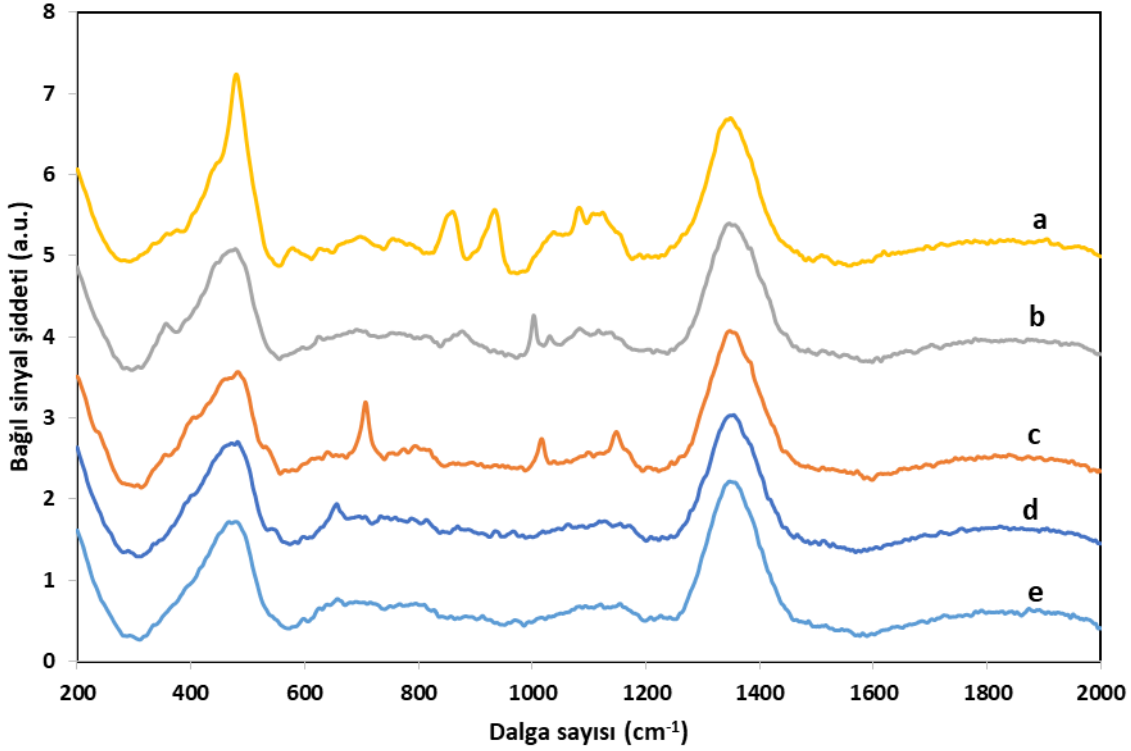
Gıda endüstrisi tarafından yapay tatlandırıcılar gıda işleme sırasında yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Kromatografik ve spektroskopik olarak farklı analiz teknikleri kullanılarak yapay tatlandırıcılar gıdalarda tespit edilebilmektedir [91].

4.7.1 Yapay Tatlandırıcıların RS Spektrumları

Tatlandırıcılar gıdalara farklı oranlarda ve eş zamanlı olarak katılabilir. Yapay RS ve SERS kullanılarak yapay tatlandırıcıların ayrı ayrı ve eş zamanlı olarak belirlenmesine yönelik çalışmalar artan bir şekilde devam etmektedir. Şekil 4.17’de dünyada ve ülkemizde sıklıkla kullanılan aspartam, sukraloz, sakarin, siklamat ve asesulfam K’ya ait RS spektrumları gösterilmiştir. Deiyonize suda çözelti halinde hazırlanan beş farklı yapay tatlandırıcının RS spektrumları incelendiğinde her bir tatlandırıcının kimyasal yapısına bağlı olarak farklı dalga sayılarında elde edilen sinyal şiddetleri görülmektedir. Bu durumda her bir tatlandırıcının kendisine ait karakteristik parmakizi spektrumunun olduğu belirlenmiştir.

Sukraloza ait RS spektrumu incelendiğinde görülen 860 cm⁻¹ dalga sayısında elde edilen sinyal şiddetinin O-C-C bağlarında iç düzlemsel deformasyondan, 930 cm⁻¹ dalga sayısında görülen sinyal şiddetinin C-O bağlarında gerilmeden ve 1085-1091 cm⁻¹ aralığında görülen geniş ve omuzlu band C-O ve C-C iç düzlemsel deformasyondan kaynaklanmaktadır [92].

Aspartama ait RS spektrumu incelendiğinde 1002 cm⁻¹ dalga sayısında elde edilen sinyal şiddetinin (C5-C6-C13) gerilme [93], fenilalanin amino asidi [94] ve fenil halkasının simetrik gerilme [95] ve COO⁻ ait deformasyon titreşimlerinin sulu çözeltide bu grupların tamamen iyonize olmasından kaynaklanmaktadır [96].



Şekil 4.17 Yapay tatlandırıcıların RS spektrumları; a) sukraloz, b) aspartam, c) sakarin, d) siklamat, e) asesulfam K

Sakarine ait RS spektrumu incelendiğinde 708 cm^{-1} dalga sayısında elde edilen bandın C-S bağlarının gerilme, 1019 cm^{-1} dalga sayısında elde edilen bandın halka yapısının titreşimi ve 1144 ve 1166 cm^{-1} arasında görülen geniş bandın simetrik ve asimetrik SO_2 gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır [97, 98].

Siklamata ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NNaO}_3\text{S}$) ait RS spektrumu incelendiğinde, sinyal şiddetlerinin zayıf olmasından dolayı karakterize bandları açık olarak gözlenememiştir. 704 cm^{-1} dalga sayısında zayıf olarak S-N-C ve N-H bağlarına ait düzlemsel eğilme ve dış düzlemsel deformasyon titreşim bandlarından kaynaklanan zayıf sinyal şiddeti görülmektedir [99].

Asesulfam K için elde edilen RS spektrumu incelendiğinde zayıf sinyal şiddetlerinin görüldüğü ve bu nedenle 627 cm^{-1} dalga sayısında S-N=C ve SO_2 bağlarına ait düzlemsel eğilme, S-O bağına ait gerilme, 1025 cm^{-1} dalgasayısında ise CH_3 yapısına ait burkulma titreşimlerine ait karakteristik bandlar gözlenememiştir [99].

Yapay tatlandırıcıların RS spektrumları alınırken, borosilikat esaslı camdan yapılmış örnek küvetlere, hazırlanan sulu çözeltileri konularak kullanılmıştır. Cam küvetlerin 450 cm^{-1} dalga sayısında Si-O-Si bağlarına ait eğilme titreşim bandları ve $1350\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$

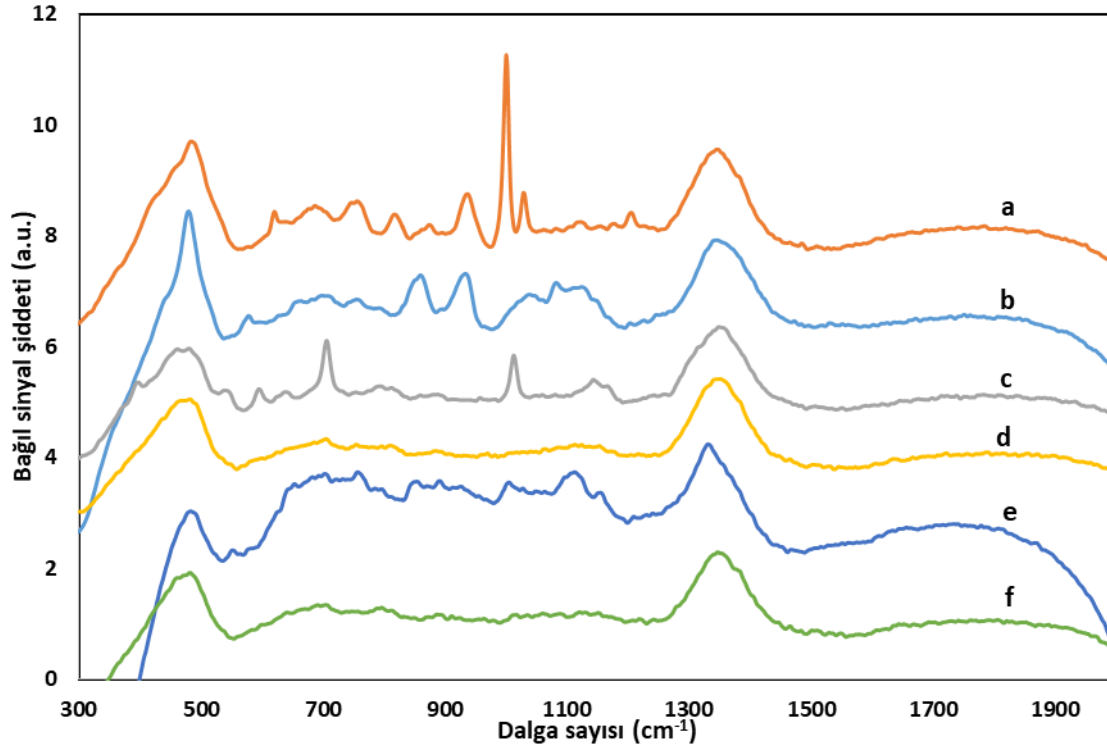
geniş aralıktaki dalgasayısında Si-O bağının gerilme titreşimine ait sinyal şiddetleri yapay tatlandırıcılara ait spektrumlarda girişimde bulunmuştur [100].

Sentezlenen AgNPs, Au-NRs ve Au-AgNPs yüzey kullanılarak yapay tatlandırıcıların belirlenen dalga sayılarındaki bağlara ait sinyal şiddetlerini zenginleştirmek için SERS ölçümleri alınmıştır.

4.7.2 Yapay Tatlandırıcıların SERS Spektrumları

Yapay tatlandırıcıların SERS spektrumları sulu çözeltileri hazırlanarak alınmıştır. AgNPs ve AuNRs nanopartikülleri 10X derişik olacak şekilde hazırlanmış ve yapay tatlandırıcıların sulu çözeltileriyle RS kuvvetleri içerisinde karıştırılarak SERS ölçümleri yapılmıştır. Au-AgNPs yüzeyler üzerine 1 µl ölçümü yapılmak istenen yapay tatlandırıcı pipet yardımıyla damlatılıp kurutulduktan sonra SERS ölçümleri yapılmış ve spektrumlar elde edilmiştir.

Şekil 4.18'de AgNPs kullanılarak yapay tatlandırıcılardan elde edilen SERS spektrumları gösterilmiştir. Ölçüm sonucunda, yapay tatlandırıcılara ait karakteristik parmak izi spektrumlarının oluştuğu ve karakteristik dalga sayılarında sinyal şiddetlerinin arttığı görülmektedir. SERS ölçümleri sırasında yapay tatlandırıcılarla birlikte kullanılan AgNPs nanopartikülüne ait girişim yapan dalga sayılarındaki sinyal şiddetlerini tespit etmek amacıyla da kullanılan AgNPs'ye ait spektrum da alınmıştır. Elde edilen spektrum incelendiğinde yapay tatlandırıcıların spektrumlarına etki edecek her hangi bir karakteristik dalga sayısında bandının olmadığı ve sinyal şiddetlerine girişim yapmadığı görülmektedir.

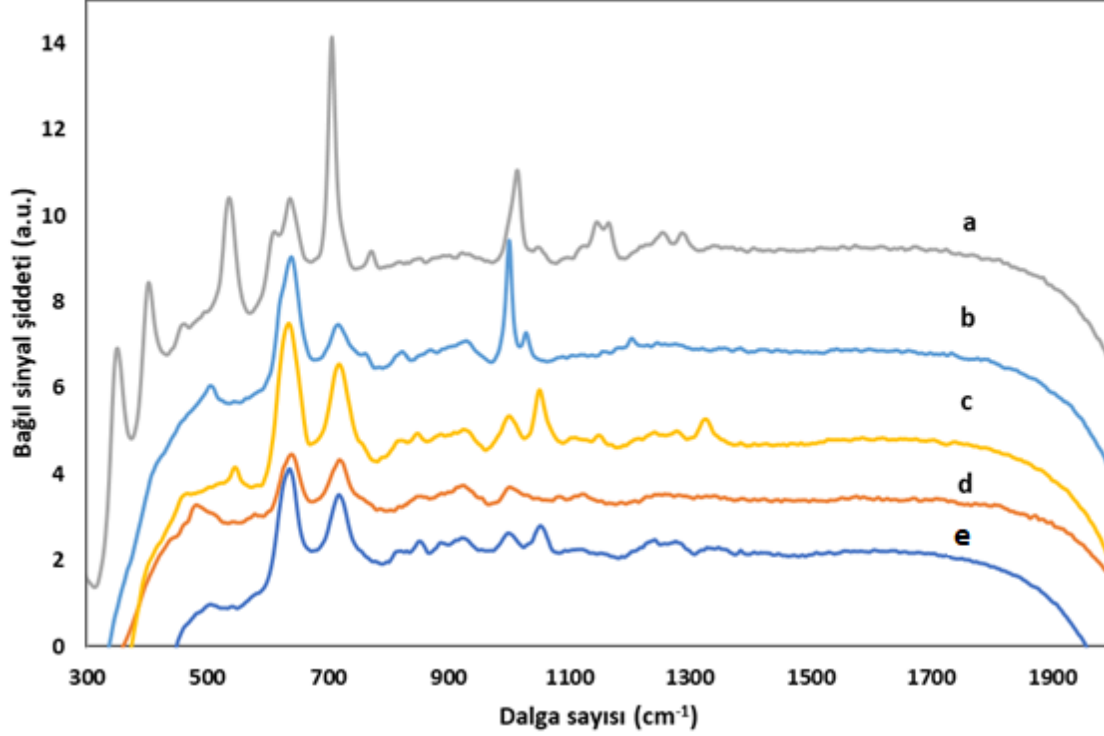


Şekil 4.18 AgNPs kullanılarak elde edilen SERS spektrumları a) aspartam, b) sukraloz, c) sakarin, d) siklamat, e) asesulfam K, f) AgNPs

Sulu çözeltileri hazırlanan yapay tatlandırıcılardan 1 µl alınarak Au-AgNPs yüzey üzerine damlatılıp kurutulduktan sonra elde edilen SERS spektrumları Şekil 4.19'da gösterilmiştir. Yapay tatlandırıcılara ait spektrumlara kullanılan Au-AgNPs yüzeyden kaynaklanan dalga sayılarındaki sinyal şiddetlerini görebilmek için boş yüzeyin spektrumu da alınmıştır. Elde edilen spektrum incelendiğinde 640 ve 726 cm^{-1} 'de tepe noktasına ulaşan sıralı iki geniş banda ait sinyal şiddetlerinin diğer tatlandırıcılardan elde edilen spektrumlarda da mevcut olduğu ve girişim yaptıkları görülmektedir. Kullanılan yüzey ve yapay tatlandırıcılara ait spektrumlar karşılaştırıldığında, bir diğer girişimin düşük sinyal şiddetinde 998 ve 1051 cm^{-1} dalga sayısında sıralı iki banda ait olduğu görülmektedir.

Yapay tatlandırıcılara ait SERS spektrumları incelendiğinde sakarinin parmakizi spektrumunda RS ile elde edilen ve cam küvetlerden dolayı girişim yapan 350 ve 550 cm^{-1} aralığında dalga sayısında karakteristik bandlarına ait sinyal şiddetleri belirlenmiştir. Bu aralıktaki bandlar incelendiğinde; 353 cm^{-1} 'de N-H dış düzlemsel deformasyon ve SO_2 içe düzlemsel eğilme, 404 cm^{-1} 'de N-H ve C-H dış düzlemsel deformasyon ve 537 cm^{-1} 'de CNS bağlarında eğilme hareketine ait titreşim bandları

görülmektedir. 704 cm^{-1} 'de görülen yüksek sinyal şiddetine ait band ise C-C ve C-S bağlarının iç düzlemsel eğilme titreşim hareketinden meydana gelmektedir [97, 101]

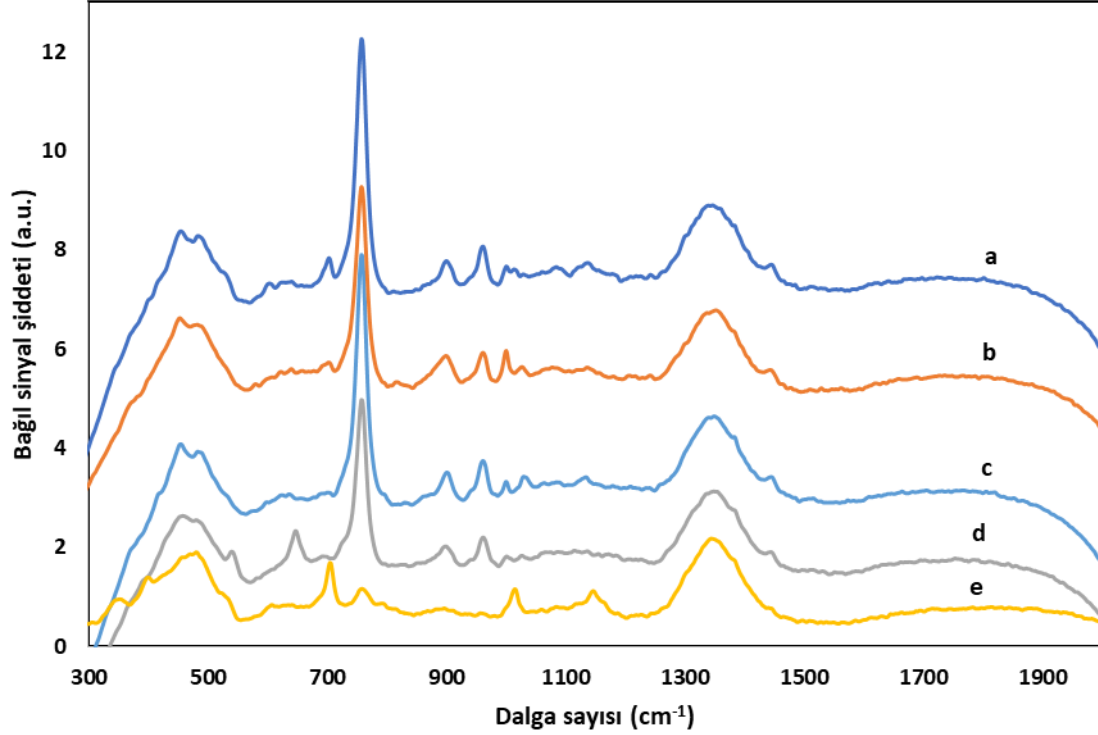


Şekil 4.19 Au-AgNPs yüzey kullanılarak elde edilen SERS spektrumları a) sakarın, b) aspartam, c) asesulfam K, d) sukraloz, e) Au-AgNPs yüzey

Asesulfam K spektrumu incelendiğinde RS spektrumunda görülmeyen ve Au-AgNPs yüzeyden girişim yapmayan zayıf sinyal şiddetine sahip iki farklı band gözlenmiştir. 550 cm^{-1} 'de CCCH_3 bağlarına ait burulma titreşimi, 1333 cm^{-1} 'de CNH iç düzlemsel deformasyon titreşimi belirlenmiştir [99, 102]. Diğer tatlandırıcılar aspartam ve sukraloza ait Au-AgNPs yüzeyinden girişim yapan bandlar haricinde yeni bir band önceki ölçümlere göre gözlenmemiştir.

Sentezlenen Au-NRs nanopartikülleri kullanılarak yapay tatlandırıcılara ait SERS spektrumları alınmıştır. Şekil 4.20'de ölçümler sonucu elde edilen spektrumlar gösterilmektedir. Kullanılan Au-NRs'nin yapay tatlandırıcıların parmakizi spektrumlarına yapabileceği girişimleri görmek için RS küvetinde tek başına ölçümü tatlandırıcılarla ayarlanan konsantrasyonda olacak şekilde alınmıştır. Elde edilen spektrum incelendiğinde nanopartikülden 760 cm^{-1} dalga sayısında sinyal şiddeti yüksek bir girişimin olduğu görülmektedir. Au-NRs ve yapay tatlandırıcılara ait

spektrumlar karşılaştırıldığında, Au-NRs kullanımıyla birlikte yapay tatlandırıcılara ait karakteristik bandların kaybolduğu veya baskılandığı görülmektedir. Bunun sonucunda yapay tatlandırıcılara ait parmakizi spektrumu ile Au-NRs'ye ait elde edilen spektrumun yapay tatlandırıcılara ait birkaç farklı dalga sayısındaki sinyal şiddeti hariç benzeştiği görülmektedir.



