GU J Sci, Part C, 8(1): 205-223 (2020)

Gazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Dergisi

PART C: TASARIM VE TEKNOLOJİ

http://dergipark.gov.tr/gujsc

Development of Nano Ache Enzyme Based Sensor for Determination of Nerve Agents Used in Chemical Weapons

Ozan YAĞMUROĞLU[1*], Sibel Emir DİLTEMİZ[2]

[1]*CBRN Department, Ministry of National Defense, Ankara,/Turkey*

[2]*Chemistry Department, Faculty of Science, Eskisehir Technical University, 26470, Eskisehir/Turkey*

Article Info:

Research article
Received: 16/09/2019
Revision 14/02/2020
Accepted: 24/02/2020

Highlights

- *Nerve agent sensors.*
- *Nano enzyme systems.*
- *Low detection limit.*

Keywords

Chemical weapon
Nerve agent
CBRN
Paraoxon
Nano enzyme

Graphical/Tabular Abstract

In this study nano enzyme system based sensor has been developed for detection of nerve agents used in chemical weapons production. The chemical substances forming the nerve agents are included in the group of organophosphorus compounds. Paraoxon was used as the organophosphorus compound. Paraoxon molecule irreversibly inhibits the acetylcholinesterase enzyme (AChE). In this respect, it is preferred because of its similarity to nerve agents.

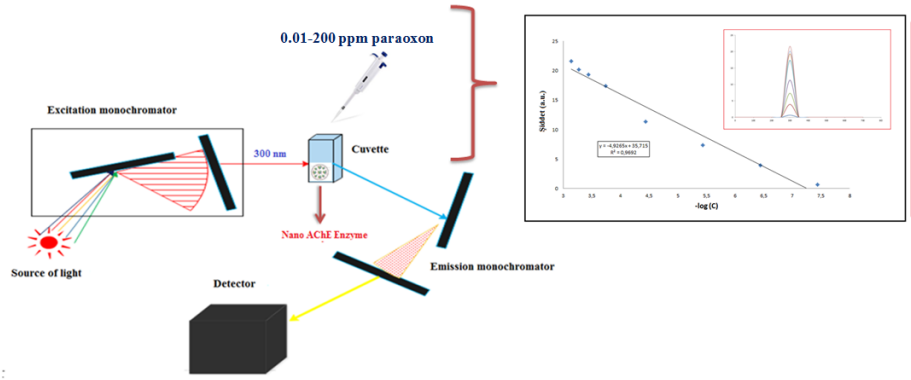


Figure A. Graphical representation of the study

Purpose: The aim of this study is to develop a sensor that can simultaneously determine the nerve agent molecule in the environment. For this purpose, a sensing layer based on the interaction between the AChE enzyme and the nerve agent has been developed.

Theory and Methods: Paraoxon molecule irreversibly inhibits the acetylcholinesterase enzyme (AChE). In this respect, it is preferred because of its similarity to nerve agents. In the sensor system, nano enzyme synthesized according to photosensitive cross-linking method with ruthenium based amino acid monomers was used as sensor layer. The fluorescence spectrum of the obtained nano enzyme was taken and observed to show fluorescence. As a result of the analyzes, working conditions were determined as wavelength of 300 nm and pH of 7,4.

Results: The fluorescence intensities of the paraoxon samples, which ranged from 0.01 ppm to 200 ppm, were measured after interaction with the nano-enzyme at 300 nm wavelength and 7.4 pH. Calibration graph is drawn by using the obtained data. According to the experimental results, the LOD value of the sensor system based on the Nano AChE enzyme was calculated as $6{,}0x10^{-8}$ M, and the LOQ was calculated as $6.98x10^{-8}$M.

Conclusion: The fluorescence intensities obtained in the study were transferred to the calibration graph. In the graphic obtained, a close relationship was observed and the regression coefficient was found to be 0.9692. In order to calculate LOD and LOQ , blank solutions were prepared and 5 different measurements were taken. As a result of the calculations, the LOD value was $6.0x10^{-8}$ M and the LOQ value was $6.98x10^{-8}$ M. These results show us that with the developed method, very low amounts of paraoxon samples can be analyzed.

* Corresponding author, e-mail: ozan.yagmuroglu@msb.gov.tr
DOI: 10.29109/gujsc.620441

GU J Sci, Part C, 8(1): 205-223 (2020)

Gazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Dergisi

PART C: TASARIM VE TEKNOLOJİ

http://dergipark.gov.tr/gujsc

Kimyasal Silahlarda Kullanılan Sinir Ajanlarının Tespitine Yönelik Nano Ache Enzim Sistemi Temelli Sensör Geliştirilmesi

Ozan YAĞMUROĞLU[1*] Sibel Emir DİLTEMİZ[2]

[1]*Milli Savunma Bakanlığı KBRN Savunma Daire Başkanlığı, Ankara/Turkey*

[2] *Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümü, 26470, Eskisehir/Turkey*

Makale Bilgisi

Araştırma makalesi
Başvuru: 16/09/2019
Düzeltme: 14/02/2020
Kabul: 24/02/2020

Anahtar Kelimeler

Kimyasal silah
Sinir ajanı
KBRN
Paraokson
Nano enzim

Öz

Bu çalışmada; kimyasal silah yapımında kullanılan sinir ajanlarının algılanmasına yönelik nano enzim sistemi temelli sensör geliştirilmiştir. Sinir ajanlarını oluşturan kimyasal maddeler organofosforlu bileşik grubu içerisinde yer almaktadır. Çalışmada organofosforlu bileşik olarak paraokson kullanılmıştır. Paraokson molekülü asetilkolinesteraz enzimini (AChE) geri dönüşümsüz olarak inhibe etmektedir. Bu yönüyle sinir ajanlarına benzemesinden dolayı tercih edilmiştir. Sensör sisteminde algılayıcı tabaka olarak rutenyum tabanlı aminoasit monomerleriyle fotosensitif çapraz bağlama yöntemine göre sentezlenen nano enzim sistemi kullanılmıştır. Elde edilen nano enzimin floresans spektrumu alınmış ve floresans özelliği gösterdiği gözlemlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda çalışma koşulları 300 nm dalga boyu ve 7,4 pH olarak belirlenmiştir. 300 nm dalga boyu ve 7.4 pH değerinde, 0.01 ppm ile 200 ppm arasında değişen paraokson numunelerinin nano enzim ile etkileştikten sonraki floresans şiddetleri ölçülmüştür. Elde edilen veriler kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Deneysel sonuçlara göre, Nano AChE enzimi temelli sensör sisteminin LOD (Gözlenebilme Sınırı) değeri $6{,}0\times10^{-8}$ M, LOQ (Tayin Sınırı) değeri $6{,}98\times10^{-8}$ M olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen bu nano enzim sistemi temelli sensör ile eser miktarda analit içeren numunelerin analizini yapmak mümkündür.

Keywords

Chemical weapon
Nerve agent
CBRN
Paraoxon
Nano enzyme

Development of Nano Ache Enzyme Based Sensor for Determination of Nerve Agents Used in Chemical Weapons

Abstract

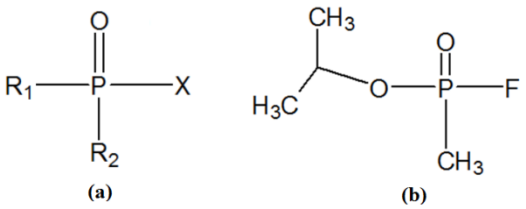
In this study; Nano enzyme system based sensor system has been developed for detection of nerve agents used in chemical weapons production. The chemical substances forming the nerve agents are included in the group of organophosphorus compounds. Paraoxon was used as the organophosphorus compound. Paraoxon molecule irreversibly inhibits the acetylcholinesterase enzyme (AChE). In this respect, it is preferred because of its similarity to nerve agents. In the sensor system, nano enzyme system synthesized according to photosensitive cross-linking method with ruthenium based amino acid monomers was used as sensor layer. The fluorescence spectrum of the obtained nano enzyme was taken and observed to show fluorescence. As a result of the analyzes, working conditions were determined as wavelength of 300 nm and pH of 7,4. The fluorescence intensities of the paraoxon samples, which ranged from 0.01 ppm to 200 ppm, were measured after interaction with the nano-enzyme at 300 nm wavelength and 7.4 pH. Calibration graph is drawn by using the obtained data. According to the experimental results, the LOD value of the sensor system based on the Nano AChE enzyme was calculated as $6{,}0\times10^{-8}$ M, and the LOQ was calculated as $6{,}98\times10^{-8}$M.

