

Pestisit Tayini için Nanopartiküllerle Duyarlılığı Arttırılmış Moleküler Baskılama Temelli Yüzey Plazmon Rezonans Sensörlerin Hazırlanması

Oğuz ÇAKIR¹, Monireh BAKHSHPOUR², Fatma YILMAZ³, Zübeyde BAYSAL⁴

ÖZET: Pestisitler yıllardır tarım alanlarında kullanılmaktadır. Ancak bu yaygın kullanım, bilimsel ve endüstriyel topluluklarda pestisitlerin uzun vadeli insan sağlığı riskleri üzerine bilinen toksisitelerinden dolayı endişeyi arttırmıştır. Böylelikle pestisitlerin tayin edilmesi, hem insanlar üzerinde artan toksik etkilerinden hem de kullanımının kontrol altına alınmasından dolayı büyük bir öneme sahiptir. Bu çalışmada, seçici, hassas, hızlı ve gerçek zamanlı klorpirifos tayini için ilk olarak, poli[etilenglikol dimetakrilat-N-metakriloil-(L)-triptofan metil ester poly(EGDMA-MATrp) nanopartikülleri hazırlandı ve zeta sizer ile karakterize edildi. Ardından, klorpirifos baskılı SPR nanosensör hazırlanarak atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve temas açısı ölçümleri ile karakterize edildi. Kalınlık ölçümleri ve AFM görüntüleri, nanopartiküllerden oluşan ince filmlerin hemen hemen tek tabakalı olduğunu gösterdi. Baskılanmış ve baskılanmamış nanosensörlerin klorpirifos tayin duyarlılığı 0.015-2.9 nM aralığında klorpirifos çözeltileri ile araştırıldı. Baskılanmış nanopartiküllerin, baskılanmamışlara göre daha fazla duyarlılık gösterdiği belirlendi. Langmuir adsorpsiyon modeli, bu afinite sistemi için en uygun model olarak belirlendi. Klorpirifos baskılanmış nanopartiküllerin seçiciliğini göstermek için 2.9 nM derişimindeki klorpirifos, diazinon ve parationun yarışmalı adsorpsiyonu araştırıldı. Sonuç olarak, SPR nanosensörlerin hızlı yanıt, kullanım kolaylığı, hassasiyet, seçicilik ve gerçek zamanlı ölçüm alınabilme özelliğinden dolayı pestisit analizleri için alternatif bir yöntem olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler: Moleküler baskılama, nanopartikül, pestisit, yüzey plazmon rezonans sensör.

Preparation of Nanoparticle-Amplified Surface Plasmon Resonance Sensors Based on Molecular Imprinting for Pesticide Determination

ABSTRACT: Pesticides have been utilized in agriculture for decades. However, their widespread use has increased concerns due to their known toxicities on long term human health risks in scientific and industrial communities. Thus, the detection of pesticides will have a great prescription due to both improve their toxicity effects over humans and their management. In this study, poly[ethyleneglycol dimethacrylate-N-methacryloyl-(L)-tryptophan methyl ester poly(EGDMA-MATrp) nanoparticles for sensitive, selective, fast and realtime detection chlorpyrifos were firstly prepared and characterized by zeta sizer. Then, a chlorpyrifos-printed SPR nanosensor was prepared and characterized by atomic force microscopy (AFM) and contact angle measurements. The thickness measurements and AFM observations indicated that the nanoparticle thin films were almost monolayer. Chlorpyrifos sensing ability of imprinted and nonimprinted nanosensors were investigated from chlorpyrifos solutions within the range of 0.015-2.9 nM. Imprinted nanoparticles showed more sensitivity to chlorpyrifos than non-imprinted ones. Langmuir adsorption model was determined as the most suitable model for this affinity system. In order to show the selectivity of the chlorpyrifos imprinted nanoparticles, competitive adsorption of chlorpyrifos, diazinon and parathion at 2.9 nM concentration was investigated. As a result of, SPR nanosensors have a potential to be used as an alternative method for pesticides analysis due to fast response, easy-to-use properties, precision, selective and real-time measurement capability.

Keywords: Molecular imprinting, nanoparticles, pesticide, surface plasmon resonance sensor.

¹ Oğuz ÇAKIR (0000-0002-8006-2054), Dicle Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Diyarbakır, Türkiye

² Monireh BAKHSHPOUR (0000-0002-5737-720X), Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya ABD, Ankara, Türkiye

³ Fatma YILMAZ (0000-0003-3260-1639), Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Gerde Meslek Yüksekokulu, Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümü, Bolu, Türkiye

⁴ Zübeyde BAYSAL (0000-0001-7682-4469), Dicle Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Diyarbakır, Türkiye

Sorumlu yazar/Corresponding Author: Oğuz ÇAKIR, ocakir44@gmail.com

GİRİŞ

Pestisit, zirai mücadele araştırma ve uygulamalarında kullanılan her türlü kimyasal madde ve preparatlarıdır (Kouzayha et al., 2012). Bu kimyasallar, insanların besin kaynaklarına, mal varlıklarına zarar veren, hastalık yapan böcekler, yabancı otlar, kuşlar, memeliler, balıklar, solucanlar ve mikroorganizmalar gibi zararlı organizmaları engellemek, kontrol altına almak, ya da zararlarını azaltmak amacıyla kullanılmaktadır (Kim et al., 2007). Her ne kadar pestisitlerin kullanılmasının bazı yararları olsa da insanlar ve diğer canlılar için potansiyel toksisitelerinden dolayı kanser, doğum defektleri, nörotoksisite ve nörodavranışsal bozukluklar gibi çok ciddi kronik sağlık etkilerine neden olabilmektedirler (Sharp et al., 1986).

