

**MODEL SENTETİK POLİMERLERİN VE
KOMPLEKSLERİNİN GAZ FAZI KARAKTERİSTİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF GAS-PHASE CHARACTERISTICS OF
MODEL SYNTHETIC POLYMERS AND THEIR
COMPLEXES**

MEHMET ATAKAY

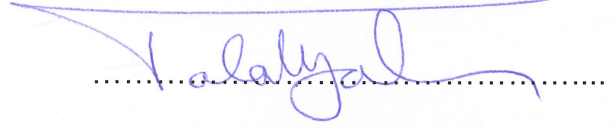
PROF. DR. BEKİR SALİH
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

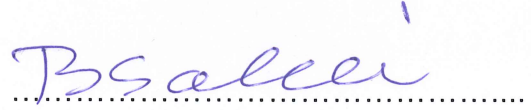
2016

MEHMET ATAKAY' ın hazırladığı “**Model Sentetik Polimerlerin ve Komplekslerinin Gaz Fazı Karakteristiklerinin İncelenmesi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI'** nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

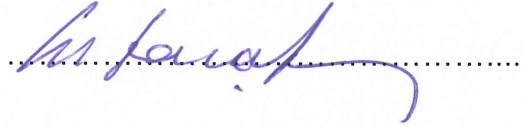
Prof. Dr. Talat YALÇIN
Başkan



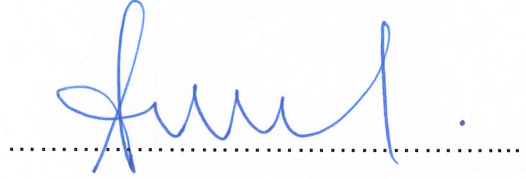
Prof. Dr. Bekir SALİH
Danışman



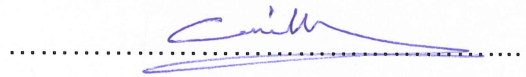
Prof. Dr. Mehmet SAÇAK
Üye



Prof. Dr. Pınar AKKAŞ KAVAKLI
Üye



Yrd. Doç. Dr. Cengiz UZUN
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Salih Bülent ALTEN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

OZAN'IMA & ASLI'MA,

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

09/12/2016

MEHMET ATAKAY

ÖZET

MODEL SENTETİK POLİMERLERİN VE KOMPLEKSLERİNİN GAZ FAZI KARAKTERİSTİKLERİNİN İNCELENMESİ

Mehmet ATAKAY

Doktora, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bekir SALİH

Aralık 2016, 141 sayfa

Kütle spektrometrisi, kovalent olmayan komplekslerin çözelti ve gaz fazlarındaki oluşum parametreleri ile ilgili faydalı bilginin yüksek doğruluk ve hassasiyetle elde edilmesi için en uygun tekniktir. İyon hareketliliği-kütle spektrometrisi (IM-MS) ise bunlara ek olarak analiz edilen moleküllerin konformasyonları ile ilgili detaylı veriler de sağlamaktadır. IM-MS analizlerinden elde edilen sürüklenme zamanı verilerinden iyonların ortalama momentum transfer etki alanları ile ilişkili bir boyut parametresi olan etkin çarpışma kesitleri (CCS) belirlenebilmektedir. Çalışmaların başlangıcında, poli-L-lizin (PLL) ve polistiren sülfonik asit (PSS) örnekleri, MALDI tandem uçuş zamanlı (ToF/ToF) kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. Bu türlerin zincir sonu grupları, MALDI kütle spektrumlarından alınan veriler değerlendirilerek belirlenebilmiştir. PLL ve PSS karışımları, farklı molar oranlarda hazırlanmış ve bunların kovalent olmayan komplekslerine ait sinyaller, negatif moddaki MALDI-MS analizi ile gözlenebilmiştir. Kovalent olmayan PLL-PSS kompleksleri için önerilen stokiyometri oranları, alınan MALDI-MS/MS spektrumları ile doğrulanmıştır. Kovalent olmayan PLL-PSS kompleksleri, iyon hareketliliği analizi özelliğine sahip ESI-Q/ToF-MS cihazı ile pozitif ve negatif iyon modunda gözlenebilmiştir. İyon hareketliliğine göre ayırma özelliğinden yararlanılarak farklı yük ve stokiyometrilere sahip kompleksler kolaylıkla tayin edilebilmiştir. Pozitif ve negatif iyon modunda gözlenen kovalent olmayan kompleks