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Toksik etkileri sonucunda canlıları; öldürme, yaralama veya temel yaşam fonksiyonlarını bozarak etkisiz hale getirme gibi özelliklere sahip kimyasal maddelere genel olarak kimyasal savaş ajanı denilmektedir. 1993 yılında imzalanan Kimyasal Silahlar Sözleşmesine göre; kimyasal savaş ajanlarını yaymak için kullanılan her türlü teçhizat kimyasal silah olarak tanımlamıştır. Bu silahlar; insanları öldürmenin yanında, bitkisel, hayvansal besin stoklarını bulaş ile kullanılamaz hale getirme, ekonomik değeri yüksek hedefleri işlemez hale getirme, asker-sivil personeli koruyucu giysi, araç kullanmak zorunda bırakarak hareket kabiliyetlerini azaltma ve askeri birlikleri istenilmeyen yönlere sevk etme gibi amaçlarla kullanılmaktadır

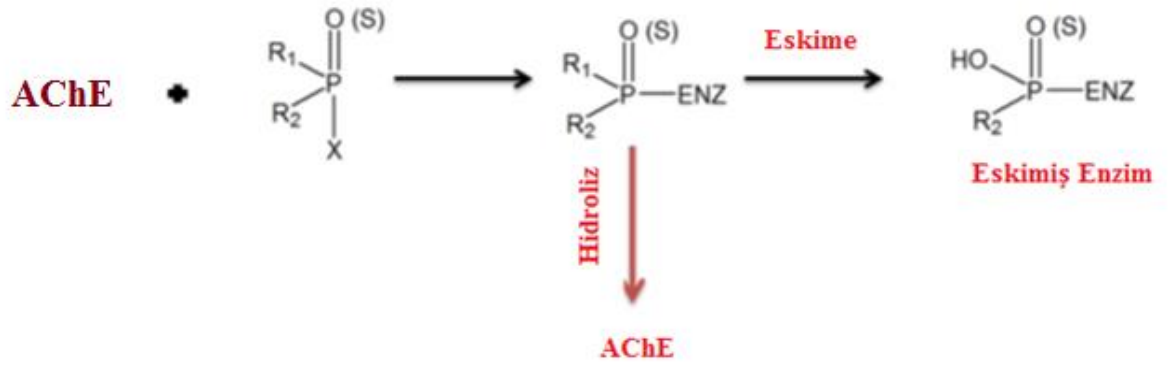
[1]. Kimyasal savaş ajanları vücuda deri, solunum sistemi, sindirim sistemi ve gözler yoluyla girebilmektedir. Bunlar; gaz, buhar, aerosol halinde solunduklarında burun ve ağız yoluyla vücuda alınmaktadırlar. Sıvı veya katı haldeki kimyasal ajanlar genel olarak deriyle temas ettiklerinde etkilerini göstermektedirler. Kimyasal silahlarda kullanılan kimyasal savaş ajanları; fiziksel özelliklerine, kimyasal özelliklerine, askeri kullanım amaçlarına, toksik özelliklerine ve etkilerine göre farklı sınıflara ayrılabilmektedir. Genel olarak kimyasal savaş ajanları toksikolojik özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Toksikolojik özelliklerine göre kimyasal savaş ajanları; sinir ajanları, yakıcı ajanlar, kan zehirleyici ajanlar, boğucu ajanlar, öldürücü olmayan kimyasal ajanlar olarak 5 farklı sınıfa ayrılmaktadır [2].

Sinir ajanlarının keşfi daha etkili pestisit geliştirmek için yapılan çalışmalara dayanmaktadır. Hem pestisitlerin hem de sinir ajanlarının molekül yapıları organofosforlu bileşiklere dayanmaktadır. Sinir ajanları ilk kez II. Dünya Savaşı'dan önce geliştirilmeye başlanmıştır. II. Dünya Savaşı esnasında ve sonrasında yeni ve daha etkili ajanlar üretmek için çalışmalar artarak devam etmiştir. İlk bulunan sinir ajanı tabundur. İlerleyen yıllarda ise sarin, soman ve VX ajanları geliştirilmiştir. Bilinen bazı sinir ajanları ise; Tabun (GA), Sarin (GB), Soman(GD), Siklosarin (GF), VX, VR-55, Goman, TGD'dir. Sinir ajanlarına maruz kalındığında oluşacak etkiler; burunda sebepsiz yere akıntı, tükürük salgılanmasında artış, zor nefes alıp verme, göğüste sıkışma hissi, göz bebeklerinde küçülme, görmede bulanıklık, baş ağrısı ve baş dönmesi, aşırı terleme, kusma, çırpınma, kaslarda kasılma olarak sıralanabilir. Sinir ajanının yarattığı etki, maruziyet şekline göre değişmektedir. Sadece yüzeysel bir temasta ortaya çıkan belirtiler ile vücuda emilimi sonucu ortaya çıkan belirtiler farklılık göstermektedir. Sinir ajanlarınında yapısını oluşturan organofosforlu bileşikler vücuttaki etkilerini sinir iletisini engelleyerek gösterirler. Bu bileşikler yapıları bakımından genel olarak esterler, amidler ve fosforik asidin tüol türevleridir. Organofosforlu bileşikler lipid çözünürlüğe sahiptirler [3]. Bundan dolayı deri, mukoza, konjoktiv ve solunum yolları tarafından vücuda alınırlar. Bu bileşikler hayvan ve insan tıbbında ilaç olarak, tarımsal uygulamalarda pestisit olarak ve askeri amaçlarla ise kimyasal savaş ajanı olarak kullanılmaktadırlar [4]. Organofosforlu bileşiklerin genel kimyasal yapıları şu şekildedir; molekülün merkezinde fosfor atomu bulunmakta ve fosfor atomu oksijen veya sülfür ile çift bağ yapmaktadır. Genel kimyasal yapıda bulunan R1-R2; hidrojen, alkil (siklik yapı dahil), aril, alkoksi, alkiltiyol ve amino gruplarını temsil etmektedir [2,5]. X ise halojenleri, siyano ve tiyol gruplarını ve inorganik-organik asitleri temsil eder. Organofosforlu bileşiklerin genel kimyasal yapısı ve sarin molekülünün kimyasal yapısı Şekil 1.'de gösterilmiştir.



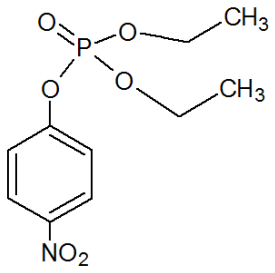
Şekil 1. *(a) Organofosforlu bileşiklerin genel molekül yapısı, (b) Sarin molekülü*

Organofosforlu bileşikler (OPB) vücuttaki etkilerini asetilkolinesteraz enziminin inhibisyonu üzerinden göstermektedir. OPB'ler AChE (Asetilkolinesteraz) enziminin aktif bölgesinde bulunan serin amino asitine bağlanarak enzim tarafından hidrolize edilirler [6]. Böylece enzimin aktif bölgesi fosforillenmiş olur [7]. AChE enzimi ile OPB'ler arasındaki reaksiyon iki basamakta gerçekleşir. Öncelikle geri dönüşümlü enzim-inhibitör kompleksi oluşur [8]. 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 (Şekil 2.) [9].



Şekil 2. *Organofosforlu bileşikler ile AChE arasındaki reaksiyon*

Paraokson; molekül kütlesi 275.2 g/mol ve kapalı formülü $C_{10}H_{14}NO_6P$ olan bir organofosforlu bileşiktir. Kimyasal adı o,o-dietil-o-p-nitrofenil fosfattır. Paraokson molekülü insan vücudunda asetilkolinesteraz (AChE) enzimi inhibitörü olarak davranır [10]. Parationun molekülünün aktif metabolitidir. AChE enzimini inhibe etme yeteneği çok güçlüdür [9]. İnsektisitler arasında inhibisyon açısından en kuvvetli organofosforlu bileşiklerden birisidir [12,13,14]. Sinir ajanı sarin molekülünün %70 kuvvetindedir ve canlılarda toksik etkilere yol açacağından dolayı kullanımı kısıtlıdır. Deri tarafından emilimi oldukça kolaydır [15]. Paraoksonun molekül yapısı Şekil 3'te verilmiştir.



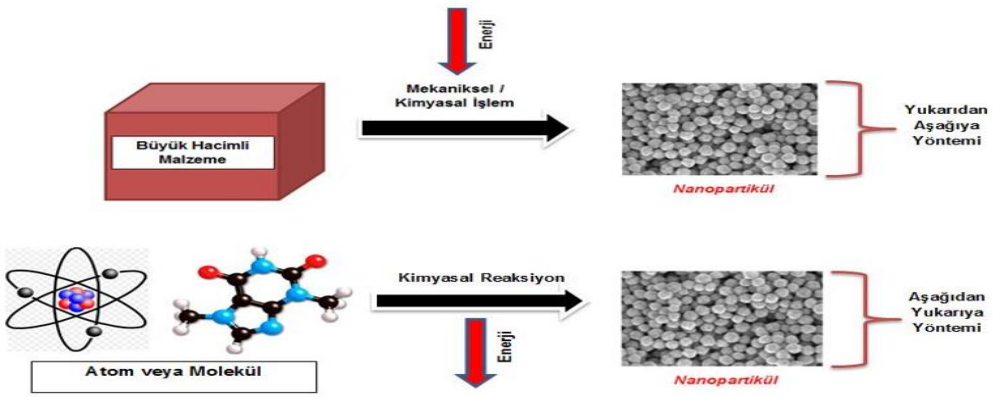
Şekil 3. *Paraoksonun (O,O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat) molekül yapısı*

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 [16]. Kimyasal reaksiyonun olmadığı sadece ortamdaki fiziksel değişimlerden yararlanarak ölçüm yapılan kimyasal sensörler mevcuttur. Bu tarz kimyasal sensörlerde absorbans değişimi, floresans değişimi, refraktif indeks, iletkenlik, sıcaklık ve kütle değişimi ölçülmektedir. Analit ortamı ile algılayıcı tabaka arasındaki reaksiyon sonucu meydana gelen değişikliklerden yararlanarak da ölçüm yapılabilir [17]. 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 denilmektedir [18-23].

