

Ksantin Biyosensörlerin Performansına Çeşitli Çok Duvarlı Karbon Nanotüplerin Etkisi

Ceren KAÇAR^{*1}, Berna DALKIRAN¹, Pınar Esra ERDEN¹, Esmâ KILIÇ¹

¹Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 06100, Ankara

(Alınış / Received: 21.04.2017, Kabul / Accepted: 12.10.2017, Online Yayınlanma / Published Online: 16.01.2018)

Anahtar Kelimeler

Biyosensör,
Amperometri,
Çok duvarlı karbon nanotüp,
Ksantin,
Ksantin oksidaz

Özet: Bu çalışmada, fonksiyonel grup içermeyen (MWCNT) ve karboksil (COOH-MWCNT), hidroksil (OH-MWCNT) ve amino (NH₂-MWCNT) grubu içeren çok duvarlı karbon nanotüplerin amperometrik ksantin biyosensörünün cevabına etkileri incelendi. Bu amaçla, MWCNT'ler ve ksantin oksidaz (XO) enzimi jelatin çözeltisi içinde dağıtıldı ve bu karışımlardan belirli miktarların camı karbon elektrot yüzeyine damlatılması ile ksantin biyosensörleri hazırlandı. Bu biyosensörlerin optimum pH, enzim miktarı gibi çalışma koşulları belirlendi ve bu koşullarda biyosensörlerin performans faktörleri incelendi. NH₂-MWCNT ile hazırlanan biyosensörün en yüksek duyarlılık ile ksantine cevap verdiği gözlemlendi. Bu biyosensör ksantine <15 s gibi kısa bir cevap süresi ile $9,9 \times 10^{-7}$ M – $9,4 \times 10^{-4}$ M aralığında doğrusal cevap gösterdi ve gözlenebilme sınırı $8,7 \times 10^{-7}$ M, duyarlılığı $23,36 \mu\text{A mM}^{-1}$ olarak belirlendi.

The Effect of Various Multiwalled Carbon Nanotubes on the Performance of Xanthine Biosensors

Keywords

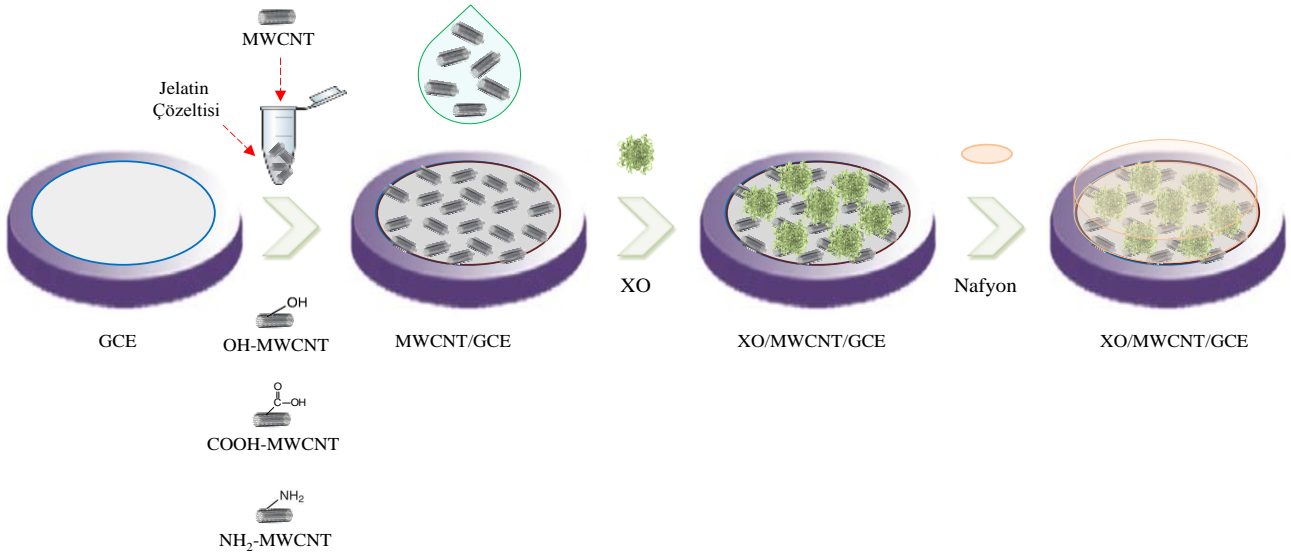
Biosensor,
Amperometry,
Multiwalled carbon nanotube,
Xanthine,
Xanthine oxidase

Abstract: In this study effects of multiwalled carbon nanotubes (MWCNT), and multiwalled carbon nanotubes with carboxyl (COOH-MWCNT), hydroxyl (OH-MWCNT) and amino (NH₂-MWCNT) functional groups on the response of amperometric xanthine biosensors were investigated. For this purpose, MWCNT and xanthine oxidase (XO) enzyme were dispersed in gelatin solution and aliquots of this solution was drop casted onto the surface of glassy carbon electrode in order to prepare the xanthine biosensors. Working conditions such as optimum pH and enzyme amount of these biosensors were investigated and analytical performances of the biosensors were determined under this optimum conditions. The biosensor prepared with NH₂-MWCNT exhibited a xanthine response with the highest sensitivity. The response time, linear working range, detection limit and sensitivity of this biosensor was <15 s; 9.9×10^{-7} M – 9.4×10^{-4} M; 8.7×10^{-7} M; $23.36 \mu\text{A mM}^{-1}$ respectively.

