



## PARAOKSON TAYİNİNE YÖNELİK REFLEKTOMETRİK GİRİŞİM SPEKTROSKOPİSİ TEMELLİ SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Sibel EMİR DİLTEMİZ <sup>1,\*</sup>, Ozan YAĞMUROĞLU <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kimya Bölümü, Fen Fakültesi, Eskişehir Teknik Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye

### ÖZET

Bu çalışmada, paraokson molekülünü tanıma bölgelerine sahip reflektometrik girişim spektroskopisi (RİfS) temelli sensör sistemleri geliştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak RİfS cihazı ile uyumlu karboksimetildekstran (CMD) biyoçip yüzeylerinin aktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Aktivasyon işleminde 3-dimetilaminopropil-N'-etilkarbodiimid (EDC) ve N-hidroksisüksinimid (NHS) çözeltileri kullanılmıştır. Biyoçip yüzeyinin aktivasyonu sağlandıktan sonra Asetilkolinesteraz (AChE) enzimi biyoçip yüzeyine immobilize edilmiş ve hazırlanan biyoçip farklı derişimlerdeki paraokson çözeltilerinin analizi için kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre RİfS spektroskopisi temelli olarak paraokson molekülünün çalışma aralığı  $1.97 \times 10^{-7}$  -  $5.4 \times 10^{-4}$  M olarak, LOD (Gözlenebilir Sınırı) değeri  $9.9 \times 10^{-8}$  M ve LOQ (Tayin Sınırı) değeri  $1.97 \times 10^{-7}$  M olarak hesaplanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Paraokson, Reflektometrik girişim spektroskopisi (RİfS), Sensör, Organofosforlu bileşikler

## DEVELOPMENT OF REFLECTOMETRIC INTERFERENCE SPECTROSCOPY BASED SENSOR FOR PARAOKSON DETERMINATION

### ABSTRACT

In this study, reflectometric interference spectroscopy (RİfS) based sensor systems, which have particular recognition site toward to paraoxon molecule was developed. For this purpose, first, the activation of the Carboxymethyl dextran (CMD) chip, which compatible with the RİfS, has been completed. 3-Dimethylaminopropyl-N'-ethylcarbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) solutions were used in the activation process. After activating the biochip surface, the Acetylcholinesterase (AChE) enzyme was transferred to the immobilization step. Afterward, the AChE enzyme immobilization was accomplished on the biochip surface, and analysis of paraoxon solutions in different concentrations was performed. According to the obtained results, the working range of the paraoxon molecule based on RİfS spectroscopy had been calculated as  $1.97 \times 10^{-7}$  to  $5.4 \times 10^{-4}$  M, the LOD value as  $9.9 \times 10^{-8}$  M and the LOQ as  $1.97 \times 10^{-7}$  M.

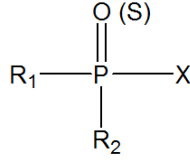
**Keywords:** Paraoxon, Reflectometric interference spectroscopy (RİfS), Sensor, Organophosphorus compounds

## 1. GİRİŞ

Organofosforlu bileşikler vücuttaki etkilerini sinir iletisini engelleyerek gösterirler. Bu bileşikler yapıları bakımından genel olarak esterler, amidler ve fosforik asidin tiyol türevleridir. Organofosfatlar lipid çözünlüğe sahiptirler [1]. Bundan dolayı deri, mukoza, konjonktiva ve solunum yolları tarafından vücuda alınırlar. Ayrıca hayvan ve insan tıbbında kimyasal ajan veya ilaç olarak sinir sistemi çalışmalarında ve askeri amaçlarla kimyasal savaş ajanı olarak da kullanılmaktadırlar [2]. Bu grup kimyasallar en yaygın şekilde pestisit, insektisit, akarisit vb. olarak kullanılırlar ve ticari olarak kolayca elde edilebilirler [3, 4]. Organofosforlu bileşiklerin genel kimyasal yapısı Şekil 1'de gösterildiği gibidir ve molekülün merkezinde fosfat atomu bulunmaktadır. Genel kimyasal yapıda bulunan R1 ve R2, hidrojen, alkil (siklik yapı dahil), aril, alkoksi, alkiltiyol ve amino gruplarını X ise halojenleri, siyano ve tiyol gruplarını ve inorganik-organik asitleri temsil etmektedir [5, 6].

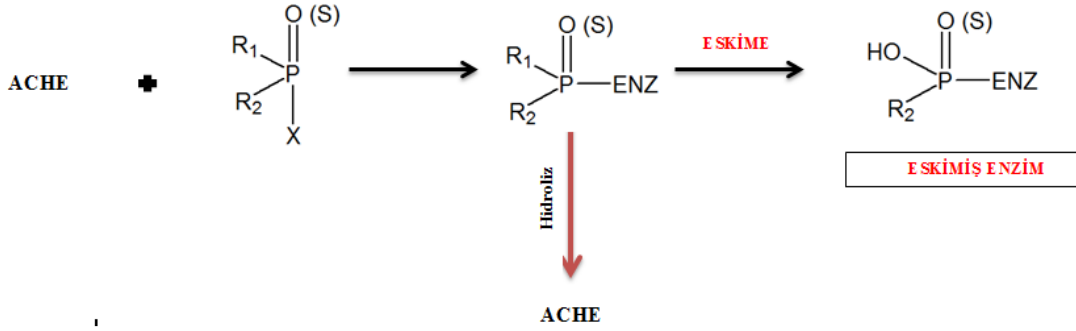
\*Sorumlu Yazar: [semir@eskisehir.edu.tr](mailto:semir@eskisehir.edu.tr)