Nanoteknoloji kavramında geçen "Nano" ön eki Latinceden gelmektedir ve "cüce, çok küçük" anlamında kullanılmaktadır. Kimya alanında nano kelimesi uzunluk kavramında nanometreyi ifade etmektedir [24]. Nanometre metrenin milyarda bir büyüklüğüne karşılık gelmektedir [25]. Nanometre ifadesinin boyutsal olarak daha iyi anlaşılması bakımından değişik büyüklüklere sahip varlıkların kıyaslanmasından yararlanılabilir. Örneğin; bir kağıdın kalınlığı yaklaşık 100000 nm, insan şaç teli yaklaşık 25000 nm, DNA sarmalı 2 nm civarındadır. Madde küçüldükçe özelliklerinde de değişmeler meydana gelmektedir. Boyutlar azaldıkça maddenin kuantum davranışları maddenin fiziksel özelliklerinin belirlenmesinde ön plana çıkmaktadır. Nano boyuttaki maddelerde, atom yapısının, bağlı atomların cinsinin, yapının büyüklüğünün

maddenin fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerinde büyük etkileri olduğu görülmektedir. Bu duruma örnek olarak karbon atomları gösterilebilir. Karbon atomlarından oluşan bir elmas kristali yalıtkan özellik gösterirken, karbon atomu ise yüksek derecede iletkenlik özelliğine sahiptir [25]. Nanoteknoloji; boyutları nanometre seviyesinde olan ve özellikleri açısından değerlendirdiğinde çok büyük avantajlar sağlayan malzemelerin üretimini ve geliştirilmesini tanımlamaktadır [26]. Nanoteknoloji ile amaçlanan, üstün özelliklere sahip malzemeler ve sistemler üreterek bunları nano boyutta elde edilebilir kılmaktır. Şuan kullanılmakta olan nanoteknoloji kavramı 1959 yılında Amerikan Fizik Topluluğu'na konuşma yapan Richard Feymann tarafından ortaya konulmuştur. Başlığı "En altta biraz yer var" olan konuşmasında günün birinde kalın ansiklopediklerin toplu iğne ucundan küçük alana sığdırılacağını ifade etmiştir. İlerleyen yıllarda yaptığı çalışmalarla Nobel ödülü almıştır. 1981 yılında taramalı tünel mikroskopunun (STM) icadı ve 1984 yılında atomik kuvvet mikroskopunun (AFM) icadıyla nano boyutta ölçüm yapılmaya başlanmıştır [25].

Makro boyuttaki bir malzemenin nano boyuttaki özellikleri incelendiğinde birçok özelliğinde farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Nano boyutu somut olarak canlandırmak gerekirse on tane yan yana konulmuş hidrojen atomu bir nanometre, DNA molekülleri yaklaşık olarak 2 nm, virüs 150 nm, biyolojik hücrelerin çapı ise bin nanometredir [27]. Nanoteknolojik malzemeler olarak tanımlanan yapılar; nanokristaller, nanopartiküller, nanotüpler, nanoteller, nanoçubuklar veya nano ince filmler gibi farklı sınıflara ayrılmaktadır. Boyutsal olarak 100 nm ve daha küçük olan toz halindeki maddelere nanopartiküller denilmektedir. Nanopartiküllerin diğer maddelerden en önemli farkı ve üstünlüğü; kuantum boyut etkileri, elektronik yapıları ile boyutları arasındaki ilişki, yüksek yüzey/hacim oranı olarak sıralanabilir [25, 28]. Günümüzde kullanılan malzemelerin ve teknolojilerin nano boyuta taşınması ile birlikte nanotaşıyıcılar, sensörler, nanomakinalar ve yüksek kapasiteli veri depolama hücreleri gibi özgün özelliklere sahip küçültülmüş cihazların üretilmesinin önü açılmıştır [29]. Nanopartiküller özelliklerine göre en basit şekliyle şu şekilde sınıflandırılabilir; karbon bazlı nanopartiküller (karbon nanotüpler), metal bazlı nanopartiküller (altın kolloidler, nanoçubuklar), yarı iletken bazlı nanopartiküller (kuantum noktaları vb.). Nanopartiküller yapıları gereği kararsızdırlar. Kararsızlık nedeniyle çözeltileri hazırlanırken topaklanma oluşumu meydana gelir ve homojen çözeltilerinin hazırlanmasını zorlaştırır. Bunun önüne geçmek için farklı sentez yöntemleri ve farklı yüzey modifikasyonları geliştirilmiştir. Çözelti hazırlanacakken ortama yüzey aktif maddeler ilave edilerek topaklanma önlenebilmektedir [30]. Nanopartiküllerin üretim yaklaşımları Şekil 4'te gösterilmektedir.



Şekil 4. *Nanopartikül üretiminde kullanılan yöntemler*

Nanopartiküllerin elde edilme yöntemlerini sınıflandırırken boyutsal yapı temel alınabileceği gibi, başlangıç fazlarından yola çıkarak sınıflandırmakta mümkündür. Buna göre buhar, sıvı ve katı yöntemler olarak da üç farklı teknik ortaya çıkmaktadır. Nanopartiküllerin başlangıç maddelerine göre üretim yöntemlerinin şematik gösterimi Şekil 5'te verilmiştir.



Şekil 5. *Nanopartiküllerin başlangıç fazlarına göre üretim yöntemleri*

Bu çalışmada nanopartikül elde edilirken rutenyum tabanlı amino asit monomerleriyle fotosensitif çapraz bağlama ve ANADOLUCA yöntemi kullanılmıştır. ANADOLUCA yöntemi (ANADOLUCA-AmiNoAcid (monomer) Decorated and Light Underpining Conjugation Approach) rutenyum tabanlı, ışığa duyarlı, amino asit monomer ve oligomerlerinin sentezi, ışığa duyarlı proteinlerin konjugasyonu ve çapraz bağlanmaları süreçlerinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir [31]. ANADOLUCA yönteminde; proteinlerde bulunan sistein, triptofan ve tirozin aminoasitleri ile rutenyum tabanlı amino asit monomerlerinin arasında çapraz bağlı konjugasyon işlemleri gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemin getirdiği en önemli avantajlardan bir tanesi, elde edilen ışığa duyarlı monomerlerin nano ve mikro yapılarda denatüre olmadan kullanılabilmesidir. ANADOLUCA yöntemi, silika materyallere, süperparamanyetik partiküllere, nanokristallere, karbon nanotüplere, Ag/Au nanopartiküllere ve Au yüzeylerine protein entegrasyonu yanı sıra proteinimsi polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında ve ilgili yüzeylerle entegrasyonuna da uygulanabilir. ANADOLUCA, yeniden ayrılabilir katı faz sistemleri, teranostikler (aynı anda tanı ve tedavi olanağı), nanoprotein taşıyıcılar, reseptör hedefli nanokargolar, biyosensörler, biyokataliz uygulamaları, yönetilebilir görüntüleme ve algılama teknolojileri gibi alanlarda kullanılabilen yeni nesil nanobiyokonjugantların oluşturulduğu bir yöntemdir [32]. ANADOLUCA; pH ve sıcaklıktan bağımsız, kataliz ve tayin amacıyla kullanılabilen bir yöntemdir. Bu teknikle elde edilen nano-biyokonjugantlarda bulunan proteinlerin fonksiyonu ve konformasyonları etkilenmez [31]. Bu çalışmada, paraokson molekülünü seçici olarak tanıyan ve bağlayan nano AChE enzim sistemi temelli sensör geliştirilmiştir. Geliştirilen sensörün performansının değerlendirilmesi maksadıyla literatür incelenmiştir [33-36]. Bu inceleme esnasında yapılan çalışmaların büyük kısmında organofosfatların hidrolizinden yararlanıldığı ve bunun sonucundaki değişimlerin analizin temelini oluşturduğu görülmüştür.

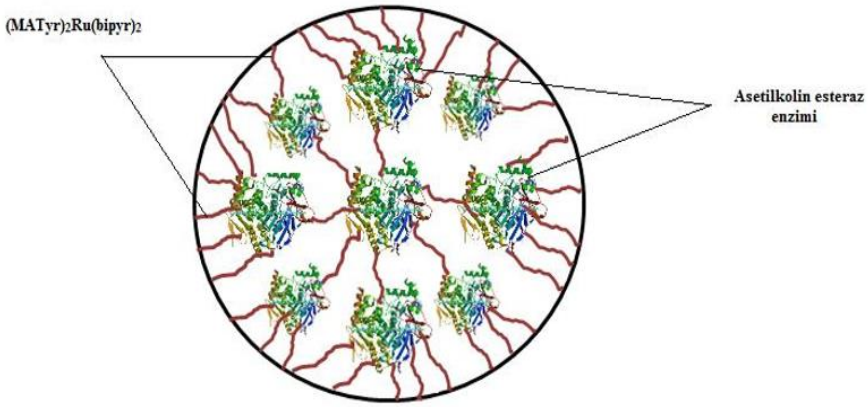
2. MATERYAL VE METOT (MATERIEL AND METHOD)

Çalışmalarda kullanılan tüm kimyasallar Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) firmasından temin edilmiştir. Saf su elde etmek için Thermo Scientific Barnstead™ Smart2Pure™ saf su cihazı kullanılmıştır. Kullanılan saf suyun iletkenliği 18 megaohmcm^{-1}'dir. Floresans ölçümleri Varian Cary Eclipse marka spektroflorometre cihazı ile yapılmıştır.