1. Giriş

Ksantin (3,7-dihidro-purin-2,6-dion) çoğu vücut dokusunda ve sıvısında bulunan bir purin bazıdır. İdrar ve kandaki ksantin miktarı ksantinüri, böbrek bozuklukları ve gut gibi hastalıkların teşhisinde kullanıldığından biyolojik sıvılardaki ksantin miktarının doğru ve hızlı biçimde belirlenmesi klinik açıdan büyük öneme sahiptir [1]. Ayrıca, ksantin değerleri gıda endüstrisinde et ürünleri ve balık tazeliğinin belirlenmesinde kullanılır. Bu nedenle ksantin tayininin endüstriyel önemi de büyüktür [2]. Ksantin tayini için kapiler kolon gaz kromatografi [3], yüksek performanslı sıvı kromatografi [4], kemilüminesans [5] ve spektrometri [6] gibi farklı yöntemler geliştirilmiştir. Ancak bu yöntemlerin pek

çoğu karmaşık, pahalı, zaman alıcı ve zahmetlidir. Bu yöntemlerle kıyaslandığında, numunede doğrudan, hızlı ve ucuz ksantin tayinine imkan veren biyosensörler iyi bir alternatiftir. Biyosensörler, biyolojik sistemin yüksek spesifikliği ile fiziksel analiz sisteminin tayin duyarlılığını bileştiren analitik araçlardır [7]. Gıda, biyoteknoloji, ilaç ve tarım gibi pek çok alanda geniş bir uygulama alanına sahip olan biyosensörler yüksek duyarlılık, yüksek hız, kullanım basitliği ve kolay üretilbilir olmaları nedeniyle oldukça önemlidirler [8]. Ksantin tayini için de geliştirilmiş çeşitli biyosensörler mevcuttur [9-12]. Son yıllarda yapılan ksantin tayini çalışmalarında ise, CNT'lere dayanan pek çok biyosensör de göze çarpmaktadır [13-17].



Şekil 1. Ksantin biyosensörlerin hazırlanışı.

1991 yılında lijima tarafından keşfedilen ve karbonun yeni bir formu olan karbon nanotüpler (CNT) kimyasal kararlılık, yüksek mekanik dayanım, hızlı elektron aktarım kinetikleri, geniş yüzey alanı gibi üstünlükleri nedeni ile son yıllarda biyosensör araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır [18, 19]. Bu üstün özelliklerden dolayı, CNT'lere dayanan biyosensörlerin geleneksel karbon elektrotlara dayananlara kıyasla daha yüksek duyarlıklara ve daha düşük gözlenebilirlik sınırlarına sahip olduğu belirlenmiştir [20]. CNT'ler çözücülerin pek çoğunda çözünmediğinden, bu bileşiklerin N,N-dimetilformamit (DMF) [21], Nafyon [22], kitosan [23], jelatin [24] gibi maddelerde dağıtılıp elde edilen karışımın uygun katı elektrot yüzeylerine damlatılması yolu ile modifiye elektrot hazırlanması en sık kullanılan yöntemdir. Kollojenin hidrolizi ile elde edilen jelatin deri, kemik ve beyaz bağlayıcı dokuların ana protein bileşenidir [25]. Biyolojik kaynaklı olması, toksik olmaması, biyoyumumluluğu, film oluşturma yeteneği gibi özellikleri nedeni ile jelatinin biyomoleküllerin ve nanopartiküllerin dağıtılmasında etkin bir bileşik olduğu rapor edilmiştir [26].

Literatür incelendiğinde, ne ksantin ne de başka bir substrat için hazırlanan biyosensörlerde fonksiyonel grup içeren MWCNT'lerin biyosensör performansına etkileri kıyaslanmamıştır. Bu çalışmada, ksantin biyosensörü geliştirilmesinde dört farklı tipte MWCNT'ün (MWCNT, COOH-MWCNT, OH-MWCNT ve NH₂-MWCNT) etkinliği araştırıldı. Bu amaçla, CNT'ler jelatin çözeltisinde dağıtılarak camı karbon elektrot yüzeylerinin modifiye edilmesi ve XO'nun immobilizasyonu ile ksantin biyosensörlerinin hazırlanması; optimum çalışma koşullarının belirlenmesi; doğrusal çalışma aralığı, duyarlılığı, gözlenebilirlik sınırı, cevap süresi gibi performans faktörlerinin tayin edilmesi hedeflendi. Elde edilen bulgulardan yararlanarak MWCNT'lerin biyosensör geliştirmedeki etkinliklerinin kıyaslanması amaçlandı.