Geliş: 27.03.2018 Kabul: 05.09.2018



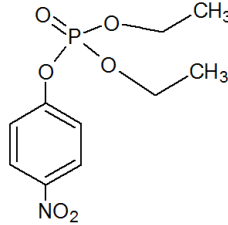
Şekil 1. Organofosforlu bileşiklerin genel kimyasal yapısı

Organofosforlu bileşikler vücuttaki etkilerini asetilkolin esteraz enziminin inhibisyonu üzerinden göstermektedir. Organofosforlu bileşikler AChE enziminin aktif bölgesinde bulunan serin amino asidine bağlanarak enzim tarafından hidrolize edilirler [7]. Böylece enzimin aktif bölgesi fosforillenmiş olur [8]. AChE enzimi ile organofosforlu bileşikler arasındaki reaksiyon iki basamakta gerçekleşir. Öncelikle geri dönüşümlü enzim-inhibitör kompleksi oluşur [9]. Bu kompleksin oluşum hızı organofosforlu bileşiğin yapısına, molekül büyüklüğüne ve alkil gruplarına bağlıdır. Geri dönüşümlü kompleks oluşumundan sonra yapıdaki alkil grubunun -OH ile yer değiştirmesi sonucu geri dönüşümsüz kompleks meydana gelir. Bu olay “eskime” olarak adlandırılır ve Şekil 2’de gösterildiği gibi gerçekleşir [10].



Şekil 2. Organofosforlu bileşikler ile AChE arasındaki reaksiyon

Paraokson, molekül ağırlığı 275.2 g mol<sup>-1</sup> ve kapalı formülü C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>6</sub>P olan bir organofosforlu bileşiktir. Kimyasal adı *o,o*-dietil-*o-p*-nitrofenil fosfattır. Paraokson molekülü insan vücudunda AChE enzimi inhibitörü olarak davranır [11]. Paration molekülünün aktif metabolitidir ve AChE enzimini inhibe etme yeteneği çok güçlüdür [12]. İnsektisitler arasında inhibisyon açısından en kuvvetli organofosforlu bileşiklerden birisidir [13-15]. Paraokson, sinir ajanı sarin molekülünün % 70 kuvvetindedir ve deri tarafından emilimi oldukça kolay olması nedeniyle canlılarda toksik etkilere yol açacağından kullanımı kısıtlıdır [16]. Paraokson molekülünün kimyasal yapısı Şekil 3’de verilmiştir.



Şekil 3. Paraokson molekülünün kimyasal yapısı

Kimyasal sensörler numune içerisindeki analitin derişimine bağlı olarak elde ettikleri kimyasal bilgiyi sinyale dönüştüren sensör sistemleridir. Elde edilen kimyasal bilgi analitin sensör yüzeyinde girdiği bir reaksiyon aracılığıyla veya ortamın değişen fiziksel özellikleri yardımıyla elde edilebilir. Kimyasal sensörler algılayıcı kısmının özelliklerine göre sınıflandırılabilir [17]. Herhangi bir kimyasal reaksiyonun olmadığı, sadece ortamdaki absorbans değişimi, refraktif indeks, iletkenlik, sıcaklık ve

kütle değişimi gibi fiziksel değişimlerden yararlanarak ölçüm yapılan sensör sistemleri de mevcuttur. Analit ortamı ile algılayıcı tabaka arasındaki reaksiyon sonucu meydana gelen değişikliklerden yararlanarak ölçüm yapılabilir [18]. Bu sensörler kimyasal ilkeye dayalı kimyasal sensörler olarak adlandırılabilirler. Algılayıcı tabakada biyolojik bir molekülün olduğu ve meydana gelen sinyalin biyokimyasal bir süreç sonucunda elde edildiği kimyasal sensörlere ise biyokimyasal sensör adı verilmektedir [19, 20].

Reflektometrik girişim spektroskopisi beyaz ışığın ince yüzey üzerinden yansımaları temeline dayanan, etiketlemeye ihtiyaç duymayan bir tayin metodudur. Bu yöntemde kullanılan biyoçipler cam yüzeye sahiptir. Tipik bir biyoçip örneği Şekil 4’de verilmiştir.



