**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

# KSANTİN TAYİNİ İÇİN KARBON NANOMATERYAL VE MEDYATÖR TEMELLİ AMPEROMETRİK BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

**Erdinç CAN**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ANKARA**
**2023**

**Her hakkı saklıdır**

# ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KSANTİN TAYİNİ İÇİN KARBON NANOMATERYAL VE MEDYATÖR TEMELLİ AMPEROMETRİK BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Erdinç CAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Esin CANEL

Bu tez çalışmasında karbon nanofiber (CNF) ve ferrosen karboksilik asit (Fc-COOH) ile modifiye edilen elektrot hazırlandı. Bu modifiye camsı karbon elektrot (GCE) yüzeyine ksantin oksidaz (XO) enziminin çapraz bağlama yöntemi kullanılarak immobilize edilmesi ile ksantin tayini için amperometrik biyosensör geliştirildi. Biyosensörün yüzey morfolojisinin karakterize edilmesinde taramalı elektron mikroskopi yöntemi kullanıldı. Enzim elektrodun optimum yüzey bileşimi, çalışma şartları, performans faktörleri ve gerçek numunede ksantin tayinine uygulanabilirliği incelendi. Geliştirilen XO/Fc-COOH/CNF/GCE için en uygun medyatör ve enzim miktarı, çalışma potansiyeli ve tampon pH'sı sırasıyla 5 µL, 3 U, +0,40 V ve pH 8,0 olarak bulundu. Biyosensörün doğrusal çalışma aralığı $6{,}0\times10^{-7}$ – $2{,}0\times10^{-4}$ M, duyarlığı 4,48 µA $\mu M^{-1}$, gözlenebilme sınırı $1{,}7\times10^{-7}$ M, cevap süresi 11 saniyeydi. Tekrar üretilebilirlik ve tekrar kullanılabilirlik çalışmalarında bağıl standart sapma sırasıyla %3,0 ve %3,6 olarak hesaplandı. Biyosensör cevabına gerçek numunelerde bulunan ve girişim etkisi yapabilecek türlerin etkisi araştırıldı. Hazırlanan biyosensör ile balıkta ksantin tayininin başarılı bir şekilde yapılabileceği görüldü.

**Ocak 2023, 59 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Amperometri, karbon nanofiber, ferrosen karboksilik asit, ksantin, enzim elektrot, ksantin oksidaz

## ABSTRACT

MSc Thesis

DEVELOPMENT OF CARBON NANOMATERIAL AND MEDIATOR-BASED AMPEROMETRIC BIOSENSOR FOR THE DETERMINATION OF XANTHINE

Erdinç CAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Esin CANEL

In this thesis, an electrode modified with carbon nanofiber (CNF) and ferrocene carboxylic acid (Fc-COOH) was prepared. An amperometric biosensor was prepared for xanthine determination by immobilizing xanthine oxidase (XO) enzyme on this modified glassy carbon electrode (GCE) surface using cross-linking method. Scanning electron microscopy method was used to characterize the surface morphology of the biosensor. The optimum surface composition of the enzyme electrode, operating conditions, performance factors and applicability to the determination of xanthine in real samples were investigated. The optimal amount of mediator and enzyme, working potential and buffer pH for the developed XO/Fc-COOH/CNF/GCE were found to be 5 μL, 3 U, +0.40 V and pH 8.0, respectively. The linear working range of the biosensor was $6{,}0\times10^{-7}$ – $2{,}0\times10^{-4}$ M, sensitivity was 4,48 μA $\mu M^{-1}$, detection limit was $1.7\times10^{-7}$ M and response time was 11 s. In the reproducibility and repeatability studies, the relative standard deviation was calculated as 3.0% and 3.6%, respectively. The effect of the species found in real samples that can cause interference on the biosensor response was investigated. It was seen that xanthine determination in fish can be performed successfully with the prepared biosensor.



**January 2023, 59 pages**

**Key Words:** Amperometry, carbon nanofiber, ferrocene carboxylic acid, xanthine, enzyme electrode, xanthine oxidase

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bana her konuda yardımcı olan, bilgisini, tecrübesini ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Esin CANEL'e,

Tez çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren Sayın Prof. Dr. Pınar Esra ERDEN ve Doç. Dr. Ceren KAÇAR SELVİ'ye,

Araştırmalarıma tecrübesi ile katkıda bulunan, bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Esma KILIÇ'a

Tez sürecinde her zaman yanımda olan ve desteğini hep hissettiğim Sayın Doç. Dr. Berna DALKIRAN'a,

Tez çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan ve desteklerini hep hissettiğim değerli arkadaşlarım Sezen İrem ASLANER, Ceren YILDIZ, Erdal EMİR ve Hüseyin ATILGAN'a

Hayatımın her döneminde bana verdikleri manevi destek, göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı canım aileme ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü'nce desteklenen 21L0430019 no'lu "Ksantin tayini için karbon nanomateryal ve medyatör temelli amperometrik biyosensör geliştirilmesi" konulu projeden temin edilen sarf malzemeler kullanılarak tamamlanmıştır.

Erdinç CAN
Ankara, Ocak 2023

# İÇİNDEKİLER

**TEZ ONAYI**
**ETİK** ..... **i**
**ÖZET** ..... **ii**
**ABSTRACT** ..... **iii**
**ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR** ..... **iv**
**SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ** ..... **vii**
**ŞEKİLLER DİZİNİ** ..... **ix**
**ÇİZELGELER DİZİNİ** ..... **x**
**1. GİRİŞ** ..... **1**
**2. KURAMSAL TEMELLER** ..... **3**
**2.1 Ksantin Tayininin Önemi** ..... **3**
**2.2 Biyosensörler** ..... **4**
**2.3 Amperometrik Biyosensörler** ..... **6**
**2.3.1 Birinci nesil enzim elektrotlar** ..... **6**
**2.3.2 İkinci nesil enzim elektrotlar** ..... **7**
**2.3.3 Üçüncü nesil enzim elektrotlar** ..... **8**
**2.4 İdeal Bir Biyosensörün Özellikleri** ..... **8**
**2.4.1 Doğrusal çalışma aralığı ve gözlenebilme sınırı** ..... **8**
**2.4.2 Duyarlık** ..... **8**
**2.4.3 Cevap süresi** ..... **9**
**2.4.4 Tekrarlanabilirlik** ..... **9**
**2.4.5 Seçicilik** ..... **9**
**2.4.6 Kararlılık** ..... **10**
**2.4.7 Ömür** ..... **10**
**2.5 Enzimler** ..... **10**
**2.6 İmmobilize Enzimler** ..... **11**
**2.6.1 Ksantin oksidaz enziminin özellikleri** ..... **12**
**2.6.2 Enzim immobilizasyon yöntemleri** ..... **12**
**2.7 Kaynak Araştırması** ..... **14**
**2.7.1 Ksantin tayini ile ilgili çalışmalar** ..... **14**
**3.MATERYAL VE YÖNTEM** ..... **21**
**3.1 Ekipmanlar** ..... **21**
**3.2 Kimyasal Maddeler** ..... **22**
**3.3 Çözeltiler** ..... **24**
**3.3.1 Ksantin çözeltisi** ..... **24**
**3.3.2 Fosfat tamponu** ..... **24**
**3.3.3 Ksantin oksidaz çözeltisi** ..... **24**
**3.3.4 Ferrosen karboksilik asit çözeltisi** ..... **24**
**3.3.5 Karbon nanofiber dispersiyonu** ..... **25**
**3.3.6 EDC-NHS çözeltisi** ..... **25**
**3.3.7 Kitosan çözeltisi** ..... **25**
**3.3.8 Glutaraldehit çözeltisi** ..... **25**
**3.3.9 Sığır serum albümin çözeltisi** ..... **25**
**3.3.10 Diğer çözeltiler** ..... **26**
**3.4 GCE Yüzeyinin Temizlenmesi ve Parlatılması** ..... **26**
**3.5 Elektrotların Modifiye Edilmesi** ..... **26**
**3.6 Modifiye Elektrotların Ksantine Duyarlığının Belirlenmesi** ..... **27**

**3.7 Dönüşümlü Voltametri (CV) ve Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) Ölçümleri ..... 27**
**3.8 Modifikasyonda Kullanılan Maddelerin Miktarlarının Optimizasyonu ..... 28**
**3.8.1 CNF miktarı ..... 28**
**3.8.2 Fc-COOH derişimi ..... 28**
**3.8.3 Enzim miktarı ..... 28**
**3.8.4 Enzim immobilizasyon yönteminin seçilmesi ..... 29**
**3. 9 Optimum Çalışma Şartlarının Belirlenmesi ..... 29**
**3.9.1 pH ..... 29**
**3.9.2 Çalışma potansiyeli ..... 29**
**3.10 Biyosensörün Performans Parametreleri ..... 30**
**3.10.1 Gözlenebilme sınırı ve çalışma aralığı ..... 30**
**3.10.2 Cevap süresi ..... 30**
**3.10.3 Tekrar kullanılabilirlik ..... 30**
**3.10.4 Kararlılık ..... 31**
**3.10.5 Bozucu türlerin biyosensör cevabına etkisi ..... 31**
**3.11 Gerçek Numune Uygulaması ..... 31**
**3.11.1 Balık numunesinin analize hazırlanması ..... 31**
**3.11.2 Balıkta ksantin tayini ..... 32**
**4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA ..... 33**
**4.1 Elektrot Modifikasyonunda Kullanılan Maddelerin Miktar Optimizasyonu ..... 33**
**4.1.1 CNF derişimi ..... 33**
**4.1.2 Fc-COOH derişimi ..... 34**
**4.1.3 Enzim miktarı ..... 35**
**4.2 Elektrot Yüzeylerinin Karakterizasyonu ..... 36**
**4.3 Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal Davranışları ..... 38**
**4.4 Enzim Elektrodun Hazırlanması ..... 40**
**4.4.1 Enzim immobilizasyon yönteminin seçilmesi ..... 40**
**4.5 Optimum Çalışma Koşulları ..... 41**
**4.5.1 pH ..... 41**
**4.5.2 Çalışma potansiyeli ..... 42**
**4.6 Performans Faktörleri ..... 44**
**4.6.1 Çalışma aralığı ve duyarlığı ..... 44**
**4.6.2 Cevap süresi ..... 46**
**4.6.3 Tekrar kullanılabilirlik ..... 46**
**4.6.4 Tekrar üretilebilirlik ..... 46**
**4.6.5 Kararlılık ..... 47**
**4.6.6 Bozucu türlerin biyosensör cevabına etkisi ..... 47**
**4.6.7 Analitik uygulamalar ..... 48**
**5. SONUÇ ..... 50**
**KAYNAKLAR ..... 51**
**ÖZGEÇMİŞ ..... 59**

## SİMGELER DİZİNİ

| | |
|---|---|
| nA | Nanoamper |
| µA | Mikroamper |
| A | Amper |
| V | Volt |
| M | Molar |
| mM | Milimolar |
| nM | Nanomolar |
| $H_2O_2$ | Hidrojen peroksit |
| Δi | Akım farkları |
| Δ*E*p | Pik potansiyelleri farkı |
| Z′ | Gerçek empedans |
| Z″ | Sanal empedans |

**Kısaltmalar**

| | |
|---|---|
| SPE | Perde baskılı elektrot |
| CV | Dönüşümlü voltametri |
| Fc-COOH | Ferrosen karboksilik asit |
| CNF | Karbon nanofiber |
| GCE | Camsı karbon elektrot |
| SEM | Taramalı elektron mikroskobu |
| DPV | Diferansiyel puls voltametrisi |
| EIS | Elektrokimyasal empedans spektroskopisi |
| TEM | Geçirimli elektron mikroskobu |
| X | Ksantin |
| XD | Ksantin dehidrojenaz |
| GA | Glutaraldehit |
| CS | Kitosan |
| EDC | N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) karbodimid |
| NHS | N-hidroksi süksinimid |
| BSA | Sığır serum albümin |

| | |
|---|---|
| BSS | Bağıl Standart Sapma |
| XO | Ksantin Oksidaz |
| PGE | Kalem grafit elektrot |
| MWCNT | Çok duvarlı karbon nanotüp |
| XRD | X ışını kırınımı |
| FTIR | Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi |
| EAB | Eğik açılı biriktirme |
| NADH | Nikotinamid adenin dinükleotit |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| HRP | Horseradish peroksidaz |
| HPLC | Yüksek performanslı sıvı kromatografi |
| U | Ünite |
| ATP | Adenozin trifosfat |
| ADP | Adenozin difosfat |
| HX | Hipoksantin |
| IMP | İnosin monofosfat |
| AMP | Adenozin monofosfat |
| GMP | Guanin monofosfat |
| HxR | İnosin |
| UA | Ürik asit |
| EDX | Enerji dağılımı X-ışını spektroskopisi |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Ksantinin kimyasal formülü ..... 4

Şekil 2.2 Biyosensörün şeması (Velasco-Garcia ve Mottram 2003) ..... 5

Şekil 2.3 Medyatörlü ve medyatörsüz biyosensörlerde elektron transfer mekanizması ... 7

Şekil 3.1 a. Elektrokimyasal hücre standı, b. Elektrokimyasal analiz cihazı ..... 22

Şekil 4.1 XO/Fc-COOH/CNF/GCE'nin ksantine duyarlığının CNF derişimi ile değişimi (0,05 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,40 V, oda sıcaklığı) ..... 34

Şekil 4.2 XO/Fc-COOH/CNF/GCE'nin ksantine duyarlığının Fc-COOH derişimi ile değişimi (0,05 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,40 V, oda sıcaklığı) ..... 35

Şekil 4.3 XO/Fc-COOH/CNF/GCE'nin ksantine duyarlığının enzim miktarı ile değişimi (0,05 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,40 V, oda sıcaklığı) ..... 36

Şekil 4.4 (a) SPE, (b) CNF/SPE, (c) Fc-COOH/CNF/SPE, (d) XO/ Fc-COOH/CNF/SPE yüzeylerin SEM görüntüleri ..... 37

Şekil 4.5 Fc-COOH/CNF/SPE'nin EDX spektrumu ..... 38

Şekil 4.6 Dönüşümlü voltamogramlar: (a) GCE; (b) CNF/GCE ve (c) Fc-COOH/CNF/GCE (0,1 M KCl içeren 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ çözeltisinde, v=50 mV $s^{-1}$) ..... 39

Şekil 4.7 (a) GCE; (b) CNF/GCE ve (c) Fc-COOH/CNF/GCE'ların Nyquist eğrileri (0,1 M KCl içeren 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ çözeltisi içinde) ..... 40

Şekil 4.8 XO/Fc-COOH/CNF/GCE ksantine duyarlığına pH'ın etkisi (0,05 M fosfat tamponu, +0,40 V, oda sıcaklığı) ..... 42

Şekil 4.9 XO/CNF/Fc-COOH/GCE'nin dönüşümlü voltamogramı (0,05 M pH 8,0 fosfat tamponu, oda sıcaklığı, v=50 mV $s^{-1}$) ..... 43

Şekil 4.10 XO/CNF/Fc-COOH/GCE'nin ksantine duyarlığına çalışma potansiyelinin etkisi (0,05 M pH 8,0 fosfat tamponu, oda sıcaklığı) ..... 44

Şekil 4.11 XO/Fc-COOH/CNF/GCE'nin ksantine kronoamperometrik cevabı (a) Akım–zaman grafiği, (b) Kalibrasyon eğrisi (N=3) (0,05 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,40 V, oda sıcaklığı) ..... 45

Şekil 4.12 XO/Fc-COOH/CNF/GCE'nin kronoamperometrik cevabına bazı türlerin etkisi (0,05 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,40 V, oda sıcaklığı) ..... 48

Şekil 4.13 XO/Fc-COOH/CNF/GCE ile balık etinin tazeliğinin izlenmesi ..... 49

# ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Biyosensör geliştirme çalışmalarında kullanılan kimyasallar, saflık düzeyleri ve markaları…….……22

Çizelge 4.1 GA-BSA ile çapraz bağlama ve EDC-NHS ile kovalent bağlama yöntemleri kullanılarak hazırlanan elektrotların performansının karşılaştırılması .....41

Çizelge 4.2 Standart katma yöntemi ile balık numunesinde ksantin tayini için XO/Fc-COOH/CNF/GCE ile elde edilen geri kazanım sonuçları (0,05 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,40 V, oda sıcaklığı, *N*=3).....49

# 1. GİRİŞ

Bir biyosensör, analit derişimi ile orantılı ölçülebilir sinyal elde etmek için yapısında bir biyolojik algılayıcı ve fiziksel dönüştürücüyü birleştiren analitik bir sistem olarak tanımlanabilir (Kissinger 2005). Biyosensörler, biyomedikal sektör; çevresel analizler, savunma sanayi, gıda endüstrisi, ilaç endüstrisi gibi alanlarda yaygın biçimde kullanılmaktadır (Dinçkaya 1999). Biyosensörlerin günümüzde en sık kullanılan örnekleri ise amperometrik enzim elektrotlardır. Amperometri belirli bir potansiyelde akım şiddetinin ölçümüne dayanır. Ölçülen akım, çalışma elektrodunda indirgenen veya yükseltgenen elektroaktif türün derişiminin bir fonksiyonudur (Pizzariello vd. 2001).

Ksantin pürin metabolizmasında bir ara ürün olup, özellikle balık et tazeliğinin değerlendirilmesinde büyük önem taşır. Bir balığın ölümünden sonra adenozin trifosfat (ATP), balık etinin depolanmasıyla artan ksantine dönüşür (Suzuki vd. 1975). ATP'nin ayrışması ATP → ADP → AMP → IMP → HxR → HX → X → UA dizisine göre ilerler; burada HX = Hipoksantin, ATP = adenozin trifosfat, , IMP = inosin monofosfat, AMP = adenozin monofosfat, HxR = inosin, ADP = adenozin difosfat, X = ksantin ve UA ürik asittir (Pundir vd. 2014).

Literatüre göre ksantin tayini için çeşitli yöntemler mevcuttur. Bunlar arasında kapiler kolon gaz kromatografisi (Devi vd. 2011), kemilüminesans (Pagliarussi vd. 2002), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (Tang vd. 2011) ve spektrofotometri (Dervisevic vd. 2015) bulunmaktadır. Fakat bu yöntemlerin çoğu yüksek maliyetli, zaman alıcı, karmaşık ve zahmetlidir. Ayrıca gerçek zamanlı izleme için yetersizdirler. Bu yöntemlerle kıyaslandığında biyosensör kullanımı basit, seçici, yüksek duyarlıklı, hızlı ve ucuz olma özellikleriyle ksantin tayini için iyi bir alternatiftir.

