

**ADLİ BİLİMLERDE, VAKALARIN
AYDINLATILMASINDA ÖNEMLİ OLAN BAZI
BİYOLOJİK SIVILARIN TÜR VE ÖZELLİKLERİNİN
ANALİZİNDE NANOPARTİKÜL KULLANILMASI VE
RAMAN SPEKTROSKOPİNİN ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**THE USE OF NANOPARTICLES IN THE ANALYSIS OF
SPECIES AND PROPERTIES OF SOME BIOLOGICAL
FLUIDS AND INVESTIGATION OF EFFECTIVENESS OF
RAMAN SPECTROSCOPY IN ILLUMINATION OF
FORENSIC CASES**

UĞUR KÖROĞLU

PROF. DR NECDET SAĞLAM

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

ADLİ BİLİMLERDE, VAKALARIN AYDINLATILMASINDA ÖNEMLİ OLAN BAZI BİYOLOJİK SIVILARIN TÜR VE ÖZELLİKLERİNİN ANALİZİNDE NANOPARTİKÜL KULLANILMASI VE RAMAN SPEKTROSKOPİNİN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Uğur KÖROĞLU

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Necdet SAĞLAM

Temmuz 2024, 104 sayfa

Adli bilimlerin önemli yönlerinden biri de olay yerinden sağlıklı bir şekilde kanıt elde edilmesidir. Bunlar çok çeşitli olup özellikle vücut sıvıları (kan, ter, idrar, semen, saliva vb), adli tıp araştırmaları için en önemli kanıtları oluşturmaktadır. İncelenen alanda bulunan lekenin meyve/sebze suları dahil herhangi bir organik/biyolojik sıvı mı yoksa bir canlıya ve en nihayetinde de bir insana ait vücut sıvısı olup olmadığı belirlenmesi, ardından bunun tanımlanması ve niteliklerinin belirlenmesi çok değerlidir. Vücut sıvılarının kanıt teşkil edecek aşamaya getirilmesi ve bunun çok kısa sürede yapılması hem olayın çözümlenmesinde hem de adaletin doğru işleminde ve sonuçlandırmasında önemli bir yer tutmaktadır.

Adli tıpta yapılan testlerin numuneyi tahrip etme durumu, test sürelerinin uzun zaman alması, olay yerinde bilinmeyen bir lekenin karakterizasyonunda zorlukların olması, kısacası konvansiyonel yöntemlerin çoğu kez yetersiz kalması bilinen bir durumdur. Doktora tez çalışması kapsamında vücut sıvılarının analizinde yetersiz görülen konvansiyonel yöntemlerin yerine, farklı nanoteknolojik analiz yöntemlerinden yararlanılarak Raman ve Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS) ile çok

küçük miktarlardaki kanıt materyallerinden, kısa sürede, sağlıklı tespit ve teşhis yapılmasının sağlanması amaçlanmıştır.

Literatürde vücut sıvılarının ve benzer fiziksel özellikteki sıvıların Raman ve SERS spektrumlarının ayrı ayrı incelendiği çalışmalar bulunmakla birlikte, bu sıvıların karmaşık bir halde olduğu durumları gösteren bir çalışma görülmemiştir. Bu tez çalışmasında idrar, kan, saliva ve semen numuneleri ile bunlara benzer fiziksel özelliklere sahip sebze/meyve sularının karıştırıldığı durumlarda tespit edilebilirliği için SERS yöntemi geliştirilmesi hedeflenmiştir. Raman ve SERS analizleri 785 nm dalga boyunda lazer kaynağına sahip Raman mikroskobu ile gerçekleştirilmiştir. Sinyal zenginleştirme için altın nanoçubuk (AuNR) ve gümüş nanopartikül (AgNP) kullanılmış, güçlendirme seviyeleri incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, biyolojik sıvıların kendilerine benzer fiziksel özellikteki sıvıların karışımlarında SERS ile tespit edilebileceğini göstermiştir. Ayrıca, AuNR ve AgNP'nin SERS spektrumlarında sinyal şiddetlerini önemli ölçüde arttırdığı ortaya konulmuştur. Geliştirilen yöntem sayesinde karmaşık bir olay yeri incelemesinde biyolojik sıvıların tespiti için doğru sonuç veren, hızlı, tahribatsız ve maliyet etkin bir yöntem geliştirilmiştir.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Spektroskopi, Nanoparçacık, Olay yeri, Biyolojik Sıvı, Raman Spektroskopisi, SERS

ABSTRACT

THE USE OF NANOPARTICLES IN THE ANALYSIS OF SPECIES AND PROPERTIES OF SOME BIOLOGICAL FLUIDS AND INVESTIGATION OF EFFECTIVENESS OF RAMAN SPECTROSCOPY IN ILLUMINATION OF FORENSIC CASES

Uğur KÖROĞLU

Doctor of Philosophy, Nanotechnology and Nanomedicine Division

Supervisor: Prof. Dr. Necdet SAĞLAM

July 2024, 104 pages

One of the important aspects of forensic science is obtaining evidence accurately from the crime scene. These can be highly diverse, especially bodily fluids (blood, sweat, urine, semen, saliva, etc.) which constitute the most crucial pieces of evidence in forensic investigations. Determining whether a stain found at the crime scene is an organic/biological fluid, such as fruit/vegetable juices, or ultimately a human body fluid, and then identifying and characterizing it, is of great value. Bringing bodily fluids to a state where they can serve as evidence and doing so quickly play a significant role in solving the case and ensuring justice is served properly.

The situation where forensic tests in forensic science can often be limited due to sample destruction, long test durations, difficulties in characterizing an unknown stain at the crime scene, in short, the insufficiency of conventional methods, is a well-known issue. Within the scope of a doctoral thesis, the aim was to provide a rapid and accurate detection and diagnosis of small amounts of evidence materials using Raman and Surface-

Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) by utilizing different nanotechnological analysis methods in place of conventional methods which were considered inadequate in the analysis of bodily fluids.

While there are studies in the literature that separately investigate the Raman and SERS spectra of bodily fluids and similar physically similar fluids, there is no study that demonstrates their complex states. In this thesis study, it was aimed to develop a SERS method for the detection of urine, blood, saliva and semen samples when mixed with vegetable/fruit juices with similar physical properties. Raman and SERS analyses were performed using a Raman microscope with a 785 nm laser source. Gold nanorods (AuNRs) and silver nanoparticles (AgNPs) were used for signal enhancement, and their enhancement levels were examined.

The results obtained showed that biological fluids can be detected by SERS when mixed with fluids with similar physical properties. Furthermore, it was revealed that AuNR and AgNP significantly increased the signal intensities in SERS spectra. Thanks to the developed method, a fast, non-destructive, and cost-effective method that provides accurate results for the detection of biological fluids in a complex crime scene investigation has been developed.

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects.

Keywords: Spectroscopy, Nanoparticle, Crime Scene, Biological Fluid, Raman Spectroscopy, SERS

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın her anında bana destek olan, tüm süreç boyunca bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren, bilime ve hayata karşı bana yeni perspektifler kazandıran sayın hocam tez danışmanım Prof. Dr. Necdet Sağlam'a,

Tez çalışmam boyunca yoğun emek veren, deneysel yöntemlerin geliştirilmesi, gerekli malzeme temini, laboratuvar olanaklarının sunulması, deney verilerinin incelenmesi ve yorumlanmasında bana destek olan, yönlendirmeleri ve değerlendirmeleri ile yanımda olan değerli hocalarım Prof. Dr. Uğur Tamer ve Prof. Dr. Ramazan Akçan'a,

Ders ve tez dönemleri boyunca Nanoteknoloji ve Nanotıp alanında sunduğu bilgiler ve yardımları için minnettar olduğum, tezimin kapsamını genişletmemde ve derinleştirmemde önemli bir rol oynayan sayın hocam Prof. Dr. Eylem Güven'e,

Tez İzleme Komitesi süreçlerindeki geri bildirimleri ve yönlendirmeleriyle çalışmama destek olan kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Mesut Şam'a,

Eğitim hayatımın her anında bana destek olan, yoğun çalışma döneminde benim için gerekli fedakarlıkları yapan değerli aileme,

Sonsuz teşekkür ediyorum, saygı, sevgi ve minnetlerimi arz ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Raman Spektroskopisi	3
2.1.1 Raman Spektroskopisi Sistemi	6
2.2. Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS).....	7
2.3. Adli Tıpta Raman Spektroskopinin Yeri.....	16
2.4. Nanoteknoloji ve Raman Spektroskopisi	17
2.4.1 Nanopartikül Sentezi ve SERS Uygulamaları	18
2.4.2 SERS Yüzeylerin Hazırlanması	19
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	21
3.1. Materyaller	21
3.1.1. Kimyasal Malzemeler	21
3.1.2. Ölçüm Sistemleri ve Cihazlar.....	21
3.2. Nanopartiküllerin Sentez ve Karakterizasyonu	22
3.2.1. Altın Nanoçubukların Sentezi	22
3.2.2. Gümüş Nanopartiküllerin Sentezi	23
3.2.3. Yüzeylerin Temizlenmesi	23
3.3. Biyolojik Numunelerin, Meyve Sularının Hazırlanması ve Deney Tasarımı	23
3.3.1. Biyolojik Numunelerin Toplanması.....	23
3.3.2. Meyve Sularının Hazırlanması	24
3.3.3. Deney Tasarımı	24

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	27
4.1. Substrat ve Sinyal Güçlendirici Nanopartikül Karakterizasyonu	27
4.1.1. Altın Nanoçubuk (AuNRs) Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	27
4.1.2. Gümüş Nanopartikül (AgNPs) Hazırlanması ve Karakterizasyonu	29
4.1.3. Substrat Yüzey Analizi	31
4.2 Biyolojik Sıvıların ve Meyve-Sebze Sularının Spektrumlarının İncelenmesi	32
4.2.1. Kan – Vişne Suyu Analizleri	33
4.2.2. İdrar – Elma Suyu Analizleri	49
4.2.3. Saliva – Soğan Suyu Analizleri	54
4.2.4. Semen – Salatalık Suyu Analizleri	59
4.2.5. Tez Çalışmasının Sınırları ve Gelişmeye Açık Yönleri.....	68
5. YORUM	70
6. KAYNAKLAR.....	75
EKLER.....	92
EK 1 – Spektrumlar	92
EK 2– Etik Kurul İzin Belgesi	100
EK 3 – Tezden Türetilmiş Yayınlar	101
EK 4 – Tezden Türetilmiş Bildiriler	102
EK 5 – Tez Çalışması Orjinallik Raporu	103
ÖZGEÇMİŞ.....	104

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. C.V. Raman ve deney düzeneği.	4
Şekil 2.2. Foton molekül etkileşimi ve Raman saçılması.	5
Şekil 2.3. Raman spektroskopisi sistemi.	7
Şekil 2.4. SERS bileşenleri.	8
Şekil 2.5. SERS tekniğine ilişkin yayın sayılarını gösteren Web of Science verileri.	11
Şekil 2.6. a) Lokalize plazmon rezonans etkisi ve b) 35 nm çapındaki metalik nanopartikülde plazmon dağılımı [47].	13
Şekil 2.7. Ag, Au, Cu için optik özellik görülen dalga boyları [55].	14
Şekil 2.8. Raman spektroskopinin adli bilimlerde kullanım alanları [87].	16
Şekil 4.1. AuNRs TEM görüntüsü.	28
Şekil 4.2. AuNRs UV-Vis spektrumu.	29
Şekil 4.3. AgNPs TEM görüntüsü.	30
Şekil 4.4. AgNPs UV-Vis spektrumu.	31
Şekil 4.5. Yüzeyin Raman spektrumu.	31
Şekil 4.6. Kan (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve vişne suyu karışımı Raman spektrumu.	34
Şekil 4.7. AuNRs katkılı kan (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve vişne suyu karışımı SERS spektrumu.	35
Şekil 4.8. AgNPs katkılı kan (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve vişne suyu karışımı SERS spektrumu.	37
Şekil 4.9. SERS spektrumlarının standart sapma yüzdeleri (a) kan ve vişne suyu karışımı (b) AuNRs katkılı (c) AgNPs katkılı.	39
Şekil 4.10. Kan örneklerinin ayırımı için PCA modeli. PC 1 (%90,06) ve PC2 (%6,73) puanları.	42
Şekil 4.11. DIW, EtOH, MW ve vişne suyu ile karıştırılmış numunelerden kanın ayırımı.	43
Şekil 4.12. DIW ile karıştırılmış kan örneklerinin kanın kendisinden, EtOH, MW ve vişne suyu ile karıştırılmış diğer kan örneklerinden ayırt edilmesi.	43
Şekil 4.13. EtOH ile karıştırılmış kan örneklerinin kanın kendisinden ve DIW, MW ve vişne suyu ile karıştırılmış diğer kan örneklerinden ayırt edilmesi.	44
Şekil 4.14. MW ile karıştırılmış kan örneklerinin kanın kendisinden ve DIW, EtOH ve vişne suyu ile karıştırılmış diğer kan örneklerinden ayırt edilmesi.	44

Şekil 4.15. Vişne suyu ile karıştırılmış kan örneklerinin, kanın kendisinden ve DIW, EtOH ve MW ile karıştırılmış diğer kan örneklerinden ayırt edilmesi.	45
Şekil 4.16. AgNPs-kan örneklerinin, DIW, EtOH, MW ve vişne suyu ile karıştırılmış diğer örneklerden ayırt edilmesi.	47
Şekil 4.17. EtOH ile karıştırılmış AgNPs-kan örneklerinin, AgNPs katkılı kan, DIW, MW ve vişne suyu ile karıştırılmış diğer örneklerden ayırt edilmesi.	47
Şekil 4.18. MW ile karıştırılmış AgNPs-kan örneklerinin, AgNPs katkılı kan, DIW, EtOH ve vişne suyu ile karıştırılmış diğer örneklerden ayırt edilmesi.	48
Şekil 4.19. Vişne suyu ile karıştırılmış AgNPs-kan örneklerinin, AgNPs katkılı kan, DIW, EtOH ve MW ile karıştırılmış diğer örneklerden ayırt edilmesi.	48
Şekil 4.20. İdrar (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve elma suyu karışımı Raman spektrumu. ...	50
Şekil 4.21. AuNRs katkılı idrar (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve elma suyu karışımı SERS spektrumu.	51
Şekil 4.22. AgNPs katkılı idrar (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve elma suyu karışımı SERS spektrumu.	52
Şekil 4.23. SERS spektrumlarının standart sapma yüzdeleri (a) idrar ve elma suyu karışımı (b) AuNRs katkılı (c) AgNPs katkılı.	54
Şekil 4.24. Saliva (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve soğan suyu karışımı Raman spektrumu. ...	55
Şekil 4.25. AuNRs katkılı saliva (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve soğan suyu karışımı SERS spektrumu.	56
Şekil 4.26. AgNPs katkılı saliva (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve soğan suyu karışımı SERS spektrumu.	57
Şekil 4.27. SERS spektrumlarının standart sapma yüzdeleri (a) saliva ve soğan suyu karışımı (b) AuNRs katkılı (c) AgNPs katkılı.	59
Şekil 4.28. Semen (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve salatalık suyu karışımı Raman spektrumu.	60
Şekil 4.29. AuNRs katkılı semen (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve salatalık suyu karışımı SERS spektrumu.	61
Şekil 4.30. AgNPs katkılı semen (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve salatalık suyu karışımı SERS spektrumu.	62
Şekil 4.31. SERS spektrumlarının standart sapma yüzdeleri (a) semen ve salatalık suyu karışımı (b) AuNRs katkılı (c) AgNPs katkılı.	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Deneysel tasarımı.....	26
Çizelge 4.1. Kan ve vişne suyu karışımı Raman spektrum pikleri.	34
Çizelge 4.2. Altın nanoçubuk katkılı kan ve vişne suyu karışımı SERS pikleri.	35
Çizelge 4.3. Gümüş nanopartikül katkılı kan ve vişne suyu karışımı SERS pikleri.	36
Çizelge 4.4. Kan ve vişne suyu için elde edilen SERS pik noktaları.	38
Çizelge 4.5. Kan ve Ag ile zenginleştirilmiş karışımların örneklerin PLS-DA ayrımının performans parametreleri.	45
Çizelge 4.6. İdrar ve elma suyu karışımı Raman spektrum pikleri.....	49
Çizelge 4.7. Altın nanoçubuk katkılı idrar ve elma suyu karışımı SERS pikleri.	50
Çizelge 4.8. Gümüş nanopartikül katkılı idrar ve elma suyu karışımı SERS pikleri.	52
Çizelge 4.9. İdrar ve elma suyu için elde edilen SERS pik noktaları.	53
Çizelge 4.10. Saliva ve soğan suyu karışımı Raman spektrum pikleri.	55
Çizelge 4.11. Altın nanoçubuk katkılı saliva ve soğan suyu SERS pikleri.	56
Çizelge 4.12. Gümüş nanopartikül katkılı saliva ve soğan suyu SERS pikleri.....	57
Çizelge 4.13. Saliva ve soğan suyu için elde edilen SERS pik noktaları.	58
Çizelge 4.14. Semen ve salatalık suyu karışımı Raman spektrum pikleri.....	60
Çizelge 4.15. Altın nanoçubuk katkılı semen ve salatalık suyu SERS pikleri.	61
Çizelge 4.16. Gümüş nanopartikül katkılı semen ve salatalık suyu SERS pikleri.	62
Çizelge 4.17. Semen ve salatalık suyu için elde edilen SERS pik noktaları.	63
Çizelge 4.18. Kan için moleküler titreşimler [161, 207-209].	66
Çizelge 4.19. İdrar için moleküler titreşimler [210, 211].	66
Çizelge 4.20. Saliva için moleküler titreşimler [212-214].	67
Çizelge 4.21. Semen için moleküler titreşimler [171, 215].....	67

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

cm	Santimetre
E	Foton Enerjisi
g	Gram
h	Planck Sabiti
M	Molarite
mL	Mililitre
mW	Miliwatt
V	Hacim
v	Parçacık Frekansı
μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre

Kısaltmalar

AA	Askorbik asit
AgNO ₃	Gümüş nitrat
au	Atomik kütle birimi
AuNP	Altın nanoküre
AuNR	Altın nanoçubuk
AuNRs	Altın nanoçubuklar
AgNP	Gümüş nanopartikül
AgNPs	Gümüş nanopartiküller
C	Karbon
C ₂ H ₆ O	Etanol

C_3H_6O	Aseton
CCD	Yük bağlaşımli cihaz
CO	Karbonmonoksit
CTAB	Hekzadesiltrimetil-amonyum bromür
DIW	Distile su
EBL	Elektron Demeti Litografisi
EFR	Model verimlilik oranı
EtOH	Etanol
FIB	İyon Demeti Litografisi
FNR	Yanlış negatif oranı
FPR	Yanlış pozitif oranı
H	Hidrojen
H_2O_2	Hidrojen peroksit
H_2SO_4	Sülfirik asit
$HAuCl_4$	Hidrojen tetrakloro aurat
IR	Kızılötesi
LSPR	Lokalize Yüzey Plazmon Rezonans
LV	Gizli değişken
MUA	11-Merkaptoundekanoik Asit
MW	Maden suyu
N	Azot
$NaBH_4$	Sodyum borhidrat
NaOH	Sodyum hidroksit
$NH_2OH \cdot HCl$	Hidroksilaminhidroklorür
nm	Nanometre
Nd:YAG	Neodyum Ytrium Aluminyum Oksit Garnet Lazer

NIR	Yakın Kızılötesi
PCA	Temel bileşen analizi
PLS-DA	Kısmi en küçük kareler diskriminant analizi
ppm	Parça başına milyon
RMSEC	Kök ortalama kareler hata kalibrasyonu
RMSECV	Kök ortalama kareler hata çapraz doğrulaması
SERS	Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopi
SPR	Özgüllük oranı
STR	Duyarlılık oranı
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TNR	Doğru negatif oranı
TPR	Doğru pozitif oranı
UV	Ultraviyole
VIS	Görünür Bölge

1. GİRİŞ

Adli bilimlerin önemli yönlerinden biri de olay yerinden, suç mahalinden sağlıklı bir şekilde kanıt elde edilmesidir. Olay yerinde elde edilen kanıt niteliğindeki materyal, numune ve sair veriler oldukça önem arz etmektedir.

Bunlar çok çeşitli olup özellikle vücut sıvıları (kan, ter, idrar, semen, saliva vb), adli tıp araştırmaları için en önemli kanıtları oluşturmaktadır [1,2]. Söz konusu biyolojik lekelerin çeşitliliği ile olayın oluş şekline veya lekelerin yaşı bağlamında olayın oluş zamanına dair verileri işaret etme potansiyeli taşırlar. İncelenen alanda bulunan lekenin meyve/sebze suları dahil herhangi bir organik/biyolojik sıvı mı yoksa bir canlıya ve en nihayetinde de bir insana ait vücut sıvısı olup olmadığının belirlenmesi, ardından bunun tanımlanması ve niteliklerinin belirlenmesi çok değerlidir.

Herhangi bir olayda doğru ve sağlıklı bir karar verilebilmesi için olay yerinde tespit edilen niteliği, natürü ve kaynağı bilinmeksizin her numunenin DNA analizine tabi tutulması hem fiyat-fayda dengesine aykırıdır hem de faydasından ziyade olayın yorumlanmasına kaos oluşturacak potansiyeldedir.

Kanıt olabilecek bir materyalde, öncelikle bir vücut sıvısı olup olmadığının belirlenmesi, tanımlanması ve niteliklerinin belirlenmesi adli araştırmalarının önemli bir aşamasını oluşturur.

Adli tıpta, vücut sıvılarının kanıt teşkil edecek aşamaya getirilmesi ve bunun çok kısa sürede yapılması hem olayın çözümlenmesinde hem de adaletin doğru işleminde ve sonuçlandırmasında önemli bir yer tutmaktadır. Vücut sıvılarının doğası, canlı sistemlerinin önemli ayrılmaz bir yapısal maddesi olduğu için bu tür araştırmalarda oldukça önemli ve aydınlatıcı ve bilgilendiricidir.

Adli tıpta kullanılan bir tarama testinin tahrip olma durumu, olay yerinde bulunan kanıtın az miktarda olması durumunda çok önemli hale gelir ve daha çok dikkat gerektirir. Bu durumda söz konusu ön tarama testi veya analizin az miktardaki leke numunesini, sonraki analizlerde de kullanımına olanak tanınması için tahrip etmemesi veya niteliğini değiştirecek kimyasal kontaminasyona neden olmaması önem arz etmektedir.

Bazı durumlarda kanıt teşkil edecek bir sıvının kimliğini bilmek, bir vakanın sonucunu aydınlatmakta etkili ve yeterli olabilir. Ama her zaman bu sıvıyı bilmek kolay

olmayabilir; birçok vücut sıvısı lekesi çıplak gözle görülemez, görünüş olarak da diğer sıvılara veya maddelere benzerliği nedeniyle işleri zorlaştırabilir.

Bunun yanı sıra Adli tıpla ilgili sonuçların beklenmesi, sürenin uzaması, olay yerinde bilinmeyen bir lekeyi karakterizedeki zorlukların olması, kısacası konvansiyonel yöntemlerin çoğu kez yetersiz kalması bilinen bir durumdur. Günümüzde vücut sıvılarının özellikle olay yerinde, orijinal yapısı bozulmadan hızlı ve doğru analiz edilmesi çok önem arz etmektedir [3-5].

Son yıllarda moleküler yapı karakterizasyonunda çok çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bunlar arasında spektroskopik yöntemler lazer teknolojisindeki önemli gelişmeler ve yeni ışık detektörlerinin geliştirilmesi ile son yıllarda önemli ölçüde geliştirilmiş ve ilgili teknolojilerde yerini almıştır [6]. Biyo-spektroskopinin adli amaçlarda da uygulanması sonucu, olay yerinde kanıt oluşturabilecek lekelerin aranmasında, görülür hale getirilmesinde, elde edilmesinde, toplanmasında, vücut sıvılarının olay yerinde zarar görmeden tanımlanmasında, karakterizasyonunda, doğrulayıcı yöntemlerin geliştirilmesinde yeni ve alternatif fırsatlar sunacağı açıktır.

Bu doğrultuda, vücut sıvılarının analizinde yetersiz görülen alanlarda, konvansiyonel yöntemlerin yerine, nanoteknolojik süreçlerden yararlanılarak spektroskopik yöntemlerin tespit ve teşhiste kullanılması ile yetersiz gibi algılanan çok küçük miktarlardaki kanıt materyallerinden, kısa sürede, nitelikli ve sağlıklı sonuçların elde edilmesi mümkündür.

Yukarıda verilen bilgiler ışığında, sunulan Doktora tez çalışması kapsamında karmaşık bir olay yerinde vücut sıvılarının Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopi (SERS) ile tespit edilebilirliğinin ve sinyal zenginleştirici nitelikleri bulunan nanopartiküllerin etkinliğinin ortaya konması amaçlanmaktadır. Karmaşık olay yeri incelemelerinde uzun süreli analizlere gerek kalmadan, sinyal arttırıcı nanopartiküllerin tespit edilen çok küçük miktarlardaki kanıt materyallerinin üzerine spreylenecek; kısa sürede, sağlıklı tespit ve teşhis yapılabilecek spektroskopik analizin sahada alternatif bir yöntem olabileceği değerlendirilmektedir.

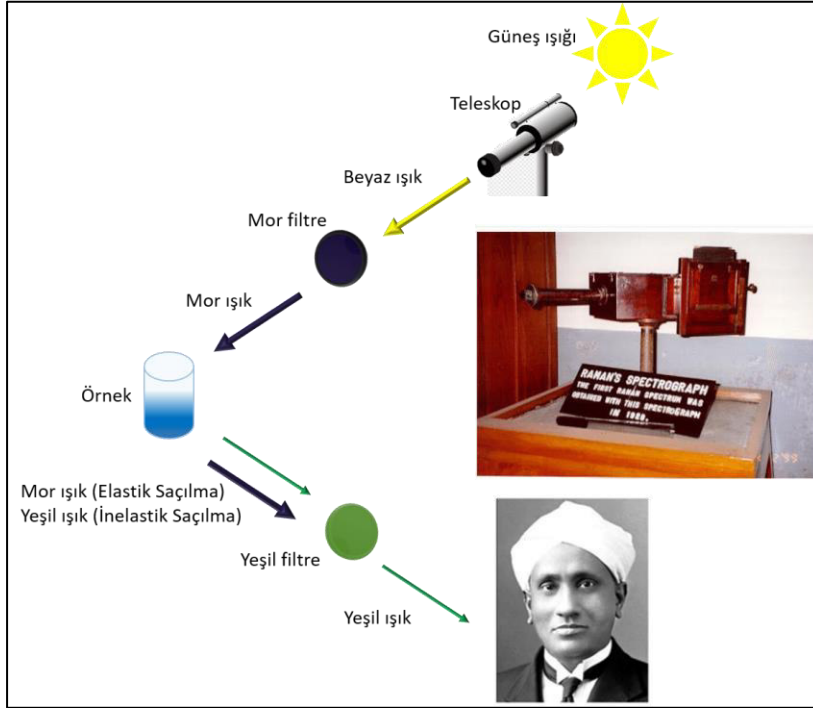
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Raman Spektroskopisi

Işığın (fotonun) bir madde üzerine geldiği durumda fotonlar absorpsiyon ya da saçılmaya uğrayabilmekte ya da etkileşim olmadan ilerleyebilmektedir. Etkileşim durumunda fotonun enerjisi maddenin uyarılmış halinden daha büyük bir enerjiye sahip değilse fotonlar absorbe edilmekte ve molekül uyarılarak bir üst enerji seviyesine gelmektedir. Absorpsiyon spektroskopisinde bu etkileşim esnasında meydana gelen enerji kaybı ölçülmektedir. Ayrıca gelen fotonun molekülle etkileştikten sonra saçılması da mümkündür. Saçılımın ölçüldüğü en yaygın metotlardan birisi Raman spektroskopisidir.

1923'te Avusturyalı fizikçi Adolf Smekal, ışık fotonlarının atomlar ve moleküller tarafından esnek olmayan saçılması olgusunu öne sürdüğü makalesi sonrasında, Hint bilim adamları Chandrasekhara Venkata Raman ve Kariamanickam Srinivasa Krishnan bu saçılmayı deneysel olarak göstermiş ve Mart 1928'de yayınlamışlardır. Bu çalışmada Raman ve Krishnan, güneş ışığının bir teleskopla saçılan malzemeler, tamamen saflaştırılmış sıvılar veya buharlar üzerine odaklandığı basit ama zarif bir deney düzeneği kullanmış ve gözlemek için ışık filtreleri yöntemi uygulamışlardır. Dedektör yerine gözle analiz gerçekleştirmişlerdir [7,8]. Bu çalışma ile Raman 1930 yılında Nobel ödülünü kazanmış ve söz konusu fenomen Raman saçılması olarak adlandırılmıştır [8,9].

Raman spektroskopisi ise, Raman saçılması ile ortaya çıkan fotonların ölçülmesiyle oluşmuştur.

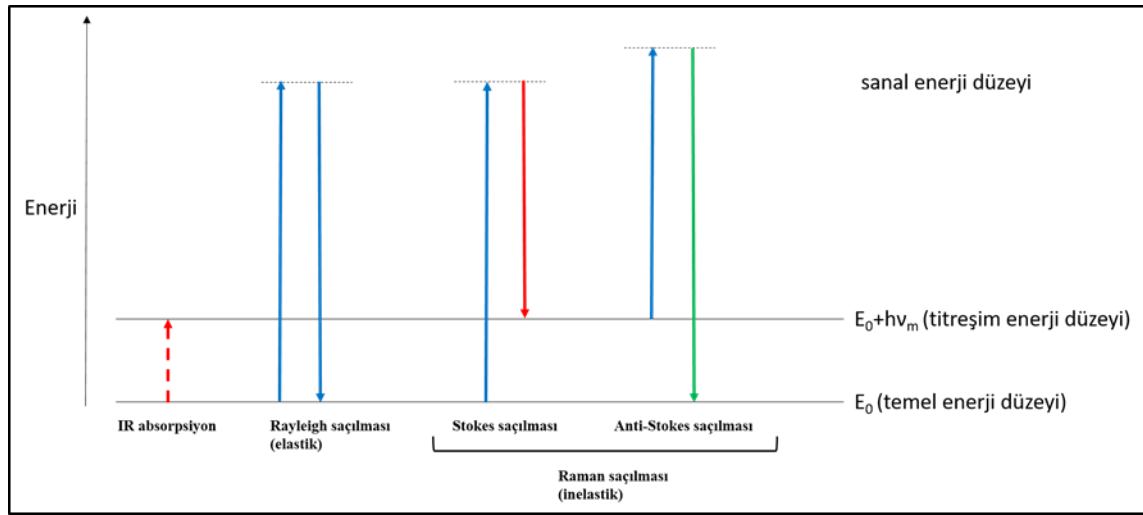


Şekil 2.1. C.V. Raman ve deney düzeneği.

Titreşim spektroskopisi tekniklerinde ışığın molekül çekirdeğinin etrafında çevrili elektron bulutunu polarize etmesi ve kısa ömürlü sanal durum oluşturmasından kaynaklı enerji değişimleri ölçülmektedir. Elastik saçılma adı verilen ve baskın olarak meydana gelen saçılmada yalnızca elektron bulutu polarize olur ve saçılan foton frekanslarında neredeyse yok denecek kadar az frekans değişikliği meydana gelir. Moleküler düzeydeki bu elastik saçılmalara Rayleigh saçılması adı verilmektedir [10]. Çekirdekte hareketi tetikleyen, enerjinin molekül ile foton arasında aktarıldığı saçılmalar ise elastik olmayan saçılma denilmektedir. Bu saçılma gerçekleştikten sonra fotonun başlangıçta sahip olduğu enerji ile saçılma esnasındaki enerjisi aynı değildir. Yaklaşık olarak $1/10^7$ tane fotondan yalnızca bir tanesi Raman saçılması yapmaktadır. Raman saçılmasında saçılan ışığın enerjisi ile moleküle etkileşen ışığın enerjisi arasındaki fark, molekülün titreşim enerji seviyeleri arasındaki enerji farklarına eşittir [11].

Raman spektroskopisinde saçılan ışığın dalga boyu ile etkileşen ışığın dalga boyu arasındaki fark ölçülmektedir. Bu farka 'Raman kayması' adı verilmektedir. Raman kayması dalga sayısı cinsinden tanımlanmakta olup birimi cm^{-1} 'dir [11-14].

Şekil 2.2’de foton madde etkileşimindeki enerji değişimleri ve Raman saçılması gösterilmektedir. Molekül tarafından absorbe edilmeyen $h\nu$ enerjili bir foton, saçılmadan hemen önce bir miktar enerjisi etkileştiği moleküle aktarmakta ya da molekülden enerji almaktadır. Gerçekleşen bu enerji aktarımı neticesinde moleküller farklı enerji seviyelerine ulaşmaktadır. Temel enerji seviyesinde yer alan bir molekül, foton ile etkileşime girdikten sonra uyarılmış enerji seviyesine geçerse foton enerji kaybetmiş ve molekül titreşim enerjisi kazanmış olmaktadır. Bu olayda gerçekleşen Raman saçılmasına Stokes saçılması adı verilmektedir. Molekülün uyarılmış enerji seviyesindeyken foton ile etkileşim sonucunda enerji kaybederek temel enerji seviyesine döndüğü ve fotonun enerjisinin arttığı saçılma durumuna ise Anti-Stokes saçılması adı verilmektedir [15-18].



Şekil 2.2. Foton molekül etkileşimi ve Raman saçılması.

Boltzman yasasının da açıkladığı doğrultuda bir etkileşim öncesinde uyarılmış enerji seviyesinde yer alan molekül sayısı, temel enerji seviyesinde yer alanlara göre oldukça azdır. Bu sebeple, Anti-Stokes Raman saçılmasının meydana gelme olasılığı Stokes Raman saçılmasına göre çok daha düşüktür [12,19].

Raman saçılmasının meydana gelebilmesi için molekülün gelen fotonun sahip olduğu elektrik alan tarafından periyodik ve fotonla aynı frekans değerinde polarlanabilmesi gerekmektedir. Bu da molekülün geçici periyodik bir dipol momente sahip olması anlamına gelmektedir. Böyle moleküllere Raman aktif moleküller denilmektedir. Raman kaymalardaki büyüklük ışık kaynağının dalga boyuna bağlı değildir ancak saçılma şiddeti dalga boyuna bağlıdır. Bir molekülün Raman türü saçılma etkileşmesine girebilmesi için Raman aktif olması gerekmektedir. Ancak asimetrik gerilme titreşimi sırasında molekülün dipol momentinde titreşim ile aynı fazda bir değişim 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 [12,20]. Bir molekülün simetrik özellik gösterip göstermemesi hangi titreşim modlarının Raman ve Kızılötesi spektroskopilerinde aktif olup olmadığını göstermektedir. Genellikle simetrik ve faz-ıç (in-phase) titreşimler ile polar olmayan gruplar Raman spektroskopisi ile en kolay çalışılabilen gruplardır. Asimetrik ve faz-dışı (out-of-phase) titreşimler ile polar gruplar ise Kızılötesi Spektroskopisi ile çalışmaya daha uygundur. Bir molekülün simetriklik özelliği üzerinden sınıflandırılmak molekülün yapısı ile titreşim spektrumu arasındaki ilişkiyi ortaya koymak açısından yararlıdır [21].

Raman spektroskopisi moleküllerin farklı titreşim modlarına hassasiyet gösterdiği için elde edilen karakteristik spektrumlar parmak izi niteliğindedir. Bu nedenle her molekülden parmak izi şeklinde sinyaller alınabilmekte ve eşsiz Raman spektrumları ortaya çıkabilmektedir. Raman spektrumu molekülün yapısındaki atomlar, bağlar ve molekül içerisindeki konumlanmalar hakkında veri sağlamaktadır. Ayrıca moleküllerin kimyasal yapıları, dizilimleri, etkileşimleri hakkında bilgi sahibi olunabilir ve kantitatif analizler gerçekleştirilebilir [22].

Raman spektroskopisi ile hem kuru hem de sıvı ortamlarda ölçüm alınması mümkündür. Özellikle kızılötesi spektroskopisi yönteminin su olduğu durumlarda yüksek absorpsiyon sergilemesi özellikle biyolojik çalışmalarda Raman spektroskopisinin daha popüler olmasına neden olmuştur. Raman ile nükleik asit, yağ ve protein analizleri gerçekleştirilmektedir.

2.1.1 Raman Spektroskopisi Sistemi

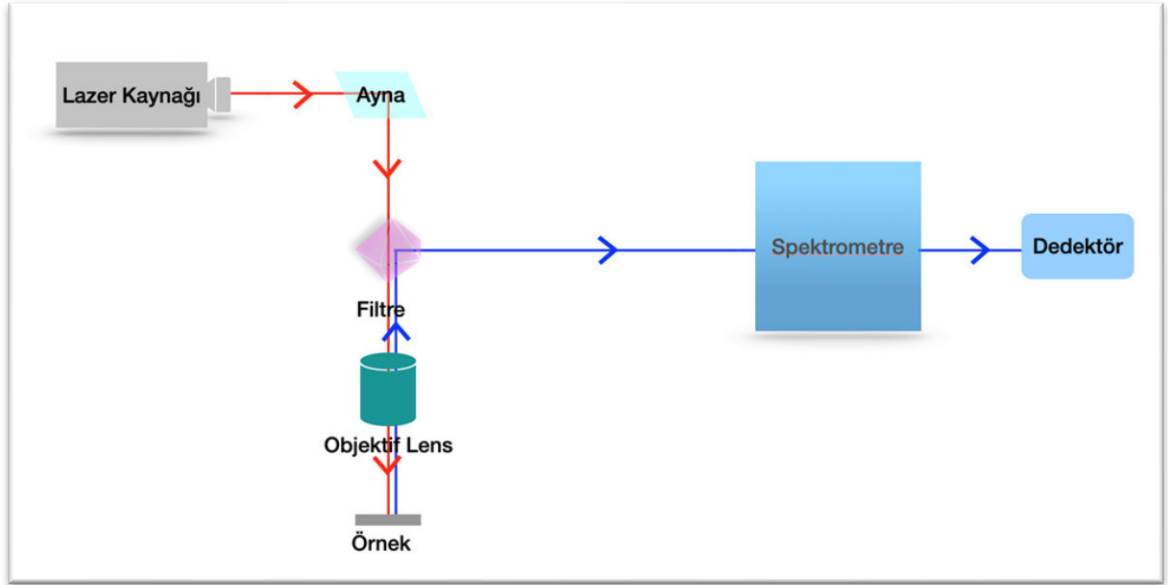
Raman spektroskopisi sistemi lazer kaynağı, numune aydınlatma sistemi ve spektrometre olmak üzere temelde üç ana bileşenden oluşmaktadır. Raman saçılımında meydana gelen sinyal yoğunluğu Rayleigh saçılımı ile oluşan sinyale göre oldukça az olduğundan dolayı örneğe yeterli sayıda foton gelmesi adına ışın kaynağı olarak lazer kullanılmaktadır. Raman spektroskopisi sistemlerinde en yaygın kullanılan lazer kaynakları ve dalga boyları:

- Helyum/neon lazer 632.8 nm,
- Argon/iyon lazer 488 ya da 514 nm,
- Nd:YAG (neodymium-kaplanmış itriyum alüminyum garnet) lazer 1064 nm

- Krypton/iyon lazer 530 ya da 647 nm

olarak belirtilmektedir.

