



O₂ ve H₂O₂ Ölçümlerinde Kullanım Amaçlı Ultra-Küçük Karbon Fiber Elektrot Probların Üretimi

Fabrication of Ultramicro Carbon Fiber Electrode Probes for Detection of O₂ and H₂O₂

Mustafa ŞEN

Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, İzmir, Türkiye
mustafa.sen@ikc.edu.tr

Özetçe— Karbon fiber elektrotlar (KFE) dopamin gibi nörotransmitterlerin salınımını elektrokimyasal analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, bu tip elektrotların uygun enzimlerle modifikasyonu lokal analiz yapabilen biyosensörlerin geliştirilmesine de olarak vermektedir. KFE'ler çeşitli şekillerde üretilmekle birlikte bu çalışmada cam kılcalların karbon fiberlere geçirilmesi şeklinde bu probların üretimi gerçekleştirilmiştir. Daha sonrasında elektrot yüzeyleri platin nanopartikülleri ile elektrokimyasal olarak modifiye edilerek bu elektrotların oksijen ve H₂O₂ deteksiyonunda etkinliği araştırılmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda bu elektrotların gerekli enzimlerle modifikasyonu ve sonrasında lokal ATP deteksiyonunda kullanımı planlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler — Karbon fiber elektrot; H₂O₂; Biyosensör; Elektrokimyasal Analiz

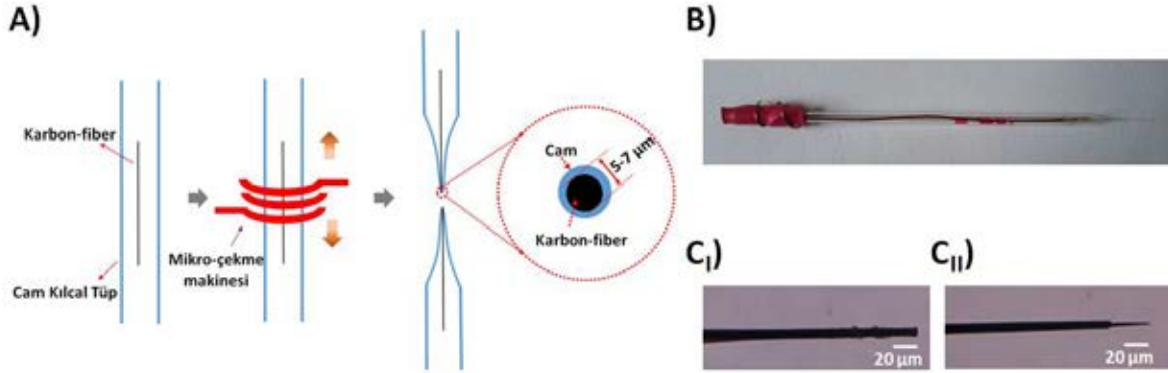
Abstract— Carbon fiber electrodes (CFEs) are commonly used in detection of neurotransmitters like dopamine. Besides, modification of these electrodes with enzymes enables development of biosensors capable of local analysis. Here, CFEs were fabricated using glass capillary tubes. Basically carbon fibers were inserted into glass capillary tubes and then the tubes were pulled using a micro-puller to insulate carbon fibers. Subsequently, the electrode surface was modified with Pt nanoparticles to evaluate the potential of these electrodes in detection of O₂ and H₂O₂. In the future, these electrodes will be used for construction of biosensors for detection of local ATP.

Keywords — Carbon fiber electrode; H₂O₂; Biosensor; Electrochemical analysis.

I. GİRİŞ

Genel olarak biyosensörler biyolojik deteksiyon ünitesi olarak enzim, antikor, mikroorganizma, hücre ve hatta bazen doku içeren, fizyolojik olarak önemli hedef molekülleri arzu edilen hassasiyette algılayarak sayısal