iyonlarının çoğu, cihazın transfer hücresinde gerçekleştirilen çarpışmayla aktifleştirilmiş parçalama ile daha küçük iyon birimlerine ayrılmıştır. Pozitif ve negatif iyon modlarında alınan ESI-MS/MS spektrumlarının kompleks stokiyometrilere ile uyumlu oldukları görülmüştür. Bir başka polianyon olan poli(akrilik asit) (PAA) örneği, tek başına analiz edilmiş ve bu örneğin farklı zincir sonu gruplarına sahip altı adet PAA iyon serisi içerdiği gözlenmiştir. Bazı serilerin PAA çözeltisinde kesin olarak bulunduğu, diğerlerinin ise muhtemelen kütle spektrometrik analiz sırasında gaz fazında oluştukları belirlenmiştir. Farklı PAA serileri içeren PLL-PAA kompleks iyonlarının sıklıklarının kıyaslanması için CCS değerleri ayrı ayrı hesaplanmıştır. Alınan sonuçlar, her türün zincir sonu grubu büyüklüklerinin kovalent olmayan komplekslerinin gaz fazındaki konformasyonlarını etkilediklerini göstermiştir. Poli(L-glutamik asit) (PGA) polianyonu analiz edildiğinde örnek içerisinde doğrusal ve halkalı formlarının bulunduğu belirlenmiştir. PLL-PGA karışımı da bu polielektrolitlerin komplekslerinin gözlenmesi için analiz edilmiştir. Polielektrolit iyonlarının sıklıklarının kıyaslanması için her birinin CCS değerleri ayrı ayrı hesaplanmıştır. Alınan verilere göre polielektrolitlerin gaz fazındaki konformasyonlarının tekrar eden birimleri üzerindeki fonksiyonel gruplara bağlı olduğu belirlenmiştir. Polielektrolit kompleks iyonlarının CCS değerleri de hesaplanmıştır. Komplekslerin CCS değerlerinin kıyaslanması, yüklü grupların itme kuvvetlerini azaltması veya daha geniş yapıların oluşması gibi durumların kompleks iyonlarının oluşumlarındaki farklılıkları meydana getirebildiklerini göstermiştir. Lizozim proteininin CSS değerinin komplekse katılan PSS zinciri sayısına göre değişimini belirlemek için lizozimin PSS oligomerleri ile oluşturdukları kovalent olmayan kompleksler de bu tez çalışmasında incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kovalent olmayan kompleksler, polielektrolit kompleksleri, etkin çarpışma kesiti, iyon hareketliliği-kütle spektrometrisi.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF GAS-PHASE CHARACTERISTICS OF MODEL SYNTHETIC POLYMERS AND THEIR COMPLEXES

Mehmet ATAKAY

Doctor of Philosophy, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Bekir SALİH

December 2016, 141 pages

Mass spectrometry is the most convenient technique for obtaining useful information about the formation parameters of noncovalent complexes in both solution and gas phases with high accuracy and sensitivity. Ion mobility-mass spectrometry (IM-MS) additionally gives conformational data about the analyzed molecules. From the drift time data obtained from the IM-MS analyses, the collision cross sections (CCS) of ions can be determined, which is a size parameter related to the averaged momentum transfer impact area of the ions. At the beginning of the studies, poly-L-lysine (PLL) and polystyrene sulfonic acid (PSS) were analyzed using MALDI tandem time-of-flight (ToF/ToF) mass spectrometer. The end groups of their chains could be determined by evaluating data obtained from MALDI mass spectra. Mixtures of PLL and PSS were prepared in various molar ratios and the signals of their noncovalent complexes could be detected in the negative ion mode MALDI-MS analysis. The MALDI-MS/MS spectra confirmed the proposed stoichiometries of the observed noncovalent complexes of PLL and PSS. Noncovalent complexes of PLL and PSS could also be detected in both positive and negative ion mode using ESI-Q/ToF-MS with ion mobility capabilities. Complexes with various charge states and stoichiometries could be identified easily utilizing ion mobility separation. Most of the noncovalent complex ions obtained in