Işın kaynağının lazer olması sayesinde çok küçük boyutlarda örnekler analiz edilse dahi kolayca odaklanma sağlanabilmekte ve sağlıklı ölçüm alınabilmektedir. Ayrıca suyun infrared ışınlarını absorblaması sayesinde Raman saçılması düşüktür. Bu sebeple su Raman spektroskopisi ile analiz edilecek numuneler için ideal bir çözücü olabilmekte ve sulu çözeltilerin analizde imkân tanımaktadır. Katı örnekler ise ön işlem uygulanmadan doğrudan incelenebilmektedir. Raman spektroskopisinde dedektör olarak ise foto çoğaltıcı tüp ya da yük-eşleşmiş dedektör (CCD) kullanılmakta olup; örnek hücresi, ayna ve lens gibi optik ekipmanlarda ise cam malzemeler tercih edilmektedir [23,24]. Şekil 2.3'te bir Raman spektroskopisi sistemi şematik olarak verilmektedir.



Şekil 2.3. Raman spektroskopisi sistemi.

2.2. Yüze Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS)

Raman saçılmasının yoğunlaştırılmasıyla sinyal şiddetinin artırıldığı fenomene Yüze Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS) adı verilmektedir. Temelde moleküler titreşimlerinden yararlanarak plazmon rezonans oluşturulması ve Raman sinyalinin zenginleştirilmesi hedeflenmektedir. Sinyal şiddetinin artması hedefte bulunan metallerle gönderilen fotonlar arasındaki etkileşimler sonucunda moleküllerin uyarılmasıyla meydana gelen plazmon rezonanslardan kaynaklanmaktadır. Sinyalin güçlendirilebilmesi için metaller ile analiz edilen moleküllerin ya temas halinde olmaları

ya da birbirlerine çok yakın (<10 nm) olmaları gerekmektedir. Sinyal güçlendirmeyi sağlayabilmek adına temel bileşenlerin iyi değerlendirilmesi gerekmektedir. Yüzey bütün etkileşimin olduğu ve saçılmanın gerçekleştiği kısımdır. Raman-aktif bir metal yüzey, metal nanopartiküller ya da her ikisi bir arada kullanılabilir. Analiz edilecek örnek ile sinyal güçlendirici metaller yüzeyde bir arada bulunmalı ya da birisi yüzeyde diğeri yüzeye yakın olmalıdır. Bu sebeple SERS yüzey temelli olarak anılır. Hızlı bir analiz yöntemi olan SERS'teki en kritik ve zorlu uygulamalardan birisi analiz edilecek moleküllerin yüzeye uygun bir şekilde transfer edilmesi metallerle etkileşiminin sağlanmasıdır. Yüzey ile elektromanyetik radyasyonun etkileşimiyle zenginleştirme sağlayan etmenler doğmaktadır. Bu etmenlere ilerleyen bölümlerde daha detaylı olarak yer verilecektir. Yüzey, molekül ve metal uyumu sağlandığında devreye plazmon rezonansların girmesiyle ve Raman sinyalinin 10^{10} - 10^{11} oranında güçlenebildiği belirtilmektedir [25]. Böyle bir durumda çok küçük miktarda veya çok düşük konsantrasyonlarda bulunan analitlerin analizi mümkün görülmektedir. SERS'in temel bileşenleri Şekil 2.4'te verilmektedir.



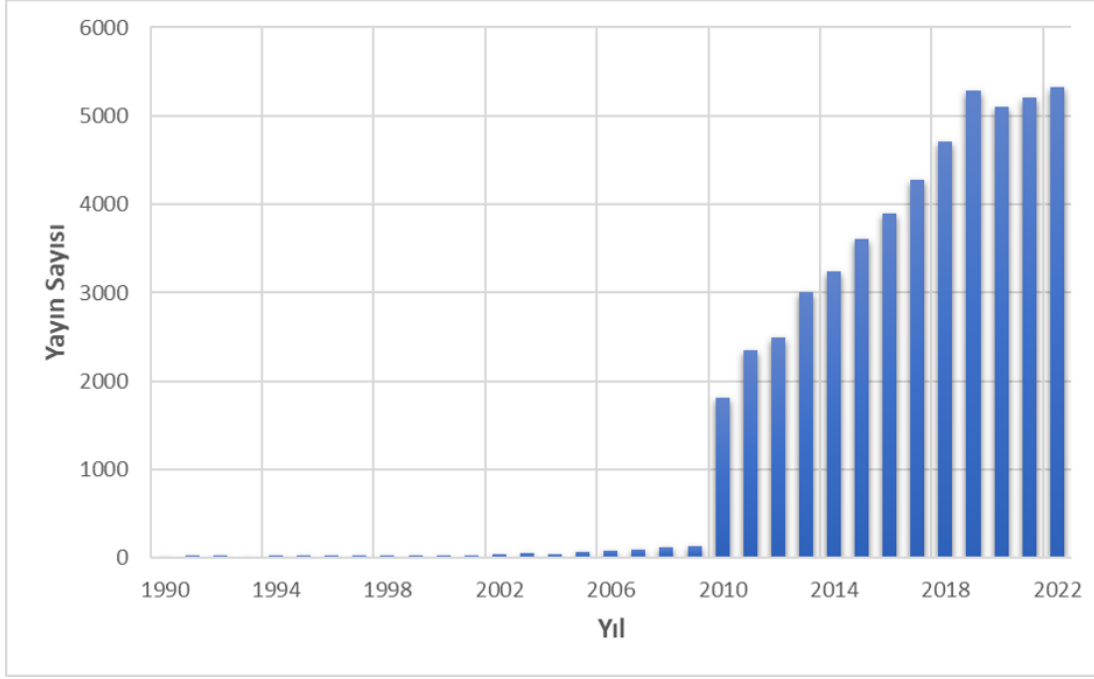
Şekil 2.4. SERS bileşenleri.

SERS tekniği multidisipliner bir yapıya sahiptir. Saçılma etkisini sağlayan olaylar silsilesi fiziksel; molekül ve metallerin hazırlanması biyoloji ve nanoteknoloji; molekül ve metal adsorbsiyonu ile yüzey uyumunun sağlanması kimyasal alanlarla bağdaşmaktadır. SERS'in multidisipliner yapısı, adli tıpın da bunlardan birisi olduğu birçok farklı bilim dalına da hizmet edebilir bir yöntem olmasını sağlamıştır.

Raman saçılmasının 1928 senesinde C.V. Raman tarafından ortaya konulmasına rağmen, Klasik Raman spektroskopisinin SERS'e evirilme süreci uzun bir süreçte olmuştur. Ancak sinyal zenginleştirmeye ilişkin fenomen 1974 senesinde Fleischmann ve ark. tarafından ortaya konulmuştur. Piridin analizi üzerine yaptıkları çalışmada kullanılan gümüş yüzeyin pürüzlülüğünü artırarak yüzeyde biriktirilen piridin miktarını çoğaltmayı hedeflemişlerdir [26]. Piridin Raman spektrumuna baktıklarında sinyal şiddetinin gürültü şiddetine göre çok yüksek olduğunu görmüşlerdir. Çalışma ekibi sinyal gürültü oranında oluşan bu dramatik artışı gümüş yüzeyin elektrokimyasal yöntemler kullanılarak pürüzlü hale getirilmesiyle birlikte yüzey alanının artması dolayısıyla yüzeyde biriktirilen piridin miktarının çoğalmasına dayandırmışlardır. Bu çalışmadan iki yıl sonra farklı gruplar tarafından yapılan iki çalışmada ise Raman sinyalinin zenginleştirilmesinin yalnız yüzey alanına ve pürüzlülüğüne bağlı olmadığı farklı etkilerin devreye girdiği, Raman sinyalinin $\sim 10^6$ oranında artış gösterdiği belirtilmiştir [27,28]. Bu çalışmalar sonrasında Moskovits ve ark. sinyal zenginleştirmesinin metal yüzeyler üzerinde meydana gelen optik olaylardan kaynaklı olduğunu ispat etmişlerdir [29]. İlerleyen yıllarda yalnızca yüzeylerin değil bakır ve altın nano parçacıkların da sinyal zenginleştirme amacıyla kullanılabileceği çalışmalarda gösterilmiştir [30]. Altın, gümüş ve bakır elementlerinin gelişkin plazmonik özelliklere sahip oldukları ve sinyalde şiddetlenmenin bu özelliklerinden kaynaklandığı farkedilmiştir [29]. Nano boyutta olan metal parçacıklarda yüzey plazmonların uyarılmasıyla lokalize bir elektrik alanı oluşmaktadır. Oluşan bu lokalize elektrik alan sayesinde saçılma radyasyonu oluşmaktadır. Lokal elektrik alan, etkileşim içerisindeki nanoyapılar birbirlerine yalnızca birkaç nm uzaklıkta olduğunda çok yüksek olmaktadır [31]. Elektrik alan şiddetinin çok daha fazla olduğu lokalize yüzey plazmonunu model alan SERS'te analitlerin kimyasal yapısının SERS üzerindeki etkisi göz ardı edilmektedir. Geçmiş dönemlerde yapılan teorik çalışmalarda hem lokalize yüzey plazmonu hem de kimyasal yapı temelli güçlendirmenin SERS'e katkı sağladığı aktarılmıştır [32]. Son dönemlerde ise çalışmalar ağırlıklı olarak günümüzde SERS'in kullanıldığı alanlar üzerine yapılmıştır [33-35]. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda

karşılaşılan en büyük sorun SERS yüzeylerinin hazırlık aşamasında yaşanan sıkıntılar, yüzeylerin tekrarlanabilir üretimi ve yüzeyde yapılan değişikliklerin kontrolsüz sonuçlar doğurması sonucu sinyal zenginleştirmesinde yaşanan performans düşüşü üzerine olmuştur. Yaşanan bu sıkıntılar SERS'in uygulamalarının geliştirilmesi ve yaygınlaştırılmasına engel olmuştur. Buna rağmen SERS yöntemi ile başta elektrokimyasal [36,37] ve biyosensör [38] alanları olmak üzere çok düşük miktarda numune ile farklı uygulamalarda analizler yapılmıştır.

SERS uygulamalarındaki gelişmeler sayesinde iki farklı çalışma ekibi tarafından SERS ile tek molekül analizi 1997 yılında gerçekleştirilmiştir [39,40]. Tek molekül analiziyle beraber SERS eser miktar ve düşük konsantrasyon için uygulanabilir analiz yöntemlerinden biri olmuştur. SERS, taramalı elektron mikroskobu (SEM), taramalı tünelleme mikroskobu (TTM) ve floresans spektroskopisi gibi diğer hassas analiz yöntemlerinden ayrı olarak analit molekülünün moleküler titreşimi hakkında bilgi vermektedir. Her bir molekül eşsiz bir moleküler titreşime sahip olduğundan dolayı ölçülen Raman saçılması aslında bir parmak izi niteliğindedir. Bu bilgiye sahip olunması SERS'in daha da yaygın bir kullanım alanına sahip olmasına olanak tanımıştır. Nanoteknolojideki gelişmeler ve nanoparçacık üretiminin ivme kazanmasıyla beraber etkin SERS yüzeylerinin üretimi ve sinyal güçlendirici nanopartiküllerin hazırlanması konusundaki çalışmalarda artış meydana gelmiştir [41-43]. Şekil 2.5'te "Surface Enhanced Raman" kelimeleriyle Web of Science araması sonucu elde edilen yayın sayısının yıllara göre dağılımı verilmiştir. Görüldüğü üzere özellikle 2010 ve sonrasında nanoteknolojide yaşanan gelişmelere paralel olarak SERS hızla popülerlik kazanan bir analiz yöntemi halini almıştır.



Şekil 2.5. SERS tekniğine ilişkin yayın sayılarını gösteren Web of Science verileri.

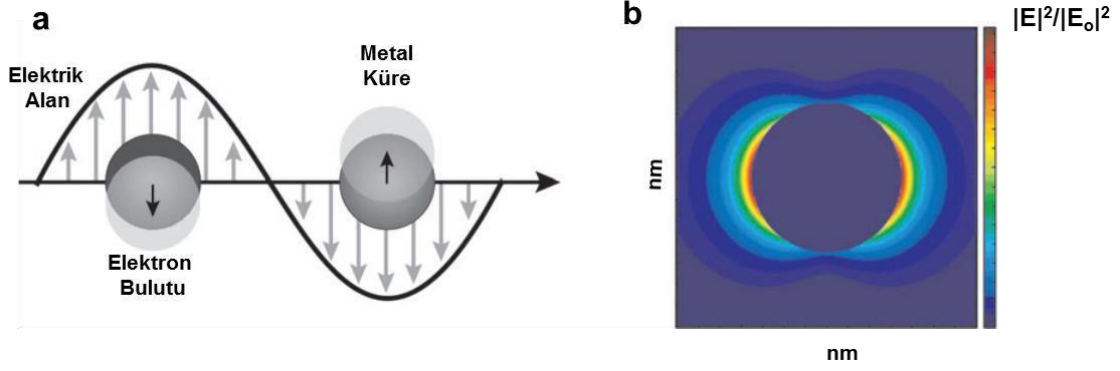
SERS araştırmalarında farklı tipte metaller kullanılarak hazırlanan yüzeyler ve yapılan çalışmalar olmasına rağmen en çok kullanılan nanopartiküller bakır, altın ve gümüş metallere aittir. Sinyal zenginleştirme katsayısının en yüksek olduğu durumlar yaklaşık olarak 10-100 nm arasında metal nanoparçacık büyüklüğü olan yüzeylerde meydana gelmektedir. Yüzeyler; litografi, buhar biriktirme, ince film kaplama, elektrotlarla indirgenme-yükseltgenme, koloidal nanopartikül hazırlanması vb. yöntemlerle hazırlanabilmektedir.

SERS'e ilişkin yapılan ilk dönemde yapılan çalışmalarında sinyal zenginleştirmesine yönelik çok farklı modeller ortaya konulmuştur [44]. SERS gelişim süreci boyunca devam eden çalışmalarda iki mekanizma öne çıkmıştır. Bu mekanizmalar kimyasal (yük transferi) ve elektromanyetik zenginleştirme mekanizmalarıdır [22,45,46]. Kimyasal mekanizma metalin yüzey ile etkileşimi sonrası ortaya çıkan elektronik yapı değişikliğine odaklanırken, elektromanyetik mekanizmada ise yüzeylerin uygulanan alan ile saçılmaya katkı sağlaması üzerinde durulmaktadır [44,47-49].

Elektromanyetik mekanizma incelendiğinde; sinyal güçlendirici nanometal ile yüzey arayüzü bölgesinde gelen ışık ile metalin hareketli elektronları (plazmonlar) etkileştiğinde elektrik alan şiddeti artar. Kimyasal mekanizmada analit ile nanometaller arasında bir yük transferi gerçekleşmektedir. Analit ile nanometal arasında bir kimyasal

etkileşimin olmadığı durumda bu mekanizmanın uygulanabilir olmadığı söylenebilmektedir. Bu sebeple yapılan çalışmaların çoğunda Raman saçılmasının artırılarak sinyalin zenginleştirilmesi için elektromanyetik mekanizma üzerinde durulmaktadır [50]. Bir iletkende elektronların toplu olarak uyarıldığı duruma plazmon adı verilmektedir. Eğer uyarılma yüzeye yakın bir bölgede meydana gelirse buna da yüzey plazmonu denilmektedir [47,50,51]. Şekil 2.6'da lokalize plazmon etkisi gösterilmektedir. Elektromanyetik mekanizmada Raman sinyalinde meydana gelen büyük çapta artış, yüzeye düşen fotonların sahip olduğu dalga boyunun, lokalize yüzey plazmon bölgesine yakın olduğu durumlarda ortaya çıkmaktadır. Yüzeyde pürüzlülüğünün artırılması sayesinde plazmonlar fotonlarla daha etkili bir şekilde uyarılabilmektedir. Yüzeye gelen ışığın sahip olduğu elektromanyetik alan yüzey plazmon etkisiyle artmakta olup, nanometallerle etkileşerek sinyalin zenginleştirilmesini sağlamaktadır. Nanometal yüzeyindeki hareketli elektronlar ile elektromanyetik dalganın aynı frekansta titreştiği durumda ise rezonans oluşmaktadır. Lokalize yüzey plazmon etkisini görebilmek için ise yüzeyde biriktirilen nanometal boyutlarının etkileşime girdikleri ışığın dalga boyundan küçük olması gerekmektedir. Gelen frekansa bağlı olarak nano parçacıkların etrafındaki lokal plazmonların titreştiği durumda lokalize yüzey plazmon rezonansı (LSPR) meydana gelmektedir [44,52,53].

Yalnızca elektromanyetik mekanizma ile sinyal güçlendirmeye odaklanan birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar sonucunda Raman sinyalinin 10^{11} - 10^{12} seviyelerinde zenginleştirilebileceği ortaya konulmuştur [54,55]. N_2 ve CO ile yapılan bir SERS çalışmasında ise kimyasal mekanizmanın da etkisi gözlenmektedir. Raman kesitleri çok benzer olan iki molekül için aynı durumda alınan SERS sinyalleri çok farklı çıkmıştır. CO sinyal şiddeti N_2 'den alınan sinyallere göre yaklaşık 200 katıdır. CO analiz SERS yüzeyine hem kimyasal hem de fiziksel bağlandığı için sinyal şiddeti oldukça fazla çıkmıştır. Bu çalışma kimyasal mekanizma etkisini de açıklamaktadır [48].



Şekil 2.6. a) Lokalize plazmon rezonans etkisi ve b) 35 nm çapındaki metalik nanopartikülde plazmon dağılımı [47].

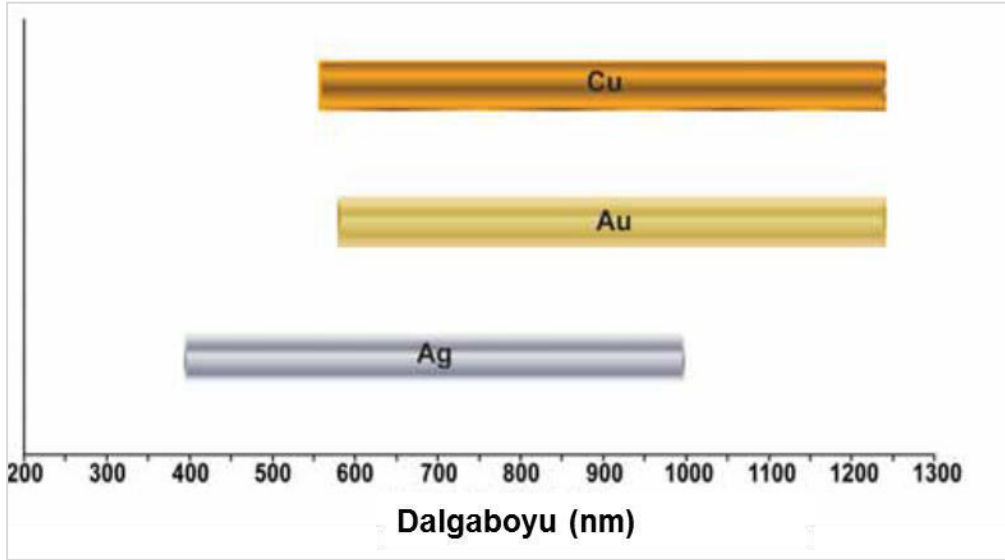
SERS uygulamalarında sinyal zenginleştirme için etkin faktörler şu şekilde açıklanabilir [56,57]:

- Işık dalgaboyu, polarizasyon, geliş açısı
- Algılayıcı dedektör düzeneği: saçılma dağılımı, algılamadaki polarizasyon durumu
- SERS Yüzey özellikleri: kullanılan nanometal (genellikle bakır, gümüş ve altın), nanometal geometrisi, gelen ışığın yönü ve ortamın kırılma indisi.
- Analiz edilecek malzeme özellikleri: Raman enine kesitleri, adsorpsiyon özellikleri: verimi, derişimi, yüzeye göre konumu (uzaklık), adsorpsiyon değişkenlik durumu (sabit ya da değişken) ve adsorpsiyon ile Raman polarizabilitede olası değişimler.

SERS sinyalini etkileyecek birçok farklı faktör olmasına rağmen bunlar içerisinde en önemlileri analiz edilecek molekül, sinyal güçlendirici nano parçacık ve kullanılan SERS yüzeyidir. Her biri özgün etkiye sahip bu bileşenlerin bir arada iken Raman sinyalini güçlendirebilmek adına plazmon rezonansların etkili şekilde uygun konumda bulunmaları gerekmektedir.

Burada bahsi geçen etmenlerden birisi olan SERS yüzey yüksek oranda sinyal zenginleştirme sağlayacak fiziksel yapıya sahip olmalıdır. Tekdüze yüzeylerin üretim tekrarlanabilirliği yüksek olmasına rağmen yüzey plazmonu oluşturma açısından daha düşük seviyelerde kalmaktadır. Pürüzlü yüzeylerin ise tekrarlanabilir bir şekilde üretilmeleri zor iken yüksek yoğunlukta yüzey plazmonu sağlayacak bir kapasiteye sahip olma potansiyelleri bulunmaktadır. Bu nedenle deneylerde istenilen sonuca ulaşabilmek adına uygun bir SERS yüzeyi hazırlamak en önemli adımlardan biridir. Ek olarak SERS güçlendirmesi yüzeyin rezonans durumundaki tepkisine bağlı olduğundan dolayı

kullanılan ışık kaynağının dalga boyu oldukça önem arz etmektedir. Kullanılacak ışığın dalga boyu ile analiz yüzeyi birbirlerine uygun olmalıdır. Bu bileşenlerde bir uyumsuzluk olması durumunda SERS sinyali gözlemlenmemektedir. SERS, görünür/yakın kızılötesi (VIS/NIR) bölgesinde etkin sonuç verecek bir yöntemdir. SERS çalışmalarında en çok tercih edilen yüksek plazmonik özelliklere sahip Cu, Au ve Ag'nin sahip oldukları etkin dalga boyu aralıkları da bunu doğrulamaktadır [Şekil 2.7.]



Şekil 2.7. Ag, Au, Cu için optik özellik görülen dalgaboyları [55].

Yapılan çalışmalarda gümüşün diğer geçiş metallerine göre daha yüksek plazmonik özelliklere sahip olduğu ortaya konulmuştur [58-61]. Ayrıca gümüş görünür bölge spektrumunun (VIS) tümünde plazmonik özellik gösteren tek malzeme olarak göze çarpmaktadır [59,62]. Gümüşün çabuk oksitlenmek, atmosferde kararsız olmak gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Bu gibi dezavantajlardan dolayı inert yapıya sahip altın da çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir.

SERS yüzeylerinin özellikleri ve hazırlanma yöntemleri incelendiğinde ilk kullanılan malzemeler elektrokimyasal yöntemlerle pürüzlü hale getirilen metal elektrotların olduğu görülmektedir [26]. Devam eden çalışmalarda metal nanopartiküller kullanılmaya başlanmış, nanopartiküllerin sahip oldukları dizilim, boyut ve şekil gibi parametrelerin sinyal zenginleştirme için önemli bir etkisinin olduğu görülmüştür. Bu bağlamda, hazırlanan nano partiküllerin optimizasyonunun gerekliliği meydana gelmiştir [63].

SERS yüzeylerinin hazırlanması için üç temel yöntemden bahsedilebilir.

- 1) Nanoyapıların yüzeye litografi vb. yöntemlerle adsorpsiyonu
- 2) Nanopartikül süspansiyonları
- 3) Nanopartiküllerin yüzeye sabitleştirilmesi

Yukarıda belirtildiği gibi SERS substratları üretim yöntemlerine bağlı olarak üç ana başlık altında toplanmaktadır. Aşağıda bu yöntemlerle ilgili daha ayrıntılı bilgiler verilmektedir.

SERS için kullanılan alttaşların birçoğu nanolitografi ile hazırlanmaktadır. Litografi işlemleri için elektron demeti (EBL) ve iyon demeti (FIB) nanolitografi yöntemleri tercih edilmektedir [64-71]. Boyut ve şekil konusunda en hassas ve en başarılı yöntem olan nanolitografi yönteminde başarılı bir şekilde kontrol sağlanabilmektedir. Gelişmiş optik özelliklere sahip tekrarlanabilir yüzey platformları elde edilebilmektedir. Ancak litografi işleminin getirdiği hazırlama süresi, litografi öncesi ve sonrası süreçler dezavantaj olarak göze çarpmaktadır.

Nanopartikül sentezine ilişkin geniş kapsamlı çalışmalar bulunmaktadır [72-75]. En çok kullanılan nanopartiküller küresel yapıda olup farklı sentezleme yöntemleriyle oluşturulabilirler [73,76,77]. Ayrıca seçici malzemelerin yüzeye aktarılmasıyla da sentezlenebilirler [42,78]. İndirgenme reaksiyonu [79], damga/kalıp kullanılması [47,80-83] ile de sentezlenme gerçekleştirilebilir.

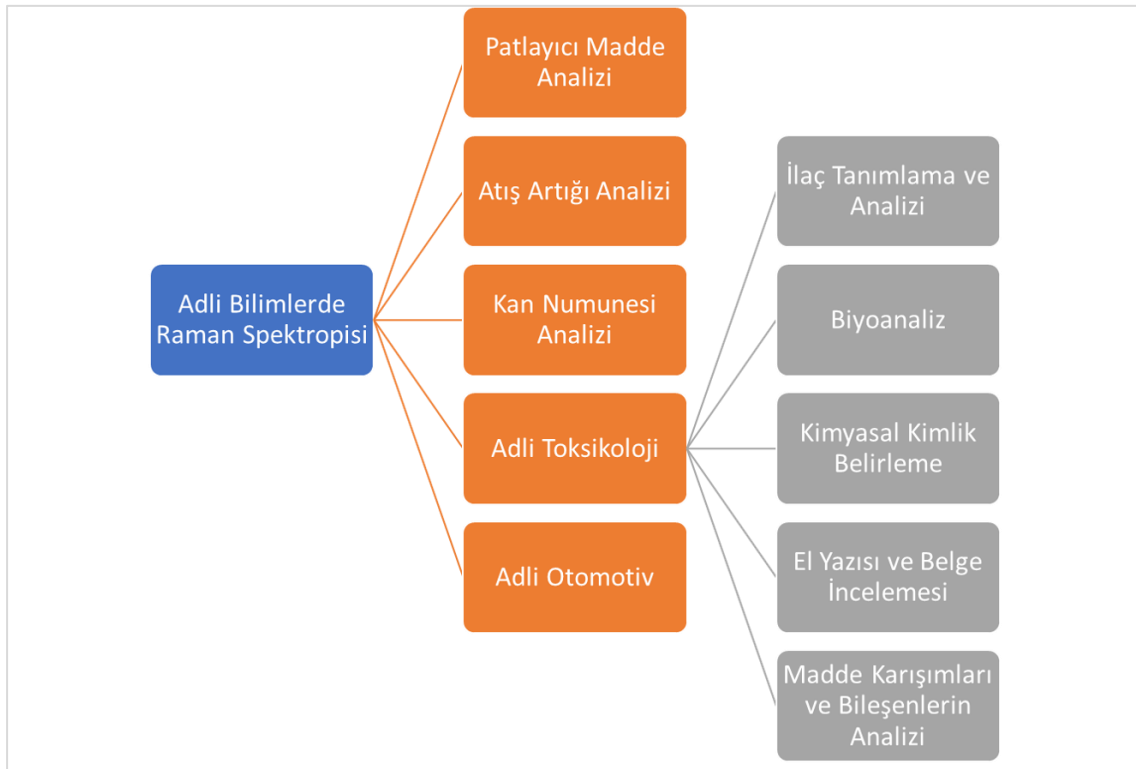
Sık kullanılan ve kolay bir üretim yöntemi olan nanometal süspansiyonlarında, nanopartiküllerin agrege olmasından dolayı tekrarlanabilir sonuç alınamamaktadır. Bazı SERS analizlerinde ise agregasyon istenen bir durumdur [55,84]. Ayrıca analit ve nanometalin karıştırılmasından dolayı örnek hazırlamak gerekmektedir. Ancak bu durumlara rağmen yüksek sinyal güçlendirme etkisi, kararlılık ve kolay sentezlenme açısından en çok bu yöntem tercih edilmektedir [85].

SERS yüzeyi oluşturmanın bir başka yöntemi de yüzeyler üzerine nanometallerin yüzeye entegre edilmesidir. Metal nanopartiküllerin yüzeye yapışma özellikleri zayıftır. Bu yapışmayı sağlamak adına yüzey farklı reçineler ile modifiye edilmektedir [86].

2.3. Adli Tıpta Raman Spektroskopinin Yeri

Raman Spektroskopisi son yıllarda birçok farklı bilim dalında olduğu gibi Adli Bilim alanında da yaygınlaşmaya başlamıştır. Gerçekleştirilen çalışmalar ve yapılan analizler göz önünde bulundurulduğunda; Raman Spektroskopisi'nin adli çalışmalarda oldukça umut verici bir analiz yöntemi olduğu görülmektedir [87]. Raman spektroskopisinin cerrahi operasyonlar süresince kullanılmasının yanında tanı amaçlı testlerde de kullanımı artmaktadır [88,89]. Yapılan çalışmalar Raman spektroskopiyi dair hızlı ve ucuz bir tanımlama yöntemi olarak tanımlamaktadır [90,91].

Raman Spektroskopisi, hızlı analiz-çabuk sonuç, yüksek hassasiyet, her numune için eşsiz sonuç vermesi ve düşük maliyeti sayesinde adli tıpta kullanılan popüler analitik yöntemler arasında yerini almıştır [92,93]. Raman Spektroskopisi, Adli Bilimlerin birçok farklı alanında kullanılmaya başlamıştır. Bu alanlar başlıklar halinde Şekil 2.8.'de verilmektedir [87].



Şekil 2.8. Raman spektroskopinin adli bilimlerde kullanım alanları [87].

Kan numunesi analizi, Raman'ın en çok kullanıldığı ve en çok çalışmanın yapıldığı alan olarak öne çıkmaktadır [87]. Özellikle Lednev ve ark. yaptıkları çalışmalar ile literatüre

önemli katkılarda bulunmuşlardır [94,95]. Bir biyolojik sıvıyı tanımlayabilmek ve kaynağını bulabilmek, ilk adım olarak son derece önemlidir çünkü sıvının doğası araştırma için çok bilgilendiricidir. Raman Spektroskopinin tahrip edici niteliğe sahip olmadığı, az miktarda analit ile biyolojik sıvıları ayırt ve analiz etme yeteneğine sahip olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [93-98].

Raman Spektroskopisi tehlikeli ve patlayıcı maddelerin uzaktan analiz edilebilmesine, çok az miktarda malzemenin ayırt edilerek tanımlanabilmesine olanak tanımaktadır [99,100]. Ayrıca, el-tipi versiyonlarının olması sayesinde sahada da kullanılabilmekte, düzgün ve hızlı sonuç verebilmektedir [3,101-103].

Raman Spektroskopisi ile ateşli silah üzerinde de analizler yapılabilmektedir. Ancak halihazırda kullanılan yöntemlere göre üstünlük sağlayacak özellikte olmadığı görülmektedir [87,104].

Raman'ın yoğun bir şekilde kullanıldığı adli bilimlerden birisi de adli otomotiv ya da olay yerinde elde edilen boyaların incelemeleri [105-107], mürekkep incelenmesi ile belge, imza ve yazı analizleri [108,109] ve boyalı sanat eserlerinin gerçekliğinin analizi üzerine yapılan boya incelemeleridir [110,111].

Raman Spektroskopiye dair çok fazla çalışmanın bulunmadığı ve kullanılabilir bir teknik olduğunun ispatlanmadığı alanlar ise Adli Tıp ve Adli Patolojidir. Bunun yanı sıra hastalıklı dokuların Raman Spektroskopi ile analiz edilebildiği ise yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur [112,113]. Raman Spektroskopisinin maliyet etkin bir yöntem olması, hızlı ve kesin sonuç vermesi anında tanı gerektiren operasyonlarda kullanılmasına imkân tanımaktadır [114-120].

2.4. Nanoteknoloji ve Raman Spektroskopisi

Raman spektroskopisinin bir türevi olan SERS için sinyal güçlendirici olarak iletkenliği yüksek metal nanoparçacıklar kullanılmaktadır. SERS'te amaç analitin Raman sinyalini artırmaktır. Bu doğrultuda farklı yöntemlerle hazırlanabilen nanopartiküllerin analit ile etkileşimi farklı yollarla sağlanabilmektedir.

2.4.1 Nanopartikül Sentezi ve SERS Uygulamaları

Nanopartiküller çok çeşitli malzeme ve yöntemlerle farklı geometri ve boyutlarda üretilebilmektedir. Gümüş ve altın nanopartiküller, kolay üretilebilmesi ve yüksek Raman sinyali sağlaması nedeniyle SERS uygulamalarında en çok kullanılan malzemelerdir [121-125]. Sinyal güçlendirme etkisi en yüksek olan, en yaygın SERS aktif yüzey türleri, kolloidal çözelti halinde ya da yüzey üzerinde kurutularak kullanılan, 10–100 nm boyut aralığındaki kolloidal gümüş ve altın nanoparçacık gruplarıdır [22,125]. Gümüş nanopartiküllerin sinyal güçlendirme etkisi dielektrik fonksiyonuna bağlı olarak diğer metallere kıyasla daha yüksektir. Ancak sentezlenmesinde partikül geometrisi, boyut ve boyut dağılımı sıkıntılar bulunmaktadır. Altın nanopartiküller ise kimyasal olarak daha kararlı bir haldedir [126].

Çoğunlukla etkileşime girdikleri ışığın dalgaboyundan daha küçük bir boyutta olan metal nanopartiküller gelen ışın ile etkileşime girerek yüzey ya da lokalize yüzey plazmon rezonansı oluştururlar [127]. Altın ve gümüş için bu rezonans frekansı spektrumun görünür bölgesinde yer almaktadır. Bu tez çalışmasında da bu iki metal nanopartikül üzerinde durulmuştur.

Altın nanopartiküller non-toksisite, biyoyumluluk ve gelişmiş optik özellikleri sayesinde birçok alanda kullanılmaktadır [126-130]. Altının tanı, görüntüleme vb. alanlarda kullanımı onu biyonanoteknoloji alanında da cazip bir hale getirmektedir. Altın ile benzer uygulamalarda kullanılan ve daha güçlü plazmonik özelliklere sahip metallere birisi de gümüşdür.

Bu nanopartiküllerin üretim süreci sonucunda hedeflenen istenen geometri, boyut ve asgari boyut dağılımıyla sentezlenebilmiş olmalarıdır. Nanopartiküllerin kullanıldığı birçok alan için geometri ve boyut bir gerekliliktir. Bu kapsamda altın ve gümüş nanopartiküllerin üretimi ve hazırlanması için çok farklı mekanizmalar ortaya çıkmıştır.

Turkevich-Frens yöntemi altın tuzunun sitratla indirgenmesini baz alan altın nanopartikül elde etmek için kullanılan en yaygın yöntemdir [75,131,132]. Bu yöntem sayesinde indirgeyici ajan ve altın tuz arasındaki oranın ayarlanmasıyla nanopartikül boyutu kontrol edilebilmektedir. Sıklıkla kullanılan bir başka yöntem ise altın tuzlarının organik bir çözücü içerisinde sodyum borhidrat (NaBH_4) ile tek ya da iki fazlı çözücü ve tiyol ligantlarla indirgenmesi Brust-Schiffrin sentezidir [133]. Burada da tiyol ile altın

arasındaki mol oranı artırıldığında daha küçük boyutta altın nanopartiküller elde edilebilmektedir.

Altın için verilen üretim yöntemlerinin birçoğu gümüş nanopartikül sentezinde de kullanılabilir. En yaygın kimyasal üretim metodu Lee-Meisel yöntemidir. Sentezlemedeki yaklaşım Turkevich-Frens yöntemine oldukça benzemektedir [134]. Tek fark altın yerine gümüş tuzlarının kullanılmasıdır. Ancak bu yöntem ile parçacık boyut dağılımı yeterince kontrol edilememektedir [135]. Alternatif bir yöntem olarak NaBH_4 ile gümüş iyonlarının indirgenmesi ve düşük boyutta nanopartikül eldesi sağlanabilen Creighton yöntemi de kullanılmaktadır [71].

Bu iki yöntemle benzer birçok kimyasal yöntem ile altın ve gümüş nanopartikül üretilmektedir. Kimyasal yöntemlerin yanı sıra buhar biriktirme [136], aşındırma [137], elektroliz [138], fotokimya (ultraviyole (UV), NIR) [139], radyoliz [140] vb. fiziksel üretim yöntemleri ile de altın ve gümüş nanopartikül sentezi gerçekleştirilebilmektedir.

Nanopartiküller çeşitli yöntemlerle küre, küp piramit, tel ve çubuk gibi farklı şekillerde üretilmektedir [141-147]. Nanopartiküllerin köşe ve kenarlı bir yapıda olması elektrik alanı bölgesel olarak yoğunlaştırabildiğinden ötürü SERS sinyalinin artmasında etki sahibi olmaktadır [144,148]. Nanopartiküllerin şekilleri, nanoparçacık ile analit etkileşimi, analitin yüzey üzerindeki yönelmesi SERS sinyalini doğrudan etkilemektedir. Yapılan bir çalışmada, üç farklı molekül için gümüş nanoküre ve nanoküp biriktirildiği durumlar karşılaştırılmış, tüm moleküllerde gümüş nanoküpün SERS sinyalinin nanoküre olduğu duruma göre 10^3 kat fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, köşe noktasının fazla olmasının sinyal şiddetini artırdığı savını güçlendirmektedir. Küp şeklindeki nanopartiküllerde güçlendirme katsayısı 10^4 - 10^5 iken küre şeklindeki nanopartiküllerde bu değer 10 - 10^2 mertebelerindedir [147,149].