Bu tez çalışmasında balık eti tazeliğini tespit etmek için önemli bir etken olan ksantinin tayini için medyatör temelli amperometrik enzim elektrot geliştirilmesi hedeflendi. Enzimin immobilize edileceği yüzey olarak camsı karbon elektrot kullanıldı. Çalışmada ksantin oksidaz enzimi camsı karbon elektrot yüzeyine EDC-NHS yardımıyla kovalent bağlama yöntemi kullanılarak immobilize edildi. Çalışmada biyosensörün optimum

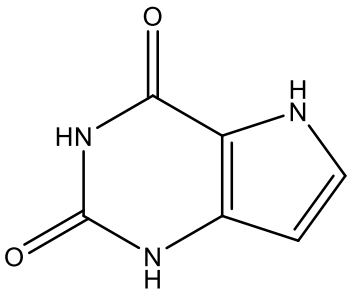
çalışma şartlarını belirlemek amacıyla tampon pH'sı, enzim ve medyatör miktarı, karbon nanomalzeme miktarı ve çalışma potansiyelinin biyosensör cevabı üzerine etkisi belirlendi. Enzim elektrot için doğrusal çalışma aralığı, duyarlık, gözlenebilme sınırı, raf ömrü ve tekrar kullanılabilirlik gibi parametreler de incelendi. Hazırlanan enzim elektrodun yüzey modifikasyonlarının tespiti için taramalı elektron mikroskopi (SEM) yönteminden faydalanıldı. Sonrasında dönüşümlü voltametri (CV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) tekniklerinden faydalanılarak elektrodun elektrokimyasal özellikleri incelendi. Hazırlanan ksantin enzim elektrot ile balık etinde ksantin tayini yapılması hedeflendi. Bu çalışma ksantin biyosensörü geliştirmede ilk defa karbon nanofiber ve redoks medyatörü olarak ferrosen karboksilik asitin (Fc-COOH) birlikte kullanılması ve bu kompozitin daha önce ksantin tayini için hiç kullanılmamış olması nedeniyle orijinal ve yenidir.

# 2. KURAMSAL TEMELLER

## 2.1 Ksantin Tayininin Önemi

Pek çok vücut dokusunda ve biyolojik sıvıda bulunan ve kimyasal adı 3,7-dihidro-pürin-2,6-dion olan ksantin bir pürin bazıdır (Pei ve Li 2000). İdrar ve kandaki ksantin seviyesi ksantinüri, hiperüresemi, gut ve böbrek yetmezliği gibi bazı metabolik bozuklukların tanı ve tıbbi tedavisi için değerli bilgiler sağlar. Ayrıca, gıda sektöründe balık ve et ürünleri tazeliğinin belirlenmesinde de ksantin derişimlerinden faydalanılabilir. Ksantinin biyolojik sıvılarda ve et ürünlerinde tayini için HPLC (Cooper vd. 2006), kemilüminesans (Hlavay vd. 1994), kılcal elektroforez (Pagliarussi vd. 2002; Kress vd. 2002), kütle spektrometri (Olojo vd. 2005) ve spektrofotometri (Amigo vd. 2005) gibi farklı analitik yöntemler rapor edilmiştir. Ancak, geliştirilen çoğu yöntem, karışık ve zaman alıcı numune hazırlama basamaklarına sahip olup ve uygulama için eğitimli kişilerin gerektiği pahalı yöntemlerdir (Vidotto vd. 2003). Ksantin tayini için geliştirilmiş elektrokimyasal yöntemler kromatografi gibi yöntemlerle karşılaştırıldığında yüksek hız, iyi duyarlık, basit kullanım ve kolay üretilebilirlik gibi üstünlüklere sahip olup, gıda, çevre, tarım uygulamaları, biyoteknoloji ve ilaç endüstrisi gibi birçok alanda geniş bir uygulama alanı potansiyeli gösterirler (Pundir vd. 2014). Ksantin elektrokimyasal yöntemle hem enzimsiz hem de enzimli elektrotlar kullanılarak tayin edilebilir (Lavanya vd. 2016; Pundir ve Devi 2014). Enzimsiz elektrokimyasal ksantin tayin yöntemleri ksantinin elektrot yüzeyinde yükseltgenmesi sonucu oluşan akımdan yararlanır (Baş 2011). Enzimli elektrokimysal ksantin tayin yöntemlerinde ksantin oksidaz enzimi (XO) yaygın biçimde kullanılır ve bu enzimin katalizlediği reaksiyonla ksantin ürik asit ve $H_2O_2$'e dönüşür (Dalkıran vd. 2014). İlgili reaksiyon aşağıda verilmiştir. Elektrot yüzeyine potansiyel uygulandığında oluşan akımın ksantin derişimiyle orantılı olmasından faydalanılarak numunedeki ksantin miktarı belirlenir.

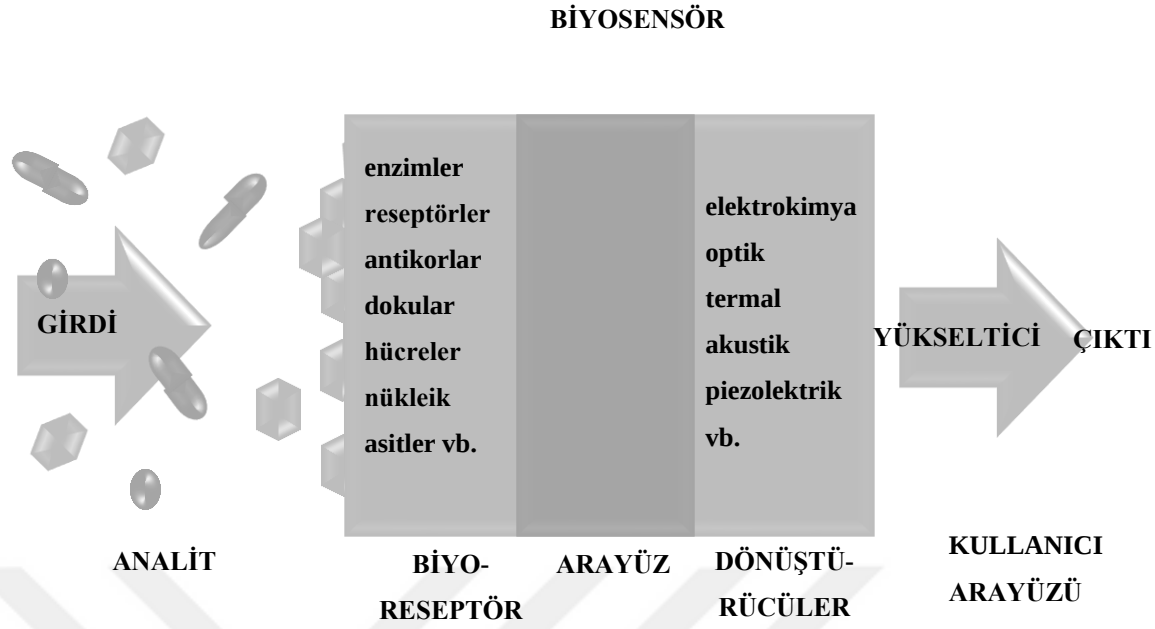
$$\text{Ksantin} + O_2 + H_2O \rightarrow \text{Ürik asit} + H_2O_2 \text{ (XO varlığında)}$$




Şekil 2.1 Ksantinin kimyasal formülü

## 2.2 Biyosensörler

L.C. Clark'ın 1950'lerde devam eden bir ameliyatta kandaki $O_2$ seviyesini bir elektrot ile izlemesi biyosensör tarihinin başlangıcı kabul edilir (Akyüz 2011). Biyosensörler, gözlenen bir yanıtı, büyüklüğü numunelerdeki belirli bir kimyasalın veya bir dizi kimyasalın derişimiyle doğru orantılı ölçülebilir bir sinyale dönüştürmek için bir dönüştürücüye bağlı bir biyolojik algılama elemanı içeren analitik cihazlardır (Akyüz 2011). Bir dönüştürücünün ana işlevi, biyolojik olarak aktif malzemede analit ile etkileşimden kaynaklanan fizikokimyasal değişikliği bir çıkış sinyaline dönüştürmektir (Yunus vd. 2011). Gıda, ilaç endüstrisi, çevre analizleri, tarım ve biyoteknoloji gibi birçok farklı dalda geniş uygulama alanı bulan biyosensörler yüksek duyarlık, kullanım kolaylığı, hızlı ve kolay üretilebilir olma gibi özellikleri nedeniyle önemli bir araştırma alanıdır (Kimmel vd. 2012). Şekil 2.2'de bir biyosensörün genel şeması gösterilmektedir (Velasco-Garcia ve Mottram 2003). Biyosensörler kullanılan dönüştürücü tipine göre optik, kalorimetrik, piezoelektrik ve elektrokimyasal biyosensörler olarak sınıflandırılır (Karunakaran vd. 2015).




Şekil 2.2 Biyosensörün şeması (Velasco-Garcia ve Mottram 2003)

Optik biyosensörler, bir biyokimyasal reaksiyonun sonucu absorplanan veya yayılan ışığın ölçümünü esas alırlar. Kalorimetrik biyosensörler, biyokimyasal reaksiyon sonucu oluşan ısı değişiminin izlenmesi ile substrat derişiminin tespit edilmesini esas alan biyosensörlerdir. Piezoelektrik biyosensörler, piezoelektrik kristalin yüzeyinde bir madde birikmesi sonucu rezonans frekansındaki değişimin ölçümüne dayanır. Elektrokimyasal biyosensörler, elektrokimyasal türlerin biyoetkileşimi sırasında oluşan sinyalin ölçümünü temel alır ve biyosensörlerin en yaygın kullanılan sınıfını oluşturur (Keskin vd. 2020). Bu tip biyosensörler, bir biyoetkileşim süreci sırasında, elektronlar gibi elektrokimyasal türlerin, bir elektrokimyasal detektör tarafından ölçülebilen bir elektrokimyasal sinyal üreterek tüketilmesi veya üretilmesi esasına dayanmaktadır (Mohanty vd. 2006). Elektrokimyasal biyosensörler, bulanık ortamda çalıştırılabilir, karşılaştırılabilir enstrümantal duyarlılığa sahiptir ve minyatürleştirmeye daha uygundur (Ansari vd. 2022). Elektrokimyasal biyosensörler elektriksel parametrelerin ölçülmesine göre kondüktometrik, amperometrik ve potansiyometrik olarak sınıflandırılır.

## 2.3 Amperometrik Biyosensörler

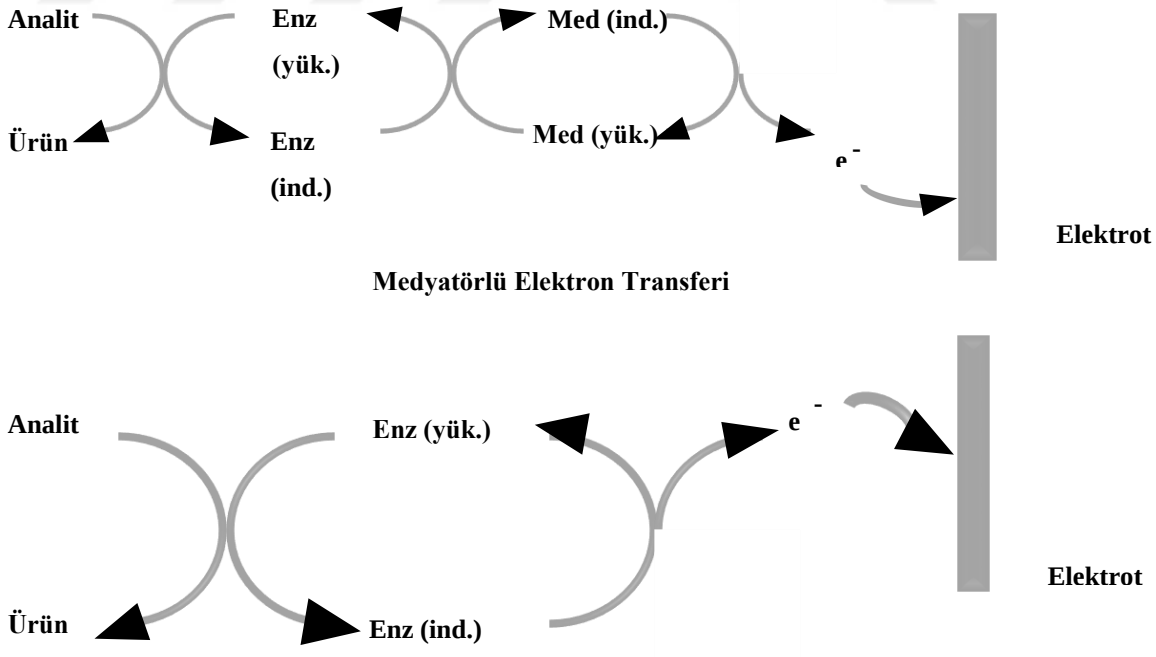
Amperometrik biyosensörler, biyokimyasal reaksiyon ürünlerinin doğrudan yükseltgenmesi ya da indirgenmesi sonucu çalışma elektrodu üzerindeki akım değişikliklerini ölçen analitik cihazlardır. Bu tip biyosensörlerde oluşan akım şiddeti çalışma elektrodu yüzeyinde yükseltgenen veya indirgenen elektrokimyasal türlerin derişiminin bir fonksiyonudur (Mello ve Kubota 2002). Oksijen ve $H_2O_2$ pek çok enzimatik reaksiyonun yardımcı substratı ve ürünüdür ve amperometrik yöntemle belirlenebilir (Lindgren vd., 2000, Davis vd., 1995). Amperometrik biyosensörlerin biyomedikal, çevresel ve endüstriyel uygulamalar için ucuz, güvenilir ve yüksek duyarlıkta olduğu kanıtlanmıştır (Turner 1988). Amperometrik biyosensörler elektron transferinin gerçekleşme şekline göre birinci, ikinci ve üçüncü nesil olmak üzere üç sınıfa ayrılır (Scott 1988).

### 2.3.1 Birinci nesil enzim elektrotlar

Sadece biyolojik algılama elemanı ve ileticiden oluşan sistemlerdir. Biyosensörlerde yaygın kullanılan bir enzim sınıfı olan oksidaz enzimlerinin doğal yardımcı substratı, substrat ile reaksiyon sırasında hidrojen peroksite dönüşen moleküler oksijendir. Bu tür redoks enzimleri bu nedenle arayüzeydeki $O_2$ ve $H_2O_2$ derşimlerinde substrata bağlı değişiklik oluştururlar. Sadece biyoalgılama elemanı ve bir dönüştürücü içeren birinci nesil elektrokimyasal biyosensörler, ya moleküler oksijeni indirgemek ya da oluşan hidrojen peroksidi yükseltgemek için uygun bir potansiyele polarize edilir. Ölçülen akım, analit derişimi ile orantılıdır. Bu sınıfa giren biyosensörlerin en büyük dezavantajı, uygulanan yüksek potansiyelin neden olduğu elektrokimyasal algılamanın düşük seçiciliğidir. Ayrıca, gerçek numunelerdeki küçük oksijen derişimleri de bu ölçümlerde sınırlayıcı bir faktör olabilir (Castillo vd. 2004).

### 2.3.2 İkinci nesil enzim elektrotlar

İkinci nesil biyosensörlerde birinci nesil biyosensörlerdeki doğal elektron alıcısı oksijenin yerini medyatör olarak adlandırılan yapay elektron aktarıcıları alır. Medyatör olarak görev yapan madde indirgenmiş enzimle reaksiyona girer ve sonrasında elektrot yüzeyinde yeniden yükseltgenir (Castillo vd. 2004). Bu tip sistemlerde ferrosen ve türevleri, benzokinon ve türevleri, metilen mavisi, osmiyum kompleksleri, tetratiyafulvalen, tetrasiyonokinodimetan, potasyum hekzasiyanoferrat, rutenyum heksamin gibi maddeler medyatör olarak sıklıkla kullanılmaktadır. İdeal bir medyatörün kararlı yükseltgenmiş ve indirgenmiş formlarının olması, ortamdaki elektroaktif türlerden daha düşük redoks potansiyeli göstermesi, çalışma şartları altında yüksek kararlılık göstermesi, elektron transferi esnasında yan reaksiyonlara katılmaması ve reaksiyon hızının yüksek olması istenir (Castillo vd. 2004; Chaubey ve Malhotra 2002). Şekil 2.3'te medyatörlü ve medyatörsüz sistemlerdeki elektron aktarım mekanizması gösterilmektedir.




Şekil 2.3 Medyatörlü ve medyatörsüz biyosensörlerde elektron transfer mekanizması

### 2.3.3 Üçüncü nesil enzim elektrotlar

Reaktifsiz biyosensörler olarak da bilinen üçüncü nesil biyosensörlerde, aracı enzim ve elektrot ile birlikte entegre edilir ve elektronları enzimin redoks merkezi ile polarize elektrot arasında taşır. Bu nesil biyosensörlerin diğer tanımlarına göre, yalnızca doğrudan elektron transferinin gerçekleştiği konfigürasyonlar gerçek üçüncü nesil olarak kabul edilebilir (Castillo vd. 2004; Murugaiyan vd. 2014). İletken polimerler, bu tür biyosensörleri yapmak için sıklıkla kullanılmaktadır (Pundir vd. 2014).

## 2.4 İdeal Bir Biyosensörün Özellikleri

İdeal davranan bir biyosensörün özellikleri aşağıda ayrıntılarıyla verilmiştir.

### 2.4.1 Doğrusal çalışma aralığı ve gözlenebilme sınırı

Biyosensör sinyali analit derişimine karşı grafiğe geçirildiğinde elde edilen kalibrasyon eğrisinde analit derişimi ve biyosensör sinyali arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu aralık doğrusal çalışma aralığıdır. Bu doğrusal grafikte ilk cevabın gözlendiği ancak analit miktarının belirlenmesi için yeterli cevabın olmadığı en küçük derişim ise gözlenebilme sınırıdır (Gründler 2007). Gözlenebilme sınırı ve doğrusal çalışma aralığı elektrodun yüzey alanına, biyoalgılama elementinin analite ilgisine ve elektrot yüzeyine immobilize edilen biyoalgılama elementinin miktarına bağlıdır. Ayrıca ortam sıcaklığı, pH, tampon derişimi ve tampon cinsi gibi çalışma koşulları da biyosensör cevabını etkileyerek doğrusal çalışma aralığı ve gözlenebilme sınırının değişmesine neden olabilen faktörlerdendir (Erden 2010).

### 2.4.2 Duyarlık

Biyosensör sinyalinin ölçüm ortamına eklenen analitin derişimindeki değişikliğe bağlı olarak zamanla değişimi duyarlık olarak tanımlanır. Biyosensörde kullanılan biyoalgılama elementinin sadece analite karşı duyarlı olması ideal bir biyosensörde

istenen bir özelliktir. İdeal bir biyosensör için duyarlığının biyosensörün kullanım ömrü süresince sabit kalması ve oluşan sinyalin elektronik kısım tarafından rahatlıkla algılanabilmesi için yeterince yüksek olması gerekir (Buerk 1993).

### 2.4.3 Cevap süresi

Bir biyosensörün analiz edilecek maddenin bulunduğu ortamla etkileşime geçtiği andan sinyal kararlı hale gelinceye kadar geçen süre biyosensörün cevap süresi olarak adlandırılır. Analiz edilecek numune sayısının fazla olduğu analizlerde kısa sürede sonuç elde edilmesi önemli olduğundan biyosensörün cevap süresinin kısa olması büyük bir avantajdır. Biyosensörlerin cevap süresi, elektrotların fiziksel özelliklerine, boyutuna, analitin derişimdeki değişikliklere tepkisine, biyomolekülün yapısına bağlı olarak değişim gösterir (Buerk 1993).

### 2.4.4 Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, kesinlik ve doğruluk ile yakından ilişkilidir ve biyosensörün, aynı numune birden fazla kez ölçüldüğünde aynı sonuçları üretme yeteneği olarak tanımlanabilir. İdeal bir biyosensörün tekrarlanabilirliğinin yüksek olması güvenilir bir analiz için çok önemli bir özelliktir (Naresh ve Lee 2021).