positive and negative ion modes were fragmented upon collisionally activated dissociation in the transfer cell unit of the instrument. ESI-MS/MS spectra obtained for both positive and negative ion modes correlated well with the stoichiometry of the complexes. Another polyanion, polyacrylic acid (PAA) sample was analyzed by itself in detail and six different types of PAA series with various end groups were detected in the sample. It was determined that some of the series must have been present in the PAA sample solution while the other series were probably generated in gas phase during the MS experiment. CCS of PLL-PAA complex ions with different PAA series were derived separately for comparison of their compactness. The results prove that the sizes of end groups of each species affect the conformation of the noncovalent complex in the gas phase. When the poly-L-glutamic acid (PGA) was analyzed, it was determined that its sample contains linear and cyclic forms of PGA. A mixture of PLL and PGA was also analyzed in order to monitor the complexes formed between these polyelectrolytes. The CCS of polyelectrolyte ions were derived individually for comparing their compactness. It was obtained that the gas-phase conformations of the polyelectrolytes depend on the nature of functional groups located in their repeating unit. The CCS values of polyelectrolyte complex ions were also derived. Comparison of the CCS values of the complexes indicated that differences in complex ion formation may be caused by reducing repulsion forces between charged groups or forming more extended structures. Noncovalent complexes of lysozyme formed with PSS oligomers were also examined in the dissertation to determine how the CCS of protein changed with the stoichiometry of the PSS chains in the complex.

Keywords: Noncovalent complexes, Polyelectrolyte complexes, collision cross section, ion mobility-mass spectrometry.

TEŞEKKÜR

Sonunu tahmin edemedim yürüdüğüm yolda vazgeçmeden ilerleyebilmemi sağlayan, bugüne kadar öğrendiklerimde büyük katkısı olan, hatalarımı ve eksikliklerimi yüzüme vurmadan her zaman onlardan ders çıkararak kendimi geliştirmemi öğütleyen, kütle spektrometrisi çalışma alanıyla beni buluşturan çok değerli danışmanım ve yol göstericim Prof. Dr. Bekir Salih'e bana inandığı ve emeğini verdiği için çok teşekkür ederim.

Engeller ve zorluklarla dolu çetin bir yolda yürürken yanınızda güvenebileceğiniz bir yol arkadaşınızın olması çok önemlidir. Tanıştığımız günden beri çıkmaza girdiğim zamanlarda tavsiyeleri ile yolu bulmamı sağlayan, bildiğini çekinmeden benimle paylaştığınız dostum, yol arkadaşım Dr. Hacı Mehmet Kayılı'ya teşekkür ederim.

Laboratuvarında çalışmalardan bunaldığım zaman beraber oturup soluklanabildiğim, yokluğunda varlığını büyük bir özlemlerle andığım bir arkadaşım olduğu için çok şanslıyım. Dinleyen, anlayan, içtenlikle anlatan, hesap etmeden yardım eden, paylaşmaktan keyif alan, güzel insan, gönüllü psikoloğum, sevgili dostum Ülkü Güler Tokat'a teşekkür ederim.

Kendilerini tanıdığım için çok mutlu olduğum, değerli arkadaşlarım, Ayşegül Özgen ve Canan Höçük'e teşekkür ederim.

Laboratuvarında beraber çalışmaktan çok keyif aldığım arkadaşlarım, Nazire Barlas, Öykü Ülkü, Alper Altınöz ve İzzet Avcı'ya benimle paylaştıkları yaratıcı fikirleri ve yardımları için teşekkür ederim.

Başta lisans öğrencileri, Büşra Ovalı ve Buğra Balaban olmak üzere tüm SAREG üyelerine teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın yürütülmesinde laboratuvar imkanlarını kullanmama izin vererek, bilgi birikimini benimle paylaşan Prof. Dr. Chrys Wesdemiotis ve Akron Üniversitesi kütle spektrometrisi araştırma grubundaki öğrencileri, Selim Gerişlioğlu, Dr. Ahlam Alalwiat, Dr. Xiumin Liu, Sahar Sallam, Dr. Kai Guo, Michelle Kushnir, Dr. Lydia Cool, AJ Marino'a teşekkür ederim.

Kendisiyle geç tanıştığımı düşündüğüm, bundan sonra her zaman yanında olacağım dostum Serhad Tilki'ye hoş sohbeti ve değerli tavsiyeleri için teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım süresince 2211 ve 2214-A burs programları kapsamında destek sağlayan TÜBİTAK-BİDEB'e teşekkür ederim.