2.1. Nano AChE sentezi ve karakterizasyonu (Nano AChE synthesis and characterization)

Nano AChE enzimi elde edilirken mikroemülsiyon polimerizasyon tekniği kullanılmıştır. Bu teknik ANADOLUCA metodundaki prosedüre göre uygulanmıştır[31]. Öncelikle mikroemülsiyon polimerizasyon ortamı hazırlanmıştır. Bunun için 0,5 g polivinil alkol 45 mL deiyonize suda dispers edilmiştir. 150 µL 1000 ppm AChE, $(MATyr)_2Ru(bipyr)_2$ ile etkileştirilmiş ve hazırlanan dispersiyon ortamına ilave edilmiştir. Dispersiyon ortamı 1 saat azot ortamında bekletilmiştir. Daha sonra polimerizasyonda başlatıcı olarak kullanılan amonyum persülfat (APS) reaksiyon ortamına ilave edilmiştir. Polimerizasyonun gerçekleşmesi için hazırlanan karışım, azot ortamında ve gün ışığına maruz kalacak

şekilde oda sıcaklığında 48 saat beklemeye bırakılmıştır. Polimerleşmenin gerçekleşmesinin ardından elde edilen nano AChE enzimleri 10000 rpm devirde santrifüjlenerek reaksiyon ortamından alınmıştır. Akabinde nano AChE enzimleri 5 kez deiyonize su ile yıkanmıştır. Elde edilen nano AChE enziminin yapısı Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6. *Nano AChE yapısı*

2.2. Nano AChE enziminin paraokson ile etkileşiminin incelenmesi (Investigation of the interaction of nano AChE enzyme with paraoxon)

Nano AChE ile paraoksonun etkileşiminin incelenmesi maksadıyla 0,01-200 ppm arasında değişen derişimlerde numuneler hazırlanmıştır. Nano AChE enziminden 100 µL, paraokson çözeltilerinden 1 mL alınarak toplam karışım deiyonize su ile 3 mL'ye seyreltilmiştir. Elde edilen çözelti floresans cihazının küvetine konulmuş ve ölçümler alınmıştır. Ölçümler yapılırken numune 300-625 nm dalga boyu aralığıda değişen ışınlarla uyarılmış ve maksimum şiddet elde edilen dalga boyu çalışma için seçilmiştir.

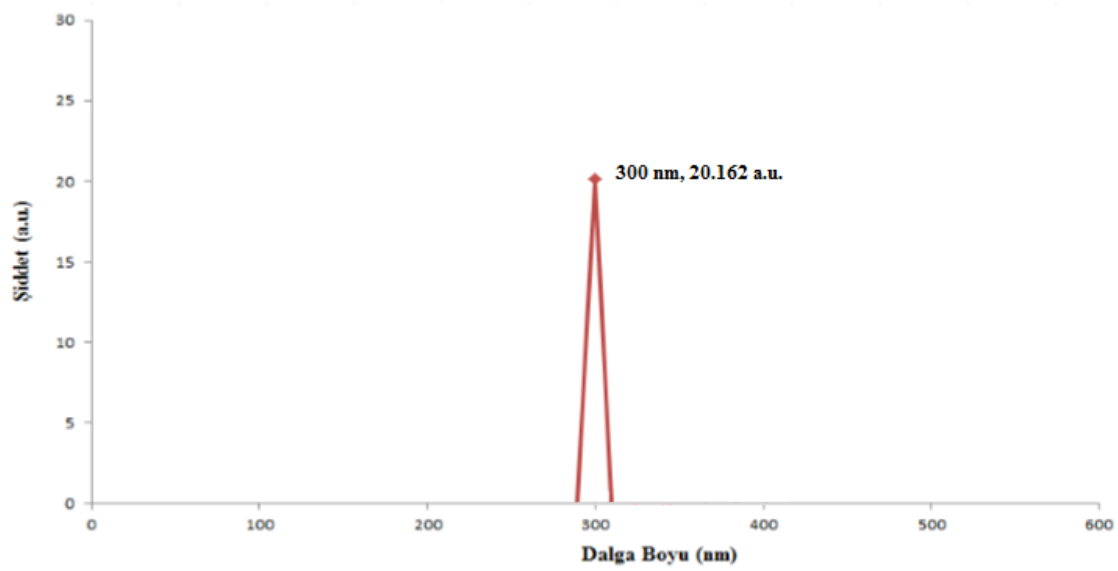
2.3. Uygun çalışma pH'sının belirlenmesi (Determination of the optimum pH)

100 µL nano AChE üzerine 1 mL 150 ppm paraokson çözeltisi eklendikten sonra farklı pH'lardaki tampon çözeltiler ile toplam hacim 3 mL'ye seyreltilmiştir. Elde edilen çözelti çalışılan dalga boyundaki ışınla uyarılarak floresans şiddetleri karşılaştırılmıştır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA (RESULTS AND DISCUSSION)

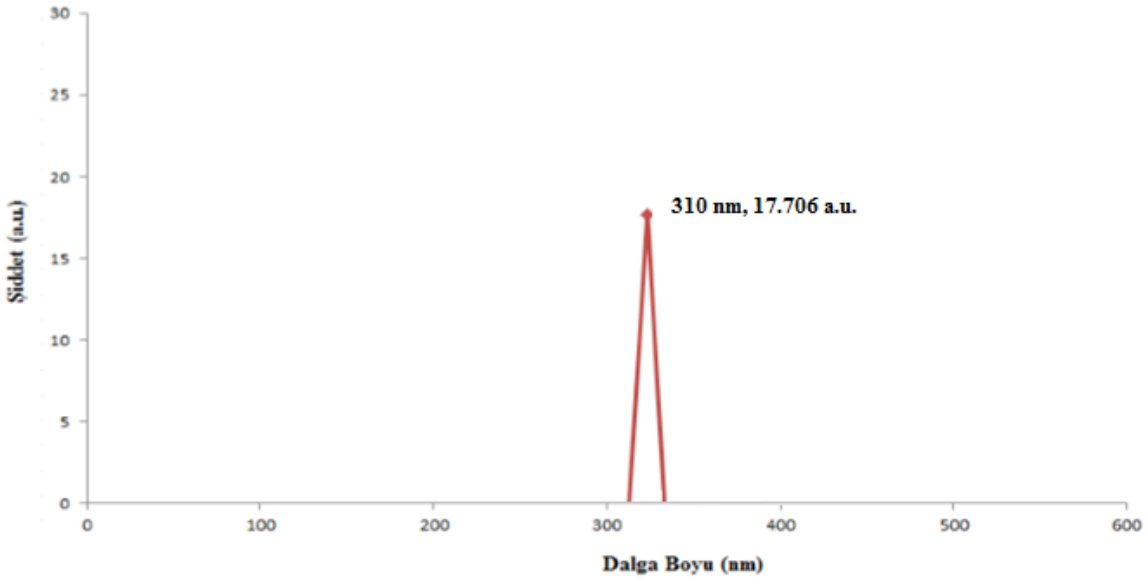
3.1 Nano AChE enzimi ile numune analizinde çalışılacak dalga boyunun belirlenmesi (Investigation of wavelength to be studied with Nano AChE enzyme)

Nano AChE enzimiyle paraokson etkileşimini floresans spektrofotometresi yardımıyla incelemek için öncelikle çalışılacak dalga boyu belirlenmiştir. Bunun için 150 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm ile 625 nm arasında değişen dalga boylarında floresans şiddetleri ölçülmüştür. Analiz yapılırken tampon çözelti olarak olarak HEPES (pH=7,4) kullanılmıştır. 150 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 7'de verilmiştir.



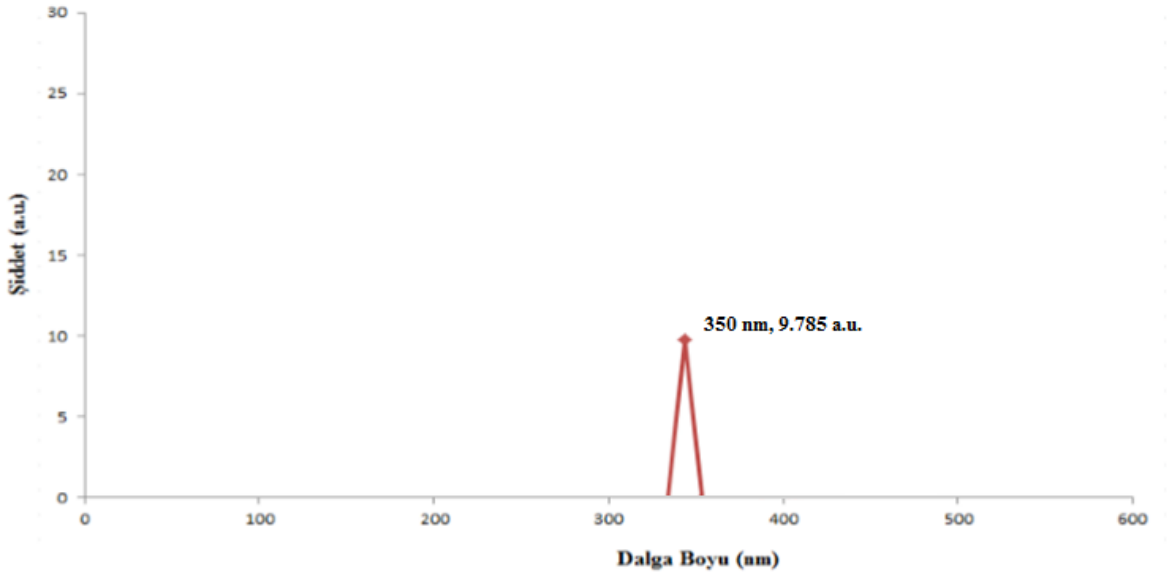
Şekil 7. *150 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu*

150 ppm paraokson içeren numunenin 310 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 8'de verilmiştir.