2.4.2 SERS Yüzeylerin Hazırlanması

Nanoparçacıklar sahip oldukları eşsiz fiziksel ve kimyasal özellikleri bir yüzey üzerine entegre edildiklerinde de sergiler ve yüzeyin daha güçlü özelliklere sahip olmasını sağlarlar. Nanoyapıların bu eşsiz özellikleri nedeniyle günümüzde bu konu özelinde birçok çalışma yapılmaktadır [150]. SERS yüzeyleri bir önceki bölümde nanopartiküller için de anlatıldığına benzer şekilde; litografi, self-assembly, polimerizasyon, kimyasal aşındırma, kalıplama, buhar biriktirme vb. yöntemler ile hazırlanabilmektedir [32]. Bu

yöntemler içerisinde düşük dalga boyuna sahip ışınların yüzeye uygulanmasıyla oluşturulan nanolitografi yöntemleri tekrarlanabilirlik, boyut, hassasiyet ve tekrarlanabilirlik açısından en iyi yöntemler olsa da uzun proses süreçleri ve maliyet etkin olmaması nedeniyle çoklu ve büyük ölçekli üretimler için uygun görünmemektedir [151].

Tez çalışmasında numuneler hazır olarak alınmış altın kaplı bir yüzey üzerinde incelenmekte, analitin Raman sinyalini güçlendirmek adına hazırlanan altın nanoçubuk ve gümüş nanoparçacıklar kullanılmaktadır. Bu nanoparçacıkların hazırlanışı ilerleyen bölümlerde anlatılacaktır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Deneysel çalışmalar nanopartiküllerin sentezlenmesi, etik kurulu onayı doğrultusunda biyolojik numunelerin toplanması ve olay yerinde bulunabilecek örneklerle simule olay yeri koşulları altında Raman analizlerinin gerçekleştirilmesi olarak ilerletilmiştir.

3.1. Materyaller

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Deney çalışmalarında sertifikalı standart kimyasallar ve malzemeler kullanılmıştır.

Altın nanoçubuk üretimi için gerekli olan;

- Hekzadesiltrimetil-amonyum bromür (CTAB), 11-Merkaptoundekanoik Asit (MUA), hidrojen tetrakloro aurat (HAuCl_4) ve askorbik asit Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Almanya),
- Gümüş nitrat (AgNO_3) ve sodyum borohidrat (NaBH_4) Merck (Darmstadt, Almanya)

firmalarından tedarik edilmiştir.

Gümüş nanopartikül sentezlenmesi için gerekli olan;

- Sodyum hidroksit (NaOH) ve hidroksilaminhidroklorür ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Almanya),
- Gümüş nitrat (AgNO_3) ve sodyum borohidür (NaBH_4) Merck (Darmstadt, Almanya)

firmalarından satın alınmıştır.

Yüzey temizliği için hazırlanan pirana çözeltilisinde kullanılan sülfürik asit (H_2SO_4) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Almanya)'ten satın alınmıştır. Yine temizlik süreçlerinde kullanılan aseton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) ve etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) Carlo Erba (Milano, İtalya) firmasından satın alınmıştır.

Biyolojik sıvı seyreltme işlemleri Millipore saflaştırma sisteminde hazırlanan deiyonize su ($18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Ölçüm Sistemleri ve Cihazlar

Raman ve SERS analizleri için 785 nm lazer dalga boyuna sahip DeltaNu Reporter Portable Raman Spektroskopi (WY-ABD) sistemi kullanılmıştır. Sistem lazer kaynağı,

optik sistemler ve CCD detektörden oluşmaktadır. Yapılan ön analizler ve denemeler sonucu tez kapsamındaki analizler için sistem parametreleri 30 µm lazer spot çapı, 10x objektif, 150 mW lazer gücü ve 60 saniye tarama süresi olarak belirlenmiştir. Tüm ölçümler için taban çizgisi (baseline) düzeltilmesi yapılmıştır. Numunelerin analizleri substrat mikroskop lamına yerleştirilerek gerçekleştirilmiştir.

Sentezleme sonrası ortamda aşırı olan bazı partikülleri ortamdan uzaklaştırmak için Eppendorf (Hamburg, Almanya) marka santrifüj cihazı kullanılmıştır. Millipore Simplicity 185 (Darmstadt, Almanya) marka deiyonize su cihazı seyreltme ve temizleme işlemlerinde kullanılmıştır. Temizlik ve numune hazırlama süreçlerinde ultrasonik banyo (Bandelin Sonorex-Berlin, Almanya), hassas terazi (Shimadzu-Kyoto, Japonya) ve mikropipet (1-10,10-100,100-1000 µl) kullanılmıştır. Analiz substratı olarak altın kaplı Si yüzeyden yararlanılmıştır.

Altın nanoçubuk ve gümüş nanopartikül UV-Vis spektrumları Specord 50 Plus (Jena, Germany) sisteminde alınmıştır. Sentezlenen nanoçubuk ve nanopartiküllerin boyut ve şekil incelemeleri JEOL 2100 HRTEM marka (Tokyo, Japonya) geçirimli elektron mikroskobu ile gerçekleştirilmiştir.

3.2. Nanopartiküllerin Sentez ve Karakterizasyonu

SERS sinyalini güçlendirme amacıyla güçlü plazmonik özelliklere sahip ve kolay hazırlanabilen Altın (Au) ve gümüş (Ag) nanopartikülleri seçilmiştir. Analitlerle karıştırmak üzere altın nanoçubuk ve gümüş nanoküreler üretilmiştir. Üretim aşamaları ilerleyen bölümlerde detaylı olarak anlatılmaktadır.

3.2.1. Altın Nanoçubukların Sentezi

Altın nanoçubuk (Au-NRs) parçacıkların sentezi hızlı ve basit bir kimyasal yöntem olan Tohum büyütme yöntemine dayanmaktadır [73,78]. Bu yöntem ile farklı en/boy oranına sahip anizotropik nanoparçacıklar yüksek verimle sentezlenebilmektedir.

Tohum solüsyonu için 7,5 ml 0,1 M CTAB ve 250 µl 0,01 M H₂AuCl₄ karıştırılmıştır. Buz banyosunda hazırlanan 600 µl 0,01 M NaBH₄ indirgeyici olarak hızlıca bir önceki solüsyona dökülmüştür. 5 dakika sonra tohum solüsyonu olarak kullanılacak küresel nanoparçacıklar oluşmaya başlamış 30 dakika sonunda oluşum tamamlanmıştır.

Altın çubukları üretmek için hazırlanan büyüme solüsyonu için ise CTAB, H₂AuCl₄ ve AgNO₃ solüsyonları sırasıyla 4,75 ml 0,1 M, 1 ml 0,01 M ve 60 µl 4x10⁻³ M başka bir

şişede karıştırılmıştır. Ortaya çıkan turuncu karışıma 250 µl 0,1 M askorbik asit (AA) ilave edilerek iyice karıştırılmış ve renksiz bir üreme solüsyonu elde edilmiştir.

Oda sıcaklığında şişede hazırlanan büyütme solüsyonuna 5 µl tohum solüsyonu ilave edilmiş ve 3 saat bekletilmiştir.

Sonunda mor renkli çubuk formunda altın nanoparçacıklar oluşmuştur. Sentezlenen nanoçubuklar santrifüjlenerek çözeltilisinden ayrılmıştır. Son olarak 5 mL su ile yıkanmış ve CTAB moleküllerinin fazlasının temizlenmesi sağlanmıştır.

Altın nanoçubukların karakterizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla taramalı elektron mikroskop (TEM) görüntüleri alınmıştır. Ayrıca UV-Vis absorpsiyon spektrumları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar bulgular kısmında açıklanmıştır.

3.2.2. Gümüş Nanopartiküllerin Sentezi

Gümüş nanopartiküllerin (AgNPs) sentezlenmesi için 3.3×10^{-3} M NaOH ve 1.68×10^{-3} M hidroksilamin hidroklorür (NH₂OH-HCl) 90 ml distile su içinde manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. 0.01 M AgNO₃ solüsyonu indirgeyici ajan olarak kullanılan 90 ml solüsyona hızlı bir şekilde dökülmüştür. Berrak çözeltilinin hızla metalik gri renge dönüştüğü gözlenmiştir. Böylece koloidal gümüş nanoparçacıkların sentezi gerçekleştirilmiştir. Gümüş nanopartiküller her kullanımdan önce santrifüjlenmiştir.

Gümüş nanopartiküllerin karakterizasyonunda da altın nanoçubuklara benzer şekilde taramalı elektron mikroskop (TEM) görüntüleri ve UV-Vis absorpsiyon spektrumları incelenmiştir. Sonuçlar bulgular kısmında açıklanmıştır.

3.2.3. Yüzeylerin Temizlenmesi

Analitlerin üzerine döküldüğü altın metal kaplı Si alttaşlar pirana çözeltisi ile temizlenmiştir. Kare şeklindeki 1cm x 1cm'lik altın kaplı yüzeyler pirana çözeltisine (%75 H₂SO₄ - %25 H₂O₂) atılmış, 30 dakikalık bekleme sonrası deiyonize su ile yıkanmıştır. Yüzeyler yıkama sonrası kurumaya bırakılmış ve analizlerde kuru yüzeyler kullanılmıştır.

3.3. Biyolojik Numunelerin, Meyve Sularının Hazırlanması ve Deney Tasarımı

3.3.1. Biyolojik Numunelerin Toplanması

Tez çalışması kapsamında adli tıpta olay yerinde karşılaşılan en yaygın biyolojik numunelerden olan idrar, kan, saliva ve semen numuneleri toplanmıştır. Etik kurulu onayı

doğrultusunda gönüllü 18 yaş üstü sağlıklı bir bireyden dört numune de alınmıştır. Burada bahsi geçen sağlıklı birey herhangi bir ilaç veya hormon kullanmamaktadır. Uygun bir beslenme ve diyet ile yaşamını sürdüren bir birey seçilmiştir.

3.3.1.1. Etik Kurulu Onayı

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 4 Mayıs 2021 tarihli toplantısında 2021/10-01 sayılı kararı ile bu tez çalışmasını uygun görmüştür (EK-3).

3.3.2. Meyve Sularının Hazırlanması

Simüle bir olay yeri yaratarak biyolojik numunelerin gözle saptanmasını engellemek amacıyla biyolojik sıvılarla benzer fiziksel özelliklere sahip dört farklı meyve suyu seçilmiştir. Elma, salatalık ve soğan suları katı hallerinin sıkılıp süzülmesiyle elde edilmiştir. Saf halde vişne suyu ise satın alınmıştır.

3.3.3. Deney Tasarımı

Çalışmada biyolojik numunelerin olay yerinde bulunabilecek diğer sıvılarla karışığında analiz edilebilirliğinin tespiti ve net bir sonuç elde edebilmek adına en güçlü SERS sinyali sağlayabilecek nanopartiküllerin denenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda özellikle biyolojik numunelerin matris bileşenlerinden kaynaklı ortaya çıkan floresans etkisini azaltmak adına analitlerin farklı konsantrasyonlarında analizler gerçekleştirilmiştir. Biyolojik numunelerde seyreltme de iyonize su ile yapılmıştır. Kullanılan meyve suları ise seyreltilmemiştir. SERS sinyali güçlendirmek için AgNP, AuNP ve AuNR'ler üretilmiş, yapılan deneme analizlerinde AuNP'den istenilen seviyede sinyal zenginleştirilmesi alınamadığı için yalnızca AgNP ve AuNR kullanılmıştır.

Çizelge 3.1'de verilen parametreler ve deney akışına uygun olarak gerekli hazırlıklar yapılmış, her analiz öncesinde substrat yüzeyine ~1 µl karışım hacim ayarlı pipet ile dökülmüştür. Aşağıda detayları verilen prosedürler uygulandıktan sonra spektrumlar alınmıştır.

İlk aşamada biyolojik sıvıların Raman spektrumları elde edilmesi ve çalışma için en uygun seyreltme oranının belirlenmesi hedeflenmiştir. Biyolojik sıvılar yüzeye dökülmüştür. Yaklaşık iki saat kuruması beklendikten sonra Raman spektrum analizleri yapılmıştır. Çalışma 1:1, 1:2, 1:4 ve 1:8 derişimindeki biyolojik sıvı konsantrasyonları için tekrarlanmıştır. Sonrasında meyve sularının Raman spektrumları elde edilmiştir.

Hazırlanan meyve sularının da benzer şekilde altın yüzey üzerinde Raman spektrumları incelenmiştir. Meyve suları için seyreltme yapılmamıştır.

İkinci aşamada optimum pik intansitelerinin elde edildiği karışımın tespiti için eşit miktarda meyve suyu ve biyolojik sıvı karışımı hazırlanmıştır. 100 µl'lik seyreltilmemiş meyve suları ve fiziksel benzerlik gösterdikleri 100 µl biyolojik sıvının farklı konsantrasyonları santrifüj tüplerinde karıştırılmıştır. Toplamda 16 tane karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan karışımlar yüzeye ayrı ayrı dökülerek iki saatlik kuruma süresinden sonra Raman spektroskopisi analizleri yapılmıştır.

Sonraki aşamalarda nanopartikül etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Üçüncü aşamada önceki aşamadakilerle aynı şekilde hazırlanan karışımlar yüzeye döküp kurutulduktan sonra üzerlerine AuNR'lar eklenmiş tekrardan 1 saat kurumaya bırakılmış ve SERS analizleri yapılmıştır.

Son aşamada ise üçüncü aşamada yapılan tüm analizler örneklere AgNP'ler eklenerek gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Deney tasarımı.

AŞAMA	NUMUNE	DERİŞİM ORANI	MİKTAR (µl)
Biyolojik Sıvıların Raman Spektrumlarının eldesi	Kan	1, 1/2, 1/4, 1/8	100
	İdrar	1, 1/2, 1/4, 1/8	100
	Saliva	1, 1/2, 1/4, 1/8	100
	Semen	1, 1/2, 1/4, 1/8	100
Meyve Sularının Raman Spektrumlarının eldesi	Vişne suyu	1	100
	Elma suyu	1	100
	Soğan suyu	1	100
	Salatalık suyu	1	100
Simule olay yeri Raman Spektrumlarının eldesi	Kan-Vişne suyu	1:1, 1:1/2, 1:1/4, 1:1/8	100:100
	İdrar-Elma suyu	1:1, 1:1/2, 1:1/4, 1:1/8	100:100
	Saliva-Soğan suyu	1:1, 1:1/2, 1:1/4, 1:1/8	100:100
	Semen-Salatalık suyu	1:1, 1:1/2, 1:1/4, 1:1/8	100:100
Altın Nanoçubuk (AuNR) Etkinliğinin araştırılması SERS analizleri	AuNR-Kan-Vişne suyu	1:1, 1:1/2, 1:1/4, 1:1/8	100:100:100
	AuNR-İdrar-Elma suyu	1:1, 1:1/2, 1:1/4, 1:1/8	100:100:100
	AuNR-Saliva-Soğan suyu	1:1, 1:1/2, 1:1/4, 1:1/8	100:100:100
	AuNR-Semen-Salatalık suyu	1:1, 1:1/2, 1:1/4, 1:1/8	100:100:100
Gümüş Nanopartikül (AgNP) Etkinliğinin araştırılması SERS analizleri	AgNP-Kan-Vişne suyu	1:1, 1:1/2, 1:1/4, 1:1/8	100:100:100
	AgNP-İdrar-Elma suyu	1:1, 1:1/2, 1:1/4, 1:1/8	100:100:100
	AgNP-Saliva-Soğan suyu	1:1, 1:1/2, 1:1/4, 1:1/8	100:100:100
	AgNP-Semen-Salatalık suyu	1:1, 1:1/2, 1:1/4, 1:1/8	100:100:100

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışması planlama ve elde edilen veriler doğrultusunda üç temel başlıkta özetlenmiştir. Bu kapsamda;

- i) Biyolojik sıvıların SERS ile tespiti için nanopartiküllerin hazırlanması ve incelenmesi,
- ii) Biyolojik sıvıların ve meyve sularının Raman Spektroskopisi ile analiz edilebilirliğinin incelenmesi,
- iii) Adaleti sağlamak adına karmaşık bir olay yeri simulasyonunda bir kanıtın SERS ile tespit edilebilirliğinin ve nanopartiküllerin etkinliğinin incelenmesi/en etkin nanopartikülün belirlenmesine ait sonuçlar incelenmiştir.

4.1. Substrat ve Sinyal Güçlendirici Nanopartikül Karakterizasyonu

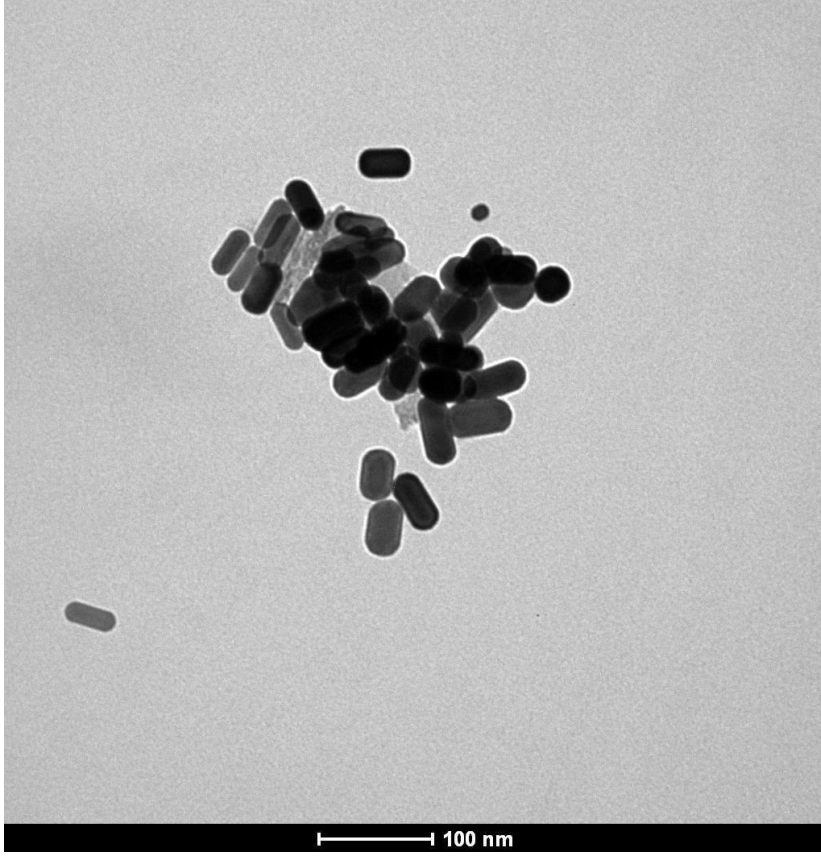
4.1.1. Altın Nanoçubuk (AuNRs) Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Öncelikli olarak bilinen yöntemlerle altın nanoküreler hazırlanmış (AuNPs) biyolojik sıvılara eklenerek SERS analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen spektrumlarda net bir sinyal zenginleştirilmesi görülmemiştir. Bunun sebebinin olarak düşük elektrik alan gücü ve düşük yüzey alanı olduğu değerlendirilmiştir. Altın nanoçubukların, nanokürelere kıyasla hem enine hem boyuna yüzey plazmon rezonansı modlarına sahip olması, bu sayede uç kısımlarda daha yüksek elektrik alan gücü sağlaması ve daha fazla yüzey alanına sahip olmaları sayesinde daha çok etkileşim noktası olması nedeniyle daha iyi bir sinyal zenginleştirme sağlayacağı öngörülmüştür.

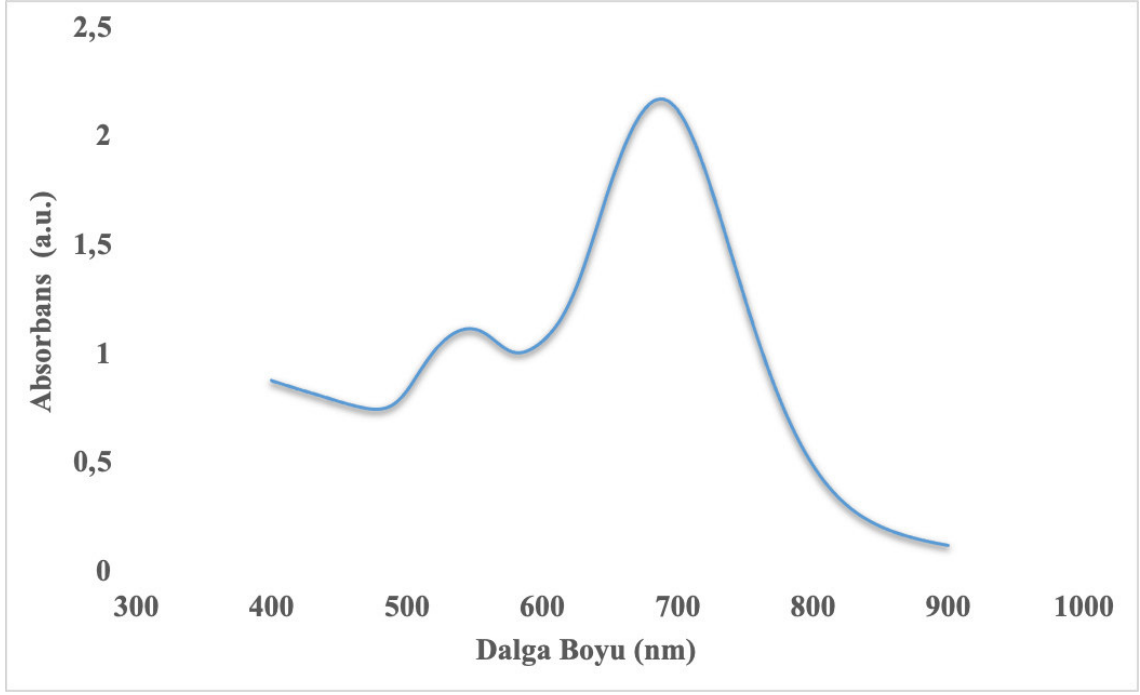
Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı şekilde hazırlanan altın nanoçubuklar ile yapılan deneme analizlerinde nanokürelere kıyasla daha yüksek verim elde edilmiştir. Nanoçubukların morfolojisini incelemek amacıyla TEM analizi gerçekleştirilmiştir. TEM görüntüleri, nanoçubukların oldukça homojen bir dağılıma sahip olduğunu ve belirgin bir morfolojik yapı sergilediğini göstermektedir. Analiz sonuçlarına göre, nanoçubukların genişliği ortalama olarak 13 nm, uzunluğu ise yaklaşık 45 nm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.1). Bu boyutsal özellikler, literatürde belirtilen standartlara oldukça yakındır ve üretim sürecinin kontrol edilebilir ve tekrarlanabilir olduğunu ortaya koymaktadır.

Ayrıca, UV-vis spektrumları da incelenmiştir. Şekil 4.2’de verilen spektrumdaki belirgin pik ~700 nm civarında olup, bu değer altın nanoçubukların karakteristik optik özelliklerini yansıtmaktadır. Bu pik, altın nanoçubukların yüzey plazmon rezonansından kaynaklanmakta olup, nanoçubukların başarılı bir şekilde sentezlendiğini

doğrulamaktadır. Elde edilen bu sonuçlar, AuNR (Altın Nanoçubuk) üretiminin yüksek verimlilikle gerçekleştirildiğini ve nanoçubukların beklenen optik ve morfolojik özelliklere sahip olduğunu güçlü bir şekilde göstermektedir [152,153].



Şekil 4.1. AuNRs TEM görüntüsü.



Şekil 4.2. AuNRs UV-Vis spektrumu.

Karışımlar hazırlanırken 100 µl altın nanoçubuk alınmıştır. Yukarıda en ve boyu verilen AuNR için 100 µl'deki nanoçubuk konsantrasyonu yaklaşık olarak şu şekilde hesaplanabilir. AuNR'nin 6,5 nm yarıçapa sahip bir silindir olduğu varsayılmıştır. Bu durumda bir nanoçubuk hacmi $V \sim 5.97 \times 10^{-19} \text{ cm}^3$ olmaktadır. Altının yoğunluğu 19.32 g/cm³ olup bir nanoçubuğun toplam kütlesi ($V \times \text{Yoğunluk}$) 1.153×10^{-17} g olarak elde edilir. 100 µl'lik AuNRs çözeltisindeki toplam altın konsantrasyonu ise 1.153×10^{-7} ppm olarak elde edilir.

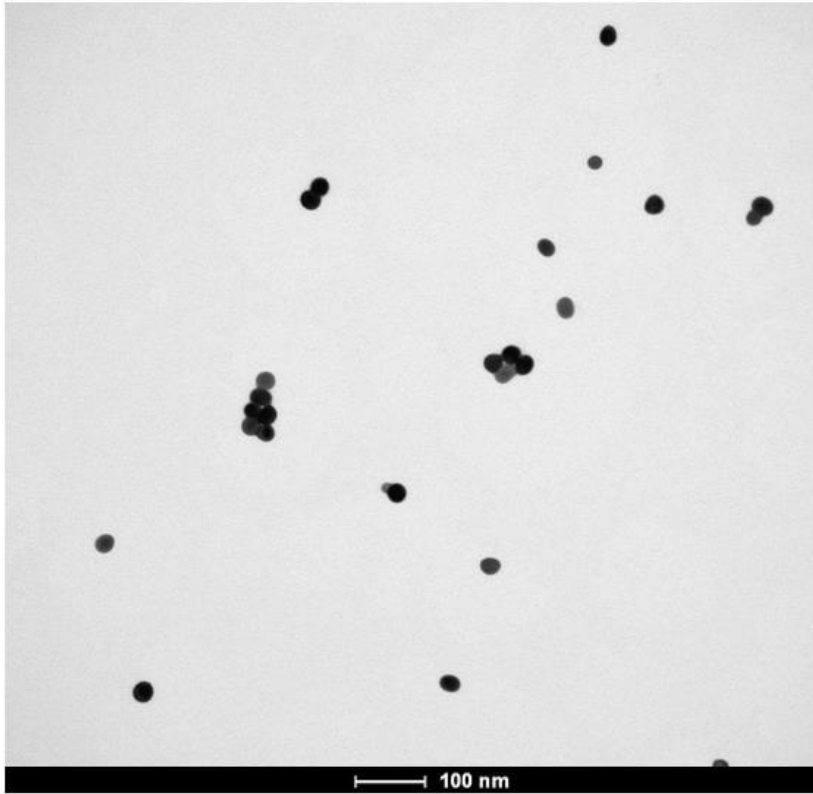
4.1.2. Gümüş Nanopartikül (AgNPs) Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Bölüm 3.2.2'de verilen yöntemle hazırlanmış olan gümüş nanopartiküller (AgNPs) TEM ve UV-Vis spektroskopisi kullanılarak detaylı bir şekilde incelenmiştir. Şekil 4.3'te sunulan TEM görüntüsü, gümüş nanopartiküllerin homojen bir dağılıma sahip olduğunu ve ~30 nm çapa sahip olduklarını açıkça göstermektedir. Bu boyutsal özellikler, nanopartiküllerin istenilen morfolojik özelliklere sahip olduğunu ve sentez sürecinin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini doğrulamaktadır.

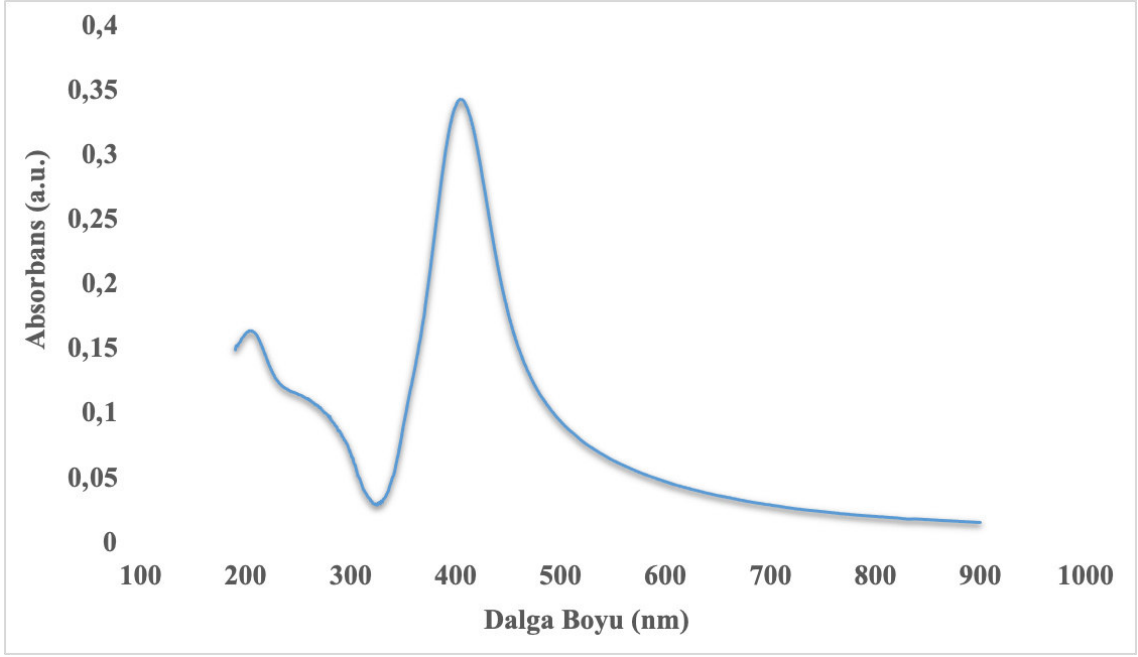
UV-Vis absorpsiyon spektrumu, Şekil 4.4'te gösterildiği üzere, 400 nm'de belirgin bir pik vermektedir. Bu pik, gümüş nanopartiküllerin karakteristik yüzey plazmon rezonansını yansıtmaktadır ve nanopartiküllerin optik özelliklerinin literatürde belirtilen değerlerle uyumlu olduğunu göstermektedir. Bhui ve arkadaşları tarafından farklı zaman

aralıklarında AgNO₃'ten sentezlenen gümüş nanopartiküllerin UV-Vis absorpsiyon spektrumlarının karşılaştırıldığı çalışma [154] ve diğer benzer literatür çalışmaları incelendiğinde, elde edilen 400 nm piki ile Şekil 4.4'te sunulan UV-Vis spektrumun tutarlı olduğu görülmektedir. Bu uyumluluk, sentezlenen AgNPs'nin optik ve morfolojik özelliklerinin literatürde belirtilen standartlarla örtüştüğünü ve sentez yönteminin tekrarlanabilir ve güvenilir olduğunu güçlü bir şekilde desteklemektedir [155-157].

Karışımlarda kullanılan 100 µl'lik AgNP konsantrasyonuna AuNR'deki hesaplamaya benzer şekilde ulaşılabilir. 30 nm çapa sahip nanopartikülün hacmi $\sim 1.41 \times 10^{-18} \text{ cm}^3$ 'tür. Gümüşün yoğunluğu 10.49g/cm³ olup, nanopartikül kütlesi $\sim 1.48 \times 10^{-17} \text{ g}$ 'dır. 100 µl'lik AgNPs çözeltisinin birim hacimdeki toplam gümüş konsantrasyonu ise 0.0141 ppm olarak elde edilir.



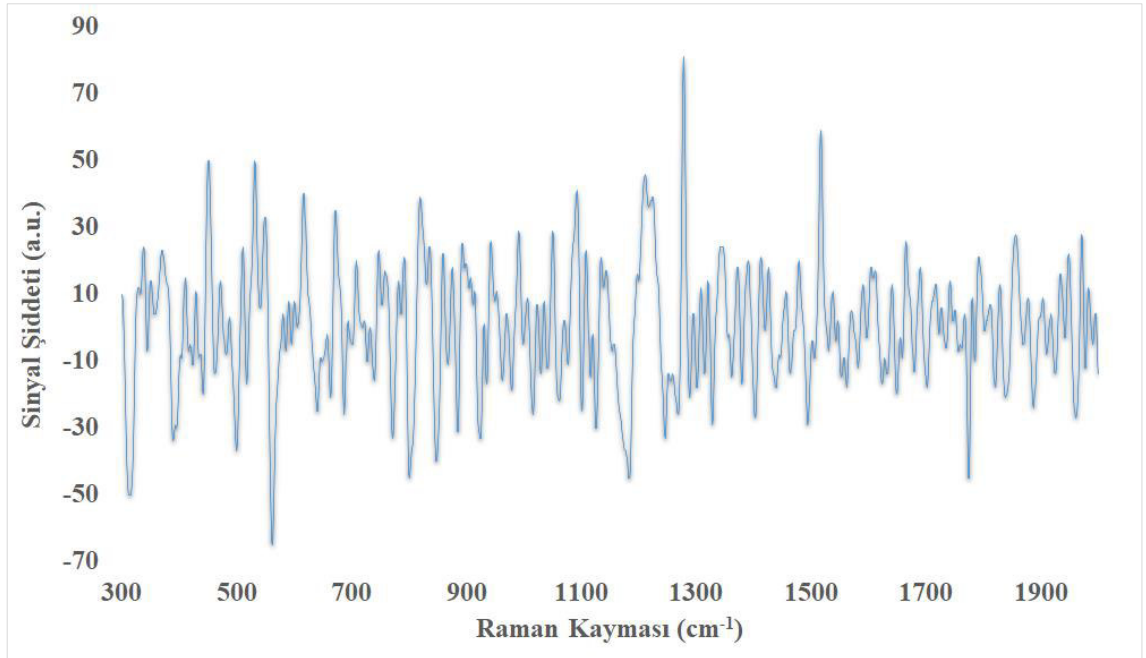
Şekil 4.3. AgNPs TEM görüntüsü.



Şekil 4.4. AgNPs UV-Vis spektrumu.

4.1.3. Substrat Yüzey Analizi

Kullanılan yüzey üzerinde herhangi bir numune yokken Raman Spektroskopisi sisteminde analiz edilmiştir. Üzeri altın kaplı yüzeyden 452, 532, 820, 1279 ve 1517 cm^{-1} 'de beş farklı pik alınmıştır (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Yüzeyin Raman spektrumu.

4.2 Biyolojik Sıvıların ve Meyve-Sebze Sularının Spektrumlarının İncelenmesi

Çizelge 3.1 de verilen deney akışı doğrultusunda hazırlanan kan, idrar, saliva ve semen için sırayla Raman spektrumları alınmıştır. Aynı akış içerisinde seyreltilmeden hazırlanan vişne, elma, soğan ve salatalık sularının da Raman spektrumları incelenmiştir. Spektrum ölçümleri sırasında kullanılacak parametrelerin belirlenmesi amacıyla çok sayıda deneme ölçümleri yapılmış ve optimum parametreler belirlenmiştir. Belirlenen parametreler doğrultusunda 785 nm dalgaboyuna sahip lazer kaynağıyla alınan spektrumlar 10x objektif ve 60 saniyelik analiz süresi kullanılarak elde edilmiştir. Bu parametreler substrat ve tüm numunelerin ölçümünde standart olarak kullanılmıştır. Genel olarak sıvıların tipik özelliği olan floresans etkisi nedeniyle hem biyolojik sıvılar hem de meyve/sebze sularının spektrumlarında nispeten düşük sinyal-gürültü oranlarına sahip olduğu görülmüştür. Altın kaplı substrat kullanılmasına rağmen floresans etkisinin azalmadığı gözlemlenmiştir. Gürültü katsayısı yüksek olmasına karşın tekrarlanabilir pikler gözlemlenmiştir. Analiz sonucunda elde edilen verilerdeki gürültü etkilerini azaltmak için spektrumların taban çizgisi NuSpec programı kullanılarak düzeltilmiştir. Biyolojik sıvıların bir kısmında özellikle seyreltmeyle birlikte pik şiddetlerinin arttığı ve sinyallerin belirgin hale geldiği analiz edilmiştir. Meyve sularının analizlerinde de tekrarlanabilir sinyaller elde edilmiş; ancak sinyal yoğunlukları muhtemel floresans ve gürültü etkilerinden dolayı zayıftır. Meyve sularının Raman ve SERS spektrumlarını araştıran çok az çalışma vardır ve bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar literatürde bildirilenlerle uyumludur. Spektrumlarda elde edilen pikler kendi içerisinde bir kıyaslamayla zayıf (0 – 150 a.u.), orta (150 – 300 a.u.) ve güçlü (>300 a.u.) olarak sınıflandırılmış ve ilgili tablolarda belirtilmiştir. Detaylar alt başlıklarda verilecektir.

Kan numunesi için yapılan Raman analizlerinde seyreltme yapılmamış örneklerde gürültü ve floresans etkisi çok baskın olarak görülmüştür. Bu sebeple seyreltilmemiş kana ait Raman piklerinden 950, 1043, 1239, 1354 ve 1625 cm^{-1} gözlemlenmiştir. Distile suyla yapılan seyreltme sonrasında 1:2, 1:4 ve 1:8 derişime sahip kan lekelerinde sinyal oranında drastik bir artış gözlemlenmemesine rağmen yapılan istatistiksel analizler sonucunda anlamlı zayıf şiddetli anlamlı pikler elde edilmiştir. Farklı derişimlerdeki kan lekelerinden elde edilen spektrumlar EK-1'de verilmektedir.

Saf idrara ait spektrumlarda floresans etkisi görülmesine rağmen 1040 ve 1607 cm^{-1} 'de kandaki sinyal seviyesine göre daha belirgin bir pik görülmüştür. Kan ile aynı şekilde seyreltilen idrarda seyreltmeye paralel olarak derişim azaldıkça gürültü oranının azaldığı

piklerin daha belirgin hale geldiği incelenmiştir. İdrarın farklı konsantrasyonları için elde edilen bantlar EK-1’de görülmektedir.

Saliva’nın için yapılan Raman analizlerinde gürültü şiddetinin kan ve idrara kıyasla daha az olduğu görülmüştür. Ancak floresans etkisinden dolayı idrara ait zayıf pikler elde edilebilmiştir. Seyreltmeyle birlikte pik şiddetlerinde hatırı sayılır bir artış olduğu analiz edilmiştir. Saliva’nın farklı derişimleri için elde edilen spektrumlar EK-1’de verilmiştir.