2. Materyal ve Metot

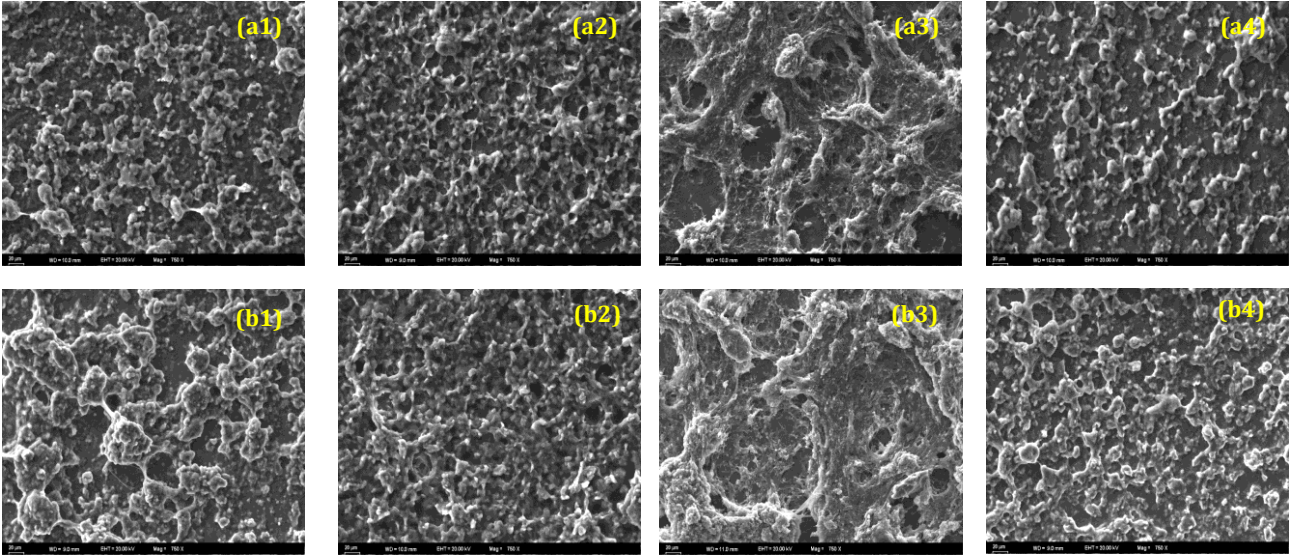
2.1. Reaktifler ve cihazlar

XO (mikrobiyal, ≥ 7 Ünite/mg katı), ksantin, jelatin, sodyum monohidrojen fosfat ve sodyum dihidrojen fosfat Sigma; MWCNT, COOH-MWCNT, OH-MWCNT ve NH₂-MWCNT'ler Cheap Tubes Inc. firmasından temin edildi. Diğer tüm kimyasallar Merck'ten satın alındı. Standart ksantin çözeltileri ksantin 0,10 M NaOH'de çözülmesi ile hazırlandı. Tüm ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Elektrokimyasal ölçümler NOVA software (Eco-Chemie, Utrecht, The Netherlands) ve BASi C3 hücre standı (Bioanalytical Systems, Inc., USA) ile birleştirilmiş Metrohm Autolab elektrokimyasal analiz sistemi (Eco-Chemie, Utrecht, The Netherlands) kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmalarda Pt tel karşıt elektrot, Ag/AgCl (3 M KCl) referans elektrot ve modifiye edilmiş camı karbon elektrottan oluşan üçlü elektrot sistemi kullanıldı. Ölçümler +0,70 V'da 0,05 M pH 7,0 fosfat tamponunda gerçekleştirildi. SEM görüntüleri Carl Zeiss AG, EVO® 50 Series marka taramalı elektron mikroskopu ile alındı. Dönüşümlü voltametri ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ölçümleri 5,0 mM K₃[(Fe(CN)₆]/K₄[(Fe(CN)₆] içeren 0,1 M KCl sulu çözeltisinde gerçekleştirildi. Dönüşümlü voltammogramlar (CV) -0,5 V ile +1,0 V aralığında 100 mV s⁻¹ tarama hızında gerçekleştirildi. EIS ölçümleri için frekans aralığı 10⁵-10⁻² Hz ve genlik 5 mV olarak belirlendi.

2.2. Biyosensör hazırlanması

Camı karbon elektrot (GCE) yüzeyi, modifikasyon öncesinde, 0,05 µm alümina tozu ile parlatıldı; önce etanol sonra deiyonize su içinde 5'er dakika ultrasonik banyoda tutuldu.



Şekil 2. Enzimsiz; (a1) MWCNT, (a2) COOH-MWCNT, (a3) NH₂-MWCNT, (a4) OH-MWCNT ve enzimli (b1) XO/MWCNT, (b2) XO/COOH-MWCNT, (b3) XO/NH₂-MWCNT, (b4) XO/OH-MWCNT modifiye GCE'lere ait SEM görüntüleri (20 µm; EHT=20.00 kV; Mag= 750 X)

Jelatin (JEL) çözeltisini hazırlamak için 100 mg jelatin, 10 mL deiyonize suda manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak çözüldü ve berrak bir çözelti elde etmek amacı ile 1 saat ultrasonik banyoda bekletildi. Her bir MWCNT'den 5 mg tartılarak 1 mL jelatin çözeltisi içerisine katıldı ve homojen hale getirmek için 2 saat ultrasonik banyoda tutuldu. Bu karışımlardan alınan 5 µL'lik bir kısım temizlenmiş GCE yüzeyine damlatıldı ve oda sıcaklığında kurutulularak MWCNT modifiye GCE'ler hazırlandı. Hazırlanan her bir modifiye GCE yüzeyine 10 µL (0,3 U) XO damlatıldı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Son olarak elektrot yüzeyine girişim etkilerini azaltmak ve enzim kaybını en aza indirmek amacı ile 5 µL nafyon çözeltisi damlatılıp oda sıcaklığında kurutulularak dört ayrı biyosensör (XO/MWCNT/GCE, XO/COOH-MWCNT/GCE, XO/OH-MWCNT/GCE, XO/NH₂-MWCNT/GCE) hazırlandı. Biyosensörler kullanılmadıklarında +4 °C'de buzdolabında bekletildi. Biyosensörlerin yapım aşamaları Şekil 1'de gösterilmiştir.