Benim için yaşamımdaki her şeyden daha değerli olan, hayatımı anlamlandıran eşim Aslı Atakay'a tüm yardımları ve zor zamanlarımda bana gösterdiği sevgi ve sabır için minnettarım. Oğlumuzun yetiştirilmesinde bulunduğu özveri karşılığında kendisine ne kadar teşekkür etsem azdır. Birlikte sahip olduğumuz ailemize, annelerimize, babalarımıza, kardeşlerimize çok teşekkür ederim. Her an onların varlıkları ve sağlıkları için şükrediyorum.

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|---------------------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | iii |
| TEŞEKKÜR | v |
| İÇİNDEKİLER..... | vi |
| ŞEKİLLER | viii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | xii |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Sentetik Polimerler | 3 |
| 2.2. Polimer Karakterizasyonu | 4 |
| 2.3. Kütle Spektrometrik Polimer Analizi | 7 |
| 2.3.1. İyonlaştırma Yöntemleri | 8 |
| 2.3.1.1. Matriks-Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma (MALDI) | 9 |
| 2.3.1.2. Elektrosprey İyonlaştırma (ESI) | 12 |
| 2.3.2. Kütle Ayırıcıları..... | 17 |
| 2.3.2.1. Dört Kutuplu Kütle Ayırıcısı..... | 18 |
| 2.3.2.2. Uçuş Zamanlı Kütle Ayırıcısı | 19 |
| 2.3.2.3. Dört Kutuplu/Uçuş Zamanlı Kütle Ayırıcısı (Q/TOF) | 22 |
| 2.3.3. Dedektörler | 22 |
| 2.4. Tandem Kütle Spektrometrisi | 23 |
| 2.5. İyon Hareketliliği-Kütle Spektrometrisi (IM-MS)..... | 27 |
| 2.5.1. Kaydırmalı Dalga İyon Hareketliliği Spektrometrisi (Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry, TWIMS) | 29 |
| 2.5.2. Etkin Çarpışma Kesiti (Collision Cross Section, CCS) | 31 |
| 2.5.3. IM-MS ile Polimer Karakterizasyonu | 34 |
| 2.6. Kovalent Olmayan Kompleksler | 37 |
| 2.7. Polielektrolitler..... | 41 |
| 2.7.1. Polielektrolit Çoklu Tabakaları | 42 |
| 2.7.2. Polielektrolit Kompleksleri | 45 |
| 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR..... | 49 |
| 3.1. Kullanılan Kimyasallar | 49 |
| 3.2. MALDI-MS Analizleri | 49 |
| 3.3. İyon Hareketliliği Kütle Spektrometrisi (IM-MS) Analizleri | 51 |

| | |
|---|-----|
| 3.4. Moleküler Modelleme ve Simülasyon..... | 52 |
| 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA..... | 54 |
| 4.1. Standart Bir Polikasyon-Polianyon Çiftinin MALDI-MS ile Analizi | 54 |
| 4.1.1. Standart Bir Polikasyon-Polianyon Çiftinin Komplekslerinin MALDI-MS Analizleri | 58 |
| 4.2. İyon Hareketlilik Kütle Spektrometrisi ile Polielektrolitlerin ve Komplekslerinin Analizleri | 63 |
| 4.2.1. PLL-PSS Komplekslerinin IM-MS Analizleri..... | 68 |
| 4.2.2. Polikasyon-Polianyon Komplekslerinin Etkin Çarpışma Kesitlerinin Hesaplanması..... | 81 |
| 4.2.3. Bir Polielektrolitin Farklı Zincir Sonu Gruplarına Sahip Oligomerlerinin Analizi | 86 |
| 4.2.4. Polielektrolitlerin Zincir Sonu Gruplarının Komplekslerin Etkin Çarpışma Kesitlerine Etkilerinin İncelenmesi | 92 |
| 4.2.5. Halkalı Yapıdaki Polielektrolitin Komplekslerinin İncelenmesi..... | 93 |
| 4.2.6. Polielektrolit Komplekslerinin CCS Değişimlerinin Kıyaslanması | 99 |
| 4.3. Protein-Polielektrolit Etkileşiminin İyon Hareketliliği-Kütle Spektrometrisi ile İzlenmesi..... | 101 |
| 5. SONUÇLAR | 107 |
| 6. KAYNAKLAR..... | 113 |
| EKLER | 131 |
| ÖZGEÇMİŞ | 140 |