### 2.4.5 Seçicilik

Seçicilik, ideal bir biyosensörün en önemli parametrelerinden birisidir. Bir biyosensörün sadece, tayin edilmek istenen analitin derişimindeki değişikliğe cevap vermesi ve numune ortamında bulunan diğer kimyasal türlerden etkilenmemesi istenir. Aksi halde, ölçüm sonuçlarına girişim etkisi yapan türlerin derişiminin değişmesi, hedef analitin miktarı için yanlış sonuçlar bulunmasına neden olur. Girişim etkisi yapan türlerin derişimleri kontrol edilemiyorsa bu durumda türlerin biyosensör cevabına etkisi belirlenmeli ve girişim yapan türlerin etkisi azaltılmalıdır. Bu türlerin etkisini en aza

indirmek için daha yüksek duyarlılığa sahip biyosensörler geliştirmek uygun bir yoldur (Buerk 1993).

### 2.4.6 Kararlılık

Kararlılık, sürekli izlemenin gerekli olduğu biyosensör uygulamalarında temel özelliklerden biridir. Kararlılık, biyosensörün biyoalgılama sisteminin içindeki ve dışındaki çevresel bozulmalara karşı savunmasızlık derecesidir. Enzimin saflık seviyesi, kaynağı ve immobilizasyonu yöntemi enzim biyosensörünün kararlılığını etkileyen faktörler arasındadır (Naresh ve Lee 2021).

### 2.4.7 Ömür

Biyosensörlerin normal koşullar altında duyarlığını kaybetmediği süre biyosensör ömrü olarak bilinmektedir. Biyosensörün ömrünü kısaltan en önemli parametre biyoalgılama elementinin aktivitesinde meydana gelen azalmadır. Bir biyosensörün ömrü, gerçekleştirilen analiz sayısına veya ölçülen analitin derişimine bağlı olarak değişebilir. Genel olarak yüksek derişimler daha hızlı duyarlık kayıplarına sebep olabilirler. Ayrıca, numune ortamında bulunabilecek başka kimyasal türler de biyosensör ömrünü kısaltabilir. Biyosensör ömrünün uzun olması için saklama koşulları önemli olup biyosensör kullanılmadığı sürelerde buzdolabında ya da biyolojik özelliklerine göre uygun sıcaklık ortamlarında saklanılabilir (Buerk 1993).

## 2.5 Enzimler

Enzimler, protein yapılı ve genellikle bir veya daha fazla metalik atom içeren prostetik gruba sahip büyük kompleks makromoleküllerdir (Yıldız 2007). Enzimler, peptit bağları ile birbirine bağlanan amino asitlerden oluşur. Farklı yan zincirlere sahip 20'den fazla amino asit vardır. Bu yan zincirlerin doğası, amino asidin özelliklerini belirler. Amino asitlerin dizilimi, enzimin birincil yapısını oluşturur. Amino asitlerin özelliklerinden dolayı yapı sarmal bir şekle sahip olabilir. Döner ve kıvrımlı gibi başka olası

düzenlemeler de vardır. Bu, bir proteinin veya enzimin ikincil yapısını oluşturur ve amino asitlerin dizilimi ve özellikleri tarafından belirlenir. Bir proteinin veya enzimin üçüncül yapısı, üç boyutlu yapısını ifade eder. Bunun nedeni, molekülün kendisini çevresiyle olumsuz olmayan termodinamik etkileşimleri en aza indirecek şekilde düzenlemesidir; örneğin polar olmayan amino asitler, sulu ortamdan uzakta tutulma eğilimindedir. Bu yapı, hidrojen bağı, disülfit bağları, van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimler ile stabilize edilebilir. Enzimin üç boyutlu yapısı öyledir ki, bir kısmı substratın, prostetik grubun ve diğer kofaktörlerin bağlanmasında doğrudan yer alan bölgeleri oluşturur. Çoğu durumda, enzimler birden fazla alt birimden oluşabilir. Bu tür alt birimler aynı olabilir veya olmayabilir. Bu tür birimlerin işlevsel, aktif bir kompleks halinde birleştirilmesi ve mekansal düzenlemesi, dörtlü yapı olarak bilinmektedir (Diamond 1998).

Enzimlerin biyosensörlerdeki avantajları, oldukça seçici olmaları, substrata kolayca bağlanabilmeleri, substrata hızla etki etmeleri ve katalitik aktiviteye sahip olmalarıdır. Bununla birlikte, enzimler pahalıdırlar ve bir destek üzerine immobilize edildiklerinde aktivitelerini kaybetme eğilimi gösterebilirler (Dervisevic, 2015).

### 2.6 İmmobilize Enzimler

İmmobilizasyon enzimi bir desteğe bağlayarak hareketini sınırlandırmak amacıyla yapılır (Sassolas vd. 2012). İmmobilize enzimler tekrar ve sürekli olarak kullanılabilirler ve katalitik aktivitelerini serbest enzimlere göre daha kararlı bir şekilde sürdürürler. İmmobilize enzimler, daha düşük katalitik hıza rağmen, enzimleri uzaklaştırarak sürecin hızlı kontrol edilebilmesi, enzimlerin üründen kolay ayrılması ve yüksek stabilite gibi avantajları nedeniyle medikal ve endüstriyel alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Nguyen vd. 2019).

### 2.6.1 Ksantin oksidaz enziminin özellikleri

Ksantin oksidaz (XO) enzimini ilk defa günümüzden yaklaşık 85 yıl önce M. Dizon ve S. Thurlow inek sütünden izole etmişlerdir. XO insanlar da dâhil olmak üzere birçok canlıda bulunan bir enzimdir ve öncelikle pürin katabolizmasında işlev görür. Bu enzim, insan dokularında karaciğer, böbrek, kalp, böbrek, beyin ve akciğerde bulunmaktadırlar (Saatçi, 1997). XO, oksidoredüktaz grubu enzimlerinden birisi olup en karmaşık yapılı flavoproteinlerdendir. Bir dizi reaksiyon yoluyla pürinler, guanin monofosfat (GMP), adenozin monofosfat (AMP), hipoksantin veya ksantine dönüştürülür. Hipoksantin ve ksantin XO tarafından ürik aside katalize edilir (Watts, 1966). Ürik asit daha sonra ürikaz enzimi tarafından idrarla atılan suda çözünebilen bir molekül olan allantoine dönüştürülür (Hediger vd. 2005). Hücre döngüsü vücutta devamlı bir süreç olduğundan ve endojen veya yutulan pürinler sürekli olarak bozulup yenilendiğinden, bu enzim memeli hücreleri için hayati önem taşımaktadır. Bir başka ksantin enzimi, ksantin dehidrojenazdır (XD). Bu iki enzimde kullanılan kofaktörler farklılık gösterir; XO'ın substrat olarak oksijen kullandığı yerde, XD aynı reaksiyonu meydana getirmek için NADH'ye ihtiyaç duyar (Aziz ve Jamil, 2019). XO tarafından gerçekleştirilen reaksiyon, oksijeni sonunda hidrojen peroksite dönüşen bir süperoksit anyonuna indirger. Ksantin oksidaz aktivitesi ürünü olan ürik asidin de literatüre bakıldığında bazı durumlarda sağlığa zararlı olduğu kanıtlanmıştır. Ürat, bir pro-oksidan gibi davranır ve hiperürisemi ile obezite arasındaki ilişkiyi açıklayan, lipit zarlarını oksitleme eğilimi olan diğer radikallerin oluşumunu indükler (Oliveira vd. 2012). Reaktif oksijen türleri doğal olarak hücresel yapılara, DNA'ya ve proteinlere zarar verme eğilimindedir ve sonuç olarak ürik asidin neden olduğu oksidatif stresin ayrıca hipertansiyon, diyabet, böbrek hastalığı ve kardiyovasküler hastalıklarla bağlantıları vardır.

### 2.6.2 Enzim immobilizasyon yöntemleri

Biyosensör yapımının en önemli kısmı biyoalgılama elementini (enzimler, hücreler, doku parçası vb.) elektrot yüzeyinde immobilize etmektir. Biyolojik materyal elektrot yüzeyine sabitlenmeli ve immobilizasyondan sonra aktivitesini korumalıdır. Enzimlerin immobilizasyonu için dört genel yöntem yaygın olarak kullanılır. Bunlar adsorpsiyon,

kovalent bağlama, tutuklama ve çapraz bağlamadır. İmmobilizasyon için kullanılacak yöntemin seçimi, ilgili enzime ve uygulamasına göre değişmektedir (Bayramoglu vd. 2012, Qin vd. 2012).

Adsorpsiyon en basit immobilizasyon yöntemlerinden olup Van der Waals bağları, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler gibi zayıf etkileşimlere dayanır. Adsorpsiyonun avantajı, ek bir reaktife gerek olmaması nedeniyle basit ve ucuz olması ve diğer yöntemlere göre enzim aktivitesine daha az zarar vermesidir. Bununla birlikte, bu yöntemle immobilize edilen enzimler, destek ile aralarındaki zayıf bağlar nedeniyle, sıcaklık, pH veya iyonik kuvvet gibi deneysel koşullardaki değişikliklerle kolayca yüzeyden uzaklaşabilir. Ayrıca, diğer substratların bir yüzey üzerine spesifik olmayan adsorpsiyonu kontaminasyona ve sinyalde girişime yol açabilir (Nguyen vd. 2019).

Kovalent bağlama en yaygın kullanılan immobilizasyon yöntemlerinden biridir ve enzimler ile destek arasında kararlı bir kompleks oluşumunu sağlar. Enzimdeki ε-amino grubu, tiyol grubu ve karboksilik grup gibi yan zincirler genellikle kovalent bağın oluşumu için kullanılır (Novick vd. 2005). Kovalent bağlama yöntemi kullanılarak immobilize edilmiş enzimler, adsorpsiyon ile immobilize edilmiş enzimlere göre son derece güçlü bağlara sahiptir, bu nedenle bu yöntem kullanılarak daha kararlı bir şekilde immobilize edilmiş enzimler elde edilebilir. Birkaç güçlü yönüne rağmen, kovalent bağ oluşumu immobilize enzimlerin aktivitesini etkiler ve bu yöntemin düşük sıcaklık, ılıman pH gibi koşullarda uygulanması gerekir (Nguyen vd. 2019).

Tutuklama yönteminde enzimler polimerlerde tutulur. Polimerizasyon, enzimlerin tutuklanması için bir enzim ve monomer karışımı içinde gerçekleştirilir. Tutuklama, kovalent bağlamadan farklı olarak kimyasal bir etkileşim değildir ve enzimlere yüksek kararlılık ve sızıntının en aza indirilmesi üstünlüğü sağlar (Nguyen vd. 2019).

Çapraz bağlama yönteminde ise, enzimler birbirine ve desteğe kovalent bağlar yardımıyla bağlanır ve üç boyutlu bir enzim kompleksi oluşturur. Enzimler arasında çapraz bağ oluşturmak için, örneğin enzimlerdeki lizin kalıntısının serbest amino grupları, glutaraldehit gibi çapraz bağlayıcı bir reaktif ile reaksiyona girer. Çapraz

bağlama yoluyla immobilizasyon yaklaşımı, enzimler arasındaki oldukça güçlü ve kararlı bağlar nedeniyle immobilizasyon etkinliğini ve kararlılığı artırır. Bununla birlikte, glutaraldehit gibi çapraz bağlama reaktiflerinin kullanımı, kovalent bağlanma nedeniyle enzimlerde şiddetli aktivite kaybına yol açabilir (Nguyen vd. 2017).

## 2.7 Kaynak Araştırması

### 2.7.1 Ksantin tayini ile ilgili çalışmalar

Ksantinin elektrokimyasal tayini için son 10 yılda raporlanan (biyo)sensörler incelendi ve aşağıda kısaca özetlendi.

Khan vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada ksantinin seçici ve hassas tespiti için işlevselleştirilmiş altın nanopartiküller ile (GCE/PEDOT:PSS-AuNPs) modifiye edilmiş camsı karbon elektrotlara dayanan yenilikçi bir biyosensör düzeneği geliştirilmiştir. Geliştirilen sensör, hipoksantin (HX) ve ürik asit (UA) gibi önemli interferansların varlığında X miktarının belirlenmesi için başarıyla uygulanmıştır. Hazırlanan nanokompoziti karakterize etmek için taramalı elektron mikroskopi (SEM), transmisyon elektron mikroskopi (TEM) ve fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) yöntemleri kullanılmıştır. Tüm deneysel işlemler $1,0 \times 10^{-3}$ M fosfat tamponunda (pH 7,0) oda sıcaklığında $N_2$ ortamında gerçekleştirilmiştir. Elektrodun, $5,0 \times 10^{-8}$ ila $1,0 \times 10^{-5}$ M doğrusal çalışma aralığında $3,0 \times 10^{-8}$ M'lik bir gözlenebilme sınırı ($S/N$ = 3) olduğu gözlemlenmiştir. Hazırlanan biyosensör kullanılarak balık ve et numunelerinde ksantin miktarı için geri kazanım çalışması yapılmış ve geri kazanımlar sırasıyla %98,1 ± 1,34, % 100,2 ± 2,39 (balık numuneleri için), %99,3 ± 1,66, %102,6 ±2,53 (et numuneleri için) olarak bulunmuştur.

Tripathi vd. 2022 tarafından yapılan çalışmada, eğik açılı biriktirme (EAB) ile hazırlanan nikel oksit (NiO) ince filmleri, et tazeliğinin belirlenmesi amacıyla ksantin miktarının ölçümü için geliştirilmiştir. Hazırlanan makro gözenekli EAB NiO elektrotlar ve XO immobilizasyonu elektrokimyasal empedans spektroskopi (EIS), dönüşümlü voltametri

(CV) ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi yöntemleriyle karakterize edilmiştir. Optimum koşullar altında, biyosensörün cevap süresi 7 s olarak belirlenmiştir. Biyosensör duyarlığı 0,1–5 μM düşük derişim aralığında 1,1 $\mu A \mu M^{-1} cm^{-2}$ ve 5–650 μM yüksek derişim aralığında 0,3 $\mu A \mu M^{-1} cm^{-2}$ olarak rapor edilmiştir. Hazırlanan biyosensör ayrıca balık örneklerinde (hipoksantin, ürik asit, glikoz ve sodyum benzoat) yaygın olarak bulunan bir dizi potansiyel interferansa karşı da değerlendirilmiş ve ksantine karşı iyi bir seçicilik gösterdiği gözlemlenmiştir. Ksantin için 0,4 mM'lik düşük bir Michealis-Menten Sabiti ($K_m$), enzimatik sensörün hedef analite yönelik yüksek afinitesini göstermiştir. Hazırlanan biyosensör kullanılarak balık numunelerinde ksantin tayini yapılmıştır. Oda sıcaklığında ortam havasına 0, 2, 4 ve 7 gün maruz kalan ton balığı ile testler gerçekleştirilmiş olup gün geçtikçe ksantin miktarının arttığı belirlenmiştir. Biyosensörün 12 gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 53'ünü koruduğu bulunmuştur.

Dervisevic vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada, kitosan-polipirol-altın nanoparçacıkları kullanılarak yeni bir elektrokimyasal ksantin biyosensörü geliştirilmiştir. Hazırlanan bu biyosensörün elektrokimyasal karakterizasyonları için CV ve EIS yöntemleri kullanılmıştır. Tüm ölçümler +0,70 V çalışma potansiyelinde 10 mM pH 7,0 fosfat tamponunda gerçekleştirilmiş ve cevap süresi 8 s olarak bulunmuştur. Biyosensörün 1-200 μM'lik doğrusal çalışma aralığında 0,25 μM'lik düşük gözlenebilme sınırında 1,4 nA $\mu M^{-1}$ duyarlığa sahip olduğu belirtilmiştir. Biyosensörün amperometrik cevabına ürik asit, askorbik asit, glikoz ve sodyum benzoattan kaynaklanan önemli bir bozucu etki olmadığı tespit edilmiştir. Hazırlanan biyo-nanokompozit ksantin biyosensörü, balık, sığır eti ve tavuk numunelerinde ksantin ölçümleriyle test edilmiştir. Biyosensörün 18 günlük depolamanın sonunda başlangıç aktivitesinin %85'ini koruduğu görülmüştür.

Yazdanparast vd. (2019) ksantin tayini için, çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) ve poli(l-aspartik asit) (Poli(l-Asp)) ve XO ile modifiye camsı karbon elektrot hazırlamışlardır. Hazırlanan biyosensörün üretim aşamaları EIS, SEM, CV kullanılarak incelenmiştir. Biyosensör cevabı diferansiyel puls voltametrisi (DPV) ile optimum koşullar (pH 7,4 ve +0,40 - +1,0 V) altında araştırılmış, cevap süresi 35 s olarak tespit

edilmiştir. Doğrusal çalışma aralığı 0,001-0,004 μM, ve 0,005-50,0 μM, gözlenebilme sınırı $3,5\times10^{-4}$ μM olarak bulunmuştur. 30 gün boyunca düzenli kullanımdan sonra elektrodun başlangıç aktivitesinin yalnızca %20'sini kaybettiği gözlemlenmiştir. Enzim elektrotlar balıktaki ksantin miktarını belirlemek için kullanılmışlardır. Balık örneklerinin ksantin içeriği 4 ila 24 günlük depolama süresinde değerlendirilmiş ve balığın ölümünden sonra zamana bağlı olarak balıketindeki ksantin seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu amaçla 10, 20, 30, 40 μM ksantin çözeltisinden uygun miktarlarda ilave edilmiş ve %95,6±3,2; %101,0±1,4 ; %100,1±2,1 ve %99,5±2,5 geri kazanımlar rapor edilmiştir.

Dalkıran vd. (2017) ksantin tayini için karbon nanotüp-metal oksit nanopartiküller ($Co_3O_4$ veya $Fe_3O_4$) ve 7,7',8,8'-tetrasiyanokinodimetan kullanımına dayalı biyosensörler geliştirmiştir. $Fe_3O_4$ temelli biyosensör ile optimum şartlar kullanıldığında (0,05 M pH 7,0 fosfat tamponu, +0,30 V potansiyel) ksantin tayininde $1,9\times10^{-6}$–$2,3\times10^{-4}$ M doğrusal çalışma aralığı; 0,20 μM gözlenebilme sınırı ile 25,07 μA $mM^{-1}$ $cm^{-2}$ duyarlık bildirilmiştir. $Co_3O_4$ temelli biyosensör aynı optimum şartlarla $1,9\times10^{-6}$–$1,2\times10^{-4}$ M doğrusal çalışma aralığı; 0,36 μM gözlenebilme sınırı ile 13,24 μA $mM^{-1}$ $cm^{-2}$ duyarlık göstermiştir. Kahve örneklerinde ksantin tayininde amaca yönelik biyosensörler uygulanmış ve tatmin edici sonuçlar alınmıştır.

Joon vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada, XO nanoparçacıkları kovalent bağlama yoluyla altın elektrodunun yüzeyine immobilize edilmiştir. Biyosensörün karakterizasyonu SEM ve FTIR yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Çalışma pH 7,0 fosfat tamponunda 35 °C'da +0,25 V'da gerçekleştirilmiş ve elektrot cevap süresi 5 s olarak verilmiştir. Biyosensörün çalışma aralığı 0,01 μM'lik gözlenebilme sınırıyla 0,01–1,0 μM olarak rapor edilmiştir. Hazırlanan biyosensör kullanılarak çeşitli balık numunelerinde ksantin miktarları tayin edilmiştir. Ksantin çözeltilerinden balık numunesine uygun miktarlarda ekleme yapılmış ve sırasıyla %94,1±0,2 ve %94,8±0,31'lik geri kazanımlar rapor edilmiştir.