Şekil 4.20 Au-NRs kullanılarak elde edilen SERS spektrumları a) Au-NRs, b) aspartam, c) asesulfam K, d) siklamat, e) sakarin

Au-NRs nanopartikül kullanılarak yapay tatlandırıcılara ait karakteristik bandların zenginleştirilememesi ve partikülün ölçüm sonrasında fazla miktarda girişim bandına sahip olması nedeniyle, Au-AgNPs yüzeyi kullanılarak yapay tatlandırıcılara ait SERS spektrumları üzerinden her bir tatlandırıcı için bu platformun EF değerleri eşitlik (3.1) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$EF = (I_{SERS}/N_{SERS}) / (I_{Raman}/N_{Raman})$$

AgNPs nanopartiküller ile yapılan SERS ölçümleri yüzeyde değil RS cam küvetlerine örneklerin konulmasından sonra yapılmıştır. Bu nedenle aşağıdaki eşitlikler kullanılarak EF değeri bulunmuştur.

$$EF = (I_{SERS}/I_{Raman})/((C_S \cdot A_{eff}/C_V \cdot V_{eff})) \quad (4.4)$$

Eşitlik (4.4)'de C_S hedef moleküle ait yüzey yoğunluğunu, C_V ise sulu çözeltilerinde hedef moleküle ait hacimsel yoğunluğu ifade etmektedir ve aşağıdaki eşitlik üzerinden hesaplanmaktadır [103];

$$C_V = (d \cdot N_A / M_w) \quad (4.8)$$

Hedef moleküle ait yoğunluk d (g cm^{-3}), Avagadro sayısı N_A ($6,022 \times 10^{23}$), moleküler ağırlığı ise M_w (g mol^{-1}) olarak gösterilmiştir. RS cam küvetlerine 20 μl AgNPs ve hedef molekülün sulu çözeltisinden 180 μl konulduğu için toplamda 200 μl hacminde örnek elde edilmiştir. A_{eff} , ölçüm alınan küvetin örnek yüzey alanını, V_{eff} ise ölçüm alınan küvetin örnek hacmini ifade etmektedir. Aşağıdaki eşitlikler kullanılarak A_{eff} ve V_{eff} değerleri hesaplanmıştır;

$$A_{eff} = 2\pi r^2 + 2\pi r h \quad (4.5)$$

$$V_{eff} = \pi r^2 h \quad (4.6)$$

Yapay tatlandırıcıların her biri için kullanılan AgNPs nanopartikülleri ve Au-AgNPs yüzeyleri için EF değerleri hesaplanmış ve Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7 Yapay tatlandırıcıların kullanılan AgNPs ve Au-AgNP yüzeylerindeki EF değerleri

	$A_{molekül} \text{ (nm}^2\text{) [51]}$	$C_S \text{ (AgNPs)}$	$C_V \text{ (AgNPs)}$	EF_{AgNPs}	$EF_{Au-AgNPs}$
Aspartam	1,19	$8,40 \times 10^{13}$	$2,76 \times 10^{21}$	$2,19 \times 10^7$	$8,80 \times 10^9$
Asesulfam K	0,872	$1,15 \times 10^{14}$	$5,41 \times 10^{21}$	$4,46 \times 10^7$	$9,39 \times 10^9$
Sakarin	0,716	$1,40 \times 10^{14}$	$2,72 \times 10^{21}$	$3,85 \times 10^6$	$3,43 \times 10^9$
Siklamat	0,776	$3,95 \times 10^{14}$	$3,95 \times 10^{21}$	$3,39 \times 10^6$	
Sukraloz	1,29	$7,75 \times 10^{13}$	$2,56 \times 10^{21}$	$3,90 \times 10^6$	$5,40 \times 10^8$

AgNPs nanopartikül ve Au-AgNPs yüzey kullanılarak yapay tatlandırıcılara ait EF değerleri hesaplanmıştır. Her bir tatlandırıcı kendi içinde değerlendirildiğinde, Au-

AgNPs yüzey üzerinden elde edilen EF değerlerinin AgNPs koloidal nanopartiküllere göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Yüzeylerin SERS spektrumları incelendiğinde tatlandırıcı kullanılmadan alınan spektrumlarında tatlandırıcıların karakteristik bandlarına ait olan dalga sayılarında girişim yaptığı görülmektedir. AgNPs nanopartikülünün ise alınan spektrumu incelendiğinde herhangi bir tatlandırıcıya ait karakteristik bandına ait dalga sayısında veya diğer aralıklarda kendisinden kaynaklanan bir girişim bandı olmadığı görülmektedir. Kullanılacak SERS temelli platformun EF değerini yüksek olmasının yanında, analizi yapılacak madde ile çakışacak veya parmak izi spektrumuna girişimde bulunabilecek olması bir dezavantaj oluşturmaktadır. Tatlandırıcıların sulu çözeltilerinin kullanılmasıyla; iyonik etkiler ve metal-molekül kompleksinin oluşumuyla, takip edilmek istenilen tatlandırıcıya ait karakteristik bandlarda elde edilen sinyal şiddetinin daha yüksek olarak elde edilebilme imkânı ortaya çıkmaktadır. Koloidal yapıda ve kuvvet içerisinde belli bir hacimde SERS ölçümü yapılabilmesine olanak sağlayan AgNPs nanopartiküllerinin, yapay tatlandırıcıların analizi için kullanılacak SERS temelli platform olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

Yapay tatlandırıcılar arasında EF değerleri karşılaştırıldığında en yüksek değerlerin sırasıyla; asesulfam K, aspartam, siklamat, sakarin ve sukraloza ait olduğu görülmektedir. Yapay tatlandırıcılar gıda maddelerinde tek başlarına kullanıldıkları gibi birlikte karıştırılarakta kullanılmaktadır. Aspartam gıda ürünlerinde tatlandırıcılık derecesi yüksek olması ve tek başına kullanıldığında asesulfam K gibi ağızda acı bir tat bırakmaması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır.

Aspartama ait elde edilen RS ve SERS spektrumları incelendiğinde moleküler yapısına ait karakterize bandların sinyal şiddetlerinin yüksek olduğu ve SERS için kullanılan iki platform içinde EF değerlerinin asesulfam K'dan sonra en yüksek olan yapay tatlandırıcı olduğu görülmektedir. Alkolsüz içecek ve meyveli içeceklerde en sık ve fazla miktarda kullanılan yapay tatlandırıcı aspartamdır [104].

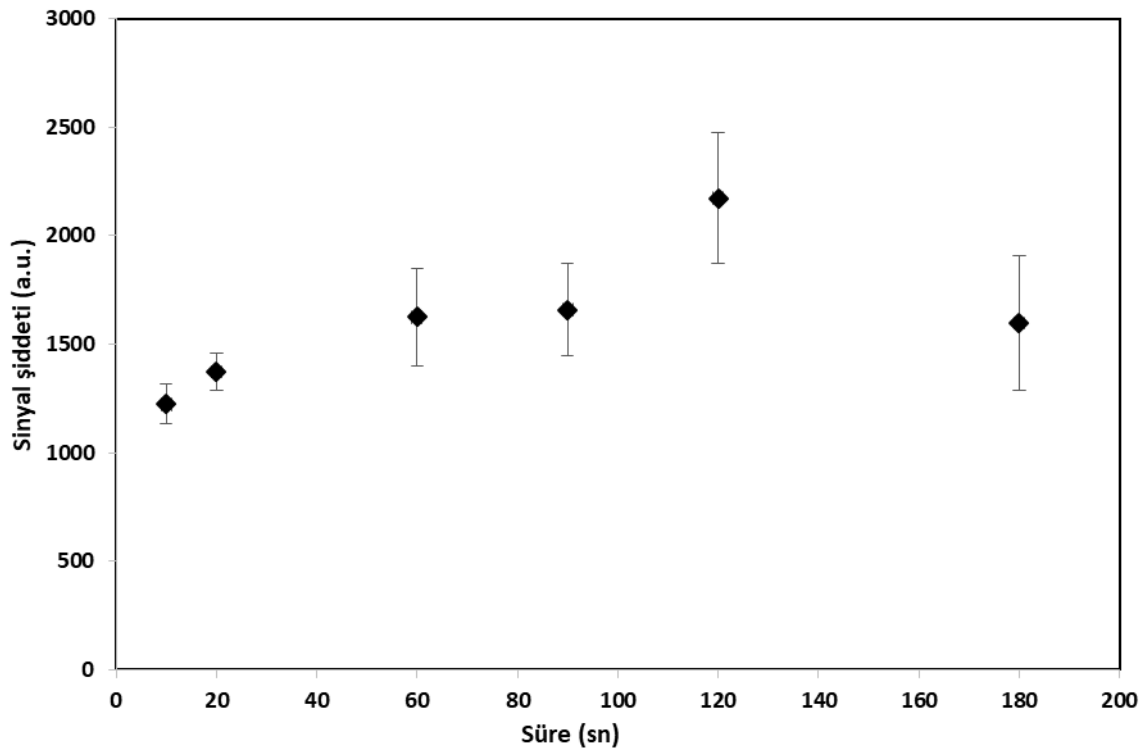
SERS ölçümünde en uygun metalik nanoyapı olarak koloidal AgNPs'nin kullanılmasına, yapay tatlandırıcılar içerisinde ise bahsedilen özelliklere sahip olmasından dolayı; aspartamın, analizi yapılacak molekül olarak kullanılmasına karar verilmiştir. Aspartam analizi için model içecek olarak maden suları seçilmiş, sade ve

mevye aromalı maden suyunda aspartam miktarını belirleyebilmek için analiz yönteminde optimizasyon çalışmaları ve SERS ölçümleri alınmıştır.

4.7.3 Optimum Süre, pH ve Tamponun Belirlenmesi

Aspartamı farklı konsantrasyonlarda belirleyebilmek için SERS sinyal şiddetleri 1002 cm^{-1} dalga sayısında takip edilmiştir. Sentezlenen AgNPs kullanılarak SERS sinyal şiddetlerinin zenginleştirilmesi sağlanmış ve aspartam tayini için süre, pH ve kullanılacak tampon çözeltisinin belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır.

RS küvetine 1 mg ml^{-1} konsantrasyonunda aspartam ve AgNPs koyulmuş, oluşan kompleks yapı sonrası SERS sinyalleri takip edilmiştir. Oluşturulan metal-analit kompleksinin stabilitesini belirlemek ve en yüksek SERS sinyal şiddetini elde etmek için inkübasyon süresinin optimizasyonu çalışılmıştır. Bu amaçla 0-180 saniye arasında belirlenen aralıklarda maden suyunda hazırlanmış 1 mg ml^{-1} aspartamın SERS ölçümleri yapılmış ve elde edilen sinyal seviyeleri Şekil 4.21’de gösterilmiştir.



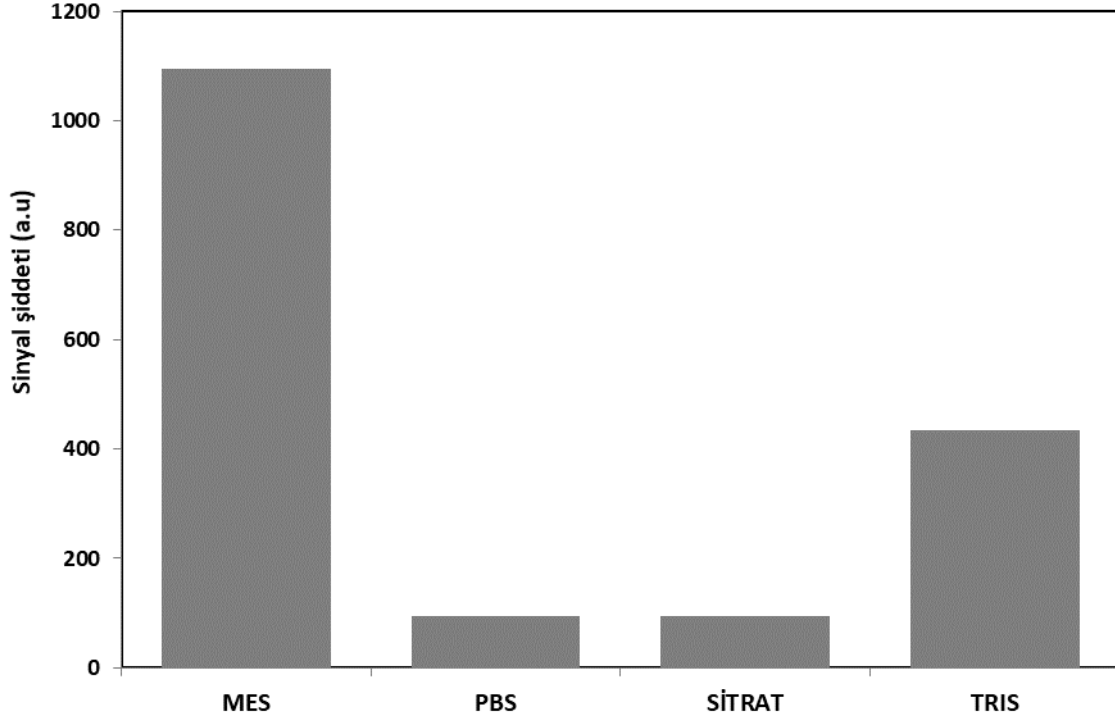
Şekil 4.21 AgNPs ve aspartam kullanılarak 1002 cm^{-1} elde edilen sinyal şiddetinin zamanla değişimi

En yüksek aspartam SERS sinyal şiddeti iki dakika süreyle örnek-AgNPs inkübasyonu sonucunda elde edilmiştir. Kompleks oluşturulduğu andan itibaren 2. dakikaya kadar

alınan ölçümlerde, SERS sinyallerinin arttığı görülmektedir. Metal-analit kompleksi incelendiğinde karışımdan itibaren 2 dk süresince stabil kaldığı ve bu süre sonunda kompleksin bozulmaya başladığı ve AgNPs nanopartiküllerinin aggregasyona uğrayarak kolloidal stabilitelerinin bozulması sonucu RS küveti dibinde toplandığı gözlenmiştir. İkinci dakikadan sonra alınan ölçümde ise SERS sinyal şiddetinin düşmesinin, aggregasyon sonucu çözelti içerisinde kurulan metal-analit kompleksinin azalmasından kaynaklandığı söylenebilir. Bu sonuç üzerinden, aspartam tayini için aspartam ve AgNPs karışımının ölçüm öncesi inkübasyon süresi 2 dk olarak belirlenmiştir.

Aspartam ve AgNPs'nin SERS ölçümü alınmadan önce RS küvetinde karıştırılarak inkübe edilme süresinin belirlenmesinden sonra farklı pH değerlerinde tamponlar kullanılarak, ölçümler sırasında aspartamın 1002 cm^{-1} karakteristik dalga sayısında elde edilen SERS sinyallerinin şiddetine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 50 mM sitrat, PBS, MES ve Tris-HCl tamponları sırasıyla pH 3,5, 6,5, 7,4 ve 9,8 olacak şekilde hazırlanmıştır. Şekil 4.22'de aspartam-AgNPs kompleksinin 2 dk inkübasyon sonunda elde edilen SERS sinyalleri şiddetlerinin farklı pH ve tamponlardaki değişimi gösterilmiştir.

MES tamponu pH 6,5'da oluşturulan aspartam-AgNPs kompleksinin 1002 cm^{-1} 'de diğer tamponlar ve pH değeriyle kıyaslandığında en yüksek SERS sinyal şiddetine sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 4.22 Farklı pH değerlerindeki tamponların aspartamın 1002 cm^{-1} deki SERS sinyali şiddetine etkisi; MES (pH 6,5), PBS (pH 7,4), sitrat (pH 3,5) ve Tris (pH 9,8)

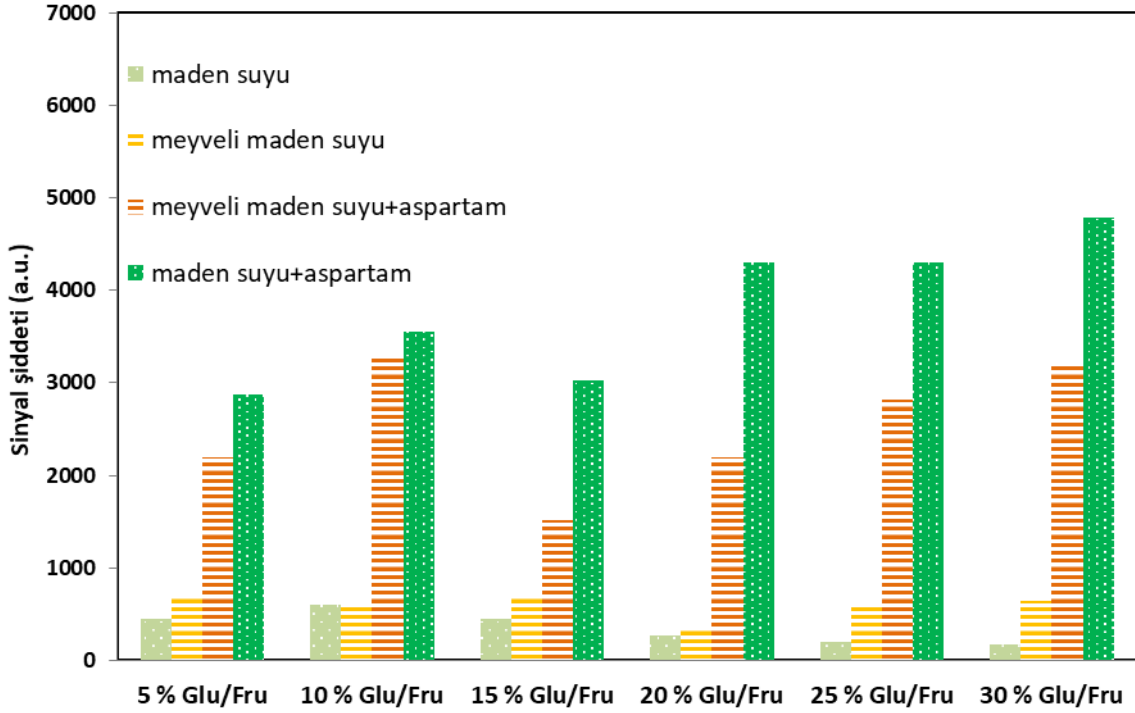
Sitrat ve Tris-HCl tamponlarının sırasıyla yüksek asidik ve alkali ortamlar oluşturması nedeniyle SERS ölçümleri için yeterli miktarda aspartam molekülü ve AgNPs nanopartikülü arasında iyonik bir etkileşim kurulmasını ve bir araya gelmelerini engellemiştir. Bu durum sonucunda düşük ve yüksek pH değerlerine sahip tamponların kullanılması aspartamın yapısını etkilemektedir. Asidik pH değerlerinde aspartam yapısını oluşturan fenilalanin ve aspartik aside dissosiyasyon olmaktadır. Alkali pH değerlerinde ise siklizasyona uğrayarak halkalı bir yapı meydana getirmektedir [105]. PBS tamponunda pH 7,4 nötr aralıkta olmasına rağmen diğer tamponlara oranla düşük SERS sinyal şiddetinin ölçülmesinin nedeni tuz konsantrasyonundan dolayı gümüş nanopartiküllerin aggregasyona daha yatkın olması sonucu yüzey plasmon rezonansını düşürmektedir. Absorbsiyon dalga boyunun daha düşük enerji seviyesine gelmesiyle 1002 cm^{-1} 'de takip edilen SERS sinyal şiddetinde dramatik bir düşüş görülmektedir [106]. Bu sebeple aspartamın maden suları içerisinde miktarının SERS ile ölçülerek belirlenmesinde kullanılacak tampon, MES ve pH 6,5 olarak belirlenmiştir.

4.7.4 Maden Suyu İçeriğinin Aspartamın SERS Sinyaline Etkisi

Ticari olarak satın alınan ve analizlerde kullanılan meyve aromalı maden sularının içeriğinde glukoz ve fruktoz bulunmaktadır. Geliştirilen yöntemde, meyve içerikli maden suyunda bulunan bu bileşenlerin SERS ölçümleri sırasında takip edilen aspartame ait 1002 cm^{-1} dalga sayısındaki karakteristik banda etkisini belirlemek için daha önceden optimize edilen tampon, pH ve sürelerde ölçümler alınmıştır. Farklı derişimlerde % 5-30 aralığında hacimsel oranı 3:2 glukoz/fruktoz (h/h) olacak şekilde MES tamponu içerisinde sulu çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan derişimleri farklı glukoz/fruktoz içeren modifiye MES tamponları sade maden suyu ve meyve aromalı maden suyu ile karıştırılmıştır. Ayrıca maden suyu ve meyve aromalı maden suyuna 1mg ml^{-1} aspartam eklenerek, doğrudan üretim sırasında katılan şeker içeriğinin aspartamın takip edilen dalga sayısındaki SERS sinyali şiddetine etkisi incelenmiştir.

Şekil 4.22’de 1002 cm^{-1} dalga sayısında, aspartam içeren ve içermeyen sade ve meyve aromalı maden sularının SERS sinyal şiddetinin değışimleri gösterilmiştir. Şekil 4.23’den anlaşıldığı üzere aspartam içermeyen sade ve meyve aromalı maden suları kendi içerisinde ve aspartam içeren sade ve meyve aromalı maden suları da kendi içerisinde değerlendirilmiştir. Kullanılan maden sularında üretici tarafından aspartam eklenmediği için sade ve meyveli maden sularında aspartam için takip edilen 1002 cm^{-1} dalga sayısında elde edilen sinyal şiddetleri, matriks etkisiyle gelen karakteristik olmayan bandlara ait değlerlerdir. Deney sırasında sade ve meyveli maden sularına ilave edilen 1 mg ml^{-1} konsantrasyonundaki aspartamlı örneklerden alınan SERS ölçümlerine ait sinyal şiddetleri incelendiğinde aspartama ait 1002 cm^{-1} dalga sayısında sinyal şiddetlerinin arttığı görölmektedir. Meyveli maden sularında aynı miktarda deney sırasında koyulan aspartamdan elde edilen sinyal şiddetleri sade maden sularına göre daha düşük ölçölmüştür.

Aspartam içeren sade ve meyveli maden suları için sinyal şiddeti farkının en az olduğu şeker konsantrasyonunun, hacimsel oranı 3:2 glukoz/fruktoz (h/h) olacak şekilde %10’luk şeker konsantrasyonu içeren MES tamponunda hazırlanan çözeltilerde olduğu görölmektedir.

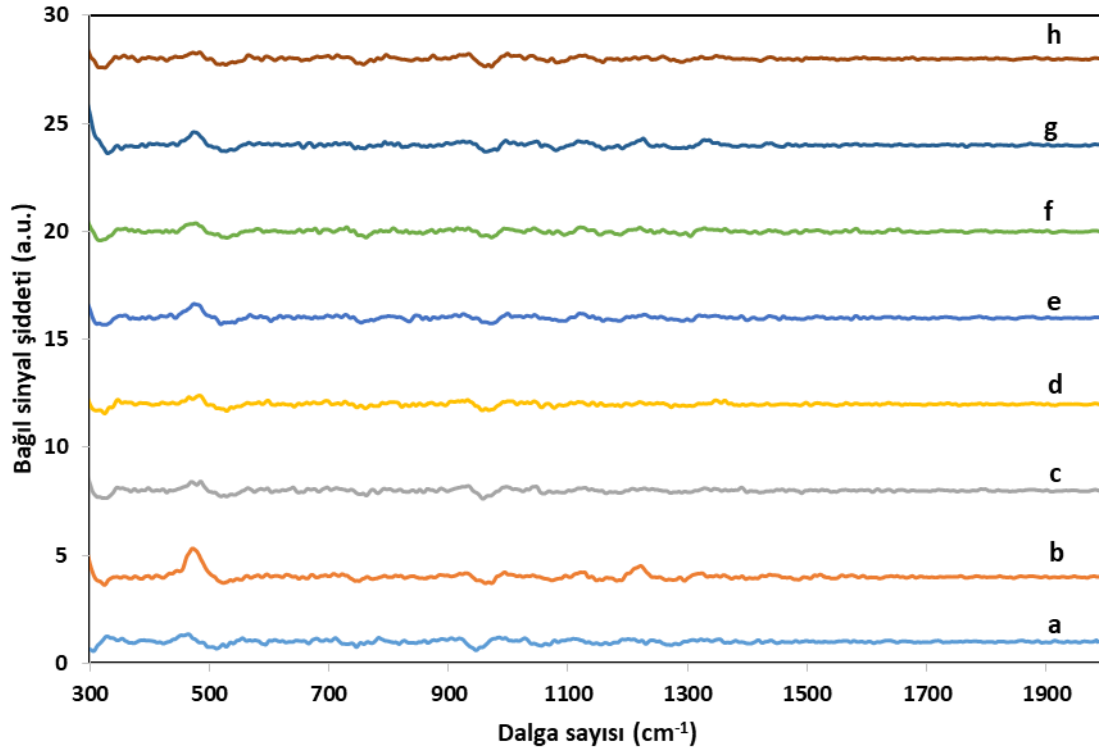


Şekil 4.23 Farklı şeker konsantrasyonları aralıklarında 1002 cm^{-1} SERS bandında aspartam içeren ve içermeyen sade ve meyve aromalı maden sularının sinyal şiddetinin değişimleri

Ticari olarak satın alınan, sade ve meyve aromalı farklı markalara ait maden sularının içeriklerinde bulunan maddelerden ve şekerlerden gelebilecek matriks etkisini en aza indirmek ve geliştirilen SERS tabanlı aspartam tayininin, maden sularına tatlandırıcı olarak eklenen aspartam miktarını diğer etkenlerden bağımsız olarak gerçek değerinde tesbit edebilmesi için %10'luk şeker çözeltisi ilave edilmiş pH 6,5'da 50 mM MES tamponu ile örneklerin karıştırılmasına karar verilmiştir.

