

Elektrokimyasal Biyosensörler için Karbon Pasta Elektrot Tasarımı ve Karakterizasyonu

İlker POLATOĞLU*¹

¹Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 45140, Manisa

(Alınış / Received: 10.01.2018, Kabul / Accepted: 30.04.2018, Online Yayınlanma / Published Online: 25.05.2018)

Anahtar Kelimeler

Elektrokimyasal biyosensör,
Karbon pasta elektrot,
3D yazıcı

Özet: Bu çalışmanın amacı grafit tozu ve parafin yağının karıştırılması ile elde edilen karbon pastanın, 3D yazıcıda bastırılan özel boyutlardaki ABS elektrot gövdesine yerleştirilmesi ve bu yapının iletken bir tel ile temas ettirilmesi sonucunda ucuz maliyetli karbon pasta çalışma elektrodunun (KPE) tasarlanmasıdır. Kitosan-altın nanotaneçik-tirozinaz enziminden (K-Gnp-T) oluşan biyokompozit film ile kaplanan elektrot yüzeyi elektrokimyasal yöntemlerle karakterize edilmiş ve geliştirilen biyosensörün (KPE*) analitik performansı fenolik bir bileşik olan kateşolün amperometrik tayini ile test edilmiştir. Ticari camı karbon elektrot (CKE) ve bu elektrot yüzeyinin K-Gnp-T biyokompozit filmle kaplanması ile geliştirilen biyosensör (CKE*) ayrıca karakterize edilmiş ve elde edilen tüm sonuçlar birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Ekonomik açıdan ticari elektrotlara göre çok daha ucuz bir maliyetle dizayn edilen KPE nin CKE ile benzer elektrokimyasal özellikler gösterdiği ve KPE*'nın 0.987 korelasyon katsayısı ile kateşolü yüksek hassasiyette (0.909 A/M) ve CKE*'ya göre daha geniş doğrusal aralıkta (0-100 µM) tespit ettiği bulunmuştur. Ayrıca tasarlanan elektrot bir platform niteliğinde olduğundan farklı birçok sayıda biyosensörün geliştirilmesine öncülük edebilecek potansiyele sahiptir.

The Design and Characterization of Carbon Paste Electrode for Electrochemical Biosensors

Keywords

Electrochemical biosensor,
Carbon paste electrode,
3D printer

Abstract: The aim of this study is to design the low cost carbon paste electrode (KPE) as a result of the placing the carbon paste obtained by mixing the graphite powder and paraffin oil into the ABS electrode body in special dimensions printed in 3D printer and contacting this structure with a conductive wire. The surface of the electrode coated with biocomposite film composed of chitosan-gold nanoparticle-tyrosinase enzyme (K-Gnp-T) was characterized by electrochemical methods and the analytical performance of the developed biosensor (KPE*) was tested by amperometric detection of catechol, a phenolic compound. The commercial glassy carbon electrode (CKE) and the biosensor (CKE*) developed by coating this electrode surface with a K-Gnp-T biocomposite film were also characterized and all of the results obtained were compared with each other. Economically, KPE, which is designed at a much cheaper than commercial electrodes, shows similar electrochemical characteristics to CKE, and KPE* detected the catechol at high sensitivity (0.909 A/M) with the correlation coefficient of 0.987 and wider linear range (0-100 µM) with respect to the CKE*. In addition, the designed electrode has the potential to lead in the development of many different biosensors due to being a platform.

1. Giriş

Hassas ve hızlı tayin özelliği bulunan biyosensörler, sensör sistemlerinin biyolojik maddeler ile kombinasyonu sonucu elde edilirler ve günümüzde

tıp, sanayi, savunma, gıda vb. birçok alanda analiz amaçlı kullanılmaktadırlar. Biyosensörler elektrokimyasal, kalorimetri, optik veya piezoelektrik esaslı olmak üzere 4 gruba ayrılır. Elektrokimyasal biyosensörler amperometrik veya potansiyometrik

ölçüme dayalı olabilir. Amperometrik biyosensörler potansiyometriklerle oranla daha hızlı ve hassas ölçüm sağladığı için tercih edilir [1-3]. Amperometrik sinyalin oluşumunu sağlayan algılayıcı kısım, elektrot yüzeyi üzerine kaplanmış bir biofilm tabakasıdır. En yaygın kullanılan elektrotlar karbon pasta elektrotlar, camı karbon elektrotlar, karbon nanotüpler, kompozit elektrotlar ve bizmut, altın, gümüş, platin gibi metal elektrotlardır [4, 5]. Altın, platin ve karbon, kimyasal ve mekanik olarak yüksek kararlılıkta olduklarından dolayı elektrot yapımında özellikle tercih edilirler [5, 6]. Karbon, geniş anodik potansiyel aralığı, düşük elektriksel direnç, düşük artık akım, tekrarlanabilir yüzey yapısı ve sulu ortamda hem indirgenme hem yükseltgenme bölgesinde geniş bir çalışma aralığı sağlama gibi özelliklerinden dolayı ideal bir elektrot malzemesidir [4].

Bir elektrotta olması gereken birçok özellik ticari camı karbon elektrotlarda bulunmaktadır. Fakat bunların pahalı olmaları alternatif karbon çalışma elektrotlarının geliştirilmesi ihtiyacını gündeme getirmektedir. İlgi çekici bir alternatif olan karbon pasta elektrotlar karbonun nujol gibi organik bir sıvı ile karıştırılması ve pasta haline getirilerek bir elektrot gövdesine doldurulup sıkıştırılmasıyla hazırlanır. Elektriksel bağlantı için ise iletken bir tel kullanılır [4].