Semen’in diğer üç biyolojik sıvıya oranla en düşük floresans ve gürültü etkisine sahip olduğu görülmektedir. Pik şiddetleri zayıf olmasına karşın tekrarlanabilir pikler elde edilmiştir. Seyreltmenin pik şiddetinin artmasına önemli bir katkı sağlamadığı incelenmiştir. Semen’in farklı derişimlerinden elde edilen spektrumlar EK-1’de verilmektedir.

Saf halde bulunan vişne, elma, soğan ve salatalık sularına ait spektrum analizlerinde yüksek gürültü oranı ile karşılaşmış ancak tekrarlanan ölçümlerde anlamlı pikler elde edilmiştir. Meyve/sebze sularına ait literatürdeki çalışmalar incelendiğinde elde edilen sonuçların anlamlı olduğu görülmüştür. Ek olarak hem biyolojik sıvıların hem de meyve/sebze sularının AgNPs eklenerek spektrumları alınmış, referans olması açısından grafiklerde verilmiştir. Detaylar ilerleyen bölümlerde aktarılacaktır.

4.2.1. Kan – Vişne Suyu Analizleri

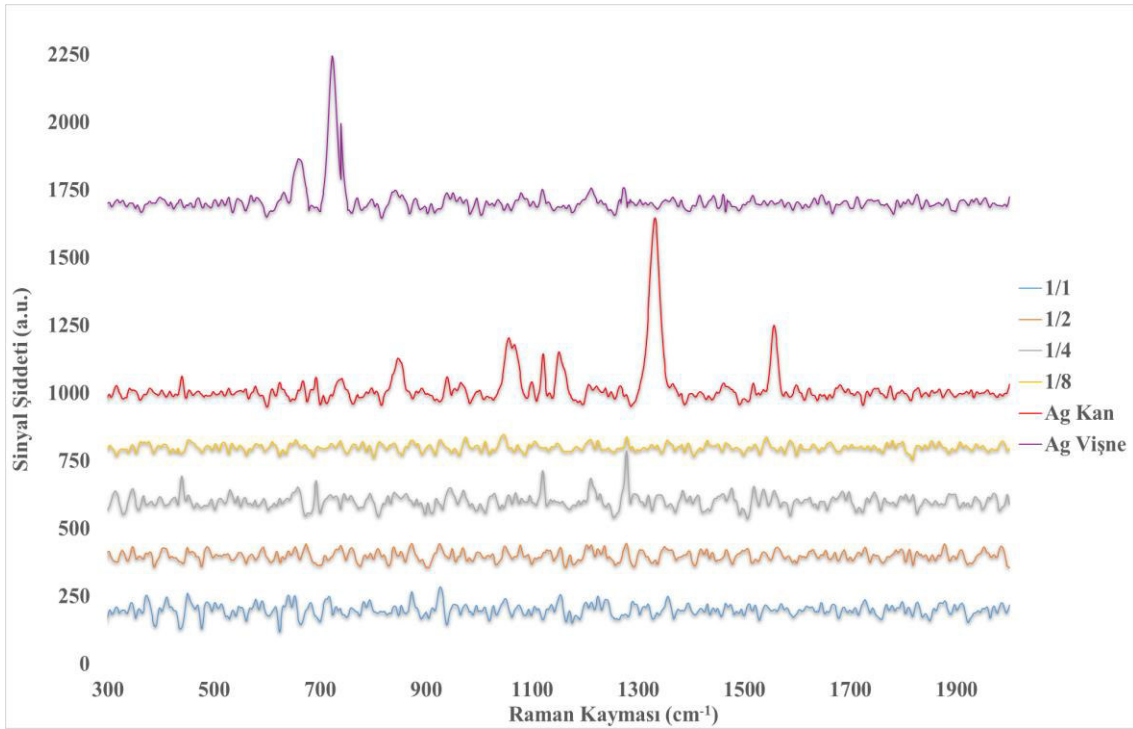
Dört farklı derişimde hazırlanan kan lekesinin hacimce eşit oranda vişne suyu ile karıştırıldığı durum için spektrumlar alınmıştır. Sonrasında karışımlara yine hacimce aynı oranda gümüş nanopartikül ve altın nanoçubuk ayrı ayrı damlatılmış bir saatlik kurumaya bırakıldıktan sonra SERS spektrumları alınmış ve karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmayla en etkili sinyal güçlendirici nanoparçacığın belirlenmesi hedeflenmiştir.

Düşük intansiteye sahip ancak tekrarlanabilir belirgin pik içeren Raman kaymaları belirlendikten ve yüzeyden gelen bantlar ayrıldıktan sonra kan-vişne suyu karışımında kan numunesi için elde edilen spektrum sırasıyla 950 ve 1043 cm^{-1} ’de daha yüksek sinyal/gürültü oranına sahip iki bant göstermiştir (Şekil 4.6.). En yüksek sinyal şiddetlerinin kanın 1/4 oranında seyreltilmiş olduğu karışım için olduğu belirlenmiştir. Bu durumun kanın bu seyreltme oranında yüzey ile yapmış olduğu etkileşimlerden ya da moleküler yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. Elde edilen sinyaller kanın tek başına analiz edildiği spektrumlarla ve literatürdeki benzer çalışmalarla uyumludur [1,116,158-172]. Ancak literatürde kana ait Raman spektrumlarında görülen sinyallerin

birçoğu floresans etkisi nedeniyle görülememiştir. Ek olarak, 658 ve 741 cm^{-1} 'de zayıf iki pik gözlemlenmiştir. Vişne suyu için yapılan Raman analizleri ile literatürde vişne ve meyve suları için yapılan kısıtlı çalışmalar ve yapısının da bulunan askorbik asite ilişkin çalışmalar incelendiğinde gözlenen iki sinyalin vişne suyuna ait olduğuna kanaat getirilmiştir [173,174]. Kan ve Vişne suyu için elde edilen Raman sinyalleri Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kan ve vişne suyu karışımı Raman spektrum pikleri.

Kan Raman Spektrum Pikleri (cm^{-1})	Şiddet Seviyesi	Vişne Suyu Raman Spektrum Pikleri (cm^{-1})	Şiddet Seviyesi
927	Zayıf	658	Zayıf
950	Orta	741	Zayıf
1043	Orta		
1356	Zayıf		
1625	Zayıf		



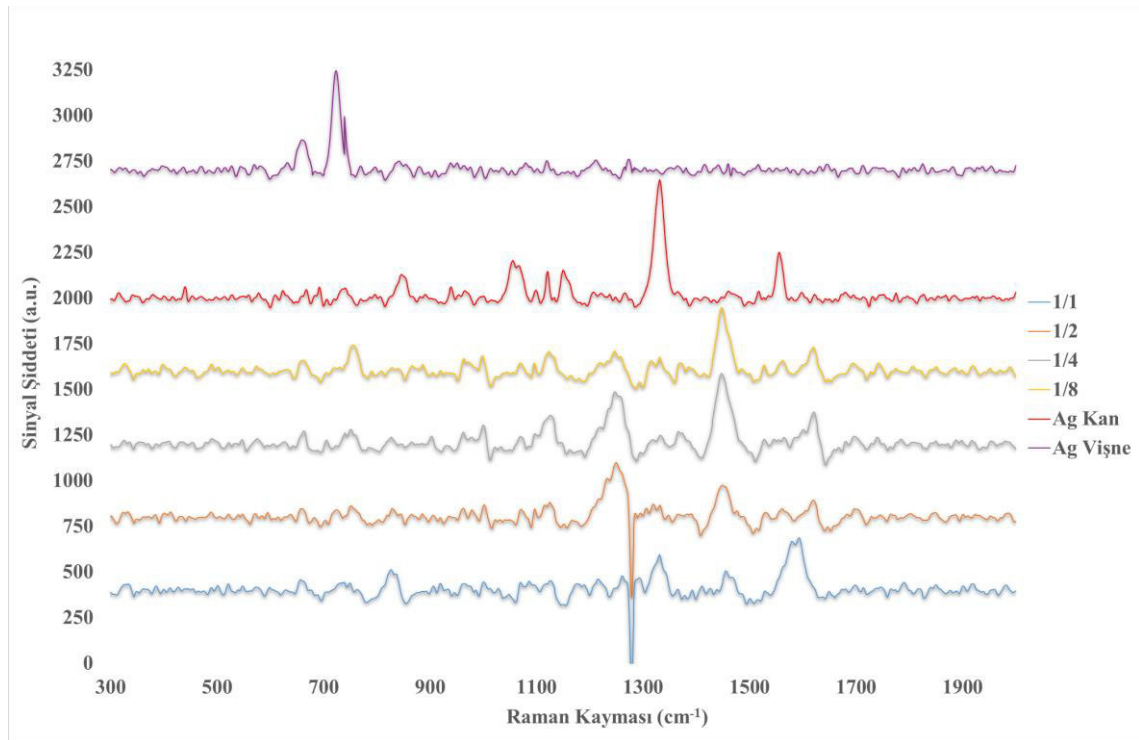
Şekil 4.6. Kan (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve vişne suyu karışımı Raman spektrumu.

Hazırlanan karışımlara AuNRs eklenmesi sonrasında alınan SERS spektrumları Şekil 4.7.'de verilmektedir. AuNRs katkısıyla birlikte sinyal şiddetlerinde belirgin bir artış gözlemlenmiş olup hem kan hem de vişne suyuna ait pikler görülmüştür. Kan için 956, 1246 ve 1620 cm^{-1} 'de, vişne suyu için ise 725 ve 740 cm^{-1} 'de intansitesi yüksek sinyaller

gözlenmiştir. Bunlar haricinde kan için literatürle uyumlu zayıf sinyaller de gözlemlenmiştir. Çizelge 4.2.'de AuNRs eklenmiş kan-vişne suyu karışımı için elde edilen bantlar verilmiştir.

Çizelge 4.2. Altın nanoçubuk katkılı kan ve vişne suyu karışımı SERS pikleri.

Kan SERS Spektrum Pikleri (cm ⁻¹)	Şiddet Seviyesi	Vişne Suyu SERS Spektrum Pikleri (cm ⁻¹)	Şiddet Seviyesi
956	Güçlü	658	Zayıf
1000	Orta	725	Güçlü
1246	Güçlü	740	Güçlü
1460	Zayıf		
1592	Orta		
1620	Güçlü		



Şekil 4.7. AuNRs katkılı kan (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve vişne suyu karışımı SERS spektrumu.

Altın nanoçubuk eklenmiş karışımında SERS sinyalleri doğrudan derişimle orantılı olarak artmamış, bazı piklerin şiddetinin kan seyreltildikçe arttığı görülürken bazılarının da kanın saf halde olduğu durumda intansitenin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bunun sebebi olarak AuNRs ile yüzey arasındaki etkileşimlerin belirli bant değerleri için farklı tepki verebilmesi söylenebilir. Ayrıca bazı bantlarda şiddet artmışken bazı bantlarda azalmalar

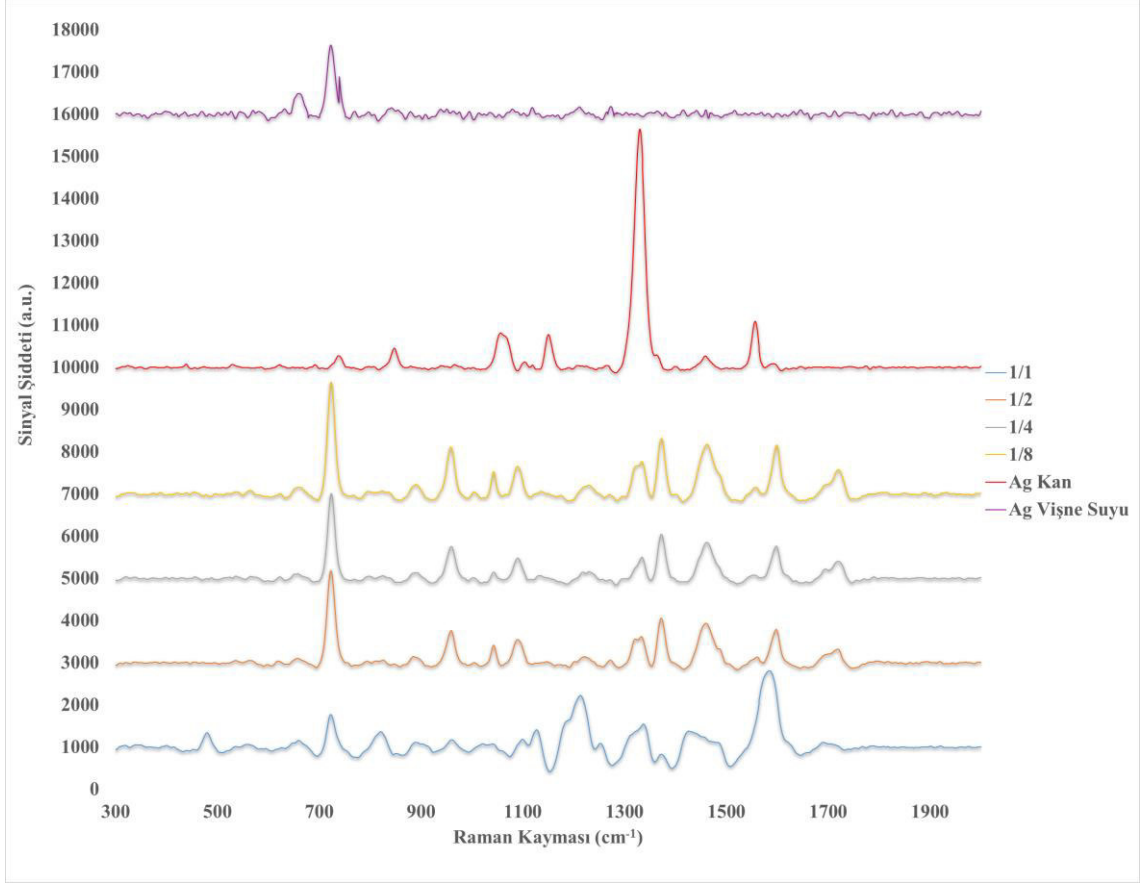
görülmesi kanın farklı seyreltme durumları için hazırlanan karışımlardaki homojeniteden, nanoçubuk etkileşiminden, substrattan ve optik koşullardan kaynaklanmaktadır [175-177].

Son aşamada kan-vişne suyu karışımlarına gümüş nanopartiküller eklenmiş, altın nanoçubuk katkılanmasına benzer şekilde bir saatlik kuruma süresi sonrasında SERS spektrumları alınmıştır. Elde edilen spektrumlarda floresans etkisinin baskılandığı gürültü oranlarının minimize hale geldiği, kan ve vişne suyuna ait spektrum bantlarının güçlü şekilde görüldüğü belirlenmiştir. AgNPs eklenen karışıma ait spektrum kan için altı, vişne suyu için dört tane güçlü bant göstermiştir (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. Gümüş nanopartikül katkılı kan ve vişne suyu karışımı SERS pikleri.

Kan SERS Spektrum Pikleri (cm ⁻¹)	Şiddet Seviyesi	Vişne Suyu SERS Spektrum Pikleri (cm ⁻¹)	Şiddet Seviyesi
959	Güçlü	658	Orta
1000	Orta	724	Güçlü
1043	Güçlü	1334	Güçlü
1231	Güçlü		
1373	Güçlü		
1462	Güçlü		
1600	Güçlü		
1723	Güçlü		

Gümüş nanopartikül eklendiği durumda SERS spektrumlarının intansitelerinde görülen büyük artış kanın seyreltildiği durumlar için çok daha fazla olmuştur. Altın eklenmesiyle oluşan spektrumlara benzer şekilde gümüş için de bazı Raman kaymalarında kanın saf halde olduğu durum için daha yüksek intansiteli sinyaller olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. AgNPs katkılı kan (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve vişne suyu karışımı SERS spektrumu.

Gümüş nanopartikülleri kullanarak kan-vişne suyu için yapılan SERS analizi sonucu elde edilen spektrumların önceki yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu görülmektedir [1,116,158-172].

Gümüş nanopartiküllerin yüzeyinde oluşan plazmonik etkiler, Raman saçılma sinyallerini altın nanoçubuğa göre daha yüksek oranda güçlendirmiştir. Altın nanoçubuk ve gümüş nanopartikülün kan lekesinin karmaşık bir olay yerinde SERS ile tespitinde kullanılabilceği değerlendirilmektedir. Elde edilen spektrumlar doğrultusunda daha kesin bir tespit için gümüş nanopartikülün kullanılmasının avantajlı olduğu görülmektedir. Kan ve vişne suyu karışımının SERS spektrumlarında görülen güçlü pikler; nanopartikül katkısız, AuNRs ve AgNPs katkılı durumlar için Çizelge 4.4.'te toplu olarak gösterilmektedir. Spektrum verileri hem kan hem meyve suyu için en az iki tane belirgin pik elde edildiğini göstermektedir. Kan ve vişne suyu için elde edilen Raman saçılma noktaları birbirleriyle uyumludur.

Çizelge 4.4. Kan ve vişne suyu için elde edilen SERS pik noktaları.

Kan			Vişne Suyu		
Karışım	AuNRs Katkılı Karışım	AgNPs Katkılı Karışım	Karışım	AuNRs Katkılı Karışım	AgNPs Katkılı Karışım
950	956	959	658	658	658
1043		1043		725	724
	1246	1231			1334
		1373			
1462	1460	1462			
	1620	1600			
		1723			

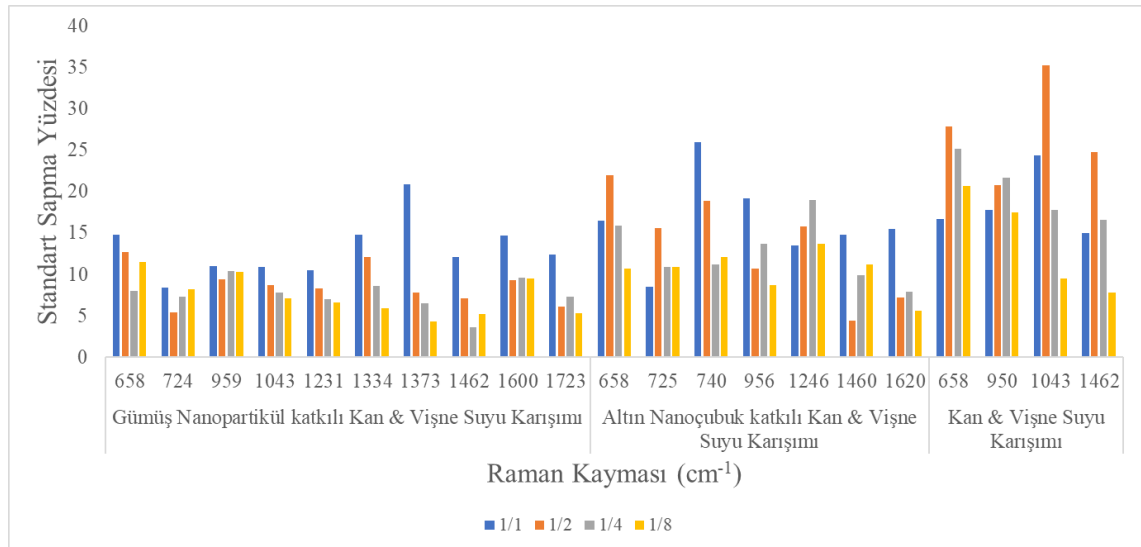
AuNRs ve AgNPs eklenen kan-vişne suyu SERS spektrumlarında elde edilen güçlü sinyallerin farklı olduğu görülmektedir. Bu farklılıklar önceki bölümlerde de anlatılan aşağıdaki nedenlerden kaynaklanabilir [177-179]:

1. Nanoparçacık Malzemesi/Yüzey Plazmon Rezonansı: Altın nanoçubuk ve gümüş nanopartiküllerin yüzey plazmon rezonansları farklıdır. Her iki metalin de yüzey plazmon rezonansı belirli bir dalga boyunda en etkili olduğu için, AuNRs ve AgNPs yüzeylerindeki elektromanyetik etkileşimlerin dalgaboyları farklı olabilir. Bu, AuNRs ve AgNPs yüzeylerinde SERS sinyallerinin farklı dalga boyu bölgelerinde güçlü olmasına neden olabilir.
2. SERS Aktif Bölge: Altın ve gümüş nanopartiküllerin yüzeylerindeki SERS aktif bölgelerin özellikleri farklıdır. Bu bölgelerin morfolojisi, büyüklüğü ve yapısal özellikleri SERS sinyallerini etkileyebilir. Örneğin, altın ve gümüş nanopartiküllerin çapları farklı ise, SERS etkinliği de farklı olabilir.
3. Elektromanyetik Alan Yoğunluğu: AuNRs ve AgNPs yüzeylerinde elektromanyetik alanlar farklı yoğunluklarda olabilir. Altın ve gümüş nanopartiküllerin yüzeylerindeki elektromanyetik alanlar, nanopartikül boyutu, şekli ve düzenlemesi gibi

faktörlere bağı olarak değişebilir. Bu nedenle, AuNRs ve AgNPs yüzeylerindeki elektromanyetik alanların yoğunluğu, SERS sinyallerinin farklı yoğunluklarda ve farklı dalga boylarında olmasına neden olabilir.

4. Moleküler Etkileşimler: AuNRs ve AgNPs, moleküllerle farklı kimyasal etkileşimler gösterebilir. Bazı moleküller altın nanopartiküllerle daha iyi etkileşebilirken, diğerleri gümüş nanopartiküllerle daha iyi etkileşebilir. Bu kimyasal etkileşimler, SERS sinyallerinin gücünü ve dalga boyunu etkileyebilir.

Sonuç olarak, AuNRs ve AgNPs SERS spektrumlarında farklı güçlü sinyaller elde etmemizin nedeni, bu metallerin özellikleri, yüzey plazmon rezonansları, elektromanyetik alan yoğunluğu ve moleküler etkileşimleri arasındaki farklılıklardır. Bu farklılıklar, SERS spektrumlarının farklı olmasına yol açar.



Şekil 4.9. SERS spektrumlarının standart sapma yüzdeleri (a) kan ve vişne suyu karışımı (b) AuNRs katkı (c) AgNPs katkı.

Elde edilen spektrumlardaki tekrarlanabilirliği görmek amacıyla her numune için 10 noktadan alınan spektrumlarının ortalama standart sapma yüzdeleri hesaplanarak Şekil 4.9.'da verilmiştir.

SERS spektrumları için belirli bir ortalama standart sapma değeri vermek zordur çünkü bu değer, substratın kalitesi, gelen lazerin gücü ve incelenen analitin türü gibi çeşitli faktörlere bağı olarak değişebilir. Bununla birlikte, genel olarak Raman sinyalinin substratın ve nanopartiküllerin plazmonik özellikleri tarafından artırılması nedeniyle SERS spektrumlarının standart sapmasının nispeten düşük olması beklenir. Bazı

çalışmalarda %1-7 aralığında standart sapma değerleri rapor edilmiştir ancak bu çalışmalarda genellikle spektrumun tamamı değil, yalnızca beklenen sinyal dalga boyları dikkate alınmıştır. Rastgele seğilen dalga boylarında standart sapma yüzdesi %30'a kadar çıkmaktadır [162,180-183].

şekil 4.9. incelendiğinde hem gümüş nanoparçacık hem de altın nanoçubuk eklenen karışımlar için standart sapma yüzdesi %3-4'e kadar düşmektedir. Sadece kan ve vişne suyu içeren karışım için ortalama %20 civarında bir standart sapma gözlenmektedir. Kan konsantrasyonu yüksek olduğunda standart sapmanın genel olarak artma eğiliminde olduğu gözlenmiştir. Buna neden olabilecek etmenler aşağıda verilmektedir.

1. Saçılma Yoğunluğu: Yüksek konsantrasyonlarda, saçılma olayları artar ve bu, analizde daha fazla varyasyona yol açabilir. SERS analizi, moleküllerin yüzey plazmonları tarafından güçlendirilen Raman saçılma olaylarını kullanır. Bu olaylar yüksek konsantrasyonlarda daha sık meydana gelir, bu da daha fazla varyasyona yol açabilir.

2. Rezonans Etkisi: SERS, yüzey plazmonlarıyla etkileşime giren moleküllerin Raman saçılmasını artırır. Yüksek konsantrasyonlarda, yüzey plazmonları daha fazla moleküle etkileşebilir, bu da Raman sinyalinde daha fazla dalgalanmaya neden olabilir.

3. Yüzey Heterojenitesi: SERS yüzeyleri, yüzey plazmonları etkisi altında Raman sinyallerini artırmak için kullanılır. Ancak yüzeylerdeki heterojenlik, yüksek konsantrasyonlarda daha fazla varyasyona yol açabilir. Farklı bölgelerde farklı yüzey plazmonları meydana gelebilir ve bu da standart sapmanın artmasına neden olabilir.

4 Örtüşme ve İnterferans: Yüksek konsantrasyonlarda, moleküller arasındaki örtüşme ve interferans etkileri daha fazla belirgin olabilir. Bu, Raman sinyalinin karmaşıklığını artırabilir ve analizde daha fazla varyasyona yol açabilir.

Sonuç olarak, yüksek konsantrasyona sahip biyolojik sıvılarda SERS analizi sırasında yüksek standart sapma gözlemlenebilir, çünkü yüksek konsantrasyonlar daha fazla saçılma olayına, rezonans etkisine, yüzey heterojenliğine ve örtüşme/interferansa yol açabilir.

4.2.1.1. Kemometrik Analiz

Kan ve vişne suyu özelinde sonuçların kemometrik analizi gerçekleştirilmiştir. Verilerin kemometrik analizi için MATLAB yazılımı (Mathworks Inc. Natick, MA) ve

PLS_Toolbox sürüm 8.2 (Eigenvector Research, Inc. Manson, WA) kullanılmıştır. Kan örneklerinin ayrımı için Temel Bileşen Analizi (PCA) ve Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analizi (PLS-DA) uygulanmıştır. PLS-DA yöntemi, özellikle (i) karışımdaki kan örnekleri ve (ii) Gümüş nanopartikül (AgNPs) ile zenginleştirilmiş karışımdaki kan örneklerinin ayırımında kullanılmış olup, bu ayrımı gerçekleştirmek için veriler 3:1 oranında eğitim ve test veri setlerine ayrılmıştır.

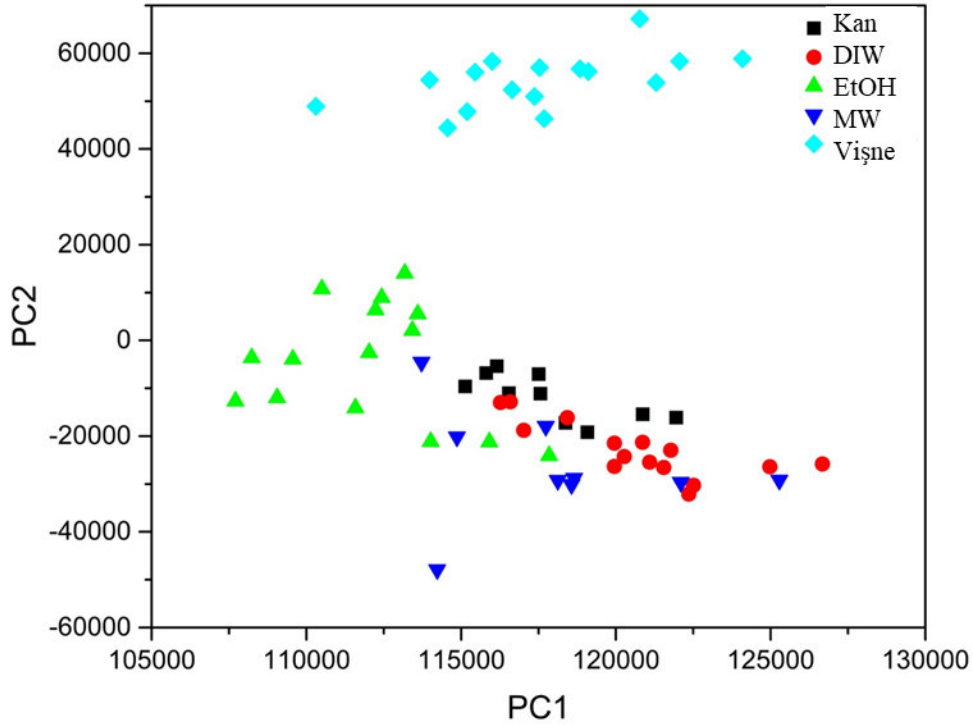
Ayrıca, PLS-DA ayırımının performansını değerlendirmek için duyarlılık oranı (STR, %), özgüllük oranı (SPR, %) ve model verimlilik oranı (EFR, %) doğru pozitif oranı (TPR), yanlış negatif oranı (FNR), doğru negatif oranı (TNR) ve yanlış pozitif oranı (FPR) gibi ölçütler kullanılmıştır.

$$STR = TPR / (TPR + FNR)$$

$$SPR = TNR / (TNR + FPR)$$

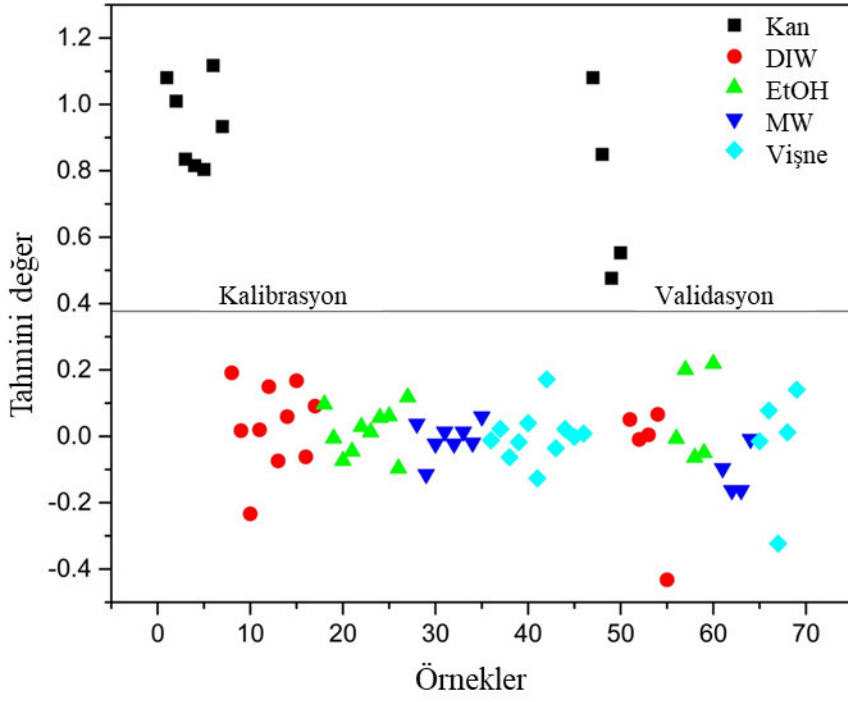
$$EFR = 100 - (FPR + FNR)$$

Kan örneklerini ayırt etmek için PCA yöntemi kullanılmıştır. Burada analizi güçlendirmek adına kanın distile su yanında, etanol ve maden suyu ile karıştırıldığı karışımların da spektrumları alınmış ve kemometrik analizlere dahil edilmiştir. Bu amaçla iki farklı PCA modeli oluşturulmuştur. Distile su (DIW), etanol (EtOH), maden suyu (MW) ve vişne suyu ile karıştırılmış kan örneklerinin PCA yöntemi kullanılarak ayrımı denenmiştir. Bu çalışmada vişne suyu ve etanol ile karıştırılmış kan örnekleri birbirinden ayırt edilebilirken, distile su, maden suyu ve tek başına kan örneklerinin ayrımı yapılamamıştır (Şekil 4.10.).

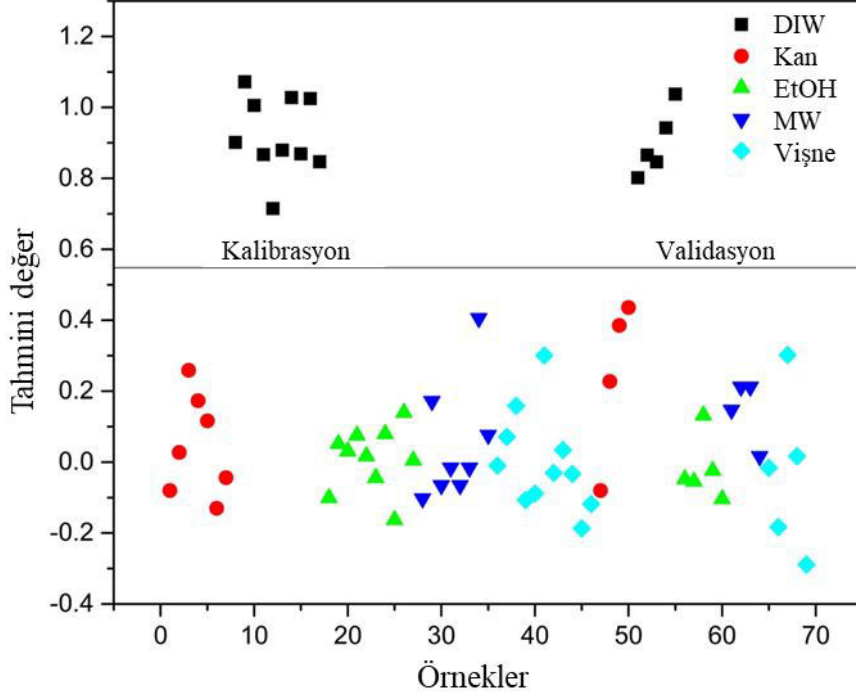


Şekil 4.10. Kan örneklerinin ayrımı için PCA modeli. PC 1 (%90,06) ve PC2 (%6,73) puanları.

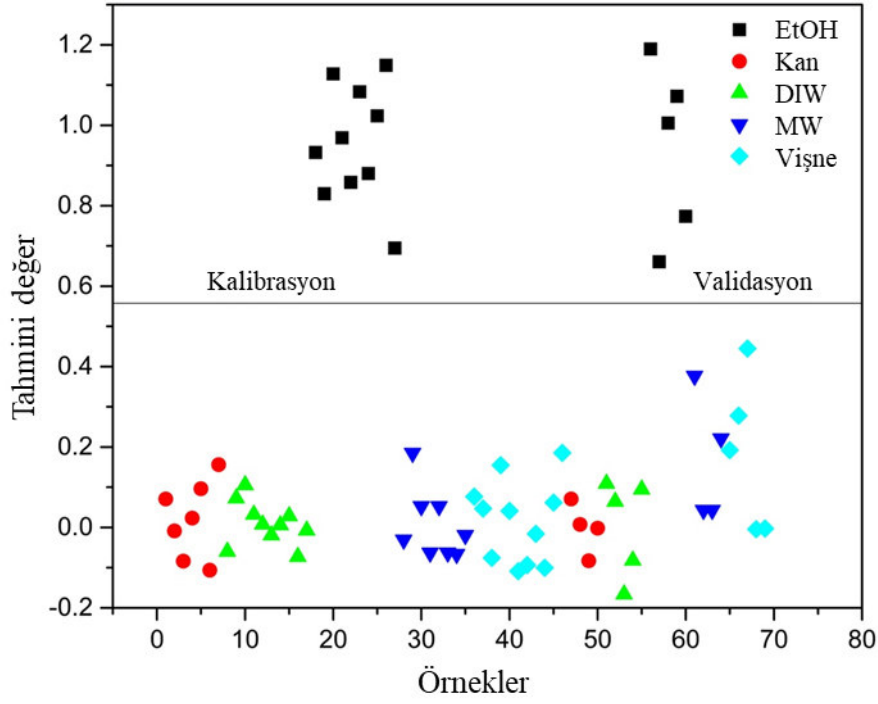
Kan ve işlenmiş örnekler arasındaki ayrımı yapmak için PLS-DA analizi gerçekleştirilmiştir. PLS-DA kullanılarak kan ve karışık örnekler arasında başarılı bir şekilde ayrım sağlanmıştır. Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13., Şekil 4.14. ve Şekil 4.15. sırasıyla kan, kan-DIW, kan-EtOH, kan-MW ve kan-vişne suyu örneklerinin ayrımını göstermektedir. Şekillerde görüldüğü üzere tüm ayrılmalarda model etkinliği %100 olarak gerçekleşmiştir. Şekil 4.16., Şekil 4.17., Şekil 4.18. ve Şekil 4.19.'da AgNPs ile zenginleştirilmiş kan numunelerinin ayrımı gösterilmektedir. Tüm PLS-DA modelleri için performans parametreleri Çizelge 4.5.'te sunulmaktadır.



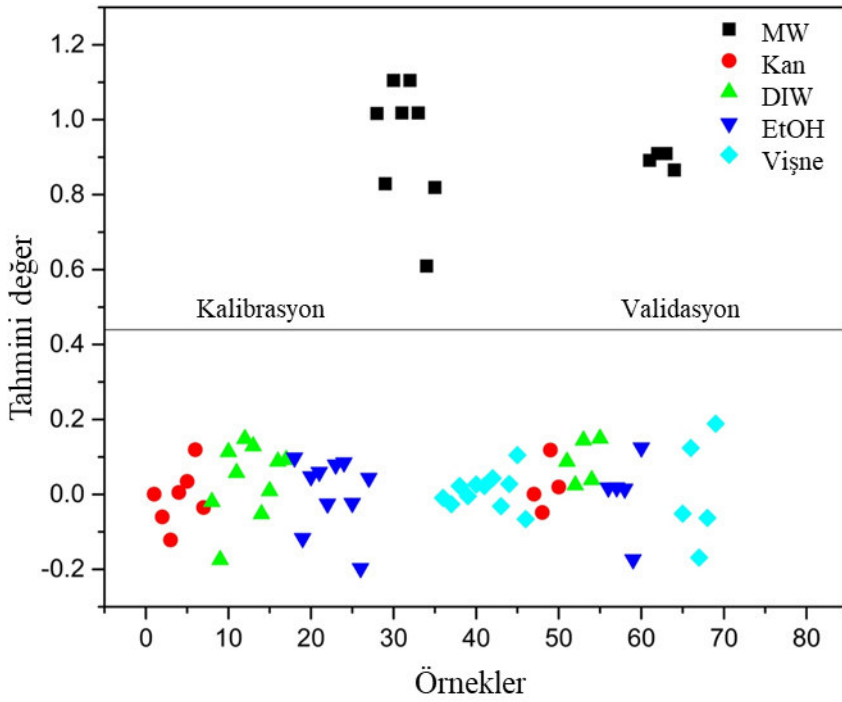
Şekil 4.11. DIW, EtOH, MW ve vişne suyu ile karıştırılmış numunelerden kanın ayırımı.