ŞEKİLLER

Sayfa

| | |
|---|----|
| Şekil 2.1. Kütle spektrometrelerinin genel bileşenleri. | 8 |
| Şekil 2.2. MALDI sisteminin şematik gösterimi | 10 |
| Şekil 2.3. ESI sisteminin şematik gösterimi. | 13 |
| Şekil 2.4. ESI sırasında iyonların oluşumu. | 14 |
| Şekil 2.5. (A) Polietilen glikolün (3400) ESI kütle spektrumu ve (B) Kütle/yük oranı ekseninin kütle eksenine dönüştürülmüş hali | 15 |
| Şekil 2.6. Dört kutuplu kütle ayırıcısının şematik gösterimi..... | 18 |
| Şekil 2.7. (A) Lineer ve (B) reflektör uçuş zamanlı kütle spektrometrelerinin şematik gösterimi. Aynı m/z oranına, farklı kinetik enerjilere sahip iyonlar, “■” (yüksek kinetik enerjiye sahip) ve “□” (düşük kinetik enerjiye sahip) işaretleri ile gösterilmektedir. ... | 20 |
| Şekil 2.8. Tandem kütle spektrometrisinin temel basamakları..... | 24 |
| Şekil 2.9. Çarpışmayla aktifleştirilmiş parçalamanın şematik gösterimi. | 25 |
| Şekil 2.10. (A) Daldırma yöntemi ile yüzey modifikasyonu basamaklarının basit gösterimi, (B) Sıra ile polikasyon ve polianyon zincirlerinin yüzeye yerleştirilmesi ve (C) Örnek olarak verilen polikasyon ve polianyonların tekrar eden birimleri..... | 43 |
| Şekil 2.11. LbL yönteminde en sık kullanılan polielektrolitlerin molekül yapıları | 44 |
| Şekil 3.1. Bruker Ultraflex MALDI-ToF/ToF cihazının şematik gösterimi | 50 |
| Şekil 4.1. (A) PLL'ye ait pozitif iyon MALDI kütle spektrumu (B) MALDI kütle spektrumunun m/z 750-1150 aralığının genişletilmiş hali. Alt indisle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir. Ardışık PLL zincirleri arasındaki kütle farkı 128 Da'dır. İşaretlenen tüm iyonlar protonlanmış haldedir. | 55 |
| Şekil 4.2. PSS'ye ait negatif iyon MALDI kütle spektrumu. Alt indisle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir. (*) ile Na ⁺ /H ⁺ değişimine uğramış anyonlar gösterilmektedir. Ardışık PSS zincirleri arasındaki kütle farkı 184 Da'dır | 57 |
| Şekil 4.3. PLL'ye ait negatif iyon MALDI kütle spektrumu. Ardışık PLL zincirleri arasındaki kütle farkı 128 Da'dır..... | 58 |
| Şekil 4.4. (A) PLL ve PSS'nin 5:1 (PLL:PSS) mol oranındaki karışımına ait negatif iyon MALDI kütle spektrumu ve (B) PLL ve PSS karışımına ait, m/z 1550-2750 aralığı genişletilmiş MALDI kütle spektrumu. Ardışık PSS zincirleri arasındaki kütle farkı 184 Da'dır. Alt indisle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir | 61 |
| Şekil 4.5. Dokuz birimli PLL ve beş birimli PSS'nin oluşturduğu kovalent olmayan komplekse ait negatif iyon MALDI-MS/MS kütle spektrumu. Alt indisle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir..... | 62 |
| Şekil 4.6. SYNAPT HDMS, Q/ToF kütle spektrometresinin şematik gösterimi. | 63 |
| Şekil 4.7. SYNAPT HDMS cihazının üçlü dalga bölümünün şematik gösterimi..... | 64 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.8. Halka elektrotlar (solda); halka elektrotlarda iyonların kaydırmalı dalga ile iletiminin şematik gösterimi (sağda) | 65 |
| Şekil 4.9. PLL'ye ait iki boyutlu ESI-IM-MS grafiği. Daire içine alınan bölümler (1) 1+ yüklü, (2) 2+ yüklü PLL iyonlarına karşılık gelmektedir..... | 66 |