Sade veya meyve aromalı maden sularına katılan aroma, sitrik asit, glukoz (% 4), fruktoz (% 3), glukoz/fruktoz 3:2 (h/h)'dan oluşan katkı maddelerinin aspartam ölçümlerinde referans alınan 1002 cm^{-1} dalga sayısındaki bandına etkileri ayrı ayrı ve bir arada olacak şekilde SERS spektrumları alınarak, Şekil 4.24'de gösterilmiştir. SERS ölçümleri sonucu aspartam içermeyen maden sularının içeriğine katılan glukoz, fruktoz, sitrik asit, meyve aromalarının tek başına veya son ürün içeriğinde birlikte bulunmaları durumunda dahi 1002 cm^{-1} dalga sayısının takip edilmesiyle oluşturulan aspartam tayini yönteminde karakteristik bir sinyal şiddeti girişiminin olmadığı görülmüştür. Bu durum ticari olarak üretilen sade veya meyve aromalı maden sularının

içeriğine katılabilecek aspartam miktarını doğrudan analiz edilebilmesini sağlamaktadır.



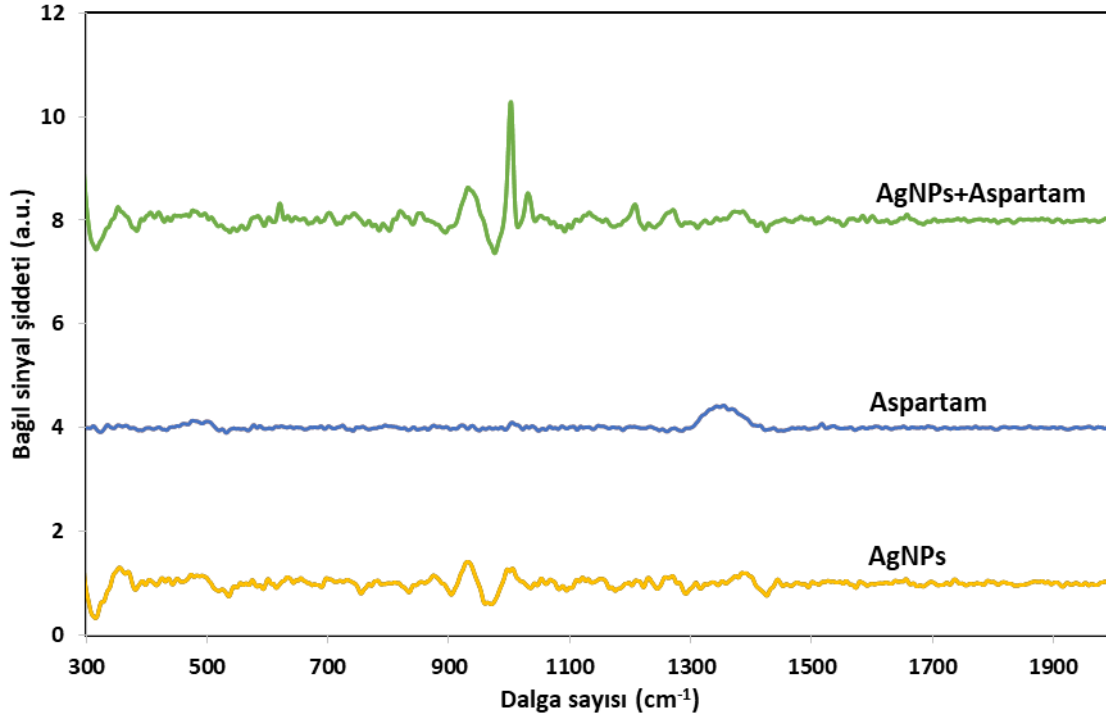
Şekil 4.24 a) meyve aroması, b) sitrik asit, c) % 4'lük glukoz, d) %3'lük fruktoz, e) glukoz/fruktoz 3:2 (h/h), f) glukoz/fruktoz 3:2 (h/h) ve sitrik asit birlikte, g) maden suyu ve h) maden suyu, meyve aroması, sitrik asit, glukoz/fruktoz 3:2 (h/h) karışım halinde alınan SERS spektrumları

4.7.5 AgNPs'nin Aspartamın SERS Sinyaline Etkisi

Aspartamın 1002 cm^{-1} 'de gözlenen SERS sinyaline analiz sırasında kullanılan AgNPs'nin girişim yapıp yapmadığının belirlenmesi amacıyla; yalnızca aspartam, AgNPs ve AgNPs-aspartame kompleksinin SERS spektrumları alınmıştır. Şekil 4-25'de görüldüğü üzere; aspartamın tek başına RS ölçümü alındığında 1002 cm^{-1} dalga sayısında karakteristik bandına ait sinyal şiddetinin düşük olduğu görülmektedir. Aynı şekilde sentezlediğimiz AgNPs'nin optimize edilen şartlarda alınan SERS spektrumu incelendiğinde de aspartamın miktarını tayin ettiğimiz 1002 cm^{-1} bandında kendisine ait zayıf bir sinyal şiddetinin olduğu, diğer dalgasayılarında ise girişim yapan yüksek şiddette bir sinyalin olmadığı görülmektedir. Son olarak SERS temelli ölçümü oluşturan aspartam-AgNPs kompleksine ait spektrum incelendiğinde 1002 cm^{-1} dalga sayısında

karakteristik bandına ait sinyalin şiddetinin arttığı ve zenginleşmenin gerçekleştiği görülmektedir.

Bu sonuçlara bakarak aspartam analizinin; maden sularında bulunan veya bulunabilecek katkı maddeleri ve şekerlerden etkilenmeden, optimizasyonu yapılan koşullarda ve AgNPs kullanılarak SERS temelli bir yöntemle yapılabileceği görülmektedir.

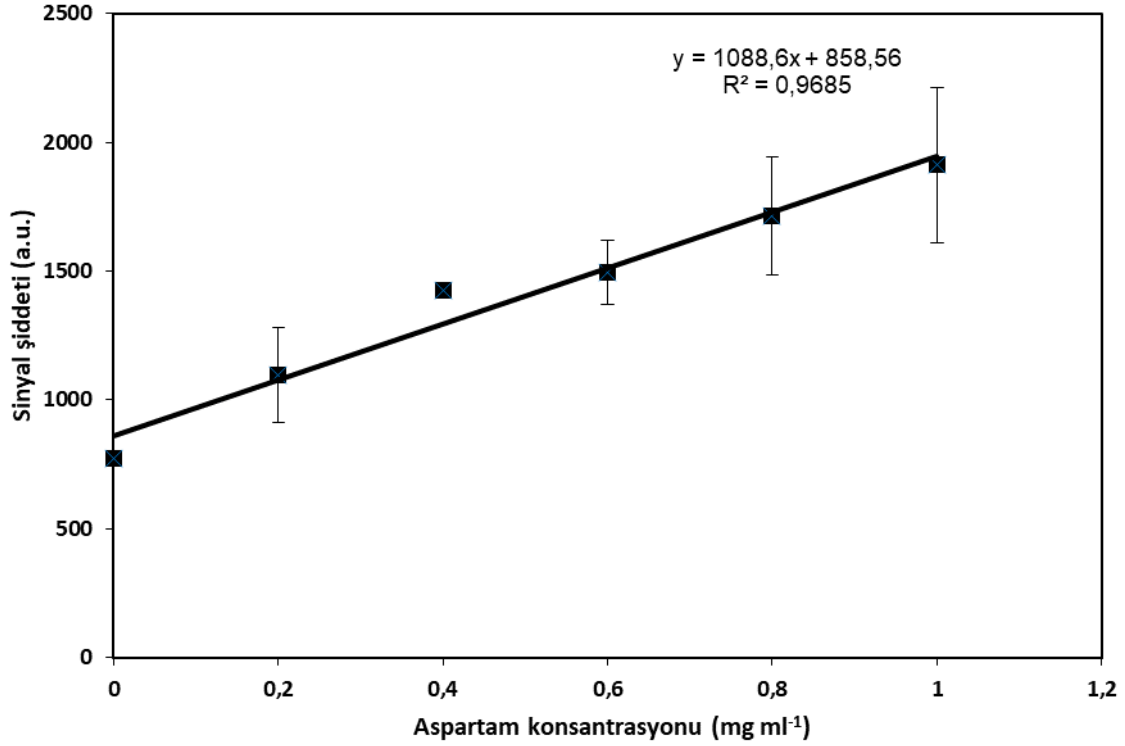


Şekil 4.25 Aspartam, AgNPs ve aspartam-AgNPs kompleksinin SERS spektrumları

4.7.6 Aspartam Miktarının Model ve Gerçek Örneklerde Belirlenmesi

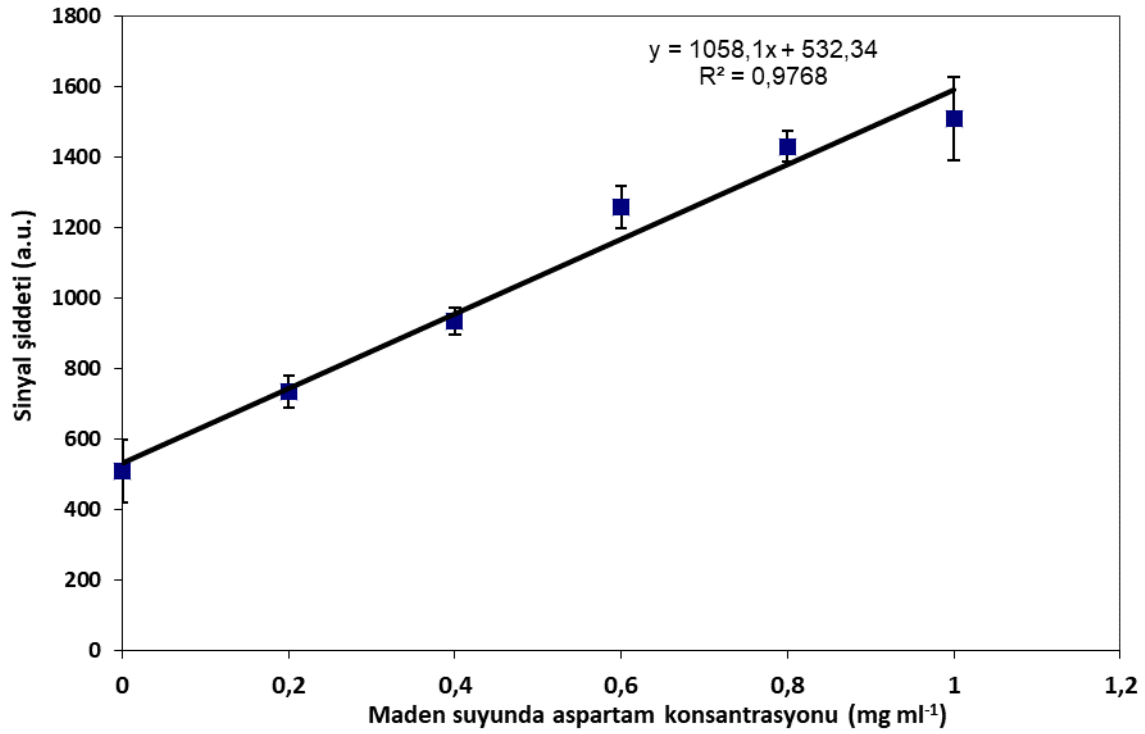
Aspartam molekülü sulu çözeltilerinde zwitteriyonik halde bulunur, COO⁻¹ ve NH₃ grupları vasıtasıyla ortamda bulunan diğer moleküller ve nanopartiküller ile elektrostatik bağlar gerçekleşebilmektedir [105]. AgNPs sentezlemek için kullandığımız prosedür sonucunda elde ettiğimiz gümüş nanopartiküller eksi yükle yüklenmişler [48, 107]. Bu durumda aspartam ve AgNPs, iyonize ve elektrostatik aktivitelerinden dolayı fiziksel olarak bir bağ oluşturabilirler. Meydana gelen bu metal-molekül kompleksi sayesinde 1002 cm⁻¹ dalga sayısında aspartamın karakteristik bandında konsantrasyona bağlı olarak SERS sinyali şiddetinde artışlar SERS ile ölçülebilmektedir. Aspartamın sulu çözeltilerdeki miktarını belirleyebilmek için 0-1 mg ml⁻¹ konsantrasyon aralığında SERS sinyali şiddetleri 1002 cm⁻¹ dalga sayısında

ölçülmüştür. Aspartamın sulu çözeltisinde hazırlanan 0-1 mg ml⁻¹ konsantrasyonlarına karşılık, 1002 cm⁻¹ dalga sayısında elde edilen SERS sinyal şiddetlerindeki artış değerleri kullanılarak Şekil 4.26'daki kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Doğrusal ilişkiyi ifade eden R² değeri 0,969 olarak bulunmuştur.



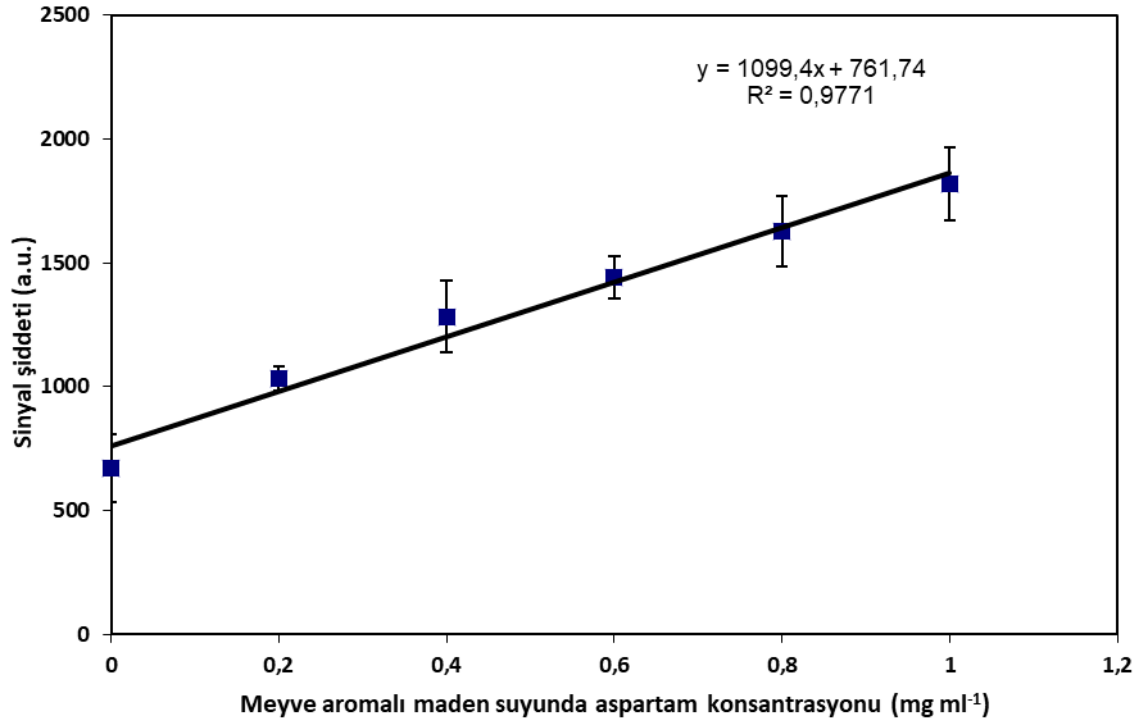
Şekil 4.26 Aspartamın (0-1 mg ml⁻¹) aralığında suda elde edilen kalibrasyon eğrisi

Aspartamın suda hazırlanan farklı konsantrasyonlarından elde edilen kalibrasyon eğrisinden sonra, aynı yöntem ile sade ve meyve aromalı maden sularına eklenen aspartamın farklı konsantrasyonlarına ait kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Sade ve meyve aromalı maden suları ayrı ayrı optimize edilen koşullarda hazırlanmış ve aspartam ilave edilmeden, son hacimde konsantrasyonları 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ve 1 mg ml⁻¹ olacak şekilde SERS ölçümleri yapılmıştır. Şekil 4.27'de sade maden suyuna eklenen aspartam konsantrasyonlarına ait SERS spektrumları ve 1002 cm⁻¹ bandından elde edilen kalibrasyon eğrisi gösterilmiştir. Maden suyu için R² hesaplandığında 0,977 değeri bulunmuştur. Şekil 4.28'de meyve aromalı maden suları için aynı şekilde SERS spektrumları alınmış ve konsantrasyonlara karşı kalibrasyon eğrisi çıkarılmıştır. Buradan R² değeri 0,977 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.27 Aspartamın (0-1 mg ml⁻¹) aralığında sade maden suyunda elde edilen kalibrasyon eğrisi

Kalibrasyon eğrilerinin eğimleri karşılaştırılarak, aspartam miktarının tayini için geliştirdiğimiz SERS yönteminin verimliliğine bakılmıştır. Model örneğimiz aspartam konsantrasyonlarının su içerisinde analizidir. Bu modelde kalibrasyon eğrisinin eğimi 1088,6 bulunmuştur. Gerçek örnek denemeleri için sade ve meyve aromalı maden sularına belirtilen miktarlarda aspartam eklenmiştir. Aspartamın konsantrasyonlarına bağlı olarak elde edilen SERS spektrumlarına karşı kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Bu gerçek örnekler üzerinden elde edilen eğrilerin eğimleri ise sırasıyla 1058,1 ve 1099,4 bulunmuştur. Model örneğimiz ve gerçek örnek olarak kullanılan maden sularından elde edilen kalibrasyon eğrilerinin eğimleri karşılaştırıldığında, bulunan sonuçlar için istatistiksel olarak bir farkın olmadığı ve güven aralığı sınırlarında ($p < 0,05$) kaldığı görülmektedir. Bu duruma göre gerçek örneklerimizde veya model örnekte katkı maddesi olarak bulunan sitrik asit, aroma ve şekerler geliştirilen SERS temelli aspartam tayini yönteminin sonucunu etkilememektedir.



Şekil 4.28 Aspartamın (0-1 mg ml⁻¹) aralığında meyve aromalı maden suyunda elde edilen kalibrasyon eğrisi

4.7.7 Geliştirilen SERS Tabanlı Yöntemin Validasyonu

Model örnek ve gerçek örnek denemelerinde kullanılan su ve maden suyu örneklerindeki aspartam tayini için doğrusal bir korelasyon bulunmuştur. Model örneğimiz suyun içindeki aspartam miktarına ait kalibrasyon eğrisinden elde edilen LOD ve LOQ değerleri hesaplandığı zaman, sırasıyla 0,17 ve 0,56 mg ml⁻¹ bulunmuştur. Gerçek örnek denemeleri için kullandığımız sade ve meyve aromalı maden sularında LOD değerleri 0,13 ve 0,14 mg ml⁻¹, LOQ değerleri ise sırasıyla 0,43 ve 0,45 mg ml⁻¹ değerleri bulunmuştur. Aspartamın günlük alımlarda kabul edilen güvenli sınırı, vücut ağırlığının her bir kg'da 50 mg ve alkolsüz içeceklerde 600 mg l⁻¹ olarak belirlenmiştir [88, 108]. Geliştirilen SERS tabanlı analiz yöntemiyle aspartamın tayin alt sınırı hem model hem de gerçek örnekler içerisinde sırasıyla 0,17, 0,13, 0,14 mg ml⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Bu durum da geliştirilen SERS tabanlı yöntem sayesinde içeceklerdeki aspartam, yasal sınırların altındaki veya üzerindeki aralıklarda belirlenebilmektedir.

Gerçek örnek içerisine sonradan eklenen aspartamın geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Bu amaçla 0,2, 0,4, 0,6 mg ml⁻¹ aspartam maden suyu içerisine

eklenmiş ve SERS ölçümleri alınmıştır. Elde edilen sinyallerin şiddeti kalibrasyon eğrisi üzerinden hesaplanmıştır. Eklenen aspartam konsantrasyonlarının geri kazanım değerleri sırasıyla, %81, %95 ve %87 olarak bulunmuş ve Çizelge 4.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8 Meyve aromalı maden suyunda aspartamın SERS ölçümü sonucu geri kazanım değerleri

Maden suyuna eklenen aspartam miktarı (mg ml ⁻¹)	Ort. Sinyal şiddeti (a.u.)	Tespit edilen miktar (mg ml ⁻¹)	% Geri kazanım (n=4)	Bağıl standart hata (%)
0,2	361	0,16±0,0181	81	4,83
0,4	612	0,38±0,0495	95	11,28
0,6	772	0,52±0,0387	87	6,0

Aspartam tayini için geliştirilen SERS tabanlı metodun kesinlik ve hassasiyetini belirleyebilmek için bağıl standart hata (RSD) % değerleri hesaplanmış ve Çizelge 4.8’de gösterilmiştir. Geliştirilen metodun gün içi ve günler arasında doğruluk ve kesinliğini belirleyebilmek için ise meyve aromalı maden suyu örneklerine 0,6 mg ml⁻¹ aspartam eklenmiş ve elde edilen değerler Çizelge 4-9’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9 Geliştirilen aspartam tayini yönteminin gün içi ve günler arası doğruluğu ve tekrarlanabilirliği

	Ölçümler	Eklenen konsantrasyon (mg ml ⁻¹)	Ölçülen konsantrasyon (mg ml ⁻¹) n=3	Standart Sapma (%)	Doğruluk (bias) ^a	Bağıl Standart Sapma (%) ^b
Gün içi	Gün 1	0,6	0,61±0,05	1,3	1,7	9,0
	Gün 1	0,6	0,59±0,02		-1,3	3,8
	Gün 1	0,6	0,63±0,05		5,3	7,7
	Gün 1	0,6	0,62±0,04		2,6	6,1
Günler arası	Gün 1	0,6	0,60±0,04	0,9	-0,7	7,3
	Gün 2	0,6	0,60±0,04		-0,2	7,1
	Gün 3	0,6	0,61±0,03		2,4	4,5
	Gün 4	0,6	0,62±0,05		2,7	8,1
	Gün 5	0,6	0,62±0,05		4,0	8,6

^a ((ortalama konsantrasyon-gerçek konsantrasyon)/gerçek konsantrasyonx100)

^b RSD (%) = (Standart sapma/ Ortalama)x100 ölçülen gün içi veya günler arası değer

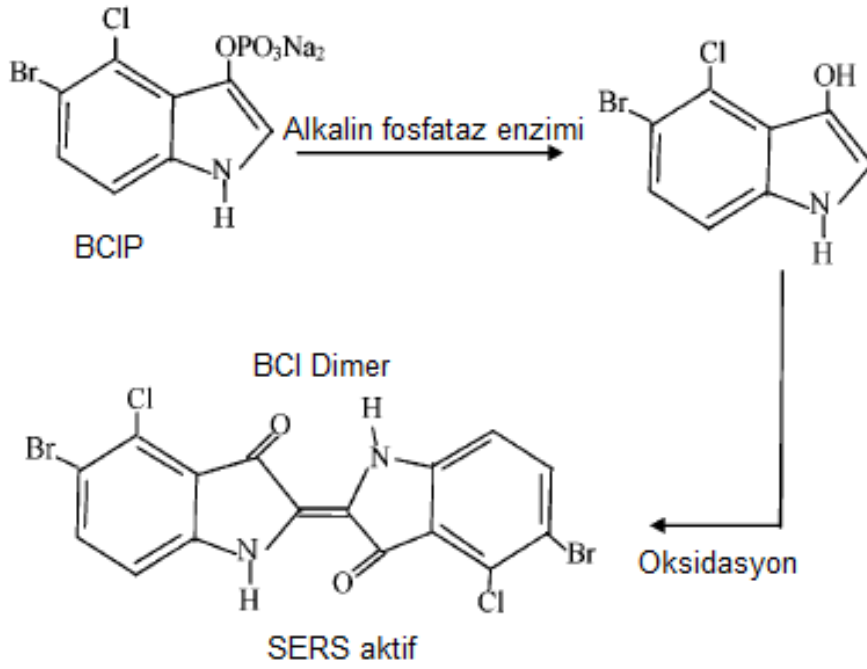
Gün içi ve günler arası yapılan ölçümlerde elde edilen RSD değerleri % 1,3 ve 0,9 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre geliştirilen metot; yenilenebilirlik, tekrarlanabilirlik ve doğruluk açısından güvenilir olarak aspartam tayini amacıyla sade ve meyve aromalı içeceklerde kullanılabileceği anlaşılmaktadır.