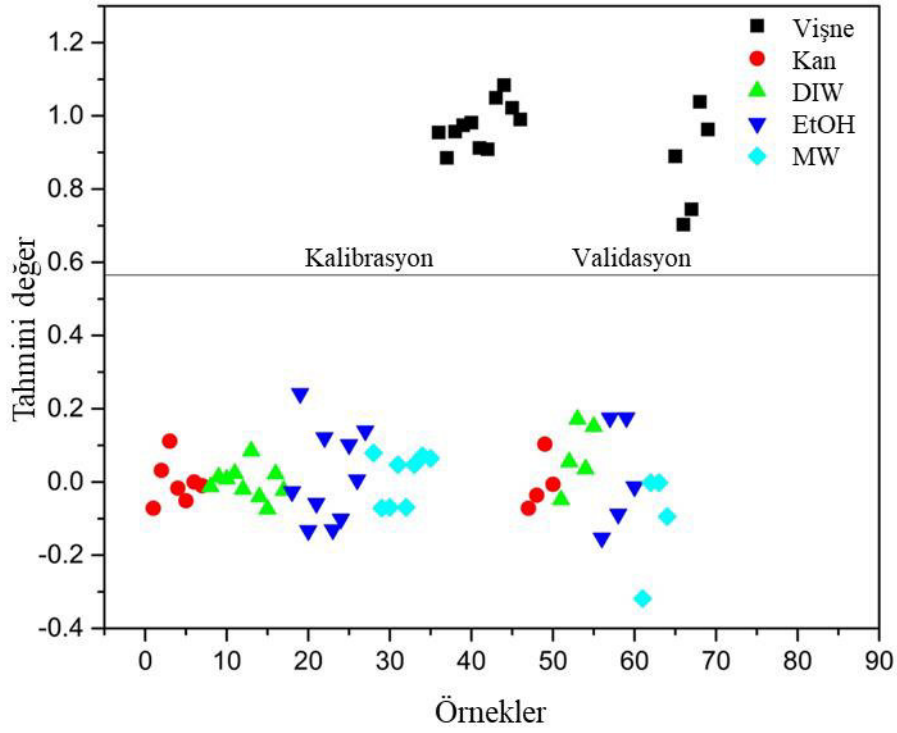
Şekil 4.12. DIW ile karıştırılmış kan örneklerinin kanın kendisinden, EtOH, MW ve vişne suyu ile karıştırılmış diğer kan örneklerinden ayırt edilmesi.



Şekil 4.13. EtOH ile karıştırılmış kan örneklerinin kanın kendisinden ve DIW, MW ve vişne suyu ile karıştırılmış diğer kan örneklerinden ayırt edilmesi.



Şekil 4.14. MW ile karıştırılmış kan örneklerinin kanın kendisinden ve DIW, EtOH ve vişne suyu ile karıştırılmış diğer kan örneklerinden ayırt edilmesi.

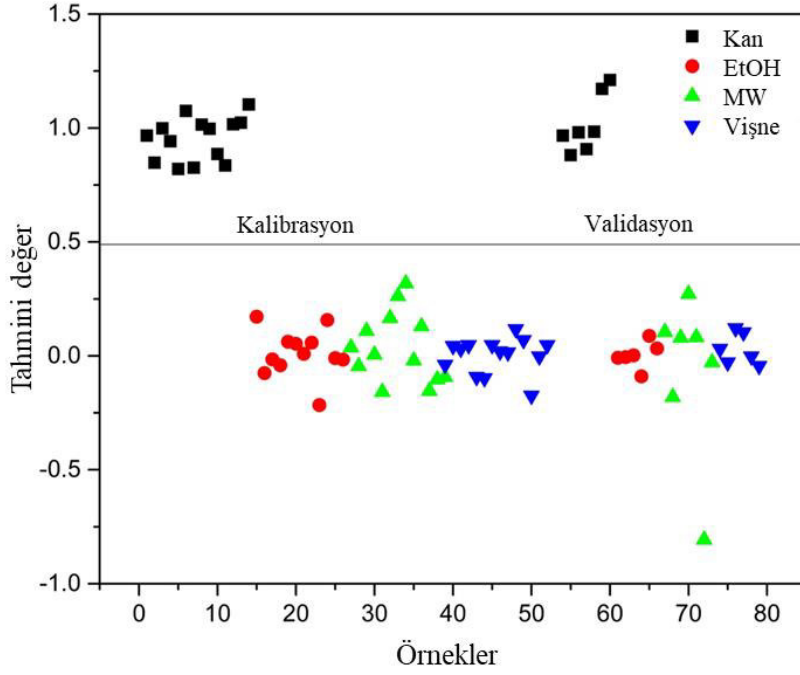


Şekil 4.15. Vişne suyu ile karıştırılmış kan örneklerinin, kanın kendisinden ve DIW, EtOH ve MW ile karıştırılmış diğer kan örneklerinden ayırt edilmesi.

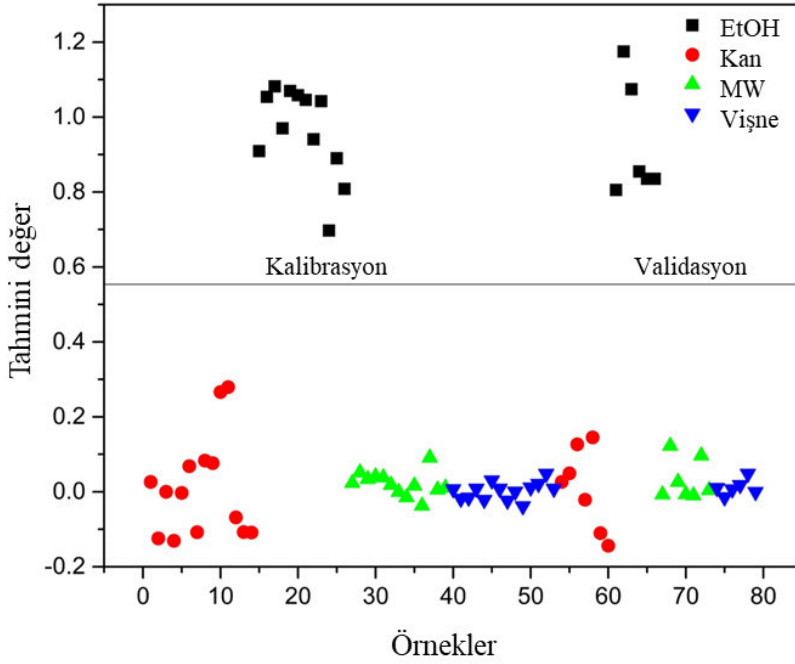
Çizelge 4.5. Kan ve Ag ile zenginleştirilmiş karışımların örneklerin PLS-DA ayrımının performans parametreleri.

	Kan örnekleri	AgNPs ile zenginleştirilmiş kan örnekleri
LV	8	9
REMSEC	0.0943344 ^a 0.131244 ^b 0.0995247 ^c 0.102529 ^d 0.0764618 ^e	0.110098 ^f 0.0910276 ^g 0.127999 ^h 0.0625064 ⁱ
REMSECV	0.176935 ^a 0.26484 ^b	0.208601 ^f 0.104725 ^g

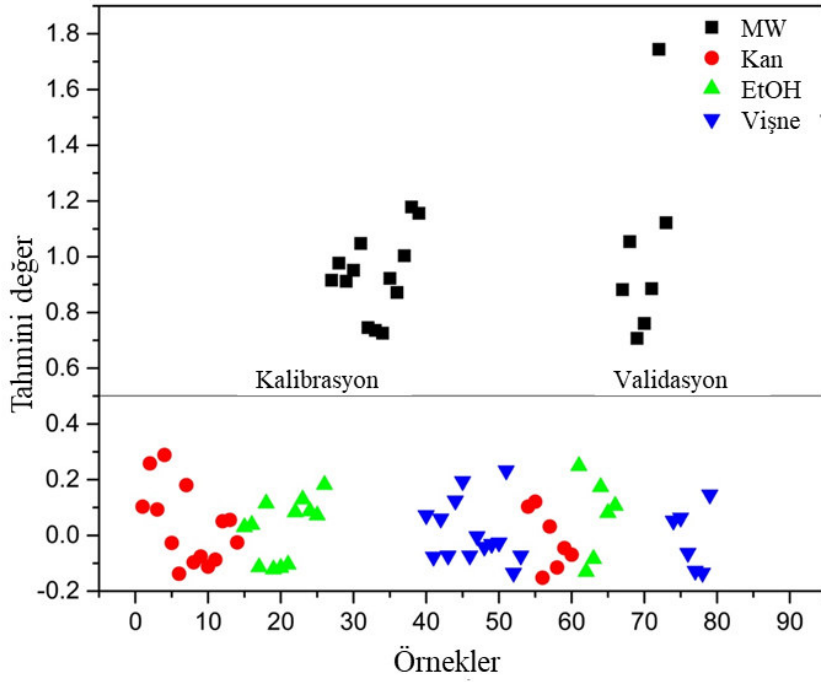
	0.145194 ^c 0.171539 ^d 0.0930372 ^e	0.215246 ^h 0.108111 ⁱ
STR (%)	1 ^a 1 ^b 1 ^c 1 ^d 1 ^e	1 ^f 1 ^g 1 ^h 1 ⁱ
SPR (%)	1 ^a 1 ^b 1 ^c 1 ^d 1 ^e	1 ^f 1 ^g 1 ^h 1 ⁱ
TPR (%)	1 ^a 1 ^b 1 ^c 1 ^d 1 ^e	1 ^f 1 ^g 1 ^h 1 ⁱ
FNR (%)	0 ^a 0 ^b 0 ^c 0 ^d 0 ^e	0 ^f 0 ^g 0 ^h 0 ⁱ
EFR (%)	100 ^a 100 ^b 100 ^c 100 ^d 100 ^e	100 ^f 100 ^g 100 ^h 100 ⁱ
^a kan; ^b kan-DIW; ^c kan-EtOH; ^d kan-MW; ^e kan-vişne suyu; ^f AgNPs-kan; ^g AgNPs-kan-EtOH; ^h AgNPs-kan-MW; ⁱ AgNPs-kan-vişne suyu		



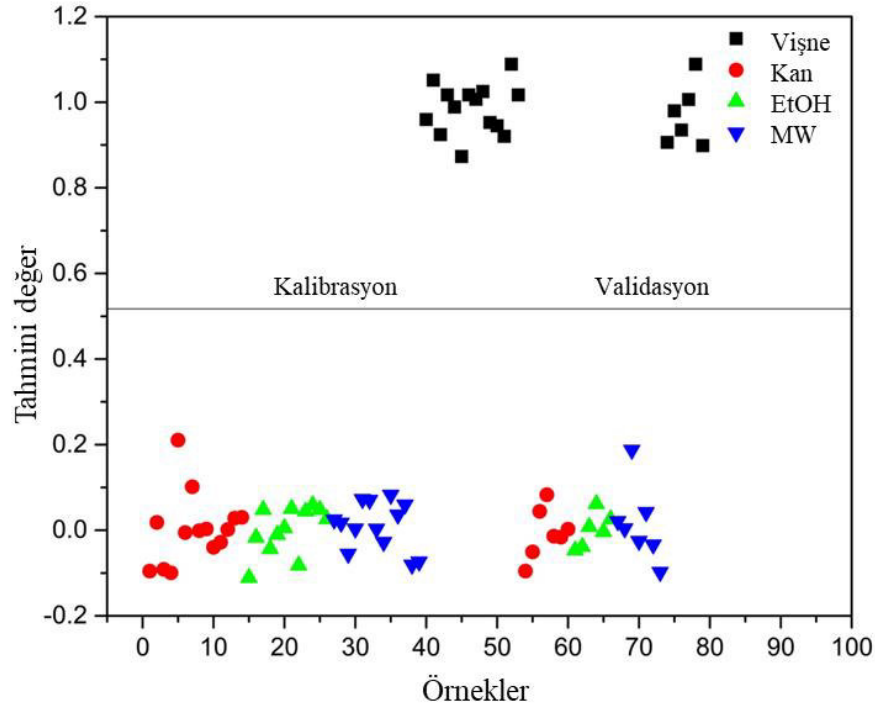
Şekil 4.16. AgNPs-kan örneklerinin, DIW, EtOH, MW ve vişne suyu ile karıştırılmış diğer örneklerden ayırt edilmesi.



Şekil 4.17. EtOH ile karıştırılmış AgNPs-kan örneklerinin, AgNPs katkılı kan, DIW, MW ve vişne suyu ile karıştırılmış diğer örneklerden ayırt edilmesi.



Şekil 4.18. MW ile karıştırılmış AgNPs-kan örneklerinin, AgNPs katkılı kan, DIW, EtOH ve vişne suyu ile karıştırılmış diğer örneklerden ayırt edilmesi.



Şekil 4.19. Vişne suyu ile karıştırılmış AgNPs-kan örneklerinin, AgNPs katkılı kan, DIW, EtOH ve MW ile karıştırılmış diğer örneklerden ayırt edilmesi.

4.2.2. İdrar – Elma Suyu Analizleri

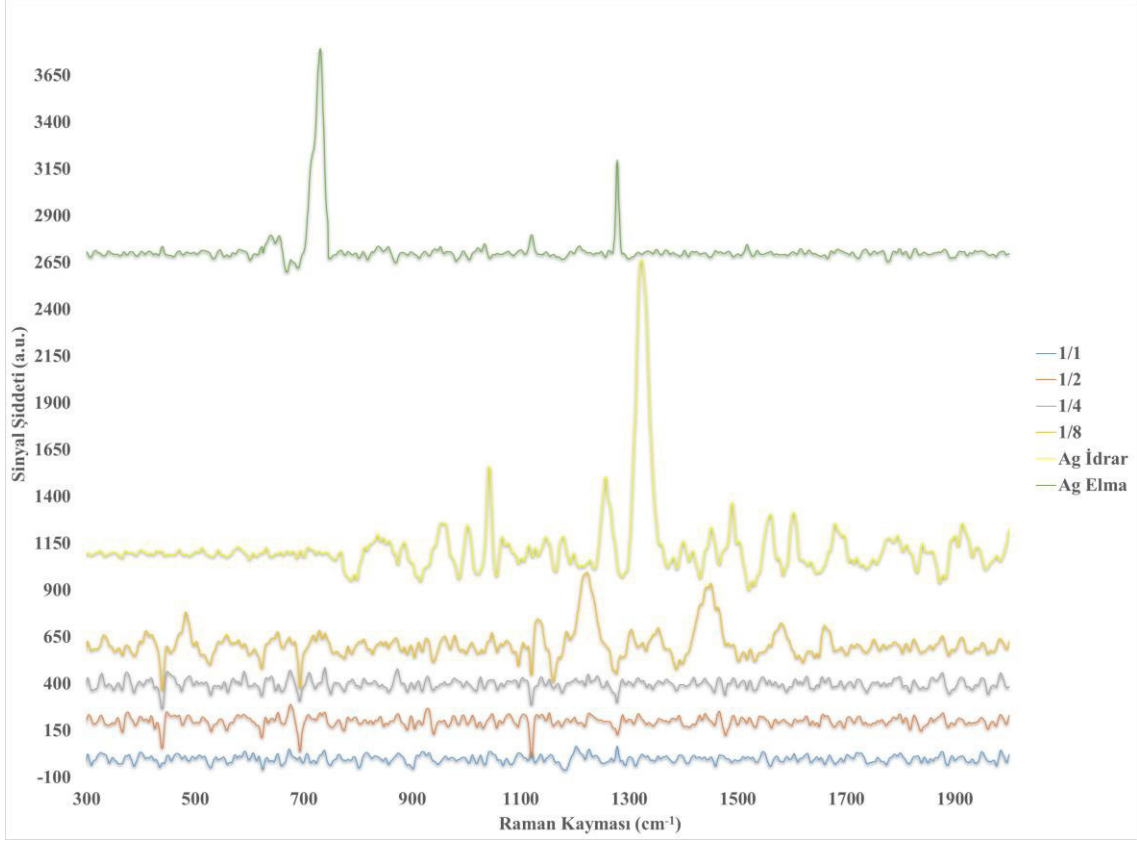
İdrar numunesi dört farklı konsantrasyonda hazırlanmış, hacimce eşit oranda elma suyu ile karıştırıldığı durum için spektrumlar alınmıştır. Bir sonraki aşamada kan-vişne suyu karışımı ile aynı prosedür uygulanmış, karışımlara yine gümüş nanopartikül ve altın nanoçubuk ayrı ayrı hacimce eş olarak damlatılmış kuruma sonrasında SERS spektrumları alınmıştır.

İdrarın seyreltilmesiyle birlikte floresans kaynaklı düşük intansiteye ve sinyal/gürültü oranına sahip olmasına rağmen tekrarlanabilir pikler gözlenmiştir. 1224, 1460 ve 1658 cm^{-1} 'de nispeten daha yüksek sinyal/gürültü oranına sahip üç bant göstermiştir (Şekil 4.20.). İdrarda 1/8 oranında seyretmeye kadar spektrumda gözle görülür bir değişiklik olmamıştır. Ancak 1/8 oranında derişimde idrara ait Raman sinyalleri daha belirgin olarak elde edilmiştir. Elde edilen sinyaller geçmiş çalışmalarla uyumludur [184-192]. Elma suyu için yapılan Raman analizlerinde ise 656 ve 735 cm^{-1} 'de tekrarlanan pikler gözlemlenmiştir. Bir önceki bölümde bahsedildiği üzere literatürde bu konuda kısıtlı çalışma yer almaktadır. Elma suyu ve bileşenleri üzerine yapılmış birkaç çalışma incelendiğinde sonuçların benzer olduğu görülmektedir [193-195]. İdrar-elma suyu karışımına ait spektrumda görülen pikler Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. İdrar ve elma suyu karışımı Raman spektrum pikleri.

İdrar Raman Spektrum Pikleri (cm^{-1})	Şiddet Seviyesi	Elma Suyu Raman Spektrum Pikleri (cm^{-1})	Şiddet Seviyesi
1224	Orta	656	Orta
1460	Orta	735	Orta
1658	Orta		

İdrar-elma suyu karışımında görülen negatif yönlü sinyaller floresans etkisinden kaynaklanmakta olup, NuSpec programıyla düzeltme yapıldıktan sonra yalnızca pozitif yöndeki sinyaller dikkate alınmaktadır. Elde edilen spektrumlara bakarak idrarın derişiminin 1/8 oranına kadar seyreltilmesinin kritik olduğu görülmektedir. İdrarın daha yoğun derişimlerde olduğu analizlerde düşük sinyal/gürültü oranı göze çarpmaktadır. Bu sebeple sinyal zenginleştirme için doğrudan kullanılan bir nanoparçacık olmadığı durumlarda idrarın en az 1/8 oranında seyreltilerek analiz edilmesinin sağlıklı olacağı aşıkardır (Şekil 4.20.).

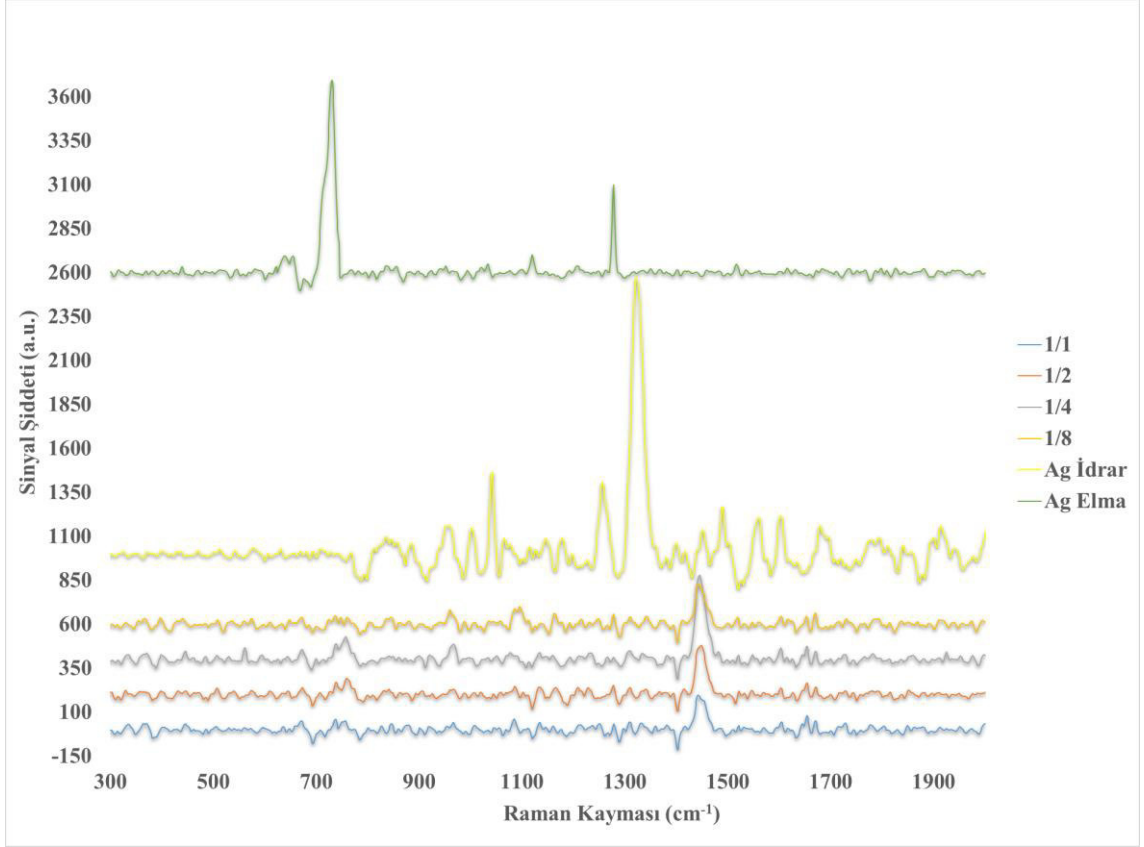


Şekil 4.20. İdrar (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve elma suyu karışımı Raman spektrumu.

İkinci aşamada eklenen AuNRs ile birlikte sinyal seviyesinde önemli ölçüde bir değişim olmamasına karşın gürültü etkisi çok zayıflamıştır ve karışımındaki sıvılara ait Raman saçılmaları net bir şekilde gözlemlenmiştir. AuNRs eklenen karışımlara ait SERS spektrumları Şekil 4.21.'de verilmektedir. İdrar için 962 ve 1654 cm^{-1} 'de, elma suyu için ise 667, 735 ve 1457 cm^{-1} 'de belirgin pikler gözlenmiştir. Çizelge 4.7.'de AuNRs eklenmiş idrar-elma suyu karışımı için elde edilen bantlar verilmiştir.

Çizelge 4.7. Altın nanoçubuk katkılı idrar ve elma suyu karışımı SERS pikleri.

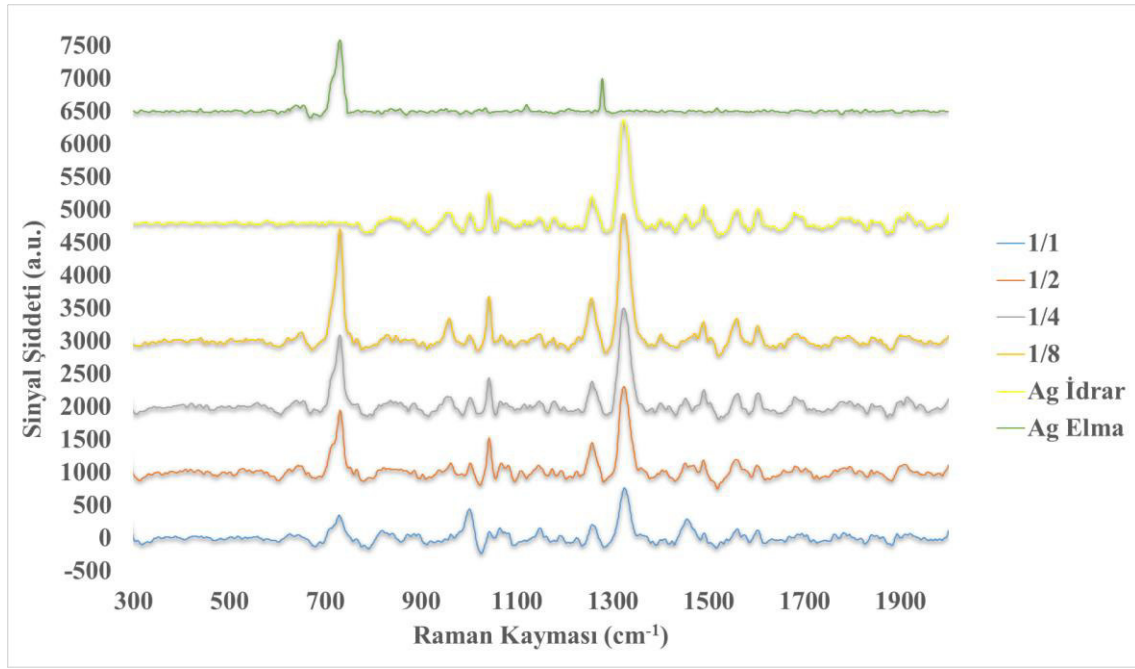
İdrar SERS Spektrum Pikleri (cm^{-1})	Şiddet Seviyesi	Elma Suyu SERS Spektrum Pikleri (cm^{-1})	Şiddet Seviyesi
962	Güçlü	667	Güçlü
1005	Orta	735	Güçlü
1597	Orta	1457	Güçlü
1654	Güçlü		



Şekil 4.21. AuNRs katkılı idrar (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve elma suyu karışımı SERS spektrumu.

AuNRS katkılı SERS spektrumu incelendiğinde hazırlanan karışımındaki homojenitenin kana kıyasla daha iyi olduğu söylenebilir. Şekil 4.21.'de verilen spektrum incelendiğinde SERS sinyallerinin idrar derişimi azaldıkça arttığı görülmektedir.

Üçüncü aşamada karışıma AgNPs eklenmiş ve SERS spektrumları alınmıştır. Nanoparçacık eklenmediği karışıma kıyasla sinyal şiddetlerinde yaklaşık 20-25 katlık bir artış olduğu Şekil 4.22.'de açıkça gözlemlenmektedir.



Şekil 4.22. AgNPs katkılı idrar (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve elma suyu karışımı SERS spektrumu.

Çizelge 4.8. Gümüş nanopartikül katkılı idrar ve elma suyu karışımı SERS pikleri.

İdrar SERS Spektrum Pikleri (cm ⁻¹)	Şiddet Seviyesi	Elma Suyu SERS Spektrum Pikleri (cm ⁻¹)	Şiddet Seviyesi
962	Güçlü	657	Güçlü
1005	Orta	735	Güçlü
1043	Güçlü		
1260	Güçlü		
1330	Güçlü		
1492	Güçlü		
1562	Güçlü		
1607	Orta		

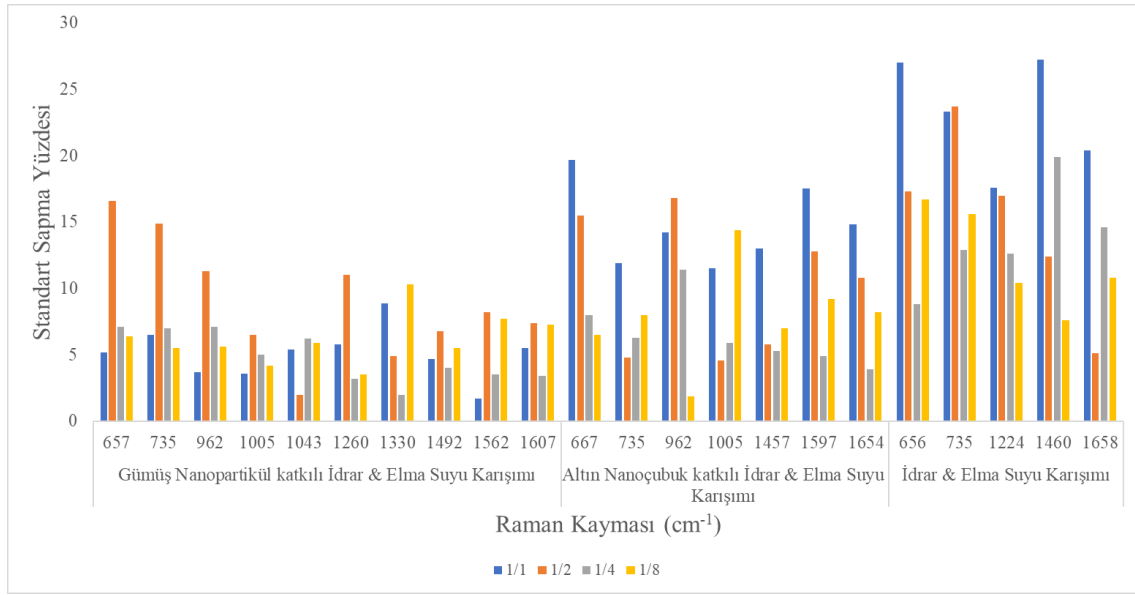
SERS sinyalinin zenginleştirilmesinde gümüş nanopartiküllerin idrar için de altın nanoçubuklara oranla daha başarılı sonuç verdiği görülmektedir. Analizi yapılan idrar ve elma suyuna ait SERS spektrumları literatürdeki benzer çalışmalarla uyumludur [185-195]. İdrar ve elma suyu karışımının SERS spektrumlarında görülen güçlü pikler; nanopartikül katkısız, AuNRs ve AgNPs katkılı durumlar için Çizelge 4.9.'da toplu olarak gösterilmektedir. İdrar ve elma suyunun ayrı ayrı Raman spektrumları, karışım ve nanoparçacık katkılı durumlar incelendiğinde spektrumların birbirleriyle uyumlu olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.9. İdrar ve elma suyu için elde edilen SERS pik noktaları.

İdrar			Elma Suyu		
Karışım	AuNRs Katkılı Karışım	AgNPs Katkılı Karışım	Karışım	AuNRs Katkılı Karışım	AgNPs Katkılı Karışım
	962	962	622		
	1005	1005	662	667	657
1040		1043	735	735	735
		1260		1457	
		1330			
		1492			
		1562			
	1597				
1607		1607			
	1654				

Yapılan analizler neticesinde idrar lekesinin karmaşık bir olay mahalinde SERS ile tespiti için altın nanoçubuk kullanılmasının net sonuç elde edilmesinde riskli olduğu, gümüş nanopartiküllerin ise tespit için kullanılabileceği değerlendirilmektedir. Spektrumlara bakıldığı zaman altın nanoçubuk eklendiği durumda gürültü oranı azalmasına ve sinyal zenginleştirilmesi görülmesine rağmen idrarın 1/8 oranında seyreltildiği durumdaki intansitelere yakın değerler görülmüştür. Bu sebeple floresans etkisini bastırarak sinyal/gürültü değeri oldukça yüksek olan gümüş nanopartikülün idrarın SERS analizi için kullanılması avantajlı konumdadır.

Son olarak alınan spektrumlarının ortalama standart sapma yüzdeleri hesaplanmıştır. Standart sapma yüzdeleri katkısız karışım, AuNRs ve AgNPs eklenmiş durumlar için Şekil 4.23.'te verilmiştir.



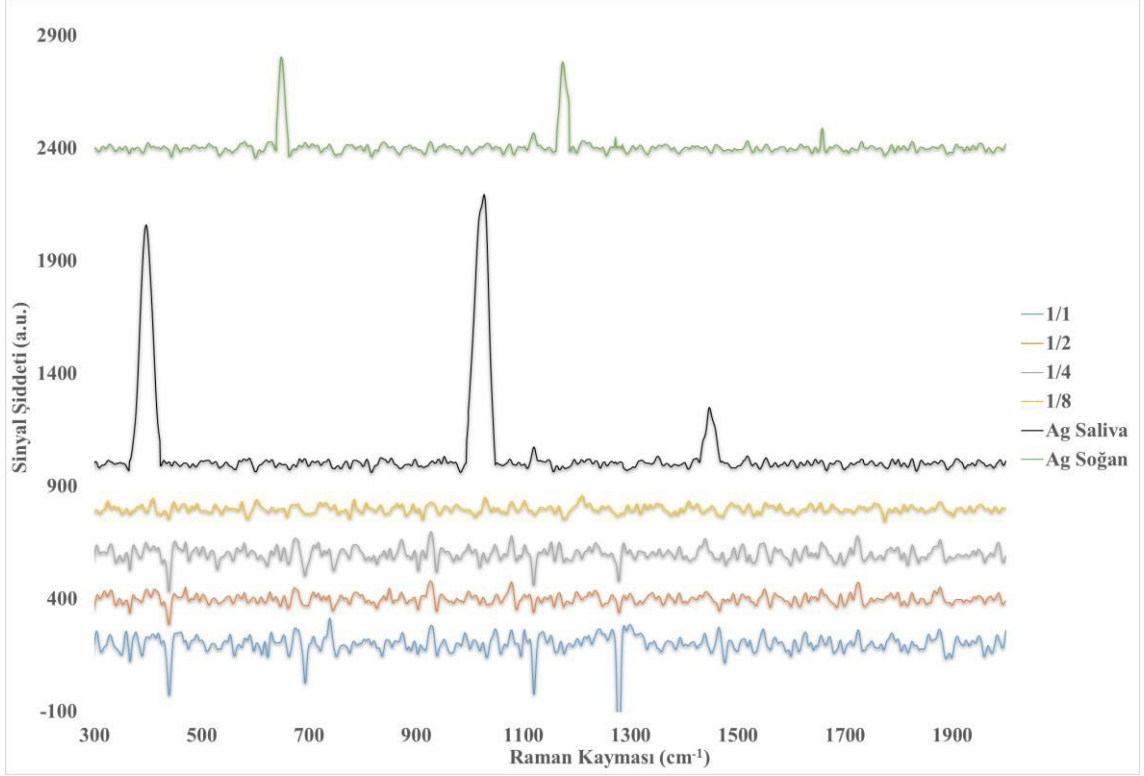
Şekil 4.23. SERS spektrumlarının standart sapma yüzdeleri (a) idrar ve elma suyu karışımı (b) AuNRs katkılı (c) AgNPs katkılı.

İdrardaki standart sapma yüzdelerinin kana oranla daha düşük çıktığı görülmektedir. Özellikle idrarın seyreltilmesiyle beraber standart sapmanın gözle görülür şekilde iyileştiği Şekil 4.23.'te görülmektedir. AgNPs ve AuNRs katkılanan karışımlar için standart sapma yüzdesi %2'ye kadar düşmektedir. Literatürdeki çalışmalarla karşılaştırıldığında elde edilen sapma değerlerinin oldukça iyi olduğu söylenebilir [162,196,197]. Standart sapma yüzdelerindeki dalgalanmaların bir önceki bölümde detayları anlatıldığı üzere konsantrasyon farkından kaynaklı saçılma, rezonans, homojenite ve interferans etkisinden kaynaklanmaktadır.

4.2.3. Saliva – Soğan Suyu Analizleri

Sağlıklı bir bireyden alınan saliva deney prosedürüne uygun olarak dört farklı derişimde hazırlanmıştır. Kendisiyle fiziksel olarak benzerlik gösteren soğan suyu ile hacimce eşit miktarda karıştırılmış ve karışımın spektrumları alınmıştır. Sonrasında AuNRs ve AgNPs eklenen karışımların SERS spektrumları analiz edilmiştir.

Salivanın derişiminin azaltıldığı durumda sinyal şiddetlerinde bir artış gözlenmemiş ancak gürültü seviyesinde ufakta olsa bir azalma meydana gelmiştir. Spektrumların taban çizgisinin düzeltilmesiyle birlikte karışımda 930 ve 1029 cm⁻¹'de salivaya, 651 cm⁻¹'de soğan suyuna ait üç pik görülmüştür (Şekil 4.24.).



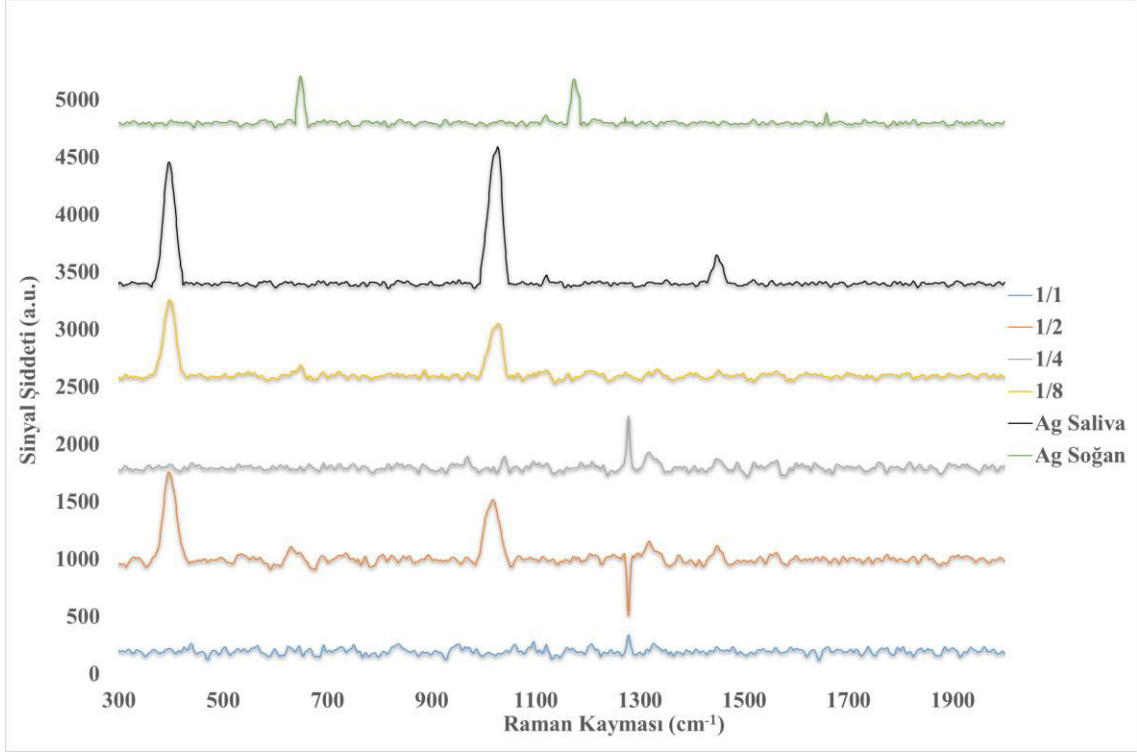
Şekil 4.24. Saliva (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve soğan suyu karışımı Raman spektrumu.