Şekil 4. CMD biyoçip

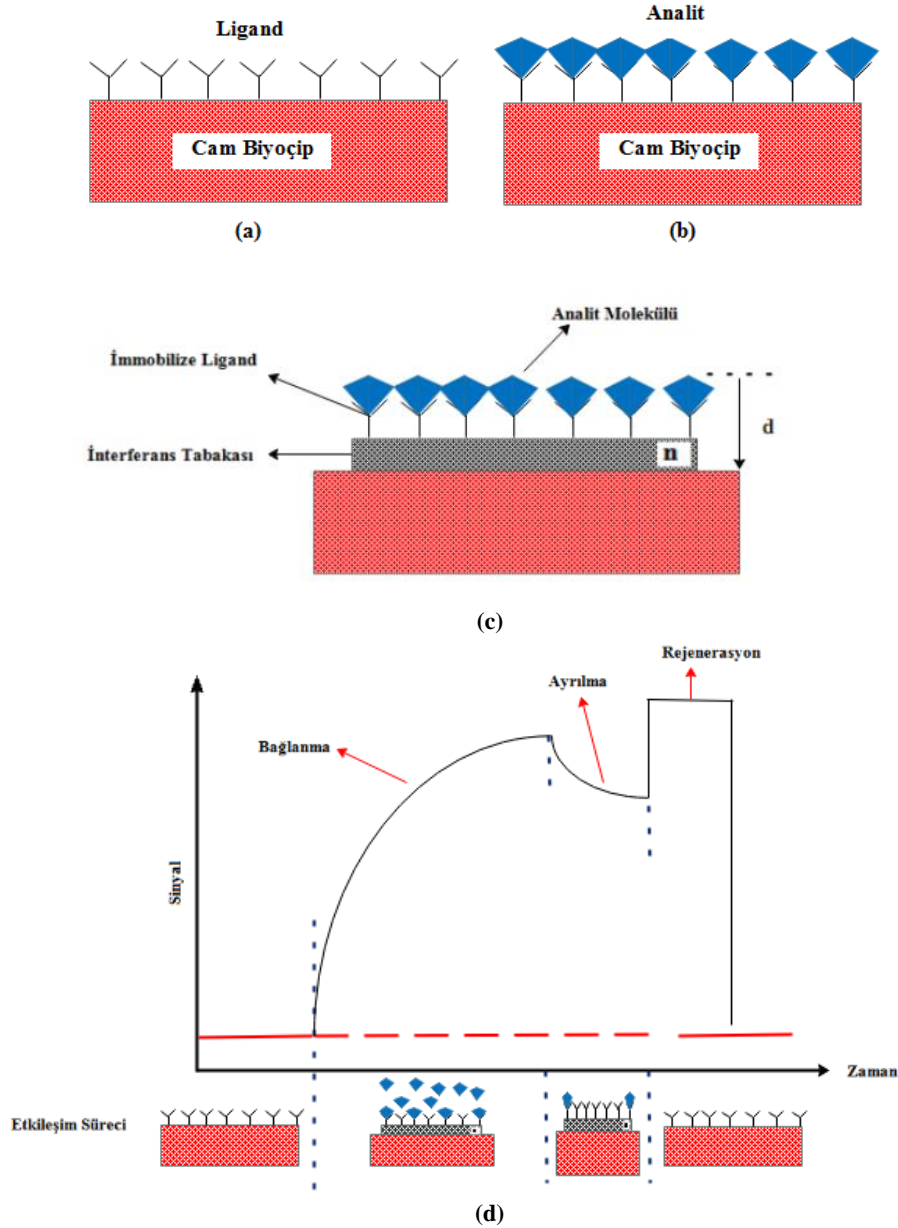
Biyochip yüzeyinin cam olması fonksiyonel grupların bağlanmasını kolaylaştırmaktadır. Biyoçip yüzeyine immobilize edilen ligand ile analit molekülü etkileşime girdiğinde biyoçip yüzeyinin kalınlığı artar ve bunun sonucunda da sensorgramda değişim meydana gelir. Biyoçip yüzeyine ligand olarak antijenler, antikolar, proteinler, peptitler, nükleik asitler, aptamerler immobilize edilebilir. Cam yüzeye ligand immobilizasyonu ve analit ile etkileşiminin şematik gösterimi Şekil 5a ve Şekil 5b’de verilmiştir.

Biyochip yüzeyine ligand molekülünün immobilizasyonundan sonra analit molekülleri ligand moleküllerine seçici bir şekilde bağlanır. Bunun sonucunda sensör yüzeyinde bir kalınlık artışı meydana gelmiş olur ve yüzeyin kırılma indisinde değişim olur. Bu durum Şekil 5c’de gösterilmiştir. Optik kalınlıkta meydana gelen değişim girişim sensorgramında değişmeye yol açar ve bu sayede analit molekülünün bağlanma davranışı izlenir, bağlanan analit miktarı için nicel bilgi almak mümkün olur.

Biyochip yüzeyine analit molekülleri bağlanmaya başladığında reflektometrik girişim spektrometresi cihazında sinyal artışı meydana gelmektedir. Sinyalin arttığı bu sürece bağlanma süreci denilmektedir. Numune analizi sona erdikten sonra biyoçip yüzeyine bağlanan analit moleküllerinin uzaklaştırılması basamağına geçilmektedir. Bu sürece ise ayrılma süreci denilmektedir. Biyoçip yüzeyinden bağlanan tüm analit moleküllerinin uzaklaştırılıp analiz öncesi duruma dönülmesine ise yenileme (rejenerasyon) adı verilmektedir (Şekil 5d).

Paraokson tayinine yönelik olarak yapılmış literatür çalışmaları incelendiğinde elektrokimyasal sensör sistemlerinin, kuantum nokta nano sistemlerinin, kromatografik yöntemlerin, spektroskopi temelli çalışmaların ve molekül baskılı polimer sistemleri ile modifiye edilmiş kuvars kristal mikroterazi temelli çalışmaların bulunduğu görülmektedir. Yapılan çalışmaların büyük kısmında organofosfatların hidrolizinden yararlanılmış ve hidroliz sonucunda meydana gelen tepkime bileşenlerinin derişim değişimleri analizin temelini oluşturmuştur [21-25]. Literatürde çeşitli organofosfatların tayini için reflektometrik girişim spektroskopisi temelli yapılmış çalışma bulunmakta fakat paraokson tayini için herhangi bir çalışma bulunmamaktadır [26]. Bu çalışmada, paraokson molekülünü tanıyan ve bağlayan

karboksimetildekstran modifiye edilmiş biyoçipler kullanılarak asetilkolin esteraz enzim temelli reflektometrik girişim spektroskopisi (RİFS) sensör sistemi geliştirilmiştir.