Pestisit gruplarından biri olarak bilinen organik fosforlu pestisitler, tarım alanlarında dünyada pestisit tüketiminin yaklaşık % 45'ini oluşturur (Daş ve Aksoy, 2016). Organik fosforlu pestisitler deri, sindirim ve solunum yoluyla etkili olur (Kim et al., 2007). Dolayısıyla, insanlar tarafından yiyecek ve içme suyuyla doğrudan veya dolaylı olarak alındığında zararlı olabilir (Kim et al., 2007; Tuna et al., 2014). Toprakta, yer altı ve yeryüzü sularında, meyve/sebzelerde ve tahıl ürünlerinde gözlenen pestisit kirliliği, günümüzde tüm dünyanın dikkatini çeken başlıca güncel konular arasındadır (Yazgan, 1997). Bu nedenle, bu kimyasalların çevreye yayılmalarını mümkün olduğunca sınırlamak zorunludur. Aynı zamanda, gerek çevre gerekse sağlık üzerine toksik etkilerinden dolayı tarımsal ürünlerdeki kontaminasyonun, çok düşük derişimlerdeki potansiyel toksik bileşikler için yeni tayin ve uzaklaştırma yöntemleri ile kalitatif ve kantitatif olarak tayin edilmesi büyük bir önem taşımaktadır. Organik fosforlu pestisitlerin tespiti için en yaygın kullanılan yöntemler, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) (Luzardo et al., 2015), gaz kromatografisi (GC) (Luzardo et al., 2015; Jamal and Ahmad, 2016) ve kütle spektroskopisidir (Gabrieli et al., 2016). Ancak bütün bu yöntemler zahmetli numune hazırlama ve pahalı aletler gerektirdiğinden son zamanlarda oldukça popüler olan sensör sistemleri kullanılmaya başlanmıştır (Saylan et al., 2017; Yılmaz et al., 2017).

Pestisit tayin yöntemleri arasında, moleküler baskılanmış polimerler (MIP) bu amaç için avantajlı bir

yöntemdir. Bu polimerler, moleküler tanıma dayalı bir etkileşim mekanizmasını içeren hedef moleküle şekil, boyut ve fonksiyonel grupları tamamlayan belirli tanıma bölgelerine sahip sentetik materyallerdir (Saylan et al., 2017). MIP'ler kolay hazırlanır, ucuz ve büyük miktarlarda iyi çoğaltılabilirlikle üretilebilir (Bereli et al., 2011). Bu polimerler biyolojik moleküller ve analitik uygulamalar gibi birçok farklı alanda kullanılmıştır (Gültekin et al., 2012; Saylan et al., 2014). Geçmiş yıllarda, MIP'ler sensör alanında oldukça bilimsel bir ilgi görmüştür (Chen et al., 2004). Aynı zamanda, mikrogravimetrik analiz ve MIP'lere dayanan yüzey plazmon rezonans (SPR) kombinasyonu seçici bulgular için popüler olmuştur (Yılmaz et al., 2015; Saylan et al., 2017). SPR sensörler, antibadi/antijen, protein/DNA, analitik polimerik malzeme etkileşimlerinin incelenmesi ve pestisit kalıntı analizleri için kullanılabilir yeni nesil optik sensörlerdir (Sari et al., 2016; Saylan et al., 2017). SPR sensör sistemleri, analizin ve tayinin gerçek zamanlı yapılabilmesi, analit molekülün işaretlenmesine gerek duyulmaması, yüksek yüzey duyarlılığı ve anlık tayin kolaylığının yanı sıra tekrar tekrar kullanım potansiyeli, hızlı cevap süresi ve aynı anda birçok analiti analiz etme olanağı sunan oldukça yüksek avantajlara sahiptir (Yılmaz et al., 2015; Sari et al., 2016). Bu çalışmada, klorpirifos tayinine yönelik son dönemlerde oldukça ilgi çekici araştırma alanlardan olan moleküler baskılama yöntemi kullanılarak klorpirifos baskılanmış poli[etilen glikol dimetakrilat-N-metakriloil-(L)-triptofan metil ester p(EGDMA-MATrp)] nanopartikül temelli yeni nesil SPR sensör hazırlanması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, p(EGDMA-MATrp) polimeri hedef moleküle etkileşmesi için uygun yapıda fonksiyonel monomer olarak N-metakriloil-L-triptofan metil ester (MATrp), çapraz bağlayıcı olarak etilenglikol dimetakrilat (EGDMA) ve başlatıcı olarak azobisisobutironitril (AIBN) kullanılarak hazırlandı ve zeta sizer ile karakterize edildi. Ardından, klorpirifos baskılı SPR nanosensör hazırlanarak atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve temas açısı ölçümleri ile karakterize edildi. SPR-MIP sisteminde farklı klorpirifos konsantrasyonları kullanılarak denge ve bağlanma kinetikleri hesaplandı, baskılama seçiciliği ve hassasiyet çalışmaları yapıldı. Bu doğrultuda, başta zirai mücadele olmak üzere birçok alanda yaygın olarak kullanılan, çevre ve insan sağlığını çok ciddi tehdit eden bu pestisit kalıntısının

anlık analizini sağlayarak bilinçsiz ve kontrolsüz kullanımının önüne geçilmesi hedeflenmektedir.