4.8 ALP Tayinine Yönelik Geliştirilen SERS Tabanlı Yöntem

Alkalın fosfataz enzimi (ALP), organik moleküllerdeki fosfat grubunu hidrolize ederek uzaklaştırmaktadır. Vücutta gerçekleşen pek çok metabolik ve biyokimyasal olayda yer almaktadır. Klinik testlerde, kan serumunda belirli miktarlarda bulunmasından dolayı pek çok hastalığın teşhisinde işaretçi enzim olarak takip edilmektedir. Bunun yanında enzimatik aktivitesinin hassas ve kararlı olması sebebiyle, pek çok immünolojik ve biyokimyasal analizlerde; proteinlerin, nükleik asitlerin ve bakterilerin tespit ve tayin edilmesinde kullanılmaktadır [109-111] .

ALP'nin yaygın bir şekilde biyolojik ve klinik uygulamalarda ve testlerde kullanılması sonucu, enzimatik aktivitesinin belirlenmesine yönelik hızlı ve güvenilir analizlerin ve yöntemlerin geliştirilmesi önemli hale gelmektedir. Günümüzde yaygın olarak ALP aktivitesinin belirlenmesi için enzimin substratı kullanılmakta ve aktivitesi sonucunda meydana gelen ürün üzerinden kemilüminesans [112], fluorometrik [113], kolorimetrik [114] veya elektrokimyasal [115] sinyaller takip edilerek belirlenmektedir. SERS tekniği kullanılarak enzimatik aktivitenin belirlenmesinde enzim substratı veya oluşan ürünü yeterli SERS sinyal şiddetini oluşturmazsa; enzimatik aktivite ve boyanın SERS sinyal şiddeti arasında ilişki kurularak SERS aktif işaretçiler kullanılmaktadır [116].

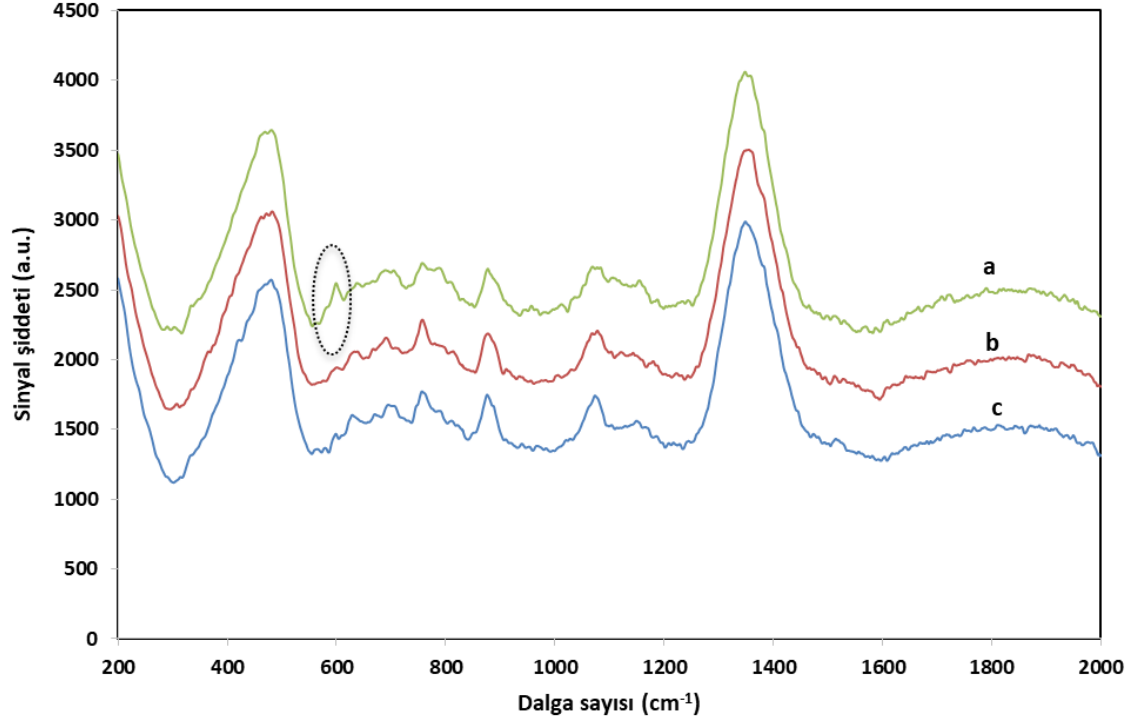
5-Bromo-4-kloro-3-indol fosfat (BCIP), ticari olarak ALP enzim aktivitesinde substrat olarak kullanılan kromojenik bir maddedir. Enzim aktivitesi sonucunda fosfat uzaklaşarak 5-bromo-4-kloro-3 indol (BCI) molekülü elde edilmektedir. BCI molekülleri oksidasyon sonucu bir araya gelerek mavi renkli BCI dimerlerini oluşturmaktadırlar. Dimer yapısının SERS aktivitesi güçlüdür ve karakteristik olarak 600 cm^{-1} dalga sayısında yüksek sinyal şiddeti elde edilir. Şekil 4.29'da ALP enzimatik aktivite sonucu BCIP substratının SERS aktif BCI dimer yapılarına dönüşümü şematize edilmiştir.



Şekil 4.29 ALP enzimatik reaksiyonu sonucu BCIP substratından SERS aktif BCI dimerinin oluşma mekanizması

4.8.1 ALP'nin Farklı Platformlarda Alınan RS ve SERS Spektrumları

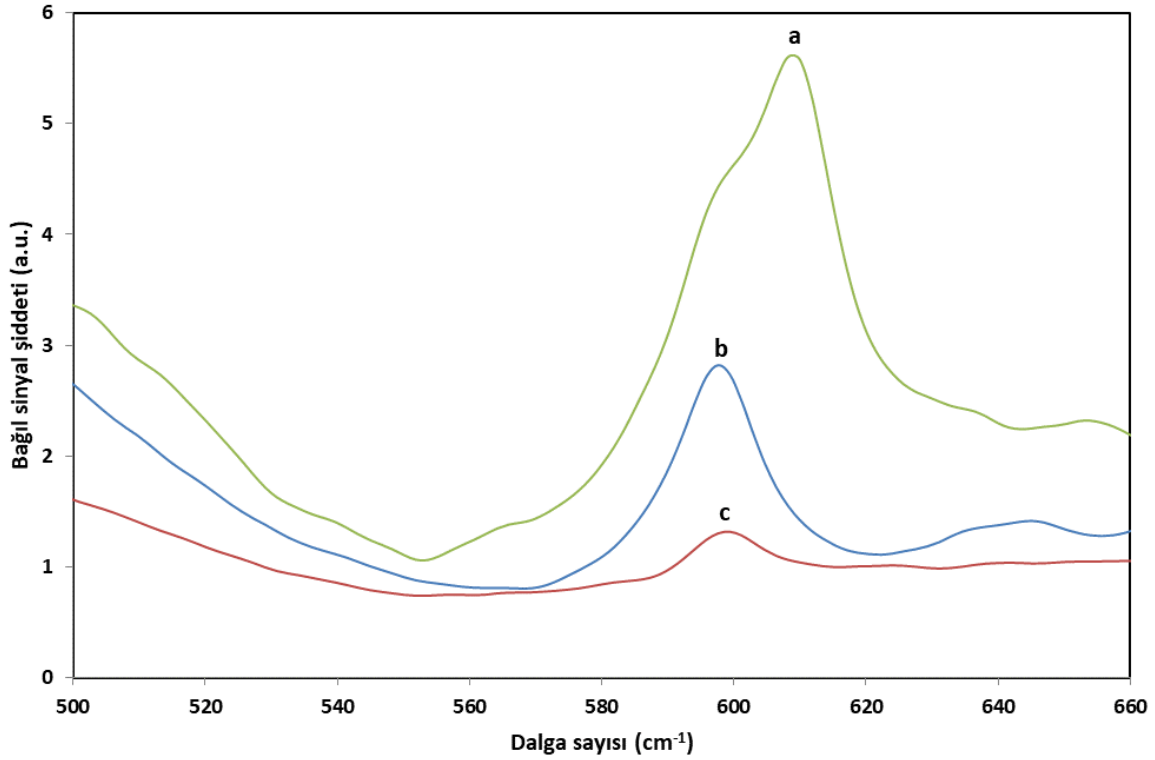
Enzimatik aktiviteyi oluşturan üç bileşen ALP, BCIP ve oluşan son ürün BCI dimerlerinin RS spektrumları alınarak karakteristik bandları tespit edilmek istenmiştir. Şekil 4.29'da ayrı ayrı ALP enzim çözeltisinden 10^{-11} M, BCIP substratından $0,3 \text{ mg ml}^{-1}$ olacak şekilde RS ölçümleri kuvvetlerde alınmıştır. ALP-BCIP enzimatik reaksiyonu sonucu oluşan BCI dimerlerinin ölçümleri için de aynı şekilde kuvvetler kullanılarak RS spektrumları alınmıştır. Elde edilen spektrumlar Şekil 4.30'da gösterilmiştir. ALP enzimi ve BCIP substratına ait alınan RS spektrumları incelendiğinde, birbirlerinden ayrıştırılacak herhangi karakteristik bir bandın meydana gelmediği ve dalga sayılarında görülen sinyal şiddetlerinin çok düşük olduğu görülmektedir. BCIP dimerinin spektrumda ise diğer spektrumlardan farklı olarak 600 cm^{-1} dalga sayısında karakteristik C=C-CO-C eğilme titreşim bandına ait sinyal şiddeti görülmektedir [117].



Şekil 4.30 a) BCI (ürün), b) ALP (enzim), c) BCIP (substrat) RS spektrumları

Sentezlenen AgNPs, Au-NRs nanopartikülleri ve Au-AgNPs yüzeylerin SERS etkisinden yararlanarak ölçümler alınmıştır. Enzimatik aktivite sonucu oluşan BCI dimerinin SERS ölçümlerinden her bir platformdan elde edilen spektrumlar Şekil 4.31’de gösterilmektedir. ALP konsantrasyonu 10^{-11} M olacak şekilde $0,3 \text{ mg ml}^{-1}$ BCIP substratıyla Tris-HCl (pH 9,8) tamponunda 1 saat süreyle etkileştirildikten sonra, enzim aktivitesi sonucu BCI dimerleri mavi renkli çözelti oluşturmuştur. Elde edilen çözelti 10X AgNPs ve Au-NRs ile ayrı ayrı karıştırılarak ticari Au slayt üzerine $1\mu\text{l}$ aktararak SERS ölçümleri alınmıştır. Au-AgNPs yüzeyler için ise doğrudan enzim aktivitesi sonucu oluşan BCI dimer çözeltisinden $1\mu\text{l}$ alınarak SERS ölçümleri alınmıştır. Şekil 4.31’de farklı nanoyapılardan oluşan SERS platformlarından alınan BCI dimerine ait 600 cm^{-1} dalga sayısındaki bağıl sinyal şiddetlerini gösterir spektrumlar verilmiştir. Elde edilen spektrumlar incelendiğinde 600 cm^{-1} dalga sayısında en yüksek sinyal şiddetinin Au-NRs nanopartiküllerine ait spektrumda görülmektedir.

Gümüş nanopartiküllerin koloidal hali ve yüzeye SAM kullanılarak biriktirilmesi sonucu elde edilen yüzeyden elde edilen Au-AgNPs yüzeye ait SERS spektrumları karşılaştırıldığında Au-AgNPs yüzeylerin AgNPs nanopartiküllere göre daha yüksek sinyal şiddetlerinin alındığı görülmektedir.



Şekil 4.31 a) Au-NRs, b) Au-AgNPs yüzey, c) AgNPs kullanılarak elde edilen BCI (ürün) SERS spektrumları

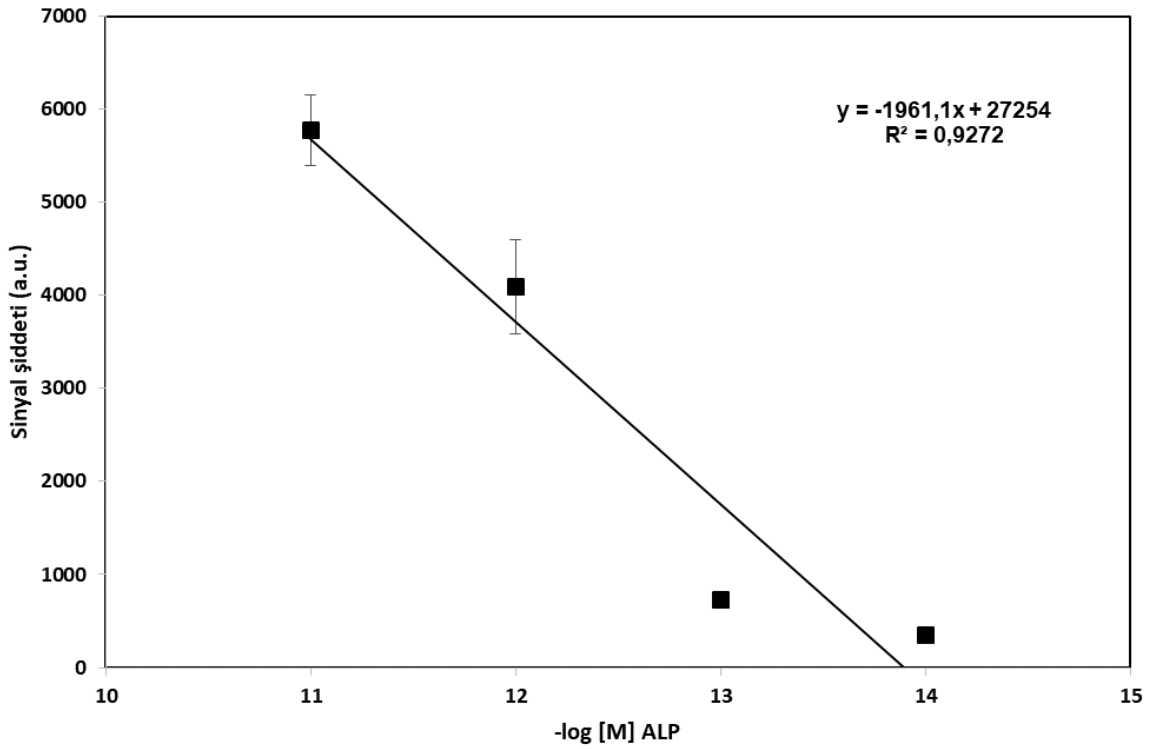
Plazmon rezonansları karşılaştırıldığında gümüş nanopartiküllerin aynı şekil ve boyutlardaki altın nanopartiküllere göre daha yüksek değerlere sahiptir [118]. Bu durumda SERS uygulamalarında gümüş nanopartiküllerin elektromanyetik alan enerjilerinin, altın nanopartiküllere göre daha yüksek olmasına ve ölçümü yapılan moleküle ait karakteristik dalga sayısında daha büyük sinyal şiddetlerinin elde edilmesini sağlamaktadır. Kullanılan Au-NRs boyutu ve şekli itibarıyla sentezlenen AgNPs'den farklıdır ve bu durum plazmon rezonanslarında ve SERS ölçümlerinde elde edilen plazmonik alanın farklılaşmasını sağlamaktadır. Anizotropik yapıdaki Au-NRs'nin yatay ve dikey eksenlerinden elde edilen bölgesel alan zenginleştirmeleri (local field enhancement) isotropik yapıdaki küresel şekilli AgNPs nanopartiküllere göre partikül boyutundan bağımsız olarak daha fazladır [119, 120]. Bunun sonucunda Au-NRs ile elde edilen BCI dimerlerine ait 600 cm⁻¹ dalga sayısında elde edilen sinyal şiddeti daha yüksek bir değerdedir.

ALP aktivitesi sonucu oluşan BCI dimerinin 600 cm⁻¹ dalga sayısındaki SERS sinyali şiddeti değerleri kullanılarak her bir platforma ait EF değerleri hesaplanmıştır. AgNPs,

Au-NRs ve Au-AgNPs yüzey için EF değerleri sırasıyla $2,19 \times 10^9$, 5×10^9 ve $7,74 \times 10^9$ olarak hesaplanmıştır.

4.8.2 ALP Konsantrasyonunun Belirlenebilmesi için Kalibrasyon Eğrileri

ALP konsantrasyonunun değişimi sonucu sabit miktarda kullanılan BCIP substratına bağlı olarak 1 saat içerisinde ürün olarak açığa çıkan BCI dimerlerinin miktarı değişmektedir. Bu durum BCI dimerlerinden 600 cm^{-1} dalga sayısında elde edilen sinyal şiddetinin ALP miktarına bağlı olarak değişmesini sağlamaktadır. Enzimatik aktivite öncesi karakteristik olarak 600 cm^{-1} dalga sayısında ALP konsantrasyonu veya BCIP miktarına bağlı olarak bir sinyal şiddeti gözlenmemektedir. Enzimatik aktivite sonrası oluşan BCI dimerlerinin 600 cm^{-1} dalga sayısında gözlenen SERS sinyal şiddetleri ALP konsantrasyonu ile ilişkilendirilerek, sentezlenen AgNPs ve Au-NRs nanopartikülleri ve Au-AgNPs yüzey kullanılarak ölçümler alınmıştır.

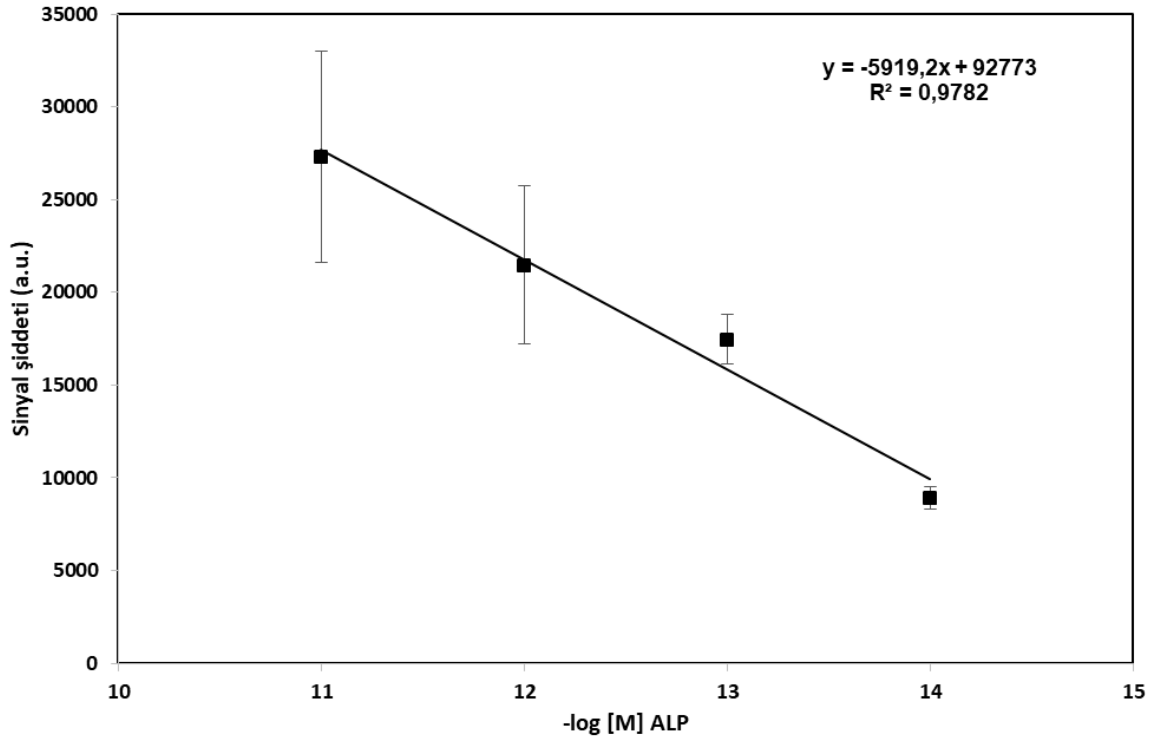


Şekil 4.32 AgNPs ile elde edilen ALP konsantrasyonuna bağlı kalibrasyon eğrisi

ALP konsantrasyonu 10^{-11} - 10^{-15} M aralıkta olacak şekilde her bir platform için kalibrasyon eğrileri çıkarılmış ve SERS performansları karşılaştırılmıştır. Şekil 4.32'de AgNPs kullanılarak 10^{-14} - 10^{-11} M aralığında ALP konsantrasyonlarına karşılık elde edilen BCI dimerlerine ait 600 cm^{-1} 'de elde edilen sinyal şiddetlerini göstermektedir.

ALP konsantrasyonunun 10^{-14} M olduğu noktadan daha düşük derişimlerde elde edilen BCI dimerlerine ait SERS sinyal şiddetlerinin anlamlı bir değişim göstererek 10^{-14} M ALP konsantrasyonundan ayırıştırılamadığı tespit edilmiştir. Daha düşük derişimlerde artık sinyal şiddetlerinin düşük olması sonucu ALP ve BCIP'a ait parmak izi spektrumdan gelen gürültü sinyalleriyle karışmaktadır. Elde edilen sinyal şiddetleri üzerinden değişen ALP konsantrasyonlarına karşılık gelecek şekilde doğrusal aralıkta bir kalibrasyon eğrisi çizildiğinde R^2 değeri 0,9272 olarak hesaplanmıştır.

Au-AgNPs yüzey kullanılarak 10^{-11} - 10^{-14} ALP konsantrasyonları aralığına karşılık elde edilen 600 cm^{-1} dalga sayısındaki BCI SERS sinyal şiddetleri, Şekil 4.33'de gösterilmiştir. Elde edilen bu değerler üzerinden doğrusal aralıkta kalibrasyon eğrisi çizildiğinde R^2 değeri 0,9782 olarak bulunmuştur.