3. Bulgular

3.1. Modifiye elektrotların yüzey karakterizasyonu

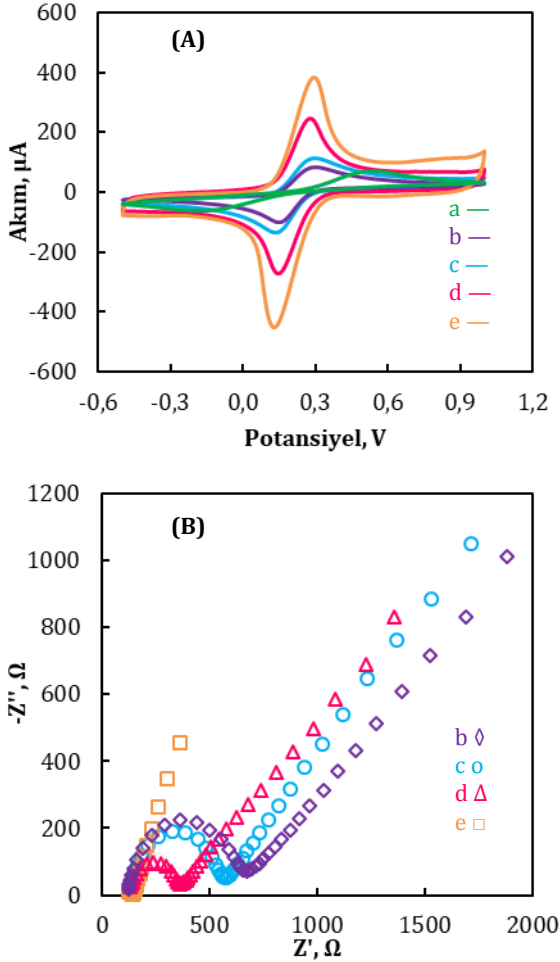
Dört farklı tür MWCNT'le hazırlanan elektrotların ve XO immobilize edilerek hazırlanan biyosensörlerin SEM görüntüleri Şekil 2'de verildi. Şekillerde a'lar enzimsiz b'ler ise enzimli elektrotları ifade etmektedir. Modifiye elektrot yüzeylerine enzim immobilizasyonundan sonra alınan SEM görüntülerindeki parlak noktaların enzimlerin yüzeye tutunmasından kaynaklandığı düşünüldü. Ancak, enzimli ve enzimsiz elektrot yüzeyleri arasında çok net bir fark olmaması enzim moleküllerinin MWCNT taneciklerinin arasına girmesinden kaynaklanabilir. Enzimlerin yüzeye tutunduğu, dört farklı biyosensörün de ksantine

enzimsiz elektrotlara göre çok daha yüksek amperometrik cevap vermesi ile desteklenmektedir.

3.2. Modifiye elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonu

Dönüşümlü voltammetri, modifiye elektrotların elektrokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde faydalı bir yöntemdir. Şekil 3A, farklı tipte MWCNT'ler ile modifiye edilmiş GCE'lerin redoks probunda ([Fe(CN)₆]^{3-/4-}) alınan CV'lerini göstermektedir. Söz konusu beş elektrodun 0,1 M KCl'de aynı potansiyel aralığındaki CV'lerinde herhangi bir pike rastlanmamıştır (Şekil'de gösterilmemiştir). Şekil 3A.(a)'da herhangi bir madde ile modifiye edilmemiş GCE'nin CV'sinde redoks probuna ait indirgenme yükseltgenme pikleri görülmektedir. Şekil 3A.(b-e) ise sırasıyla OH-MWCNT, MWCNT, COOH-MWCNT ve NH₂-MWCNT'ler ile modifiye edilmiş GCE'lere ait CV'leri göstermektedir. Bu CV'lere ait pik akımları modifiye edilmemiş GCE ile kıyaslandığında daha yüksek; pik potansiyelleri arasındaki farkın (ΔE_p) ise daha düşük olduğu bulundu. Bu durum MWCNT'lerin yüzey alanlarının ve elektriksel iletkenliklerinin daha yüksek olması ile açıklanabilir [27]. MWCNT modifiye elektrotlar kendi içinde değerlendirildiğinde ise, pik akımlarının OH-MWCNT/GCE, MWCNT/GCE, COOH-MWCNT/GCE ve NH₂-MWCNT/GCE sırasıyla arttığı gözlemlendi.

Modifiye elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonunda sıklıkla kullanılan bir diğer yöntem EIS'dir. OH-MWCNT/GCE, MWCNT/GCE, COOH-MWCNT/GCE ve NH₂-MWCNT/GCE'lerin empedans spektrumları Şekil 3B'de verildi. Nyquist eğrileri şeklinde verilen empedans spektrumunda yüksek frekanslardaki yarı-dairesel kısımlar sınırlı elektron aktarımına; düşük frekanslardaki doğrusal kısımlar ise, difüzyon olayına karşılık gelir.