MATERYAL VE YÖNTEM

SPR altın çipler Horiba'dan (İngiltere) alındı. Tüm deneylerde analitik saflıkta reaktifler ve çözücüler kullanıldı. Bu çalışmada kullanılan klorpirifos, diazinon ve paration Dr. Ehrenstorfer'dan, satın alındı. Etilen glikol dimetakrilat (EDGMA), polivinil alkol (PVA), sodyum dodesil sülfat (SDS) ve diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich'den temin edildi. N-metakriloil-L-triptofan metil ester (MATrp) monomeri Nanoreg Ltd. Şti. (Ankara, Türkiye)'den temin edildi. Klorpirifos metanolde çözünerek saf su ile farklı derişimlerde hazırlandı ve +4 °C'de soğutucuda muhafaza edildi.

Klorpirifos baskılı nanopartiküllerin hazırlanması: Klorpirifos baskılı poli[etilenglikol dimetakrilat-N-metakriloil-(L)-triptofan metil ester poly(EGDMA-MATrp) nanopartiküller, Üzek et al., (2014)'nin yapmış olduğu metoda göre, küçük değişiklikler yapılarak iki fazlı miniemülsiyon polimerizasyon yöntemi ile hazırlandı. Nanoparçacıkların karakterizasyonu Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, London, UK) ölçümü ile yapıldı. poly(EGDMA-MATrp) nanopartiküller (3 mL) örnek tutucuya yerleştirildi ve ışık saçılması 25 °C'de ve 90°'lik bir açı oranında gerçekleştirildi. Her bir sonuç ortalama üç ölçüm olup analizör yazılımı tarafından standart sapma ile rapor edildi.

Klorpirifos baskılı SPR sensörün hazırlanması: İlk olarak, SPR sensör çip yüzeyleri asidik pirana çözeltisi (3:1H₂SO₄/H₂O₂, v/v) ile temizlendi. Ardından, SPR çip 10 mL temizleme çözeltisinde 5 dakika bekletildikten sonra etil alkol ile yıkanıp 1 saat vakumlu etüvde (200 mmHg, 35 °C) kurutuldu. poly(EGDMA-MATrp) nanopartikül karışımından 5 µL alınıp "spin coating" metodu kullanılarak SPR sensör çip yüzeyine damlatıldı. Bekleme süresinin ardından çipler alınarak karanlık ortamda UV ışığı (100 W, 365 nm) altında polimerizasyon gerçekleştirildi. Son olarak, reaksiyona girmeyen monomer çözeltisi etanol ile yıkandı ve vakum etüvünde kurutuldu. Moleküler baskılamanın olmadığı (NIP) yüzeyler ise klorpirifos kullanılmaksızın aynı işlemler uygulanarak hazırlandı. Klorpirifosu polimerik yapıdan uzaklaştırmak için bir

desorpsiyon ajanının kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla ortama desorpsiyon çözeltisi olarak 1 % asetik asit içeren 0,1 M CaCl₂ ilave edildi ve çalkalamalı inkübatörde oda sıcaklığında 2 saat süre ile 200 rpm'de çalkalandı. Desorbe edilen sensör çipleri, saf su ile yıkandı ve vakum etüvünde (200 mmHg, 25 °C) kurutuldu.

Klorpirifos baskılı SPR sensörün yüzey karakterizasyonu: SPR nanosensörün temas açısı ölçümleri KRUSS DSA100 (Hamburg, Almanya) cihazı ile belirlendi. Çip yüzeylerinin temas açısı Sessile Drop yöntemi ile su damlatılmasıyla ölçüldü. SPR çip yüzeylerinin farklı bölümlerinden on ayrı fotoğraf çekildi, ardından her damla için temas açısı değerleri ölçüldü. Ortalama temas açısı değerleri on değerlerin ortalaması olarak hesaplandı. Atomik kuvvet mikroskobu (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere) ölçümleri, serbest kantileverli interferometre özelliğine sahip atomik kuvvet mikroskobu ile 4096 x 4096 piksel ile alındı. Bu sensör çipleri çift yüzlü karbon bant aracılığıyla örnek tutucuya yerleştirildi ve görüntüleme hava ortamında yarı degen modda gerçekleştirildi. 341.30 kHz salınım rezonans frekansı uygulandı. Titreşim genliği 1 VRMS ve boş titreşim genliği ise 2 VRMS'dir. Örnekler 2 µm s⁻¹ tarama hızında, 256 x 256 piksel çözünürlükte, 1 x 1 µm² bir alanın görüntüsü olarak alındı.