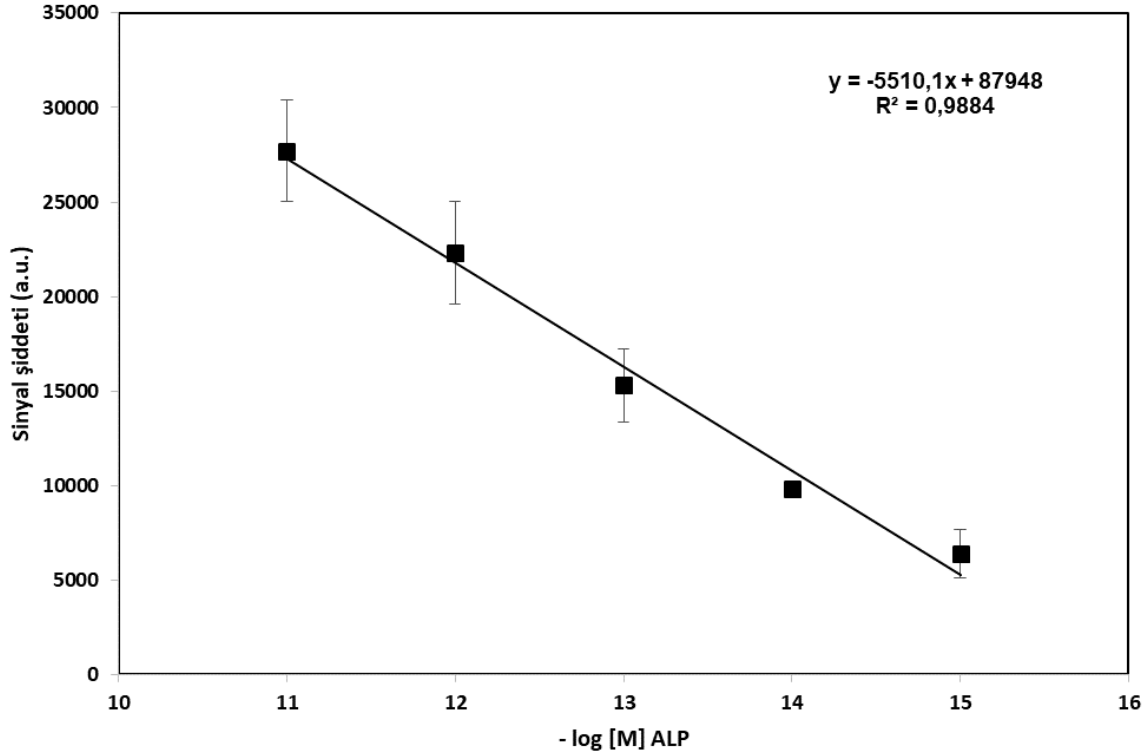


Şekil 4.33 Au-AgNPs yüzey ile elde edilen ALP konsantrasyonuna bağlı kalibrasyon eğrisi

ALP konsantrasyonlarının değişimine göre elde edilen BCI dimerlerinin SERS sinyal şiddetlerini takip etmek için Au-AgNPs yüzeylerden alınan ölçümlerde artan konsantrasyonlarda tekrar eden ölçümlerde standart sapma değerinin giderek arttığı gözlenmiştir. Geliştirilen yüzey için elde edilen determinasyon katsayısı her ne kadar yüksek olsa da elde edilen sonuçların artan ALP konsantrasyonlarının güvenilir

aralıklarda tahmin edilememesi nedeniyle bu yüzeylerin kullanımı enzimatik reaksiyon sonucunda ALP miktarının tespitine yönelik hassasiyeti düşürmektedir.

Şekil 4.34’de Au-NRs kullanılarak 10^{-11} - 10^{-15} M ALP konsantrasyonu aralığında BCI dimerine ait 600 cm^{-1} dalga sayısında alınan SERS sinyal şiddetleri gösterilmektedir.



Şekil 4.34 Au-NRs ile elde edilen ALP konsantrasyonuna bağlı kalibrasyon eğrisi

Au-NRs kullanılarak 10^{-11} - 10^{-15} M ALP konsantrasyonu aralığında elde edilen kalibrasyon eğrisinde R^2 değeri 0,9884 olarak bulunmuştur. Her üç SERS platformu kullanılarak elde edilen SERS sinyal şiddetleri ve kalibrasyon eğrileri üzerinden hesaplanan değerler karşılaştırıldığında Au-NRs nanopartikülleri kullanılarak daha düşük ALP konsantrasyonundan (10^{-15} M) BCI dendrimerine ait sinyal şiddeti tespit edilebilmiştir. ALP konsantrasyonları için elde edilen sinyal şiddetlerinin standart hata değerleri diğer iki SERS platformuyla karşılaştırıldığında daha düşük bulunmuştur. Bu durum Au-NRs ile alınan ölçümlerin daha hassas ve güvenilir bir aralıkta kalmasını sağlamaktadır. R^2 değerleri karşılaştırıldığında ise en iyi determinasyon katsayısına Au-NRs kullanılarak ulaşıldığı görülmektedir.

ALP enzimatik aktivitesinin sonucunda oluşan BCI dimerlerinin geliştirilen SERS platformlarının kullanılmasıyla elde edilen kantitatif değerler Çizelge 4.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.10 SERS platformlarının ALP enzimatik aktivite sonucu hesaplanan EF ve R^2 değerleri

SERS Platformları	EF	Doğrusal Aralık [M]	R^2
AgNPs	$2,19 \times 10^9$	10^{-11} - 10^{-14}	0,9272
Au-AgNPs	$7,74 \times 10^9$	10^{-11} - 10^{-14}	0,9782
Au-NRs	$5,00 \times 10^9$	10^{-11} - 10^{-15}	0,9884

4.9 ALP İşaretli SERS Aktif İmmunoassay Tabanlı *Escherichia coli* Tayini

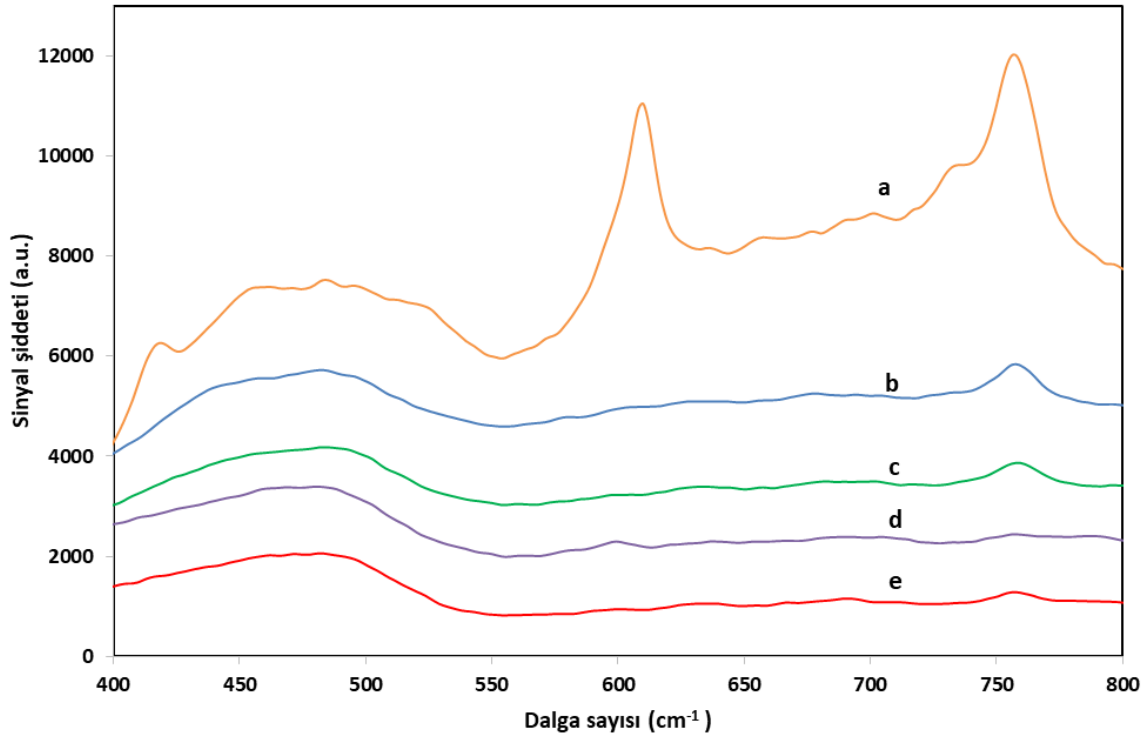
Patojen bakterilerin tespit ve tayini gıda güvenliği ve insan sağlığının korunması açısından kritik öneme sahiptir. *E. coli* patojen bakteriler içiresinde önemli bir yere sahiptir ve ölümcül hastalıklara yol açmaktadır [121]. Bunun sonucu olarak *E. coli*'nin güvenilir ve hassas olarak hızlı bir şekilde tayini önem arz etmektedir [122, 123]. *E. coli*'nin güvenilir, hassas ve hızlı bir şekilde tayin edilmesini sağlayacak metotların geliştirilmesinde SERS uygulamaları etkin bir şekilde kullanılmaktadır [124-126]. Patojen bakterilerin tayin yöntemlerinde, enzimatik reaksiyonların SERS aktif ürünleri yoluyla takip edilebilir olması, rapor edilen SERS temelli enzimatik çalışmaların sayısının artırmaktadır [127, 128]. Enzimlerin nanopartiküllerin yüzeylerine bağlanmalarıyla enzimatik aktiviteleri sonucu SERS temelli uygulamalarda daha hassas ölçümlerin alınmasını sağlamaktadır [129, 130].

ALP'nin enzimatik aktivitesi sonucu, substratı olan BCIP parçalanarak SERS yönünden aktif BCI dimerleri ve inorganik fosfat meydana gelir. SERS aktif BCI dendrimeri işaretçi olarak kullanılarak bakteri tayini için immunoassay tasarlanmıştır. BCI dendrimerine ait olan SERS sinyalleri *E. coli* konsantrasyonu ile korelasyon oluşturacak şekilde SERS tabanlı bir yöntem geliştirilmiştir. Bakterilerin seçici olarak bulunduğu ortamdan ayrıştırılmaları için manyetik çekirdekli altın kaplı nanopartiküller kullanılmıştır. Bu manyetik nanopartiküllerin yüzeyi *E. coli* antikoru ile modifiye edilerek seçici ayırım sağlanmıştır. SERS temelli platformlar içersinde ALP aktivitesinin en hassas ve doğru olarak takip edilmesini sağlayan Au-NRs nanopartikülleri yüzeyine, belirlenen konsantrasyonda ALP modifiye edilmiştir. Daha önceden immunomanyetik

olarak ayrıştırılan çözelti içerisindeki *E. coli* bakterilerine seçici olarak bağlanması için yüzeyi antikör ile modifiye edilmiştir. İki taraflı sandviç yapı oluşturulduktan sonra bağlanmayan ALP işaretli Au-NRs yıkama tamponları kullanılarak uzaklaştırılmıştır. BCIP substratı oluşturulan sandviç yapının bulunduğu çözeltiye gönderilmiş ve Au-NRs yüzeyinde bağlı olarak bulunan ALP ile enzimatik reaksiyona girerek SERS aktif BCI ürününün oluşması sağlanmıştır. Son olarak Raman spektroskopisinde ölçümler yapılarak SERS spektrumları elde edilmiştir. Bu yöntemin seçiciliğini ve duyarlılığını belirlemek için kontrol ölçümleri ve optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

4.9.1 ALP, BCIP ve BCI'nın RS ve SERS Spektrumları

Bakteri tayinine yönelik geliştirilen yöntem esas olarak ALP'nin enzimatik reaksiyonuna bağlıdır. Bu sebeple enzimatik reaksiyon bileşenleri olan ALP, substratı BCIP ve oluşan ürün BCI ayrı ayrı RS ve Au-NRs kullanılarak SERS spektrumları alınmış ve Şekil 4.35'te gösterilmiştir. Elde edilen spektrumlar incelendiğinde 600 cm^{-1} dalga sayısında BCI dimerine ait olan band Au-NRs varlığında gözlenmekte ve sinyal şiddeti artmaktadır. Enzim olarak ALP, substrat olarak BCIP tek başlarına veya Au-NRs varlığında herhangi bir girişim bandı göstermemektedir.



Şekil 4.35 a) BCI+Au-NRs, b) BCIP+Au-NRs, c) ALP+Au-NRs, d) BCI, e) ALP SERS ve RS spektrumları

ALP'nin substratı olan BCIP'i hidrolize ederek BCI ve iorganik fosfata ayırmaktadır. BCI daha sonra atmosferik oksijen varlığında okside olarak mavi renkli 5,5'-dibromo-4,4'-dikloro-indigo adlı SERS aktif bir bileşiğe dönüşmektedir [131].

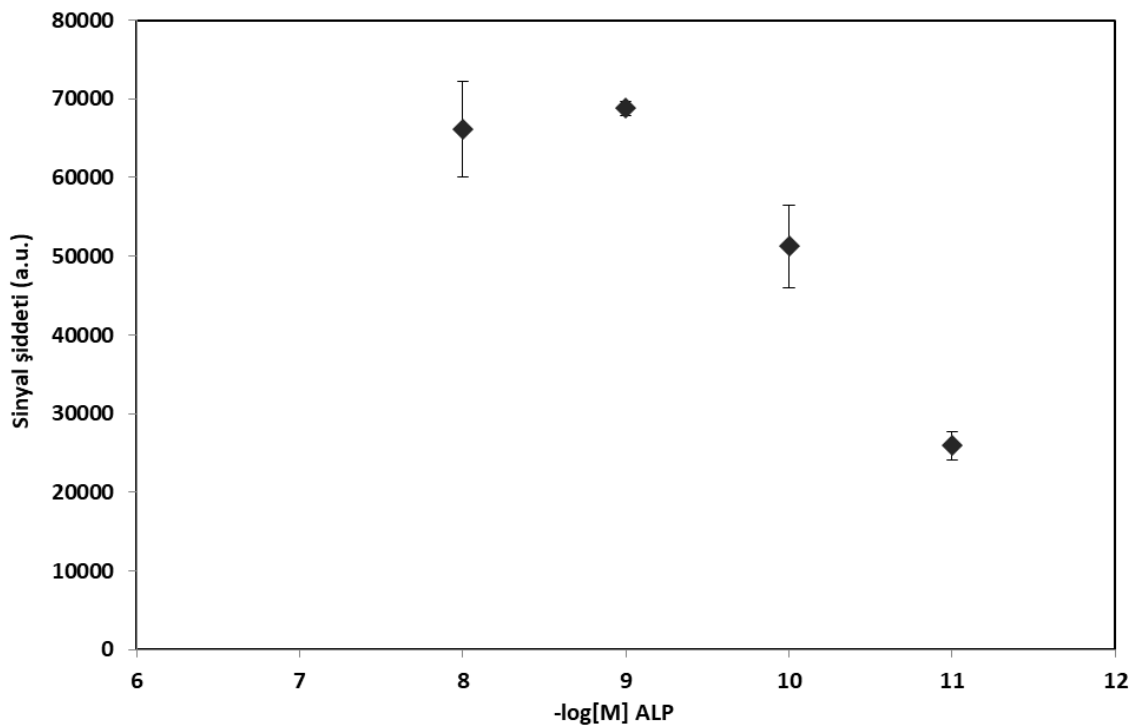
Metalik nanopartiküllerin Raman saçılımını zenginleştirme özelliğinden yararlanarak, BCI'nın 600 cm^{-1} 'de gözlenebilen karakteristik bandı üzerinden ALP'nin enzimatik reaksiyonunu ve konsantrasyonu belirlenebilmektedir. BCIP bileşik yapısı itibarıyla Raman ve SERS saçılımında gözlenememekte ve metalik nanopartiküllerle sulu çözeltilerinde kompleks bir yapı oluşturmamaktadır. ALP tarafından hidrolize edildikten sonra meydana gelen ürün BCI ise oksidasyon sonucu dimer yapıları oluşturmaktadır. Metalik nanopartiküllerle kompleks yapan BCI dimerleri SERS aktif bir bileşik olduğu için işaretçi olarak 600 cm^{-1} dalga sayısındaki yüksek sinyal şiddetlerinden yararlanılarak ALP konsantrasyonları takip edilebilmektedir.

4.9.2 MNPs-Au ve Au-NRs'nin Optimizasyon ve Modifikasyon Parametreleri

Manyetik taşıyıcı ve bakterilerin ortamdan spesifik olarak ayrımı için kullanılacak MNPs-Au'nun ve enzimatik aktivitenin sağlanması için yüzeyine ALP bağlanacak Au-NRs'nin, sentezlendikten sonra şekil ve boyut özellikleri UV-Visible spektrofotometrede ve TEM görüntülerinde karakterize edildikten sonra yüzeyinin modifikasyonu için 11-MuA kullanılmıştır. Tiyol grubuna sahip bu alkanetiyol zincirinin ucunda fonksiyonel grup olarak karboksil bulunmaktadır. Bu sayede altın üzerine tiyol gruplarının bağlanmasıyla SAM oluşturulmaktadır [132]. Oluşturulan SAM'in fonksiyonel karboksil grubunu moleküllerin bağlanmasını sağlamak için EDC-NHS kullanılarak aktif hale getirilir [133].

Avidin, MNPs-Au yüzeyinde aktif edilen COO^- gruplarına öncelikle kovalent olarak bağlanmakta ve biotin işaretli *E. coli* antikorunu avidin-biotin ilişkisi üzerinden ($K_d = 10^{-15}\text{ M}$) yakalayarak protein-ligand kompleksi oluşturmaktadır [134]. Sentezlenen MNPs-Au yüzeyine bağlanabilecek avidin miktarı daha önceden teorik ve deneysel olarak hesaplanmış ve ortaya konulmuştur [135]. Kaynak verilen çalışmada 1 mg MNPs-Au üzerine teorik olarak bağlanabilecek avidin miktarı $39,8 \times 10^{-3}\text{ mg}$ olarak bulunmuştur. Deneysel olarak ise $39 \times 10^{-3}\text{ mg}$ avidinin partikülün yüzeyine bağlandığı rapor edilmiştir. Bu veriler dikkate alınarak, geliştirilen SERS temelli yöntemde $0,5\text{ mg ml}^{-1}$ avidinin MNPs-Au ve Au-NRs üzerine bağlanmasında yeterli olacağı anlaşılmaktadır.

İmmuno manyetik ayırma (İMA) dayanan SERS temelli geliştirilen yöntemde *E. coli* sayısının belirlenmesinde doğru sonuçların elde edilebilmesi, doğrudan Au-NRs yüzeyine immobilize edilen ALP konsantrasyonuna ve onun aktivitesine bağlıdır. Bu maksatla 10^{-8} - 10^{-11} M ALP konsantrasyonları Au-NRs yüzeyine gönderilmiş ve bağlanma oranları üzerinden ALP aktivitesi sonucu elde edilen SERS sinyalleri 600 cm^{-1} 'de optimum konsantrasyonu belirlemek amacıyla karşılaştırılmıştır. Şekil 4-36'da Au-NRs'nin yüzeyine farklı konsantrasyonlarda gönderilen ve kovalent olarak bağlanan ALP'nin, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan ürünü BCI'dan elde edilen 600 cm^{-1} 'de SERS sinyalleri gösterilmiştir.

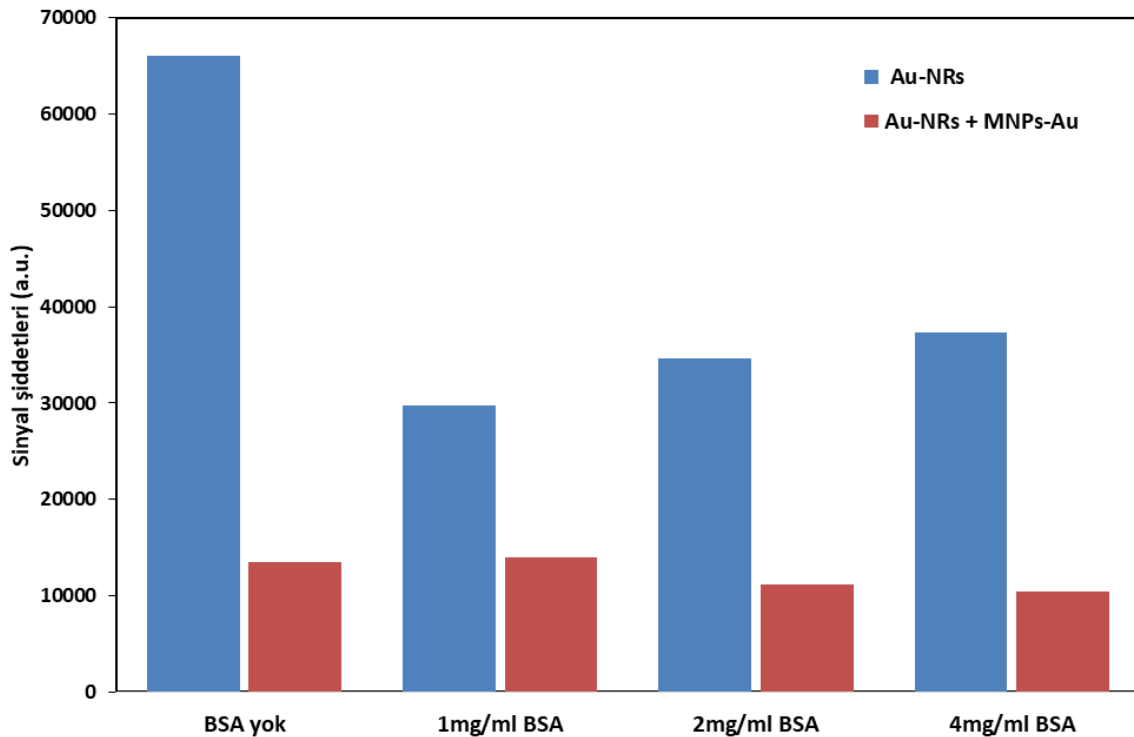


Şekil 4.36 Au-NRs yüzeyine immobilize edilen ALP konsantrasyonları ve oluşan BCI'nın 600 cm^{-1} 'de SERS sinyali şiddeti.

Kontrol edilen ALP konsantrasyonu aralığında elde edilen BCI sinyallerinin şiddetine bakıldığında, enzim konsantrasyonu arttıkça 600 cm^{-1} 'de yükseldiği görülmektedir. ALP konsantrasyonu 10^{-9} ve 10^{-8} M olduğunda ise SERS sinyal şiddetinin platoya geldiği ve daha yüksek konsantrasyonlarda artışın olmayacağı anlaşılmaktadır. Optimum enzim aktivitesi ve Au-NRs yüzeyinde ALP'nin kovalent olarak bağlanırken avidin ile beraber yarışmalı olarak gönderilmesi durumu da değerlendirilmiş ve 10^{-8} M ALP optimum konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

İmmunoassayin seçiciliği kullanılan nanopartiküllerin yüzeylerinin seçici olmayan bağlanmalara karşı blokasyonu doğru orantılıdır. BSA, hidrofilik ve hidrofobik yüzeylerde bu tür seçici olmayan protein-yüzey bağlanmalarını engellemek amacıyla blokasyon ajanı olarak kullanılmaktadır [136]. Yüzey modifikasyonları yapılan MNPs-Au ve Au-NRs'nin yüzeylerini seçici olmayan bağlanmalara karşı bloke etmek için BSA kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar 1 mg ml^{-1} BSA konsantrasyonunun veya %1'lik çözeltisinin yüzeyleri bloke etmede yeterli olduğunu göstermektedir [137]. Geliştirilen SERS aktif immunoassay yöntemimizde sandviç yapıyı oluşturan her iki nanopartikülün yüzeyine blokasyon için bağlanacak BSA miktarının optimize edilmesi amacıyla $0-4 \text{ mg ml}^{-1}$ konsantrasyonları arasında çalışılmıştır.