veriye çevirebilen analitik cihazlardır. Bu tip cihazlar tasarımı tamamen araştırmacıya özgün olmakla beraber daha çok mikro-çip veya prob şeklinde dizayn edilirler. Son yıllarda araştırmalar yüksek hassasiyete sahip, daha etkili ve ucuz biyosensör yapımına yoğunlaşmıştır. Deteksiyonda kullanılan metot optik, mekanik veya elektrokimyasal olabilir. Şu ana kadar geliştirilen biyosensörlerin çoğu optik temelli olmasına rağmen bu tekniğin hedef olmayan moleküllerden kaynaklı sönme ve ışımaya bağlı dalgalanmalar, hedef molekülü belli bir belirteç (label) ile işaretleme gereksinimi, kullanılan solüsyonun yoğunluğuna veya bulanıklığına bağlı koruma etkisinin analizi etkilemesi ve hassasiyeti düşürmesi gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır^{1,2}. Ayrıca, optik deteksiyonda kullanılan cihazların büyük ve ağır olması bu cihazların pratik kullanımı sınırlamaktadır. Alternatif bir metot olarak elektrokimyasal deteksiyon biyosensörlerde kullanılmaktadır. Genel olarak elektrokimyasal metotlar hızlı cevap verebilme, ucuz üretim, kullanımının basit ve kolay olması, biyosensör üretimi için üretimlerinin mikro olarak uygunluğu ve sinyal dönüşümü için pahalı ekipmanlara gereksinim olmaması gibi nedenlerden dolayı optiksel metotlara nazaran daha avantajlı oldukları düşünülmektedir³⁻⁵. Basit bir elektrot kullanılarak hücrelerin oksijen tüketimi, salınan bazı proteinlerin aktivitesi veya hücre proteinlerinin analizi kolayca yapılabilmektedir. Gelişen teknolojinin ultra küçük ve nano düzeyde elektrotların üretimine imkân vermesi bu elektrotların mikro ve nano seviyede analizlerde kullanımını olanaklı hale getirmiştir. Mikro veya nanoelektrotlar milimetre boyutundaki elektrotlardan farklı olarak düşük ohmik potansiyel düşmesi, düşük ara yüz şarj akımı ve yüksek molekül transportu gibi deteksiyonu olumlu yönde etkileyip hassasiyeti arttıran özelliklere sahiptir^{6,7}. Ek olarak bu küçük boyuttaki elektrotlar küçük hacimli ortamlarda analizi mümkün kılmaktadır.



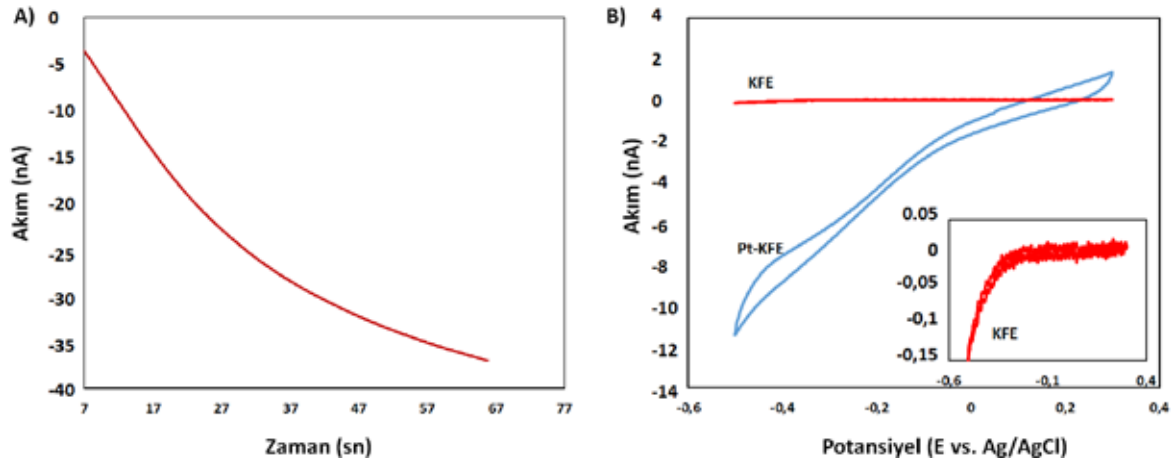
Şekil 1. Karbon fiber elektrot (KFE) prob (A). Disk (B_i) ve (B_{ii}) silindirik uçlu KFE.

Karbon fiber elektrotların (KFE) boyutlarının çok küçük olması mikro ve nano problemlerin üretimini olanaklı hale getirmekte ve bu da belli avantajlar sağlamaktadır; örneğin, bu elektrotların tek hücre gibi küçük hacimli ortamlarda kullanımı ve canlı doku analizlerinde kullanılan diğer problemlere nazaran (örneğin mikrodializ problemleri) çok daha az zarar vermesi gibi. Ek olarak küçük yüzey modifikasyonları ile bu problemlerle mükemmel hassasiyete ve seçiciliğe kolayca ulaşılabilmektedir. Bu çalışma kapsamında cam kılcal tüplerin karbon fiberlere geçirilmesi şeklinde KFE problemlerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Daha sonrasında bu problemlerin elektrot yüzeyleri platin nanopartikülleri ile modifiye edilerek bu problemlerin oksijen ve hidrojen peroksit deteksiyonunda etkinlikleri analiz edilmiştir.