Klorpirifos baskılı nanosensör ile kinetik ve seçicilik çalışmaları: Bu aşamada sulu çözeltiden klorpirifosun gerçek zamanlı tayini için SPR sistemi (GenOptics, SPRi-Lab, Orsay, Fransa) kullanıldı. Klorpirifos baskılı çip yüzeyi 1 mL dak.⁻¹ akış hızında saf su (50 mL) ile yıkandıktan sonra metanol:saf su karışımı denge çözeltisi beş dakika boyunca sistemden geçirildi. Bu dengeleme basamağında sonra, farklı derişimlerdeki (0.015-2.9 nM) klorpirifos çözeltileri (10 mL, 2.0 mL dak.⁻¹ akış hızı) ayrı ayrı sisteme verildi. Sistem denge durumuna geldiğinde (yaklaşık 15 dak.) sisteme uygun desorpsiyon çözeltisi (10 mL, 2.0 mL dak.⁻¹ akış hızı) verilerek desorpsiyon işlemi gerçekleştirildi. Desorpsiyon işleminden sonra, SPR sensör çip tekrar yıkandı ve farklı derişimlerdeki pestisit çözeltileri sisteme verilmeden önce desorpsiyon-temizleme aşamaları tekrarlandı. Eş zamanlı klorpirifos baskılı SPR nanosensörün seçiciliği için klorpirifos, diazinon ve paration moleküllerinin SPR nanosensör ölçümleri alındı ve elde edilen datalar hesaplamalar için kullanıldı.

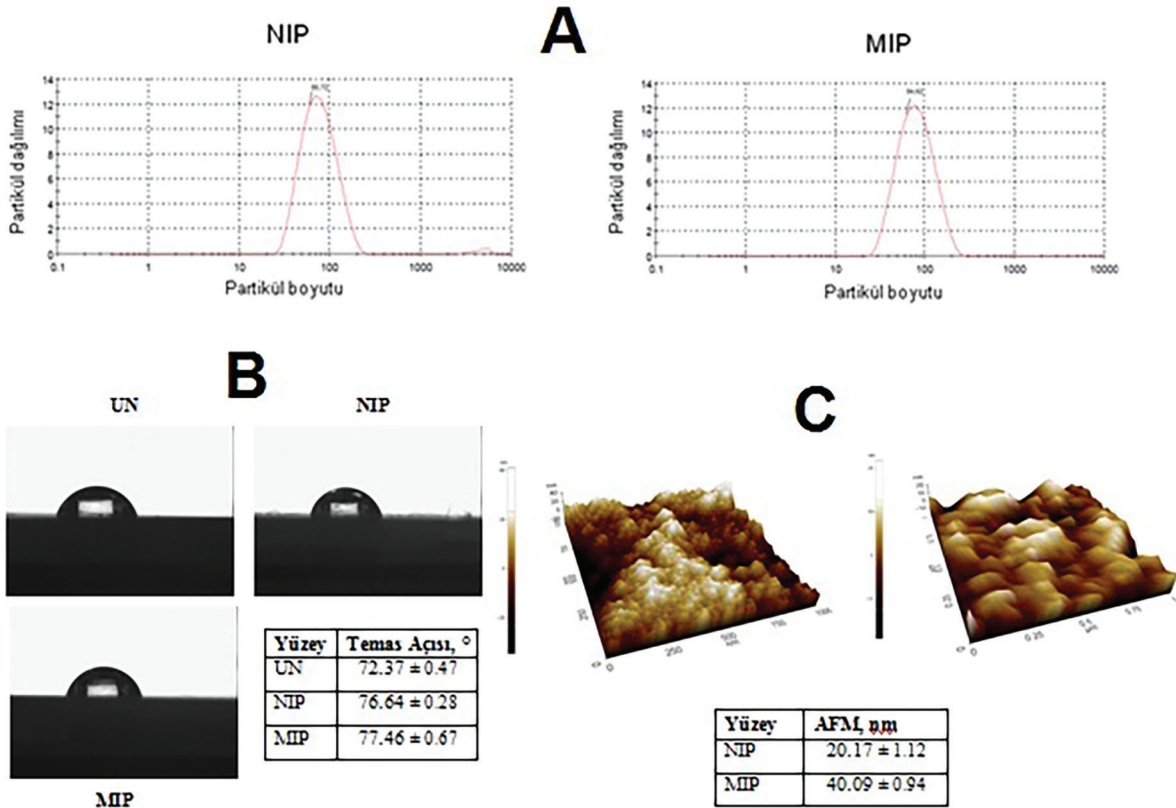
BULGULAR VE TARTIŞMA

Klorpirifos baskılı SPR nanosensörün karakterizasyonu: Klorpirifos baskılı SPR nanosensörün karakterizasyonu temas açısı ve AFM ile nanopartiküller ise zeta-sizer ölçümleri ile karakterize edildi. Şekil 1A'da görüldüğü gibi klorpirifos baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) nanopartiküllerin boyutu sırasıyla 84.62 nm ve 80.72 nm olarak bulundu. Bu ölçümler sonucu uygulanan yöntem nanopartiküllerin sentezi için uygun bulundu.