Karışıma ait spektrumdan alınan tekrarlanabilir sinyaller Çizelge 4.10'da verilmektedir. Spektrumdan sonuçla hiçbir nanoparçacık eklenmediği durumlar için saliva-soğan suyu karışımının analizinin yapılması pek sağlıklı görünmemektedir. Nanopartikül eklenmemiş bir durumda yapılacak analiz için salivanın daha fazla seyreltilmesi değerlendirilebilir.

Çizelge 4.10. Saliva ve soğan suyu karışımı Raman spektrum pikleri.

Saliva Raman Spektrum Pikleri (cm ⁻¹)	Şiddet Seviyesi	Soğan Suyu Raman Spektrum Pikleri (cm ⁻¹)	Şiddet Seviyesi
930	Orta	651	Orta
1029	Orta	1724	Zayıf
1445	Zayıf		

AuNRs eklendiği duruma ait SERS spektrumlarında Şekil 4.25.'te görüldüğü üzere oldukça iyi seviyede sinyal zenginleştirilmesi elde edilmiş, gürültü seviyelerinde net bir düşüş gözlemlenmiştir.



Şekil 4.25. AuNRs katkılı salivaya (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve soğan suyu karışımı SERS spektrumu.

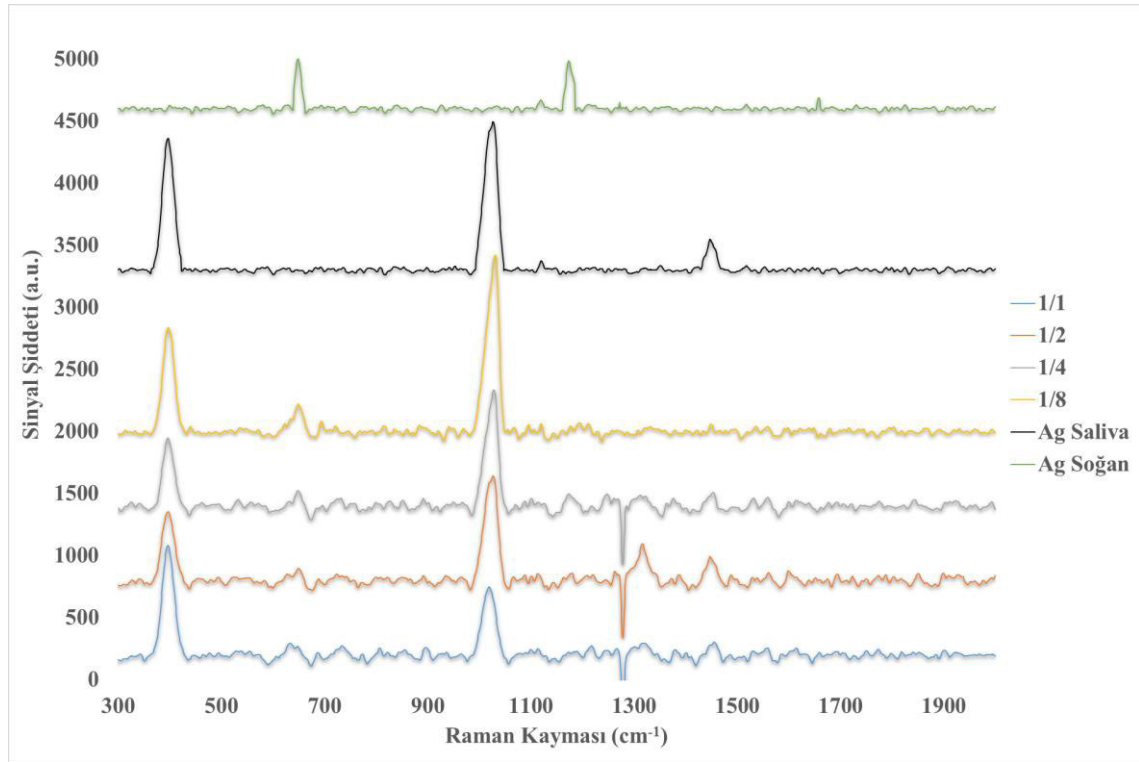
AuNRs eklenen salivaya-soğan suyu karışımları için alınan SERS spektrumlarında salivaya için 398, 1031 ve 1448 cm^{-1} 'de, soğan suyu için 653 cm^{-1} 'de sinyaller alınmıştır. Çizelge 4.11.'de AuNRs eklenmiş salivaya-soğan suyu karışımı için elde edilen tüm pikler verilmiştir.

Çizelge 4.11. Altın nanoçubuk katkılı salivaya ve soğan suyu SERS pikleri.

Salivaya SERS Spektrum Pikleri (cm^{-1})	Şiddet Seviyesi	Soğan Suyu SERS Spektrum Pikleri (cm^{-1})	Şiddet Seviyesi
398	Güçlü	653	Güçlü
1031	Güçlü		
1448	Güçlü		

Sinyal intansiteleri incelendiğinde, nanoparçacık eklenmediği duruma benzer şekilde salivanın derişimindeki değişikliğin bir etkisi olmadığı görülmektedir. Salivanın 1/2 ve 1/8 derişimde olduğu karışımlarda intansiteler birbirine oldukça yakın görünmektedir. Ayrıca bu iki derişimde alınan spektrumlar birbirleriyle benzerlik gösterirken salivanın saf halde analiz edildiği ve 1/4 derişimde hazırlandığı karışım için spektrumlarında daha farklı davranış gözlenmiştir. Bunun sebebi olarak Bölüm 4.2.1.'de detayları verilen plazmon rezonansı ve moleküler etkileşimler olduğu düşünülmektedir. Hazırlanan

karışımlarda olabilecek homojenite problemi ve substrat yüzeyi bu davranışların farklı olmasını tetikleyebilir.



Şekil 4.26. AgNPs katkılı salivaya (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve soğan suyu karışımı SERS spektrumu.

Son aşamada analiz edilen AgNPs ile zenginleştirilmiş SERS spektrumlarında sinyal şiddetinde oldukça 30 kata varan bir artış gerçekleşmiştir (Şekil 4.26.). Elde edilen piklere bakıldığında gümüş nanopartiküllerin yine altın nanoçubuklara oranla daha kuvvetli bir sinyal zenginleştirilmesi sağladığı belirlenmiştir. AgNPs katkılı karışıma ait güçlü pikler Çizelge 4.12.'de verilmektedir.

Çizelge 4.12. Gümüş nanopartikül katkılı salivaya ve soğan suyu SERS pikleri.

Salivaya SERS Spektrum Pikleri (cm ⁻¹)	Şiddet Seviyesi	Soğan Suyu SERS Spektrum Pikleri (cm ⁻¹)	Şiddet Seviyesi
397	Güçlü	649	Güçlü
1031	Güçlü	1168	Güçlü
1447	Güçlü		

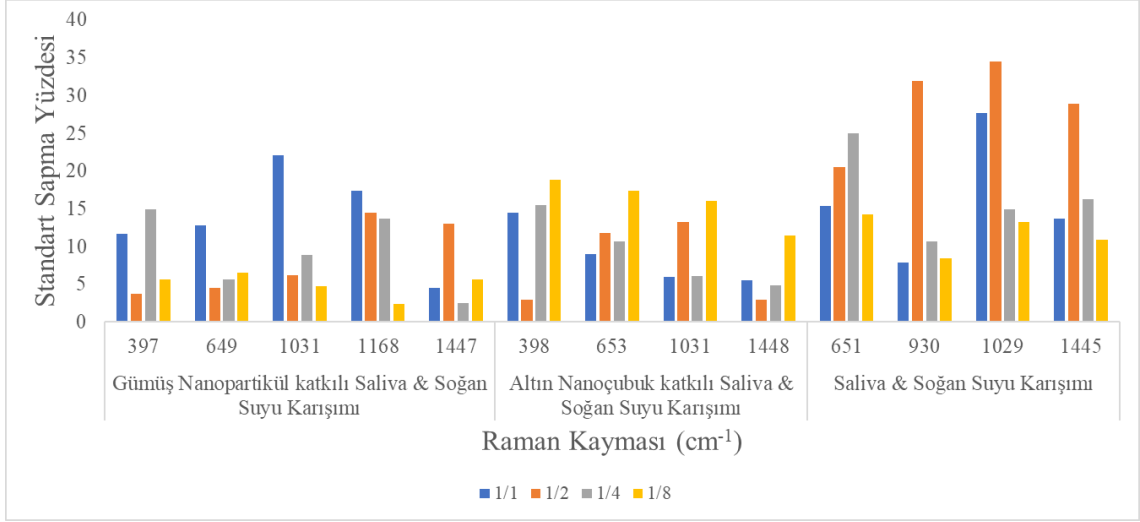
Bu konuda yapılan önceki çalışmalar incelendiğinde salivaya için SERS spektrumlarında görülen bantların bu çalışmalarla uyumlu olduğu gözlemlenmiştir [5,118,166,167,198-201]. Soğan suyu için literatürde yapılan benzer bir çalışma görülmemiştir. Ancak

spektrumdan alınan veriler soğanın saf halde alınan Raman spektrumu (EK-1) ve Palanco ile ark. Tarafından soğan ile yapılan analizlerde görülen piklerle uyumludur [202]. Belirlenen deney prosedürüne uygun olarak saliva-soğan suyu için yapılan üç aşamalı çalışmada ulaşılan spektrumlardaki güçlü sinyaller Çizelge 4.13.'te verilmektedir. Edinilen spektrumlar ışığında altın nanoçubuk ve gümüş nanopartikülün salivanın karmaşık bir olay mahali SERS analizinde sinyal zenginleştirme amacıyla kullanılabileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.13. Saliva ve soğan suyu için elde edilen SERS pik noktaları.

Saliva			Soğan Suyu		
Karışım	AuNRs Katkılı Karışım	AgNPs Katkılı Karışım	Karışım	AuNRs Katkılı Karışım	AgNPs Katkılı Karışım
	398	397	651	653	649
930					1168
1029	1031	1031	1724		
1445	1448	1447			

Standart sapma yüzdelerine bakıldığında salivanın derişim oranı düştükçe sapma yüzdelerinde de azalmalar tespit edilmiştir. Özellikle AgNPs eklenmiş karışım için sapma oranı oldukça makul seviyelerdedir (Şekil 4.27.). Bu açıdan bakıldığında çok fazla sayıda SERS spektrumlarının alınması gereken durumlar için gümüş nanopartikül yine öne çıkmaktadır. Önceki biyolojik sıvıların analizinde olduğu gibi saliva-soğan suyu karışımı için elde edilen standart sapmalarda da değişimler görülse de benzer çalışmalardaki sonuçlarla [198-200] uyumlu olup kan ve idrara oranla daha stabil sonuçlara ulaşılmıştır.

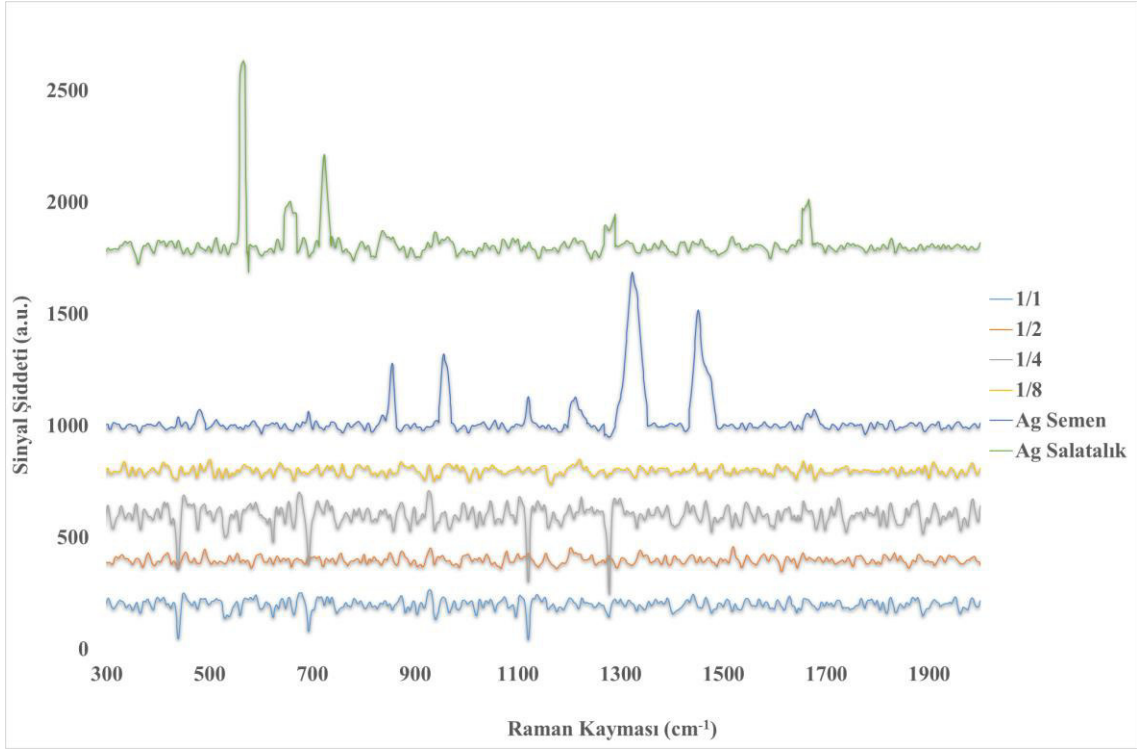


Şekil 4.27. SERS spektrumlarının standart sapma yüzdeleri (a) saliva ve soğan suyu karışımı (b) AuNRs katkılı (c) AgNPs katkılı.

4.2.4. Semen – Salatalık Suyu Analizleri

Son aşamada dördüncü grup olarak belirlenen ve fiziksel benzerlikler gösteren semen ve salatalık suyu karışımları için spektrum analizleri gerçekleştirilmiştir. Öncelikle semenin dört farklı konsantrasyonu ile soğan suyu karıştırılmış, oluşturulan karışımların Raman spektrumlarına bakılmıştır. Önceki aşamalarda da gerçekleştirildiği gibi aynı karışımlara AuNRs ve AgNPs eklenmiş SERS spektrumları incelenmiştir.

Salivadakine benzer durumda semen için de konsantrasyonun düşürüldüğü durumda pik şiddetlerinde bir değişim görülmemiş yalnızca floresans etkisinde bir azalma farkedilmiştir. Semen daha derişik olduğu karışımlarda görülen arka plan yansımaları ve gürültüden kaynaklı anlamsız piklerin seyreltmeyle birlikte önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Karışıma ait spektrumlar Şekil 4.28.'de verilmekte olup taban çizgisinin düzeltilmesiyle birlikte semene ait 1218 cm⁻¹'de bir pik görülmüştür. Salatalık suyu için güçlü olarak nitelendirilebilecek bir sinyal görülmemiştir, ancak salatalık suyunun tek başına yapılan Raman analizleriyle uyumlu (EK-1) sinyallere rastlanmıştır.



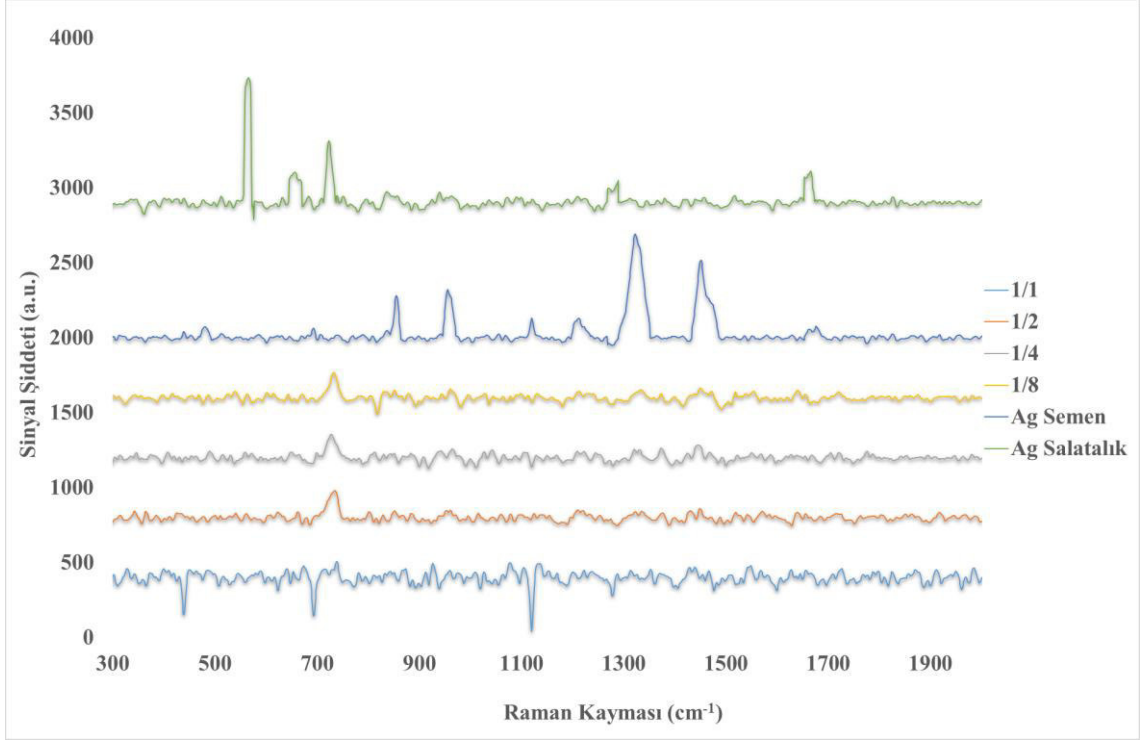
Şekil 4.28. Semen (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve salatalık suyu karışımı Raman spektrumu.

Semen-salatalık suyu karışımına ait spektrumdan elde edilen pikler Çizelge 4.14.'te verilmektedir. Karışıma ait olduğuna kanaat getirilen sinyallerin intansiteleri ve seyreltme sonrası spektrumlarında görülen değişimler göz önüne alındığında semen spektrum analizinin sinyal zenginleştirme olmadan yapılmasının sağlıklı olmadığı değerlendirilmektedir.

Çizelge 4.14. Semen ve salatalık suyu karışımı Raman spektrum pikleri.

Semen Raman Spektrum Pikleri (cm ⁻¹)	Şiddet Seviyesi	Salatalık Suyu Raman Spektrum Pikleri (cm ⁻¹)	Şiddet Seviyesi
488	Zayıf	650	Zayıf
676	Zayıf	730	Zayıf
1218	Orta		
1678	Zayıf		

AuNRs eklenen karışımında, karışımın spektrumunu etkileyen gürültü sinyalleri azaltılmış olsa da sinyal şiddetinde önemli bir artışa ulaşılmamıştır.



Şekil 4.29. AuNRs katkılı semen (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve salatalık suyu karışımı SERS spektrumu.

AuNRs katkılı karışımında 485 cm^{-1} 'de semen, 732 cm^{-1} 'de salatalık suyu için pik gözlenmiştir (Şekil 4.29.). Çizelge 4.15.'te AuNRs eklenmiş saliva-soğan suyu karışımı için elde edilen tüm pikler verilmiştir.

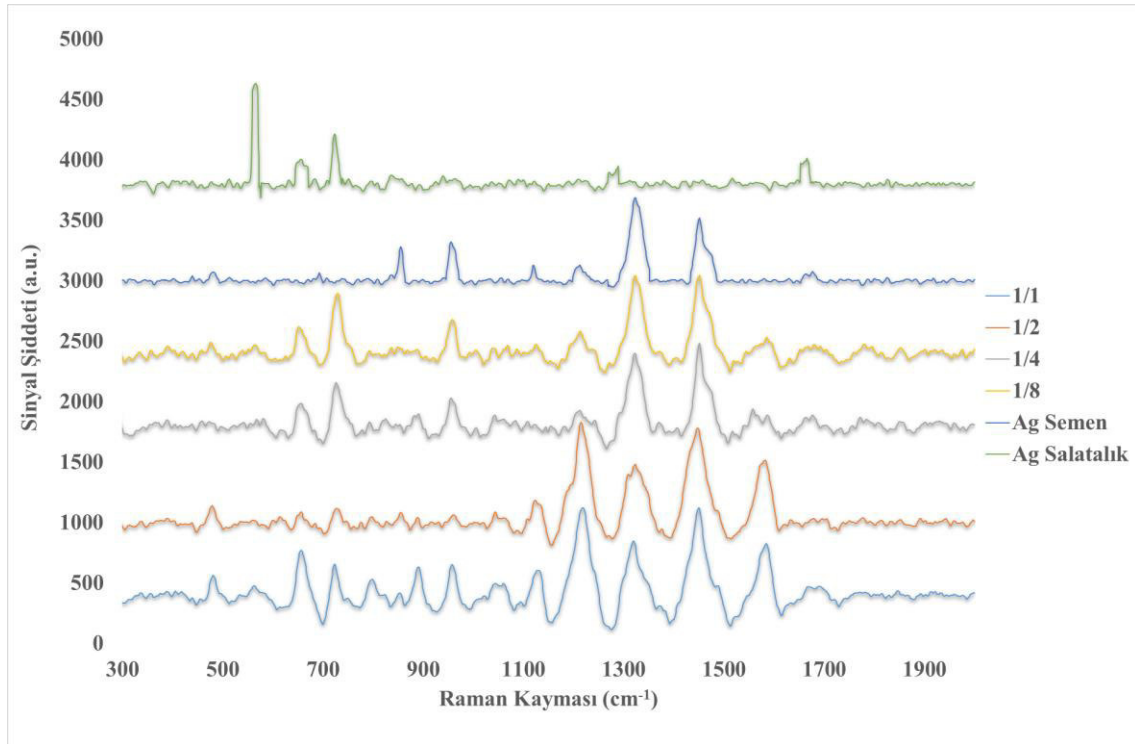
Çizelge 4.15. Altın nanoçubuk katkılı semen ve salatalık suyu SERS pikleri.

Semen SERS Spektrum Pikleri (cm^{-1})	Şiddet Seviyesi	Salatalık Suyu SERS Spektrum Pikleri (cm^{-1})	Şiddet Seviyesi
485	Güçlü	560	Zayıf
963	Zayıf	650	Zayıf
1215	Zayıf	732	Güçlü
1452	Zayıf		
1579	Zayıf		

AuNRs'nin spektrumlardaki etkisine ve sinyal şiddetlerine bakıldığında semenin analizi için AuNRs kullanılmasının uygun olmadığı değerlendirilmektedir.

Son adımda AgNPs katkılı SERS spektrumları incelenmiştir. Önceki aşamalarda görülmeyen pikler gümüş nanopartikül eklenmesiyle birlikte ortaya çıkmıştır. Semen farklı derişimlerine bakıldığında ise AgNPs katkılı durum için de derişimin pik yoğunluğunda bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir. AgNPs ile sinyal zenginleştirilmesi

yapılan karışımın spektrumu Şekil 4.30.'da, spektrumda görülen pik noktaları Çizelge 4.16.'da verilmektedir.



Şekil 4.30. AgNPs katkılı semen (1, 1/2, 1/4, 1/8 derişim) ve salatalık suyu karışımı SERS spektrumu.

Çizelge 4.16. Gümüş nanopartikül katkılı semen ve salatalık suyu SERS pikleri.

Semen SERS Spektrum Pikleri (cm ⁻¹)	Şiddet Seviyesi	Salatalık Suyu SERS Spektrum Pikleri (cm ⁻¹)	Şiddet Seviyesi
485	Güçlü	566	Zayıf
854	Güçlü	654	Güçlü
961	Güçlü	732	Güçlü
1216	Zayıf	1666	Güçlü
1324	Güçlü		
1451	Güçlü		
1676	Orta		

Semenin Raman ve SERS analizleri konusunda literatürde yapılan çalışmalardaki spektrumlarla karşılaştırıldığında yapılan analizlerin uyumlu olduğu saptanmıştır [166,167,171,203-205]. Salatalık suyu için yapılan birkaç çalışmada da benzer piklere ulaşılmıştır [193,206]. Spektrumlardan alınan bantlar semenin dört farklı derişimi ve salatalık suyunun saf halde alınan Raman spektrumlarıyla da uyumludur (EK-1). Yapılan çalışma ışığında semen için sinyal zenginleştirme amacıyla gümüş nanopartikül

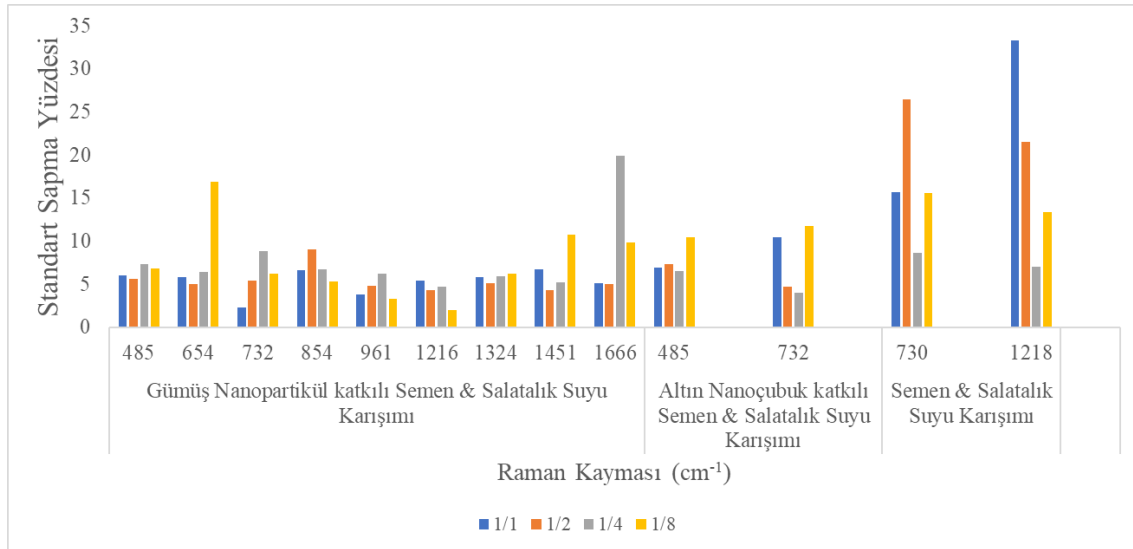
kullanılarak analiz yapılmasının uygun olacağı değerlendirilmiştir. Altın nanoçubuk ile yapılacak sinyal zenginleştirilmenin kesin sonuca götüremeyebileceği öngörülmektedir.

Semen-salatalık suyu için uygulanan deney prosedüründe alınan spektrumlardaki pikler Çizelge 4.17.'de verilmektedir.

Çizelge 4.17. Semen ve salatalık suyu için elde edilen SERS pik noktaları.

Semen			Salatalık Suyu		
Karışım	AuNRs Katkılı Karışım	AgNPs Katkılı Karışım	Karışım	AuNRs Katkılı Karışım	AgNPs Katkılı Karışım
	485	485			654
		854		732	732
		961			1666
1218		1216			
		1324			
		1451			

Tekrarlanabilirlik için ise Çizelge 4.17.'de verilen bantların standart sapma yüzdeleri analiz edilmiştir. Semen-salatalık suyu karışımının SERS analizleri sonucunda alınan spektrumdaki güçlü bantların sapma yüzdeleri Şekil 4.31.'de gösterilmektedir. Özellikle AgNPs katkılı spektruma ait pikler için standart sapma yüzdeleri oldukça makul görünmektedir. Bu da hem gümüş nanopartikülün hem yüzeyle hem de incelenen semen ve salatalık suyu moleküllerin yapıları ve kimyasal grupları ile iyi bir etkileşime girdiğini işaret etmektedir.



Şekil 4.31. SERS spektrumlarının standart sapma yüzdeleri (a) semen ve salatalık suyu karışımı (b) AuNRs katkı (c) AgNPs katkı.

Yapılan analizlerin bütününe bakıldığında öncelikle biyolojik sıvıların ve meyve/sebze sularının ayrı ayrı spektrumlarına bakılmıştır. Biyolojik ve organik sıvıların matris yapısından kaynaklı olarak ve analize özgü optimize edilmiş özel bir SERS aktif substrat kullanılmadığından dolayı beklendiği üzere floresans etkisi nedeniyle sıvılara ait sinyaller zayıf kalmış gürültü etkisinden kolaylıkla seçilememiştir. Raman spektroskopisinin hassasiyetini artırmak amacıyla floresansın kaynağı olan kirletici maddelerin varlığını ve substrattan gelen floresansı azaltmak için biyolojik sıvılara distile su ile seyreltme yapılmıştır. Kan ve idrar spektrumlarında yapılan seyreltmenin olumlu etkileri görülmüşken, saliva ve semen için aynı olumlu etkiyi sağlamadığına ulaşılmıştır. Bunun sebebinin önceki bölümlerde de belirtildiği üzere karışımlardaki homojeniteden, nanoparçacık-yüzey/analit etkileşiminden, substrattan ve optik koşullardan kaynaklandığı değerlendirilmektedir [175-177]. Yapılan çoklu spektrum ölçümleri sonrasında sinyal intansitesi düşük olmasına rağmen anlamlı biyolojik sıvı ve sebze/meyve sularından anlamlı pikler elde edilmiştir. Sıvıların, ayrı ayrı ve karışım hazırlandıktan sonra alınan spektrumlarındaki pik değerleri birbirleriyle ve literatürdeki benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında uyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

Sinyal zenginleştirme amacıyla kullanılan altın nanoçubukların eklendiği karışımlar için alınan spektrumlar incelendiğinde özellikle saliva için oldukça temiz bir spektrum elde edilmiştir. Kan ve idrar için de sinyallerin önemli oranda güçlendiği ve gürültü etkisinin azaldığı olumlu sonuçlara ulaşılmış fakat semen için yeterli zenginleştirme

sağlanamamıştır. Deneysel sonuçlarına bakılarak; kan, idrar ve salivaya için yapılacak SERS analizlerinde sinyal zenginleştirme amacıyla altın nanoçubuk kullanılması uygun olduğu söylenebilir. Semen için istenen sonucun alınamamasında kullanılan substrat ve nanoparçacık-yüzey etkileşimleri ana sebeplerdir. Deneysel bu aşamasında sinyal zenginleştirme için boyut ve şekillerinden dolayı altın nanoçubukların daha iyi bir zenginleştirme sağlayacağı değerlendirilmiş ve altın nanoçubuk kullanılmıştır. Sentezlenen altın nanoçubukların semenin sinyal zenginleştirilmesi için uygun fiziksel yapıya sahip olmamasından kaynaklı gerekli plazmon rezonansı sağlayamadığı değerlendirilmektedir.

Deneysel son aşamasında sinyal zenginleştirme için kullanılan gümüş nanopartiküllerin ise tüm biyolojik sıvılarda beklenen sinyal zenginleştirmesini sağladığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda idrar, kan, salivaya ve semen için yapılacak SERS analizlerinde gümüş nanopartikülün sinyal zenginleştirme için kullanılmasının uygun olduğu tespit edilmiştir.

Altın nanopartiküller ve nanoçubuklar, özellikle biyomedikal ve biyolojik uygulamalarda gümüş nanopartiküllere göre daha çok tercih edilebilir, çünkü altın biyolojik sistemlerle daha uyumludur. Ancak yapılan çalışmalarda gümüşün çok güçlü plazmonik özellikleri ve görünür bölgenin tümünde plazmonik özellik göstermesi gümüşü öne çıkarmaktadır [58-62]. Deneysel alınan spektrumlarında da gümüş nanopartiküllerin daha başarılı olduğunu göstermektedir.

Analiz edilen SERS spektrumlarında AuNRs ve AgNPs katkılı durumlar için farklı pik değerlerinde yüksek şiddetler görülmüş bunun yanı sıra seyreltme oranıyla sinyal seviyeleri belirli bir düzen içerisinde değişkenlik göstermemişlerdir. Bunların sebepleri olarak kullanılan nanoparçacık metallerin özellikleri, yüzey plazmon rezonansları, elektromanyetik alan yoğunlukları, örnek homojenitesi, kullanılan substrat ve moleküler etkileşimleri arasındaki farklılıklar gösterilebilir. Bu farklılıklar, SERS spektrumlarının farklı olmasına yol açmaktadır.

Spektrumdaki farklılıklara ek olarak olay mahalinden alınan biyolojik örnekler her zaman sağlıklı bireylere ait olmayabilir. Numunenin ait olduğu kişi bir uyuşturucu bağımlısı veya hasta olabilir. Bu gibi durumlarda, biyolojik numunenin kimyasal bileşimindeki farklılıklar ve benzersiz biyomoleküllerin varlığı Raman spektrumlarında farklılıklara neden olabilir. Bu, araştırmaya yeni bir boyut kazandırabilir ve diğer analitik

prosedürlerin araştırılmasını gerektirebilir. Bu nedenle, tez çalışmasında tespit edilen biyolojik sıvılara ait sinyallerin moleküler etkileşimleri, bilimsel çalışmalardan elde edilen bulgular kullanılarak derlenmiştir. Kan, idrar, saliva ve semen için sırasıyla Çizelge 4.18., Çizelge 4.19., Çizelge 4.20. ve Çizelge 4.21.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.18. Kan için moleküler titreşimler [161, 207-209].

Yapılan çalışmada Kana ait Raman kayması (cm⁻¹)	Referans çalışmalarda Kana ait Raman kayması (cm⁻¹)	Moleküler Titreşimler
950-959	950	Kalsiyum Fosfat germe bandı
1043	1041-1043	C-N Porphyrin
1231	1230	Amid III
1373	1371-1374	CH ₃
1460-1462	1460	Lipidlerin ve kollajenin CH ₂ /CH ₃ deformasyonu
1620	1620	v(C=C)

Çizelge 4.19. İdrar için moleküler titreşimler [210, 211].

Yapılan çalışmada İdrara ait Raman kayması (cm⁻¹)	Referans çalışmalarda İdrara ait Raman kayması (cm⁻¹)	Moleküler Titreşimler
1005	1006	N-C-N (Üre)
1260	1263	C-H (Amid)
1492	1490	Kreatinin
1597	1596	C-O (Alanin)

1607	1608	Üre
1654	1650	H-O-H (Su)

Çizelge 4.20. Saliva için moleküler titreşimler [212-214].

Yapılan çalışmada Salivaya ait Raman kayması (cm⁻¹)	Referans çalışmalarda Salivaya ait Raman kayması (cm⁻¹)	Moleküler Titreşimler
930	933-935	C-C (Prolin)
1031	1037	C-C, C-O (Şeker, glikozlanmış protein)
1445-1448	1452	C-H (Kollajen, lipidler)

Çizelge 4.21. Semen için moleküler titreşimler [171, 215].

Yapılan çalışmada Semene ait Raman kayması (cm⁻¹)	Referans çalışmalarda Semene ait Raman kayması (cm⁻¹)	Moleküler Titreşimler
485	488	N-C-O (Üre)
854	856	C-C (Tirozin)
961	959	Simetrik fosfat
1324	1328	Halka germe
1451	1451	CH ₂ , CH ₃

Sonuç olarak;

- Biyolojik sıvıların sinyal zenginleştirme için bir nanoparçacık kullanılmadan analiz edilmesinin sağlıklı olmadığı,
- Altın nanoçubuk ile sinyal zenginleştirme sağlandığı durumda kan, idrar ve salivanın sağlıklı şekilde tespit edilebilirliği,

- Gümüş nanopartikülün sinyal güçlendirme için kullanıldığı durumda kan, idrar, saliva ve semenin net bir şekilde SERS spektrumlarının alınabileceği,

tespit edilmiştir.

4.2.5. Tez Çalışmasının Sınırları ve Gelişmeye Açık Yönleri

Yapılan tez çalışmasında tüm biyolojik sıvılar için sabit bir substrat ve sabit prosedürle üretilen altın nanoçubuk ve gümüş nanopartiküller kullanılmıştır. Numuneye özgü bir sentez ya da substrat seçimi yapılmamıştır.

Biyolojik sıvıların moleküler yapısı ve doğası göz önüne alındığında, floresans problemlerinin ve gürültü etkilerinin SERS analizi sırasında önemli bir sorun olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu bağlamda analiz edilecek biyolojik sıvılardan tekrarlanabilir bir spektrum sonucu almak için standart bir prosedür ile ön işlem/uygulama yapmak faydalı olacaktır.

Deney malzemeleri dışında bir diğer sınır koşulu ölçüm yapılan spektroskopi cihazıdır. Kullanılan cihazın analizi yapılacak sıvılara uygun özelliklere ve lazer dalga boyuna sahip olması, kalibrasyonunun yapılmış olması ve doğru parametrelerle çalışması kritiktir. Tez çalışmasında tek bir Raman spektroskopi cihazıyla biyolojik sıvılarla ayrı ayrı yapılan deneme analizlerinde en optimum parametreler belirlenmiş, sabit olarak bu parametreler üzerinden spektrumlar alınmıştır.

Biyolojik sıvının bulunduğu yüzeyin, sıvıyla etkileşimi göz ardı edilmektedir. Gerçek bir olay yerinde elde edilen biyolojik sıvı özellikle emici özelliğe sahip bir yüzey ile etkileşime geçebilir. Bu durumda numunenin alınması için farklı yöntemler kullanılması gerekebilir ya da bulunduğu yüzey üzerinde analiz yapılması gerekebilir. Bu tip durumlar tez çalışması için sınır koşullarından birisidir.

Tez çalışmasındaki asıl amaç biyolojik sıvıların tespit edilebilirliği olsa da olay yeri analizleri için meyve/sebze sularının da spektrumları incelenmiştir. Ancak gerek meyve/sebze sularının moleküler yapılarındaki benzerliklerden dolayı spektrumlarının benzer olması gerekse bu maddelere ilişkin literatürde karşılaştırma yapacak çok az çalışmanın bulunması tez çalışması için bir sınır faktörüdür.