Wang vd. (2019) bakır temelli metal organik çerçeve nano bir film üzerine ksantin oksidaz immobilize edilerek yeni ksantin biyosensörü geliştirmiştir. Hazırlanan

biyosensörlerin karakterizasyonu, SEM ve X-ışını kırınımı (XRD) yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. Tüm çalışmalar pH 7,5 (0,1 M) fosfat tamponunda 0,90 ila - 0,80 V çalışma potansiyelinde DPV yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve 0,01 ila 10 μM gibi geniş bir çalışma aralığına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Hazırlanan biyosensörün seçiciliğini incelemek için askorbik asit, glikoz, benzoat, arginin ve aspartik asit gibi olası girişim yapabilecek maddelerin amperometrik cevapları belirlenmiş ve tüm bu bileşikler, biyosensörün hipoksantin ve ksantin için iyi bir seçiciliğe sahip olduğunu göstermiştir. 20 gün depolamanın ardından biyosensörün hipoksantin ve ksantine verdiği ilk DPV cevaplarının %80'inden fazlasını koruyabildiği gözlemlenmiştir. Hem kalamar hem de büyük sarı şarlatan balığı numunelerinde hipoksantin geri kazanımları $\%93 \pm 4$ ile $\%104 \pm 4$ aralığında; ksantinin geri kazanımları $\%97 \pm 3$ ila $\%101 \pm 7$ aralığında gözlemlenmiştir.

Thandavan vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada, nano arayüzlü medyatörsüz bir elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir. Hazırlanan biyosensörün karakterizasyon çalışmaları, XRD, alan emisyonlu SEM ve FTIR yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. Nano arayüzlü elektrokimyasal biyosensörün optimum şartlarda (0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu, 0,50 V çalışma potansiyeli) 0,4 – 2,4 nM doğrusal çalışma aralığı ve 2,5 pM gözlenebilme sınırında 4,94 μA $nM^{-1}$ duyarlığa sahip olduğu ve cevap süresinin <2 s olduğu belirtilmiştir. Geliştirilen modifiye elektrodun girişim yapan askorbik asit, üre ve sükroz gibi kimyasal maddelere daha az eğilimli olduğu gözlemlenmiştir. Biyosensörün 11 gün kullanım sonucunda %80'lik aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir. Geliştirilen biyosensör, balık tazeliğinin gerçek zamanlı ölçümü için kullanılmıştır.

Sadeghi vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada, hibrit bir nanokompozit film üzerine XO enziminin immobilizasyonuna dayalı olarak yeni bir ksantin biyosensörü geliştirilmiştir. Elektrot yüzeyini karakterize etmek için SEM, FTIR, CV ve EIS yöntemlerinden yararlanılmıştır. Tüm ölçümler 0,05 M pH 7,2 fosfat tamponunda 35 °C sıcaklıkta ve -0,35 V'da gerçekleştirilmiştir. Elektrodun 0,2 – 36,0 μM doğrusal çalışma aralığına, 0,1 μM gözlenebilme sınırına ve 13,58 μA$\mu M^{-1}cm^{-2}$ duyarlığa sahip olduğu belirtilmiştir. Olası girişim etkisi yapabilecek askorbik asit, benzoat, ürik asit ve glukoz gibi çeşitli metabolitlerin biyosensör cevabı üzerinde önemli bir etkisi olmadığı

gözlemlenmiştir. Üretilen biyosensör, balık ve tavuk eti tazeliğinin ölçümü için %95 güven seviyesinde standart yöntemle uyumlu sonuçlar vererek başarıyla uygulanmıştır.

Saadaoui vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada, XO yüklü elektrograflı gözenekli silika nanomalzemelerle modifiye edilmiş camsı karbon elektroda dayalı amperometrik biyosensör hazırlanmıştır. Hazırlanan biyosensörün karakterizasyon çalışmaları, TEM ve alan emisyonlu SEM ile gerçekleştirilmiştir. Biyosensörün en uygun koşullarda (0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, Ag/AgCl'ye karşı +0,70 V sabit çalışma potansiyelinde) cevap süresinin 4-8 s aralığında olduğu tespit edilmiştir. Biyosensörün çalışma aralığı 0,28 µM gözlenebilme sınırıyla 1,5 – 12 µM olarak bulunmuştur. Biyosensörün girişim yapabilecek türler olan sakkaroz, üre, glikoz, früktoz, galaktoz, kafein ve klorüre karşı olan tepkisi incelenmiş olup incelenen maddelerin önemli bir bozucu etki yapmadığı gözlenmiştir. Hazırlanan elektrokimyasal biyosensör ile balıkta ksantin miktarı tayin edilmiş, taze ve bayat balık numunelerinde sırasıyla %93,3 ± 0,2 ve %101,43 ± 0,19 geri kazanım bulunmuştur.

Dalkıran vd. (2014) kitosan (CS), $Co_3O_4$ nanoparçacıkları ve MWCNT'ler modifiye GCE temelli ksantin biyosensörleri geliştirmişlerdir Bu çalışmada XO ve XO/HRP (yabanturpu peroksidaz) ko-immobilizasyonunu içeren iki farklı enzim sistemi araştırılmıştır. XO/$Co_3O_4$/MWCNTs/CS/GCE ve XO/HRP/$Co_3O_4$/MWCNTs/CS/GCE için modifiye elektrot optimum şartlarda (0,05 M pH 7 fosfat tamponunda, Ag/AgCl'ye karşı +0,70 V ve -0,30 V'de) ksantinin amperometrik cevabı incelenmiştir. Modifiye elektrotların özellikleri SEM, CV ve EIS yöntemlerinden yararlanılarak belirlenmiştir. XO/$Co_3O_4$/MWCNT/CS/GCE'nin ve XO/HRP/$Co_3O_4$/MWCNT/CS/GCE'lerin çalışma aralıklarının sırasıyla $2{,}0\times10^{-7}$ M – $1{,}6\times10^{-5}$ M ve $2{,}0\times10^{-5}$ M – $3{,}6\times10^{-4}$M, gözlenebilme sınırlarının sırasıyla $2{,}0\times10^{-7}$ M ve $2{,}0\times10^{-5}$ M olduğu belirlenmiştir. Elektrotların aktivitesi incelendiğinde 1 ay depolama sonucunda başlangıç aktivitesinin %88'ini ve %65'ini korudukları gözlemlenmiştir. Elektrodun seçiciliğini değerlendirmek için girişim etkisi yapabilecek askorbik asit, glukoz ve ürik asit kullanılmış ve girişim etkilerinin %10, %1 ve %15 olduğu gözlemlenmiştir. Amaçlanan biyosensörlerin uygulanabilirliği balık örneğinde ksantin belirlenerek test edilmiştir.

Ortalama geri kazanım, sırasıyla XO/$Co_3O_4$/MWCNT/CS/GCE ile %96,2±%3,5 ve XO/HRP/$Co_3O_4$/MWCNT/CS/GCE ile %95,4±%2,1 olarak hesaplanmıştır.

Dervisevic vd. (2016) tarafından gerçekleştirilen çalışmada kalem grafit elektrot (PGE) üzerinde ksantin oksidaz immobilizasyonu ile yeni bir amperometrik ksantin biyosensörü geliştirilmiştir. Hazırlanan biyosensörün morfolojisi SEM kullanılarak incelenmiştir. Optimum şartlarda (+0,50 V çalışma potansiyeli, 30 °C sıcaklık ve 10 mM pH 7,0 fosfat tamponu) biyosensör cevabı 5 s olarak tespit edilmiştir. Doğrusal çalışma aralığı 0,3-25 μM, gözlenebilme sınırı 0,074 μM ve duyarlık 124 $mAM^{-1}$ ($S/N$=3) olarak hesaplanmıştır. Girişim yapabilecek kimyasal maddelerin (ürik asit, askorbik asit, glikoz ve sodyum benzoat) amperometrik cevap üzerindeki etkileri incelenmiş ve bu bileşiklerin ksantinin belirlenmesine önemli bir etki yapmadığı gözlemlenmiştir. Biyosensörün 16 günlük depolama sonucunda başlangıç aktivitesinin %80'ini koruduğu tespit edilmiştir.

Dalkıran vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada, çinko oksit nanoparçacıkları kitosan çok duvarlı karbon nanotüpler ve 1,4-benzokinon camsı karbon elektrot yüzeyine modifiye edilmiş ve XO bu yüzeye glutaraldehit kullanılarak çapraz bağlama yoluyla immobilize edilmiştir. Elektrotların elektrokimyasal özellikleri CV ve EIS yöntemleriyle, elektrot yüzey morfolojisi ise SEM yöntemiyle incelenmiştir. Biyosensör cevabı, 0,05M pH 7,5 fosfat tamponunda +0,25 V sabit çalışma potansiyelinde incelenmiş ve cevap süresi 10 s olarak bulunmuştur. Çalışmada, $2{,}1\times10^{-7}$ M gözlenebilme sınırı ve 39,4 μA $mM^{-1}$ $cm^{-2}$ duyarlık ile $9{,}0\times10^{-7}$–$1{,}1\times10^{-4}$ M aralığında doğrusal çalışma aralığı elde edilmiştir. Ksantin enzim elektrodun girişim yapabilecek sodyum benzoat, glikoz, kreatin, kafein ve teofilinin maddelerin etkisi incelenmiş ve ksantin analizinde neredeyse hiç etkileri olmadığı gözlemlenmiştir. Diğer girişim yapan türler olan askorbik asit ve ürik asidin sırasıyla yaklaşık %2 ve %10 gibi düşük oranda girişim yaptıkları tespit edilmiştir. Hazırlanan biyosensör et tazeliğinin değerlendirilmesi için tavuk ve sığır eti numunelerindeki ksantin içeriğini tespit etmek için kullanılmıştır.

Dalkıran vd. (2017) tarafından balık tazeliğini tespit etmek için grafen/kobalt oksit nanoparçacıkları/kitosan kompozitlerine dayalı bir amperometrik ksantin biyosensörü

geliştirilmiştir. Modifiye elektrodun morfolojisi ve elektrokimyasal özellikleri CV, EIS ve SEM ile incelenmiştir. 0,05 M pH 7,5 fosfat tamponunda, +0,70 V çalışma potansiyelinde biyosensörün $2{,}0\times10^{-4}$ mM gözlenebilme sınırına, $5{,}0\times10^{-4}$ – $8{,}0\times10^{-2}$ mM doğrusal çalışma aralığına, 6,58 μA $mM^{-1}$ duyarlığa, %1,2 (BSS) tekrar üretilebilirliğe ve 10 s cevap süresine sahip olduğu bulunmuştur. Elektrotların 30 günlük depolama süresinin sonunda biyosensör aktivitesinin %90'ını korumuştur. Ksantin tayininde bozucu etki yapabilecek türler olan askorbik asit, sodyum benzoat, ürik asit ve glikoz gibi türlerin etkisi incelenmiş olup bu maddelerin biyosensörün ksantine cevabını sırasıyla %20, %4, %15 ve −%3 oranında değiştirdiği gözlemlenmiştir. Geliştirilen biyosensör balıketi tazeliğini değerlendirmek için kullanılmıştır.

Kaçar vd. (2018) tarafından fonksiyonel grup bulundurmayan (MWCNT), karboksil, hidroksil ve amino grubu bulunduran MWCNT'ler kullanılarak yeni amperometrik ksantin biyosensörleri geliştirilmiştir. Tüm deneyler 0,70 V'ta 0,05 M pH 7,0 fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir. Tüm ölçümler 0,05 M pH 7,0 fosfat tamponunda +0,70 V'da gerçekleştirilmiştir. En iyi performansı sergileyen biyosensörün ($NH_2$-MWCNT) çalışma aralığı $9{,}9\times10^{-7}$ – $9{,}4\times10^{-4}$ M, gözlenebilme sınırı $8{,}7\times10^{-7}$ M ve ardışık 4 ölçüm sonucunun BSS değeri % 1,9 olarak rapor edilmiştir. Ksantin biyosensörün 1 ay sonunda başlangıç aktivitesinin %98,6'sını gösterdiği belirlenmiştir.

# 3.MATERYAL VE YÖNTEM

## 3.1 Ekipmanlar

Elektrokimyasal ölçümler IVIUM elektrokimysal analiz cihazı (Ivium Technologies, Netherlands) ve üç elektrotlu hücre standı (Bioanalytical Systems, Inc. ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmalarda üçlü elektrot sistemi kullanılmış olup, modifiye edilmiş bir GCE çalışma elektrodu, Pt tel (BASi–MW–1032) karşıt elektrot ve Ag/AgCl elektrot (BASi–MF–2052) referans elektrot olarak işlev gördü. Tampon çözeltilerin pH değerleri, Orion marka pH/iyon metre (720A) (Thermo Scientific, ABD) ile ölçüldü. Tüm sulu çözeltiler, Ultra Pure Water System'den (ELGA) sağlanan çift distile su ile hazırlandı. Tartımlar 0,01 mg duyarlıkta analitik terazide (Mettler Toledo) yapıldı. Vorteks karıştırıcı (Isolab-I.622.01.001) ve ultrasonik banyo (Elma-LC30H) kullanılarak, hazırlanan çözeltilerin çözünmesi ve/veya homojen hale gelmesi sağlandı. Modifiye elektrotların yüzey morfolojileri perde baskılı karbon elektrotlar (SPE) kullanılarak taramalı elektron mikroskobu (SEM) (QUANTA 400F) yardımıyla aydınlatıldı. EDX ölçümleri için JXA-8230 Elektron Prob Mikroanalizörü kullanıldı. Çözelti ilaveleri farklı hacimlerde mikropipetler (Axygen) ile yapıldı. Balık numunesinden balık özütü santrifüj (NÜVE-NF800) ile ayrıldı. Çözeltilerin karıştırılmasında Chiltern marka (MS21S model) manyetik karıştırıcıdan yararlanıldı.

a



b




Şekil 3.1 a. Elektrokimyasal hücre standı, b. Elektrokimyasal analiz cihazı

### 3.2 Kimyasal Maddeler

Çizelge 3.1 biyosensör geliştirme çalışmalarında kullanılan kimyasalları, saflık düzeylerini ve markalarını göstermektedir.

Çizelge 3.1 Biyosensör geliştirme çalışmalarında kullanılan kimyasallar, saflık düzeyleri ve markaları

| **Kimyasal madde** | **Saflık düzeyi** | **Marka** |
|---|---|---|
| Alümina | 0,05 µm | Buehler |
| Askorbik asit | Ultra saf | Sigma |
| Aspartik asit | %98 | Sigma |
| Etanol | %99,8 | Riedel |
| 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid | ≥%98 | Sigma |
| Ferrosen karboksilik asit | ≥%96 | Sigma |
| Glukoz | ≥%99,5 | Fluka |

Çizelge 3.1 Biyosensör geliştirme çalışmalarında kullanılan kimyasallar, saflık düzeyleri ve markaları (devam)

| **Kimyasal madde** | **Saflık düzeyi** | **Marka** |
|---|---|---|
| Gluteraldehit | %25 | Sigma |
| Hidroklorik asit | %37 | Merck |
| Karbon nanofiber | %98 | Sigma |
| Kitosan | Saf | Sigma |
| Kreatin | ≥%98 | Sigma |
| Kreatinin | ≥%98 | Sigma |
| Ksantin | %99–100 | Sigma |
| N-Hidroksisüksinimit | %98 | Sigma |
| Nafyon | Saf | Sigma |
| Sığır serum albümin | %97 | Fluka |
| Sodyum hidroksit | Saf | Merck |
| Sodyum dihidrojenfosfat-2-hidrat | %99 | Riedel |
| Sodyum monohidrojenfosfat-7-hidrat | %99 | Riedel |
| Üre | ≥%99,5 | Sigma |
| Ürik asit | %99 | Sigma |

Biyosensör hazırlanmasında mikrobiyal kaynaktan elde edilen ve Sigma firmasından temin edilen ksantin oksidaz enzimi (X-2252-25UN) kullanıldı.

## 3.3 Çözeltiler

### 3.3.1 Ksantin çözeltisi

Derişimi $1\times10^{-2}$ M olan ksantin çözeltisi hazırlamak için belirli miktarda ksantin tartıldı ve 0,10 M NaOH çözeltisi ve çift distile su kullanılarak çözüldü. Hazırlanan stok ksantin çözeltisi kullanılmadığında +4°C'da saklanıldı.

### 3.3.2 Fosfat tamponu

Sodyum monohidrojenfosfat-7-hidrat ve sodyum dihidrojenfosfat-2-hidrat'dan belirli miktarlarda tartılarak toplam fosfat derişimi 0,05 M olacak şekilde çift distile suda çözülerek hazırlandı. Fosfat tamponu çözeltilerinin pH değerleri 0,10 M HCl ve 0,10 M NaOH çözeltileri yardımıyla istenen pH'lara ayarlandı. Hazırlanan çözeltiler kullanılmadıklarında +4°C'da tutuldu.

### 3.3.3 Ksantin oksidaz çözeltisi

Ksantin oksidaz (XO) pH 7,5 fosfat tamponunda belirli miktarda çözülerek 0,3 U/5 µL aktiviteye sahip enzim çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltiler derin dondurucuda -18 ºC'ta muhafaza edildi.

### 3.3.4 Ferrosen karboksilik asit çözeltisi

Ferrosen karboksilik asitten (Fc-COOH) uygun miktarda tartılarak %50 alkol-su karışımı ile çözülerek uygun derişimde çözelti hazırlandı. Bu çözelti deneyler öncesi taze olarak hazırlandı.

### 3.3.5 Karbon nanofiber dispersiyonu

Karbon nanofiberden (CNF) belirli miktarda tartılarak %0,1 lik kitosan çözeltisi içerisinde dağıtıldı ve 7,5 mg $mL^{-1}$'lik çözelti hazırlandı. Hazırlanan bu çözelti deney aralarında +4°C'da muhafaza edildi.

### 3.3.6 EDC-NHS çözeltisi

1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC) ve N-Hidroksisüksinimit (NHS)'den uygun miktarlarda tartılarak pH 7,5 ile çözüldü. Hazırlanan çözeltiler 1:1 oranda birleştirilerek EDC–NHS karışımı hazırlandı. Bu karışım deneyler öncesinde taze olarak hazırlandı.

### 3.3.7 Kitosan çözeltisi

5 mg $mL^{-1}$ kitosan çözeltisi hazırlamak için belirli miktarda kitosan (CS) tartılarak pH 4,0 asetat tamponu ile çözüldü. Kitosan çözeltisi kullanılmadığı zamanlarda +4°C'ta tutuldu.

### 3.3.8 Glutaraldehit çözeltisi

Gluteraldehitin %25'lik çözeltisinin saf su ile 1:100 oranında seyreltilmesi ile %0,25'lik gluteraldehit çözeltisi hazırlandı. Gluteraldehit çözeltisi her deney öncesinde taze olarak hazırlandı.

### 3.3.9 Sığır serum albümin çözeltisi

Sığır serum albümin katısından uygun miktarda alınarak pH 7,5 tamponu içerisinde 1 mg $mL^{-1}$'lik çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti deneyler öncesinde taze olarak hazırlandı.

### 3.3.10 Diğer çözeltiler

Kreatinin, aspartik asit, kreatin, dopamin, glukoz, askorbik asit ve üre $1{,}0\times10^{-2}$ M'lık stok çözeltileri, bu maddelerden tartılan belirli miktarların çift distile suda çözülerek hazırlandı. $1{,}0\times10^{-2}$ M ürik asit stok çözeltisi ise, uygun miktarlarda ürik asidin ve $Li_2CO_3$'ın çift distile suda çözülmesi ile hazırlandı.