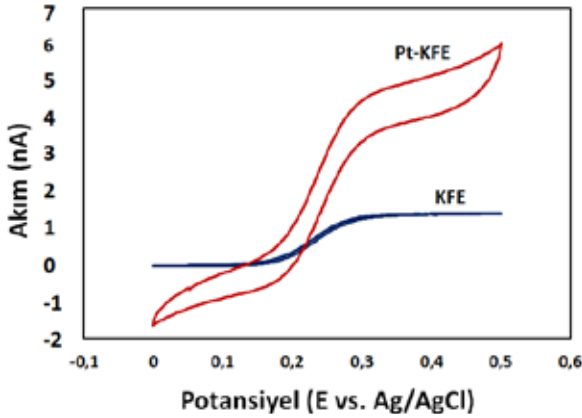
II. YÖNTEM VE SONUÇLAR

KFE'ler çeşitli şekillerde üretilmekle birlikte bu çalışmada cam kılcallarının karbon fiberlere geçirilmesi şeklinde üretimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 1A). İlk olarak karbon

fiberlerin cam kılcal tüplere geçirilmesi ve daha sonrasında karbon fiber elektrotların elektrokimyasal sisteme (potentiyostat) bağlanmasında kolaylık sağlaması gibi nedenlerden dolayı karbon fiberler sadece uç kısımları açılmış bakır tellere bağlanmıştır. Bağlama işlemi için karbon fiberler ve bakır teller gümüş (Ag) pastası kullanılarak bir birlerine tutunması sağlanmış ve daha sonrasında gümüş pastasının 180 °C derecede pişirilerek katılaşması şeklinde bağlantı kalıcı hale getirilmiştir. Bakır tellere bağlanan karbon fiberler cam kılcal tüplerine sabitlendikleri bakır teller yardımıyla tersten yerleştirilmiş ve sonraki işlemlerde karbon fiberlerin herhangi bir zarar görmemesi için bakır teller cam tüplerin üzerine ısı ile daralan makaron ile sabitlenmiştir (Şekil 1B). Bir sonraki işlemden cam kılcal tüpler karbon fiberlere mikçekme yöntemiyle geçirilerek Pt-KFE'ler üretilmiştir. Geçirme işlemi için mikçekme 'PC-10 puller' makinesi kullanılmış ve bu noktada çekme işleminin istenilen şekilde gerçekleşmesi için çekme parametreleri optimize edilmiştir (kullanılan parametreler: seçenek 1 (option 1; makinede var olan bir seçenek) ve 65 °C). Prob üretiminin son kısmında



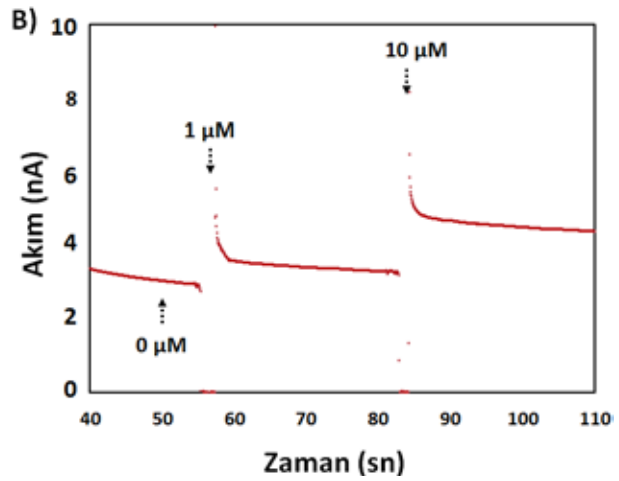
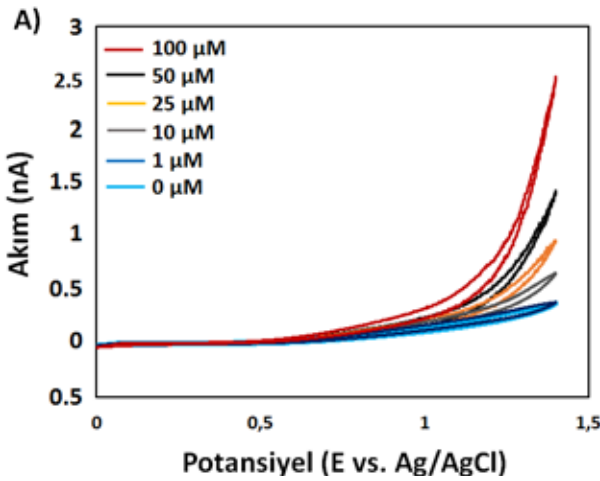
Şekil 2. Pt-KFE'lerin platin nanopartikülleri ile modifikasyonu (A) ve bu elektrotların oksijen redüklemeye potansiyelinin PBS solüsyonunda KFE'ler ile karşılaştırılması (B).