Şekil 4.37'de Au-NRs yüzeyine blokasyon aşamasında $0-4 \text{ mg ml}^{-1}$ konsantrasyon aralığında gönderilen BSA ve değişen konsantrasyonlara bağlı olarak 600 cm^{-1} dalga sayısında elde edilen SERS sinyal şiddetleri gösterilmiştir. Au-NRs yüzeylerine BSA blokasyon ajanı olarak bağlandıktan sonra ALP enzimatik reaksiyonuna etkisini gözlemek için BCIP substratı ile reaksiyon gerçekleştirilmiş ve elde edilen BCI dimerlerinin SERS ölçümleri alınmıştır.



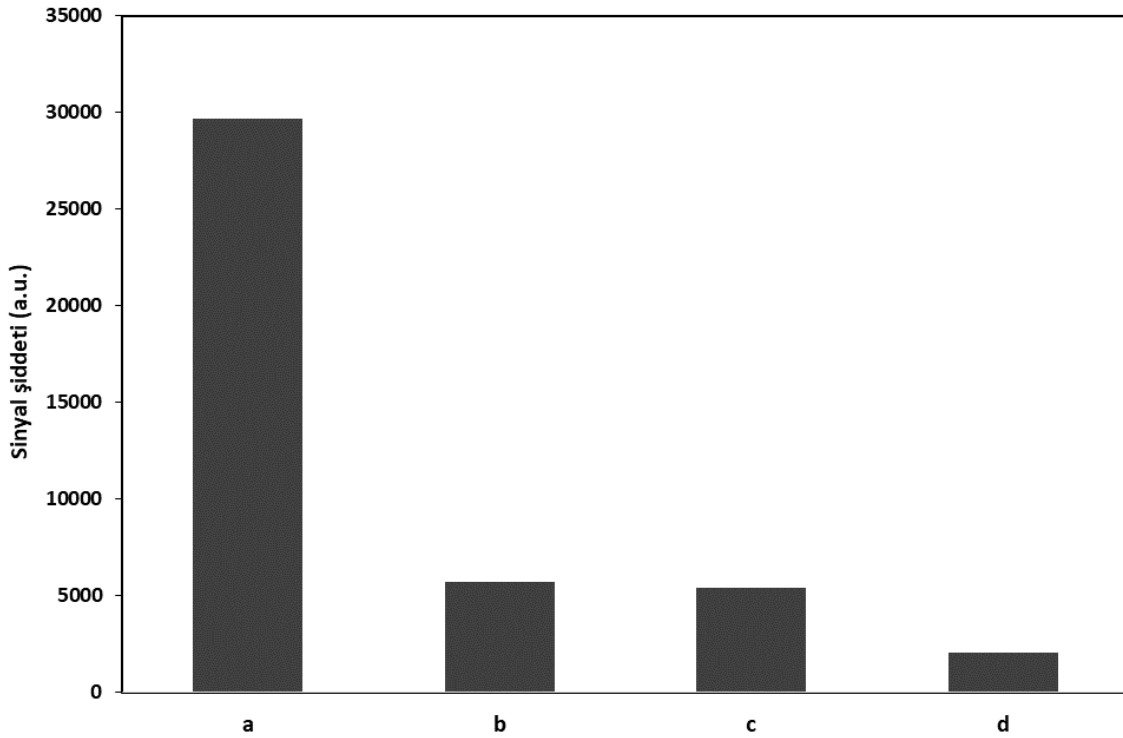
Şekil 4.37 Değişen BSA konsantrasyonlarının ALP aktivitesine etkisi

Au-NRs üzerine ALP ve avidin immobilize edilmiş şekilde alınan SERS ölçümünde enzimatik aktivite sonucu BCI dimerlerinin oluşması sonucu 600 cm^{-1} dalga sayısından alınan SERS sinyal şiddeti değerlerinin yüksek olduğu görülmektedir. BSA blokasyon ajanı olarak Au-NRs yüzeylerine immobilize edildiğinde daha önceden elde edilen SERS sinyal şiddeti değerlerinin yarı yarıya düştüğü görülmektedir. Bu duruma Au-NRs yüzeyinde artan protein konsantrasyonuna bağlı olarak sterik engellemelerin artmasının ve ALP enziminin aktivite gösteren bölgelerinin substrat BCIP ile yeterince reaksiyona girememesine yol açtığı düşünülmektedir. Au-NRs yüzeyine bağlanan BSA konsantrasyonlarından ayrı olarak sandviç yapıyı tamamlamak için kullanılan MNPs-Au nanopartiküllerinin bulunduğu sistemde alınan SERS ölçümlerinde takip edilen BCI'nın 600 cm^{-1} dalga sayısındaki sinyal şiddetlerinin azaldığı görülmektedir. Manyetik çekirdek ve metal kabuk yapısına sahip hibrit nanopartiküllerin SERS sinyallerini artırdığı, dışarıdan uygulanan manyetik alan kuvvetinin ise manyetik çekirdekler vasıtasıyla SERS yüzeylerinde yeniden düzenlenme ve oryantasyonları sağlayarak "hot spot" oluşumlarının artmasına katkıda bulunduğu belirtilmiştir [138-140]. Au-NRs ve MNPs kullanılarak kurulan sandviç sistemden elde edilen SERS sinyallerinin şiddetinin azalması MNPs-Au nanopartiküllerinin eklenmesi sonucu açık bir şekilde görülmektedir ve yukarıda belirtilen çalışmaların aksine bir durum oluşturmaktadır. Bu çelişen durumun karşısında literatürde bir diğer yapılan çalışma ise manyetik çekirdeğe sahip plazmon rezonansı oluşturacak yapıdaki hibrit partiküller kullanılarak hedef moleküle ait SERS spektrumları ve zenginleşmesi takip edilmiştir. Manyetik çekirdek ve kabuk yapıyı oluşturan metallerin mol oranlarının değişmesiyle hedef moleküle ait SERS spektrumunun karakteristik bandlarındaki sinyal şiddetlerinde manyetik çekirdeğin mol oranının artışına paralel bir azalış görülmektedir [141].

Yapılan bu çalışmanın sonucundan yola çıkarak sandviç sistemimizde kullanılan MNPs-Au nanopartiküllerinin manyetik çekirdeğini oluşturan manyetitin (Fe_3O_4) SERS ölçümleri sırasında BCI'nın 600 cm^{-1} dalga sayısında elde edilen sinyal şiddetini azalttığı düşünülmektedir. Plazmon rezonansın, manyetik çekirdeğin refraktif indeksinden, boyutundan, kullanılan soy metalin kabuk yapısındaki kalınlığından etkilenecek elektromanyetik dalga spektrumunda sağa (mavi bölge) veya sola (kırmızı bölge) kaymasını tetiklemesi sonucu partikülün dielektrik özelliklerini değiştirdiği ve değişen yüzey plazmon rezonansının ve dielektrik kuvvetlerinin SERS sinyal şiddetleri

üzerinde önemli değişimlere sebep olduğu belirtilmektedir [142]. Sentezlenen MNPs-Au nanopartiküllerinin manyetik çekirdeği olarak kullanılan manyetitin, yüzey plazmon rezonansını mavi bölgeye kaydırarak altın kabuk ve hedef molekül arasında gerçekleşecek yük transferinin yönünü ve etkisini değiştirerek SERS sinyal şiddetlerinin azalmasına neden olduğu belirtilmektedir [143].

İmmunomanyetik ayırım için kullanılan MNPs-Au nanopartiküllerinden kaynaklı meydana gelen SERS sinyal şiddetindeki azalış nedeniyle sandviç yapıda kullanımının optimize edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla Au-NRs miktarını sabit tutmak koşuluyla değişen konsantrasyonlarda MNPs-Au kullanılan sandviç yapıdan ALP'nin enzimatik reaksiyonu sonucu SERS ölçümleri alınmış ve elde edilen BCI'nın 600 cm^{-1} dalga sayısındaki sinyal şiddetleri karşılaştırılarak Şekil 4.38'de gösterilmiştir.



Şekil) 4.38 KMnPs-Au:Au-NRs oranının BCI'nın 600 cm^{-1} sinyal şiddetine etkisi a) Sadece Au-NRs, b) 1:1 c) 0,2:1 d) 0,1:1

Geliştirilen sandviç yapıda KMnPs-Au nanopartiküllerinin 1:1 oranda kullanılmasıyla daha önceden sadece Au-NRs ile elde edilen sinyal şiddetinin yaklaşık 1/5 oranına kadar düştüğü görülmektedir. Bu düşüş sonrası KMnPs-Au oranının sandviç yapıda düşürülmesi için azalan oranlarda yapıya gönderilmiş ve sinyal şiddetleri takip edilmiştir. KMnPs-Au oranı 1:1 ve 0,2:1 olduğunda elde edilen SERS sinyal

şiddetlerinin aynı seviyede kaldığı görülmektedir. Oran 0,1:1 olarak ayarlandığında manyetik nanopartikül miktarının azalmasından dolayı daha yüksek değerlerde SERS sinyal şiddetinin olması beklenirken daha da düştüğü görülmektedir. Manyetik ayırım sırasında mümkün olan en az miktarda MNPs-Au nanopartikül kullanılması, sandviç yapının oluşturulması sırasında ALP işaretli Au-NRs ile oluşacak istenmeyen etkileşim ve bağlanmaları engelleyecek ve bakterilerin bulundukları ortamdan ayrılmaları sırasında oluşacak spesifik olmayan bağlanmaları ve ayırım süresini düşürecektir. Sandviç yapıyı oluştururken kullanabileceğimiz en iyi KMNPs-Au:Au-NRs oranının 0,2:1 olduğu yapılan çalışmalar sonucu elde edilen Şekil 4.38'deki karşılaştırmadan anlaşılmaktadır.

4.9.3 Sandviç Yöntemin *E. coli* Seçiciliğinin Belirlenmesi ve Kalibrasyon Eğrisinin Elde Edilmesi

ALP enzimatik aktivitesi sonucu oluşan SERS yönünden aktif BCI ürününün 600 cm^{-1} 'de sinyal şiddetinin takip edilmesiyle *E. coli* sayısı belirlenmiştir. Bu maksatla Au-NRs yüzeyine ALP immobilize edilerek, *E. coli* bakterilerinin seçici olarak yakalanması için antikoruyla modifiye edilmiştir. Bu sayede bulunduğu ortamdan ilk önce, manyetik olarak MNPs-Au nanopartikülleri yüzeyindeki antikorlar vasıtasıyla seçici olarak ayrıştırılırlar ve yıkama tampomları PBS ve PBST kullanılarak seçici olarak bağlanmayan bakterilerin uzaklaştırılması sağlanır. İkinci aşamada ALP işaretli olarak hazırlanmış Au-NRs, yakalanan bakterilerin üzerine gönderilerek yüzeylerindeki antikorlar sayesinde seçici olarak *E. coli* üzerine bağlanmaları sağlanmıştır. Seçici olmayan Au-NRs bağlanmalarını uzaklaştırmak için yıkama tamponları PBS ve PBST kullanılarak üç defa yıkama yapılmıştır. Sandviç yapı tamamlandıktan sonra Au-NRs yüzeyinde tutuklanmış ALP enziminin aktivitesinden yararlanılarak BCIP substratı reaksiyona girerek SERS aktif BCI dimeri ürününe dönüşmüştür. SERS ölçümü alınarak BCI dimerinin 600 cm^{-1} dalga sayısındaki sinyal şiddeti takip edilmiştir. Bu işlemler sırasıyla $1,7 \times 10^1$ - $1,7 \times 10^6$ kob ml^{-1} aralığında sayıdaki *E. coli* bakterilerine uygulanarak BCI'nın 600 cm^{-1} dalga sayısında değişen SERS sinyal şiddeti ile ilişkilendirilerek kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir.

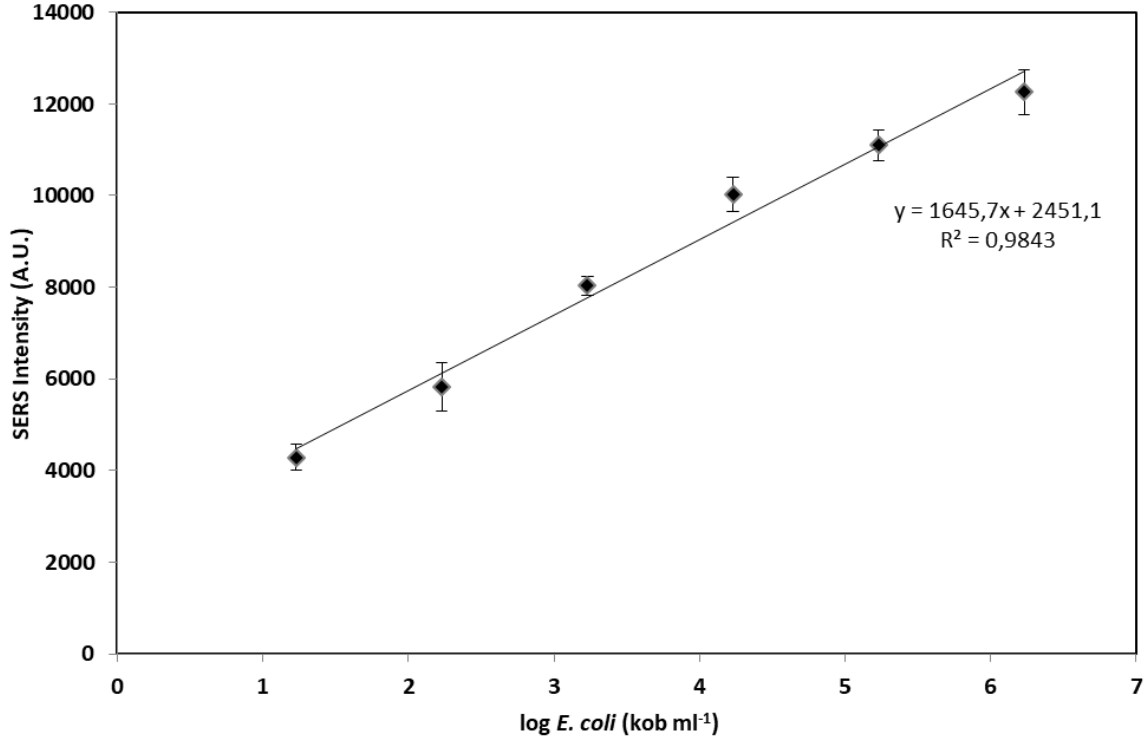
Geliştirilen sandviç yöntemde kullanılan *E. coli* antikorunun seçiciliğini kontrol etmek için sırasıyla Salmonella, *E.aerogenes* ve *E. coli* bakterileri ayrı ayrı test edilmişlerdir. Yüzeye yayma metodu kullanılarak MNPs-Au ile etkileştirilen bakterilerin manyetik

ayırım sonrası kalan üst faztan alınan örnekler LB agar besiyerlerine aktarılmış ve 37 °C’de 18 saat inkübatörde bekletilerek koloni sayımları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.11’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11 Farklı bakterilere karşı kullanılan *E. coli* antikorunun seçiciliği

	Uygulanan bakteri (kob ml ⁻¹)	Sayılan bakteri (kob ml ⁻¹)	% Bağlanma	% Standart Sapma
Salmonella	5,7x10 ³	5,3x10 ³	1,91	4,07
<i>E. aerogenes</i>	6,5x10 ³	7,2x10 ³	-15,01	5,13
<i>E. coli</i>	1,9x10 ³	3,72x10 ²	80,02	1,20

Kullanılan *E. coli* antikorunun poliklonal olması sebebiyle aynı bakterinin değişik bölgelerindeki farklı epitoplarına bağlanabilmesini sağlamaktadır. Bu durum bağlanma kapasitesini artırırken farklı türlerdeki bakterilere ait seçiciliği monoklonal antikorlara kıyasla düşürmektedir. Kullandığımız *E. coli* antikorunun K ve O serotiplerine bağlanma gösterebilecek özellikte olması sebebiyle model bakteri olarak *E. coli* K12 suşu kullanılmış ve antikorun bağlanma verimi % 80,02 bulunmuştur. Diğer bakteriler *Salmonella* ve *E. aerogenes* için antikorun bağlanma verimi ise % 2’nin altında bulunmuştur. Kullanılan antikorun seçiciliğinin ve bağlanma veriminin yüksek olduğu belirlendikten sonra değişen sayılardaki *E. coli* bakterisinin geliştirilen ALP enzmi aktivitesine dayanan sandviç yönteminde belirlenmiştir. Bu maksatla 1,7x10¹-1,7x10⁶ kob ml⁻¹ aralığında değişen *E. coli* sayılarına karşılık ALP’nin enzimatik aktivitesi sonucu oluşan BCI ürününün 600 cm⁻¹ dalga sayısında SERS sinyal şiddetleri ve kalibrasyon eğrileri elde edilerek Şekil 4.39’da gösterilmiştir.



Şekil 4.39 ALP enzimatik aktivitesine bağlı olarak elde edilen *E. coli* kalibrasyon eğrisi

SERS ölçümleri sonucu, *E. coli* sayılarına karşılık elde edilen sinyal şiddetlerinden R^2 değeri 0,9843 olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemin hassasiyetinin belirlenebilmesi için LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış ve sırasıyla 10 kob ml⁻¹ ve 30 kob ml⁻¹ olarak bulunmuştur. SERS tabanlı, ALP enziminin aktivitesine bağlı olarak oluşan BCI dimerinin sinyal şiddetini *E. coli* sayısı ile korelasyon oluşturarak tespit edilmesini sağlayan hassas, seçici ve güvenilir bir sandviç yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem kullanılarak 3 saatten az bir sürede bütün aşamalar gerçekleştirilip, *E. coli* sayısının 10¹-10⁶ kob ml⁻¹ aralıkta enzimatik reaksiyon sonucunda belirlenebildiği görülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan tez kapsamında metalik nanoyapılar, plazmonik özelliklerinden yararlanılarak SERS temelli biyoanalizlerde kullanılmıştır. Kollodial halde üç farklı özellikte nanopartikül sentezlenmiştir.

AgNPs; gümüş metal tuzunun indirgeyici ajan kullanılarak çöktürülmesi sonucu sentezlenmiştir. TEM ve UV-Vis spektrofotometrede yapılan ölçümler sonucu yaklaşık 40 nm’de küresel şekilli olarak karakterize edilmiştir.

Au-NRs; HAuCl₄ tuzunun farklı tohum ve büyütme çözeltilerinde indirgenmesi yoluyla sentezlenmiştir. TEM ve Uv-vis spektrofotometresinde yapılan ölçümler sonucu 50 nm boyunda ve 10 nm eninde çubuk şekilli, anizotropik yapılı bir nanopartikül olarak karakterize edilmiştir.

MNPs-Au; manyetik çekirdeği manyetit ve kabuk yapısı HAuCl₄ tuzunun indirgenmesi sonucu manyetik çekirdek etrafına altının kaplanması sonucu oluşan çekirdek@kabuk yapılı hibrit bir nanopartiküldür. TEM ve Uv-Vis spektrofotometresinde yapılan ölçümler sonucunda 20 nm çapa sahip küresel şekilli olarak karakterize edilmiştir.

SERS ölçümleri sırasında kullanılmak üzere sentezlenen gümüş nanopartiküller ayrıca yüzeylerde iki farklı yöntemle biriktirilerek SERS özellikli substratlar oluşturulmuştur. Yüzey olarak ticari olarak satın alınmış 50 nm altın kaplı cam slaytlar kullanılmıştır. Altın yüzeyler üzerine ilk yöntem olarak, sentezlenen AgNPs nanopartikülleri konsantre edilerek sentez halinden 10 veya 20 kat daha derişik olacak şekilde pipet yardımıyla 1 µl olacak şekilde aktararak AgNPs spotlar oluşturulmuş ve oda koşullarında kurutulduktan sonra SERS ölçümleri için kullanılmıştır. İkinci yöntem olarak ise, altın yüzeyler üzerine 1,4-DTT kullanılarak SAM yapılmıştır. İki ucunda tiyol grubu olan bu kısa zincirli molekülün bir ucu altın yüzey ile Au-S bağı oluşturarak SAM yapısını oluşturmuştur. Sentezlenen AgNPs nanopartikülleri SAM yapılan altın yüzey üzerine KNO₃ tuzu ile hazırlanan çözelti içinde çöktürülmüştür. Açıkta kalan tiyol gruplarına AgNPs’nin bağlanması ve Ag-S bağları kurularak altın yüzey üzerinde biriktirilmesi sağlanarak Au-AgNPs yüzeyler elde edilmiştir.

Elde edilen bu nanoyüzeyler ve sentezlenen nanopartiküller, gıda analizlerinde önemli olan moleküllerin tayin ve tespiti için SERS temelli platformlar olarak kullanılarak

yöntemler geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemlerde ve hedeflenen molekül tayini için kullanılan her bir nanopartikül ve nanoyüzeye ait EF faktörleri hesaplanmıştır.

Gıda analizleri için sırasıyla askorbik asit, kafein, yapay tatlandırıcılar ve aspartam, ALP enzimi ve enzimatik aktivitesi üzerinden *E. coli* tayinleri SERS temelli platformlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Askorbik asit (vitamin C), vücut tarafından depolanmayan ve çoğu meyve ve sebzede bulunan güçlü bir antioksidan kapasiteye sahip vitamindir. Günlük olarak yaklaşık olarak vücut ağırlığına bağlı olarak en az 50 mg kg⁻¹ gıdalardan alınması vücut sağlığının korunması açısından elzemdir. Gıda analizlerinde farklı yöntemler kullanılarak sıklıkla tespitine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Tez kapsamında askorbik asitin hızlı, güvenilir ve hassas bir şekilde miktarının belirlenebilmesi amacıyla SERS temelli yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Gümüş nanopartiküllerin sentezlenmesi sırasında indirgeyici ajan olarak askorbik asit kullanılarak AgNPs nanopartiküllerinin elde edilmesi sağlanmıştır. Bu şekilde değişen konsantrasyonlarda indirgeyici olarak kullanılan askorbik asit miktarına bağlı olarak oluşan AgNPs nanopartiküllerinin SERS uygulamalarında değişen plazmonik etkilerini takip edebilmek için RS yönünden aktif işaretçi ve boyalar kullanılmıştır. Bu sayede farklı RS işaretçi moleküllerine ait parmak izi spektrumlar elde edilerek EF değerleri hesaplanmıştır. RS işaretçilerinin askorbik asit varlığında indirgenmesi sonucu oluşan AgNPs nanopartikülleri tarafından karakteristik bandlarının zenginleşmesiyle hesaplanan EF değerlerinin 10⁸-10⁹ aralığında olduğu görülmüştür. Yapılan optimizasyon ölçümleri sonucu RS işaretçisi olarak bromkresol yeşili seçilmiştir. Askorbik asit konsantrasyonuna bağlı olarak kullanılan işaretçiye ait karakteristik bandlarda SERS sinyal şiddetinin değişimi üzerinden kalibrasyon eğrisi çıkarılmıştır. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1,37 µg ml⁻¹ ve 4,56 µg ml⁻¹ olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemle askorbik asitin insan kan serumunda kritik seviye olan 11,4 µmol l⁻¹ ve üzeri değerleri, çoğu gıda maddesinde yer alan 50 mg 100 g⁻¹ seviyelerinde tespit edilebilmesini sağlayacağı görülmüştür. Ayrıca geliştirilen yöntem SERS temelli uygulamaların sağladığı; ön işlem basamaklarının azlığı, düşük maliyetli, hızlı, hassas ve sahada kolaylıkla uygulanabilirliği sayesinde diğer analiz yöntemlerine göre daha avantajlıdır.