## 3.4 GCE Yüzeyinin Temizlenmesi ve Parlatılması

GCE yüzeyinin temizlenmesi ve parlatılması için boyutu 0,05 μm olan alümina tozları ile hazırlanan süspansiyon çözeltiden belirli bir miktar alınarak elektrot temizleme pedine damlatıldı ve dairesel hareketler çizilerek GCE yüzeyinin mekanik olarak temizlenmesi sağlandı. Elektrot yüzeyi çift distile su ile temizlenip, sırasıyla bir miktar saf su ve etil alkol çözeltisi içinde 5 dakika boyunca ultrasonik banyoda bekletildi.

## 3.5 Elektrotların Modifiye Edilmesi

GCE yüzeyinin farklı şekillerde modifiye edilmesi ile aşağıda verilen modifiye elektrotlar oluşturuldu:

(a) Karbon nanofiber ile modifiye edilmiş GCE (CNF/GCE): Uygun miktarda CNF içeren kitosan çözeltisinden belirli hacimde alınarak mikropipet yardımıyla temiz GCE yüzeyine damlatılarak oda sıcaklığında kuruması sağlandı.

(b) Ferrosen karboksilik asit ile modifiye edilmiş GCE (Fc-COOH/GCE): Belirli miktardaki Fc-COOH'nin, %50 alkol-su içerisinde çözülmesi ile hazırlanan çözeltiden belirli bir miktar mikropipet aracılığıyla GCE yüzeyine aktarıldı ve oda sıcaklığında kurutuldu.

(c) Karbon nanofiber ve ferrosen karboksilik asit ile modifiye edilmiş GCE (Fc-COOH/CNF/GCE): Uygun miktarda CNF içeren kitosan çözeltisinden belirli hacimde

alınarak mikropipet yardımıyla temiz GCE yüzeyine damlatılarak oda sıcaklığında kuruması sağlandı. Damlatılan CNF çözeltisi kuruduktan sonra, %50 alkol-su içerisinde hazırlanan Fc-COOH çözeltisinden belirli miktarda alınarak CNF modifiye GCE üzerine damlatıldı ve oda sıcaklığında kuruması sağlandı.

(d) Ksantin oksidaz, karbon nanofiber ve ferrosen karboksilik asit ile modifiye GCE: (XO/Fc-COOH/CNF/GCE): Yukarıda c basamağında anlatıldığı şekilde hazırlanan Fc-COOH/CNF/GCE yüzeyine 1:1 oranda hazırlanan 100 mM EDC-NHS çözeltisinden belirli miktarda damlatıldı, elektrot yüzeyi kısmen kuruduktan sonra, XO çözeltisinden belirli bir miktarda damlatılarak enzimin yüzeye kovalent bağlanması sağlandı ve enzim elektrot hazırlandı. Hazırlanan enzim elektrotun yüzeyine 3 µL Nafyon çözeltisi (%0,5) damlatılarak kuruması için oda sıcaklığında bekletildi. Hazırlanan biyosensör kullanılmadığı zamanlarda +4°C'ta bekletildi.

### 3.6 Modifiye Elektrotların Ksantine Duyarlığının Belirlenmesi

Enzimsiz modifiye elektrodun ksantine karşı duyarlığını tespit etmek amacıyla, 0,05 M fosfat tamponundan (pH 8,0) 5 mL elektrokimyasal hücreye konuldu ve Fc-COOH/CNF/GCE +0,40 V potansiyel uygulanarak kararlı hal akımı elde edilmesi için bir süre beklendi. Kararlı hal akımı kaydedildi ve elektrokimyasal hücreye standart ksantin çözeltisinden art arda ilaveler yapıldı. Elde edilen amperometrik cevap akımı farkları ($\Delta i$) ksantin derişimine karşı grafiğe geçirilerek oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin eğimlerinden yararlanılarak elektrodun ksantine duyarlığı belirlendi. XO/Fc-COOH/CNF/GCE biyosensörünün ksantine duyarlığı da aynı yöntem kullanılarak araştırıldı.

### 3.7 Dönüşümlü Voltametri (CV) ve Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) Ölçümleri

Çalışmada hazırlanmış olan tüm modifiye elektrotların dönüşümlü voltamogramları 0,10 M KCl içeren 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ çözeltisinde 50 mV $s^{-1}$ tarama hızı kullanılarak

ölçüldü. Empedans ölçümleri ise, 100000 Hz–0,05 Hz aralığında 0,20 V potansiyelde ölçüldü ve Nyquist eğrileri çizildi.

### 3.8 Modifikasyonda Kullanılan Maddelerin Miktarlarının Optimizasyonu

#### 3.8.1 CNF miktarı

CNF miktarının optimize edilmesi amacıyla CNF, kitosan çözeltisinde 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 mg $mL^{-1}$ olacak şekilde dağıtılarak dört ayrı karışım hazırlandı. Bu çözeltilerle hazırlanmış olan modifiye elektrotların ksantine amperometrik cevabı belirlendi ve en yüksek duyarlığın elde edildiği modifiye elektrodun hazırlanmasında kullanılan CNF miktarı optimum olarak kabul edildi.

#### 3.8.2 Fc-COOH derişimi

Fc-COOH miktarının optimize edilmesi amacıyla %50 alkol-su çözeltisinde 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 mg $mL^{-1}$ Fc-COOH içerecek şekilde bir seri Fc-COOH çözeltisi hazırlandı. Farklı derişimlerdeki bu çözeltilerle hazırlanmış olan modifiye elektrotların amperometrik ksantin cevabı belirlendi ve en yüksek duyarlığın gözlendiği modifiye elektrodun hazırlanmasında kullanılan Fc-COOH miktarı optimum olarak alındı.

#### 3.8.3 Enzim miktarı

Optimum XO miktarının belirlenmesi için CNF ve Fc-COOH miktarları sabit tutularak elektrot yüzeyine immobilize edilen enzim miktarı 0,18; 0,24; 0,30 ve 0,36 U olan farklı enzim elektrotlar oluşturuldu. Tüm elektrotlar 0,05 M fosfat tamponunda (pH 8,0) +0,40 V'da kararlı hal akımına ulaşılıncaya kadar tutuldu ve elektrokimyasal hücreye stok ksantin çözeltisinden ilaveler yapılarak çizilen kalibrasyon eğrilerinden elde edilen duyarlık değerleri immobilize edilen enzim ünitesine karşı grafiğe alındı ve en yüksek duyarlığın görüldüğü enzim ünitesi, optimum olarak kabul edildi.

### 3.8.4 Enzim immobilizasyon yönteminin seçilmesi

Enzimin yüzeye immobilize edilmesi amacıyla Fc-COOH-CNF modifiye elektrot yüzeyine EDC-NHS ile kovalent bağlama ve GA-BSA ile çapraz bağlama yöntemleri denendi. Bölüm 3.5. (c)'de anlatılan şekilde 2 elektrot hazırlandı ve birisinin yüzeyine Bölüm 3.3.6'da anlatıldığı gibi hazırlanan EDC-NHS çözeltisinden 3 µL damlatıldı ve elektrot yüzeyi kuruduktan sonra 4 µL XO (0,3 U/5µL) enzimi immobilize edildi. Diğer elektrot yüzeyine ise 4 µL XO (0,3 U/5µL)+1 µL GA (%0,25'lik, 1:100)+1 µL BSA (1 mg $mL^{-1}$, pH 7,5 fosfat tamponunda) karıştırılarak elde edilen çözeltiden 6 µL damlatıldı. Son olarak elektrotların yüzeyi 3 µL nafyon (%0,5) ile kaplandı. Her iki yöntemle hazırlanan enzim elektrotların tekrarlanabilirliği art arda çizilen kalibrasyon eğrileri yardımıyla belirlendi.

## 3. 9 Optimum Çalışma Şartlarının Belirlenmesi

### 3.9.1 pH

Biyosensörün cevabına fosfat tamponu çözeltisinin pH'sının etkisini incelemek amacıyla, biyosensörün fosfat derişimi 0,05 M olan ve pH değerleri 0,5 birimlik artışlarla 6,5–9,0 aralığında değişen farklı fosfat tamponu çözeltilerinde +0,40 V potansiyelde ardışık ksantin ilavelerine amperometrik cevabı tespit edildi. Her pH'da çizilen akım farkı-ksantin derişimi grafiklerinin duyarlığı kıyaslanarak en yüksek duyarlığın bulunduğu pH optimum tampon pH'sı olarak seçildi.

### 3.9.2 Çalışma potansiyeli

Biyosensörün optimum çalışma potansiyelini belirleyebilmek için, elektrot pH'sı 8,0 olan 0,05 M fosfat tamponunda (+0,20)–(+0,50) V aralığında farklı potansiyellerde ksantine cevabı kaydedildi ve kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Elde edilen grafiklerin duyarlıkları karşılaştırıldı ve en yüksek duyarlığın gözlendiği potansiyel biyosensör için en uygun çalışma potansiyeli olarak kabul edildi.

### 3.10 Biyosensörün Performans Parametreleri

#### 3.10.1 Gözlenebilme sınırı ve çalışma aralığı

Biyosensörün doğrusal çalışma aralığını belirlemek için optimum bileşimde hazırlanan biyosensör 0,05 M fosfat tamponunda (pH 8,0) +0,40 V'da kararlı hal akımına ulaşılıncaya kadar tutuldu. Kararlı hal akımına ulaşıldıktan sonra elektrokimyasal hücreye derişimi $1{,}0\times10^{-4}$ ile $1{,}0\times10^{-2}$ M aralığında değişen standart ksantin çözeltilerinden ardışık ilaveler yapıldı ve elde edilen amperometrik cevap akımları kaydedildi. Elde edilen akımlardan kararlı hal akımının çıkarılması ile hesaplanan akım farklarını ilave edilen ksantin derişimine karşı grafiğe geçirilmesi ile çizilen kalibrasyon grafiklerinin eğimi biyosensörün duyarlığı olarak belirlendi. Kalibrasyon eğrisinin doğrusal olduğu bölge biyosensörün doğrusal çalışma aralığı kabul edildi. Biyosensörün çalışma aralığının en alt noktasındaki ksantin derişimine verdiği amperometrik cevapların standart sapmasının *m* kalibrasyon eğrisinin duyarlığı olmak üzere $3s/m$ formülünde yerine konmasıyla gözlenebilme sınırı (LOD) ve $10s/m$ formülünden ise alt tayin sınırı (LOQ) belirlendi.

#### 3.10.2 Cevap süresi

Biyosensörün ksantine cevap süresini belirlemek için 0,05 M pH 8,0 fosfat tamponuna 100 µL $1{,}0\times10^{-3}$ M'lik stok ksantin çözeltisinden eklendi ve +0,40 V'de akım cevabının kararlı hale ulaşması beklendi. Kararlı haldeki akım cevabının %95'ine ulaşılması için gerekli süre biyosensör için cevap süresi kabul edildi.

#### 3.10.3 Tekrar kullanılabilirlik

Optimum elektrot bileşiminde hazırlanan biyosensör +0,40 V'de 0,05 M fosfat tamponu (pH 8,0) çözeltisinde kararlı hal akımı gözlenene kadar tutuldu. Elektrokimyasal hücreye stok ksantin çözeltisinden uygun miktarlarda eklendi ve ksantin için art arda kalibrasyon

grafikleri oluşturuldu. Bu kalibrasyon eğrilerinin eğimlerinden bulunan duyarlıkların BSS değeri hesaplanarak biyosensörün tekrar kullanılabilirliği belirlendi.

### 3.10.4 Kararlılık

Biyosensörün kararlılığının belirlenmesi için, optimum koşullarda hazırlanan biyosensörün optimum çalışma şartları altında ksantine amperometrik cevabı 50 ardışık ölçümle belirlendi. Bu ardışık ölçümlerin %BSS değeri hesaplanarak biyosensörün kararlılığı değerlendirildi.

### 3.10.5 Bozucu türlerin biyosensör cevabına etkisi

Gerçek numunelerde bulunan ve biyosensör cevabı üzerine bozucu etki yapma potansiyeli olan ürik asit, üre, aspartik asit, askorbik asit, glukoz, kreatin ve kreatinin gibi türlerin etkisini incelemek için, biyosensör optimum çalışma koşullarında kararlı hal akımı gözlenene kadar bekletildi. Elektrokimyasal hücreye ksantin ilavesinden sonra elde edilen akım farkı kaydedildi ve sonrasında girişim etkisi yapabileceği düşünülen türler hücreye art arda ilave edilerek akım cevapları ölçüldü ve akım-zaman grafikleri elde edildi. Girişim yapan türlerin amperometrik cevap akımı ksantin ilavesi sonrası elde edilen akıma oranlanarak incelenen maddelerin % bozucu etkileri tespit edildi.

## 3.11 Gerçek Numune Uygulaması

### 3.11.1 Balık numunesinin analize hazırlanması

Balık halinden satın alınan çinekop kılçıklarından ayrıldı ve balık eti ufak parçalara bölündü. Bu parçalar homojen hale getirilmesi için havanda ezildi. Homojen haldeki etten belirli miktarda tartılarak üzerine 0,05 M fosfat tamponu (pH 8) eklendi ve manyetik karıştırıcıda 30 dakika boyunca karıştırılarak ksantinin çözeltiye geçmesi sağlandı. Elde edilen bu balık eti tampon çözelti karışımı 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj

edildi ve santrifüj tüpünün üst kısmında bulunan balık özütü bir damlalık ile falkon tüpe alındı.

### 3.11.2 Balıkta ksantin tayini

Balık numunesinde bulunan ksantin miktarının tayini için optimum koşullarda hazırlanmış olan biyosensör 0,05 M fosfat tamponunda (pH 8,0) +0,40 V sabit potansiyelde kararlı hal akımı gözlenene kadar tutuldu. Daha sonra elektrokimyasal hücreye balık özütünden belirli miktarda eklendi ve amperometrik cevap akımı kaydedildi. Elektrokimyasal hücreye stok ksantin çözeltisinden ilaveler yapılarak standart katma eğrisi elde edildi. Bu eğriden yararlanılarak balık numunesindeki ksantin derişimi tayin edildi. Daha sonra balık özütüne standart ksantin çözeltisi eklendi ve elektrokimyasal hücreye balık özütü-standart ksantin çözeltisi karışımından belirli miktarda eklendi ve amperometrik cevap akımı kaydedildi. Hücreye stok ksantin çözeltisinden ilaveler yapılarak standart katma eğrisi oluşturuldu. Bu eğri kullanılarak balık özütü-standart ksantin çözeltisi karışımında ksantin derişimi tayin edildi ve % geri kazanım değerleri hesaplandı.

# 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

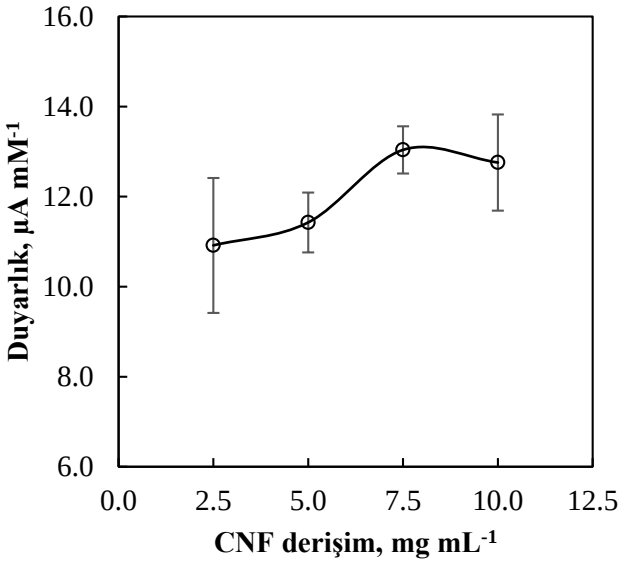
Bu çalışmada ksantinin amperometrik yöntem ile tayini için modifiye GCE'ye dayanan biyosensör geliştirilmesi hedeflendi. Ksantin tayini için geliştirilen sensörde karbon nanomalzeme olarak CNF ve medyatör olarak ferrosen karboksilik asit kullanıldı. Yapılan ön denemelerde elde edilen optimum elektrot bileşimi ve çalışma koşullarında tüm deneyler tekrarlandı ve ilgili veriler ve tartışmalar aşağıda detaylarıyla ele alındı.

## 4.1 Elektrot Modifikasyonunda Kullanılan Maddelerin Miktar Optimizasyonu

Bu çalışmada CNF ve Fc-COOH kullanılarak hazırlanan modifiye elektrotların, optimum CNF ve Fc-COOH miktarları kronoamperometri yöntemi kullanılarak belirlendi, aşağıda elde edilen veriler ve ilgili tartışmalar verildi.

### 4.1.1 CNF derişimi

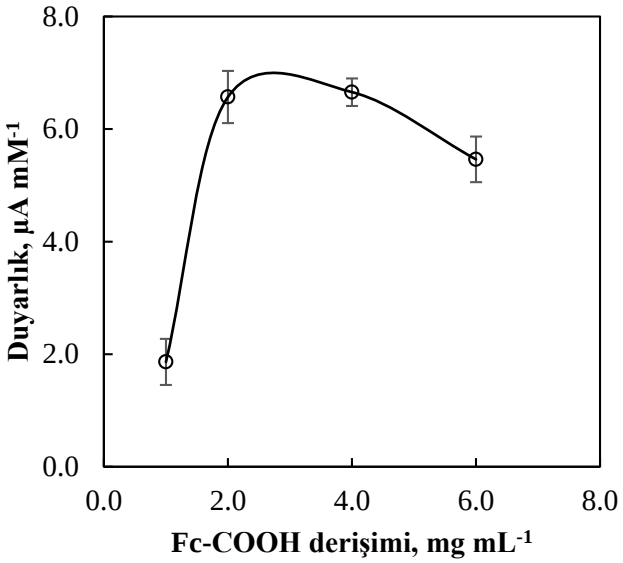
Modifikasyonda kullanılacak optimum CNF derişimini bulmak için, 4 farklı derişimde (2,5; 5,0; 7,5; 10,0 mg $mL^{-1}$) kitosan çözeltisi içerisinde dağıtılmış CNF karışımı hazırlandı. Hazırlanan elektrotların ksantine kronoamperometrik cevabı ölçüldü ve aynı elektrot ile art arda 3 kez kalibrasyon grafiği çizildi. Çizilen kalibrasyon grafiklerinin eğimleri incelendiğinde (Şekil 4.1) en iyi duyarlığın 7,5 mg $mL^{-1}$ CNF kullanılarak hazırlanan modifiye elektrot ile kaydedildiği gözlendi ve bu değer optimum CNF miktarı olarak seçildi.