| Şekil 4.10. PLL'ye ait iki boyutlu ESI-IM-MS grafiğindeki 1. bölgenin kütle spektrumu. H / OH zincir sonu gruplarını içeren PLL zincirleri L_n ile işaretlenmiştir. İşaretlenen tüm iyonlar tek yüklü ve protonlanmış haldedir. Alt indisle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir. Ardışık PLL zincirleri arasındaki kütle farkı 128 Da'dır..... | 67 |
| Şekil 4.11. PLL'ye ait iki boyutlu ESI-IM-MS grafiğindeki 2. bölgenin kütle spektrumu. H / OH zincir sonu gruplarını içeren PLL zincirleri L_n ile işaretlenmiştir. İşaretlenen tüm iyonlar 2+ yüklü ve protonlanmış haldedir. Alt indisle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir. Ardışık PLL zincirleri arasındaki kütle farkı 64 Da'dır..... | 68 |
| Şekil 4.12. PLL ve PSS'nin 5:1 (PLL:PSS) mol oranındaki karışımına ait pozitif iyon ESI kütle spektrumu. “^” işareti ile PLL zincirlerinden su veya amonyak ayrılması sonucunda oluşan iyonlar gösterilmektedir. Aynı örneğe ait iki boyutlu ESI-IM-MS grafiği şekil içerisinde ayrıca verilmiştir | 69 |
| Şekil 4.13. PLL ve PSS'nin 5:1 (PLL:PSS) mol oranındaki karışımına ait pozitif iyon iki boyutlu ESI-IM-MS grafiğindeki (2), (3) ve (4) bölgelerinin kütle spektrumları. Alt indisle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir. Na^+/H^+ yer değiştirmesi sonucunda meydana gelen iyonlar “*” işareti ile gösterilmektedir..... | 71 |
| Şekil 4.14. PLL ve PSS'nin 5:1 (PLL:PSS) mol oranındaki karışımına ait negatif iyon ESI kütle spektrumu. Alt indisle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir. Na^+/H^+ yer değiştirmesi sonucunda meydana gelen anyonlar “*” işareti ile gösterilmektedir. Aynı örneğe ait iki boyutlu ESI-IM-MS grafiği şekil içerisinde ayrıca verilmiştir | 72 |
| Şekil 4.15. PLL ve PSS'nin 5:1 (PLL:PSS) mol oranındaki karışımına ait negatif iyon iki boyutlu ESI-IM-MS grafiğindeki (2) ve (3) bölgelerinin kütle spektrumları. Alt indisle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir. Na^+/H^+ yer değiştirmesi sonucunda meydana gelen anyonlar “*” işareti ile gösterilmektedir..... | 73 |
| Şekil 4.16. 5 birimli PLL ve 4 birimli PSS'nin oluşturduğu kovalent olmayan komplekse ait pozitif iyon ESI MS/MS kütle spektrumu. Alt indisle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir. PLL oligomerlerinden “^” ve “~” işaretleri sırasıyla su ve amonyak kayıplarına uğrayan PLL oligomerlerine ait sinyalleri göstermektedir | 74 |
| Şekil 4.17. 5 birimli PLL ve 4 birimli PSS'nin oluşturduğu kovalent olmayan komplekse ait negatif iyon ESI MS ² kütle spektrumu. Alt indisle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir | 76 |
| Şekil 4.18. 2+ ve 2- yüklü, S_4+L_5 stokiyometrisindeki kompleks iyonlarının parçalanma verimliliği eğrileri..... | 77 |
| Şekil 4.19. Bazı 2+ yüklü PLL-PSS kompleks iyonlarının parçalanma verimliliği eğrileri | 78 |
| Şekil 4.20. Bazı 2+ yüklü PLL-PSS kompleks iyonlarının etkileşimlerinin şematik gösterimi..... | 79 |
| Şekil 4.21. Bazı 2- yüklü PLL-PSS kompleks iyonlarının parçalanma verimliliği eğrileri | 80 |