Şekil 1B'de temas açısı ölçümleri verilmektedir. Modifiye edilmemiş, MIP ve NIP SPR sensör çip temas açısı ölçümleri sırasıyla $72.37^\circ \pm 0.47$, $77.46^\circ \pm 0.67$ ve $76.64^\circ \pm 0.28$ olarak ölçüldü. Temas açısı değerlerindeki bu artış fonksiyonel monomer olarak kullanılan MATrp'nin hidrofobik karaktere sahip olması ile açıklanabilir. AFM görüntülerine göre, MIP ve NIP SPR sensör çip yüzey derinliği sırasıyla 20.17 ± 1.12 nm ve 40.09 ± 0.94 nm olarak bulundu (Şekil 1C). MIP ve NIP SPR sensör arasındaki yüzey derinliği değerlerinin farklı olması, sensör yüzey pürüzlülüğünün tüm yüzey boyunca iyi dağıldığını ve moleküler baskılama işleminin başarılı bir şekilde

gerçekleştiğini göstermektedir. Bu sonuç, SPR nanosensör çip üzerindeki klorpirifos baskılamanın homojen bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Bu özellik nanosensörün özgülüğünü, seçiciliğini ve tanıma oranını kontrol eden önemli bir parametredir (Saylan et al., 2017).

Klorpirifos baskılı SPR nanosensörün gerçek zamanlı izlenmesi: Moleküler baskılı SPR nanosensör çip, 0.015-2.9 nM aralığındaki konsantrasyonlarda sulu çözeltilerde klorpirifosun gerçek zamanlı tespiti için hazırlandı. Klorpirifos çözeltisi sensör çip yüzeyine ulaştığında klorpirifos baskılı SPR nanosensör hızlı bir şekilde cevap vermiştir. Klorpirifos konsantrasyonundaki artış klorpirifos baskılı SPR nanosensör cevabında artışa sebep olmuştur. Toplam ölçüm süresi 18 dakika olarak belirlendi (Şekil 2). Belirleme katsayısı ($R^2=0.999$) ile oldukça iyi doğrusallık elde edildi. Klorpirifos baskılı nanosensörün cevabı ve hassasiyetinin baskılanmamış nanosensörden çok daha büyük olduğu açık bir şekilde görülmektedir. Bütün bu sonuçlar, klorpirifos baskılı nanopartiküllerin yüzeyinde spesifik bağlanma bölgelerinin olduğunu göstermektedir.



Şekil 1. Klorpirifos baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) nanosensörlerin karakterizasyonu: (A) MIP ve NIP nanopartiküllerin zeta-sizer ölçümleri; (B) modifiye edilmemiş (UN), NIP ve MIP nanopartiküllerin temas açısı ölçümleri ve görüntüleri; (C) NIP ve MIP nanopartiküllerin AFM ölçümleri ve görüntüleri

Denge analizi ve kinetik izoterm çalışmaları: Klorpirifos baskılı nanosensör ile klorpirifos molekülü arasındaki etkileşim kinetiğini analiz etmek için, Scatchard, Langmuir, Freundlich ve Freundlich-Langmuir olmak üzere dört denge izoterm modeli incelendi.

$$\text{Bağlanma kinetik analizi} \quad d\Delta R/dt = k_a C \Delta R_{maks} - (k_a C + k_d) \Delta R \quad (1)$$

$$\text{Scatchard} \quad \Delta R_{denge}/C = K_A \Delta R_{maks} - K_A \Delta R_{denge} \quad (2)$$

$$\text{Langmuir} \quad \Delta R = \{\Delta R_{maks} [C] / (K_D + [C])\} \quad (3)$$

$$\text{Freundlich} \quad \Delta R = \Delta R_{maks} [C]^{1/n} \quad (4)$$

$$\text{Langmuir-Freundlich} \quad \Delta R = \{\Delta R_{maks} [C]^{1/n} / K_D + [C]^{1/n}\} \quad (5)$$

Burada, $d\Delta R/dt$ SPR sinyal değişim hızı; m ve ΔR_{maks} ölçülen sinyali bağlama ve kütle (nM/cm^2) artışından gelen maksimum sinyali; C , konsantrasyon (nM); k_a ($1/\text{nM s}$) bağlanma hız sabiti ve k_d ($1/s$) ayrışma hız sabiti; $1/n$ Freundlich heterojenite indeksini ifade etmektedir. Bağlanma sabiti (K_A)= k_a/k_d olarak hesaplandı, ayrışma sabiti (K_D)= $1/K_A$ 'ya eşittir. Bağlanma analiz parametreleri Çizelge 1'de verilmiştir.

Bağlanma (k_a) ve ayrışma (k_d) sabitleri sırasıyla $0.225 \text{ nM}^{-1} \text{ sn}^{-1}$ ve 0.486 sn^{-1} , bağlanma denge (K_A) ve ayrışma denge (K_D) sabitleri ise sırasıyla 7.786 nM^{-1} ve 0.128 nM olarak hesaplandı.

Bu denge izoterm parametreleri (k_a , k_d , K_A ve K_D) klorpirifos baskılı nanosensörün klorpirifos molekülüne yüksek bağlanma afinitesi sergilediğini kanıtlamaktadır.