Şekil 5. (a) Ligand immobilize biyoçip (b) Analit ile etkileştirilen biyoçip (c) Analit ile etkileşimden sonra yüzey morfolojisindeki değişim (d) Reflektometrik girişim spektroskopisi ölçüm basamakları

## 2. MATERYAL VE METOT

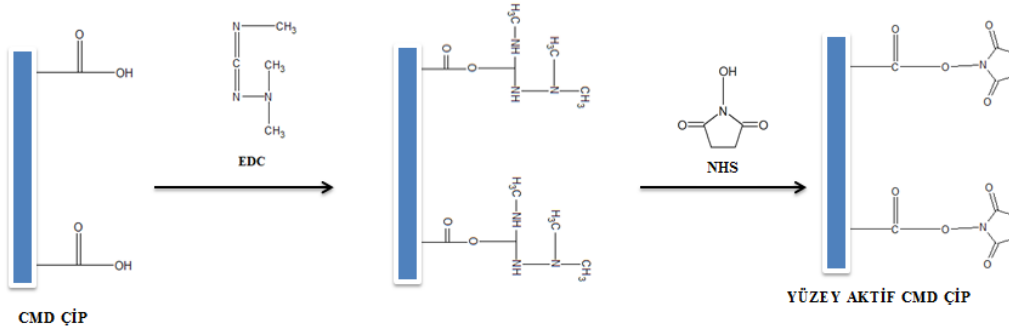
DeneySEL çalışmalarında kullanılan Paraokson, Asetilkolin esteraz (AChE), N-hidroksisüksinimid (NHS), (3-Dimetillaminopropil)-N'-etilkarbodiimid (EDC), Glisin, HCl, Etanolamin ve 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinethansülfonik asit Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) firmasından temin edilmiştir. Diğer bütün kimyasallar ve biyokimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır. Reflektometrik girişim spektroskopisi ölçümleri için Analytic Jena marka, BiAffinity (Jena, Almanya) model spektrofotometre ve yine BiAffinity cihazı ile uyumlu karboksimetildekstran modifiye biyoçipler kullanılmıştır. pH ölçümleri WTW Series InoLab pH730 model pH metre ile yapılmıştır. Deneylerde kullanılan su; yüksek akışlı selüloz membranlı Barnstead (Dubuque, IA) Ropure LP® ters

ozmoz ünitesinde işleme tabi tutulduktan sonra Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloidal uzaklaştırma ve dolgulu iyon değişim sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun iletkenliği 18 megaohm/cm'dir.

## 2.1. Karboksimetildekstran (CMD) Biyoçip Yüzey Aktivasyonu

AChE enzim immobilizasyonu öncesinde sensör yüzeyinin aktivasyonu için RfS cihazına ilk olarak yıkama biyoçipi yerleştirilmiş ve cihaz saf su ile 10 dakika boyunca yıkama işlemine tabii tutulmuştur. Ardından 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetsülfonik asit (HEPES) tamponu sistemden 10 dakika boyunca geçirilerek nano boyuttaki akış kanalları tampon sistemi ile doymun hale getirilmiştir. Sisteme immobilizasyon yapılacak olan CMD biyoçip yerleştirilmiş ve akış hızı  $5 \mu\text{L min}^{-1}$  olarak ayarlanarak biyoçip üzerindeki iki kanaldan geçirilmiştir.

Tampon geçişinden sonra 0.1 M N-hidroksisüksinimid (NHS) ve 0.1 M 3-dimetilaminopropil-N'-etilkarbodiimid (EDC) çözeltileri hacimce 1:1 oranında karıştırılmış ve bu karışımın  $70 \mu\text{L}$ 'si  $5 \mu\text{L min}^{-1}$  akış hızında CMD biyoçip ile etkileştirilerek amid temelli bir aktivasyon gerçekleştirilmiştir. NHS/EDC çözeltisinin biyoçip yüzeyinden geçişi bittikten sonra yüzey aktivasyonu tamamlanmıştır. Yüzey aktivasyonunun şematik gösterimi Şekil 7'de verilmiştir.



Şekil 6. CMD biyoçipin yüzey aktivasyonunun şematik gösterimi

## 2.2. CMD Biyoçip Yüzeyine AChE İmmobilizasyonu

Yüzey aktivasyonu tamamlandıktan sonra, çözücü olarak HEPES tamponu kullanılarak  $1,33 \times 10^{-5}$  M AChE enzim çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti akış hızı  $5 \mu\text{L min}^{-1}$  ve hacim  $200 \mu\text{L}$  olacak şekilde aktive edilen biyoçip ile etkileştirilmiştir. Bu aşamada çözelti akışı biyoçip üzerindeki tek kanaldan geçirilecek şekilde yapılmıştır. Böylece biyoçip yüzeyinin bir bölümüne enzim immobilize edilmeyerek referans yüzey oluşumu sağlanmıştır. Bu çalışma koşulları altında enzim çözeltisi biyoçip yüzeyinden 40 dakika boyunca geçirilmiştir. Enzim geçişi tamamlandıktan sonra enzimin spesifik olmayan bağlanma bölgelerini kapatmak amacıyla etanolamin çözeltisi akış hızı  $5 \mu\text{L min}^{-1}$  ve hacim  $70 \mu\text{L}$  olarak ayarlanarak biyoçip yüzeyinden geçirilmiştir. İmmobilizasyon işleminin bitiminden sonra temel sinyalde oluşan değişim incelenerek immobilizasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğine karar verilmiştir.