Kafein analizi için geliştirilen üç farklı AgNPs, Au-NRs ve Au-AgNPs yüzeyleri kullanılarak SERS sinyal şiddetleri ve EF değerleri karşılaştırılmıştır. Kafein molekülü

için kullanılan platformlar AgNPs, Au-NRs, Au-AgNPs 'den hesaplanan EF değerleri sırasıyla $1,04 \times 10^9$, $1,55 \times 10^9$ ve $6,7 \times 10^9$ olarak bulunmuştur. Kafein molekülünün farklı konsantrasyonlarda belirlenebilmesi ve kalibrasyon eğrisinin çıkarılabilmesi için EF değeri en yüksek olan Au-AgNPs yüzeyler kullanılmıştır. Yüzey kullanılarak alınan ölçümlerde farklı optik açıklığa sahip 20X ve 50X mercekleri kullanılarak elde edilen SERS sinyal şiddetlerinin konsantrasyonlara bağlı değişimi üzerinden çıkarılan kalibrasyon eğrileri karşılaştırıldığında R^2 değerler sırasıyla 0,9501 ve 0,9193 olarak bulunmuştur. NA değerlerinin değişiminin SERS ölçümlerine etkisi gösterilmiştir. Ölçüm aralıkları, LOD ve LOQ değerleri; 20X mercek için sırasıyla 0,1904 ve 0,6346 mg ml⁻¹ ve 50X mercek için sırasıyla 0,0678 ve 0,2260 mg ml⁻¹ olarak bulunmuştur. Kahve, çay, gazlı içecek ve enerji içeceklerinde kafeinin bulunma aralığı olan 0,1-1 mg ml⁻¹ konsantrasyonlara göre geliştirilen yöntemin hassasiyetinin ölçümler için yeterli olduğu görülmektedir.

Yapay tatlandırıcıların tayinine yönelik geliştirilen SERS platformları ile ölçümler alınmıştır. Au-NRs ve Au-AgNPs yüzeylerde alınan SERS ölçümlerinde kullanılan platformlarından elde edilen bandlarının yapay tatlandırıcıların karakteristik bandlarına girişimde bulundukları görülmüştür. Yapılan ölçümler sonucunda AgNPs nanopartikülleri ile alınan SERS ölçümlerinde yapay tatlandırıcıların spektrumlarına girişimin olmadığı görülmüştür. Asesulfam K ve siklamat yapay tatlandırıcının elde edilen spektrumlarından karakteristik bandları ayırt edilememiştir. Her bir tatlandırıcı için hesaplanan EF değerleri 10^6 - 10^7 aralığında bulunmuştur. Aspartam yapay tatlandırıcılar arasında yaygın olarak kullanılması nedeniyle 0,1-1 mg ml⁻¹ konsantrasyonları arasında SERS ölçümleri alınarak kalibrasyon eğrileri çıkarılmıştır. Gerçek örneklerde aspartamın analizi için sade ve meyve aromalı maden sularında aspartamın tayini için optimizasyon çalışmaları yapılmış ve kalibrasyon eğrileri çıkarılmıştır. Model örnekte, sade maden suyu ve meyve aromalı maden suyunda hesaplanan R^2 değerleri sırasıyla; 0,969, 0,977, 0,977 olarak bulunmuştur. LOD değerleri ise sırasıyla; 0,17, 0,13, 0,14 mg ml⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Aspartam tayinine yönelik geliştirilen SERS temelli yöntem ile birlikte içeceklerde kullanılan aspartam 2 dakika içerisinde hızlı, güvenilir ve yasal sınırı 0,6 mg ml⁻¹ olan miktarın alt ve üst noktalarında kolaylıkla tespit edilebildiği görülmüştür.

ALP enzimi fizyolojik olarak metabolik olayların gerçekleştirilmesinde işlevsel olarak bulunmaktadır. Kandaki seviyesi arttığında; dokularda, karaciğerde ve kemiklerde

meydana gelen hasarların ve hastalıkların teşhisi için klinik çalışmalarda işaretçi olarak kabul edilmektedir. ALP aktivitesinin belirlenmesi amacıyla geliştirilen üç farklı SERS temelli platform kullanılmış ve enzimatik reaksiyon sonucu oluşan BCI dimerlerinin 600 cm^{-1} dalga sayısındaki karakteristik bandları takip edilerek ALP konsantrasyonlarına ait kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. AgNPs, Au-NRs ve Au-AgNPs yüzeyler için R^2 değerleri sırasıyla; 0,927, 0,988 ve 0,978 olarak bulunmuştur. Geliştirilen SERS temelli platformların BCI dimerlerinden elde edilen sinyal şiddetleri üzerinden hesaplanan EF değerleri sırasıyla $2,19 \times 10^9$, $5,00 \times 10^9$ ve $7,74 \times 10^9$ olarak bulunmuştur. ALP enzimatik reaksiyonunda doğrusal aralığı 10^{-11} - 10^{-15} M konsantrasyonları arası Au-NRs kullanılarak ölçülebilmıştır ve R^2 değeri diğer platformlara göre daha yüksek bulunmuştur.

Au-NRs nanopartikülleri kullanılarak SERS temelli enzimatik reaksiyon üzerinden bakterilerin tayinine yönelik bir yöntem geliştirilmiştir. Au-NRs nanopartikülleri; yüzeyinde kovalent olarak ALP tutuklanabilmesi, bakteri antikorlarının bağlanabilmesi ve ALP aktivitesi sonucu oluşan BCI dimerlerinin SERS sinyal şiddetlerini zenginleştirerek çok düşük konsantrasyonlardaki ALP'nin tayin edilmesini sağlaması sonucu sandviç immunoassay geliştirilmiştir. *E. coli* bakterisi manyetik nanopartiküller kullanılarak bulundukları ortamdan izole edilmişler ve ALP enzimi ile işaretlenmiş olan yüzeyinde antikorlar ile modifiye edilmiş Au-NRs kullanılarak birbirlerine bağlanmaları sağlanmıştır. Değişen *E. coli* sayısına bağlı olarak sandviç sistemde bağlanan Au-NRs miktarı değişmektedir. Bu durumda ALP miktarına göre elde edilen enzim aktivitesi sonucu oluşan BCI dimerlerinin SERS sinyalleri değiştiği için *E. coli* sayısı ile SERS sinyal şiddeti değişimleri arasında korelasyon kurulmuştur. ALP aktivitesi sonucu 10^1 - 10^6 kob ml^{-1} *E. coli* sayısı aralığında kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. R^2 değeri 0,9843 olarak, LOD ve LOQ değerleri ise sırasıyla; 10 ve 30 kob ml^{-1} bulunmuştur.

SERS ölçümleriyle ALP aktivitesi, üç farklı platform ile doğrudan düşük konsantrasyonlardaki ALP için belirlenebilmiştir. Ayrıca ALP işaretçi enzim olarak kullanılarak *E. coli* bakteri sayısı ölçülebilmıştır.

Geliştirilen SERS temelli platformların kullanıldıkları analitin içinde bulunduğu ortam ve matrikse göre EF değerleri ve analit için sinyal şiddetleri değiştiği görülmüştür. Tampon çözeltisinin pH'sı, hedef molekülün yük ve iyon dengesi ve kullanılan nanoyapı ile etkileşimi, etkileşim veya ölçüm sürelerinin değişimi, kullanılan nanopartiküllerin hacim

içerisinde kolloidal veya yüzey üzerinde film şeklinde olması, nanopartiküllerin derişimi, SERS ölçümü alınan merceklerin büyütme ve NA değerlerinin farklılığı gibi parametrelerin SERS sinyal şiddetini ve bunun sonucunda bulunan kantitatif değerleri ve EF değerlerini etkilediğı çalışmlar sırasında görölmüştür.



KAYNAKLAR

- [1] Sebastian, S., SERS Microscopy: Nanoparticle Probes and Biomedical Applications, *ChemPhysChem*, 10, 1344-1354, **2009**.
- [2] Moskovits, M., Surface-enhanced spectroscopy, *Reviews of Modern Physics*, 57, 783-826, **1985**.
- [3] Persson, B. N. J., On the theory of surface-enhanced Raman scattering, *Chemical Physics Letters*, 82, 561-565, **1981**.
- [4] Kahraman, M.; Mullen, E. R.; Korkmaz, A.; Wachsmann-Hogiu, S., Fundamentals and applications of SERS-based bioanalytical sensing, *Nanophotonics*, 6, 831-852, **2017**.
- [5] Israelsen, N. D.; Hanson, C.; Vargis, E., Nanoparticle Properties and Synthesis Effects on Surface-Enhanced Raman Scattering Enhancement Factor: An Introduction, *The Scientific World Journal*, 2015, 124582, **2015**.
- [6] Smith, W. E., Practical understanding and use of surface enhanced Raman scattering/surface enhanced resonance Raman scattering in chemical and biological analysis, *Chemical Society Reviews*, 37, 955-964, **2008**.
- [7] Nie, S.; Emory, S. R., Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering, *Science*, 275, 1102, **1997**.
- [8] Wang, Z.; Zong, S.; Wu, L.; Zhu, D.; Cui, Y., SERS-Activated Platforms for Immunoassay: Probes, Encoding Methods, and Applications, *Chemical Reviews*, 117, 7910-7963, **2017**.
- [9] Cialla-May, D.; Zheng, X. S.; Weber, K.; Popp, J., Recent progress in surface-enhanced Raman spectroscopy for biological and biomedical applications: from cells to clinics, *Chemical Society Reviews*, 46, 3945-3961, **2017**.
- [10] Theory of Molecular Vibrations. The Origin of Infrared and Raman Spectra. *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*, (eds,
- [11] Raman, C. V.; Krishnan, K. S., A New Type of Secondary Radiation, *Nature*, 121, 501, **1928**.
- [12] Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 21, 3072-3076, **1998**.
- [13] Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R., *Principles of instrumental analysis*. Brooks/Cole : Thomson Learning: Australia; **2007**.
- [14] Temiz, H. T. *Yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi kullanılarak ağır metal tayinine yönelik yeni sistemlerin geliştirilmesi*. Hacettepe University, Ankara, **2013**.
- [15] Yıldız A., G. Ö., Bektaş S., *Enstrümental Analiz Yöntemleri 2*. Baskı ed.; Hacettepe Üniversitesi Yayınları: Ankara; **1997**.
- [16] Long, D. A., *Raman spectroscopy*. McGraw-Hill: New York; **1976**.
- [17] H.H. Willard, L. L. M. J., J.J. Dean, F.A. Settle Jr., *Instrumental methods of analysis*. 7th. edition ed.; CBS Publisher & Distributors: New Delhi; **1988**.

- [18] Huh, Y. S.; Chung, A. J.; Erickson, D., Surface enhanced Raman spectroscopy and its application to molecular and cellular analysis, *Microfluidics and Nanofluidics*, 6, 285, **2009**.
- [19] Kneipp, K.; Wang, Y.; Kneipp, H.; Perelman, L. T.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S., Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS), *Physical Review Letters*, 78, 1667-1670, **1997**.
- [20] Kneipp, K.; Kneipp, H.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S., Ultrasensitive Chemical Analysis by Raman Spectroscopy, *Chemical Reviews*, 99, 2957-2976, **1999**.
- [21] McNay, G.; Eustace, D.; Smith, W. E.; Faulds, K.; Graham, D., Surface-enhanced Raman scattering (SERS) and surface-enhanced resonance Raman scattering (SERRS): a review of applications, *Applied Spectroscopy*, 65, 825-37, **2011**.
- [22] Zou, X.; Dong, S., Surface-Enhanced Raman Scattering Studies on Aggregated Silver Nanoplates in Aqueous Solution, *The Journal of Physical Chemistry B*, 110, 21545-21550, **2006**.
- [23] P., K.; Ok-Keun, S.; A., C., Probing Photoinduced Charge Transfer at Atomically Smooth Metal Surfaces Using Surface Enhanced Raman Scattering, *physica status solidi (a)*, 175, 233-239, **1999**.
- [24] Jinkai, Z.; Lili, H., Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for the Chemical Analysis of Food, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 317-328, **2014**.
- [25] James, A. T.; Martin, A. J., Gas-liquid partition chromatography; the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid, *Biochem J*, 50, 679-90, **1952**.
- [26] Horvath, C. G.; Preiss, B. A.; Lipsky, S. R., Fast liquid chromatography. Investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers, *Analytical Chemistry*, 39, 1422-1428, **1967**.
- [27] Cordella, C.; Moussa, I.; Martel, A.-C.; Sbirrazzuoli, N.; Lizzani-Cuvelier, L., Recent Developments in Food Characterization and Adulteration Detection: Technique-Oriented Perspectives, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1751-1764, **2002**.
- [28] Asensio-Ramos, M.; Hernandez-Borges, J.; Rocco, A.; Fanali, S., Food analysis: a continuous challenge for miniaturized separation techniques, *J Sep Sci*, 32, 3764-800, **2009**.
- [29] Schieberle, P.; Molyneux, R. J., Quantitation of Sensory-Active and Bioactive Constituents of Food: A Journal of Agricultural and Food Chemistry Perspective, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 2404-2408, **2012**.
- [30] Doering, W. E.; Piotti, M. E.; Natan, M. J.; Freeman, R. G., SERS as a Foundation for Nanoscale, Optically Detected Biological Labels, *Advanced Materials*, 19, 3100-3108, **2007**.
- [31] Thygesen, L. G.; Løkke, M. M.; Micklander, E.; Engelsen, S. B., Vibrational microspectroscopy of food. Raman vs. FT-IR, *Trends in Food Science & Technology*, 14, 50-57, **2003**.

- [32] Li-Chan, E.; Chalmers, J. M.; Griffiths, P. R., *Applications of vibrational spectroscopy to food science*. Wiley ; John Wiley [distributor]: Hoboken, N.J.; Chichester; **2010**.
- [33] Haynes, C. L.; McFarland, A. D.; Duyne, R. P. V., Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Analytical Chemistry*, 77, 338 A-346 A, **2005**.
- [34] Craig, A. P.; Franca, A. S.; Irudayaraj, J., Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Applied to Food Safety, *Annual Review of Food Science and Technology*, 4, 369-380, **2013**.
- [35] Hu, H.; Wang, Z.; Pan, L.; Zhao, S.; Zhu, S., Ag-Coated Fe₃O₄@SiO₂ Three-Ply Composite Microspheres: Synthesis, Characterization, and Application in Detecting Melamine with Their Surface-Enhanced Raman Scattering, *The Journal of Physical Chemistry C*, 114, 7738-7742, **2010**.
- [36] Li, J. F.; Huang, Y. F.; Ding, Y.; Yang, Z. L.; Li, S. B.; Zhou, X. S.; Fan, F. R.; Zhang, W.; Zhou, Z. Y.; Wu, D. Y.; Ren, B.; Wang, Z. L.; Tian, Z. Q., Shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy, *Nature*, 464, 392, **2010**.
- [37] Fang, Y.; Seong, N.-H.; Dlott, D. D., Measurement of the Distribution of Site Enhancements in Surface-Enhanced Raman Scattering, *Science*, 321, 388, **2008**.
- [38] Sharma, B.; Frontiera, R. R.; Henry, A.-I.; Ringe, E.; Van Duyne, R. P., SERS: Materials, applications, and the future, *Materials Today*, 15, 16-25, **2012**.
- [39] Yılmaz, M. *Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS) için Nano-yaklaşım Temelli Platformların Geliştirilmesi ve Tanı Amaçlı Uygulanması*. Hacette Üniversitesi, Ankara, **2014**.
- [40] Hao, E.; Schatz, G.; Hupp, J., Synthesis and Optical Properties of Anisotropic Metal Nanoparticles, *Journal of Fluorescence*, 14, 331-341, **2004**.
- [41] Katrin, K.; Harald, K.; Irving, I.; Ramachandra, R. D.; Michael, S. F., Surface-enhanced Raman scattering and biophysics, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 14, R597, **2002**.
- [42] Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G., Chapter 7 - Metallic colloids and other SERS substrates. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*, (eds: Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G., Elsevier: Amsterdam, 367-413, **2009**.
- [43] Freeman, R. G.; Grabar, K. C.; Allison, K. J.; Bright, R. M.; Davis, J. A.; Guthrie, A. P.; Hommer, M. B.; Jackson, M. A.; Smith, P. C.; Walter, D. G.; Natan, M. J., Self-Assembled Metal Colloid Monolayers: An Approach to SERS Substrates, *Science*, 267, 1629, **1995**.
- [44] Qiuming, Y.; Scott, B.; Brian, C.; Jiajie, X.; Paul, M. W.; Heng, G.; Dmitry, K., Surface-enhanced Raman scattering on gold quasi-3D nanostructure and 2D nanohole arrays, *Nanotechnology*, 21, 355301, **2010**.
- [45] Im, H.; Bantz, K. C.; Lindquist, N. C.; Haynes, C. L.; Oh, S.-H., Vertically Oriented Sub-10-nm Plasmonic Nanogap Arrays, *Nano Letters*, 10, 2231-2236, **2010**.
- [46] Ye, J.; Wen, F.; Sobhani, H.; Lassiter, J. B.; Van Dorpe, P.; Nordlander, P.; Halas, N. J., Plasmonic Nanoclusters: Near Field Properties of the Fano Resonance Interrogated with SERS, *Nano Letters*, 12, 1660-1667, **2012**.

- [47] Moskovits, M., Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective, *Journal of Raman Spectroscopy*, 36, 485-496, **2005**.
- [48] Leopold, N.; Lendl, B., A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride, *The Journal of Physical Chemistry B*, 107, 5723-5727, **2003**.
- [49] Temur, E.; Boyaci, I. H.; Tamer, U.; Unsal, H.; Aydogan, N., A highly sensitive detection platform based on surface-enhanced Raman scattering for Escherichia coli enumeration, *Anal Bioanal Chem*, 397, 1595-604, **2010**.
- [50] Tamer, U.; Gündoğdu, Y.; Boyacı, İ. H.; Pekmez, K., Synthesis of magnetic core-shell Fe₃O₄-Au nanoparticle for biomolecule immobilization and detection, *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 1187-1196, **2010**.
- [51] National Center for Biotechnology Information. In PubChem Compound Database.
- [52] Pakiari, A. H.; Jamshidi, Z., Nature and Strength of M-S Bonds (M = Au, Ag, and Cu) in Binary Alloy Gold Clusters, *The Journal of Physical Chemistry A*, 114, 9212-9221, **2010**.
- [53] Long, G. L.; Winefordner, J. D., Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition, *Analytical Chemistry*, 55, 712A-724A, **1983**.
- [54] Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C., The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment, *The Journal of Physical Chemistry B*, 107, 668-677, **2003**.
- [55] Porter, M. D.; Lipert, R. J.; Siperko, L. M.; Wang, G.; Narayanan, R., SERS as a bioassay platform: fundamentals, design, and applications, *Chemical Society Reviews*, 37, 1001-1011, **2008**.
- [56] Bensebaa, F.; Zhou, Y.; Brolo, A. G.; Irish, D. E.; Deslandes, Y.; Kruus, E.; Ellis, T. H., Raman characterization of metal-alkanethiolates, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 55, 1229-1236, **1999**.
- [57] X., Z. P.; V., M. I.; J., S. P.; J., L. D., Details of the damage profile in self-ion-implanted silicon, *Journal of Raman Spectroscopy*, 25, 515-520, **1994**.
- [58] Berg, R. W., Investigation of L(+)-Ascorbic acid with Raman spectroscopy in visible and UV light, *Applied Spectroscopy Reviews*, 50, 193-239, **2015**.
- [59] Shimada, H.; Nibu, Y.; Shimada, R., Pressure effects on inter- and intramolecular vibrations in hydrogen-bonded L-ascorbic acid crystal, *Journal of Raman Spectroscopy*, 39, 32-39, **2008**.
- [60] Merlen, A.; Lagugné-Labarthe, F.; Harté, E., Surface-Enhanced Raman and Fluorescence Spectroscopy of Dye Molecules Deposited on Nanostructured Gold Surfaces, *The Journal of Physical Chemistry C*, 114, 12878-12884, **2010**.
- [61] Le Ru, E. C.; Blackie, E.; Meyer, M.; Etchegoin, P. G., Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study, *The Journal of Physical Chemistry C*, 111, 13794-13803, **2007**.
- [62] National Center for Biotechnology Information. In PubChem Compound Database: 2018.

- [63] Christensen, P. A., Stability of plasma albumin depends on measurement method, *Clin Chem Lab Med*, 54, e327-e329, **2016**.
- [64] Songjaroen, T.; Dungchai, W.; Chailapakul, O.; Henry, C. S.; Laiwattanapaisal, W., Blood separation on microfluidic paper-based analytical devices, *Lab Chip*, 12, 3392-8, **2012**.
- [65] Vinay, K. B.; Revannasiddappa, H. D.; Rajendraprasad, N.; Ramesh, P. J.; Xavier, C. M.; Basavaiah, K., Use of two sulfonphthalein dyes in the extraction-free spectrophotometric assay of tramadol in dosage forms and in spiked human urine based on ion-pair reaction, *Drug Test Anal*, 4, 116-22, **2012**.
- [66] Lo, S. F.; Miller, W. G.; Doumas, B. T., Laboratory performance in albumin and total protein measurement using a commutable specimen: results of a College of American Pathologists study, *Arch Pathol Lab Med*, 137, 912-20, **2013**.
- [67] Valentine, C. D.; Verkman, A. S.; Haggie, P. M., Protein trafficking rates assessed by quantum dot quenching with bromocresol green, *Traffic*, 13, 25-9, **2012**.
- [68] Lin, G.; Lu, W.; Cui, W.; Jiang, L., A Simple Synthesis Method for Gold Nano- and Microplate Fabrication Using a Tree-Type Multiple-Amine Head Surfactant, *Crystal Growth & Design*, 10, 1118-1123, **2010**.
- [69] El-Zahry, M. R.; Refaat, I. H.; Mohamed, H. A.; Lendl, B., Sequential SERS determination of aspirin and vitamin C using in situ laser-induced photochemical silver substrate synthesis in a moving flow cell, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408, 4733-4741, **2016**.
- [70] Cholula-Díaz, J. L.; Lomelí-Marroquín, D.; Pramanick, B.; Nieto-Argüello, A.; Cantú-Castillo, L. A.; Hwang, H., Synthesis of colloidal silver nanoparticle clusters and their application in ascorbic acid detection by SERS, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 163, 329-335, **2018**.
- [71] dongming, L.; Shuhai, J.; Jun, W.; Yang, J., Ordered silver nanoparticle arrays as surface-enhanced Raman spectroscopy substrates for label-free detection of vitamin C in serum, *Sensors and Actuators A: Physical*, 201, 416-420, **2013**.
- [72] Landen, J., W; Ye, L.; Eitenmiller, R., *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences*. Second Edition ed.; CRC Press: Boca Raton; **2007**.
- [73] Gibson, R. S., Assessment of Vitamin C status. *Principles of Nutritional Assessment*, 2nd Edition (eds: Oxford University Press: New York, **2005**.
- [74] Armenta, S.; Garrigues, S.; de la Guardia, M., Solid-phase FT-Raman determination of caffeine in energy drinks, *Analytica Chimica Acta*, 547, 197-203, **2005**.
- [75] Ashihara, H.; Crozier, A., Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science, *Trends in Plant Science*, 6, 407-413, **2001**.
- [76] Kang, J.; Gu, H.; Zhong, L.; Hu, Y.; Liu, F., The pH dependent Raman spectroscopic study of caffeine, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78, 757-762, **2011**.
- [77] Kumazawa, T.; Seno, H.; Lee, X.-P.; Ishii, A.; Watanabe-Suzuki, K.; Sato, K.; Suzuki, O., Extraction of methylxanthines from human body fluids by solid-phase microextraction, *Analytica Chimica Acta*, 387, 53-60, **1999**.