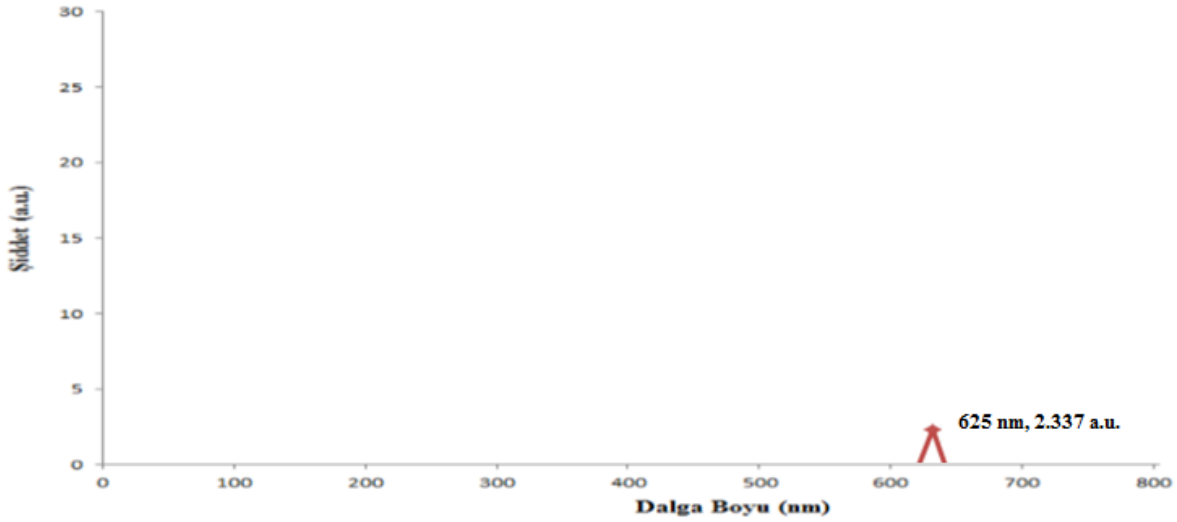
Şekil 8. *150 ppm paraokson içeren numunenin 310 nm dalga boyundaki floresans spektrumu*

150 ppm paraokson içeren numunenin 350 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 9'da verilmiştir.



Şekil 9. *150 ppm paraokson içeren numunenin 350 nm dalga boyundaki floresans spektrumu*

150 ppm paraokson içeren numunenin 625 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 10. *150 ppm paraokson içeren numunenin 625 nm dalga boyundaki floresans spektrumu*

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde en yüksek floresans şiddetini veren dalga boyunun 300 nm olduğu görülmüştür. Bundan sonraki ölçümlerde çalışılacak dalga boyu olarak 300 nm belirlenmiştir.

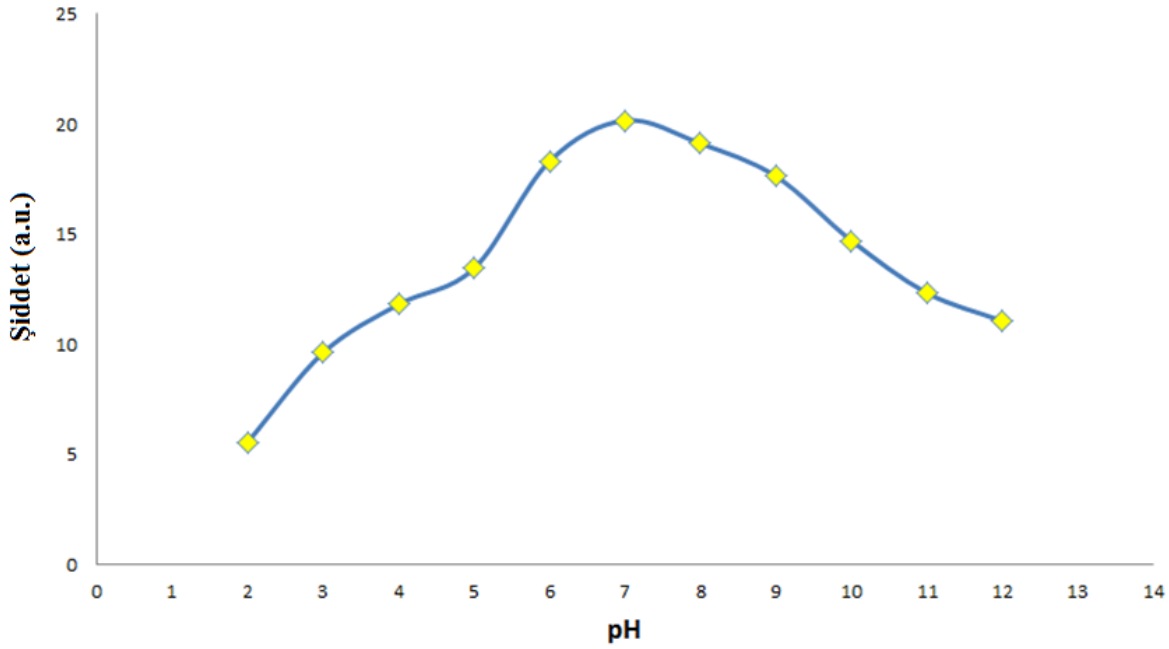
3.2. Nano AChE enzimi ile numune analizinde çalışılacak pH'nın belirlenmesi (Determination of pH to be studied in sample analysis with nano AChE enzyme)

Analizler esnasında çalışılacak pH'nın belirlenmesi amacıyla çeşitli pH değerlerine sahip tampon çözeltiler hazırlanmıştır. 100 µL nano AChE, 150 ppm paraokson çözeltisinden 1 mL alınmış ve hazırlanan tampon çözeltilerle hacim 3 mL'ye seyreltilmiştir Farklı pH değerlerine sahip olarak hazırlanan her bir numune çözeltisi 300 nm dalga boyuna sahip ışınla uyarılarak floresans şiddetleri ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda elde edilen veriler Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. *Farklı pH değerlerinde elde edilen floresans şiddetleri*

ppm(mg/L)	pH	Intensity (a.u.)
150	2	5,571
150	3	9,623
150	4	11,818
150	5	13,456
150	6	18,314
150	7	20,162
150	8	19,115
150	9	17,631
150	10	14,711
150	11	12,336
150	12	11,071

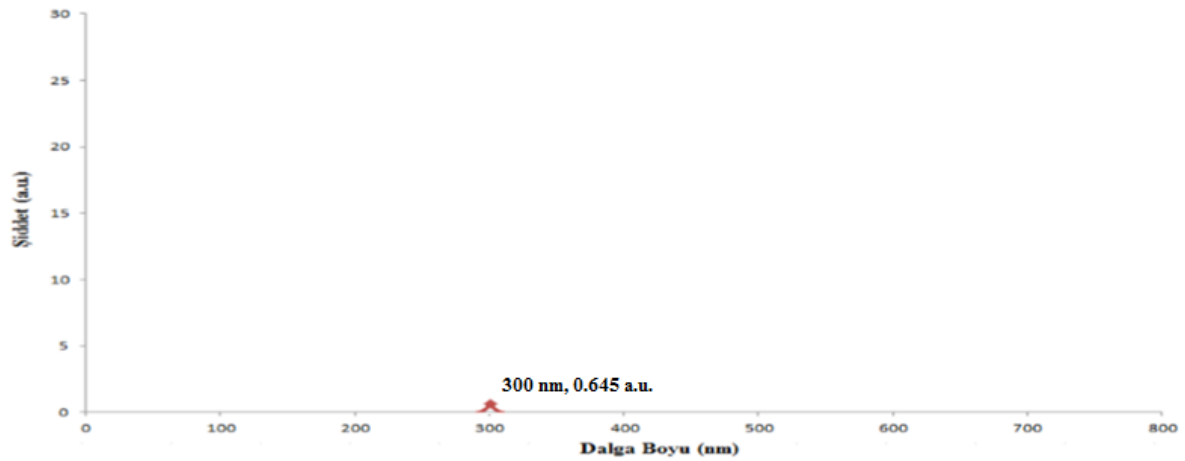
Elde edilen ölçüm sonuçları grafiğe geçirilmiştir (Şekil. 11). Ölçüm sonuçları incelendiğinde en yüksek floresans şiddetinin pH 6-8 arasında elde edildiği görülmüştür. Bundan dolayı bundan sonraki analizlerde HEPES (pH=7,4) tamponu kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 11. *Ölçüm sonuçlarına pH etkisi*

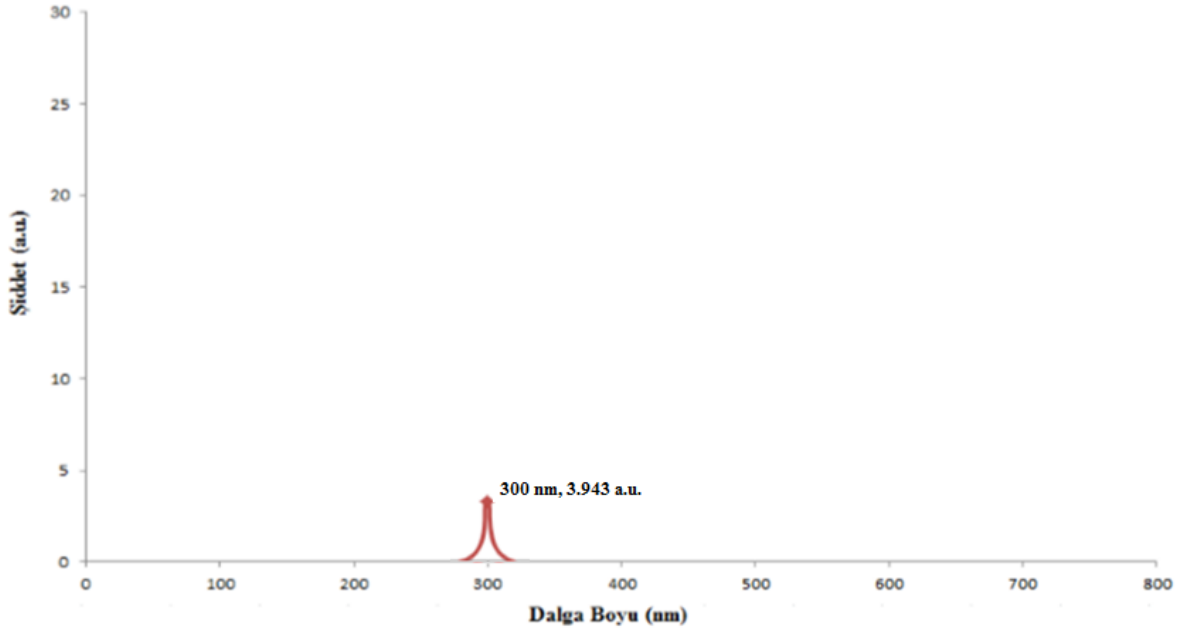
3.3 Nano AChE enzimi ile artan derişimdeki paraokson arasındaki etkileşimin incelenmesi (Investigation of the interaction between nano AChE enzyme and paraoxon at increasing concentration)

Farklı derişimlerdeki paraokson ile nano AChE etileşimini incelemeden önce çalışılacak pH ve dalga boyunu belirlemiştik. Şimdi ise belirlenen çalışma şartlarında 0,01 ppm ile 200 ppm arasında değişen paraokson numunelerinin floresans şiddetleri ölçülmüştür. 0,01 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 12'de verilmiştir.