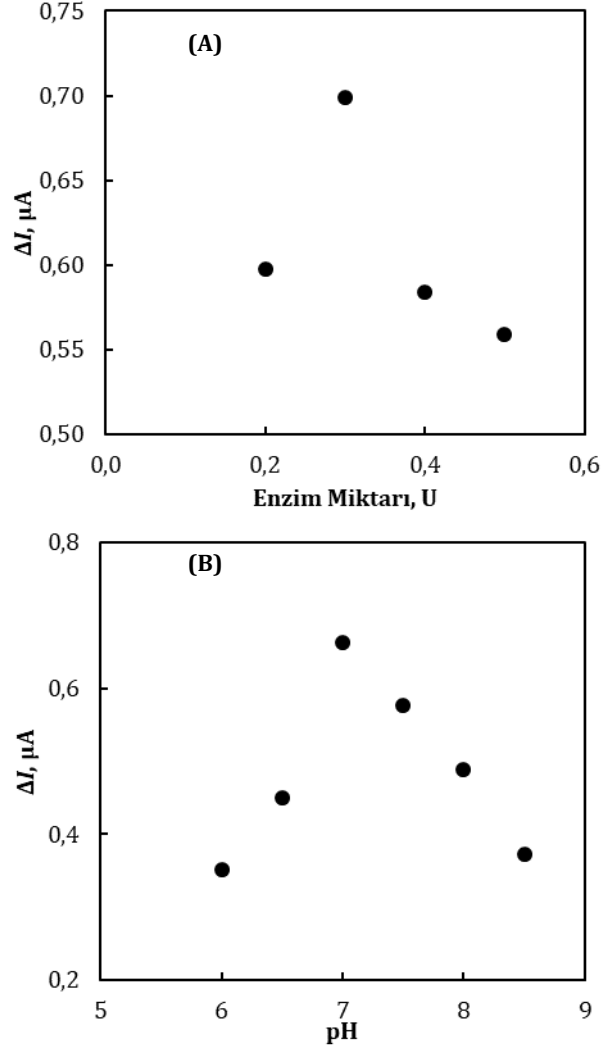
Şekil 3. Modifiye edilmiş ve edilmemiş elektrotlara ait (A) Dönüşümlü voltammogramlar (tarama hızı: 100 mVs⁻¹) ve (B) Nyquist eğrileri (redoks probunda: 0,10 M KCl içeren 5,0 mM Fe(CN)₆^{3-/4-}): (a) GCE, (b) OH-MWCNT/GCE, (c) MWCNT/GCE, (d) COOH-MWCNT/GCE ve (e) NH₂-MWCNT/GCE

Yarı-dairesel kısımların çapı, elektrot/çözelti ara yüzündeki elektron aktarım direncine (R_{ct}) eşittir [28]. Şekil 3B'de verilen Nyquist eğrilerinde R_{ct} değerleri GCE (şekil üzerinde gösterilmemiştir), JEL/GCE (şekil üzerinde gösterilmemiştir), OH-MWCNT/GCE, MWCNT/GCE, COOH-MWCNT/GCE ve NH₂-MWCNT/GCE için sırasıyla 4640 Ω, 4870 Ω, 511 Ω, 405 Ω, 210 Ω ve 18 Ω olarak bulundu. Bu değerlerden de görüldüğü gibi, GCE jelatin çözeltisi ile modifiye edildiğinde, elektrot/çözelti ara yüzündeki elektron aktarım direnci artmakta, MWCNT'ler ile modifiye edildiğinde ise elektron aktarım direnci azalmaktadır. Bu durum MWCNT'lerin elektrot/çözelti ara yüzünde daha fazla sayıda elektron aktarım yolu oluşturması ve elektron aktarımının kolaylaşması ile açıklanabilir.

3.3. Elektrot bileşiminin optimizasyonu

Ksantine duyarlı biyosensörleri hazırlamak için kullanılan MWCNT ve her bir fonksiyonlu MWCNT'nin miktarları optimize edildi. Bunun için, farklı miktarlarda (1-5 mg mL⁻¹) MWCNT, OH-MWCNT, COOH-MWCNT ve NH₂-MWCNT içeren

çözeltilerden 5'er µL GCE yüzeylerine damlatıldı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Bu modifiye elektrotların her birinin CV'si 5,0 mM Fe(CN)₆^{3-/4-} içeren 0,1 M KCl çözeltisinde 100 mV s⁻¹ tarama hızında alındı ve en yüksek akım cevabı gösteren MWCNT miktarı optimum değer olarak kabul edildi. Hem MWCNT hem de fonksiyonlu MWCNT'ler için en iyi akım cevabı elektrot yüzeyinde 25 µg nanomalzeme olduğunda elde edildi.



Şekil 4. NH₂-MWCNT/GCE cevabına (A) enzim miktarının ve (B) pH'nın etkisi (0,02 mM ksantin, 0,05 M pH 7,0 fosfat tamponu, +0,70 V)

Elektroda immobilize edilen XO miktarının biyosensör cevabına etkisinin incelenmesi amacı ile, örnek matrisi olarak NH₂-MWCNT kullanıldı. NH₂-MWCNT/GCE elektroda immobilize edilen XO miktarları 0,2 U; 0,3 U; 0,4 U ve 0,5 U olarak değiştirilerek 4 farklı biyosensör hazırlandı ve 0,02 mM ksantin içeren 0,05 M fosfat tamponunda cevap akımları belirlendi. Biyosensör cevabının 0,3 U'ye kadar artış gösterdiği daha yüksek enzim miktarlarında ise düştüğü gözlemlendi (Şekil 4A). Çalışma sonucunda 0,03 Ünite µL⁻¹ XO optimum enzim miktarı olarak seçildi ve karşılaştırma açısından diğer tip MWCNT'ler ile hazırlanan elektrotlarda da aynı miktar enzim kullanıldı.