Şekil 4.1 XO/Fc-COOH/CNF/GCE'nin ksantine duyarlığının CNF derişimi ile değişimi (0,05 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,40 V, oda sıcaklığı)

### 4.1.2 Fc-COOH derişimi

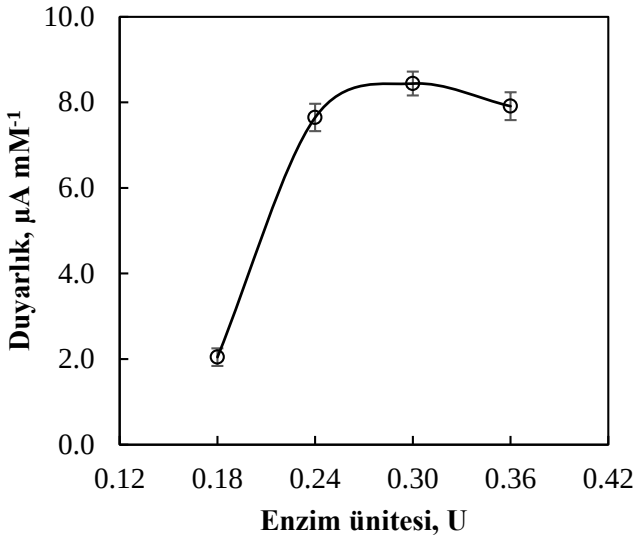
Optimum CNF derişimini belirledikten sonra CNF derişimi sabit tutularak, optimum Fc-COOH derişiminin belirlenmesi için farklı derişimlerde (0,5; 2,0; 4,0 ve 6,0 mg $mL^{-1}$) Fc-COOH içeren çözeltiler kullanılarak 4 adet modifiye elektrot hazırlandı. Bölüm 3.3.4'de açıklandığı gibi hazırlanan elektrotların her biri ile kalibrasyon eğrileri elde edildi ($N$=3). Her bir elektrot için elde edilen duyarlıklar kıyaslandı. Elde edilen kalibrasyon grafikleri incelendiğinde (Şekil 4.2) en yüksek duyarlığın 2 mg $mL^{-1}$ Fc-COOH çözeltisi kullanılarak hazırlanan modifiye elektrot ile elde edildiği görüldüğünden bu değer medyatör miktarı için optimum derişim olarak seçildi.




Şekil 4.2 XO/Fc-COOH/CNF/GCE'nin ksantine duyarlığının Fc-COOH derişimi ile değişimi (0,05 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,40 V, oda sıcaklığı)

### 4.1.3 Enzim miktarı

Enzim miktarını optimize etmek için optimum koşullarda hazırlanan elektrot yüzeyine 4 farklı ünite olacak şekilde enzim immobilize edildi ve dört modifiye enzim elektrot hazırlandı. Bölüm 3.8.3'de açıklandığı gibi hazırlanan elektrotların ksantine amperometrik cevabı belirlendi ve enzim ünitesine karşı değişen duyarlıklar grafiğe geçirildi ($N$=3). Her bir elektrot için elde edilen duyarlıklar kıyaslandı. Elde edilen kalibrasyon grafiği incelendiğinde (Şekil 4.3) en yüksek duyarlığın 0,30 ünite XO enzimi kullanılarak hazırlanan modifiye elektrot ile elde edildiği görüldüğünden bu değer enzim miktarı için optimum ünite olarak seçildi.

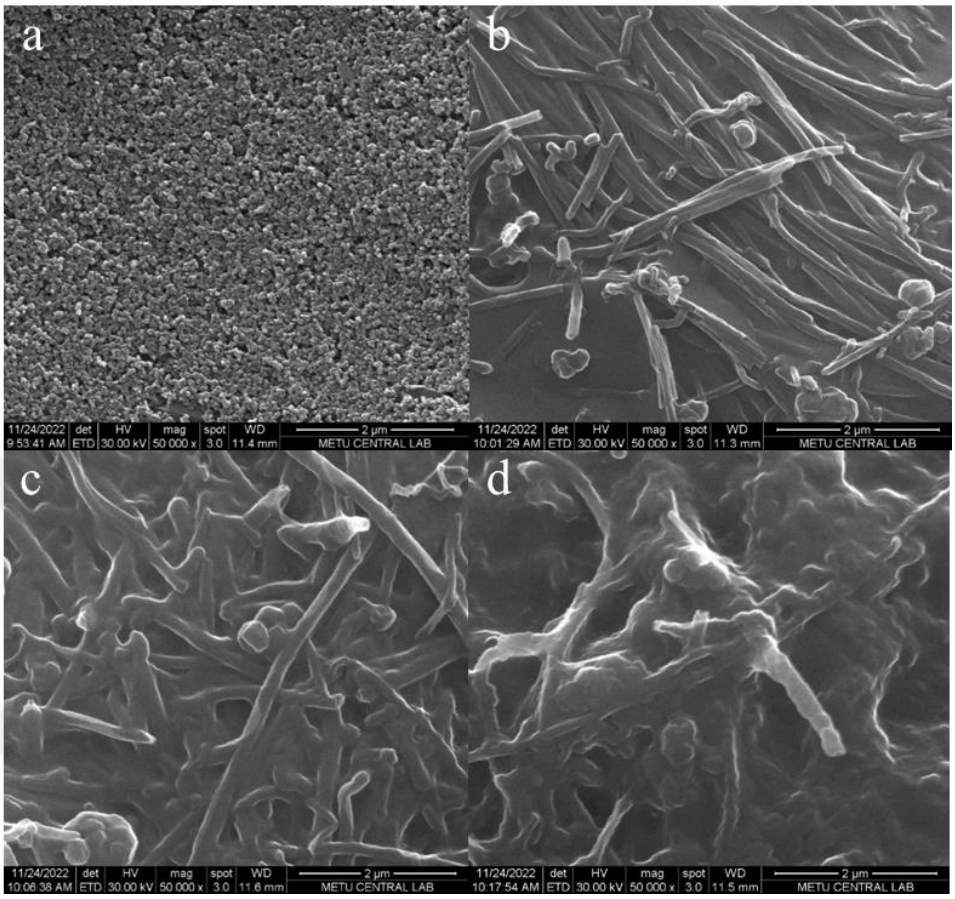



Şekil 4.3 XO/Fc-COOH/CNF/GCE'nin ksantine duyarlığının enzim miktarı ile değişimi (0,05 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,40 V, oda sıcaklığı)

## 4.2 Elektrot Yüzeylerinin Karakterizasyonu

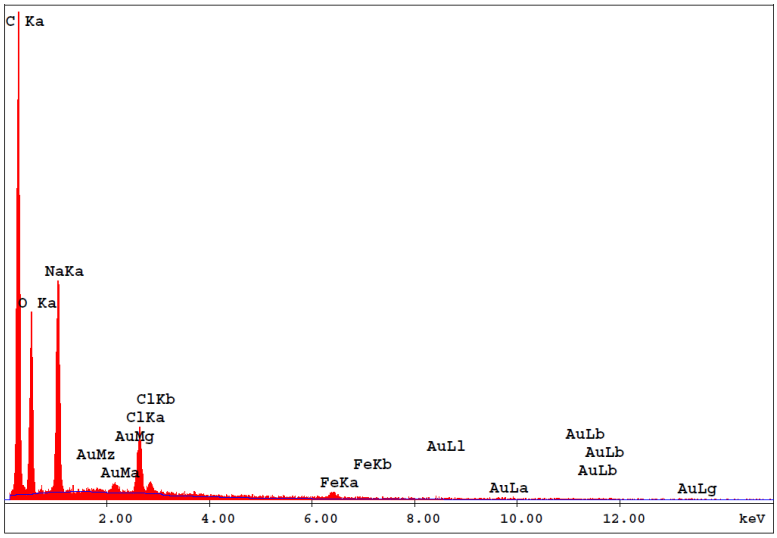
Çalışmada hazırlanan modifiye perde baskılı elektrotların (SPE, CNF/SPE, Fc-COOH/CNF/SPE ve XO/Fc-COOH/CNF/SPE) yüzey karakterizasyonları taramalı elektron mikroskobu (SEM) yöntemi kullanılarak incelendi, sonuçlar ve ilgili tartışmalar aşağıda verildi. Şekil 4.4'te modifiye edilmemiş SPE (a), CNF/SPE (b), Fc-COOH/CNF/SPE (c) ve XO/ Fc-COOH/CNF/SPE (d) elektrotlarına ait SEM görüntüleri verildi. Görüntüler incelendiğinde kitosan içinde CNF dağıtılarak elde edilen karışımın SPE yüzeyine damlatılıp kurutulmasıyla oluşturulan CNF/SPE'nin SEM görüntüsü (Şekil 4.4.b), CNF'in kitosanda düzgün bir şekilde dağıldığını gösterdi. Hem CNF hem de Fc-COOH ile modifiye edilen SPE'nin SEM görüntüsünden (Şekil 4.4.c), Fc-COOH ve CNF'nin elektrot yüzeyinde homojen olarak dağıldığı görüldü. Şekil 4.4.d ise Fc-COOH/CNF/SPE yüzeyine XO immobilize edilerek oluşturulan enzim elektrodun SEM görüntüsüdür. Bu görüntü ile enzimin modifiye elektrot yüzeyine başarılı bir şekilde immobilize edildiği tespit edildi. Böylece, hazırlanan modifiye elektrotun yüzeyine enzimin başarılı şekilde immobilizasyonu bu elektrodun ksantin tayini için kullanılabilir

olduğu, Fc-COOH ve CNF'nin bu enzimin immobilizasyonu için uygun bir ortam oluşturduğu kanısına varıldı.




Şekil 4.4 (a) SPE, (b) CNF/SPE, (c) Fc-COOH/CNF/SPE, (d) XO/ Fc-COOH/CNF/SPE yüzeylerin SEM görüntüleri

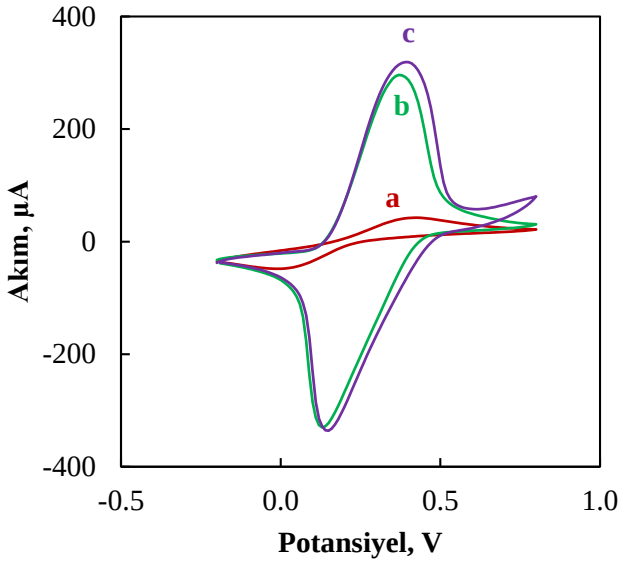
Çalışmada ayrıca Fc-COOH/CNF/SPE'nin yüzey bileşimi enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) yöntemi kullanılarak incelendi ve sonuçlar Şekil 4.5'de verildi. Şekil incelendiğinde gözlenen C ve Fe pikleri hem CNF hem de Fc-COOH'in elektrot yüzeyine başarılı şekilde modifiye edildiğini kanıtladı.




Şekil 4.5 Fc-COOH/CNF/SPE'nin EDX spektrumu

### 4.3 Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal Davranışları

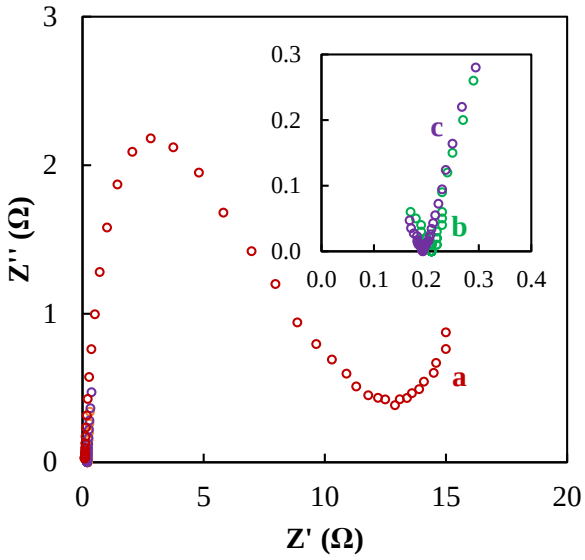
Elektrotların elektrokimyasal özelliklerinin tespitinde dönüşümlü voltametri yararlı ve sık kullanılan bir yöntemdir. Şekil 4.6'da CNF ve Fc-COOH ile modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş farklı tipte GCE'ların 0,10 M KCl içeren 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks probunda 50 mV $s^{-1}$ tarama hızında alınan CV sonuçları gösterilmektedir. Şekil 4.6.a'da üzerine bir modifikasyon yapılmamış GCE'nin dönüşümlü voltamogramında redoks çiftine ait indirgenme yükseltgenme pikleri görüntülendi. GCE, CNF/GCE ve Fc-COOH/CNF/GCE'ye ait dönüşümlü voltamogramlar ise sırasıyla Şekil 4.6.(a-c)'de gösterilmiştir. CNF/GCE ve Fc-COOH/CNF/GCE'lar ile elde edilen pik akımları modifiye edilmemiş GCE ile karşılaştırıldığında modifiye elektrotların pik akımlarının daha büyük; pik potansiyelleri farkının ($\Delta E$p) ise daha küçük olduğu gözlemlendi. Bu artışın sebebinin, CNF ile modifiye elektrodun yüzey alanlarının ve elektroaktifliğinin daha yüksek olması olabileceği düşünülmektedir (Yang vd. 2009, Lu vd. 2009).




Şekil 4.6 Dönüşümlü voltamogramlar: (a) GCE; (b) CNF/GCE ve (c) Fc-COOH/CNF/GCE (0,1 M KCl içeren 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ çözeltisinde, $\nu$=50 mV $s^{-1}$)

Çalışmada hazırlanan elektrotların elektrokimyasal davranışları elektrokimyasal empedans spektroskopisi yöntemiyle de incelendi. GCE, CNF/GCE ve Fc-COOH/CNF/GCE'lerin 0,10 M KCl içeren 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ çözelti içerisinde empedans ölçümleri Bölüm 3.7'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi ve ölçüm sonuçları Nyquist eğrileri şeklinde verildi (Şekil 4.7). Bu eğriler, gerçek empedans (Z′) değerlerine karşı sanal empedans (Z″) değerleri grafiğe geçirilerek çizildi. Empedans spektrumlarının Nyquist grafiği, bir yarım daire kısmı ve bir doğrusal kısım içerir. Yarım dairelerin çapı elektrot yüzeyindeki elektron transfer direncine eşittir (Kang vd 2007, Che vd. 2010).

Çalışmada elde edilen Nyquist eğrileri incelediğinde en yüksek elektron transfer direncinin modifiye edilmemiş GCE ile elde edildiği (a eğrisi), elektrot CNF ile modifiye edildiğinde direncin önemli ölçüde azaldığı (eğri b) gözlendi. Bunun nedeninin yüksek elektrik iletkenliği sağlayan karbon nanofiberlerin elektrot-çözelti ara yüzeyinde direnci düşürücü yönde etki yapması olduğu düşünüldü. CNF/GCE, Fc-COOH ile modifiye edildiğinde ise en düşük direncin elde edildiği bulundu.




Şekil 4.7 (a) GCE; (b) CNF/GCE ve (c) Fc-COOH/CNF/GCE'ların Nyquist eğrileri (0,1 M KCl içeren 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ çözeltisi içinde)

### 4.4 Enzim Elektrodun Hazırlanması

Bu çalışmada balık tazeliğinin tespiti için önemli bir parametre olan ksantin tayini için modifiye enzim elektrot geliştirilmesi amaçlandı. Çalışmada hazırlanan farklı tipteki modifiye GCE'larla gerçekleştirilen CV ve EIS sonuçları incelendiğinde enzim elektrot hazırlanması optimum elektrodun Fc-COOH/CNF/GCE olduğu belirlendi. Bu elektroda XO enzimi immobilize edilerek Bölüm 3.5'da anlatıldığı şekilde XO/Fc-COOH/CNF modifiye GCE'ler hazırlandı ve en uygun enzim miktarı; uygun çalışma şartları, performans etkenleri ve analitik uygulamalarda kullanılabilirliği irdelendi. Bulunan sonuçlar ve yorumları aşağıda sunulmuştur.

#### 4.4.1 Enzim immobilizasyon yönteminin seçilmesi

XO enzimini Fc-COOH/CNF/GCE yüzeyine immobilize etmek için EDC-NHS ile kovalent bağlama ve GA-BSA ile çapraz bağlama yöntemleri denendi. Burada önemli olan noktalardan biri hazırlanan elektrotlar ile elde edilen cevapların birbirine yakınlığı olduğu için elektrotlar ile art arda 3 kez kalibrasyon çizilerek enzim elektrotların duyarlıkları belirlendi. Kovalent bağlama ve çapraz bağlama yöntemleri

karşılaştırıldığında, her iki enzim elektrot ile çizilen kalibrasyon eğrilerinin duyarlıklarının ve tekrarlanabilirliklerinin birbirine yakın olduğu bulundu. Ancak, elektrot modifikasyonunda ferrosen karboksilik asit kullanıldığı için EDC-NHS kimyası kullanılarak kovalent bağlama yapmanın enzim elektrodun kararlılığı da göz önüne alındığında teorik açıdan daha uygun olduğu düşünüldü ve immobilizasyon için bu yöntem tercih edildi.

Çizelge 4.1 GA-BSA ile çapraz bağlama ve EDC-NHS ile kovalent bağlama yöntemleri kullanılarak hazırlanan elektrotların performansının karşılaştırılması

| İmmobilizasyon Yöntemi | Ksantine Duyarlık 1 ($\mu A\ mM^{-1}$) | Ksantine Duyarlık 2 ($\mu A\ mM^{-1}$) | Ksantine Duyarlık 3 ($\mu A\ mM^{-1}$) | Ortalama, $\mu A\ mM^{-1}$ |
|---|---|---|---|---|
| **GA-BSA** | 6,69 | 6,37 | 5,46 | 6,17±1,6 |
| **EDC-NHS** | 6,56 | 5,74 | 6,29 | 6,19±1,0 |

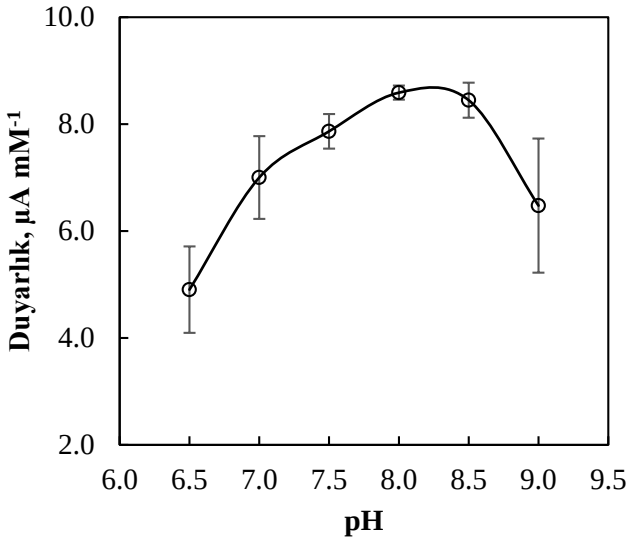
## 4.5 Optimum Çalışma Koşulları

Optimum CNF, Fc-COOH ve XO miktarları kullanılarak hazırlanan XO/Fc-COOH/CNF/GCE için optimum çalışma koşulları incelendi ve bulunan sonuçlar aşağıda sunuldu.