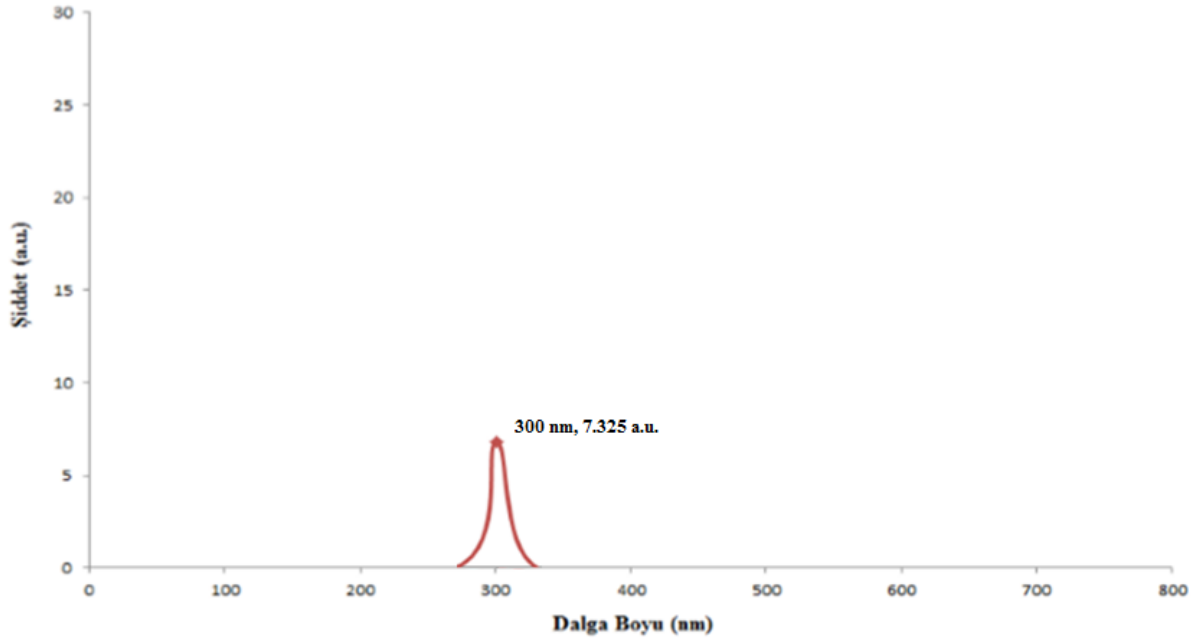
Şekil 12. *0,01 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu*

0,1 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 13'de verilmiştir.



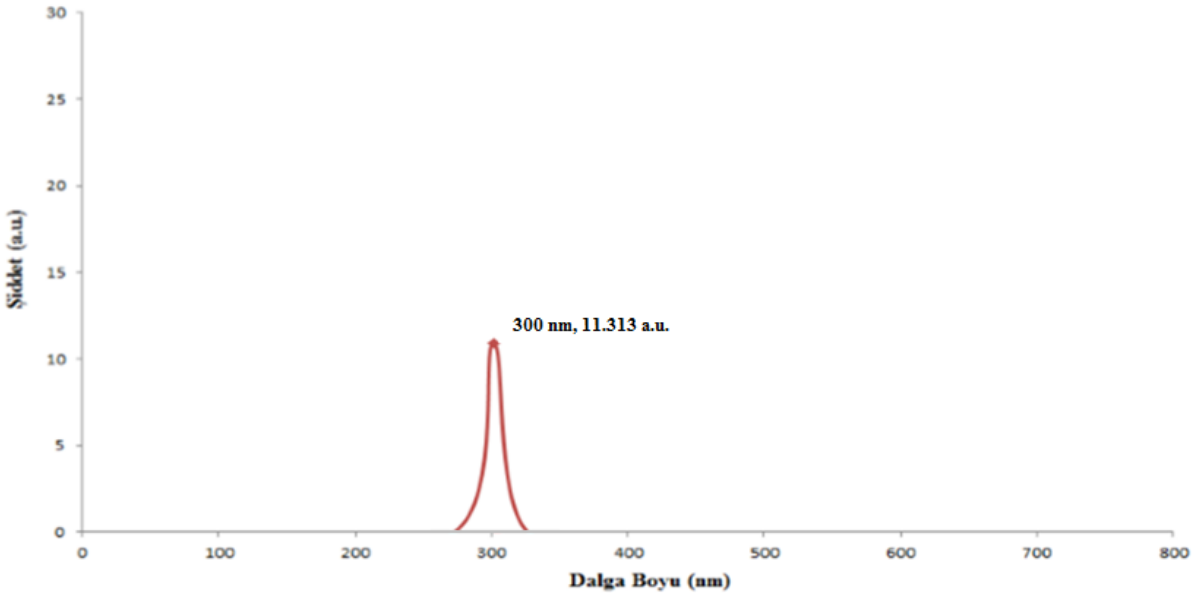
Şekil 13. *0,1 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu*

1 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 14'de verilmiştir.



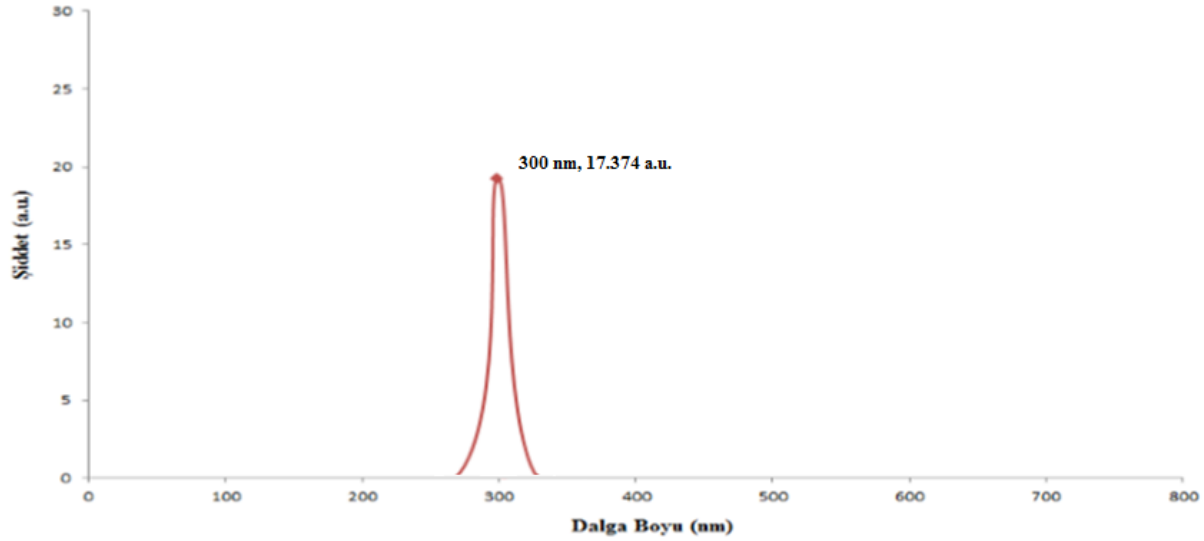
Şekil 14. *1 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu*

10 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 15'de verilmiştir**.**



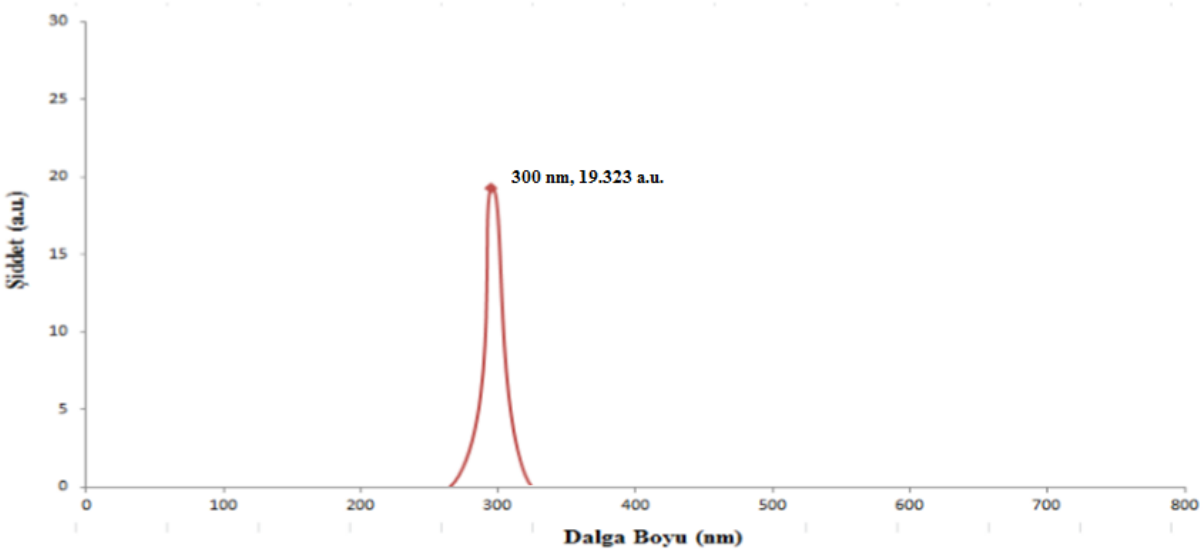
Şekil 15. *10 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu*

50 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 16'da verilmiştir.