## 2.3. Hazırlanan Sensörlerin Paraokson Tayininde Kullanılması

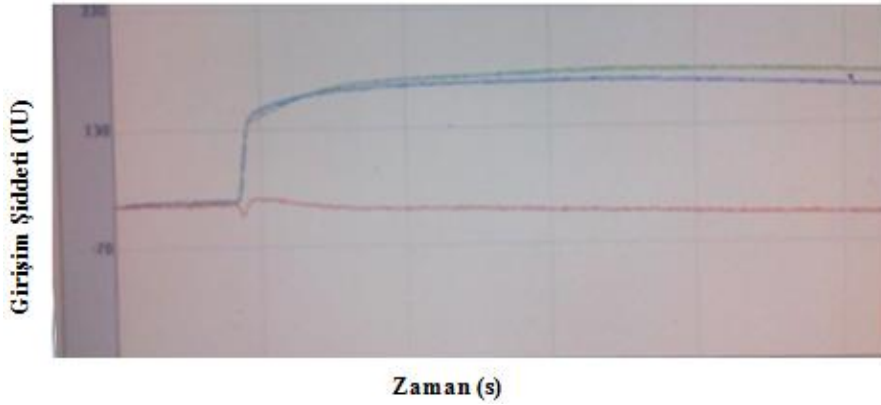
Biyoçip yüzeyine AChE enzim immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra farklı derişimlerde paraokson çözeltilerinin analizi yapılmıştır. Ölçüm yapılmaya başlanmadan önce enzim immobilize biyoçip cihaza ölçüm pozisyonunda yerleştirilmiş ve 10 dakika boyunca  $10 \mu\text{L min}^{-1}$  akış hızında HEPES tamponu ile muamele edilerek yüzeyin doymunluğa ulaşması sağlanmıştır. Ardından RfS cihazının farklı giriş portlarına sırasıyla  $200 \mu\text{L}$  farklı derişimlerdeki paraokson çözeltileri,  $50 \mu\text{L}$  glisin ve  $50 \mu\text{L}$  HCl çözeltisi yerleştirilerek deneysel ölçüm basamakları gerçekleştirilmiştir. Paraokson moleküllerinin AChE immobilize biyoçip yüzeyine bağlanma miktarı sinyaldeki artış miktarından

belirledikten sonra geçirilen glisin ve HCl çözeltileri ile biyoçip yüzeyinin rejenerasyonu sağlanmıştır. Bu şekilde ardışık olarak farklı paraokson derişimleri için ölçümler alınmıştır.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. AChE İmmobilize CMD Biyoçipin Sensorgramının Alınması

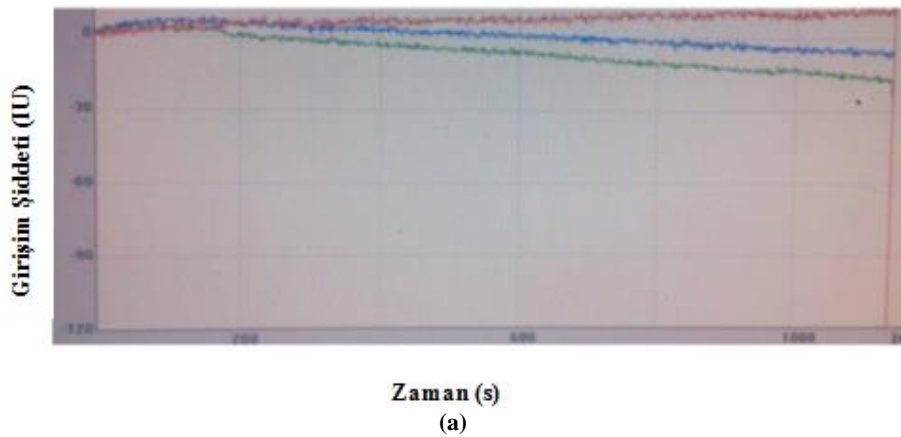
AChE enzimi biyoçip yüzeyine bağlandığında yüzeyin kırılma indisinde değişim olacağından elde edilen sensorgramda artış beklenmektedir. Elde edilecek artış immobilizasyon işleminin gerçekleştiğini gösterecektir. Bu nedenle AChE enziminin immobilizasyonu sırasında CMD biyoçipe ait sensorgram alınmıştır. Elde edilen sensorgram Şekil 7’de gösterildiği gibidir ve girişim şiddetindeki 200 IU birimlik artış immobilizasyonun başarı ile gerçekleştirildiğini göstermektedir.

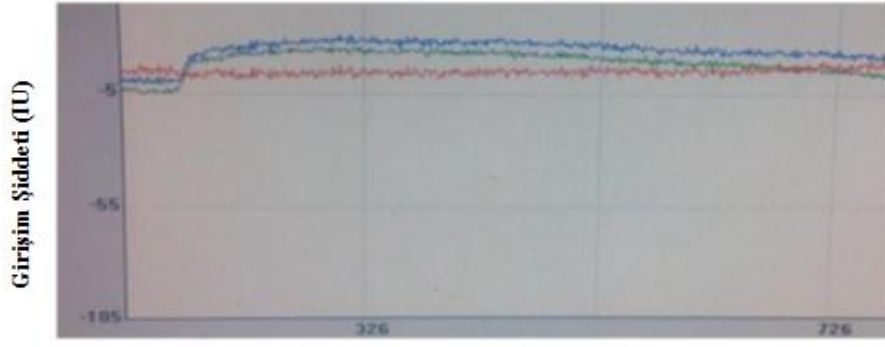


Şekil 7. AChE enzim immobilizasyonu sonucu elde edilen sensorgram

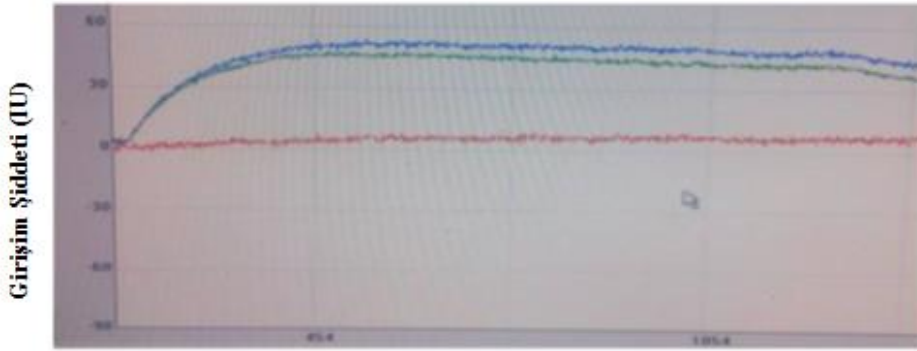
#### 3.2. Farklı Derişimlerdeki Paraokson Çözeltilerinin Sensorgramlarının Alınması

Hazırlanan AChE immobilize CMD biyoçip yüzeyi, farklı derişimlerde paraokson çözeltileri ile etkileştirilmiş ve artan derişimlerdeki ( $3.6 \times 10^{-8}$  M- $5.4 \times 10^{-4}$  M) paraokson çözeltileri için elde edilen sensorgram verileri Şekil 8(a-g)’de verilmiştir. Sensorgramlardan görüldüğü gibi paraokson derişimi arttıkça yüzeye bağlanan paraokson miktarı artmakta ve dolayısıyla yüzey kalınlığı değişmektedir. Bunun sonucunda biyoçipin kırılma indeksi değişmekte ve bu sonuç girişim şiddetinde artış olarak ortaya çıkmaktadır.