Elektrot materyali olarak pek çok karbon türü kullanılmaktadır. En çok kullanılan türler; yüksek düzenlilikte pirolitik grafit (HOPG), tek kristalli grafit, gömme karbon, lif karbon, karbon siyahı, camı veya seramik karbon ve toz grafitir. Grafitlerin petek biçiminde altıgen karbon dizilimi içeren, levhaya benzer tabakalı bir yapısı vardır. Bu özellikleri sayesinde, farklı türler karbon levhaların arasına değişik şekillerde yerleştirilebilir. Grafitler anizotropiktir yani farklı yönlerde farklı özellik gösterirler. Örneğin levhanın paralel olduğu yerlerde elektriksel iletkenlik daha fazladır. Elektrotlarda çok kullanılan bir diğer karbon türü ise toz haline getirilmiş grafitir. Bunun nedeni grafit tozunun yüksek saflığa, düşük soğurma kapasitesine ve mikron boyutlarda partiküllere sahip olmasıdır. Karbon pasta elektrotun diğer önemli bileşeni ise pasta bağlayıcı sıvılardır. Bu sıvıların yüksek viskozite, hidrofilik, uçucu olmayan, organik çözücülere dayanıklı olan ve topaklanmaya engel olmayan bir sıvı olması gerekir. Ayrıca bu sıvılar elektroaktif ve inert özellikte olmalıdır. Bağlayıcı sıvı olarak mineral yağı veya parafin olarak da bilinen nujol ve uvasol gibi yağlar bu özelliklere sahip olmaları bakımından karbon pasta elektrotlarda yaygın olarak kullanılır. Nujolün yanında bağlayıcı sıvı olarak organofosfat sıvılar, elektrolitik sıvılar veya silikon yağı da kullanılabilir [4-6]. Elde edilen karbon pasta elektrotlar düşük omik dirence sahip olduklarından (yüksek iletkenlik) büyük sinyal oranı sağlarlar. Bağlayıcı sıvının suda çözünmeyen bir sıvı olması karbon pasta elektrotların lipofilik özelliğe

sahip olmalarını sağlamıştır. Dezavantaj olarak bu elektrotların heterojen bir yapıya sahip olmaları ve organik çözücülere karşı dayanıksız olmaları sayılabilir [4].

Katı elektrotlardan karmaşık modifikasyonlar ile elde edilen biyosensörlerin aksine, organik ve inorganik bileşiklerin tayini için kullanılan karbon pasta elektrotlar çalışmanın amacına uygun bir şekilde daha kolay modifiye edilebilmekte ve bozularak tekrar yapılabilmektedirler [7]. Bir elektrotu modifiye etmenin belli başlı sebepleri vardır. Bunlar, sıyırma analizi sırasında özderiştirme işlemini sağlamak, molekülleri pastaya immobilize ederek elektrot tepkimelerini gerçekleştirmek için ortam hazırlamak, katalitik etkiyi gerçekleştirmek ve elektrotların yüzey özelliklerini değiştirmektir. Karbon pasta elektrotların modifikasyonu farklı şekillerde olabilir. Elektrotlar modifiye edicinin elektrot yüzeyine adsorplanması veya yüzeye kovalent bağlanması, modifiye edici polimerin ince bir film şeklinde elektrot yüzeyine kaplanması ve çözünmeyen veya az çözünen modifiye edicinin karbon pasta gibi iletken bir matris içine katılması gibi metotlarla modifiye edilebilir. Modifikasyon malzemesi değişik şekillerde karışıma eklenebilir. Modifikasyon malzemesi direkt bağlayıcı sıvı içinde çözündürülebilir, grafit ve bağlayıcı sıvıdan oluşan karışıma eklenebilir, modifikasyon malzemesi, grafit ve bağlayıcı sıvı uygun bir çözücüde karıştırıldıktan sonra çözücü uzaklaştırılabilir son olarak da karbon pasta elektrot hazırlandıktan sonra modifikasyon malzemesi elektrot yüzeyine kaplanabilir [4].

Modifikasyon işlemi için kullanılan pek çok malzeme mevcuttur. Bunlar, kimyasal bileşikler ve analitik reaktifler, iyon değiştiriciler, kil mineralleri ve zeolitler, humik maddeler, silika ve silika içeren maddeler, biyolojik malzemeler ve nanopartiküller olabilir [4]. Nanopartikül modifiyeli karbon pasta elektrotların, kolay ve hızlı hazırlanması, düşük maliyetli olması, yapım ve yüzeylerinin yenilenmelerinin kolay ve zaman alıcı olmaması, birçok biyosensör materyalini aynı anda içerebilmesi, geniş bir potansiyel aralığına sahip olması ve zemin akımlarının oldukça düşük olması gibi avantajları sayesinde kullanımları son yıllarda önemli ölçüde artmıştır [2, 3]. Özellikle altın nanotaneçikler mükemmel elektrik iletkenliklerinden dolayı sensör bileşeni olarak dikkat çekmektedir [8].

Literatürde modifiye karbon pasta elektrotlar kullanılarak yapılan bazı çalışmalar mevcuttur. Hashemnia ve arkadaşları fenolik bileşik tayini için nafyon, mineral yağı ve toz grafit kullanılarak karbon nanotüp, sürfaktan ve tirozinaz enzimi ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot hazırlamışlardır. Sensörün kateşölü tespit etme sınırı 0.9 (μM), lineer aralığı 2.0–15.0 (μM), korelasyon katsayısı 0.991, K_M değeri 8.1 μM ve hassasiyeti 3.1 (A/M) olarak belirlenmiştir [9]. Vasjari ve Parroj'un çalışmasında

parafin, muz kabuğu ve grafit tozu karışımıyla hazırlanmış karbon pasta elektrot fenolik bileşik tayinine yönelik kullanılmış ve hassasiyet değeri 1.17 mA/ppm, korelasyon katsayısı 0.98 ve tespit sınırı 1.99 ppm olarak belirlenmiştir [10]. Milan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada toz karbon ve mineral yağı karışımı ile hazırlanan, tirozinaz enzimi ve nafyon ile modifiye edilmiş karbon pasta elektroda ait akım değerinin difenol konsantrasyonu ile doğrusal arttığı gözlemlenmiştir [11]. Silva ve arkadaşları $\text{Si}_4\text{Pic}^+\text{Cl}^-$ ve grafit tozu kullanılarak hazırlanmış, silsesquioxane polimer ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrodun kateşol içerisindeki elektrokimyasal ölçümlerinde 10-300 μM lineer aralık, 0.997 korelasyon katsayısı, 10 μM tespit etme sınırı belirlemişlerdir [12]. Apetrei ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada grafit tozu, karbon mikro küreler, karbon nanotüp ve mineral yağı kullanılarak hazırlanan karbon pasta elektrodun antioksidan tayini için kateşol içerisinde yapılan amperometrik ölçümleri sonucunda 0.0003 $\mu\text{A}/\text{mM}$ hassasiyet değeri, 0.95 korelasyon katsayısı, 5.47 μM tespit etme sınırı olarak belirlenmiştir [13]. Ivan ve arkadaşları fenolik bileşik tayini için tirozinaz enzimi ve bakır ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrodu hazırlamışlar ve kuinon oluşumuna dayalı amperometrik ölçümü sonucunda 5×10^{-8} M tespit etme sınırı gözlemlenmişlerdir [14]. Hanifah ve arkadaşları fenol tayini için tirozinaz enzimi tutturulmuş ve altın nano tanecikler ile zenginleştirilmiş membran filmler ile karbon pasta baskı elektrodu geliştirmişlerdir.