### 4.5.1 pH

Ölçüm ortamının optimum pH'sını belirlemek için pH değeri 6,5-9,0 aralığında 0,5 pH birim değiştirilerek 0,05 M derişimde yedi adet fosfat tampon çözeltisi hazırlandı. +0,40 V çalışma potansiyelinde XO/Fc-COOH/CNF/GCE'un her bir pH çözeltisine ardışık ksantin ilaveleri yapıldığında verdiği akım cevaplarından yararlanılarak

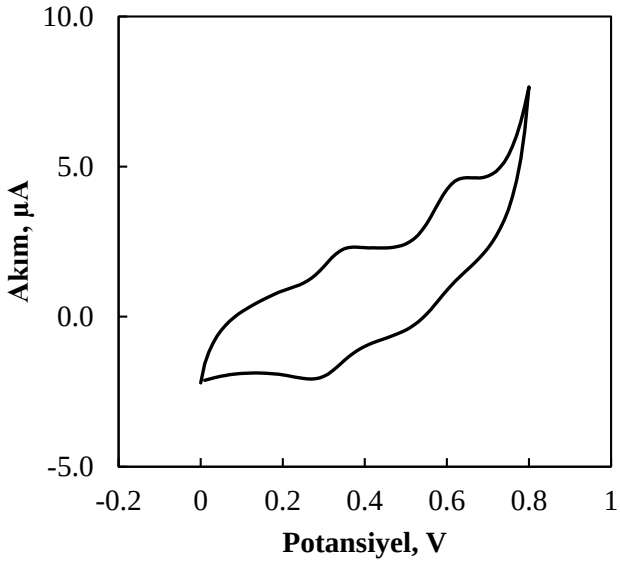
oluşturulan kalibrasyon grafiklerinin duyarlıkları çözelti pH'sına karşı grafiğe alındı (Şekil 4.8). Şekilden en yüksek duyarlığın pH 8,0'da olduğu gözlendi. Optimum pH değerinin böylece pH 8,0 olması uygun görüldü ve bütün deneyler bu optimum değerde gerçekleştirildi. Serbest XO için (mikrobiyal kaynaklı) en uygun pH aralığı 7,0-8,5 şeklinde belirtilmiştir (Balladin vd. 1997, Egwim vd. 2005). Bu nedenle immobilizasyonun enzim pH'sına çok büyük bir etkisi olmadığı düşünüldü.




Şekil 4.8 XO/Fc-COOH/CNF/GCE ksantine duyarlığına pH'ın etkisi (0,05 M fosfat tamponu, +0,40 V, oda sıcaklığı)

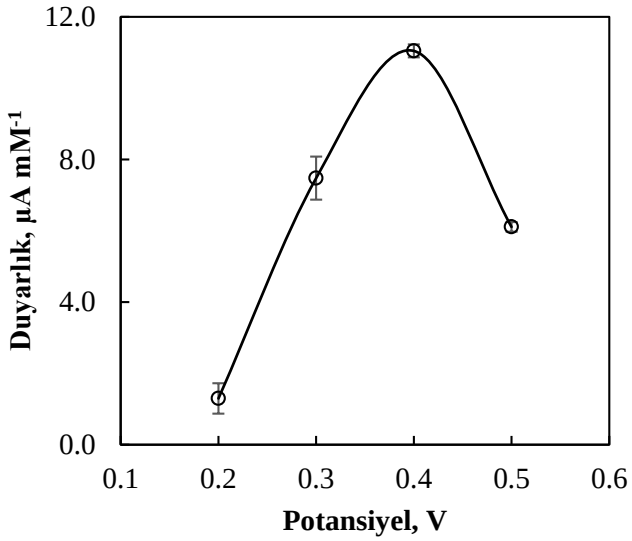
### 4.5.2 Çalışma potansiyeli

Optimum miktarlarda modifikasyon malzemesi kullanılarak hazırlanmış olan modifiye enzim elektrodun optimum çalışma potansiyeli Bölüm 3.9.2'de açıklandığı gibi incelendi.




Şekil 4.9 XO/CNF/Fc-COOH/GCE'nin dönüşümlü voltamogramı (0,05 M pH 8,0 fosfat tamponu, oda sıcaklığı, $v$=50 mV $s^{-1}$)

İlk olarak, XO/Fc-COOH/CNF/GCE ile tampon çözeltide (0,0)–(+1,0) V aralığında dönüşümlü voltamogram alınarak kaydedildi (Şekil 4.9). Voltamogram incelendiğinde +0,36 V'da gözlenen pikin Fc-COOH medyatörüne ait olduğu düşünüldü ve bu veriden çalışma potansiyelinin etkisinin duyarlık üzerine etkisini incelemede yararlanıldı. Enzim elektrodun (+0,20)–(+0,50) V aralığında farklı potansiyel değerlerinde ksantine cevabı belirlendi. Çizilen kalibrasyon eğrilerinin duyarlıkları potansiyellere karşı grafiğe alındı (Şekil 4.10). Şekilden en yüksek duyarlığın +0,40 V'da olduğu görüldü ve optimum değer olarak kabul edilerek deneyler bu potansiyelde gerçekleştirildi.

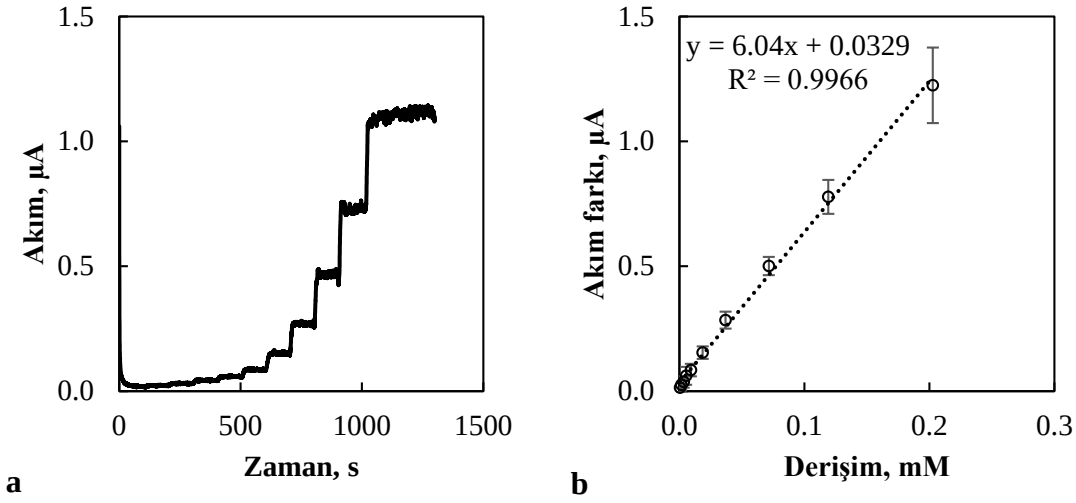



Şekil 4.10 XO/CNF/Fc-COOH/GCE'nin ksantine duyarlığına çalışma potansiyelinin etkisi (0,05 M pH 8,0 fosfat tamponu, oda sıcaklığı)

## 4.6 Performans Faktörleri

### 4.6.1 Çalışma aralığı ve duyarlığı

Optimum şartlarda hazırlanan XO/Fc-COOH/CNF/GCE'nin optimum koşullar altında ortama eklenen farklı ksantin derişimlerinde amperometrik cevapları incelendi ve doğrusal çalışma aralığı ve duyarlılığı belirlendi. Ksantin derişimine karşı, bulunan akım farkları grafiğe alındı (Şekil 4.11). Bu grafikten, XO/Fc-COOH/CNF/GCE'un 6,04 µA $\mu M^{-1}$ duyarlık ile $6{,}0\times10^{-7}$ – $2{,}0\times10^{-4}$ M aralığında doğrusal cevap verdiği bulundu.




Şekil 4.11 XO/Fc-COOH/CNF/GCE'nin ksantine kronoamperometrik cevabı (a) Akım–zaman grafiği, (b) Kalibrasyon eğrisi (*N*=3) (0,05 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,40 V, oda sıcaklığı)

XO/Fc-COOH/CNF/GCE için LOD ile LOQ Bölüm 3.10.1'de açıklandığı şekilde hesaplandı. Bunun için elektrokimyasal hücreye $6{,}0\times10^{-7}$ M ksantin eklendi ve amperometrik akım cevabı ölçüldü. Bu işlem 10 defa tekrarlandı ve kaydedilen akım farklarının standart sapması (*s*) ve kalibrasyon grafiğinin eğiminin (*m*) 10*s*/*m* ve 3*s*/*m* formüllerinde yerine konmasıyla sırasıyla LOQ ve LOD değerleri hesaplandı. Çalışmada LOQ $5{,}8\times10^{-7}$ M ve LOD $1{,}7\times10^{-7}$ M bulundu.

Çalışmamızda geliştirilen ksantin biyosensörü geniş çalışma aralığında ($6{,}0\times10^{-7}$ – $2{,}0\times10^{-4}$ M) çalışmaya olanak tanıması açısından Tripathi vd. (2022) ($6{,}5\times10^{-7}$ – $5{,}0\times10^{-6}$ M), Dalkıran vd. (2017) ($1{,}9\times10^{-6}$–$2{,}3\times10^{-4}$ M), Sadeghi vd. (2014) ($3{,}6\times10^{-7}$ – $2{,}0\times10^{-5}$ M) tarafından geliştirilmiş biyosensörlerden, düşük bir LOD değerine ($1{,}7\times10^{-7}$ M) sahip olması açısından (Saadaoui vd. 2016) ($2{,}8\times10^{-5}$ M), (Dalkıran vd. 2017) ($2{,}0\times10^{-4}$ M), (Dervisevic vd. 2017) ($2{,}5\times10^{-5}$ M (Kaçar vd. 2018) ($8{,}7\times10^{-7}$ M tarafından rapor edilen biyosensörlerden daha üstündür.

### 4.6.2 Cevap süresi

XO/Fc-COOH/CNF modifiye ksantin enzim elektrodun ksantin substratına cevap süresi Bölüm 3.10.2'de açıklandığı gibi araştırıldı ve 11 s olarak bulundu. Elde edilen cevap süresinin literatürlerde 100 s (Shan vd. 2009), 15 s (Kalimuthu vd. 2012), 60 s (Erden vd. 2012, 10 s (Dalkıran vd. 2014), 35 s (Yazdanparast vd. 2019), ksantin biyosensörleri için verilen cevap süreleri ile kıyaslanabilecek kadar düşük seviyede olduğu kanısına varıldı.

### 4.6.3 Tekrar kullanılabilirlik

Hazırlanan XO/Fc-COOH/CNF/GCE ile art arda üç kez kalibrasyon eğrisi oluşturularak bu eğrilerin duyarlıklarının BSS değeri hesaplandı ve biyosensörün tekrar kullanılabilirliği %3,6 olarak bulundu. Çalışmada bulunan yüzde bağıl standart sapma değerinin literatürlerde verilen %4,9 (Shan vd. 2009), %5,1 (Devi vd. 2011), %6,1 (Villalonga vd. 2011), %2,9 (Dalkıran vd. 2014), %4,0 (Dalkıran vd. 2018) gibi farklı çalışmalardan elde edilen değerlerin pek çoğundan daha düşük olması hazırlanmış olan elektrodun tekrar kullanılabilir olma özelliğinin iyi seviyede bulunduğunu ve hazırlanan elektrot ile art arda fazla sayıda ölçüm yapılabileceğini gösterdi.

### 4.6.4 Tekrar üretilebilirlik

Bu tez çalışmasında hazırlanan biyosensörlerin tekrar üretilebilirliğini belirlemek için aynı şartlarda üç ayrı XO/Fc-COOH/CNF/GCE hazırlandı. Bu biyosensörlerin ksantine verdikleri amperometrik cevap akımlarının derişime karşı grafiğe geçirilmesiyle oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin duyarlıklarının BSS değeri %3,0 olarak hesaplandı. Literatürdeki veriler incelendiğinde bu elektrodun tekrar üretilebilirliğinin %8,0 (Thandavan vd. 2013), %4,6 (Yazdanparast vd. 2019), <%1,5 (Khan vd. 2020), %4,0 (Tripathi vd. 2022) gibi çalışmaların çoğundan elde edilen sonuçlardan daha iyi olduğu gözlemlendi.

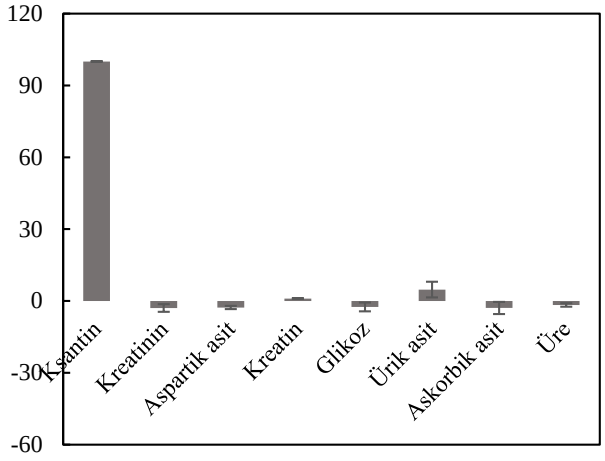
### 4.6.5 Kararlılık

Fc-COOH/CNF modifiye ksantin enzim elektrot Bölüm 3.10.4'de anlatıldığı gibi optimum şartlarda hazırlandı ve elektrodun kararlığının incelemek için $2{,}0\times10^{-5}$ M ksantin içeren çözeltide art arda 50 ölçüm alındı. 50 okuma sonrasında elektrodun başlangıç aktivitesinin %6,6'ını kaybettiği görüldü. Bu çalışmada hazırlanan elektrodun kararlılığının tatmin edici seviyede olduğu söylenebilir.

### 4.6.6 Bozucu türlerin biyosensör cevabına etkisi

Bir biyosensörün seçiciliği gerçek numune analizlerinde çok önemli olduğundan gerçek numunelerde bulunabilecek türler kullanılarak bunların XO/Fc-COOH/CNF/GCE'nin ksantin cevabı üzerine etkisi Bölüm 3.10.5'de açıklandığı gibi incelendi. Bozucu etki gösterme potansiyeli olan türlerin %girişim değerleri Çizelge 4.2'de verildi.

Şekilde 4.12 incelendiğinde XO/Fc-COOH/CNF/GCE için kreatinin, ürik asit, kreatin, glikoz, aspartik asit, askorbik asit ve üre için yüzde girişim -2,9; 4,7; 1; -2,5; -2,7; -2,9 ve -1,7 olarak bulundu. Girişim yapan kimyasal türlerin ksantinin amperometrik cevabına etkisinin %5,0'den daha düşük olduğu gözlenmiştir. Sonuçlara dayanılarak XO/Fc-COOH/CNF/GCE'nin ksantin tayini için iyi bir seçicilik gösterdiği söylenebilir.

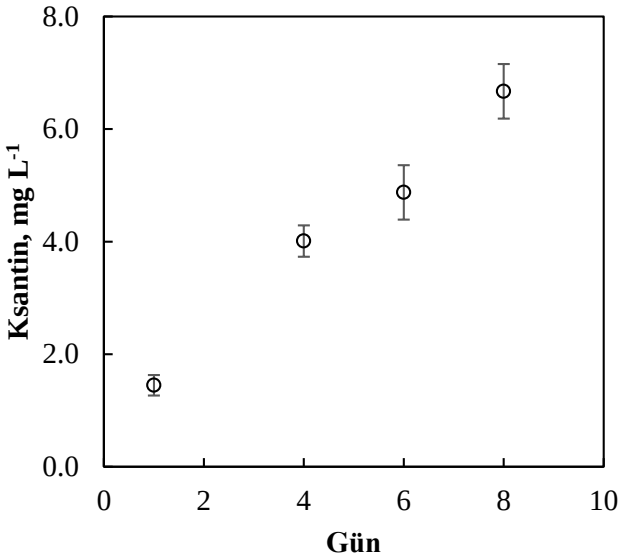



Şekil 4.12 XO/Fc-COOH/CNF/GCE'nin kronoamperometrik cevabına bazı türlerin etkisi (0,05 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,40 V, oda sıcaklığı)

### 4.6.7 Analitik uygulamalar

**XO/Fc-COOH/CNF/GCE'un balık eti tazeliğinin belirlenmesinde kullanılması**

Yerel bir pazardan alınan çinekop balığı doğranarak küçük parçalara ayrıldı ve homojen hale getirildi. Elde edilen homojenat +4 °C'de buzdolabında saklandı. Analiz, Bölüm 3.11'de açıklandığı şekilde gerçekleştirildi. Standart katma eğrilerinden yararlanılarak balık numunesindeki 1, 4, 6 ve 8. gün sonunda oluşan ksantin miktarları sırasıyla 1,4; 4,0; 4,9 ve 6,7 mg $L^{-1}$ olarak bulundu (Şekil 4.13). Buradan balık bayatladıkça dokularındaki ksantin miktarının arttığı ve geliştirilen biyosensörün balık tazeliğinin belirlenmesinde kullanılabileceği sonucuna varıldı.




Şekil 4.13 XO/Fc-COOH/CNF/GCE ile balık etinin tazeliğinin izlenmesi

Çalışmada ayrıca, standart katma yöntemi ile elde ettiğimiz verilerin doğruluğunu belirlemek için, balık numunelerine standart ksantin çözeltisinden katıldı ve oluşan karışımlarda ksantin miktarları belirlenerek % geri kazanım değerleri Bölüm 3.11.2'de açıklandığı gibi belirlendi. Yapılan üç tekrar sonucu balık numunesinde ortalama geri kazanım değeri %101,5±0,7 olarak hesaplandı (Çizelge 4.2). Bulunan yüzde geri kazanım değeri çalışmada geliştirilen elektrot ile balıkta ksantin tayininin başarılı bir şekilde yapılabileceğini gösterdi.

Çizelge 4.2 Standart katma yöntemi ile balık numunesinde ksantin tayini için XO/Fc-COOH/CNF/GCE ile elde edilen geri kazanım sonuçları (0,05 M pH 8,0 fosfat tamponu, +0,40 V, oda sıcaklığı, *N*=3)

| **Eklenen ksantin, mg $L^{-1}$** | **Bulunan ksantin, mg $L^{-1}$** | **Geri kazanım, %** |
|---|---|---|
| – | 1,05±0,06 | – |
| 0,75 | 1,82±0,01 | 101,5±0,7 |

## 5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında ksantin miktarının belirlenmesi için karbon nanofiber ve ferrosen karboksilik asit medyatörü ile modifiye edilmiş GCE'nin kullanıldığı amperometrik bir biyosensör hazırlandı.

Ksantin tayini için geliştirilen XO/Fc-COOH/CNF/GCE'nin özellikleri literatürde daha önce rapor edilen ksantin biyosensörleri ile karşılaştırıldığında;

XO/Fc-COOH/CNF/GCE;

- Geniş bir doğrusal çalışma aralığına ($6{,}0\times10^{-7}$ – $2{,}0\times10^{-4}$ M) sahiptir.
- LOD değeri oldukça düşüktür ($1{,}7\times10^{-7}$ M).
- Yüksek tekrar kullanılabilirliğe (BSS %3,6) ve tekrar üretilebilirliğe (BSS %3,0) sahiptir.
- Kısa cevap süresi vardır (<15).
- Biyosensörün kararlılığı yüksektir (50 ölçüm sonucunda %93,4 başlangıç aktivitesine sahiptir)
- Balık tazeliğinin takibinde biyosensör balık numunesinde ksantin tayininde başarıyla kullanılmıştır.
- Biyosensör yüksek seçiciliğe sahiptir.
- Biyosensör kısa sürede hazırlanabilmektedir.
- Biyosensörün maliyeti düşüktür.

Sonuçlar incelendiğinde enzim elektrodun modifikasyonunda kullanılan karbon nanofiberin enzim immobilizasyonu için geniş yüzey alanı sağladığı, medyatör olarak kullanılan ferrosen karboksilik asitin ise düşük potansiyelde çalışma imkanı sağlayarak girişim yapabilecek türlerin etkisini azalttığı ve böylece ksantin enzim biyosensörünün performansını büyük ölçüde geliştirdiği görülmüştür.