Enzimlerin aktiviteleri pH ile değiştiğinden tampon pH'sının biyosensör cevabı üzerinde önemli bir etkisi vardır [29]. Bu etkiyi araştırmak amacı ile NH₂-MWCNT ile modifiye edilmiş enzim elektrot örnek matrisi olarak kullanıldı ve 6,0-8,5 aralığında 0,5 pH birimi değişen pH'larda biyosensörün 0,02 mM ksantine cevabı belirlendi. Biyosensör cevabının pH 7,0'ye kadar arttığı daha sonra kademeli olarak düştüğü gözlemlendi (Şekil 4B). Çalışma sonucunda en uygun çalışma pH'sı 7,0 olarak belirlendi ve bu değer tüm biyosensörler ile yapılan çalışmalarda kullanıldı. Literatür incelendiğinde optimum olarak bulunan bu pH'nın daha önce rapor edilmiş pek çok ksantin biyosensöründe kullanılan pH değeri ile uyumlu olduğu bulunmuştur [20, 30-34].

NH₂-MWCNT kullanılarak hazırlanan ksantin biyosensörü için çalışma koşulları Tablo 1'de verildi. Diğer fonksiyonel grup içeren MWCNT'ler kullanılarak hazırlanan biyosensörler ile yapılan çalışmalarda da bu değerler kullanıldı.

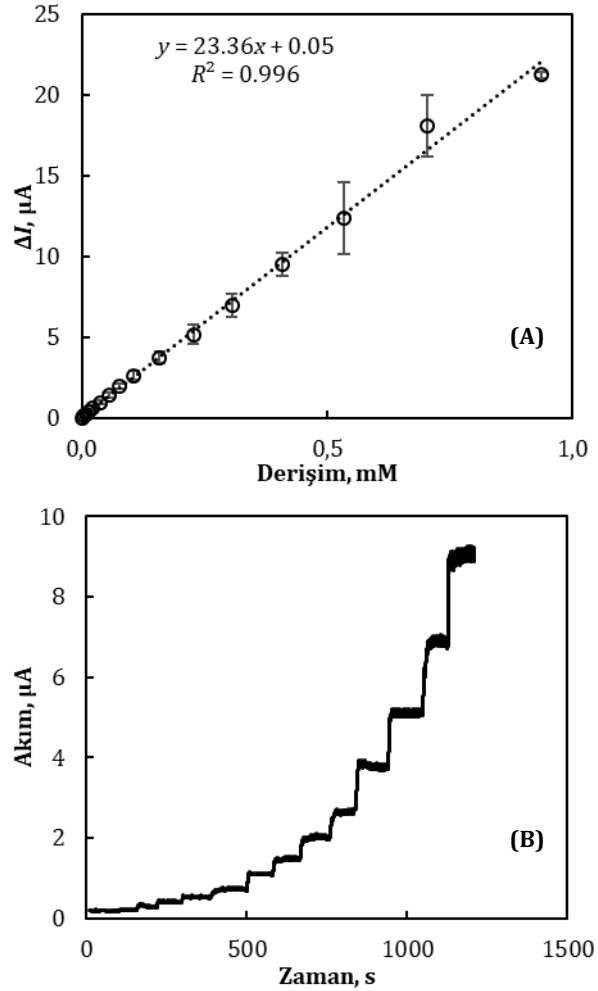
3.4. Biyosensörlerin analitik cevabı

Hazırlanan tüm biyosensörlerin ksantin cevabı optimum çalışma koşulları altında +0,70 V'da belirlendi ve sonuçlar Tablo 2'de listelendi. Tablo 2'den de görüldüğü gibi en geniş doğrusal çalışma aralığı ve en düşük gözlenebilirlik sınırı NH₂-MWCNT ile hazırlanan biyosensör ile elde edildi. Bu biyosensörün doğrusal çalışma aralığı $9,9 \times 10^{-7} - 9,4 \times 10^{-4}$ M, gözlenebilirlik sınırı ise $8,7 \times 10^{-7}$ M olarak bulundu. Literatürde rapor edilen MWCNT'lere dayalı ksantin biyosensörleri incelendiğinde çalışmamızda NH₂-MWCNT ile hazırlanan biyosensör ile elde edilen çalışma aralığı Luteolin/MWCNT modifiye GCE'ye dayalı biyosensörden ($1,0 \times 10^{-6} - 7,0 \times 10^{-5}$ M) [34], çinko oksit nanopartikül/c-MWCNT/polianilin modifiye Pt elektroda dayalı biyosensörden ($1,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-1}$ M) [30], polimerik medyatör/MWCNT'e dayalı biyosensörden ($2,0 \times 10^{-6} - 2,8 \times 10^{-5}$ M, $2,8 \times 10^{-5} - 4,6 \times 10^{-5}$ M, $4,6 \times 10^{-5} - 8,6 \times 10^{-5}$ M) [20] ve kobalt oksit nanopartikül/MWCNT modifiye GCE'ye dayalı biyosensörden ($2,0 \times 10^{-7} - 1,6 \times 10^{-5}$ M) [22] daha geniş bulundu. Biyosensörün gözlenebilirlik sınırının da literatürdeki bazı ksantin biyosensörlerinden daha düşük [35, 36] bazıları ile ise kıyaslanabilir olduğu görüldü [34, 37]. Şekil 5, NH₂-MWCNT ile hazırlanan biyosensör ile elde edilen akım-zaman grafiği ve kalibrasyon eğrilerini göstermektedir. NH₂-MWCNT ile hazırlanan biyosensörün duyarlılığı $358,0 \text{ mM } \mu\text{A}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ cevap süresi <15 s olarak belirlendi.