Kullanılan substrattan SERS zenginleştirmesi için bir katkı beklenmemiştir. SERS zenginleştirmesi numune üzerine dökülen nanoparçacıklarla sağlanmıştır. Literatürdeki birçok alışma SERS zenginleştirmesi sağlayan substratlar üzerine odaklanmaktadır. Analiz edilecek sıvının doğrudan Raman aktif bir substrat ile etkileşimi de sonuçlarda güçlü iyileştirme sağlayabilir. Bu yönüyle çalışma gelişmeye açıktır. Ayrıca mevcut substrat yerine analiz edilecek sıvılar için daha uygun substratlar belirlenmesi de elde edilen sonuçlara olumlu yönde katkı sağlayacaktır.

Sıvılar ve karışımlar standart prosedürlerle hazırlanmış ve spektrumlar alınmıştır. Sonuçlar incelendiğinde homojenitenin daha iyi bir seviyeye getirilmesi durumunda spektrumların daha temiz ve daha güçlü piklere sahip olabileceği değerlendirilmektedir. Bu doğrultuda daha hassas ve ölçülebilir yöntemlerin uygulanması ile çukur morfolojiye sahip substrat yüzeylerinin kullanılması analiz öncesi yüzeyde daha homojen dağılım elde edilmesi için gelişmeye açık bir yndr.

Deneylerde sinyal zenginleştirme amacıyla altın nanoçubuk ve gümüş nanopartikül kullanılmıştır. Altın ve gümüş dışında; bakır, platin, paladyum, alüminyum vb. geçiş metalleri ile metaloksit yapılar da SERS analizlerinde sinyal güçlendirme amacıyla kullanılmaktadır. Spektrumu incelenecek her sıvı için en uygun metal nanoparçacık ve sahip olduğu geometrinin tespit edilmesi iyi bir kütüphane oluşturulmasına, kesin ve hızlı tespitinin gerçekleştirilmesine katkı sağlayacaktır.

5. YORUM

Sunulan tez çalışmasında ulaşılan sonuçlar, çalışmanın sınırları ve literatüre sağlanan katkılar aşağıda liste halinde özetlenmiştir.

- Adli bir olay mahalinde dağınmık ve belirsiz halde bulunan numunelerin delil aşamasına getirilmesi oldukça uzun bir süreçtir. Özellikle eser miktarda elde edilen numuneler için ön işlem gerektiren uzun analiz süreleri, yapılan analizlerin numunelerde tahribat yaratması, analiz yöntemlerinin pahalı olması ve bazen kesin sonuç vermemesi durumu adaletin tecelli etmesi için geçen sürelerin çok uzun olmasına ve bazen numunenin delil niteliğine gelememesine yol açmaktadır. Bu bağlamda tahribatsız, güvenilir, kesin ve hızlı sonuç veren analiz yöntemlerine ihtiyaç duyulduğu görülmektedir.
- Literatürde adli tıpta bu konuya yönelik çalışmalar incelendiğinde yaşanan en büyük sorunların yukarıda belirtilen sebepler olduğuna ulaşılmıştır.
- Özellikle son yirmi yılda lazer teknolojisinin gelişmesiyle birlikte spektroskopi potansiyel bir analiz aracı haline gelmiş, literatürde bu yönde yapılan çalışmalarda artış olduğu gözlenmiştir.
- Bununla birlikte yapılan çalışmalar incelendiğinde delil niteliğinde olabilecek biyolojik sıvıların tek başına olduğu durumlara yönelik analizler yapılmış, karmaşık bir olay mahalini yansıtan çalışmaya rastlanmamıştır.
- Bu sebeple, tez çalışmasında adli bir olay yerinde karşılabilecek dört farklı biyolojik sıvı (kan, idrar, saliva, semen) belirlenmiş, karmaşık bir adli mahalini simule etmek amacıyla bu dört sıvıya fiziksel benzerlik gösteren meyve/sebze suları seçilmiş ve gerekli karışımlar hazırlanmıştır. Böyle bir karmaşık olay mahalinde biyolojik sıvının tespit edilebilirliğini sağlayacak SERS yöntemi önerilmiştir.
 - o Mevcutta kullanılan ve laboratuvarında gerçekleştirilen analiz yöntemleri acil sonuca gitmek gerektiren olaylar için uygun olmayan bir yöntemdir ve alternatif hızlı bir yöntem ortaya konulmuştur.
- Literatürde yapılan benzer çalışmalarda karmaşık bir olay mahali incelenmesi haricinde biyolojik sıvı spektroskopi analizinde nanoparçacık etkinliğinin incelenmediği görülmüştür.

- Raman tekniğinde sinyal güçlendirmek amacıyla kullanılan nanoyapıların olduğu ve olmadığı durumlarda biyolojik numunelerin spektrumundaki değişimin daha önce incelenmediği görülmektedir. Sunulan tez çalışmasında altın nanoçubuk ve gümüş nanopartikülün sinyal zenginleşmesine katkıları incelenmiş ve karşılaştırılmıştır. Dört biyolojik sıvının spektrumlarındaki sinyal intansitelerini ortalama olarak altın nanoçubuğun yaklaşık 4 kat, gümüş nanopartikülün ise yaklaşık 20 kat arttırdığı gözlemlenmiştir.
- Literatürde yapılan çalışmalarda tez çalışmasında kullanılan meyve/sebze sularına yönelik analizlerin daha önce yapılmadığı ve bunların karmaşık bir olay mahalinde tek bir spektrumda değerlendirilmediği görülmüştür.
 - Sunulan çalışmada vişne, elma, soğan ve salatalık suları hazırlanmış spektrumları incelenmiştir. Bu organik yapıların bazılarının spektrumlarının incelendiği çalışma bulunmamaktadır. Bazıları için ise yapılmış birkaç çalışma bulunmaktadır. Yapılan tez çalışmasında biyolojik sıvıların yanı sıra meyve/sebze sularının da SERS ile karmaşık bir mahalde tespit edilebilirliği gösterilmiştir.
- Spektroskopik sistemlerin geleneksel analiz sistemlerinden daha hızlı analiz yapması,
 - Raman spektroskopisi ile yapılan analizler örnek hazırlanmasına gerek duyulmaması, ekstraksiyon ihtiyacı olmaması açısından mevcut analitik sistemlere göre çok daha hızlı olmaktadır. Literatürdeki bazı örneklerde 1 dakikadan daha az bir sürede analiz yapıldığı belirtilmektedir. Tez çalışmasında yapılan spektrum analizlerinde yaklaşık 1 dakikalık bir süre içerisinde spektrumun ortaya koyulabildiği belirlenmiştir. Özellikle erken teşhis ve tanı gerektiren adli olaylarda kısa sürede analiz yapılması, birçok olayın deliller yok olmadan, erkenden çözülmesine adına büyük katkı sağlayacaktır.
- SERS'te az örnekle çok analiz yapılabilmesi,
 - SERS analizlerinde az miktarda bir biyolojik leke ile bile işlem yapılabilen, numuneler herhangi bir kimyasal işleme maruz bırakılmadığı için farklı bir sistemde yeni bir analiz yapmak üzere

tekrardan kullanılabilir. Tez çalışmasında μl ve daha düşük miktarda sıvılarla SERS analizleri gerçekleştirilmiş, spektrum elde edilmiştir. Ayrıca aynı numune üzerinde tekrarlanabilir sonuç veren asgari on adet spektrum analizi gerçekleştirilmiştir.

- SERS kullanımının geleneksel analiz sistemlerine göre daha kolay olması,
 - o Spektroskopik sistemlerin birçoğunun taşınabilir ve kullanıcı dostu versiyonları üretilmiştir. Bu sebeple farklı ortamlarda kullanım açısından oldukça kolay ve uygundur. Tez çalışmasından elde edilen sonuçlara dayanarak numune analizlerinin farklı ortam ve çevresel koşullar altında gerçekleştirilebilmesinin mümkün olduğu ortaya konulmuştur.
- SERS kullanımının geleneksel analiz sistemlerine göre numuneyi fiziksel açıdan tahrip etmemesi ve kimyasal kontaminasyona neden olmaması
 - o Mevcut uygulamalarda biyolojik leke veya sıvıların tanımlanması için çeşitli testlerde fiziksel ve kimyasal aşamalardan geçmesi gerekmektedir. Bu durumda az miktardaki örnek tahrip olacağından sonraki biyolojik veya toksikolojik analizler açısından kullanılamamaktadır. Hazırlanan karışımlar üzerinde yapılan çoklu spektrum ölçümlerinde numunenin tahrip olmaması tekrarlanabilir spektruma ulaşılması, geliştirilen yöntemin üstünlüğünü ortaya koymaktadır.
- SERS'in laboratuvar ortamına ek olarak El-Tipi sistemlerle sahada analiz olanağı tanınması
 - o Olay yeri incelemesi açısından en önemli husus, olay yeri korunmuş ve kontamine olmamışken olabilecek en hızlı şekilde ve yerinde analizlerin gerçekleştirilmesidir. Bu çalışmada geliştirilmiş yöntemin AgNPs ve AuNRs ile sağlanan sinyal zenginleştirilmesinin el-tipi Raman spektroskopisi cihazlarına entegrasyonu ile birlikte daha az miktarda numune ile daha hassas ölçümler yapılabilir. Bu sayede, el tipi SERS cihazlarının kullanım alanları genişletilebilir ve çevresel izleme, gıda güvenliği ve adli tıp gibi alanlarda daha etkili hale getirilebilir.
 - o Ayrıca, AgNP ve AuNR'nin kimyasal ve biyolojik seçiciliği, el tipi SERS cihazlarının belirli molekülleri veya molekül gruplarını hedeflemesine olanak tanır. Bu özellik, karmaşık matrislerde bulunan moleküllerin tespit ve analizi için son derece faydalı olabilir.

- Sıvı ya da katı bir numunein identifikasyonu için yöntem ortaya konulması
 - o Raman Spektroskopisi her numune için parmak izi niteliğinde bir spektrum ortaya koymaktadır. AgNP ve AuNR ile zenginleştirilmiş bir SERS analizi ile belirsiz olan bir çok numune analiz edilebilir ve karakteristiği belirlenebilir.
- Bu tez çalışmasında ulaşılmış hedeflenmiş olan iki amaçtan ilki biyolojik bir sıvının ortamda benzer fiziksel özelliklere sahip başka bir sıvı bulunması durumunda SERS yöntemi ile tespit edilebilirliğini göstermektir. Diğeri ise bu biyolojik sıvıların SERS analizlerinde sinyal zenginleştirme amacıyla kullanılan gümüş nanopartikül ve altın nanoçubuktan hangisinin daha etkin olduğu belirlemektir. Tez çalışması bu sınırlar çerçevesinde yürütülmüş ve sonuçta hedeflenen kazanımlara ulaşılmıştır. Çalışmanın gelişime açık yönleri aşağıda verilmiştir.
 - o Adli tıpta olay yerinde elde edilebilecek diğer biyolojik sıvılar da geliştirilen bu yöntemle incelenebilir. Böylece ortaya konulan yöntemin uygulama alanı arttırılabilir.
 - o Bunun yanı sıra yapılan çalışma farklı meyve/sebze suları için de uygulanabilir, literatüre katkı sağlayacak yeni veriler ortaya koyulabilir.
 - o Tezin deney aşamasında tek bir substrat kullanılmıştır. Ancak tez çalışmasında incelenen biyolojik sıvılar için uyumlu Raman aktif yüzeye sahip farklı tip substratların belirlenmesi SERS analizlerinde daha iyi spektrumlar ortaya konulmasına yardımcı olabilir.
 - o Tez çalışmasında yalnızca altın nanoçubuk ve gümüş nanopartikülün sinyal zenginleştirmeye katkıları incelenmiştir. Bunların farklı geometrik şekillerde ve boyutlarda sentezlenmesi veya farklı nanometallerin kullanılması daha iyi bir zenginleştirme sağlayabilir.
 - o Tez çalışmasında spektrumların alınması için kullanılan Raman Spektroskopi cihazına özel bir kalibrasyon ya da konfigürasyon düzenlemesi yapılmamıştır. Aynı deney koşulları altında farklı spektroskopi cihazları ile analizlerin tekrarlanması olumlu etki yaratabilir.

- Hazırlanan karışımların homojenitesine yönelik özel bir analiz yapılmamıştır. Karışımların homojenitesinden emin olunacağı koşulların sağlanması spektrumların iyileşmesine katkıda bulunabilir.
- Sunulan tez çalışması sonucunda bilimsel birikime aşağıda verilen katkılar gerçekleştirilmiştir. Aşağıda verilen alanlarda çalışan araştırmacılar ortaya konulan yöntem ve verilerden yararlanabilecektir.
 - Tez kapsamı özellikle Adli Tıp ve Nanoteknoloji bilimlerini ilgilendiren multidisipliner bir çalışmadır. Bu disiplinlerde ilerinde yapılacak bilimsel çalışma ve araştırmalara referans olacak bir tez çalışması ortaya konmuştur.
 - Ayrıca hem dünyada hem de ülkemizde maalesef sıkça karşılaştığımız trafik kazası, tecavüz, cinayet vb. üzücü olaylarda adaletin kısa sürede ve doğru tecelli edebilmesi adına yeni bir çözüm yöntemi ortaya konulmuştur. Bu yöntem sayesinde, hem adaletin sağlanması için geçen süreç kısalabilecek hem de delil sayılabilecek tüm biyolojik lekelerin ileride yapılacak olası yeni bir adli test için rahatlıkla kullanılabilir olacağı gösterilmiştir.
 - Son olarak, dünyada yürütülen çalışmalarla kıyaslandığında geriden takip ettiğimiz Nanoteknoloji'nin aslında ne kadar önemli ve her bilim alanında ne kadar uygulanabilir olduğu bir kez daha kanıtlanmış ve Nanoteknoloji bilimcilerine yeni bir alan ortaya çıkarılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] Virkler, K., & Lednev, I. K., "Blood species identification for forensic purposes using Raman spectroscopy combined with advanced statistical analysis", *Analytical chemistry*, 81(18): 7773-7777, (2009).
- [2] J. Siegel, G. Knupfer, P. Saukko, "Encyclopedia of Forensic Sciences", Academic Press, London, San Diego, (2000).
- [3] Izake, Emad L. "Forensic and homeland security applications of modern portable Raman spectroscopy." *Forensic science international*, 202.1-3 (2010): 1-8.
- [4] Muro, Claire K., et al. "Forensic applications of vibrational spectroscopy." *Forensic Science: A Multidisciplinary Approach*, (2016): 5-54.
- [5] Andreou, Chrysafis, et al. "Rapid detection of drugs of abuse in saliva using surface enhanced Raman spectroscopy and microfluidics." *ACS nano*, 7.8 (2013): 7157-7164.
- [6] Bilgili A. K., Akpınar Ö., Öztürk M. K., Özçelik S., Özbay E. "XRD vs Raman for InGaN/GaN structures", *Politeknik Dergisi*, 23(2): 291-296, (2020).
- [7] Mikla, V.I. and Mikla, V.V., 8 - Raman Spectroscopy in Medicine, *Medical Imaging Technology*. (eds: Mikla, V.I. and Mikla, V.V.), Elsevier, Oxford, 129-141, (2014).
- [8] Ferraro, J.R., Nakamoto, K., and Brown, C.W., Chapter 1 - Basic Theory *Academic Press*, San Diego, (2003).
- [9] V., R.C., *The molecular scattering of light*, (1930).
- [10] G. G. Büyükgöz, *Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi ile DNA Hassas Tayini ve Nanopartiküller Arası Mesafelerin Optimizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2014.
- [11] Movasaghi, Z., Rehman, S., and Rehman, I.U., *Raman Spectroscopy of Biological Tissues*, *Applied Spectroscopy Reviews*, 42, 493-541, (2007).
- [12] Yıldız A, Genç Ö, and S., B., *Enstrümental Analiz Yöntemleri Hacettepe Üniversitesi Yayınları*, Ankara, (1997).
- [13] B. Güven, *Gıda Uygulamalarına Yönelik Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisini Temel Alan Biyoanaliz Yöntemlerinin Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2011.
- [14] Das, R.S. and Agrawal, Y.K., *Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications*, *Vibrational Spectroscopy*, 57, 163-176, (2011).

- [15] Kneipp, K., et al. "Surface-enhanced and normal Stokes and anti-Stokes Raman spectroscopy of single-walled carbon nanotubes." *Physical review letters*, 84.15 (2000): 3470.
- [16] Smith Even and Geoffrey, D., *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*, Wiley John, 2005.
- [17] Efremov, E.V., Ariese, F., and Gooijer, C., Achievements in resonance Raman spectroscopy: Review of a technique with a distinct analytical chemistry potential, *Analytica Chimica Acta*, 606, 119-134, 2008.
- [18] Kneipp, K., Kneipp, H., Itzkan, I., Dasari, R.R., and Feld, M.S., Surface-enhanced non-linear Raman scattering at the single-molecule level, *Chemical Physics*, 247, 155-162, 1999.
- [19] Gardiner, Derek J. "Introduction to Raman scattering." *Practical Raman Spectroscopy*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1989. 1-12.
- [20] Sur, Ujjal Kumar. "Surface-enhanced Raman spectroscopy: recent advancement of Raman spectroscopy." *Resonance*, 15.2 (2010): 154-164.
- [21] Long, D. A., *Raman spectroscopy*. McGraw-Hill: New York; 1976
- [22] Kneipp, Katrin, et al. "Surface-enhanced Raman scattering and biophysics." *Journal of Physics: Condensed Matter*, 14.18 (2002): R597.
- [23] Skoog, Douglas A., F. James Holler, and T. A. Nieman. "Raman spectroscopy." *Principles of instrumental analysis*, 5 (1998): 429-444.
- [24] 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.
- [25] E.J. Blackie, E.C. Le Ru, P.G. Etchegoin, *J. Am. Chem. Soc.*, 131 (2009) 14466–14472.
- [26] Fleischmann M, Hendra P, McQuillan A. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters*, 1974;26:163-6
- [27] Albrecht MG, Creighton JA. Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. *Journal of the American Chemical Society*, 1977;99:5215-7.
- [28] Jeanmaire DL, Van Duyne RP. Surface Raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 1977;84:1-20.

- [29] Moskovits M. Surface roughness and the enhanced intensity of Raman scattering by molecules adsorbed on metals. *The Journal of Chemical Physics*, **1978**;69:4159-61.
- [30] Pettinger B, Wenning U, Wetzel H. Surface plasmon enhanced Raman scattering frequency and angular resonance of Raman scattered light from pyridine on Au, Ag and Cu electrodes. *Surface Science*, **1980**;101:409-16.
- [31] Hao E, Schatz GC. Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers. *The Journal of chemical physics*, **2004**;120:357-66.
- [32] Fan M, Andrade GF, Brolo AG. A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*, **2011**;693:7-25.
- [33] Sheng R, Ni F, Cotton TM. Determination of purine bases by reversed-phase high-performance liquid chromatography using real-time surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analytical chemistry*, **1991**;63:437-42.
- [34] Carron K, Mullen K, Lanouette M, Angersbach H. Selective-ultratrace detection of metal ions with SERS. *Applied spectroscopy*, **1991**;45:420-3
- [35] Rubim JC. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) on silver electrodes as a technical tool in the study of the electrochemical reduction of cyanopyridines and in quantitative analysis. *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry*, **1987**;220:339-50.
- [36] Wu D-Y, Li J-F, Ren B, Tian Z-Q. Electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy of nanostructures. *Chemical Society Reviews*, **2008**;37:1025-41.
- [37] Brolo AG, Irish DE, Smith BD. Applications of surface enhanced Raman scattering to the study of metal-adsorbate interactions. *Journal of molecular structure*, **1997**;405:29-44.
- [38] Vo-Dinh T. SERS chemical sensors and biosensors: new tools for environmental and biological analysis. *Sensors and Actuators B: chemical*, **1995**;29:183-9.
- [39] Nie S, Emory SR. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. *Science*, **1997**;275:1102
- [40] Kneipp K, Wang Y, Kneipp H, Perelman LT, Itzkan I, Dasari RR, et al. Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Physical review letters*, **1997**;78:1667.

- [41] Reilly TH, Chang S-H, Corbman JD, Schatz GC, Rowlen KL. Quantitative evaluation of plasmon enhanced Raman scattering from nanoaperture arrays. *The Journal of Physical Chemistry C.*, **2007**;111:1689-94
- [42] Xia Y, Xiong Y, Lim B, Skrabalak SE. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics *Angewandte Chemie International Edition*, **2009**;48:60-103.
- [43] Bell SE, Sirimuthu NM. Quantitative surface-enhanced Raman spectroscopy. *Chemical Society Reviews*, **2008**;37:1012-24
- [44] Sharma B, Frontiera RR, Henry A-I, Ringe E, Van Duyne RP. SERS: materials, applications, and the future. *Materials today*, **2012**;15:16-25
- [45] Otto, A., Mrozek, I., Grabhorn, H., and Akemann, W., Surface-enhanced Raman scattering, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 4, 1143–1212, **1992**.
- [46] Etchegoin, P., Cohen, L. F., Hartigan, H., Brown, R. J. C., Milton, M. J. T., and Gallop, J. C., Electromagnetic contribution to surface enhanced Raman scattering revisited, *Journal of Chemical Physics*, 119, 5281–5289, **2003**.
- [47] Stiles PL, Dieringer JA, Shah NC, Van Duyne RR. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Annual Review of Analytical Chemistry*. Palo Alto: Annual Reviews, **2008**. p. 601-26.
- [48] Campion A, Kambhampati P. Surface-enhanced Raman scattering. *Chem Soc Rev.*, **1998**;27:241-50.
- [49] Vo-Dinh T. Surface-enhanced Raman spectroscopy using metallic nanostructures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **1998**;17:557-82.
- [50] Hossain, M. K., Kitahama, Y., Huang, G. G., Han, X., & Ozaki, Y. (2009). Surface-enhanced Raman scattering: realization of localized surface plasmon resonance using unique substrates and methods. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 394, 1747-1760.
- [51] Tsang, J. C., Kirtley, J. R., & Bradley, J. A. (1979). Surface-enhanced Raman spectroscopy and surface plasmons. *Physical review letters*, 43(11), 772.
- [52] Yan, B., Thubagere, A., Premasiri, W. R., Ziegler, L. D., Negro, L. D., and Reinhard, B. M., Engineered SERS substrates with multiscale signal enhancement: nanoparticle cluster arrays, *ACS Nano*, 3, 1190–1202, **2009**.
- [53] Jeanmaire, D. L. and Van Duyne, R. P., Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 84, 1–20, **1977**.

- [54] Camden JP, Dieringer JA, Wang Y, Masiello DJ, Marks LD, Schatz GC, et al. Probing the structure of single-molecule surface-enhanced Raman scattering hot spots. *Journal of the American Chemical Society*, **2008**;130:12616-7
- [55] M. Yılmaz, Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS) için Nano-Yaklaşım Temelli Platformların Geliştirilmesi ve Tanı Amaçlı Uygulanması, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2014**.
- [56] Kiefer W, Schlücker S. *Surface enhanced Raman spectroscopy: analytical, biophysical and life science applications*: John Wiley & Sons; **2013**.
- [57] Moskovits M. Surface selection rules. *The Journal of Chemical Physics*, **1982**;77:4408-16.
- [58] Amendola, Vincenzo, et al. "Laser generation of iron-doped silver nanotruffles with magnetic and plasmonic properties." *Nano research*, 8 (**2015**): 4007-4023.
- [59] Gahlaut, Shashank K., Anisha Pathak, and Banshi D. Gupta. "Recent advances in silver nanostructured substrates for plasmonic sensors." *Biosensors*, 12.9 (**2022**): 713.
- [60] Kreibig U, Vollmer M. *Optical properties of metal clusters*. **1995**.
- [61] Amendola, Vincenzo, Osman M. Bakr, and Francesco Stellacci. "A study of the surface plasmon resonance of silver nanoparticles by the discrete dipole approximation method: effect of shape, size, structure, and assembly." *Plasmonics*, 5 (**2010**): 85-97.
- [62] Evanoff DD, Chumanov G. Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays. *ChemPhysChem.*, **2005**;6:1221-31.
- [63] Kelly KL, Coronado E, Zhao LL, Schatz GC. The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. *The Journal of Physical Chemistry B.*, **2003**;107:668-77.
- [64] Sun, Xin, and Hao Li. "A review: nanofabrication of surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) substrates." *Current Nanoscience*, 12.2 (**2016**): 175-183.
- [65] Gordon R, Sinton D, Kavanagh KL, Brolo AG. A new generation of sensors based on extraordinary optical transmission. *Accounts of chemical research*, **2008**;41:1049-57.
- [66] Baker GA, Moore DS. Progress in plasmonic engineering of surface-enhanced Raman-scattering substrates toward ultra-trace analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2005**;382:1751-70.

- [67] Brolo AG, Arctander E, Gordon R, Leathem B, Kavanagh KL. Nanohole-enhanced Raman scattering. *Nano Letters*, **2004**;4:2015-8.
- [68] Kahl M, Voges E, Kostrewa S, Viets C, Hill W. Periodically structured metallic substrates for SERS. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **1998**;51:285-91.
- [69] David, Catalina, et al. "SERS detection of biomolecules using lithographed nanoparticles towards a reproducible SERS biosensor." *Nanotechnology*, 21.47 (**2010**): 475501.
- [70] Dhawan, Anuj, et al. "Methodologies for developing surface-enhanced Raman scattering (SERS) substrates for detection of chemical and biological molecules." *IEEE Sensors Journal*, 10.3 (**2010**): 608-616.
- [71] Sivashanmugan, Kundan, Jiunn-Der Liao, and Chih-Kai Yao. "Nanovoids embedded in FIB-fabricated Au/Ag nanorod arrays for ultrasensitive SERS-active substrate." *Applied Physics Express*, 7.9 (**2014**): 092202.
- [72] Fedlheim, Daniel L., and Colby A. Foss. *Metal nanoparticles: synthesis, characterization, and applications*. CRC press, **2001**.
- [73] 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: 1595-1604, (**2010**).
- [74] Zhao, Pengxiang, Na Li, and Didier Astruc. "State of the art in gold nanoparticle synthesis." *Coordination Chemistry Reviews*, 257.3-4 (**2013**): 638-665.
- [75] Kimling, Judith, et al. "Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited." *The Journal of Physical Chemistry, B* 110.32 (**2006**): 15700-15707.
- [76] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature*, **1973**;241:20-2.
- [77] Lee P, Meisel D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *The Journal of Physical Chemistry*, **1982**;86:3391-5.
- [78] Nikoobakht B, El-Sayed MA. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chemistry of Materials*, 2003;15:**1957-62**.
- [79] Rocha TC, Zanchet D. Growth aspects of photochemically synthesized silver triangular nanoplates. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, **2007**;7:618-25.
- [80] Cintra S, Abdelsalam ME, Bartlett PN, Baumberg JJ, Kelf TA, Sugawara Y, et al. Sculpted substrates for SERS. *Faraday discussions*, **2006**;132:191-9.

- [81] Jeong DH, Zhang YX, Moskovits M. Polarized surface enhanced Raman scattering from aligned silver nanowire rafts. *The Journal of Physical Chemistry B.*, **2004**;108:12724-8.
- [82] Rycenga M, Camargo PHC, Xia Y. Template-assisted self-assembly: a versatile approach to complex micro- and nanostructures. *Soft Matter*, **2009**;5:1129-36.
- [83] Batista EA, dos Santos DP, Andrade GF, Sant'Ana AC, Brolo AG, Temperini ML. Using polycarbonate membranes as templates for the preparation of nanostructures for surface-enhanced raman scattering. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, **2009**;9:3233-8
- [84] Pieczonka NP, Aroca RF. Inherent Complexities of Trace Detection by Surface-Enhanced Raman Scattering. *ChemPhysChem.*, **2005**;6:2473-84.
- [85] Li JF, Huang YF, Ding Y, Yang ZL, Li SB, Zhou XS, et al. Shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy. *Nature*, **2010**;464:392-5
- [86] Fan M, Brolo AG. Silver nanoparticles self assembly as SERS substrates with near single molecule detection limit. *Physical Chemistry Chemical Physics.*, **2009**;11:7381-9.
- [87] R. Akçan, Tükürükte Eroin ve Metabolitlerinin Toksikolojik Analizinde Yeni Bir Analitik Gereç Olarak Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2021**.
- [88] F.M. Lyng, D. Traynor, T.N.Q. Nguyen, A.D. Meade, F. Rakib, R. Al-Saady, E. Goormaghtigh, K. Al-Saad, M.H. Ali, *PLoS One*, 14 (**2019**) e0212376.
- [89] M.G. Shim, B.C. Wilson, E. Marple, M. Wach, *Appl. Spectrosc.*, 53 (**1999**) 619–627.
- [90] I. Nabiev, I. Chourpa, M. Manfait, *J. Raman Spectrosc.*, 25 (**1994**) 13–23.
- [91] L.P. Choo-Smith, H.G.M. Edwards, H.P. Endtz, J.M. Kros, F. Heule, H. Barr, J.S. Robinson, H.A. Bruining, G.J. Puppels, *Biopolym. - Biospectroscopy Sect.*, 67 (**2002**) 1–9.
- [92] B. Yu, M. Ge, P. Li, Q. Xie, L. Yang, *Talanta*, 191 (**2019**) 1–10.
- [93] K.C. Doty, C.K. Muro, J. Bueno, L. Halámková, I.K. Lednev, *J. Raman Spectrosc.*, 47 (**2016**) 39–50.
- [94] V. Sikirzhytski, A. Sikirzhytskaya, I.K. Lednev, *Appl. Spectrosc.*, 65 (**2011**) 1223–1232.
- [95] V. Sikirzhytski, A. Sikirzhytskaya, I.K. Lednev, *Anal. Chim. Acta*, 718 (**2012**) 78–83.

- [96] C.A.F. De Oliveira Penido, M.T.T. Pacheco, I.K. Lednev, L. Silveira, J. Raman Spectrosc., 47 (2016) 28–38.
- [97] G. McLaughlin, K.C. Doty, I.K. Lednev, Forensic Sci. Int., 238 (2014) 91–95
- [98] K.C. Doty, G. McLaughlin, I.K. Lednev, Anal. Bioanal. Chem., 408 (2016) 3993–4001.
- [99] K.K. Gulati, S. Gulia, T. Gambhir, N. Kumar, V. Gambhir, M.N. Reddy, Def. Sci. J., 69 (2019) 342–347.
- [100] M. Liszewska, B. Bartosewicz, B. Budner, B. Nasiłowska, M. Szala, J.L. Weyher, I. Dzieńcielewski, Z. Mierczyk, B.J. Jankiewicz, Vib. Spectrosc., 100 (2019) 79–85.
- [101] F. Zapata, C. García-Ruiz, Anal. Chem., 88 (2016) 6726–6733.
- [102] N.R. Gomer, N. Lamsal, H. Sun, H. Gomer, M.P. Nelson, in: Chem. Biol. Radiol. Nucl. Explos. Sens. XX, International Society for Optics and Photonics, 2019, p. 110100H.
- [103] W.F. Hug, M. Reid, Q. Nguyen, R. Bhartia, R.D. Reid, (2019) 8.
- [104] E. Goudsmits, L.S. Blakey, K. Chana, G.P. Sharples, J.W. Birkett, Forensic Sci. Int., 299 (2019) 168–173.
- [105] K.J. Kruglak, M. Dubnicka, B. Kammrath, V. Maxwell, J.A. Reffner, J. 97 Forensic Sci., 64 (2019) 1345–1358.
- [106] J.G. Lv, S. Liu, J.M. Feng, Y. Liu, S.D. Zhou, R. Chen, Pigment Resin Technol., 45 (2016) 294–300.
- [107] K.B. Ferreira, A.G.G. Oliveira, J.A. Gomes, Spectrosc. Lett. 50 (2017) 102–110.
- [108] C.A. Teixeira, R.J. Poppi, Microchem. J., 144 (2019) 411–418.
- [109] M.N.M. Asri, N.N. Yahya, N.A.M. Nor, W.N.S.M. Desa, D. Ismail, AIP Conf. Proc., 2155 (2019) 1–7.
- [110] Ropret, Polonca, et al. "Advances in Raman mapping of works of art." Journal of Raman Spectroscopy, 41.11 (2010): 1462-1467.
- [111] C. Miguel, A. Candeias, in: Raman Spectrosc. Archaeol. Art Hist., 2018, pp. 184–195.
- [112] Depciuch, Joanna, et al. "Identification of chemical changes in healthy breast tissue caused by chemotherapy using Raman and FTIR spectroscopy: A preliminary study." Infrared Physics & Technology, 102 (2019): 102989.
- [113] A. Daniel, A. Prakasarao, S. Ganesan, Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc., 190 (2018) 409–416.

- [114] Akçan, R., & Yıldırım, M. Ş., “Raman Spectroscopy as a Novel Technology in Forensic Toxicological Analyses”, *Current Analytical Chemistry*, 17(8), 1082-1096, (2021).
- [115] B. Venkatesh, S. Ramasamy, M. Mylrajan, R. Asokan, P.T. Manoharan, J.M. Rifkind, “Fourier transform Raman approach to structural correlation in hemoglobin derivatives, *Spectrochim*”, *Acta*, A 55,1691-1697, (1999)
- [116] A.M.K. Enejder, T. Koo, J. Oh, M. Hunter, S. Sasic, M.S. Feld, G.L. Horowitz, “Blood analysis by Raman spectroscopy”, *Opt. Lett.*, 27, 2004-2006, (2002).
- [117] M. Volkan, “Use of surface enhanced raman spectroscopy (SERS) in bioanalytical chemistry”, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2(2), 40-40, (2000).
- [118] Akçan, R., Yıldırım, M. Ş., İlhan, H., Güven, B., Tamer, U., & Sağlam, N., “Surface enhanced Raman spectroscopy as a novel tool for rapid quantification of heroin and metabolites in saliva”, *Turkish journal of medical sciences*, 50(5), 1470-1479, (2020).
- [119] A.T. Lewis, R. Gaifulina, N.J. Guppy, M. Isabelle, J. Dorney, G.R. Lloyd, M. Rodriguez-Justo, C. Kendall, N. Stone, G.M. Thomas, *J. Biophotonics*, 11 (2018) 1–9.
- [120] K. Aubertin, J. Desroches, M. Jermyn, V.Q. Trinh, F. Saad, D. Trudel, F. Leblond, *Biomed. Opt. Express*, 9 (2018) 4294.
- [121] Wang, X., A., Kong, X., Review of recent progress of plasmonic materials and nano-structures for Surface Enhanced Raman Scattering, *Materials*, 8, 3024-3052, 2015.
- [122] Lin, K. Q., Yi, J., Hu, S., Liu, B. J., Liu, J. Y., Wang, X., & Ren, B. “Size effect on SERS of gold nanorods demonstrated via single nanoparticle spectroscopy”, *The Journal of Physical Chemistry C*, 120(37), 20806-20813, (2016).
- [123] Yu, Y., Zeng, P., Yang, C., Gong, J., Liang, R., Ou, Q., & Zhang, S. “Gold-nanorod-coated capillaries for the SERS-based detection of thiram”, *ACS Applied Nano Materials*, 2(1), 598-606, (2019).
- [124] Albarghouthi, N., MacMillan, P., & Brosseau, C. L. “Optimization of gold nanorod arrays for surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) detection of atrazine”, *Analyst*, 146(6), 2037-2047, (2021).

- [125] 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(1), 158-172, (2013).
- [126] Fernanda Cardinal, M., Rodríguez-González, B., Alvarez-Puebla, R. A., Pérez-Juste, J., and Liz-Marzán, L. M., Modulation of localized surface plasmons and SERS response in gold dumbbells through silver coating, *Journal of Physical Chemistry*, 114, 10417–10423, 2010.
- [127] Myroshnychenko V, Rodríguez-Fernández J, Pastoriza-Santos I, Funston AM, Novo C, Mulvaney P, et al. Modelling the optical response of gold nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 2008;37:1792-805
- [128] Daniel M-C, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical reviews*, 2004;104:293-346.
- [129] Eustis S, El-Sayed MA. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Society Reviews*, 2006;35:209-17.
- [130] Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chemical Society Reviews*, 2009;38:1759-82.
- [131] Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. The size and shape factor in colloidal systems. *A General Discussion of the Faraday Society*, 1951;11:55.
- [132] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature*, 1973;241:20-2.
- [133] Brust M, Walker M, Bethell D, Schiffrin DJ, Whyman R. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid–liquid system. *J Chem Soc, Chem Commun.*, 1994;801-2.
- [134] Wan, Yu, et al. "Quasi-spherical silver nanoparticles: Aqueous synthesis and size control by the seed-mediated Lee–Meisel method." *Journal of colloid and interface science*, 394 (2013): 263-268.
- [135] Evanoff DD, Chumanov G. Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays. *ChemPhysChem.*, 2005 6:1221-31.

- [136] Kim, Da-Seul, and Nong-Moon Hwang. "Synthesis of nanostructures using charged nanoparticles spontaneously generated in the gas phase during chemical vapor deposition." *Journal of Physics D: Applied Physics*, 51.46 (2018): 463002.
- [137] Kotov NA, Zaniquelli MED, Meldrum FC, Fendler JH. Two-dimensional silver electrocrystallization under monolayers spread on aqueous silver nitrate. *Langmuir*, 1993;9:3710-6.
- [138] Khaydarov, Rashid A., et al. "Electrochemical method for the synthesis of silver nanoparticles." *Journal of Nanoparticle Research*, 11 (2009): 1193-1200.
- [139] Jara, Nicole, et al. "Photochemical synthesis of gold and silver nanoparticles A review." *Molecules* 26.15 (2021): 4585.
- [140] Henglein A, Meisel D. Radiolytic control of the size of colloidal gold nanoparticles. *Langmuir*. 1998;14:7392-6.
- [141] Rycenga, M. Xia, X., Moran C. H., Generation of hot spots with silver nanocubes for single-molecule detection by surface-enhanced Raman Scattering, *Angewandte Chemie - International Edition*, 50, 5473–5477, 2011.
- [142] Rodríguez-Fernández, J., Pérez-Juste, J., García De Abajo, F. J., and Liz-Marzán, L. M., Seeded growth of submicron Au colloids with quadrupole plasmon resonance modes, *Langmuir*, 22, 7007–7010, 2006.
- [143] Pastoriza-Santos, I., Synthesis of Silver Nanoprisms in DMF, *Nano Letters*, 2, 903–905, 2002.
- [144] Ye, X., Gao, Y., Chen, J., Reifsnnyder, D. C., Zheng, C., and Christopher, B., Seeded Growth of Monodisperse Gold Nanorods Using Bromide, *Nano Letters*, 13, 2163–2171, 2013.
- [145] Brinson, B. E., Lassiter, J. B., Levin, C. S., Bardhan, R., Mirin, N., and Halas, N. J., Nanoshells made easy: Improving Au layer growth on nanoparticle surfaces, *Langmuir*, 24, 14166–14171, 2008.
- [146] Lee, P. C. and Meisel, D., Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols, *Journal of Physical Chemistry*, 86, 3391–3395, 1982.
- [147] T. Tezcan, Raman Sinyalinin Güçlendirilmesine Yönelik Nanoyapılı Sensör Yüzeyinin Hazırlanması, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2018.
- [148] Sharma, B., Cardinal, F. M., Kleinman S. M., High-performance SERS substrates: Advances and challenges, *MRS Bulletin*, 38, 615–624, 2013.