# KAYNAKLAR


Akyüz, E. 2011. Ürik asit tayini için yeni bir biyosensör geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 84, Edirne.

Amigo, J. M., Coello, J., & Maspoch, S. 2005. Three-way partial least-squares regression for the simultaneous kinetic-enzymatic determination of xanthine and hypoxanthine in human urine. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 382(6), 1380-1388.

Amiri-Aref, M., Raoof, J. B., & Ojani, R. 2014. A highly sensitive electrochemical sensor for simultaneous voltammetric determination of noradrenaline, acetaminophen, xanthine and caffeine based on a flavonoid nanostructured modified glassy carbon electrode. Sensors and Actuators B: Chemical, 192, 634-641.

Ansari, A. A., & Malhotra, B. D. 2022. Current progress in organic–inorganic hetero-nano-interfaces based electrochemical biosensors for healthcare monitoring. Coordination Chemistry Reviews, 452, 214282.

Arslan, F., Yaşar, A., & Kılıç, E. 2006. An amperometric biosensor for xanthine determination prepared from xanthine oxidase immobilized in polypyrrole film. Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology, 34(1), 113-128.

Aziz, N., & Jamil, R. T. 2019. Biochemistry, Xanthine Oxidase.

Balladin, D.A., Narinesingh, D., Stoute, V.A. and Ngo, T.T. 1997. Immobilization of xanthine oxidase and its use in the quantitation of hypoxanthine in fish muscle tissue extracts using a flow injection method. Applied Biochemistry and Biotechnology, 62(2-3); 317–328.

Baş, S. Z. 2011. Ksantin tayini için amperometrik enzim elektrotlarının geliştirilmesi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 149, Konya.

Battelli, M. G., Polito, L., Bortolotti, M., & Bolognesi, A. 2016. Xanthine oxidoreductase-derived reactive species: physiological and pathological effects. Oxidative Medicine and Cellular Longevity.

Bayramoglu, G., Altintas, B., & Yakup Arica, M. 2012. Cross-linking of horseradish peroxidase adsorbed on polycationic films: utilization for direct dye degradation. Bioprocess and Biosystems Engineering, 35, 1355-1365.

Buerk, D.G. 1993 Biosensors Theory and Applications, Technomic Publishing, 221, Pennsylvania, USA.

Castillo, J., Gáspár, S., Leth, S., Niculescu, M., Mortari, A., Bontidean, I., ... & Csöregi, E. 2004. Biosensors for life quality: Design, development and applications. Sensors and Actuators B: Chemical, 102(2), 179-194.

Chaubey, A., & Malhotra, B. 2002. Mediated biosensors. Biosensors and Bioelectronics, 17(6-7), 441-456.

Che, X., Yuan, R., Chai, Y., Li, J., Song, Z., & Li, W. 2010. Amperometric glucose biosensor based on Prussian blue–multiwall carbon nanotubes composite and hollow PtCo nanochains. Electrochimica Acta, 55(19), 5420-5427.

Cooper, N., Khosravan R., Erdmann, C., Fiene, J. and Lee, J. W. 2006. Quantification of uric acid, xanthine and hypoxanthine in human serum by HPLC for pharmacodynamic studies. Journal of Chromatography B, 837, 1–10

Çubukçu, M., Timur, S. and Anık, Ü. 2007. Examination of performance of glassy carbon paste electrode modified with gold nanoparticle and xanthine oxidase for xanthine and hypoxanthine detection. Talanta, 74(3); 434–439.

Dalkiran, B., Kacar, C., Erden, P. E., & Kilic, E. 2014. Amperometric xanthine biosensors based on chitosan-$Co_3O_4$-multiwall carbon nanotube modified glassy carbon electrode. Sensors and Actuators B: Chemical, 200, 83-91.

Dalkiran, B., Erden, P. E., & Kılıç, E. 2017. Amperometric biosensors based on carboxylated multiwalled carbon nanotubes-metal oxide nanoparticles-7, 7, 8, 8-tetracyanoquinodimethane composite for the determination of xanthine. Talanta, 167, 286-295.

Dalkiran, B., Erden, P. E., & Kılıç, E. 2017. Construction of an electrochemical xanthine biosensor based on graphene/cobalt oxide nanoparticles/chitosan composite for fish freshness detection. Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry, 4(1), 23-44.

Dalkiran, B., Kaçar, C., Erden, P. E., & Kılıç, E. 2018. Electrochemical xanthine biosensor based on zinc oxide nanoparticles–multiwalled carbon nanotubes–1, 4-benzoquinone composite. Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry, 5(1), 317-332.

de Oliveira, E. P., & Burini, R. C. 2012. High plasma uric acid concentration: causes and consequences. Diabetology & Metabolic Syndrome, 4(1), 1-7.

Dervisevic, M., Custiuc, E., Çevik, E., Durmus, Z., Şenel, M., & Durmus, A. 2015. Electrochemical biosensor based on REGO/Fe3O4 bionanocomposite interface for xanthine detection in fish sample. Food Control, 57, 402-410.

Dervisevic, M., Dervisevic, E., Azak, H., Çevik, E., Şenel, M., & Yildiz, H. B. 2016. Novel amperometric xanthine biosensor based on xanthine oxidase immobilized on electrochemically polymerized 10-[4H-dithieno (3, 2-b: 2′, 3′-d) pyrrole-4-yl] decane-1-amine film. Sensors and Actuators B: Chemical, 225, 181-187.

Dervisevic, M., Dervisevic, E., Çevik, E., & Şenel, M. 2017. Novel electrochemical xanthine biosensor based on chitosan–polypyrrole–gold nanoparticles hybrid bio-nanocomposite platform. Journal of Food and Drug Analysis, 25(3), 510-519.

Devi, R., Thakur, M. and Pundir, C.S. 2011. Construction and application of an amperometric xanthine biosensor based on zinc oxide nanoparticles–polypyrrole composite film. Biosensors and Bioelectronics, 26(8); 3420–3426.

Devi, R., Yadav, S. and Pundir, C.S. 2012. Amperometric determination of xanthine in fish meat by zinc oxide nanoparticle/chitosan/multiwalled carbon nanotube/polyaniline composite film bound xanthine oxidase. Analyst, 13, 754–759.

Diamond, D. 1998. Principles of chemical and biological sensors. Wiley.

Dinckaya E, 1999. Enzim sensorleri. Biyosensorler (Ed. Azmi Telefoncu):81-142. Ege Universitesi Basımevi, İzmir.

Dodevska, T., Horozova, E. and Dimcheva, N. 2010. Design of an amperometric xanthinebiosensor based on a graphite transducer patterned with noble metal micro–particles. Central European Journal of Chemistry, 8(1); 19–27.

Egwim, E. C., Vunchi, M. A., & Egwim, P. O. 2005. Comparism of xanthine oxidase activities in cow and goat milks. Biokemistri, 17(1), 1-6.

El Ridi, R., & Tallima, H. 2017. Physiological functions and pathogenic potential of uric acid: A review. Journal of Advanced Research, 8(5), 487-493.

Emre, F. B., 2007. Kolesterol Biyosensörü Tasarımında Bazı Polimerik Materyallerin Enzim İmmobilizasyon Ortamı Olarak Kullanımı. Doktoraz Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 118, Malatya.

Erden, P. E. 2010. Ksantin ve ürik asit tayini için farklı medyatörlü modifiye karbon pasta enzim elektrotların hazırlanması. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 169, Ankara.

Erden, P. E., Pekyardımcı, Ş., & Kılıç, E. 2012. Amperometric enzyme electrodes for xanthine determination with different mediators. Acta Chimica Slovenica, 59(4).

Gao, Y., Shen, C. Di, J. and Tu Y. 2009. Fabrication of amperometric xanthine biosensors based on direct chemistry of xanthine oxidase. Materials Science and Engineering: C, 29, 2213–2216.

Gründler, P. 2007. Chemical sensors an introduction for scientists and engineers. Springer, 273, Germany.

Hediger, M. A., Johnson, R. J., Miyazaki, H., & Endou, H. 2005. Molecular physiology of urate transport. Physiology, 20(2), 125-133.

Hlavay, J., Haemmerli, S. D., & Guilbault, G. G. 1994. Fibre-optic biosensor for hypoxanthine and xanthine based on a chemiluminescence reaction. Biosensors and Bioelectronics, 9(3), 189-195.

Joon, A., Ahlawat, J., Aggarwal, V., Jaiwal, R., & Pundir, C. S. 2021. An improved amperometric determination of xanthine with xanthine oxidase nanoparticles for testing of fish meat freshness. Sensing and Bio-Sensing Research, 33, 100437.

Kaçar, C., Dalkıran, B., Erden, P. E., & Kılıç, E. 2018. Ksantin Biyosensörlerin Performansına Çeşitli Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 22(2), 832-839.

Kalimuthu, P., Leimkühler, S., & Bernhardt, P. V. 2012. Low-potential amperometric enzyme biosensor for xanthine and hypoxanthine. Analytical Chemistry, 84(23), 10359-10365.

Kang, X., Mai, Z., Zou, X., Cai, P., & Mo, J. 2007. A novel glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in chitosan on a glassy carbon electrode modified with gold–platinum alloy nanoparticles/multiwall carbon nanotubes. Analytical Biochemistry, 369(1), 71-79.

Karunakaran, C., Rajkumar, R., & Bhargava, K. 2015. Introduction to biosensors. In Biosensors and Bioelectronics (pp. 1-68). Elsevier.

Katchalski-Katzir, E. 1993 Immobilized enzymes -learning from past successes and failures. Trends in Biotechnology, 11, 471–478

Keskin, M., & Arslan, F. 2020 Biyosensörler. Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi, 1(1-2), 51-60.

Khan, M. Z. H., Ahommed, M. S., & Daizy, M. 2020. Detection of xanthine in food samples with an electrochemical biosensor based on PEDOT: PSS and functionalized gold nanoparticles. RSC Advances, 10(59), 36147-36154.

Kimmel, D. W., LeBlanc, G., Meschievitz, M. E., & Cliffel, D. E. 2012. Electrochemical sensors and biosensors. Analytical Chemistry, 84(2), 685-707.

Kirgöz, Ü.A., Timur, S., Wang, J. and Telefoncu, A. 2004. Xanthine oxidase modified glassy carbon paste electrode. Electrochemistry Communications, 6, 913−916.

Kissinger, P. T. 2005. Biosensors—a perspective. Biosensors and Bioelectronics, 20(12), 2512-2516.

Kocabay Ö., 2011. Jelatin-Karboksimetilselüloz-Süperoksit Dismutaz Biyosensörünün Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 91, Ankara.

Kress, M., Meissner, D., Kaiser, P., Hanke, R., & Wood, W. G. 2002. The measurement of theophylline in human serum or plasma using gas chromatography and isotope dilution-mass spectrometry (GC-IDMS) taking other substituted xanthines into consideration. Clinical Laboratory, 48(9-10), 535-540.

Lavanya, N., Sekar, C., Murugan, R., & Ravi, G. 2016. An ultrasensitive electrochemical sensor for simultaneous determination of xanthine, hypoxanthine and uric acid based on Co doped $CeO_2$ nanoparticles. Materials Science and Engineering: C, 65, 278-286

Liu, X., Ou, X., Lu, Q., Zhang, J., Chen, S. and Wei, S. 2014. Electrochemical sensor based on overoxidized dopamine polymer and 3,4,9,10-perylenetetracarboxylic acid for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid, xanthine and hypoxanthine. RSC Advances, 4, 42632–42637.

Mello, L. D., & Kubota, L. T. 2002. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. Food Chemistry, 77(2), 237-256.

Mohamad, N.R.; Marzuki, N.H.C.; Buang, N.A.; Huyop, F.; Wahab, R.A. 2015 An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. Biotechnology & Biotechnoligical Equipment, 29, 205–220.

Mohanty, S. P., & Kougianos, E. 2006. Biosensors: A tutorial review. Ieee Potentials, 25(2), 35-40.

Muamer Dervisevic, 2015 Amperometric Biosensor For Detection Of Xanthine Level For Meat Freshness Control. Yüksek Lisans Tezi, Fatih Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 57, İstanbul.

Murugaiyan, S. B., Ramasamy, R., Gopal, N., & Kuzhandaivelu, V. 2014. Biosensors in clinical chemistry: An overview. Advanced Biomedical Research, 3.

Naresh, V., & Lee, N. 2021. A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. Sensors, 21(4), 1109.

Nguyen, H.H.; Kim, M. 2017 An overview of techniques in enzyme immobilization. Applied Science and Convergence Technology, 26, 157–163.

Nguyen, H.H., Lee, S. H., Lee, U. J., Fermin, C. D., & Kim, M. 2019. Immobilized enzymes in biosensor applications. Materials, 12(1), 121.

Novick, S. J., & Rozzell, J. D. 2005. Immobilization of enzymes by covalent attachment. Microbial Enzymes and Biotransformations, 247-271.

Olojo, R. O., Xia, R. H., & Abramson, J. J. 2005. Spectrophotometric and fluorometric assay of superoxide ion using 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazole. Analytical Biochemistry, 339(2), 338-344.

Pacher, P. A. L., Nivorozhkin, A., & Szabó, C. 2006. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. Pharmacological Reviews, 58(1), 87-114.

Pagliarussi, R. S., Freitas, L. A., & Bastos, J. K. 2002. A quantitative method for the analysis of xanthine alkaloids in Paullinia cupana (guarana) by capillary column gas chromatography. Journal of Separation Science, 25(5-6), 371-374.

Pei, J. and Li, X. 2000. Xanthine and hypoxanthine sensors based on xanthine oxidase immobilized on a $CuPtCl_6$ chemically modified electrode and liquid chromatography electrochemical detection. Analytica Chimica Acta, 414, 205–213.

Pizzariello, A., Stredanský, M., Stredanská, S., and Miertuš, S. 2001. Urea biosensor based on amperometric pH-sensing with hematein as a pH-sensitive redox mediator. Talanta, 54(4), 763-772.

Pundir, C. S., & Devi, R. 2014. Biosensing methods for xanthine determination: A review. Enzyme and Microbial Technology, 57, 55-62.

Qin, C., Chen, C., Xie, Q., Wang, L., He, X., Huang, Y., Zhou, Y., Xie, F., Yang, D., Yao, S. 2012. Amperometric enzyme electrodes of glucose and lactate based on poly (diallyldimethylammonium)-alginate-metal ion-enzyme biocomposites. Analytica Chimica Acta, 720, 49-56.

Rahman, M. A., Won, M. S., & Shim, Y. B. 2007. Xanthine sensors based on anodic and cathodic detection of enzymatically generated hydrogen peroxide. Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis, 19(6), 631-637.

Saadaoui, M., Sánchez, A., Díez, P., Raouafi, N., Pingarrón, J. M., & Villalonga, R. 2016. Amperometric xanthine biosensors using glassy carbon electrodes modified with electrografted porous silica nanomaterials loaded with xanthine oxidase. Microchimica Acta, 183(6), 2023-2030.

Saatçi, E., 1997. İnek sütü ksantin oksidazının saflaştırılması ve bazı kinetik özelliklerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 104, Kayseri.

Sadeghi, S., Fooladi, E., & Malekaneh, M. 2014. A nanocomposite/crude extract enzyme-based xanthine biosensor. Analytical Biochemistry, 464, 51-59.

Sassolas, A.; Blum, L.J.; Leca-Bouvier, B.D. 2012 Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. Biotechnology Advances, 30, 489–511.

Senel, M. 2012. Amperometric Glucose Biosensors. Lap Lambert Academic Publishing, 156, Germany.

Scott, A.O. 1998. Biosensors for Food Analysis. The Royal Society of Chemistry, 197 , Cambridge-UK.

Shan, D., Wang, Y., Xue, H. and Cosnier, S. 2009. Sensitive and selective xanthine amper–ometric sensors based on calcium carbonate nanoparticles. Sensors and Actuators B:Chemical, 136, 510–515.

Shihabi, Z. K., Hinsdale, M. E., & Bleyer, A. J. 1995. Xanthine analysis in biological fluids by capillary electrophoresis. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 669(1), 163-169.

Suzuki, T. A. K. E. O., & Takahashi, E. I. I. C. H. I. 1975. Metabolism of xanthine and hypoxanthine in the tea plant (Thea sinensis L.).Biochemical Journal, 146(1), 79-85.

Tang, X., Liu, Y., Hou, H., & You, T. 2011. A nonenzymatic sensor for xanthine based on electrospun carbon nanofibers modified electrode. Talanta 83(5), 1410-1414.

Teng, Y., Chen, C., Zhao, C.X., Zhao, H.L. and Lan, M.B. 2010. Disposable amperometric biosensors based on xanthine oxidase immobilized in the Prussian bluemodified screen–printed three–electrode System. Science China Chemistry, 53, 2581–2586.

Thandavan, K., Gandhi, S., Sethuraman, S., Rayappan, J. B. B., & Krishnan, U. M. 2013. Development of electrochemical biosensor with nano-interface for xanthine sensing–A novel approach for fish freshness estimation. Food chemistry, 139(1-4), 963-969.

Tripathi, A., Elias, A. L., Jemere, A. B., & Harris, K. D. 2022. Amperometric Determination of Xanthine Using Nanostructured NiO Electrodes Loaded with Xanthine Oxidase. ACS Food Science & Technology, 2(8), 1307-1317.

Turner, A. P. 1988. [7] Amperometric biosensors based on mediator-modified electrodes. In Methods in enzymology. Academic Press, Vol. 137, pp. 90-103.

Velasco-Garcia, M. N., & Mottram, T. 2003. Biosensor technology addressing agricultural problems. Biosystems Engineering, 84(1), 1-12.

Villalonga, R., Matos, M., & Cao, R. 2007. Construction of an amperometric biosensor for xanthine via supramolecular associations. Electrochemistry Communications, 9(3), 454-458.

Wang, C. H., Zhang, C., & Xing, X. H. 2016. Xanthine dehydrogenase: An old enzyme with new knowledge and prospects. Bioengineered, 7(6), 395-405.

Wang, Z., Ma, B., Shen, C., Lai, O. M., Tan, C. P., & Cheong, L. Z. 2019. Electrochemical biosensing of chilled seafood freshness by xanthine oxidase immobilized on copper-based metal–organic framework nanofiber film. Food Analytical Methods, 12(8), 1715-1724.

Yang, L., Ren, X., Tang, F., & Zhang, L. 2009. A practical glucose biosensor based on Fe3O4 nanoparticles and chitosan/nafion composite film. Biosensors and Bioelectronics, 25(4), 889-895.

Yazdanparast, S., Benvidi, A., Abbasi, S., & Rezaeinasab, M. 2019. Enzyme-based ultrasensitive electrochemical biosensor using poly (l-aspartic acid)/MWCNT bio-nanocomposite for xanthine detection: A meat freshness marker. Microchemical Journal, 149, 104000.

Yunus, S., Attout, A., Vanlancker, G., Bertrand, P., Ruth, N., & Galleni, M. 2011. A method to probe electrochemically active material state in portable sensor applications. Sensors and Actuators B: Chemical, 156(1), 35-42.

Zhu, Z., Garcia-Gancedo, L., Flewitt, A. J., Xie, H., Moussy, F., & Milne, W. I. 2012. A critical review of glucose biosensors based on carbon nanomaterials: carbon nanotubes and graphene. Sensors, 12(5), 5996-6022.