| | |
|--|-----|
| Şekil 4.22. Bazı 2- yüklü PLL-PSS kompleks iyonlarının etkileşimlerinin şematik gösterimi..... | 81 |
| Şekil 4.23. 2+ yüklü PLL ve PSS iyonlarının deneysel CCS değerlerinin kütle/yük oranına göre değişimi..... | 83 |
| Şekil 4.24. 2+ yüklü PLL-PSS kompleks iyonlarının deneysel CCS değerlerinin kütle/yük oranına göre değişimi..... | 84 |
| Şekil 4.25. 2+ yüklü PLL-PSS kompleks iyonlarının deneysel ve teorik CCS değerlerinin kütle/yük oranına göre değişimi..... | 85 |
| Şekil 4.26. PAA'nın iki boyutlu ESI-IM-MS grafiğinden elde edilen 1+ yüklü iyonlara ait kütle spektrumu..... | 86 |
| Şekil 4.27. Analiz edilen PAA örneğinde tespit edilen farklı zincir sonu gruplara sahip serilerin gösterimi..... | 87 |
| Şekil 4.28. PLL ve PAA'nın 5:1 (PLL:PAA) mol oranındaki karışımına ait pozitif iyon ESI kütle spektrumu. “^” işareti ile PLL zincirlerinden su ayrılması sonucunda oluşan iyonlar gösterilmektedir. Aynı örneğe ait iki boyutlu ESI-IM-MS grafiği şekil içerisinde ayrıca verilmiştir..... | 88 |
| Şekil 4.29. PLL ve PAA'nın 5:1 (PLL:PAA) mol oranındaki karışımına ait pozitif iyon iki boyutlu ESI-IM-MS grafiğindeki 2+ ve 3+ yüklü iyonlara karşılık gelen bölgelerinin kütle spektrumları. Alt indisle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir... | 90 |
| Şekil 4.30. PLL ve PAA'nın 5:1 (PLL:PAA) mol oranındaki karışımına ait pozitif iyon iki boyutlu ESI-IM-MS grafiğindeki 2+ yüklü iyonlara karşılık gelen bölgelerinin kütle spektrumları. A, B ve C harfleri PAA'nın serilerini ifade etmektedir..... | 91 |
| Şekil 4.31. 2+ yüklü PLL-PAA kompleks iyonlarının deneysel CCS değerlerinin kütle/yük oranına göre değişimi..... | 93 |
| Şekil 4.32. PGA örneğinin ESI-IM-MS analizinde elde edilen 1+ yüklü iyonların gözlemlendiği kütle spektrumu..... | 94 |
| Şekil 4.33. Doğrusal $[M_5+Na]^+$ (m/z 686), $[M_5+H]^+$ (m/z 664) ve halkalı $[M_5+Na]^+$ (m/z 668), $[M_5-H+2Na]^+$ (m/z 690) iyonlarının sürüklenme zamanları..... | 95 |
| Şekil 4.34. 5 birimli PGA molekülünün zincir sonundaki halkalaşmanın gösterimi | 96 |
| Şekil 4.35. PLL ve PGA'nın 5:1 (PLL:PGA) mol oranındaki karışımına ait pozitif iyon ESI kütle spektrumu. “^” işareti ile PLL zincirlerinden su ayrılması sonucunda oluşan iyonlar gösterilmektedir. Aynı örneğe ait iki boyutlu ESI-IM-MS grafiği şekil içerisinde ayrıca verilmiştir..... | 97 |
| Şekil 4.36. PLL ve PGA'nın 5:1 (PLL:PGA) mol oranındaki karışımına ait pozitif iyon iki boyutlu ESI-IM-MS grafiğindeki 2+ yüklü iyonlara karşılık gelen bölgelerinin kütle spektrumları. “◇” işareti ile PLL'nin halkalı PGA oligomerleri ile yaptığı komplekslere ait sinyaller gösterilmektedir..... | 98 |
| Şekil 4.37. 2+ yüklü polielektrolit iyonlarının deneysel CCS değerlerinin kütle/yük oranına göre değişimi..... | 99 |
| Şekil 4.38. 2+ yüklü kovalent olmayan polielektrolit kompleks iyonlarının deneysel CCS değerlerinin kütle/yük oranına göre değişimi..... | 100 |
| Şekil 4.39. Lizozimin pozitif iyon ESI kütle spektrumu. Aynı örneğe ait iki boyutlu ESI-IM-MS grafiği şekil içerisinde ayrıca verilmiştir..... | 102 |