Yaygın olarak kullanılan karbon pasta elektrotlar cam, PVC, plastik şırınga ya da teflon çubuk gövdeleri kullanılarak hazırlanmaktadır [15]. Bu projenin amacı grafit tozları ile parafin yağı kullanılarak hazırlanan karbon pastanın, alışıl gelmiş elektrot gövdeleri yerine 3D yazıcıda özel olarak tasarlanan ABS elektrot gövdesine doldurulması ve bu şekilde karbon pasta çalışma elektrodu (KPE) elde edilmesidir. Bu elektrodun ve ticari olarak satılan camsı karbon elektrodun (CKE) üzerine kitosan-altın nanotaneçik-tirozinaz enziminden oluşan (K-Gnp-T) kompozit malzemenin kaplanması ve elektrokimyasal yöntem ile karakterize edilerek fenolik bir bileşik olan kateşol için analitik performanslarının karşılaştırılması çalışmanın diğer bir amacı ve katkısıdır.

2. Materyal ve Metod

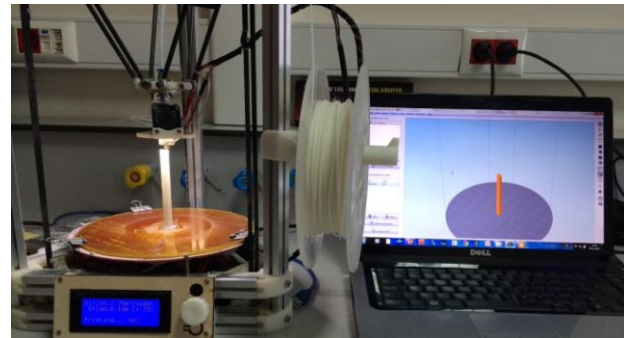
Mantar kaynaklı tirozinaz (T3824, 25KU/4.3mg), kateşol, kitosan, altın nanoparçacıklar (Gnp, 20 nm, 0.1mM fosfat tampon çözeltisi içinde süspansiyon halinde), grafit tozu (<20 mikron), potasyum nitrat (KNO_3) ve potasyum hegzasiyanoferrat (II) trihidrat ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Hidroklorik asit (HCl, %37), di-sodyum hidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ve sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) Merck

firmasından, parafin yağı Sial firmasından, akrilonitril bütadien stiren (ABS) Oo-kuma firmasından temin edilmiştir. Tüm çözeltiler ultra saf su (18.2 M Ω) kullanılarak hazırlanmıştır.

Elektrokimyasal ölçümler üçlü elektrot sistemine sahip (referans elektrot: Ag/AgCl, karşıt elektrot: Pt, çalışma elektrodu: ticari 5 mm camsı karbon elektrot "CKE" ve kendi tasarladığımız karbon pasta elektrodu "KPE") Autolab potantiostat/galvanostat cihazı ile elde edilmiştir. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ kullanılarak 50 mM pH:6.5 fosfat tampon çözeltisi (PBS) hazırlanmıştır. Daha sonra enzim stok çözeltisi (4.3 mg/mL) ve 2 mM stok kateşol çözeltisi, pH: 6.5 PBS de, kitosan destek malzemesi ise 0.1 M HCl içerisinde hazırlanmıştır. Gnp solüsyonu nanotaneçiklerin topaklanmasını engelleyecek yeterli sürede sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. 0.5 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ içeren 0.5 M KNO_3 çözeltisi ise 18 M Ω cm⁻¹ ultra saf su ile hazırlanmıştır.

2.1. Karbon pasta elektrodun hazırlanması

Ticari olarak satılan camsı karbon elektroda alternatif olarak üretilen karbon pasta elektrotların hazırlanmasındaki ilk aşama elektrot gövdesini hazırlamaktır. Bu amaç için elektrot gövdesinin teknik resmi "Solid Works" programı kullanılarak bilgisayar ortamında çizilmiş ve 3D yazıcıda ABS hammaddesi kullanılarak Şekil 1 de görüldüğü gibi basılmıştır. Elektrot gövdesi tasarlanırken istenilen sensör yüzey çapı 7 mm olarak tercih edilmiştir. Bu aşamada elektrot gövdesinin istenilen boyutlarda dizayn edilebilme avantajı olduğundan 3D yazıcı kullanılarak farklı tasarımlar ve dolayısı ile farklı biyosensörler geliştirmek mümkün olmaktadır. Projemizde ticari camsı karbon elektrot model olarak alınmış ve karşılaştırma imkânı sağlamak açısından tasarlanan karbon pasta elektrot gövdesinin mümkün olduğunca ticari camsı karbon elektroda eşdeğer olarak 3D yazıcıda basılmasına dikkat edilmiştir.



Şekil 1. "Solid Works" programı kullanılarak bilgisayar ortamında çizilmiş Karbon pasta elektrot gövdesinin 3D yazıcıda ABS hammaddesi kullanılarak basılması

Yazdırma işlemi bittikten sonra biyokimyasal reaksiyon sonucu elde edilen elektrokimyasal sinyallerin takibini sağlayacak bakır iletken bir tel karbon pasta elektrot gövdesinin içinden geçirilerek Şekil 2'de gösterilen yapı elde edilmiştir. Bu sayede

hazırlanacak grafit pasta ile potansiyostat/galvanostat cihazı arasında iletişim sağlanmıştır.