- [149] Rycenga, M., Kim, M. H., Camargo, P. H. C., Cobley, C., Li, Z. Y., and Xia, Y., Surface-enhanced raman scattering: comparison of three different molecules on single-crystal nanocubes and nanospheres of silver, *Journal of Physical Chemistry A*, **2009**.
- [150] Tawfick S, De Volder M, Copic D, Park SJ, Oliver CR, Polsen ES, et al. Engineering of Micro-and Nanostructured Surfaces with Anisotropic Geometries and Properties. *Advanced Materials*, **2012**;24:1628-74.
- [151] Ko, H., Singamaneni, S., and Tsukruk, V. V., Nanostructured surfaces and assemblies as SERS media, *Small*, 4, 1576–1599, **2008**.
- [152] Li, J. J., Zhang, N., Wang, J., Yang, C. Y., Zhu, J., & Zhao, J. W., “Tuning the EDTA-induced self-assembly and plasmonic spectral properties of gold nanorods: application in surface-enhanced Raman scattering”, *Journal of Nanoparticle Research*, 18, 1-12, **(2016)**.
- [153] Haiss, Wolfgang, et al. "Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV– Vis spectra." *Analytical chemistry*, 79.11 **(2007)**: 4215-4221
- [154] Bhui, D. K., Bar, H., Sarkar, P., Sahoo, G. P., De, S. P., & Misra, A., “Synthesis and UV–vis spectroscopic study of silver nanoparticles in aqueous SDS solution”, *Journal of Molecular Liquids*, 145(1), 33-37, **(2009)**.
- [155] Song, Ki Chang, et al. "Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method." *Korean Journal of Chemical Engineering* 26 **(2009)**: 153-155.
- [156] Desai, Rucha, et al. "Size distribution of silver nanoparticles: UV-visible spectroscopic assessment." *Nanoscience and nanotechnology letters*, 4.1 **(2012)**: 30-34.
- [157] Ateş M., Yılmaz E., Kar B. ve Kars Durukan İ., “Synthesis and characterization silver nanoparticles and coating with chitosan”, *Politeknik Dergisi*, 24(4): 1401-1408, **(2021)**.
- [158] Atkins, Chad G., et al. "Raman spectroscopy of blood and blood components." *Applied spectroscopy*, 71.5 **(2017)**: 767-793.
- [159] Annika M. K. Enejder, Tae-Woong Koo, Jeankun Oh, Martin Hunter, Slobodan Sasic, Michael S. Feld, and Gary L. Horowitz, "Blood analysis by Raman spectroscopy," *Opt. Lett.*, 27, 2004-2006 **(2002)**.

- [160] Boyd, Samantha, Massimo F. Bertino, and Sarah J. Seashols. "Raman spectroscopy of blood samples for forensic applications." *Forensic science international*, 208.1-3 (2011): 124-128.
- [161] Premasiri, W. R., J. C. Lee, and L. D. Ziegler. "Surface-enhanced Raman scattering of whole human blood, blood plasma, and red blood cells: cellular processes and bioanalytical sensing." *The Journal of Physical Chemistry B*, 116.31 (2012): 9376-9386.
- [162] Bonifacio, Alois, et al. "Surface-enhanced Raman spectroscopy of blood plasma and serum using Ag and Au nanoparticles: a systematic study." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (2014): 2355-2365.
- [163] Feng, Shangyuan, et al. "Nasopharyngeal cancer detection based on blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate analysis." *Biosensors and Bioelectronics*, 25.11 (2010): 2414-2419.
- [164] Casella, Michele, et al. "Raman and SERS recognition of β -carotene and haemoglobin fingerprints in human whole blood." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 79.5 (2011): 915-919.
- [165] Wang, J., et al. "SERS spectroscopy and multivariate analysis of globulin in human blood." *Laser physics*, 24.6 (2014): 065602.
- [166] Virkler, Kelly, and Igor K. Lednev. "Raman spectroscopy offers great potential for the nondestructive confirmatory identification of body fluids." *Forensic Science International*, 181.1-3 (2008): e1-e5.
- [167] Virkler, Kelly, and Igor K. Lednev. "Raman spectroscopic signature of blood and its potential application to forensic body fluid identification." *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396 (2010): 525-534.
- [168] Bankapur, Aseefhali, et al. "Raman tweezers spectroscopy of live, single red and white blood cells." *PLoS one*, 5.4 (2010): e10427.
- [169] Drescher, Daniela, et al. "SERS reveals the specific interaction of silver and gold nanoparticles with hemoglobin and red blood cell components." *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15.15 (2013): 5364-5373.
- [170] Bian, Haiyi, et al. "Discrimination of human and nonhuman blood using Raman spectroscopy with self-reference algorithm." *Journal of biomedical optics*, 22.9 (2017): 095006-095006.

- [171] Zou, Yun, et al. "Whole blood and semen identification using mid-infrared and Raman spectrum analysis for forensic applications." *Analytical Methods*, 8.18 (2016): 3763-3767.
- [172] Lemler, P., et al. "NIR Raman spectra of whole human blood: effects of laser-induced and in vitro hemoglobin denaturation." *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406 (2014): 193-200.
- [173] Berghian-Grosan, Camelia, and Dana Alina Magdas. "Application of Raman spectroscopy and Machine Learning algorithms for fruit distillates discrimination." *Scientific reports* 10.1 (2020): 21152.
- [174] A. G. Bozkurt, Yüzeyde güçlendirilmiş raman spektroskopisi (sers) temelli platformların geliştirilmesi ve biyoanalizlerde kullanımı, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2018.
- [175] Cialla, Dana, et al. "Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends." *Analytical and bioanalytical chemistry*, 403 (2012): 27-54.
- [176] Amendola, Vincenzo, and Moreno Meneghetti. "Exploring How to Increase the Brightness of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Nanolabels: The Effect of the Raman-Active Molecules and of the Label Size." *Advanced Functional Materials*, 22.2 (2012): 353-360.
- [177] Kruszewski, Stefan. "Dependence of SERS signal on surface roughness." *Surface and interface analysis*, 21.12 (1994): 830-838.
- [178] Mahmoud, Mahmoud A., and Mostafa A. El-Sayed. "Different plasmon sensing behavior of silver and gold nanorods." *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 4.9 (2013): 1541-1545.
- [179] Wang, Li, Yujing Sun, and Zhuang Li. "Dependence of Raman intensity on the surface coverage of silver nanocubes in SERS active monolayers." *Applied Surface Science*, 325 (2015): 242-250.
- [180] Zhang, Chengpeng, et al. "Highly sensitive and reproducible SERS substrates based on ordered micropylramid array and silver nanoparticles." *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13.24 (2021): 29222-29229.
- [181] Feng, Shangyuan, et al. "Nasopharyngeal cancer detection based on blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate analysis." *Biosensors and Bioelectronics*, 25.11 (2010): 2414-2419.

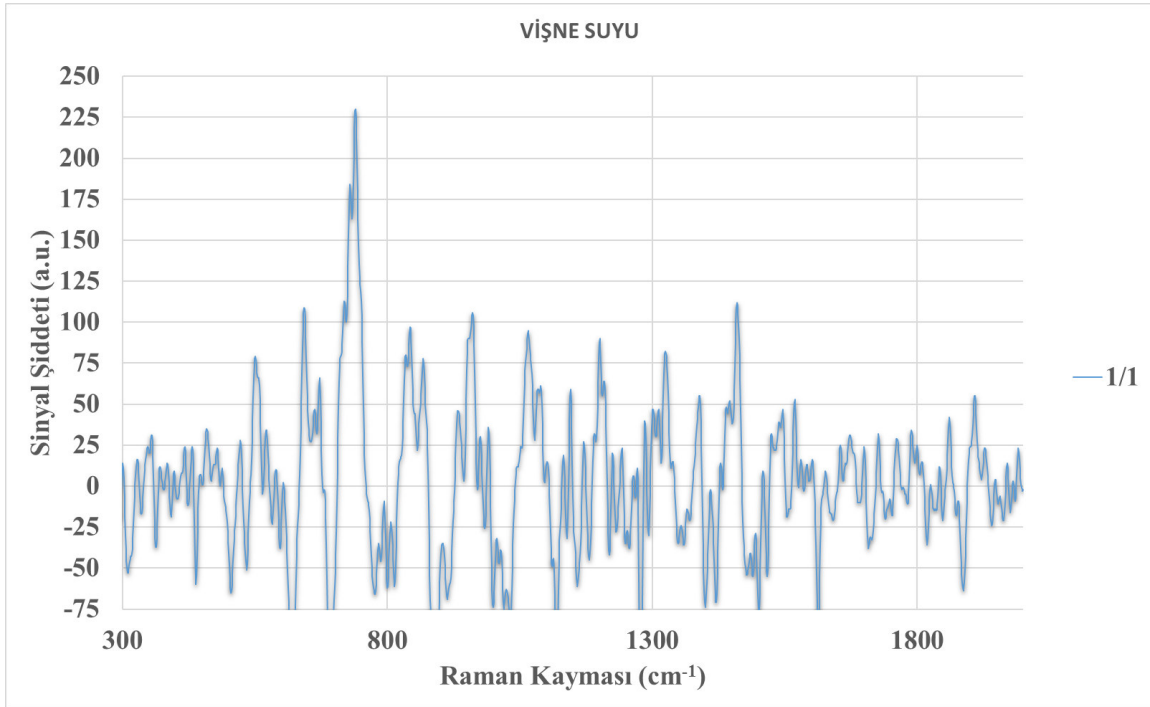
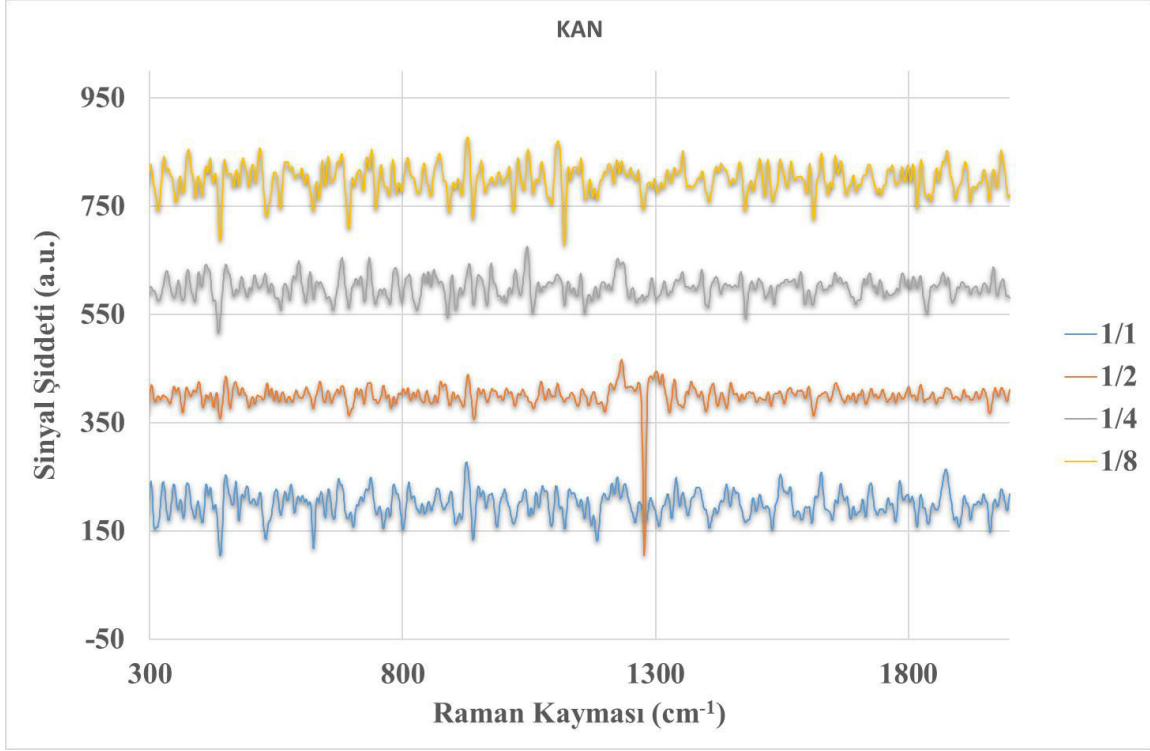
- [182] Smyth, C. A., et al. "Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) using Ag nanoparticle films produced by pulsed laser deposition." *Applied surface science*, 264 (2013): 31-35.
- [183] Lin, Dongdong, et al. "Large-area Au-nanoparticle-functionalized Si nanorod arrays for spatially uniform surface-enhanced Raman spectroscopy." *ACS nano*, 11.2 (2017): 1478-1487.
- [184] Saatkamp, Cassiano Junior, et al. "Quantifying creatinine and urea in human urine through Raman spectroscopy aiming at diagnosis of kidney disease." *Journal of biomedical optics*, 21.3 (2016): 037001-037001.
- [185] Trachta, Gerd, et al. "Combination of high-performance liquid chromatography and SERS detection applied to the analysis of drugs in human blood and urine." *Journal of molecular structure*, 693.1-3 (2004): 175-185.
- [186] Moisoiu, Vlad, et al. "Breast cancer diagnosis by surface-enhanced Raman scattering (SERS) of urine." *Applied Sciences*, 9.4 (2019): 806.
- [187] Phy, Jung Bin, et al. "Label-free SERS analysis of urine using a 3D-stacked AgNW-glass fiber filter sensor for the diagnosis of pancreatic cancer and prostate cancer." *Analytical chemistry*, 93.8 (2021): 3778-3785.
- [188] Moisoiu, Tudor, et al. "Combined miRNA and SERS urine liquid biopsy for the point-of-care diagnosis and molecular stratification of bladder cancer." *Molecular Medicine*, 28.1 (2022): 39.
- [189] Li, Ming, et al. "Reagent-and separation-free measurements of urine creatinine concentration using stamping surface enhanced Raman scattering (S-SERS)." *Biomedical optics express*, 6.3 (2015): 849-858.
- [190] Iancu, Stefania D., et al. "SERS liquid biopsy in breast cancer. What can we learn from SERS on serum and urine?" *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 273 (2022): 120992.
- [191] Guimarães, A. E., et al. "Near Infrared Raman Spectroscopy (NIRS): A technique for doping control." *Spectroscopy*, 20.4 (2006): 185-194.
- [192] Flores-Guerrero, Jose L., et al. "Novel assessment of urinary albumin excretion in type 2 diabetes patients by Raman spectroscopy." *Diagnostics*, 10.3 (2020): 141.
- [193] Mizrach, Amos, et al. "Yeast detection in apple juice using Raman spectroscopy and chemometric methods." *Transactions of the ASABE*, 50.6 (2007): 2143-2149.

- [194] Zhang, Zhong, et al. "Standing gold nanorod arrays as reproducible SERS substrates for measurement of pesticides in apple juice and vegetables." *Journal of food science*, 80.2 (2015): N450-N458.
- [195] Feng, Shaolong, et al. "Development of molecularly imprinted polymers-surface-enhanced Raman spectroscopy/colorimetric dual sensor for determination of chlorpyrifos in apple juice." *Sensors and Actuators B: Chemical*, 241 (2017): 750-757.
- [196] Žukovskaja, Olga, et al. "Towards Raman spectroscopy of urine as screening tool." *Journal of Biophotonics*, 13.1 (2020): e201900143.
- [197] Del Mistro, Greta, et al. "Surface-enhanced Raman spectroscopy of urine for prostate cancer detection: a preliminary study." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407 (2015): 3271-3275.
- [198] Fălămaș, A., H. Rotaru, and M. Hedeșiu. "Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) investigations of saliva for oral cancer diagnosis." *Lasers in Medical Science*, 35.6 (2020): 1393-1401.
- [199] Li, Xiaozhou, Tianyue Yang, and Junxiu Lin. "Spectral analysis of human saliva for detection of lung cancer using surface-enhanced Raman spectroscopy." *Journal of biomedical optics*, 17.3 (2012): 037003-037003.
- [200] Ma, Lingwei, Zhengjun Zhang, and Xiaogang Li. "Non-invasive disease diagnosis using surface-enhanced Raman spectroscopy of urine and saliva." *Applied Spectroscopy Reviews*, 55.3 (2020): 197-219.
- [201] Velička, Martynas, et al. "Detection of caffeine intake by means of EC-SERS spectroscopy of human saliva." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 246 (2021): 118956.
- [202] Palanco, Marta Espina, et al. "Templated green synthesis of plasmonic silver nanoparticles in onion epidermal cells suitable for surface-enhanced Raman and hyper-Raman scattering." *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 7.1 (2016): 834-840.
- [203] McLaughlin, Gregory, and Igor K. Lednev. "In situ identification of semen stains on common substrates via Raman spectroscopy." *Journal of forensic sciences*, 60.3 (2015): 595-604.
- [204] Muro, Claire K., and Igor K. Lednev. "Race differentiation based on Raman spectroscopy of semen traces for forensic purposes." *Analytical chemistry*, 89.8 (2017): 4344-4348.

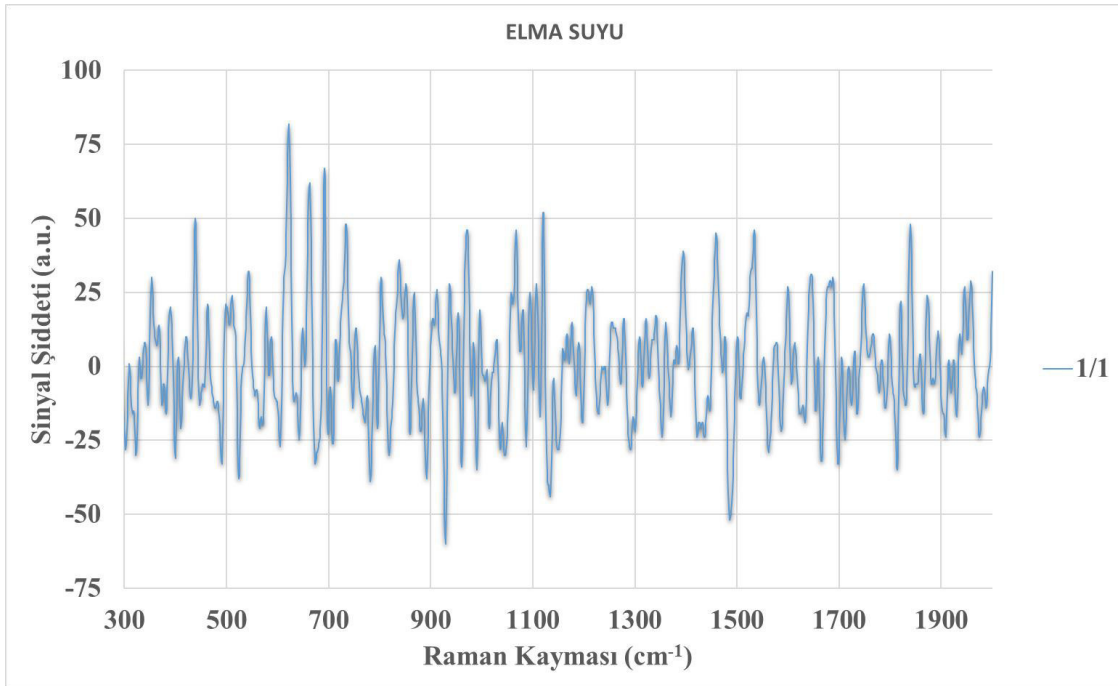
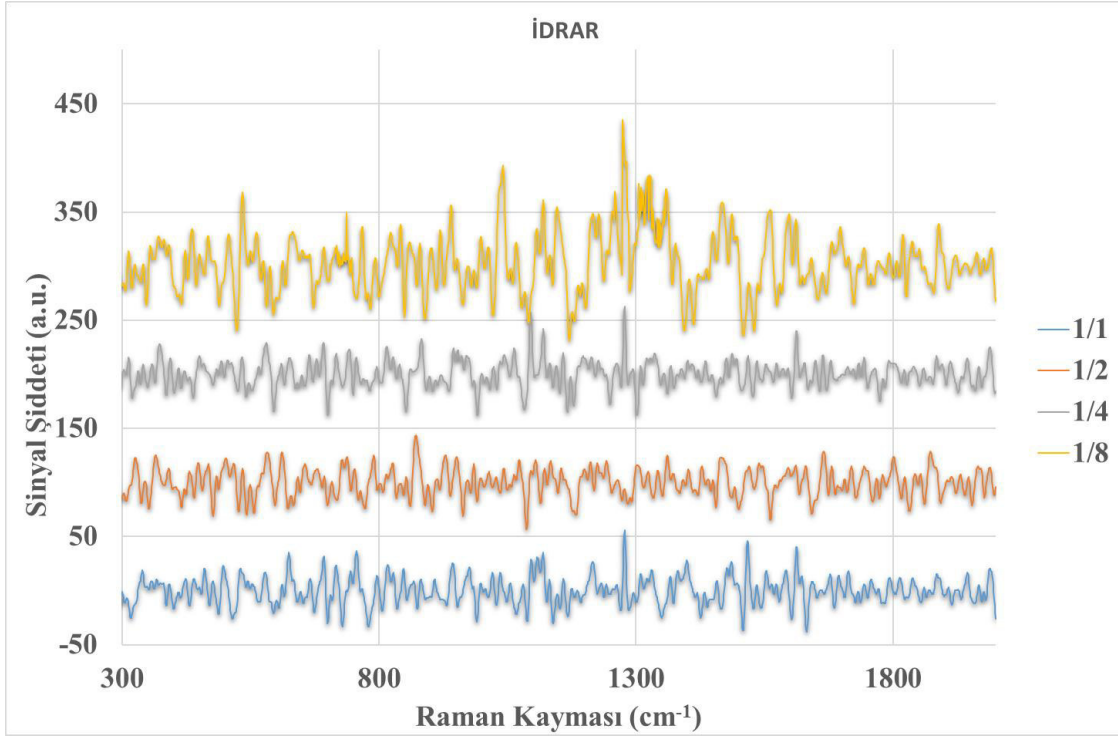
- [205] Sikirzhyskaya, Aliaksandra, et al. "Raman spectroscopy for the identification of body fluid traces: Semen and vaginal fluid mixture." *Forensic Chemistry*, 32 (2023): 100468.
- [206] Mo, Changyeun, et al. "Germination prediction of cucumber (*cucumis sativus*) seed using raman spectroscopy." *Journal of Biosystems Engineering*, 37.6 (2012): 404-410.
- [207] Atkins, Chad G., et al. "Raman spectroscopy of blood and blood components." *Applied spectroscopy*, 71.5 (2017): 767-793.
- [208] Barkur, Surekha, and Santhosh Chidangil. "Surface-enhanced Raman spectroscopy study of red blood cells and platelets." *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 37.4 (2019): 1090-1098.
- [209] Talari, Abdullah Chandra Sekhar, et al. "Raman spectroscopy of biological tissues." *Applied spectroscopy reviews*, 50.1 (2015): 46-111.
- [210] Lin, Jinyong, et al. "Rapid and label-free urine test based on surface-enhanced Raman spectroscopy for the non-invasive detection of colorectal cancer at different stages." *Biomedical optics express*, 11.12 (2020): 7109-7119.
- [211] Chen, Cheng, et al. "Urine Raman spectroscopy for rapid and inexpensive diagnosis of chronic renal failure (CRF) using multiple classification algorithms." *Optik*, 203 (2020): 164043.
- [212] Bel'skaya, L. V., E. A. Sarf, and N. A. Makarova. "Use of Fourier transform IR spectroscopy for the study of saliva composition." *Journal of Applied Spectroscopy*, 85 (2018): 445-451.
- [213] Derruau, Stéphane, et al. "Vibrational spectroscopy saliva profiling as biometric tool for disease diagnostics: A systematic literature review." *Molecules*, 25.18 (2020): 4142.
- [214] Colceriu-Şimon, Ioana Maria, et al. "The effects of low-dose irradiation on human saliva: A surface-enhanced raman spectroscopy study." *Diagnostics*, 9.3 (2019): 101.
- [215] Fikiet, Marisia A., and Igor K. Lednev. "Raman spectroscopic method for semen identification: Azoospermia." *Talanta*, 194 (2019): 385-389.

EKLER

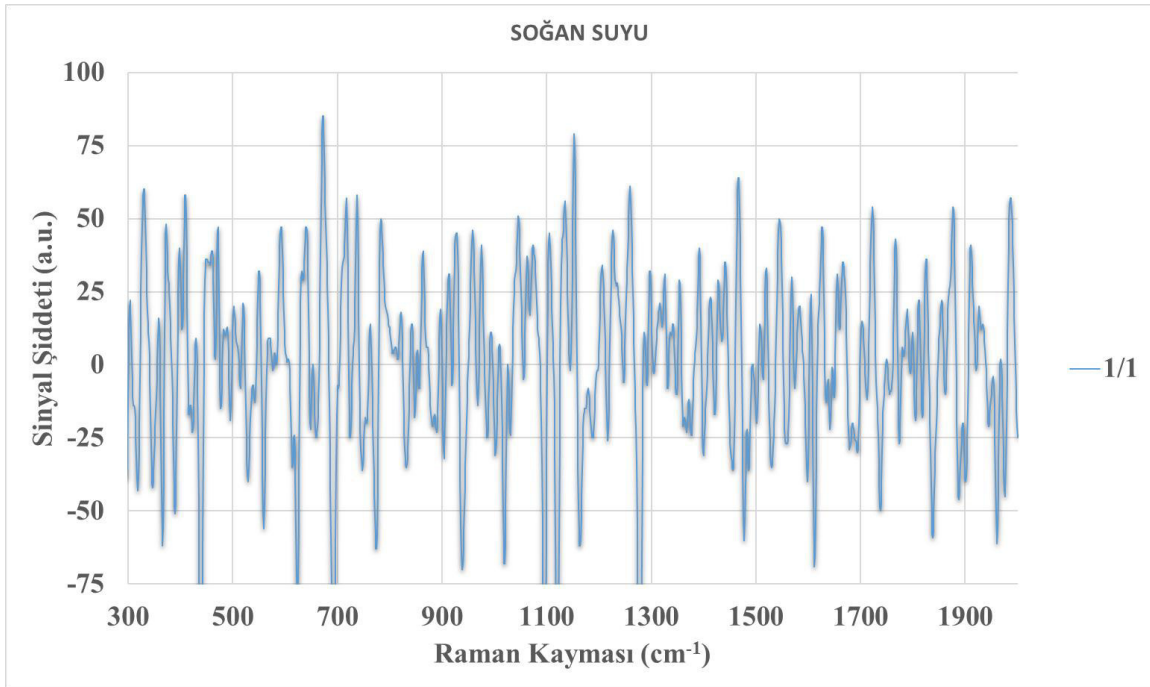
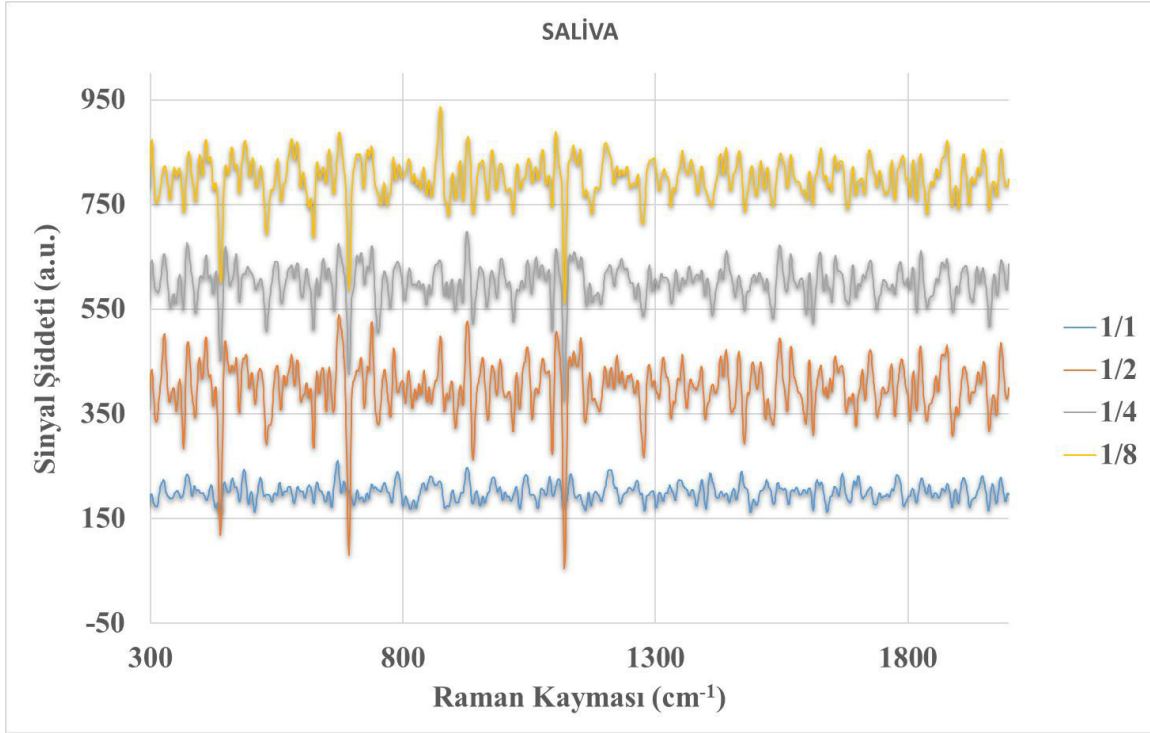
EK 1 – Spektrumlar



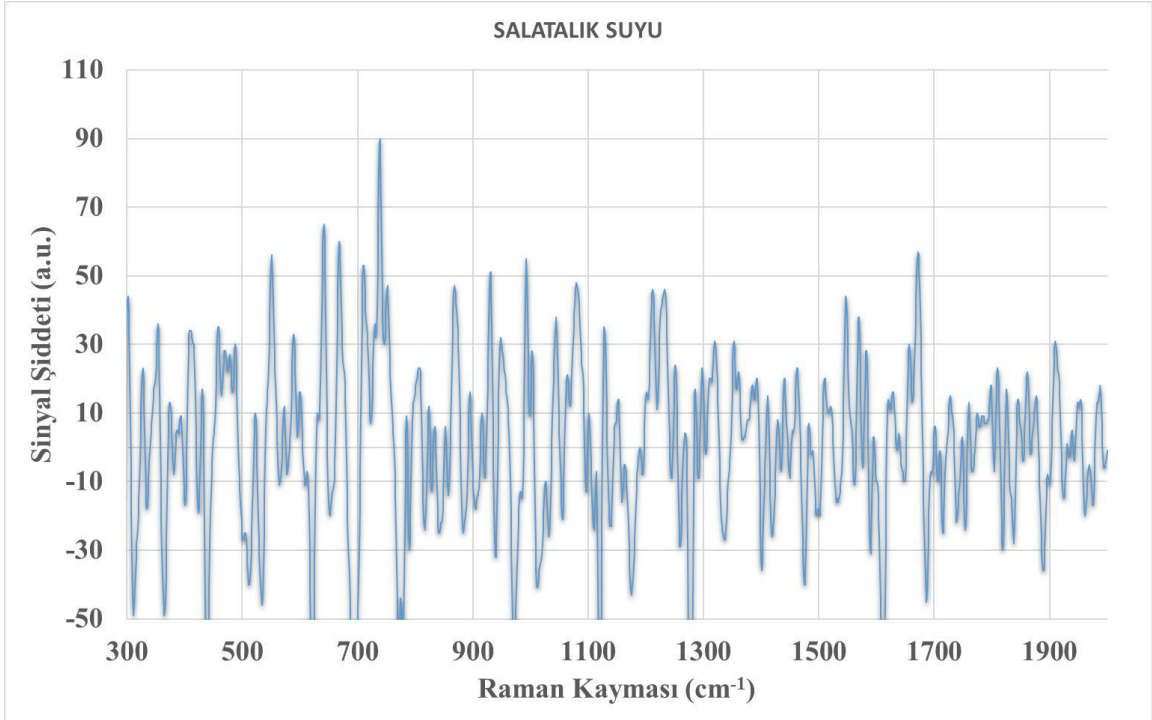
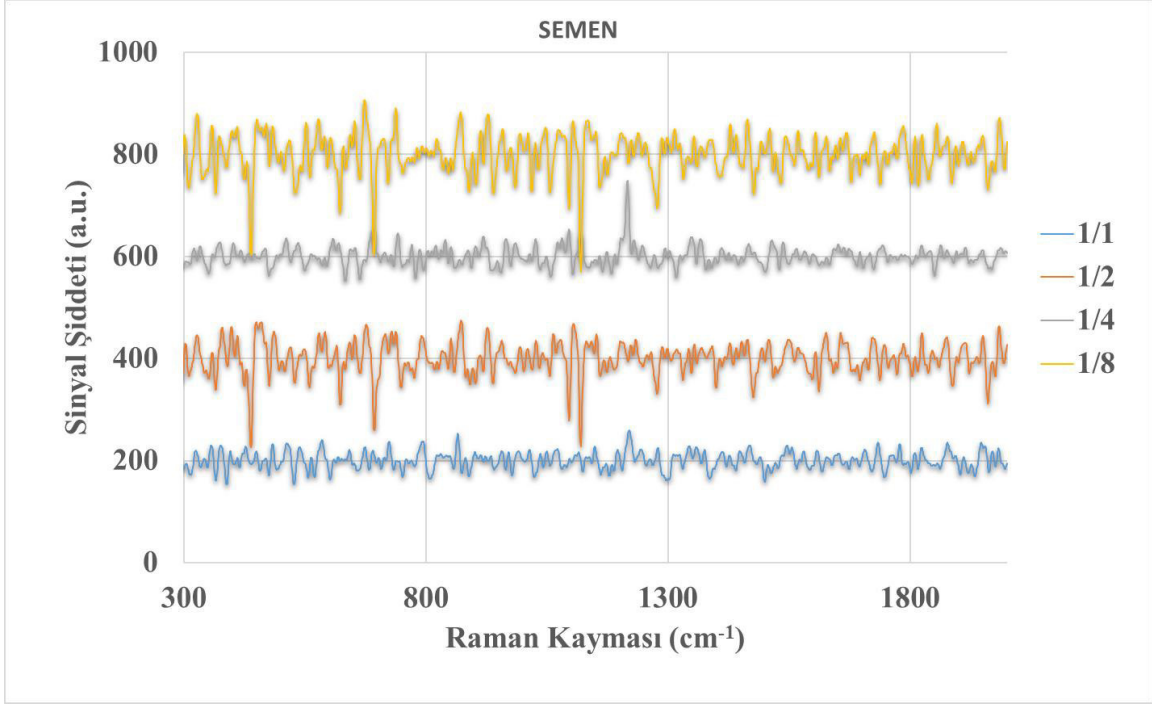
Kan Raman Spektrum Pikleri (cm⁻¹)	Şiddet Seviyesi	Vişne Suyu Raman Spektrum Pikleri (cm⁻¹)	Şiddet Seviyesi
950	Orta	655	Orta
1043	Orta	741	Zayıf
1239	Zayıf	1200	Zayıf
1354	Zayıf	1330	Zayıf
1462	Zayıf		
1625	Zayıf		



İdrar Raman Spektrum Pikleri (cm⁻¹)	Şiddet Seviyesi	Elma Suyu Raman Spektrum Pikleri (cm⁻¹)	Şiddet Seviyesi
875	Zayıf	622	Orta
942	Zayıf	662	Orta
1004	Zayıf	692	Zayıf
1040	Orta	735	Orta
1224	Zayıf	1459	Zayıf
1330	Zayıf		
1607	Orta		



Saliva Raman Spektrum Pikleri (cm ⁻¹)	Şiddet Seviyesi	Soğan Suyu Raman Spektrum Pikleri (cm ⁻¹)	Şiddet Seviyesi
393	Zayıf	651	Orta
877	Zayıf	672	Zayıf
928	Orta	1160	Zayıf
1030	Orta	1467	Zayıf
1444	Zayıf		



Semen Raman Spektrum Pikleri (cm-1)	Şiddet Seviyesi	Salatalık Suyu Raman Spektrum Pikleri (cm-1)	Şiddet Seviyesi
676	Zayıf	560	Zayıf
860	Zayıf	647	Zayıf
1105	Zayıf	731	Zayıf
1218	Güçlü	1669	Zayıf
1452	Zayıf		
1569	Zayıf		
1678	Zayıf		

EK 3 – Tezden Türetilmiş Yayınlar

1. Köroğlu, U., Sağlam, N., Tamer, U., Akçan, R., Altın Nano Çubuklar ve Gümüş Nano Parçacıklar Kullanılarak Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi Yoluyla Saf ve Karışık İdrar Lekelerinin Tanımlanması. Politeknik Dergisi, (2023), 1-1.
2. Köroğlu, U., Sağlam, N., Tamer, U., Akçan, R., Boyacı, İH., Evran, E., Identification of blood at simulated crime scenes using silver nanoparticles with SERS. Turkish Journal of Chemistry, (2024), 1-1.

EK 4 – Tezden Türetilmiş Bildiriler

1. Uğur Köroğlu, Necdet Sağlam, Uğur TAMER, Ramazan AKÇAN, Identification Of Biological Fluids Through SERS Using Various Nanoparticles, International Conference On Advanced Materials Science & Engineering And High Tech Devices Applications; Exhibition (ICMATSE 2022), 27-29 October 2022, Ankara, Türkiye.
2. Uğur Köroğlu, Mahmut Şerif Yıldırım, Uğur TAMER, Necdet Sağlam, Identification Of Saliva Stains Through SERS Using Various Nanoparticles ,6th International Conference On Physical Chemistry & Functional Materials (PCFM 2023), 13-14 June 2023, Elazığ, Türkiye.