Şekil 3. Platin ile modifiye edilmiş ve normal KFE'lerin dönüşümlü voltametri grafikleri

mikro öğütücü (microgrinder) adı verilen cihaz yardımıyla problemlerin ucu zımparalanarak prob ucunda disk elektrotun üretimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1C_I). Bu çalışma kapsamında önerilen ve geliştirilen üretim yöntemiyle elektrokimyasal davranışı sayısal (quantitative) olarak analiz edilebilen Pt-KFE'ler kolaylıkla üretilebilmektedir. Üretilen Pt-KFE'lerin zımparalama işlemi sonrası resimleri optik mikroskop kullanılarak çekilmiştir. Çekilen resimlerden anlaşılacağı gibi prob ucu tamamen düzlenmiş ve böylece disk elektrotun üretimi başarıyla gerçekleştirilmiştir (Şekil 1C_I). Ayrıca bu noktada mikro öğütücü makinesi kullanılmadan "microforge" adı verilen diğer bir makineyle çeşitli büyüklüklerde silindirik uçlu KFE'lerin de üretimi mümkündür (Şekil 1C_{II}). Daha sonrasında disk elektrot içeren Pt-KFE'lerin elektrokimyasal davranışı elektroaktif FMA (ferrocenemethanol) içeren PBS çözeltisi ile analiz edilmiştir. Bu analiz için 1 mM FMA içeren PBS çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözelti içerisinde üretilen Pt-KFE'lerin potansiyostat ile dönüşümlü voltammogramları

(CV) elde edilmiştir (Metrohm, Autolab PGSTAT204). Bu noktada çalışma elektrotunun potansiyeli 0 ile +0.5 V (vs Ag/AgCl) arasında 50 mV/s hızında taranarak akım ölçümü yapılmıştır. Ölçülen maksimum akımın 1.5 nA seviyesinde olduğu gözlemlenmiş ve akım seviyesinin teorik olarak hesaplanan akıma yakın olduğu saptanmıştır. Teorik maksimum akım hesaplamada mikro disk için "I = 4nFDCr" formülü kullanılmıştır (I: akım; n: elektron sayısı ($n_{K_3Fe(III)(CN)_6} = 1$); F: Faraday sabiti (96485,329 s A/mol); D: Difüzyon sabiti ($D_{K_3Fe(III)(CN)_6} = 6,7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$); C: Analit konsantrasyonu ($C_{K_3Fe(III)(CN)_6} = 0,5 \text{ mM}$); r: elektrot yarıçapı ($r = 40 \mu\text{m}$)). Bu bulgular ışığında üretilen karbon fiber mikro elektrotların sayısal algılamada kullanımının uygun olduğu kanısına varılmıştır. Bir sonraki aşamada üretilen Pt-KFE'lerin yüzeyleri platin nanopartiküller ile elektrokimyasal olarak modifiye edilmiştir. Elektrokimyasal modifikasyon için kronoamperometri kullanılmıştır. İşlem boyunca Pt-KFE'nin potansiyeli 0 V'ta (vs. Ag/AgCl) yaklaşık 70 sn. boyunca sabit tutulmuştur. Şekil 2A'den anlaşılacağı gibi akım beklediği gibi modifikasyon işlemi boyunca düşme eğilimi göstermiştir. Daha sonra modifiye edilmiş Pt-KFE'lerin oksijen redüklemeye potansiyeli normal Pt-KFE'ler ile karşılaştırılarak modifikasyon işleminin başarıyla gerçekleşip gerçekleşmediği belirlenmiştir. Bilindiği üzere platin oksijenin indirgenmesinde yüksek katalitik aktiviteye sahiptir. Oksijenin elektrokimyasal indirgenmesinde dönüşümlü voltametri kullanılmış ve bu işlem boyunca çalışma elektrotunun (karbon fiber ve platin ile modifiye edilmiş karbon fiber elektrotlar) potansiyeli +0.4 V ile -0.6 V'a (vs. Ag/AgCl) taranarak akım ölçümü yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarda platin ile modifiye edilmiş elektrotlardan elde edilen akımın karbon fiber elektrotlarla elde edilen akımdan çok daha yüksek olduğu gözlemlenmiş ve bu da yüzeyin platin nanopartikülleri ile modifikasyonunun başarı ile gerçekleştiğini göstermiştir



Şekil 4. Pt-KFE ile elektrokimyasal hidrojen peroksit deteksiyonu için dönüşümlü voltametri kullanılmıştır (0, 1, 10, 25, 50 ve 100 μM)(A). Bu elektrotların ölçebileceği en küçük konsantrasyon seviyesi kronoamperometri ile belirlenmiştir (B).