Şekil 2. Bakir iletken tel geçirilmiş karbon pasta elektrot gövdesi

Elektrodun diğer bir hazırlık aşaması gövdede bulunan boşluklu kısma grafit tozlarının pasta kıvamına getirilerek sıkı bir şekilde doldurulmasıdır. Bu amaç için 7/3 ağırlık oranında grafit tozu parafin yağı ile karıştırılmış ve elektrot gövdesi üzerindeki boşluklu kısma sıkıca doldurulmuştur. Son olarak elektrot yüzeyinin herhangi bir kâğıt üzerinde döndürülerek parlatılması sağlanmış ve tasarlanan karbon pasta elektrot (KPE) kullanıma hazır hale getirilmiştir (Şekil 3a). Ticari 5 mm camı karbon elektrot (CKE) yüzeyi ise etanol ve ultra saf su ile yıkandıktan sonra 0.05 µm alumina ile parlatılarak film oluşturmaya uygun bir hale getirilmiştir (Şekil 3b).



Şekil 3. (a) Tasarlanan elektrot "KPE" (b) ticari elektrot "CKE"

2.2. Elektrot yüzeylerinin biyokompozit film ile kaplanması

Hazırlanan stok çözeltilerden kitosan, altın nanotaneçik ve tirozinaz enzimi (K-Gnp-T) sırası ile 1/1/4 hacim oranında karıştırılarak KPE ve CKE üzerine 10 µl olacak şekilde damlatılmıştır. Elektrotlar 1 saat vakumlu etüvde 40 cm Hg basınçta ve 25°C sıcaklıkta kurumaya bırakılarak biyokompozit filmin yüzeye tutturulması sağlanmış ve daha sonra elektrotlar, yüzeyde tutunmayan enzimlerin uzaklaştırılması için 10 ml pH:6.5 PBS çözeltisi içinde 200 RPM de 30 dakika yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Bu sayede KPE ve CKE elektrotlarının biyokompozit film ile kaplanarak KPE* ve CKE* biyosensörleri geliştirilmiştir.

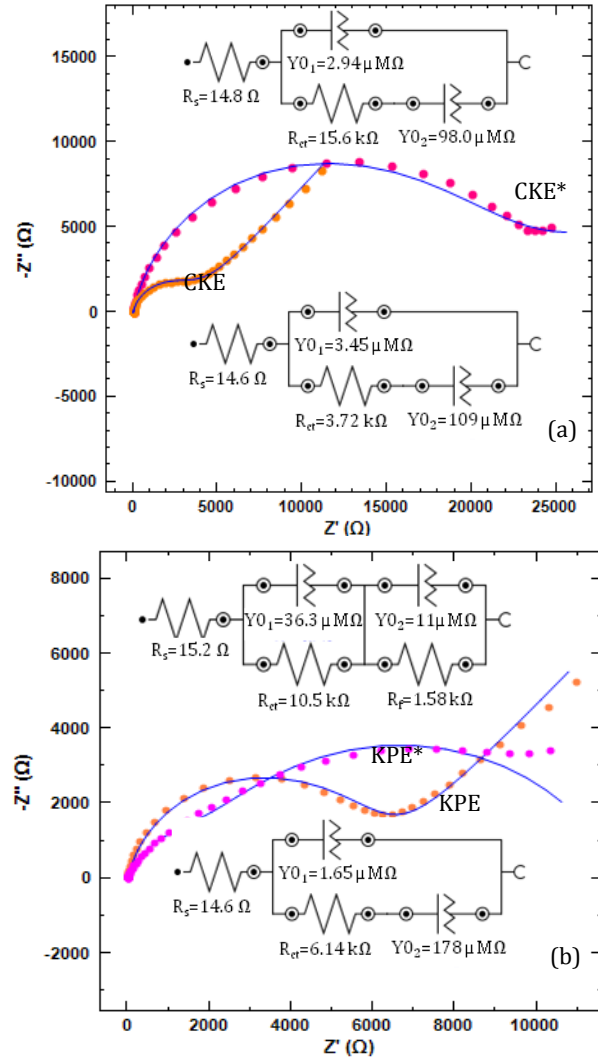
2.3. Tasarlanan biyosensörlerin elektrokimyasal karakterizasyonu

Bu amaca yönelik elektrokimyasal empedans spektroskopisi "EIS" ve döngüsel voltmetri "CV" metodu kullanılmıştır. Empedans ölçümleri 0,5 mM ($K_4[Fe(CN)_6]$) içeren 0,5 M KNO_3 çözeltisi içerisinde 10^5 -0.1 frekans aralığı ve 5 mV genlik değeri

kullanılarak alınmıştır. Döngüsel voltmetre çalışmaları 0.1 mM kateşol içeren ve içermeyen pH 6.5 PBS çözeltisinde ± 0.6 volt potansiyel aralığı, 0,01 v/s tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen biyosensörlerin (KPE* ve CKE*) optimum çalışma potansiyelleri 0.1 mM kateşol içeren ve içermeyen PBS çözeltisi içerisinde, ± 1 V potansiyel aralığı ve 0,01 v/s tarama hızında belirlenmiştir. Enzimatik sensörlerin fenolik bileşikler tayin etme kapasitesi, analitik performansı ve kinetik parametreleri 0.2-145 µM kateşol konsantrasyon değerleri aralığında kronoamperometrik metot ile test edildiği gibi tekrar kullanılabilirlikleri 10 µM kateşol çözeltisi ile belirlenmiştir

3. Bulgular

Elektrokimyasal biyosensörler geliştirilirken hazırlanan biyokompozit filmlerin arayüzey özellikleri hem ticari hem de tasarlanan karbon pasta elektrodu (KPE) için empedans spektroskopisi ile tayin edilmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. (a) CKE, CKE* ve (b) KPE, KPE* elektrotlarının 0,5 mM ($K_4[Fe(CN)_6]$) içeren 0,5 M KNO_3 çözeltisi içerisinde empedans ölçümleri (Frekans Aralığı: 10^5 -0.1, Genlik: 0,005 V)