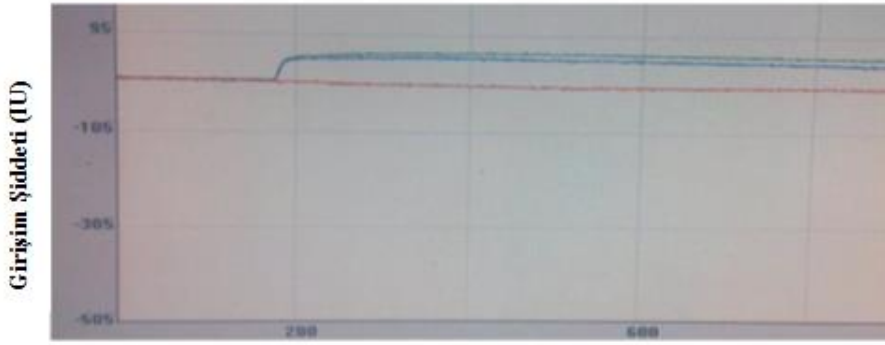




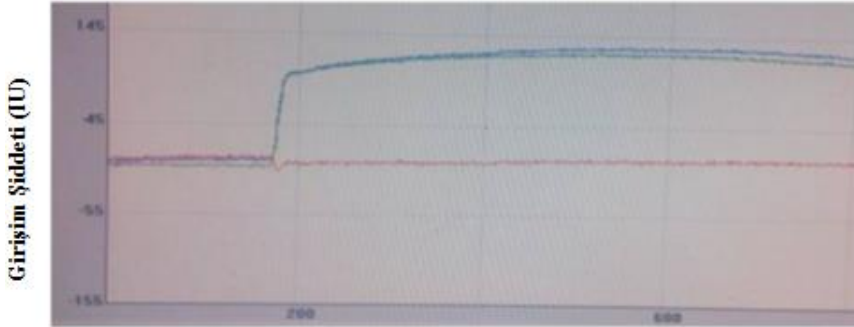
Zaman (s)  
(b)



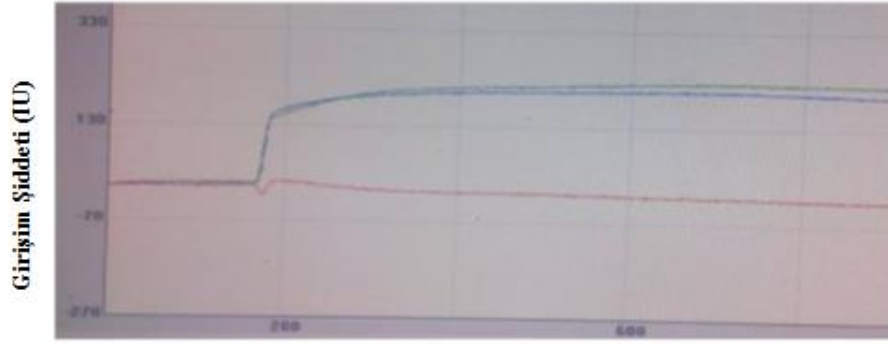
Zaman (s)  
(c)



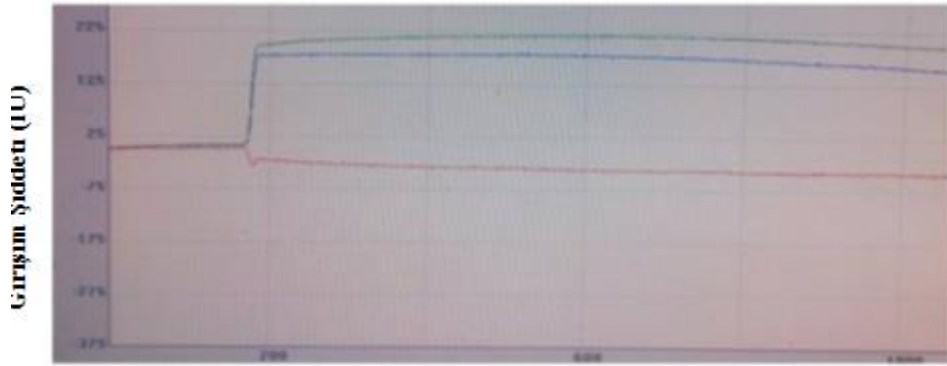
Zaman (s)  
(d)



Zaman (s)  
(e)



Zaman (s)  
(f)



Zaman (s)  
(g)

Şekil 8. (a)  $3.6 \times 10^{-8}$  M paraokson çözeltisi (b)  $3.6 \times 10^{-7}$  M paraokson çözeltisi (c)  $3.6 \times 10^{-6}$  M paraokson çözeltisi (d)  $3.6 \times 10^{-5}$  M paraokson çözeltisi (e)  $1.8 \times 10^{-4}$  M paraokson çözeltisi (f)  $3.6 \times 10^{-4}$  M paraokson çözeltisi ve (g)  $5.4 \times 10^{-4}$  M paraokson çözeltisi için elde edilen sensorgramlar.