- [78] Pavel, I.; Szeghalmi, A.; Moigno, D.; Cîntă, S.; Kiefer, W., Theoretical and pH dependent surface enhanced Raman spectroscopy study on caffeine, *Biopolymers - Biospectroscopy Section*, 72, 25-37, **2003**.
- [79] McNay, G.; Eustace, D.; Smith, W. E.; Faulds, K.; Graham, D., Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS): A Review of Applications, *Applied Spectroscopy*, 65, 825-837, **2011**.
- [80] Sriram, S.; Bhaskaran, M.; Chen, S.; Jayawardhana, S.; Stoddart, P. R.; Liu, J. Z.; Medhekar, N. V.; Kalantar-Zadeh, K.; Mitchell, A., Influence of Electric Field on SERS: Frequency Effects, Intensity Changes, and Susceptible Bonds, *Journal of the American Chemical Society*, 134, 4646-4653, **2012**.
- [81] Jayawardhana, S.; Rosa, L.; Juodkazis, S.; Stoddart, P. R., Additional Enhancement of Electric Field in Surface-Enhanced Raman Scattering due to Fresnel Mechanism, *Scientific Reports*, 3, 2335, **2013**.
- [82] R., B.; P.R., S.; S., J., Laser fabricated ripple substrates for surface-enhanced Raman scattering, *Annalen der Physik*, 524, L5-L10, **2012**.
- [83] Jayawardhana, S.; Rosa, L.; Buividas, R.; Stoddart, P. R.; Juodkazis, S., Light enhancement in surface-enhanced Raman scattering at oblique incidence, *Photonic Sensors*, 2, 283-288, **2012**.
- [84] Guthrie, J. F.; Morton, J. F., Food sources of added sweeteners in the diets of Americans, *J Am Diet Assoc*, 100, 43-51, quiz 49-50, **2000**.
- [85] Ludwig, D. S., The glycemic index: physiological mechanisms relating to obesity, diabetes, and cardiovascular disease, *Jama*, 287, 2414-23, **2002**.
- [86] M., P. B.; Joy, N. S., The Sweetening of the World's Diet, *Obesity Research*, 11, 1325-1332, **2003**.
- [87] Özdemir, D.; Başer, H.; Çakır, B., Tatlandırıcılar, *Türkiye Klinikleri Endokrinoloji Dergisi*, 9, 60-70, **2014**.
- [88] Manfred, K.; Kathleen, M.; Ruth, K., Low-calorie Sweeteners and Other Sugar Substitutes: A Review of the Safety Issues, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5, 35-47, **2006**.
- [89] Raben, A.; Vasilaras, T. H.; Moller, A. C.; Astrup, A., Sucrose compared with artificial sweeteners: different effects on ad libitum food intake and body weight after 10 wk of supplementation in overweight subjects, *Am J Clin Nutr*, 76, 721-9, **2002**.
- [90] Weihrauch, M. R.; Diehl, V., Artificial sweeteners—do they bear a carcinogenic risk?, *Annals of Oncology*, 15, 1460-1465, **2004**.
- [91] Zygler, A.; Wasik, A.; Namieśnik, J., Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28, 1082-1102, **2009**.
- [92] Brizuela, A. B.; Raschi, A. B.; Castillo, M. V.; Leyton, P.; Romano, E.; Brandán, S. A., Theoretical structural and vibrational properties of the artificial sweetener sucralose, *Computational and Theoretical Chemistry*, 1008, 52-60, **2013**.
- [93] Peica, N.; Lehe, C.; Leopold, N.; Schlücker, S.; Kiefer, W., Monosodium glutamate in its anhydrous and monohydrate form: Differentiation by Raman

spectroscopies and density functional calculations, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 66, 604-615, **2007**.

[94] Tortajada, J.; Leon, E.; Morizur, J. P.; Luna, A.; Mo, O.; Yanez, M., Potential Energy Surface of Protonated Formamide and of Formamide-X⁺ (X = Li, Na, Mg, and Al) Complexes, *The Journal of Physical Chemistry*, 99, 13890-13898, **1995**.

[95] Graves, D. J.; Luo, S., Decomposition of aspartame caused by heat in the acidified and dried state, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35, 439-442, **1987**.

[96] Pagannone, M.; Fornari, B.; Mattei, G., Molecular structure and orientation of chemisorbed aromatic carboxylic acids: Surface enhanced Raman spectrum of benzoic acid adsorbed on silver sol, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 43, 621-625, **1987**.

[97] Lin-Vien, D.; Colthup, N. B.; Fateley, W. G.; Grasselli, J. G., CHAPTER 14 - Organic Sulfur Compounds. *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, (eds: Academic Press: San Diego, 225-250, **1991**.

[98] Armenta, S.; Garrigues, S.; de la Guardia, M., Sweeteners determination in table top formulations using FT-Raman spectrometry and chemometric analysis, *Analytica Chimica Acta*, 521, 149-155, **2004**.

[99] Duarte, L. M.; Paschoal, D.; Izumi, C. M. S.; Dolzan, M. D.; Alves, V. R.; Mücke, G. A.; Dos Santos, H. F.; de Oliveira, M. A. L., Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in powder tabletop sweeteners by FT-Raman spectroscopy associated with the multivariate calibration: PLS, iPLS and siPLS models were compared, *Food Research International*, 99, 106-114, **2017**.

[100] Manghnani, M. H.; Hushur, A.; Sekine, T.; Wu, J.; Stebbins, J. F.; Williams, Q., Raman, Brillouin, and nuclear magnetic resonance spectroscopic studies on shocked borosilicate glass, *Journal of Applied Physics*, 109, 113509, **2011**.

[101] Jovanovski, G.; Makreski, P.; Šoptrajanov, B., Vibrational study and spectra-structure correlations in magnesium disaccharinate heptahydrate, Mg(Sac)₂·7H₂O*, *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 27, 1-8, **2008**.

[102] Popova, A. D.; Velcheva, E. A.; Stamboliyska, B. A., DFT and experimental study on the IR spectra and structure of acesulfame sweetener, *Journal of Molecular Structure*, 1009, 23-29, **2012**.

[103] Michieli, N.; Pilot, R.; Russo, V.; Scian, C.; Todescato, F.; Signorini, R.; Agnoli, S.; Cesca, T.; Bozio, R.; Mattei, G., Oxidation effects on the SERS response of silver nanoprism arrays, *RSC Advances*, 7, 369-378, **2017**.

[104] Report of the meeting on Aspartame with National Experts, *EFSA Supporting Publications*, 7, 1641, **2010**.

[105] Niculina, P., Identification and characterisation of the E951 artificial food sweetener by vibrational spectroscopy and theoretical modelling, *Journal of Raman Spectroscopy*, 40, 2144-2154, **2009**.

[106] Herrera, G. M.; Padilla, A. C.; Hernandez-Rivera, S. P., Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) Studies of Gold and Silver Nanoparticles Prepared by Laser Ablation, *Nanomaterials*, 3, 158-172, **2013**.

- [107] A., L. I.; K., F.; D., G., SERS activity and stability of the most frequently used silver colloids, *Journal of Raman Spectroscopy*, 43, 202-206, **2012**.
- [108] Scientific Opinion on the re-evaluation of aspartame (E 951) as a food additive, *EFSA Journal*, 11, 3496, **2013**.
- [109] Glover, D. J.; Harris, W. J., The use of alkaline phosphatase-labelled oligonucleotide probes as culture confirmation reagents for the identification of commercially important bacteria, *Letters in Applied Microbiology*, 27, 116-120, **1998**.
- [110] Tu, S.-I.; Patterson, D.; Briggs, C.; Irwin, P.; Yu, L., Detection of immunomagnetically captured *Escherichia coli* O157:H7 by antibody-conjugated alkaline phosphatase, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26, 345-349, **2001**.
- [111] Anja, B.; Andreas, G.; Rupert, H.; Ursel, S.; Gerhard, F., Detection of circulating melanoma cells by immunomagnetic cell sorting, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 13, 229-233, **1999**.
- [112] Ximenes, V. F.; Campa, A.; Baader, W. J.; Catalani, L. H., Facile chemiluminescent method for alkaline phosphatase determination, *Analytica Chimica Acta*, 402, 99-104, **1999**.
- [113] Fenoll, J.; Jourquin, G.; Kauffmann, J.-M., Fluorimetric determination of alkaline phosphatase in solid and fluid dairy products, *Talanta*, 56, 1021-1026, **2002**.
- [114] Grates, H. E.; McGowen, R. M.; Gupta, S. V.; Falck, J. R.; Brown, T. R.; Callewaert, D. M.; Sasaki, D. M., Quantification of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid by colorimetric competitive enzyme linked immunosorbent assay, *Journal of Biosciences*, 28, 109-113, **2003**.
- [115] Kim, H.-J.; Kwak, J., Electrochemical determination of total alkaline phosphatase in human blood with a micropatterned ITO film, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 577, 243-248, **2005**.
- [116] Moore, B. D.; Stevenson, L.; Watt, A.; Flitsch, S.; Turner, N. J.; Cassidy, C.; Graham, D., Rapid and ultra-sensitive determination of enzyme activities using surface-enhanced resonance Raman scattering, *Nat Biotechnol*, 22, 1133-8, **2004**.
- [117] Karapanayiotis, T.; Jorge Villar, S. E.; Bowen, R. D.; Edwards, H. G. M., Raman spectroscopic and structural studies of indigo and its four 6,6[prime or minute]-dihalogeno analogues, *Analyst*, 129, 613-618, **2004**.
- [118] Mahmoud, M. A.; El-Sayed, M. A., Different Plasmon Sensing Behavior of Silver and Gold Nanorods, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 4, 1541-1545, **2013**.
- [119] Boyack, R.; Le Ru, E. C., Investigation of particle shape and size effects in SERS using T-matrix calculations, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11, 7398-7405, **2009**.
- [120] Tian, F.; Bonnier, F.; Casey, A.; Shanahan, A. E.; Byrne, H. J., Surface enhanced Raman scattering with gold nanoparticles: effect of particle shape, *Analytical Methods*, 6, 9116-9123, **2014**.
- [121] Paul, S. M.; Laurence, S.; Vance, D.; Linda, F. M.; Joseph, S. B.; Craig, S.; Patricia, M. G.; Robert, V. T., Food-Related Illness and Death in the United States, *Emerging Infectious Disease journal*, 5, 607, **1999**.

- [122] Law, J. W.-F.; Ab Mutalib, N.-S.; Chan, K.-G.; Lee, L.-H., Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations, *Frontiers in Microbiology*, 5, 770, **2014**.
- [123] Baker, C. A.; Rubinelli, P. M.; Park, S. H.; Ricke, S. C., Immuno-based detection of Shiga toxin-producing pathogenic *Escherichia coli* in food – A review on current approaches and potential strategies for optimization, *Critical Reviews in Microbiology*, 42, 656-675, **2016**.
- [124] Yang, D.; Zhou, H.; Haisch, C.; Niessner, R.; Ying, Y., Reproducible *E. coli* detection based on label-free SERS and mapping, *Talanta*, 146, 457-463, **2016**.
- [125] Temur, E.; Boyacı, İ. H.; Tamer, U.; Unsal, H.; Aydoğan, N., A highly sensitive detection platform based on surface-enhanced Raman scattering for *Escherichia coli* enumeration, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 1595-1604, **2010**.
- [126] Knauer, M.; Ivleva, N. P.; Niessner, R.; Haisch, C., A flow-through microarray cell for the online SERS detection of antibody-captured *E. coli* bacteria, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402, 2663-2667, **2012**.
- [127] Dou, X.; Takama, T.; Yamaguchi, Y.; Yamamoto, H.; Ozaki, Y., Enzyme Immunoassay Utilizing Surface-Enhanced Raman Scattering of the Enzyme Reaction Product, *Analytical Chemistry*, 69, 1492-1495, **1997**.
- [128] Gracie, K.; Correa, E.; Mabbott, S.; Dougan, J. A.; Graham, D.; Goodacre, R.; Faulds, K., Simultaneous detection and quantification of three bacterial meningitis pathogens by SERS, *Chemical Science*, 5, 1030-1040, **2014**.
- [129] Velusamy, V.; Arshak, K.; Korostynska, O.; Oliwa, K.; Adley, C., An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors, *Biotechnology Advances*, 28, 232-254, **2010**.
- [130] Wu, Z.-S.; Zhou, G.-Z.; Jiang, J.-H.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q., Gold colloid-bienzyme conjugates for glucose detection utilizing surface-enhanced Raman scattering, *Talanta*, 70, 533-539, **2006**.
- [131] Chen, Y.; Cheng, H.; Tram, K.; Zhang, S.; Zhao, Y.; Han, L.; Chen, Z.; Huan, S., A paper-based surface-enhanced resonance Raman spectroscopic (SERRS) immunoassay using magnetic separation and enzyme-catalyzed reaction, *Analyst*, 138, 2624-2631, **2013**.
- [132] Grönbeck, H.; Curioni, A.; Andreoni, W., Thiols and Disulfides on the Au(111) Surface: The Headgroup–Gold Interaction, *Journal of the American Chemical Society*, 122, 3839-3842, **2000**.
- [133] Fischer, M. J., Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach. (eds: 55-73, **2010**.
- [134] Guesdon, J. L.; Ternynck, T.; Avrameas, S., The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 27, 1131-1139, **1979**.
- [135] Bozkurt, A. G. *Yüksek verimli immunomanyetik ayırım için manyetik nanopartiküllerin geliştirilmesi*. Hacettepe Üniversitesi, Ankara, **2012**.

- [136] Jeyachandran, Y. L.; Mielczarski, E.; Rai, B.; Mielczarski, J. A., Quantitative and Qualitative Evaluation of Adsorption/Desorption of Bovine Serum Albumin on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces, *Langmuir*, 25, 11614-11620, **2009**.
- [137] Sun, Y.-S.; Zhu, X., Characterization of Bovine Serum Albumin Blocking Efficiency on Epoxy-Functionalized Substrates for Microarray Applications, *Journal of Laboratory Automation*, 21, 625-631, **2016**.
- [138] Q.-H., X., SERS under magnetic control, *Annalen der Physik*, 524, A161-A162, **2012**.
- [139] Shao, Q.; Liao, F.; Ruotolo, A., Magnetic-Polaron-Induced Enhancement of Surface Raman Scattering, *Scientific Reports*, 6, 19025, **2016**.
- [140] Kumar, G. V. P.; Rangarajan, N.; Sonia, B.; Deepika, P.; Rohman, N.; Narayana, C., Metal-coated magnetic nanoparticles for surface enhanced Raman scattering studies, *Bulletin of Materials Science*, 34, 207-216, **2011**.
- [141] Ran, L.; Qian-Wang, C.; Hao, Z.; Xiang-Kai, K.; Yu-Bing, S.; Hao, Z.; Hui, W.; Shuai, Z., Experimental investigations on the weakening effect of magnetic fields on surface-enhanced Raman scattering, *Journal of Raman Spectroscopy*, 44, 525-530, **2013**.
- [142] Chaffin, E. A.; Bhana, S.; O'Connor, R. T.; Huang, X.; Wang, Y., Impact of Core Dielectric Properties on the Localized Surface Plasmonic Spectra of Gold-Coated Magnetic Core–Shell Nanoparticles, *The Journal of Physical Chemistry B*, 118, 14076-14084, **2014**.
- [143] Mingsheng, W.; Qianwang, C.; Qiang, D., Synthesis of SiO₂ spheres with magnetic cores: Implications for the primary accretion in the solar nebula, *Journal of Geophysical Research: Planets*, 115, **2010**.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : AKİF GÖKTUĞ BOZKURT

Doğum Yeri : KEÇİÖREN

Doğum Yılı : 1987

Medeni Hali : BEKAR

E-posta : agbozkurt@hacettepe.edu.tr

Adresi : Mürsel Uluç Mah. 982. Sok. 7/4 Çankaya-Ankara

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : 2001-2005 Bursa Ulubatlı Hasan Anadolu Lisesi

Lisans : 2005- 2009 Uludağ Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Y. Lisans : 2009-2012 Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Doktora : 2012-2018 Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Yabancı Dil: İngilizce (İleri), Almanca (Başlangıç)

İş Tecrübesi:

2010- 2011 Araştırma Görevlisi (ÖYP) Ardahan Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

2011-2018 Araştırma Görevlisi (ÖYP) Hacettepe Üniversitesi Gıda Müh. Bölümü

Deneyim Alanları

Nanopartiküllerin sentezi, biyosensörler, Raman Spektroskopisi ve biyoanaliz uygulamaları, Spektroskopik teknikler

Tezden Üretilmiş Yayınlar

- 1- Bozkurt A. G., Buyukgoz G. G., Soforoglu M., Tamer U., Suludere Z., Boyaci I. H., Alkaline phosphatase labeled SERS active sandwich immunoassay for detection of *Escherichia coli*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, volume 194, 2018, pages 8-13
- 2- Buyukgoz, G.G., Bozkurt, A.G., Akgul, N.B., Tamer, U., Boyacı, İ. H., Spectroscopic detection of aspartame in soft drinks by surface-enhanced Raman spectroscopy, European Food Research Technology, 2015, 240: 567

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

- 1- Bozkurt A. G., Büyükgöz G. G., A, Şöforoğlu M., Tamer U., Boyacı İ. H., Alkaline phosphatase labeled SERS active sandwich immunoassay for the detection of *E. coli*. Colloquium Spectroscopicum Internationale XL June 11-16, 2017, Congress Palace, Pisa, Italy (Sözlü Sunum)
- 2- Bozkurt A. G., Temür E., Boyacı İ. H., Tamer U., Ascorbic Acid Quantification in the Presence of Bromocresol Green via Surface Enhanced Raman Spectroscopy, ICORS 2014 XXIV. International Conference on Raman Spectroscopy, August 10-14 2014, Jena-Germany (Poster)
- 3- Görkem G., Bozkurt A. G., Şöforoğlu M., Boyacı İ. H., A Novel Method for Quantification of Aspartame Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy. PITTCON 2014, Mar 2-6 2014, Chicago, Illinois, 1100-1P (Poster)

Tez Harici Üretilmiş Diğer Yayınlar

- 1- Baniukevic J, Hakki Boyaci I, Goktug Bozkurt A, Tamer U, Ramanavicius A, Ramanaviciene A., Magnetic gold nanoparticles in SERS-based sandwich immunoassay for antigen detection by well oriented antibodies. Biosensors & Bioelectronics 2013; 43:281-8
- 2- Zengin A., Bozkurt A., Boyaci İ. H., Özcan S., Daniel P., Lagarde F., Gibaud A., Cetin A., Suludere Z., Guttmann P. and Tamer U., Anisotropic core-shell Fe₃O₄@Au

magnetic nanoparticles and the effect of the immunomagnetic separation volume on the capture efficiency, Pure Appl. Chem. 2014; 86(6): 967–978

3- Tamer U., Onay A., Ciftci H., Bozkurt A. G., Cetin D., Suludere Z., Boyacı İ. H., Daniel P., Lagarde F., Yaacoub N., Greneche J-M., High-yield aqueous synthesis of multi-branched iron oxide core-gold shell nanoparticles: SERS substrate for immobilization and magnetic separation of bacteria, J Nanopart Res (2014) 16:2624

4- Boyacı İ. H., Temiz H. T., Genis H. E., Soykut E. A., Yazgan N. N., Guven B., Uysal R. S., Bozkurt A. G., Ilaslan K., Torun O., Seker F. C. D., Dispersive and FT Raman spectroscopic methods in food analysis, RSC Adv., 2015, 5, 56606–56624

5- Didem R., Boyacı İ. H., Bozkurt A. G., Eksi H., Zengin A., Tamer U., Aydogan N., Ozcan S., Tugcu-Demiroz F., Quantitative Characterization of Magnetic Mobility of Nanoparticle in Solution-Based Condition, Current Pharmaceutical Design, Vol 21, Number 37, November 2015, pp. 5389-5400(12)

Tez Harici Üretilmiş Diğer Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

1- Ramanaviciene A., Bozkurt A., Ramanavicius A., Boyacı İ., Baniukevic J., Tamer U., Magnetic Gold Nanoparticles in SERS-Based Sandwich Immunoassay for Antigen Detection by Well Oriented Antibodies. PITTCON 2013, Mar 17-21 2013, Philadelphia, PA, 510-8P (Poster)

2- Temiz H. T., Bozkurt A., Boyacı İ., Tamer U., Determination of Malachite Green in Nanogram Levels by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. PITTCON 2013, Mar 17-21 2013, Philadelphia, PA, 2510-8P (Poster)

3- Bozkurt A. G., Zengin A., Boyacı İ. H., Tamer U., Immunomagnetic Separation Efficiencies of Different Magnetic Gold Nanoparticles. PITTCON 2013, Mar 17-21 2013, Philadelphia, PA, 2790-9P (Poster)

4- Bozkurt A. G., Boyacı İ. H., Özcan S., Zengin A., Tamer U., Comparison of Magnetic Properties of Synthesized Different Core-Shell Gold Nanoparticles, PITTCON Conference&Expo 2015, 08-12 March, New Orleans, LA, (Poster)

5- Gumustas A., Bozkurt A. G., Cetin D., Acar E., Boyaci İ. H., Eryilmaz M., Suludere M., Paper Membrane Based SERS Platform for Rapid Bacteria Enumeration, PITTCON Conference&Expo 2016, 6-10 March, Atlanta,GA, P1410-19, (Poster)





HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 12/06/2018

Tez Başlığı / Konusu: Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS) Temelli Platformların Geliştirilmesi ve Biyoanalizlerde Kullanımı

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 107 sayfalık kısmına ilişkin, 12/06/2018 tarihinde ~~şahsım~~/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 2 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/~~dahil~~
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.


12/06/2018

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Akif Göktuğ Bozkurt
Öğrenci No: N12142090
Anabilim Dalı: Gıda Mühendisliği
Programı: Gıda Mühendisliği
Statüsü: ☐ Y.Lisans ☒ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.


Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı
(Unvan, Ad Soyad, İmza)