Ara yüzeyde meydana gelen elektrokimyasal reaksiyonların kinetik açıdan değerlendirilmesini sağlayacak sayısal veriler elde etmek amacı ile Nyquist eğriler kullanılmıştır. Empedans ölçümleri alınarak Nyquist eğrileri çizdirilen bu filmler, kaplandıkları elektrotların elektrokimyasal davranışlarını değiştirmiştir. Bu durum filmlerin elektrot yüzeylerine başarılı bir şekilde kaplandığını göstermektedir. Şekilde görülen yarım dairelerin çapı elektrot yüzeyindeki elektron transfer kinetiğini kontrol eden elektron transfer dirençlerini temsil ettiğinden elektrokimyasal davranışın belirleyicisi olarak hesaplanmaktadır [16, 17]. CKE yüzeyine K-Gnp-T kaplandıktan sonra elde edilen biyosensöre ait (CKE*) eğri çapının arttığı ve bunun biyokompozit film içeriğinde bulunan düşük iletkenliğe sahip kitosan ve enzimden kaynaklandığı söylenebilir [18]. Aynı durum tasarlanan KPE elektrodu içinde gözlemlenmiştir. Her bir elektrot ve biyokompozit film kaplandıktan sonra geliştirilen biyosensörler için elde edilen eğriler, eşdeğer bir devre modeline uydurularak ara yüzey mekanizmaları hakkında daha detaylı bilgiler elde edilmiş ve sistemi temsil edebilecek en uygun eşdeğer elektriksel devre elemanları belirlenmiştir. Sensör bileşenleri ile kaplanan elektrotların impedans spektrumları, bilinen Randles devresi dışında sabit faz elemanını (CPE) devresi ile daha iyi uyum sağlayabilir. Çünkü impedans deneylerinde kapasitörler ideal davranmazlar. Diğer bir deyişle çift tabaka kapasitörü gerçek bir örnekte çift tabaka kapasitörünün ideal olmadığı sabit faz elemanı gibi davranır [19]. Kullanılan eşdeğer devre modellerinde R_s çözelti direncini, R_{ct} elektron transfer direncini, R_f film direncini, Y_{01} ve Y_{02} ise sabit faz elementini ifade etmektedir. Tablo 1 de özetlenen bu elektriksel parametrelere bakıldığında çözelti direnci tüm elektrotlar için birbirlerine yakın bulunmuştur. Ayrıca elektrot yüzeylerinin K-Gnp-T ile kaplanmasından sonra her iki elektrot içinde elektron transfer direncinde (R_{ct}) bariz bir artış (CKE için 3.72 k Ω dan 15.6 k Ω 'a, KPE için 6.14 k Ω dan 10.5 k Ω 'a) gözlemlenmiştir.

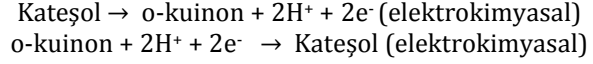
Tablo 1. CKE, CKE*, KPE ve KPE* ait elektriksel parametreler

Elektrot	R_s (Ω)	R_{ct} (k Ω)	Y_{01} ($\mu M\Omega$)	Y_{02} ($\mu M\Omega$)
CKE	14.6	3.72	3.45	109
CKE*	14.8	15.6	2.94	98.0
KPE	14.6	6.14	1.65	178
KPE*	15.2	10.5	36.3	11

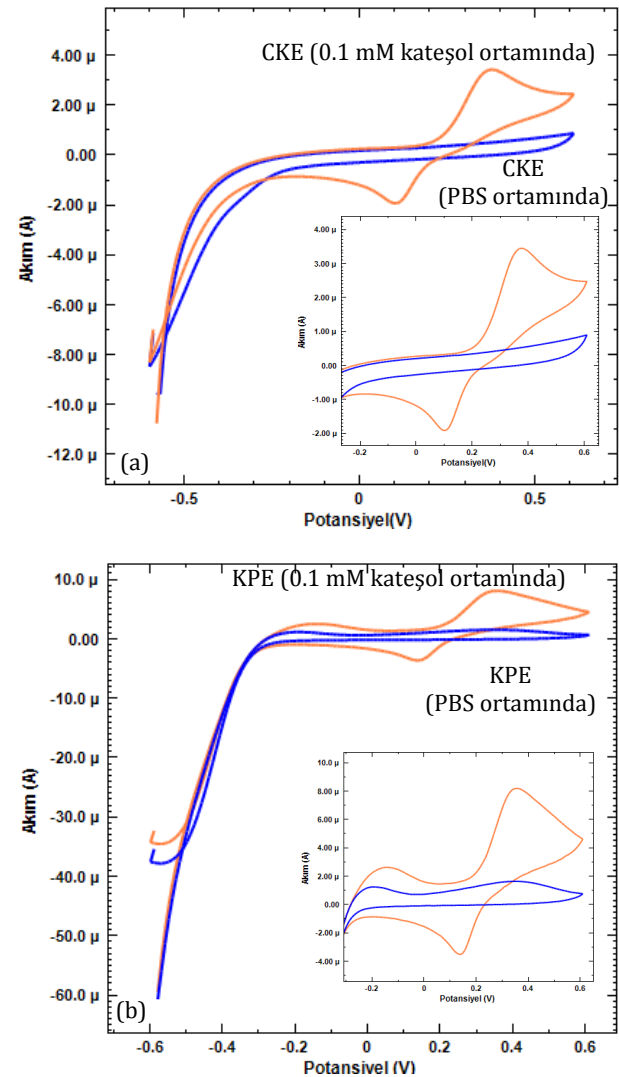
Şekil 5 CKE ve KPE elektrotlarının 0.1 mM kateşol içeren ve içermeyen PBS (pH: 6.5) içerisindeki tipik döngüsel voltamogramlarını göstermektedir. Ortamda yalnız PBS varken beklendiği gibi CKE elektroduna ait voltamogramda herhangi bir redoks piki görünmezken KPE elektrodu için tipik bir zemin çözelti davranışı ile oldukça küçük pikler

gözlemlenmiştir. Bunun nedeni karbon pasta çalışma elektrodu hazırlanırken elektrot yüzeyinde iz miktarda soğurulmuş oksijen kalması ve bundan dolayı az miktarda artık akımın oluşabilmesidir [20]. 0.1 mM kateşol ortamında ise reaksiyon ürünü olarak o-kuinon açığa çıkmaktadır ve çıkan ürün (o-kuinon) elektrokimyasal olarak tekrar kateşole indirgenmektedir [21].

Mekanizma 1: (EE: elektrokimyasal elektrokimyasal mekanizma)



Her iki elektrotta da aynı mekanizmanın gerçekleşmesi KPE elektrodunun ticari elektrot (CKE) performansında tasarlandığının bir göstergesidir.