Çizelge 1. Kinetik ve izoterm parametreleri

Denge Analizi	Bağlanma Analizi	Langmuir	Freundlich	Langmuir-Freundlich
$\Delta R_{maks}, \text{nM/cm}^2$ 4.431	$k_a, \text{nM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 0.225	$\Delta R_{maks}, \text{nM/cm}^2$ 4.082	$\Delta R_{maks}, \text{nM/cm}^2$ 3.827	$\Delta R_{maks}, \text{nM/cm}^2$ 6.289
K_A, nM^{-1} 7.786	k_d, s^{-1} 0.486	K_A, nM^{-1} 9.423	$1/n$ 0.410	$1/n$ 0.410
K_D, nM 0.128	K_A, nM^{-1} 0.463	K_D, nM 0.106	R^2 0.931	K_A, nM^{-1} 0.462
R^2 0.999	K_D, nM 2.160	R^2 0.997		K_D, nM 2.164
	R^2 0.940			R^2 0.927

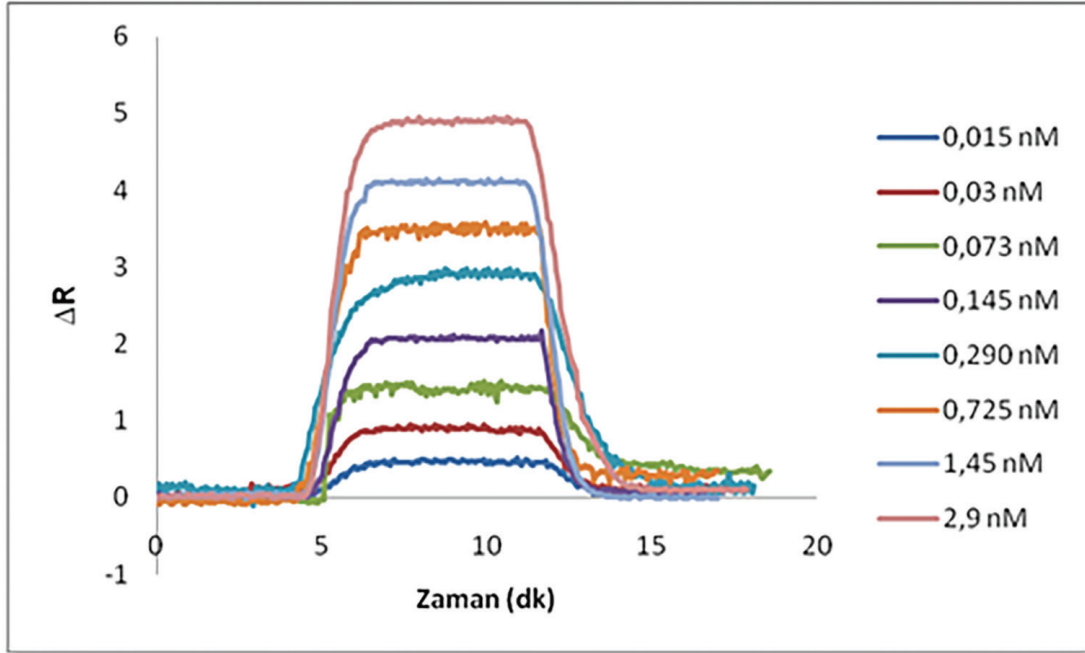
Adsorpsiyon izoterm (Scatchard, Langmuir, Freundlich ve Freundlich-Langmuir) verileri baskılı nanosensör yüzeyinin homojenliğini araştırmak için kullanıldı.

Langmuir modeli yüzeydeki bağlanma bölgelerinin tek tabakalı ve homojen dağılıma sahip olduğunu söylerken, Freundlich modeli heterojen dağılıma oldukça uygundur. Diğer yandan, Freundlich-Langmuir modeli her iki modele de tamamen uymayan durumlar için kullanılır.

Korelasyon katsayısı ve doğrusallık verilerine göre Langmuir modeli bu çalışmada adsorpsiyon verilerini

makul derecede iyi sonuçlandırmıştır. Langmuir izoterm modeli, MIP'lerin homojenliğini belirlemek için yaygın olarak kullanılır. Polimerlerin homojen dağılımına bağlı olarak, MIP'ler yüksek afiniteli bağlanma bölgelerinin daha yüksek bir kısmını teşkil eder (Li and Husson, 2006).

Klorpirifos baskılı SPR nanosensör ile klorpirifos molekülü arasındaki etkileşimi açıklayan en uygun model Langmuir (ΔR_{maks} değeri 4.082 nM/cm^2) modelidir. Bu sonuçlar, klorpirifos baskılı SPR nanosensör üzerine klorpirifos bağlanmasının tek tabakalı ve homojen olduğunu göstermektedir.



Şekil 2. Sulu çözeltilerdeki farklı konsantrasyonlarda klorpirifosun gerçek zamanlı tayini

Klorpirifos baskılı SPR nanosensörün seçiciliği:

Klorpirifos baskılı SPR nanosensörün seçiciliği, NIP-SPR nanosensörün seçiciliği ve hedef molekülün

bağlanma bölgeleri arasındaki etkileşimlerin özgülüğünün daha iyi anlaşılması için araştırıldı.

$$K_d = [(C_i - C_f) / C_f] \times V / m \quad (6)$$

Burada, K_d (mL g^{-1}) dağılım katsayısı; C_i (nM) ve C_f (nM) bağlanma öncesi ve sonrası pestisit çözeltisi konsantrasyonları; V (mL) ve m (g) pestisit çözeltisi hacmi ve nanopartikül kütlesini ifade etmektedir.