### 3.3. RİFS ölçümleri Sonucunda Paraokson İçin Kalibrasyon Grafiğinin Çizilmesi

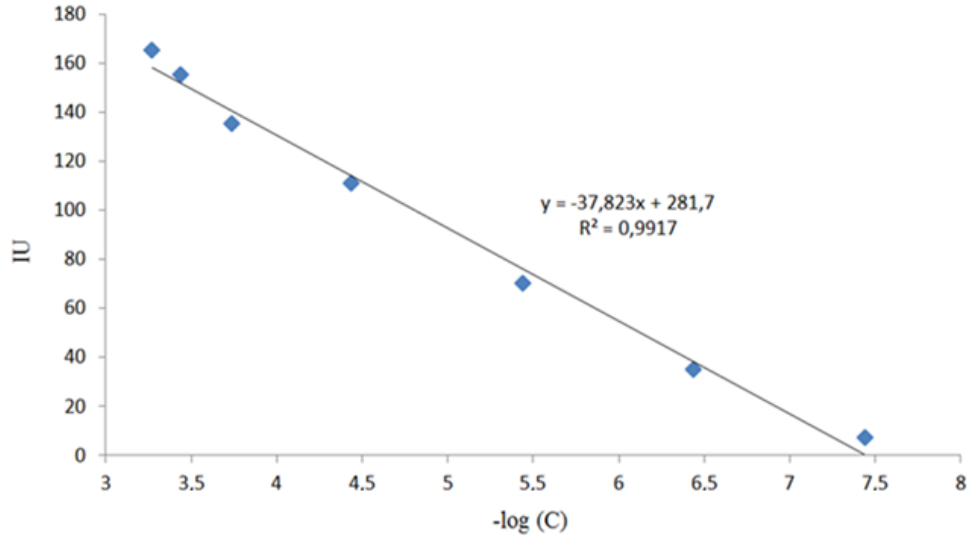
Paraoksone ait farklı derişimlerdeki numuneler için alınan ölçüm sonuçları aşağıdaki Tablo 2’de verildiği gibidir.

Tablo 2. Paraokson çözeltileri için elde edilen ölçüm sonuçları

ppm (mg L <sup>-1</sup> )	Molarite (M)	-log (C)	IU
0.01	$3.6 \times 10^{-8}$	7.44	7
0.1	$3.6 \times 10^{-7}$	6.44	35
1	$3.6 \times 10^{-6}$	5.44	70
10	$3.6 \times 10^{-5}$	4.44	111
50	$1.8 \times 10^{-4}$	3.74	135
100	$3.6 \times 10^{-4}$	3.44	155
150	$5.4 \times 10^{-4}$	3.27	165

Bu ölçüm sonuçlarına göre çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 9’da verilmiştir. Ölçümler üç kez tekrarlanmış ve her bir veri seti için ortalama değerler ve standart sapmayı hesaplamak üzere standart istatistiksel yöntemler uygulanmıştır. Güven aralığı % 95 tutulmuştur.





Şekil 9. Reflektometrik girişim spektroskopisinde farklı derişimlerdeki paraokson numunelerine ait kalibrasyon grafiği

Kalibrasyon doğrusu için paraoksonun çalışılan en yüksek derişimi olan  $5.4 \times 10^{-4}$  M değerine kadar reflektometrik girişim spektroskopisinde doğrusal bir ilişki olduğu gözlenmiş ve korelasyon katsayısı 0.9917 olarak bulunmuştur. LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması amacıyla kör çözeltisi için 5 farklı ölçüm alınmış ve alınan ölçüm sonuçlarına ait standart sapma değerinin 3.3 katının kalibrasyon grafiğinin eğim değerine oranı LOD değerinin, 10 katının kalibrasyon grafiğinin eğim değerine oranı LOQ değerinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Yapılan hesaplamalar sonucunda LOD değeri  $9.9 \times 10^{-8}$  M, LOQ değeri  $1.9 \times 10^{-7}$  M olarak bulunmuştur.

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, paraokson molekülünü tanıyan ve bağlayan reflektometrik girişim spektroskopisi (RIFS) temelli sensör sistemi geliştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak CMD biyoçip yüzeyine AChE enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Immobilizasyon işlemine başlamadan önce CMD biyoçip yüzeyinin aktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için CMD biyoçip yüzeyinden 3-dimetillaminopropil-N'-etilkarbodiimid ve N-hidroksisüksinimid çözelti karışımı geçirilmiştir. Yüzey aktivasyonu tamamlandıktan sonra biyoçip yüzeyinden  $5 \mu\text{L min}^{-1}$  akış hızında ve  $200 \mu\text{L}$  hacminde  $1.33 \times 10^{-5}$  M AChE çözeltisi geçirilmiştir. Enzim immobilizasyonundan sonra biyoçip yüzeyinden etanolamin çözeltisi geçirilerek spesifik olmayan bağlanma bölgeleri kapatılmıştır. Immobilizasyon işleminin bitiminden sonra temel sinyalde oluşan değişim incelenerek immobilizasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edilmiştir. Sinyalde görülen artış, immobilizasyonun başarılı bir şekilde tamamlandığını göstermiştir. Biyoçip yüzeyine AChE enzim immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra farklı derişimlerde paraokson çözeltilerinin analizi yapılmıştır. Bu amaçla  $3.6 \times 10^{-8}$  M- $5.4 \times 10^{-4}$  M arasında değişen derişimlerde paraokson çözeltileri kullanılmıştır. Elde edilen ölçüm sonuçları grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Reflektometrik girişim spektroskopisinde elde edilen kalibrasyon grafiği için paraoksonun çalışma aralığı  $1.9 \times 10^{-7}$  M- $5.4 \times 10^{-4}$  M olarak ve elde edilen grafiğe ait korelasyon katsayısı 0.9917 olarak bulunmuştur. LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması amacıyla kör çözeltileri hazırlanarak ölçüm alınmıştır. Yapılan hesaplamalar sonucunda LOD değeri  $9.9 \times 10^{-8}$  M, LOQ değeri  $1.97 \times 10^{-7}$  M olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar göstermektedir ki geliştirilen RIFS temelli yöntem kullanılarak çok düşük miktarlardaki paraokson tayini yapılabilir. Ayrıca paraokson dışındaki diğer organofosfat bileşikleri de vücut içerisinde asetilkolin esteraz enzimini inhibe etme özelliğine sahip olduğu için geliştirilen asetilkolinesteraz enzimi immobilize edilmiş bu RIFS sensör sistemi, paraokson dışındaki organofosfat bileşiklerinde de tayini için de kullanılabilir niteliktedir.