Biyoinformatik - Biyoistatistik - 1

2. Gün / 28 Ekim 2016, Cuma

(Şekil 4.2B). Ayrıca platin modifikasyonunun yüzeyi ve yüzey alanını nasıl değiştirdiğini göstermesi açısından bu modifiye elektrotların FMA solüsyonunda dönüşümlü voltamogramları elde edilmiş ve KFE'lerin dönüşümlü voltamogramları ile karşılaştırılmıştır. Şekil 3'te görüleceği gibi modifikasyon sonucunda elektrottan elde edilen akım normal karbon fibere göre artmıştır. Bu da modifikasyonun elektrot yüzey alanını artırdığını göstermektedir. Elektrot yüzey alanının artması bu gibi elektrotlarda hassasiyete olumlu yönde katkı yapmaktadır. Bu iş paketinin en son kısmında bu modifiye edilmiş elektrotlarla hidrojen peroksit (H_2O_2) deteksiyonu yapılarak bu elektrotların ölçebileceği en düşük konsantrasyon belirlenmiştir. Bu noktada Pt-KFE'ler ile farklı konsantrasyon seviyesinde H_2O_2 için dönüşümlü voltametri grafikleri elde edilmiştir. Dönüşümlü voltamogram eldesinde modifiye elektrotların potansiyeli 0 V ile +1.4 V (vs. Ag/AgCl) arasında 100 mV/s hızında taranmıştır. Şekil 4A'dan anlaşılacağı gibi modifiye edilmiş elektrotlarla belirtilen H_2O_2 konsantrasyon seviyeleri başarı ile ölçülmüştür. Pt-KFE'lerin ölçebileceği en düşük konsantrasyon seviyesinin belirlenmesinde kronoamperometri kullanılmış ve bu işlem boyunca modifiye edilmiş elektrotun potansiyeli +0.8 V seviyesinde sabit tutulmuştur. Sonuçlardan anlaşılacağı üzere bu elektrotlarla 1 μM seviyesinde H_2O_2 ölçülebilmektedir (Şekil 4B). +1.2 V (vs. Ag/AgCl) yerine +0.8 V kullanılmasının nedeni yüksek potansiyelde elektrotun zarar görme ihtimalinin olmasıdır. Üretilen PT-KFE probolar sahip oldukları küçük boyutlardan dolayı lokal analizde yüksek potansiyel taşıdığı ve küçük modifikasyonlarla çeşitli biyosensörlerin geliştirilmesinde bu proboların kullanımının uygun olduğu düşünülmektedir. Bundan sonraki çalışmalarda Pt-KFE'lerin yüksek duyarlılıkta ATP deteksiyonunda kullanımı için geliştirilmesi planlanmaktadır.

III. TEŞEKKÜR

Bu çalışma 115C013 nolu TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKÇA

- [1] Inoue, K. Y., Matsudaira, M., Kubo, R., Nakano, M., Yoshida, S., Matsuzaki, S., Suda, A., Kunikata, R., Kimura, T., Tsurumi, R., Shioya, T., Ino, K., Shiku, H., Satoh, S., Esashi, M., Matsue, T. *Lab Chip* **2012**, 12, 3481.
- [2] Ino, K., Kanno, Y., Nishijo, T., Goto, T., Arai, T., Takahashi, Y., Shiku, H., and Matsue, T. *Chem. Com.* **2012**, 48-8505-8507.
- [3] Drummond, T. G., Hill, M. G., Barton, J. K. *Nature Biotechnol.* **2003**, 21, 1192-1199.
- [4] Wang, J. *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 3011-3016.
- [5] Bang, G. S., Cho, S., Kim, B.-G. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 21, 863-870.
- [6] Lin, R., Taberna, P. L., Chmiola, J., Guay, D., Gogotsi, Y., Simon, P. *J. Electrochem. Soc.* **2009**, 156, A7-A12.
- [7] Wang, J. X., Springer, T. E., Adzic, R. R. *Electrochem. Soc.* **2006**, 153, A1732-A1740.