Yarışmacı pestisitlerin varlığında klorpirifosun bağlanma seçicilik katsayısı (k) denge bağlanma sabitinden elde edilir;

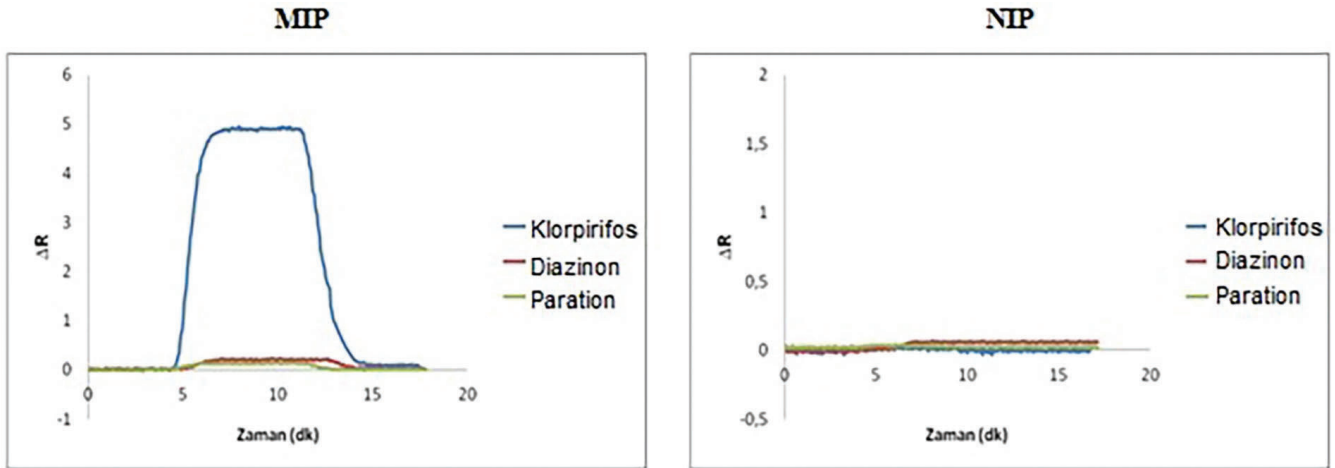
$$k = \Delta R_{\text{klorpirifos}} / \Delta R_{\text{yarışmacı}} \quad (7)$$

Bağıl seçicilik katsayısı (k')

$$k' = k_{\text{baskılanmış}} / k_{\text{baskılanmamış}} \quad (8)$$

Bu amaç için, 2.9 nM derişimindeki diazinon, paration ve klorpirifos çözeltileri SPR sistemine gönderildi. SPR sensörün aynı derişimdeki klorpirifos çözeltisine göre diazinon ve paration çözeltilerine verdiği sinyal artışının oldukça az olduğu görülmektedir. Şekil 3'te, klorpirifos baskılanmış ve baskılanmamış

SPR nanosensörüne ilişkin seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları verilmiştir. Elde edilen sonuçlar, klorpirifos tanıma bölgelerinin baskılama işlemi sırasında oluştuğunu ve klorpirifos baskılı SPR nanosensörde oluşan kavitelelerin öncelikli olarak klorpirifosu tanıdığını göstermektedir.



	MIP		NIP		
	ΔR	k	ΔR	k	k'
Klorpirifos	4.7		0.028		
Diazinon	0.255	18.431	0.061	0.459	40.154
Paration	0.212	22.169	0.042	0.666	33.254

Şekil 3. Klorpirifos baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) SPR nanosensörlerin cevabı

Burada bir amino asit temelli fonksiyonel monomer olan MATrp, hedef molekülün (klorpirifos) etrafında fonksiyonel gruplarla etkileşime girerek hedef molekülün çevresinde toplanır ve polimerizasyondan sonra seçici bağlanma bölgeleri oluşturur. Klorpirifosun seçicilik katsayısı, pestisit baskılı SPR nanosensörde oluşan kavitelerin baskılı hedef molekülü tanıdığı, yapısal hafıza ve hedef molekül için olağanüstü moleküler boyut uyumu olduğunu göstermektedir.

SONUÇ

Bu çalışmada, klorpirifosun gerçek zamanlı tayini için SPR nanosensör hazırlandı. SPR nanosensörler temas açısı ölçümleri, zeta-sizer ve atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edildi. Scatchard, Langmuir, Freundlich ve Freundlich-Langmuir modeller bağlanma, denge ve adsorpsiyon kinetikleri için kullanıldı. Langmuir adsorpsiyon modelinin klorpirifos baskılı SPR sensör için en uygun model

olduğu belirlendi. Nanosensör 0.015 nM seviyelerinde klorpirifos un tayininde kullanılan elektrokimyasal sensör metotları (Mauriz et al., 2006; Terese Marie and Drexel, 2017) ve kromatografik (Kouzayha et al., 2012; Luzardo et al., 2015) gibi farklı yöntemler ile karşılaştırılabilir. Bu yöntemlerin aksine, sunulan SPR biyosensör direkt olarak klorpirifosu yüksek hassasiyet ve seçicilikte tayin etmiştir.