## **KAYNAKLAR**

- [1] Jeyeratnam J. Pesticides: poisoning as a global health problem. *World Health Stat* 1990; Q.43: 139-144.
- [2] Kamanyire R, Karalliedde L. Organophosphate toxicity and occupational exposure. *Occup Med (Lond)* 2004; 54: 69–75.
- [3] Sunay S. Paraoksonaz polimorfizminin ve paraoksonaz enzim aktivitesinin pestisitlere maruz kalan bireylerde araştırılması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, Tukey, 2010.
- [4] Hıncal F, Çeliker A, Özgüven Ş, Kaya E. Kimyasal ve biyolojik savaş ajanlarının sağlık üzerine etkileri. Ankara: Hacettepe İlaç ve Zehir Bilgi Merkezi 1991.
- [5] Karayılanoğlu T. Kimyasal atakta tıbbi savunma ve pestisitler. Ankara: GATA Basımevi 2003.
- [6] Marrs TC, Balantyne B. Pesticide toxicology. New York: Wiley 2002.
- [7] Şanlı Y. Çevre sorunları ve besin kirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 1984; Özel Sayı: 17-37.
- [8] Dragonov DI, Ladu BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2004; 369(1): 78-88.
- [9] Bajgar J. Organophosphates/Nerve Agents poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis and treatment. *Advances In Clinical Chemistry* 2004; Vol 38: 152-153.
- [10] Patocka J, Kuča K, Jun D, Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – Important enzymes of human body. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2004; Vol. 4: No. 4.
- [11] Textbook of Military Medicine. Washington, D.C.: Office of the surgeon general at TMM publications. 1997.
- [12] Patocka J, Kuca K, Jun D, Cabal J. Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: In vitro kinetics and thermodynamics. *J.Appl.Biomed.* 2005; 3:91-99.
- [13] Kousba AA, Sultatos LG, Poet TS, Timchalk C. Comparison of chlorpyrifos-oxon and paraoxon acetylcholinesterase inhibition dynamics: potential role of a peripheral binding site. *Toxicol Sci* 2004; 80(2): 239-48.
- [14] Başkol G, Köse K. Paraoksonaz: Biyokimyasal özellikleri, fonksiyonları ve klinik önemi. *Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal)* 2004; 26(2): 75-80.
- [15] Hong-Liang L, De-Pei L, Chih-Chuan L. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress and diseases. *J. Mol. Med.* 2003; 81(12): 766-79.
- [16] Rainwater DL, Rutherford S, Dyer TD, Rainwater ED, Cole SA, Vandenberg JL, Almasy L, Blangero J, Maccluer JW, Mahaney MC. Determinants of variation in human serum paraoxonase activity. *Heredity* 2009; 102(2): 147 54.
- [17] Stetter J, Penrose W. Understanding chemical sensors and chemical sensors arrays; past, present and future. *Sensors Update* 2002; Vol 10: 189-229.

- [18] Skoog DA, West DM, Holler FJ. Fundamentals of analytical chemistry. Saunders College Publishing. 1990; 496 p.
- [19] Dondurmacıoğlu F. Ağır metal iyonlarının tayini için optik sensörlerin geliştirilmesi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Tukey, 2011.
- [20] Hulanicki A, Glab S, İngman F. Chemical sensors definitions and classification. Pure&apl Chem 1991; 63(9): 1247-1250.
- [21] Wang J, Krause R, Block K, Musameh M, Mulchandani A. Dual amperometric-potentiometric biosensor detection system for monitoring organophosphorus neurotoxins. Analytica Chimica Acta 2009; 469: 197-203.
- [22] Hossain M, Faisal M, Kim C, Cha H, Nam S, Lee J. Amperometric proton selective strip-sensors with a microelliptic liquid/gel interface for organophosphate neurotoxins. Electrochemistry Communication 2011; 13: 611-614.
- [23] Lei C, Valenta M, Saripalli P, Ackerman J. Biosensing paraoxon in simulated environmental samples by immobilized organophosphorus hydrolase in functionalized mesoporous silica. J. Environ. Qual. 2007; 36: 233-238.
- [24] Meng Z, Yamazaki T, Sode K. Enhancement of the catalytic activity of an artificial phosphotriesterase using a molecular imprinting technique. Biotechnol. Lett. 2003; 25: 1075-1080.
- [25] Özkütük EB., Emir Diltemiz S, Özalp E, Gedikbey T, Ersöz A, Paraoxon imprinted biopolymer based QCM sensor. Materials Chemistry and Physics 2013, 139: 107-112.
- [26] Walz I., Schwack W. Reflectometric Cutinase Assay for Rapid Screening of Contaminants and Residues of Insecticidal Organophosphates and Carbamates, Journal of AOAC International, 2008, 91: 1130-1137.