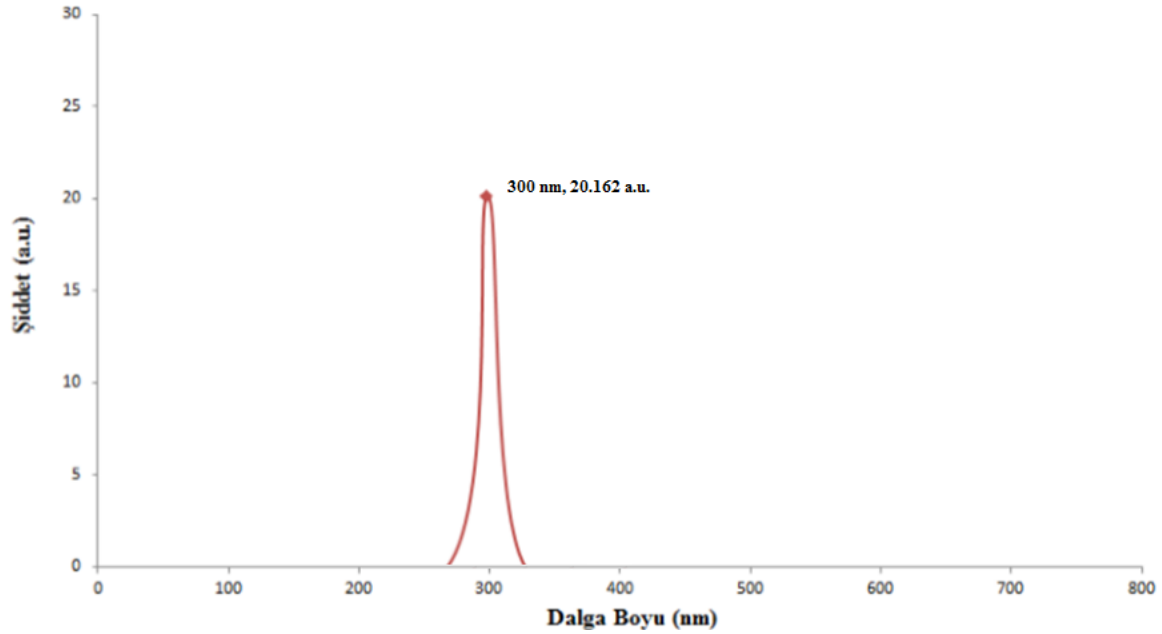
Şekil 16. *50 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu*

100 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 17'de verilmiştir.



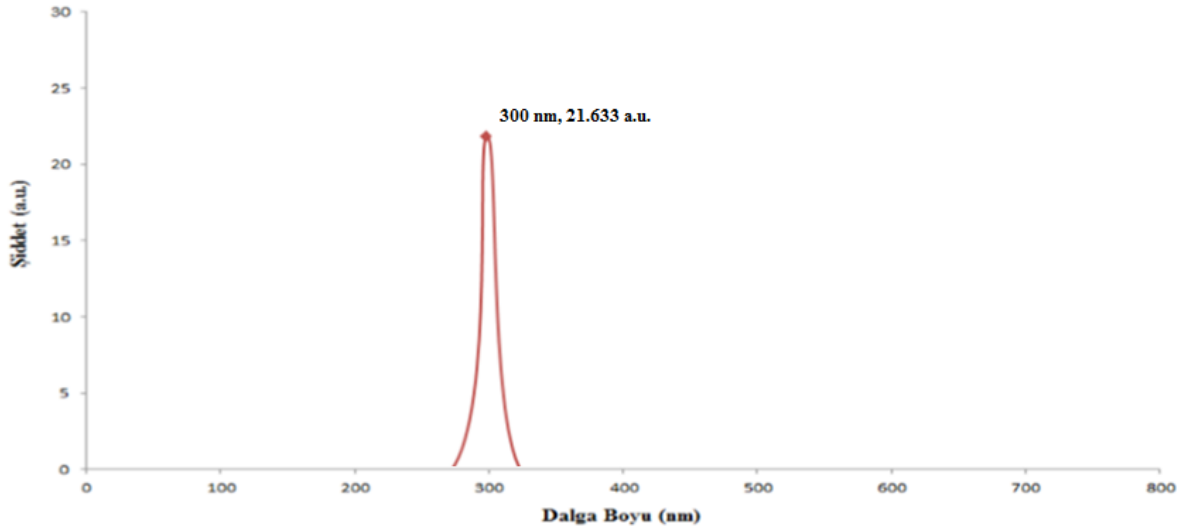
Şekil 17. *100 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu*

150 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 18'de verilmiştir.



Şekil 18. *150 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu*

200 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu Şekil 19'da verilmiştir.



Şekil 19. *200 ppm paraokson içeren numunenin 300 nm dalga boyundaki floresans spektrumu*

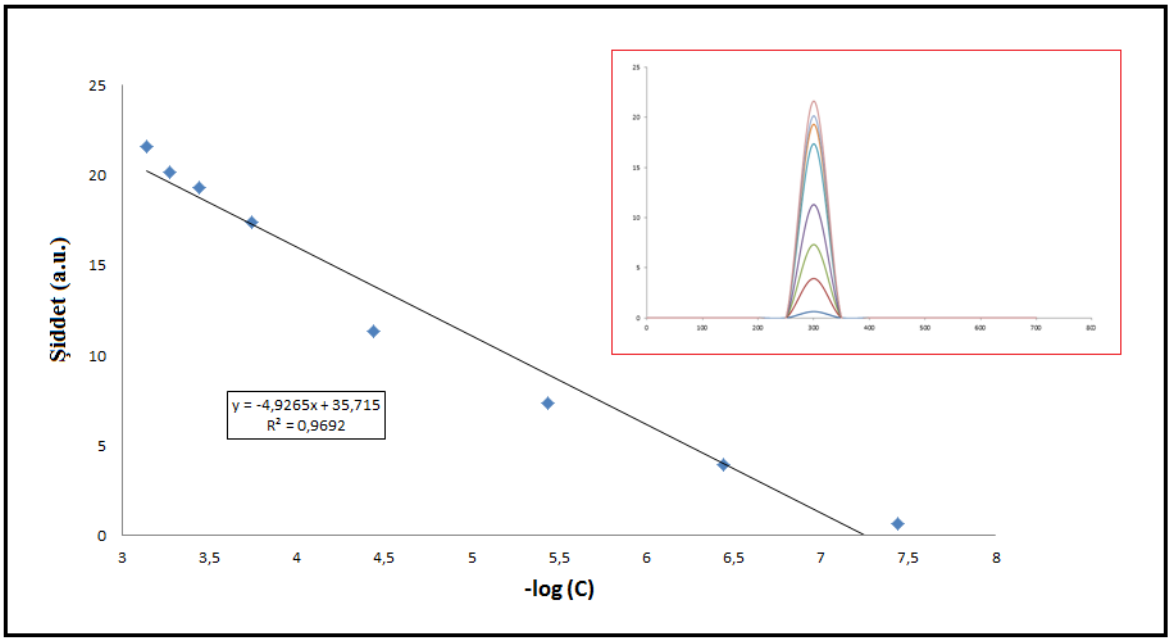
Farklı konsantrasyonlarda paraokson numuneleri için elde edilen ölçüm sonuçları toplu olarak Tablo 2'de gösterilmektedir.

Tablo 2. *Paraokson numunelerine ait floresans şiddetleri*

ppm(mg/L)	Floresans Şiddeti (a.u.)
0.01	0,645
0.1	3,943
1	7,325
10	11,313
50	17,374
100	19,323
150	20,162
200	21,633

3.4 Floresans ölçümleri sonucunda elde edilen paraoksona ait kalibrasyon grafiği (Calibration graph of paraoxone obtained as a result of fluorescence measurements)

Paraoksonun farklı derişimlerdeki numuneleriyle alınan floresans ölçümleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafik Şekil 20'de gösterilmiştir.



Şekil 20. *Farklı derişimlerdeki paraokson numunelerine ait kalibrasyon grafiği*

Kalibrasyon doğrusu için paraoksonun çalışılan en yüksek derişimi olan $7{,}2 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} değerine kadar floresans spektroskopisinde doğrusala yakın bir ilişki gözlenmiş ve elde edilen regresyon katsayısı 0,9692 olarak bulunmuştur. LOD (Gözlenebilme Sınırı) ve LOQ (Tayin Sınırı) hesaplanması maksadıyla blank (kör) çözeltileri hazırlanarak 5 farklı ölçüm alınmıştır (Tablo 3).

***Tablo 3**. Blank çözeltilerden alınan ölçüm sonuçları*

Ölçüm Numarası	Floresans Şiddeti (a.u.)
1	0,32
2	0,37
3	0,35
4	0,41
5	0,29

Alınan ölçüm sonuçlarının ortalaması 0,348, standart sapma ise 0,046 olarak hesaplanmıştır. Bulunan standart sapma değerinden yararlanılarak LOD ve LOQ değerlerine geçilmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda LOD değeri $6{,}0 \times 10^{-8}$ M, LOQ değeri $6{,}98 \times 10^{-8}$ M olarak bulunmuştur.