Geliştirilen baskılanmış nanosensör, oldukça düşük konsantrasyonlarda (0.015-2.9 nM) yüksek seçicilik gösterdi. Ayrıca, aynı derişimde hazırlanan (2.9 nM) klorpirifos baskılı nanosensör diazinon ve parationa karşı sırasıyla 18.431 ve 22.169 kat daha fazla seçicilik göstermektedir. SPR nanosensör yukarıda belirtilen diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında tatmin edici sonuçlar vermektedir. Sonuç olarak, klorpirifos molekülünün tayini için hem araştırma hem de endüstriyel uygulamalarda kullanılabilecek daha hızlı, daha ucuz ve kompakt bir optik tabanlı nanosensör sistemi geliştirildi.

KAYNAKLAR

- Bereli N, Saylan Y, Uzun L, Say R, Denizli A, 2011. L-histidine imprinted supermacroporous cryogels for protein recognition. *Separation Purification Technology*, 82: 28-35.
- Chen YC, Brazier JJ, Yan MD, Bargo PR, Prah SA, 2004. Fluorescence-based optical sensor design for molecularly imprinted polymers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 102: 107-116.
- Daş YK, Aksoy A, 2016. Pestisitler. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics*, 2(2).
- Gabrieli B, Magali K, Lucila R, Martha BA, Renato Z, Osmar DP, 2016. An effective method for pesticide residues determination in tobacco by GC-MS/MS and UHPLC-MS/MS employing acetonitrile extraction with low-temperature precipitation and d-SPE clean-up. *Talanta*, 161: 40-47.
- Gültekin A, Ersöz A, Denizli A, Say R, 2012. Preparation of new molecularly imprinted nanosensor for cholic acid determination. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 162: 153-158.
- Jamal HM, Ahmad AS, 2016. Organochlorine pesticide residues in human milk and estimated daily intake (EDI) for the infants from eastern region of Saudi Arabia. *Environmental Sciences & Ecology*, 164: 643-648.
- Kim N, Park IS, Kim DK, 2007. High-sensitivity detection for model organophosphorus and carbamate pesticide with quartz crystal microbalance-precipitation sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 1593-1599.
- Kouzayha A, Rabaa AR, Iskandarani M, Beh D, Budzinski H, Jaber F, 2012. Multi-residue method for determination of 67 pesticides in water samples using solid-phase extraction with centrifugation and gas chromatography-mass spectrometry. *American Journal of Analytical Chemistry*, 3: 257-265.
- Li X, Husson SM, 2006. Adsorption of dansylated amino acids on molecularly imprinted surfaces: a surface plasmon resonance study. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 336-348.
- Luzardo OP, Almeida-González M, Ruiz-Suárez N, Zumbado M, Henríquez-Hernández LA, Meilán MJ, Camacho M, Boada LD, 2015. Validated analytical methodology for the simultaneous determination of a wide range of pesticides in human blood using GC-MS/MS and LC-ESI/MS/MS and its application in two poisoning cases. *Science and Justice*, 55: 307-315.
- Mauriz E, Calle A, Lechuga LM, Quintana J, Montoya A, Manclús JJ, 2006. Real-time detection of chlorpyrifos at part per trillion levels in ground, surface and drinking water samples by a portable surface plasmon resonance immunosensor. *Analytica Chimica Acta*, 561: 40-47.
- Sari E, Üzek R, Duman M, Denizli A, 2016. Fabrication of surface plasmon resonance nanosensor for the selective determination of erythromycin via molecularly imprinted nanoparticles. *Talanta*, 150: 607-614.
- Saylan Y, Akgönüllü S, Çimen D, Derazshamshir A, Bereli N, Yılmaz F, Denizli A, 2017. Development of surface plasmon resonance sensors based on molecularly imprinted nanofilms for sensitive and selective detection of pesticides. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 241: 446-454.
- Saylan Y, Üzek R, Uzun L, Denizli A, 2014. Surface imprinting approach for preparing specific adsorbent for IgG separation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25: 881-894.
- Sharp DS, Eskenazi B, Harrison R, Callas P, Smith AH, 1986. Delayed health hazard of pesticide exposure. *American Journal of Public Health*, 7: 441-471.
- Therese Marie SR, Drexel HC, 2017. Green preparation and characterization of tentacle-like silver/copper nanoparticles for catalytic degradation of toxic chlorpyrifos in water. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5: 2524-2532.
- Tuna S, Duman O, Soylu I, Kancı Bozoğlan B, 2014. Spectroscopic investigation of the interactions of carbofuran and amitrol herbicides with human serum albumin. *Journal of Luminescence*, 151: 22-28.
- Üzek R, Özkara S, Güngüneş H, Uzun L, Şenel S, 2014. Magnetic nanoparticles for plasmid DNA purification through hydrophobic interaction chromatography. *Separation Science and Technology*, 49: 2193-2203.
- Yazgan MS, 1997. Türkiye'de pestisit kirliliği. *Türkiye'de Çevre Kirlenmesi Öncelikleri Sempozyumu II*, 571-577. Gebze-Kocaeli.
- Yılmaz F, Saylan Y, Akgönüllü S, Çimen D, Derazshamshir A, Bereli N, Denizli A, 2017. Surface plasmon resonance based nanosensors for detection of triazinic pesticides in agricultural foods. *New Pesticides and Soil Sensors*, 679-718.
- Yılmaz E, Majidi D, Özgür E, Denizli A, 2015. Whole cell imprinting based *Escherichia coli* sensors: A study for SPR and QCM. *Sensors and Actuators B*, 209: 714-721.