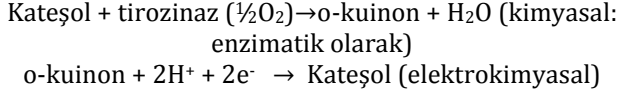


Şekil 5. (a) CKE ve (b) KPE elektrotlarının 0.1 mM kateşol içeren ve içermeyen PBS (pH: 6.5) içerisindeki döngüsel voltamogramları (Potansiyel: ± 0.6 V, Tarama Hızı: 0.01 v/s)

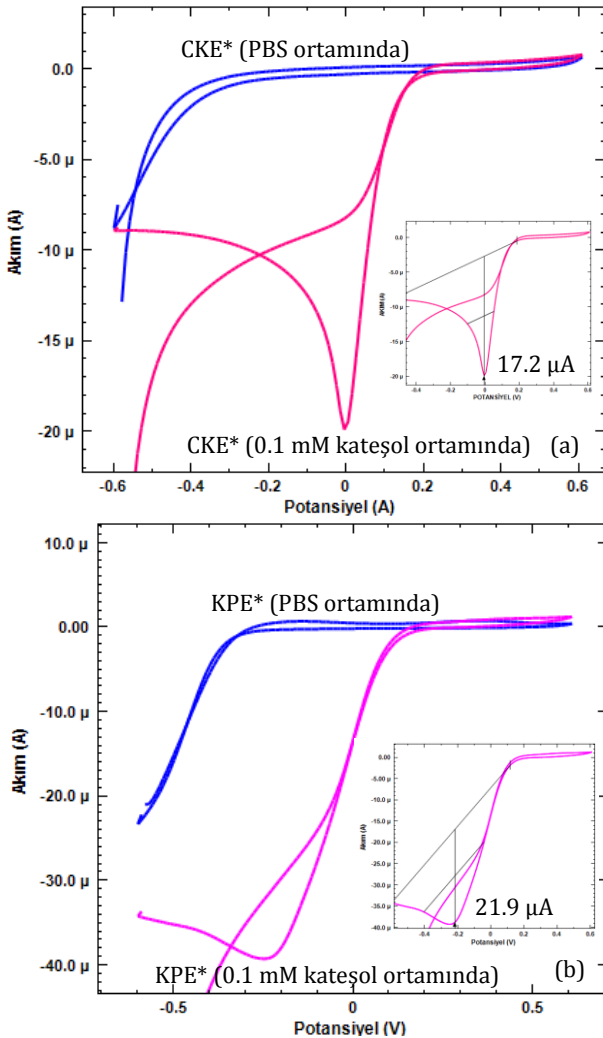
Elektrot yüzeylerine K-Gnp-T bağlanması ile CE mekanizması (Kimyasal elektrokimyasal) devreye girmektedir (Şekil 6). Beklendiği gibi elektrotlar PBS çözeltisinde herhangi bir indirgenme yükseltgenme

piki vermezken 0.1 mM kateşol içerisinde yapıya enzim tutturulduğundan dolayı belirgin indirgenme pikleri vermektedirler. Kateşol artık enzimatik yolla o-kuinon ürününe dönüşmekte ve oluşan o-kuinonlar elektrokimyasal olarak tekrar kateşole indirgenmektedir. (CE mekanizması) [22-24].

Mekanizma 2: (CE)



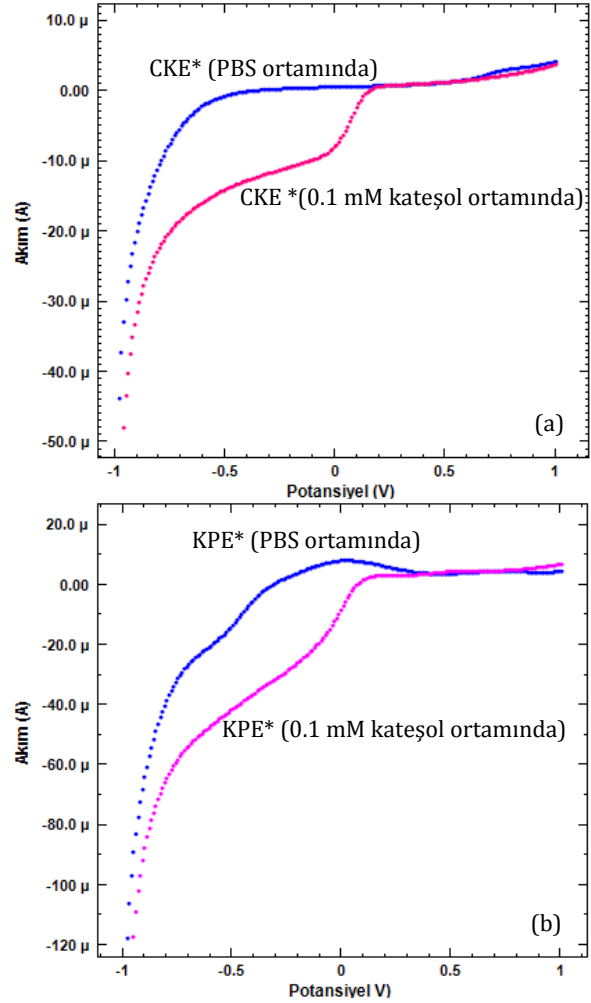
İndirgenme pikleri karşılaştırıldığında CKE* için 17.2 μA , KPE* için 21.9 μA akım farkının olması KPE* biyosensörünün ideal bir şekilde tasarlandığını ve enzimin yapıya sıkı bir şekilde tutturulduğunu göstermektedir. Bu çalışmada fenolik bileşik olarak seçilen kateşol amperometrik yöntem kullanılarak tayin edilmiş ve bu amaca yönelik optimum çalışma potansiyeli belirlenmiştir.