4. SONUÇ (CONCLUSION)

Bu çalışmada, kimyasal silah yapımında kullanılan sinir ajanlarının algılanmasına yönelik nano enzim sistemi temelli sensör geliştirilmiştir. Nanopartikül olarak rutenyum tabanlı aminoasit monomerleriyle fotosensitif çapraz bağlama (ANADOLUCA) yöntemine göre sentezlenen nano enzim sistemi kullanılmıştır. Nano AChE enzimi elde edilirken mikroemülsiyon polimerizasyon tekniği kullanılmıştır. AChE, $(MATyr)_2Ru(bipyr)_2$ ile etkileştirilerek mikroemülsiyon polimerizasyon ortamı hazırlanmıştır. Başlatıcı olarak ise APS kullanılmıştır. Elde edilen nano enzimin floresans spektrumu alınmış ve floresans özelliği gösterdiği gözlemlenmiştir. Daha sonra nano enzim sisteminde çalışılacak dalga boyunu belirlemek maksadıyla 300-625 nm aralığında AChE nano enzimi 150 ppm paraokson ile etkileştirilmiş ve floresansın en çok değiştiği dalga boyu çalışılacak dalga boyu olarak seçilmiştir. Yapılan ölçümlerde çalışılacak dalga boyu olarak 300 nm belirlenmiştir. Daha sonra çalışma pH'sını belirlemek maksadıyla pH 2-12 arasında 150 ppm paraokson numunesi için ölçümler alınmış ve en uygun pH'nın 6-8 arasında olduğu gözlemlenmiştir. Bu maksatla tampon çözelti olarak HEPES (pH=7,4) kullanılmıştır. 300 nm dalga boyu ve 7,4 pH değerinde, 0,01 ppm ile 200 ppm arasında değişen paraokson numunelerinin nano enzim ile etkileştikten sonraki floresans şiddetleri ölçülmüştür. Elde edilen floresans şiddetleri kalibrasyon grafiğine geçirildi. Elde edilen grafikte doğrusala yakın bir ilişki gözlenmiş ve elde edilen regresyon katsayısı 0,9692 olarak bulunmuştur. LOD (Gözlenebilme Sınırı) ve LOQ (Tayin Sınırı) hesaplanması maksadıyla blank (kör) çözeltileri hazırlanarak 5 farklı ölçüm alınmıştır. Hesaplamalar sonucunda LOD değeri $6{,}0 \times 10^{-8}$ M, LOQ değeri $6{,}98 \times 10^{-8}$ M olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar bize göstermektedir ki geliştirilen yöntemle çok düşük miktarlardaki paraokson numunelerinin analizi yapılabilmektedir.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

[1] Karayılanoğlu,T. (1996). Kimyasal, biyolojik ve nükleer silahların tıbbi etkileri. Ankara: GATA Basımevi.

[2] Hıncal, F., Çeliker, A., Özgüven, Ş., Kaya, E. (1991). Kimyasal ve biyolojik savaş ajanlarının sağlık üzerine etkileri. Ankara: Hacettepe İlaç ve Zehir Bilgi Merkezi.

[3] Jeyeratnam, J. (1990). Pesticides: poisining as a global health problem. World Health Stat., Vol. Q.43, 139-144.

[4] Kamanyire, R., Karalliedde, L. (2004). Organophosphate toxicity and occupational exposure. Occup. Med., Vol. 54, 69–75.

[5] Sunay, S. (2010). Paraoksonaz polimorfizminin ve paraoksonaz enzim aktivitesinin pestisitlere maruz kalan bireylerde araştırılması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 80-85.

[6] Şanlı, Y. (1984). Çevre sorunları ve besin kirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, Özel Sayı, 17-37.

[7] Dragonov, D. I., Ladu, B.N. (2004). Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmocol, Vol.369(1), 78-88.

[8] Bajgar, J. (2004). Organophosphates/Nevre Agents poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis and treatment. Advances In Clinical Chemistry, Vol. 38, 152-153.

[9] Patocka, J., Kuča, K. (2004). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – Important enzymes of human body. Acta Medica (Hradec Králové), Vol. 4, No. 4.

[10] Textbook of Military Medicine. Washington, D.C.: Office of the surgeon general at TMM publications, 1997.

[11] Patocka, J., Kuca, K., Jun, J. (2005). Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: In vitro kinetics and thermodynamics. J.Appl.Biomed., Vol.3, 91-99.

[12] Kousba, A. A., Sultatos, L.G., Poet, T.S., Timchalk, C. (2004). Comparison of chlorpyrifos-oxon and paraoxon acetylcholinesterase inhibition dynamics: potential role of a peripheral binding site. Toxicol Sci., Vol.80(2), 239-48.

[13] Başkol, G., Köse, K. (2004). Paraoksonaz: Biyokimyasal özellikleri, fonksiyonları ve klinik önemi. Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal), Vol.26(2), 75-80.

[14] Hong-Liang, L., De-Pei, L. Chih-Chuan, L. (2003). Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress and diseases. J. Mol. Med., Vol.81(12), 766-79.

[15] Rainwater, D.L., Rutherford, S.T., Dyer, D.E., Rainwater, D.S.A., Cole, J., Vandeberg, L., Almasy, L., Blangero, J. J., Maccluer, W., Mahaney, M. C. (2009). Determinants of variation in human serum paraoxonase activity. Heredity, Vol.102(2), 147-154.

[16] Stetter, J., Penrose, W. (2002). Understanding chemical sensors and chemical sensors arrays; past, present and future. Sensors Update, Vol.10, 189-229.

[17] Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. (1990). Fundamentals of analytical chemistry. Saunders College publishing.

[18] Dondurmacıoğlu, F. (2011). Ağır metal iyonlarının tayini için optik sensörlerin geliştirilmesi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul,.

[19] A. Hulanicki, Glab, S., İngman, F. (1991). Chemical sensors definitions and classification. Pure&apl Chem., Vol.63(9), 1247-1250.

[20] Yağmuroğlu, O. (2018). Kimyasal Savunma ve Güvenlik. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Basımevi, s.3,30.

[21] Yağmuroğlu, O., Diltemiz, SE. (2020). Development of QCM based biosensor for the selective and sensitive detection of paraoxon. Analytical Biochemistry, 591, 113572.

[22] Diltemiz, S., Yağmuroğlu, O. (2019). Development of reflectometric interference spectroscopy based sensors for paraoxon determination. Eskişehir Technical University Journal of Science and Technology - C Life Sciences and Biotechnology, 8 (1), 12-22.

[23] Yağmuroğlu, O. (2017). Development of paraoxon-based sensors for the detection of chemical warfare agents. Doctoral Thesis. Anadolu University, Eskişehir.

[24] Ateş, H., Kaya, B., Bahçeci, E. (2015). Nano malzemeler için üretim yöntemleri. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi Part C: Tasarım ve Teknoloji, 3(2), 483–499.

[25] Bergeson, L.L. (2004). The regulatory implications of nanotechnology. Environmental Quality Management, Vol.14(1), 71-82.

[26] Bayındır, M., Köylü, Ö. (2006). Türkiye'de nanoteknoloji. Bilim ve Teknik Dergisi - Yeni Ufuklar, Vol.469, 1-23.

[27] Erkoç, Ş. (2010). Nanobilim ve nanoteknoloji. Ankara: ODTÜ Yayıncılık.

[28] Liveri, F. (2006). Controlled synthesis of nanoparticles in microheterogeneous systems. New York: Springer science and Business media.

[29] Goldstain, A. (1997). Handbook of nanophase materials. New York: Marcel Dekker Inc.

[30] Doron, A., Katz, E., Willner, I. (1995). Organization of au colloids as monolayer films onto glass surfaces: application of the metal colloid films as base ınterfaces to construct redox-active monolayers. Langmuir, Vol.11, 1313-1317.

[31] Say, R., Ersoz, A., Hur, D., Yılmaz, F., Denizli, A., Atılır Özcan, A., Emir Diltemiz, S., Yazar, S., Biçen, Ö., Büyüktiryaki, S., Keçili, R., Saka, G., Fındık, T. (16.06.2011). Photosensıtıve aminoacid-monomer linkage and bioconjugatıon applıcatıons ın lıfe scıences and bıotechnology. U.S. Patent, No: WO/2011/070402.

[32] Köse, E. (2015). Yapısında birden fazla fonksiyonu barındıran hetero nano-enzim yapılar ve elısa uygulamaları. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.

[33] Wang, J., Krause, R., Block, K., Musameh, M., Mulchandani, A. (2009). Dual amperometric-potentiometric biosensor detection system for monitoring organophosphorus neurotoxins. Analytica Chemica Acta., Vol.469, 197-203.

[34] Lei, C., Valenta, M., Saripalli, P., Ackerman, J. (2007). Biosensing paraoxon in simulated environmental samples by immobilized organophosphorus hydrolase in functionalized mesoporous silica. J. Environ. Qual., Vol.36, 233-238.

[35] Hossain, M., Faisal, M., Kim, C., Cha, H., Nam, S., Lee, J. (2011). Amperometric proton selective strip-sensors with a microelliptic liquid/gel interface for organophosphate neurotoxins. Electrochemistry Communication, Vol.13, 611-614.

[36] Meng, Z., Yamazaki, T., Sode, K. (2003). Enhancement of the catalytic activity of an artificial phosphotriesterase using a molecular impirinting technique. Biotechnol. Lett., Vol.25, 1075-1080.