Tekrarlanabilirlik ve ömür biyosensör performansının değerlendirilmesi açısından önemli parametrelerdir. Bu sebeple, çalışma sonucunda en iyi analitik özellikleri gösterdiği belirlenen XO/NH₂-MWCNT/GCE'un tekrarlanabilirliği ve ömrü araştırıldı. Biyosensörün tekrarlanabilirliği aynı elektrot kullanılarak $9,9 \times 10^{-7} - 4,1 \times 10^{-4}$ M aralığında ksantin için ardışık kalibrasyon eğrileri çizilerek belirlendi. Çizilen 4 kalibrasyon eğrisinin duyarlıklarının bağıl standart sapması %1,9 olarak bulundu.

Tablo 1. NH₂-MWCNT kullanılarak hazırlanan ksantin biyosensörü için çalışma koşulları

Tampon	Fosfat tamponu
Tampon derişimi	0,05 mol L ⁻¹
pH	7,0
Çalışma potansiyeli	+ 0,70 V
Enzim miktarı	0,3 Ünite/10 μL



Şekil 5. XO/NH₂-MWNT/GCE'un en iyi çalışma koşullarında elde edilen (A) kalibrasyon ve (B) akım-zaman eğrisi

Tablo 2. Ksantin biyosensörlerinin analitik performansı

Biyosensör	Doğrusal çalışma aralığı (M)	Gözlenebilirlik sınırı (M)	Duyarlık (mM $\mu\text{A}^{-1} \text{ cm}^{-2}$)
XO/MWCNT/GCE	$9,9 \times 10^{-7} - 2,2 \times 10^{-5}$	$9,4 \times 10^{-7}$	10,7
XO/COOH-MWCNT/GCE	$9,9 \times 10^{-7} - 1,1 \times 10^{-4}$	$8,9 \times 10^{-7}$	160,3
XO/OH-MWCNT/GCE	$1,4 \times 10^{-5} - 9,4 \times 10^{-4}$	$2,8 \times 10^{-6}$	0,9
XO/NH ₂ -MWCNT/GCE	$9,9 \times 10^{-7} - 9,4 \times 10^{-4}$	$8,7 \times 10^{-7}$	358,0

Bu sonuç biyosensörün iyi bir tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu gösterir. Biyosensörün ömrü 1 ay boyunca, farklı zamanlarda, 0,02 mM ksantine amperometrik cevabı ölçülerek değerlendirildi. Her ölçümden sonra biyosensör +4 °C'de saklandı. Biyosensörün 1 ay sonunda başlangıç cevabınının %98,6'sını koruduğu görüldü. Buradan biyosensörün raf ömrünün uzun olduğu ve aynı biyosensör kullanılarak pek çok ölçüm yapılabileceği sonucu çıkarılabilir.

4. Tartışma ve Sonuç

Çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT), karboksil modifiye çok duvarlı karbon nanotüp (COOH-MWCNT), OH modifiye çok duvarlı karbon nanotüp (OH-MWCNT) ve NH₂ modifiye çok duvarlı karbon nanotüp (NH₂-MWCNT)'lere dayanan amperometrik ksantin biyosensörleri hazırlandı ve hazırlanan biyosensörlerin performansları karşılaştırıldı. En iyi analitik performansı NH₂-MWCNT ile hazırlanan ksantin biyosensörü gösterdi. Bu biyosensörün doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilir sınıırı, cevap süresi, duyarlılığı, tekrarlanabilirliği sırası ile $9,9 \times 10^{-7} - 9,4 \times 10^{-4}$ M, $8,7 \times 10^{-7}$ M, <15 s, 23,36 μ A mM⁻¹ ve %1,9 olarak bulundu. Fonksiyonel grup içermeyen ve farklı fonksiyonel gruplu CNT'ler ile hazırlanan ksantin biyosensörlerinin analitik performanslarının farklı olmasının (i) CNT'lerin sentezinde farklı yöntemlerin kullanılmasından, (ii) sentez sırasında kullanılan sistemler nedeni ile CNT'lerin yapısında farklı oranlarda metal safsızlıkların bulunabilmesinden, (iii) XO enziminin CNT'lerdeki fonksiyonel gruplarla etkileşiminin farklı olması nedeni ile enzimin etkin aktif merkezlerinin sayısının değişiminden, (iv) her bir CNT taneciğinin farklı boyut ve şekle sahip olmasından ve (v) CNT'lerdeki -COOH, -NH₂ ve -OH grupları nedeniyle hidrojen bağı oluşumu gibi etkileşimlerle, bu maddelerin jelatin içinde dağılımının farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü.

Teşekkür

Bu çalışma Ankara Üniversitesi BAP tarafından desteklenmiştir (Proje No: 16H0430007).