Şekil 6. (a) CKE* ve (b) KPE* biyosensörlerinin 0.1 mM kateşol içeren ve içermeyen PBS çözeltisindeki döngüsel voltamogramları (Potansiyel: ± 0.6 V, Tarama Hızı: 0.01 v/s)

Şekil 7 çalışma potansiyelinin (Potansiyel aralık: ± 1 V, Tarama Hızı: 0.01 v/s) pH 6.5, 0.1 mM kateşol içeren ve içermeyen PBS çözeltisindeki KPE* ve CKE* biyosensörlerine ait amperometrik yanıtları üzerine

olan etkisini göstermektedir. Geliştirilen bu sensörlerin kateşolu tayin etme performansları amperometrik yöntemle tayin edilirken uygun bir potansiyel değeri seçilmesi gereklidir. Bu değer kateşol varlığında ve yokluğunda elde edilen potansiyel farkların en yüksek olduğu değerdir [25]. Her iki biyosensör için -0.1 V ile -0.7 V potansiyel aralıklarında yüksek potansiyel farkların elde edilmesi kronoamperometrik çalışma için çok geniş bir seçenek aralığı sunarak bu aralıktaki herhangi bir potansiyelde çalışabilme rahatlığı vermekte ve bu durum KPE* biyosensörünün ticari olanla aynı performansı gösterdiğini kanıtlamaktadır.

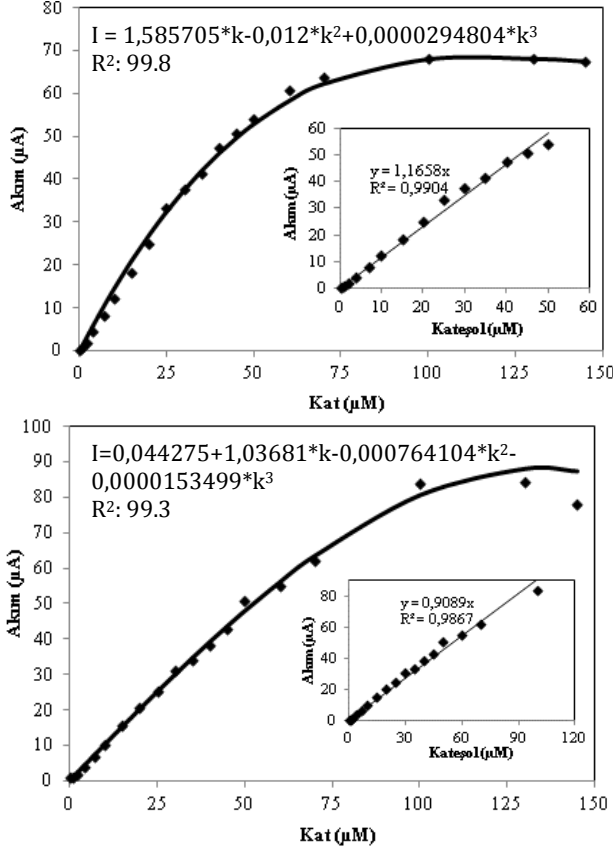


Şekil 7. Çalışma potansiyelinin 0.1 mM kateşol içeren ve içermeyen PBS çözeltisindeki (a) CKE* ve (b) KPE* sensörü amperometrik yanıtları üzerine etkisi

Geliştirilen sensörlerin (CKE* ve KPE*) kateşolu tayin etme performansları amperometrik yöntemle 0.2-145 μM kateşol konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Akım zaman grafiklerinden elde edilen değerler ile Şekil 8 de gösterilen kateşole ait kalibrasyon eğrileri elde edilmiş ve ayrıca deneysel dataların nonlineer regresyon metodu ile elde edilen model denkleğine uydurulması ile de kinetik parametreler de (K_m , I_m) hesaplanmıştır.

Her iki sensör için yüksek korelasyon katsayısında geniş birer doğrusal aralık (CKE*: 0-50 μM , KPE*: 0-

100 μM) elde edilmiştir. Tasarlanan biyosensörün (KPE*) kateşol tayininde daha geniş bir doğrusal aralığa sahip olması dikkat çekmektedir (Tablo 2). Ticari çalışma elektrodu ile elde edilen biyosensörün hassasiyeti (1.166 A/M) bu çalışmada tasarlanan elektrot ile elde edilen biyosensöründen (0.909 A/M) biraz daha yüksek olsa bile I_m değeri tasarlanan elektrot için çok daha yüksek çıkmıştır.



Şekil 8. (a) CKE* ve (b) KPE* sensörleri kullanılarak elde edilen kateşole ait kalibrasyon grafikleri

Ayrıca CKE* biyosensörü %3.1 standart sapma ile 10 kez arka arkaya kullanılabilirken KPE* biyosensörünün %5.3 standart sapma ile 20 kez arka arkaya kullanılabilir olması tekrarlanabilir ölçümlerin alındığı bir biyosensörün tasarlandığını göstermektedir.

Tablo 2. KPE* ve CKE* biyosensörlerinin kateşolü tayin etme performansları

Parametre	CKE*	KPE*
Doğrusal aralık (μM)	0-50	0-100
Korelasyon Katsayısı	0.990	0.987
Hassasiyet (A/M)	1.166	0.909
K_m (μM)	26.6	45.5
I_m (μA)	68.5	88.3

4. Tartışma ve Sonuç

Projemizde kullanılan elektrot gövdesi ABS ile istenilen şekilde tasarlanarak ideal bir karbon pasta elektrot hazırlanmış (KPE) ve bu çalışma elektrodu fenolik bir bileşik olan kateşolün tayin edilmesi için altın nanoparçacıklar ile zenginleştirilmiş

elektrokimyasal bir enzim sensör olarak geliştirilmiştir (KPE*). Tasarlanan ve geliştirilen bu elektrot EIS, CV ve amperometrik yöntemlerle karakterize edilmiş ve elde edilen sonuçlar ticari camsi karbon elektrot (CKE) ile geliştirilen enzim sensöründen (CKE*) elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Hazırlanan nanobiyokompozit filmlerin (K-Gnp-T) her iki elektrot yüzeyine tutunduğu yapılan karakterizasyon işlemlerinden anlaşıldığı gibi tasarlanan biyosensörlerin ticari olanlara elektrokimyasal olarak benzer özellikler gösterdiği ve fenol tayini için çok iyi analitik performans sergilediği sonucuna varılmıştır. KPE* dan elde edilen sonuçlar CKE* ile benzer çıkmış ve KPE*, yüksek hassasiyette ve hatta daha geniş bir aralıkta kateşol konsantrasyonlarını tespit edebilmiştir. Amaca uygun bir şekilde modifiye edilebilir özelliğine sahip olan KPE, ticari camsi karbon elektrotlara (CKE) göre (yaklaşık fiyat:3500-5000 TL) çok daha uygun bir maliyetle (Yaklaşık 5 TL) imal edilebilmiş ve bu sayede ekonomik anlamda önemli bir avantaj sağlanmıştır. Tasarlanan elektrot bir platform gibi tasarlandığından farklı dolgu malzemelerinin de (sadece karbon pasta yerine platinyum, altın, ya da farklı nanotaniciklerle zenginleştirilmiş karbon pasta içerikleri) kullanımı ile farklı enzim sensörlerinin geliştirilmesine öncülük edebilecek bir vizyona sahiptir.

Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK projesi (Proje No: 114Z417) ve Celal Bayar Üniversitesi BAP projesi (Proje No: 2016-102) tarafından desteklenmiştir

Kaynakça

- [1] Grieshaber, D., Mackenzie, R., Vörös, J., Reimhult, E. 2008. Electrochemical Biosensors, Sensor Principles and Architectures. Sensors, 8, 1400-1458.
- [2] Kökbaş, U., Kayrın, L., Tuli, A. 2013. Biyosensörler ve Tıpta Kullanım Alanları, Arşiv Kaynak Toplama Dergisi, 22(4), 499-513.
- [3] Yambin, L. 2006. Handbook of Agricultural Engineering: Information Technology, American Society of Agricultural Engineers, Wisconsin.
- [4] Erdem, C. 2012. Glukoz Tayini için Nikel Oksit Modifiye Karbon Pasta Elektrotların Hazırlanması. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- [5] Yalvaş, A. 2014. Karbon Pasta Elektrotların Bitki Dokuları ile Modifikasyonu ve Elektrokataliz Özelliklerinin İncelenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- [6] İnce, A. 2008. Elektrotların Yüzey Modifikasyonu ve Karakterizasyonu, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya.

- [7] Kalcher, K., Švancara, I., Metelka, R., Vytřas, K., Walcarius, A. 2006. Heterogeneous Carbon Electrochemical Sensors. In *Encyclopedia of Sensors*, American Scientific Publishers, 4, 283-429.
- [8] Feng, D., Wang, F., Chen, Z. 2009. Electrochemical glucose sensor based on one-step construction of gold nanoparticle-chitosan composite film. *Sensors and Actuators B*, 138, 539-544.
- [9] Hashemnia, S., Khayatzadeh, S., Hashemnia, M. 2012. Electrochemical Detection of Phenolic Compounds Using Composite Film of Multiwall Carbon Nanotube/Surfactant/ Tyrosinase on a Carbon Paste Electrode. *J Solid State Electrochem.*, 16, 473-479.
- [10] Vasjari, M., Parroj, N. 2012. Phenolic Biosensor Based On Carbon Paste Electrode Modified with Crude Tissue. University of Tirana, Department of Chemistry Faculty of Natural Sciences.
- [11] Šýs, M., Metelka, R., Vytřas, K. 2013. On the Performance of Amperometric Tyrosinase Carbon Paste Biosensor in the Presence of Catechol, Resorcinol, or Hydroquinone. *Sensing in Electroanalysis*, 8, 253-263.
- [12] Silva, P., Gasparini, B.C., Magosso, H.A., Spinelli, A. 2013. Electrochemical Behavior of Hydroquinone and Catechol at a Silsesquioxane-Modified Carbon Paste Electrode. *Chem. Soc.*, 24(4), 695-699.
- [13] Apetrei, C., Apetrei, I., Saja, J.A., Rodriguez-Mendez, M.L. 2011. Article Carbon Paste Electrodes Made from Different Carbonaceous Materials: Application in the Study of Antioxidants. *Sensors*, 11, 1328-1344.
- [14] Švancara, I., Vytřas, K., Barek, J., Zima, J. 2001. Carbon Paste Electrodes in Modern Electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31(4), 311-345.
- [15] Martinez, R., Teresa Ramirez, M., Gonzalez, I. 1998. Voltammetric Characterization of Carbon Paste Electrodes with a Nonconducting Binder. Part I: Evidence of the Influence of Electroactive Species Dissolution into the Paste on the Voltammetric Response. *Electroanalysis*, 10, 336.
- [16] Lu, B.W., Chen, W.C. 2006. A disposable glucose biosensor based on drop-coating of screen-printed carbon electrodes with magnetic nanoparticles. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 304(1), 400-402.
- [17] Zia, A.I., Syaifudin, A.M., Mukhopadhyay, S.C., Yu, P.L., Al-Bahadly, I.H., Gooneratne, C.P., Liao, T.S. 2013. Electrochemical impedance spectroscopy based MEMS sensors for phthalates detection in water and juices. In *Journal of Physics: Conference Series*, 439.
- [18] Yu, C., Gou, L., Zhou, X., Bao, N., Gu, H. 2011. Chitosan-Fe₃O₄ nanocomposite based electrochemical sensors for the determination of bisphenol A. *Electrochimica Acta*, 56(25), 9056-9063.
- [19] Demir, M.A. 2008. Platin elektrotun p-aminobenzoik asit ile modifikasyonu ve kararlılığının belirlenmesi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- [20] Tural, H., Gökçel, H.Ğ., Ertaç, F.N. 2003. Enstrümental Analiz 1 Elektroanalitik Yöntemler, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir, 132-144.
- [21] Kim, E., Liu, Y., Shi, X.W., Yang, X., Bentley, W.E., Payne, G.F. 2010. Biomimetic Approach to Confer Redox Activity to Thin Chitosan Films. *Adv. Funct. Mater.*, 20, 2683-2694.
- [22] Chen, L., Gu, B., Zhu, G., Wu, Y., Liu, S., Xu, C. 2006. Electron transfer properties and electrocatalytic behavior of tyrosinase on ZnO nanorod. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 617, 7-13.
- [23] Abdullah, J., Ahmad, M., Karuppiyah, N., Henga, L.Y., Sidek, H. 2006. Immobilization of tyrosinase in chitosan film for an optical detection of phenol. *Sensors and Actuators B*, 114, 604-609.
- [24] Wanga, S. Tana, Y., Zhao, D., Liub, G. 2008. Amperometric tyrosinase biosensor based on Fe₃O₄ nanoparticles-chitosan nanocomposite. *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 1781-1787.
- [25] Wang, S., Tan, Y., Zhao, D., Liu, G. 2008. Amperometric tyrosinase biosensor based on Fe₃O₄ nanoparticles-chitosan nanocomposite. *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 1781-1787.