Kaynakça

- [1] Pundir, C. S., Devi, R. 2014. Biosensing methods for xanthine determination: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 57, 55-62.
- [2] 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), 963-969.
- [3] Pagliarussi, R. S., Freitas, L. A. P., 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, 371-374.
- [4] Cooper, N., Khosravan, R., Erdmann, C., Fiene, J., 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.
- [5] Hlavay, J., Haemmerli, S., Gailbult, G. 1994. Fibre-optic biosensor for hypoxanthine and xanthine based on a chemiluminescence reaction. *Biosensors and Bioelectronics*, 9, 189-195.
- [6] 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, 1380-1388.
- [7] Dinçkaya, E. 1999. Enzim sensörleri, ss 81-142. Telefoncu, A., ed. 1999. *Biyosensörler*, Ege Ün. Yayınları, İzmir, 280s.
- [8] Zhu, C., Yang, G., Li, H., Du, D., Lin, Y. 2014. Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and nanostructures. *Analytical Chemistry*, 87(1), 230-249.
- [9] Erden, P. E., Pekyardımcı, Ş., Kılıç, E. 2012. Amperometric enzyme electrodes for xanthine determination with different mediators. *Acta Chimica Slovenica*, 59, 824-832.
- [10] Devi, R., Yadav, S., Nehra, R., Yadav, S., Pundir, C. S. 2013. Electrochemical biosensor based on gold coated iron nanoparticles/chitosan composite bound xanthine oxidase for detection of xanthine in fish meat. *Journal of Food Engineering*, 115(2), 207-214.
- [11] Dervisevic, M., Custiuc, E., Çevik, E., Şenel, M. 2015. Construction of novel xanthine biosensor by using polymeric mediator/MWCNT nanocomposite layer for fish freshness detection. *Food Chemistry*, 181, 277-283.
- [12] 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.
- [13] Dalkiran, B., Kacar, C., Erden, P. E., Kilic, E. 2014. Amperometric xanthine biosensors based on chitosan-Co₃O₄-multiwall carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 200, 83-91.
- [14] 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.
- [15] Çevik, S. 2016. Xanthine biosensor based on XO/AuNP/PtNP/MWCNT hybrid nanocomposite modified GCPE. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 21(2), 314-320.
- [16] Devi, R., Yadav, S., 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*, 137(3), 754-759.
- [17] Anik, Ü., Çevik, S. 2009. Double-walled carbon nanotube based carbon paste electrode as xanthine biosensor. *Microchimica Acta*, 166(3-4), 209-213.
- [18] Kaçar, C., Dalkıran, B., Erden, P. E., Kılıç, E. 2014. An amperometric hydrogen peroxide biosensor based on Co_3O_4 nanoparticles and multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Applied Surface Science*, 311, 139-146.
- [19] Dalkıran, B., Erden, P. E., Kılıç, E. 2016. Electrochemical biosensing of galactose based on carbon materials: graphene versus multiwalled carbon nanotubes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(16), 4329-4339.
- [20] Hammond, J. L., Formisano, N., Estrela, P., Carrara, S., Tkac, J. 2016. Electrochemical biosensors and nanobiosensors. *Essays in Biochemistry*, 60, 69-80.
- [21] Zhu, N., Gao, H., Xu, Q., Lin, Y., Su, L., Mao, L. 2010. Sensitive impedimetric DNA biosensor with poly (amidoamine) dendrimer covalently attached onto carbon nanotube electronic transducers as the tether for surface confinement of probe DNA. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(6), 1498-1503.
- [22] Wang, J., Musameh, M., Lin, Y. 2003. Solubilization of carbon nanotubes by Nafion toward the preparation of amperometric biosensors. *Journal of the American Chemical Society*, 125(9), 2408-2409.
- [23] Tkac, J., Whittaker, J. W., Ruzgas, T. 2007. The use of single walled carbon nanotubes dispersed in a chitosan matrix for preparation of a galactose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(8), 1820-1824.
- [24] Erden, P. E., Kaçar, C., Öztürk, F., Kılıç, E. 2015. Amperometric uric acid biosensor based on poly (vinylferrocene)-gelatin-carboxylated multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Talanta*, 134, 488-495.
- [25] Periasamy, A. P., Chang, Y. J., Chen, S. M. 2011. Amperometric glucose sensor based on glucose oxidase immobilized on gelatin-multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry*, 80(2), 114-120.
- [26] Zheng, W., Zheng, Y. F. 2007. Gelatin-functionalized carbon nanotubes for the bioelectrochemistry of hemoglobin. *Electrochemistry Communications*, 9, 1619-1623.
- [27] Yang, N., Chen, X., Ren, T., Zhang, P., Yang, D. 2015. Carbon nanotube based biosensors. *Sensors and Actuators B*, 207, 690-715.
- [28] Fu, J., Pang, Z., Yang, J., Huang, F., Cai, Y., Wei, Q. 2015. Fabrication of polyaniline/carboxymethyl cellulose/cellulose nanofibrous mats and their biosensing application. *Applied Surface Science*, 349, 35-42.
- [29] Türkaslan, Ö., Kıralp Kayahan, S. and Toppare, L. 2009. A new amperometric cholestrol biosensor based on poly(3,4-ethylenedioxyppyrole). *Sensor and Actuators B*, 136, 484-488.
- [30] Devi, R., Yadav, S., 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*, 137, 754-759.
- [31] Devi, R., Batra, B., Lata, S., Yadav, S. and Pundir, C.S. 2013. A method for determination of xanthine in meat by amperometric biosensor based on silver nanoparticles/cysteine modified Au electrode. *Process Biochemistry*, 48(2), 242-249.
- [32] Liu, Y., Li, W., Wei, C., Lü, L. 2012. Preparation of a xanthine sensor based on the immobilization of xanthine oxidase on a chitosan modified electrode by cross-linking. *Chinese Journal of Chemistry*, 30, 1601-1604.
- [33] Zou, L., Li, Y., Cao, S. and Ye, B. 2014. A new voltammetric sensor for sensitive and selective determination of xanthine based on DNA and polyaniline composite Langmuir-Blodgett film. *Talanta*, 129, 346-351.
- [34] Amiri-Aref, M., Raoof, J.B. and 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*, 192, 634-641.
- [35] Liu, X., Ou, X., Lu, Q., Zhang, J., Chen, S., Wei, S. 2014. Electrochemical sensor based on overoxidized dopamine polymer and 3,4,9,10-perylenetetra-carboxylic acid for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric

acid, xanthine and hypoxanthine. RSC Advances, 4, 42632-42637.

- [36] 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.
- [37] Devi, R., Thakur, M., 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.