| | |
|---|-----|
| Şekil 4.40. Lizozim proteininin farklı yüke sahip iyonlarının deneysel CCS değerlerinin değişimi | 103 |
| Şekil 4.41. Lizozim ve PSS karışımına ait pozitif iyon ESI kütle spektrumu. Aynı örneğe ait 2D ESI-IM-MS grafiği şekil içerisinde ayrıca verilmiştir | 104 |
| Şekil 4.42. Lizozim ve PSS karışımına ait pozitif iyon ESI kütle spektrumunun 8+ yüklü lizozim ve lizozim-PSS komplekslerine ait iyonların gözlendiği bölümü. Protein ile etkileşen PSS zincirlerinin sayısı sinyaller üzerinde ayrıca belirtilmektedir | 105 |
| Şekil 4.43. Kovalent olmayan, farklı yüke sahip lizozim-PSS kompleks iyonlarının deneysel CCS değerlerinin yapılarındaki PSS zincir uzunluklarına bağlı olarak kütle/yük oranına göre değişimleri..... | 106 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

| | |
|------------|---|
| ϵ | Dielektrik sabiti |
| Ω | Etkin çarpışma kesiti |
| Ω' | Düzeltilmiş etkin çarpışma kesiti |
| c | Geliştirilmiş kapasite çevrimi gecikmesi sabiti |
| e | Bir elektronun yükü |
| E | Elektriksel alanın şiddeti |
| E_c | Kulomb enerjisi |
| E_{cm} | Kütle merkezi çarpışma enerjisi |
| E_{com} | Kütle merkezi kinetik enerjisi |
| E_{lab} | Laboratuvar ölçeğindeki çarpışma enerjisi |
| E_k | Öncül iyonun çarpışma öncesindeki kinetik enerjisi |
| E_K | Keesom enerjisi |
| K | İyon hareketliliği sabiti |
| k_B | Boltzmann sabiti |
| m_N | Nötral çarpışma/sürükleyici gazının atom/molekül kütlesi |
| M_n | Sayıcı ortalama molekül kütlesi |
| m_p | Öncül iyonun molekül kütlesi |
| M_w | Ağırlıkça ortalama molekül kütlesi |
| N | Sayıcı sürükleyici gaz yoğunluğu (hacim başına düşen molekül sayısı) |
| r | Birimler arasındaki mesafe |
| t_D | İyonun sürüklenme zamanı |
| t_D' | İyonun düzeltilmiş sürüklenme zamanı |
| u | Dipol moment |
| v_D | İyonun sürüklenme hızı |
| Z | Yük sayısı |

Kısaltmalar

| | |
|----------------|--|
| α -CHCA | α -siyano-4-hidroksisinnamik-asit |
| ASAP | Atmosferik katı analiz probu |
| ATT | 6-aza-2-tiyotimin |
| CI | Kimyasal iyonlaştırma |
| CAD | Çarpışmayla aktifleştirilmiş parçalama |
| CID | Çarpışmayla indüklenmiş parçalama |
| CCS | Etkin çarpışma kesiti |
| DAD | Diyot sıralı dedektör |
| DC | Doğru akım |
| DCTB | trans-2-[3-(4-tert-bütilfenil)-2-metil-2-propeniliden] malononitril |
| DHB | 2,5-dihidroksibenzoik asit |
| DMA | Tekdüze alan hareketlilik analizörleri |
| DTIMS | Sürüklenme tüpü iyon hareketliliği spektrometrisi |
| EDC | Geliştirilmiş kapasite çevrimi |
| EHSS | Kesin katı küre yayılması |
| EI | Elektron iyonlaştırma |
| ESI | Elektrosprey iyonlaştırma |
| ETD | Elektron transferi ile parçalama |
| FAB | Hızlı atom bombardımanı |
| FAIMS | Alan asimetrik iyon hareketliliği spektrometrisi |
| FT-ICR | Fourier Transform- İyon Siklotron Rezonans |
| GPC | Jel geçirgenliği kromatografisi |
| HABA | 2-(4-hidroksifenilazo)- benzoik asit |
| H/D | Hidrojen/Döteryum |
| HPLC | Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi |
| IAA | Trans-3-indolakrilik asit |
| IM | İyon hareketliliği |
| IPEC | Polielektrolitler arası kompleksler |
| IT | İyon tuzaklı |
| LACCC | Kritik koşullarda sıvı adsorpsiyon kromatografisi |
| LbL | Çoklu tabaka oluşturma yöntemi |

| | |
|-------|---|
| LC | Sıvı kromatografisi |
| m/z | Kütle/Yük |
| MAIV | Matriks yardımcı vakumda iyonlaştırma |
| MALDI | Matriks yardımcı lazer desorpsiyon / iyonlaştırma |
| MALS | Çoklu açılı ışık saçılması |
| MCP | Mikrokanallı plaka dedektörü |
| MS | Kütle Spektrometresi/Spektrometrisi |
| MS/MS | Tandem kütle spektrometrisi |
| NMR | Nükleer manyetik rezonans |
| OMS | Art dalga hareketlilik spektrometrisi |
| PA | İzdüşümü yaklaşımı |
| PAA | Poli(Akrilik Asit) |
| PEFC | Polimer elektrolit yakıt hücresi |
| PEG | Polietilen glikol |
| PGA | Poli(L-Glutamik Asit) |
| PLL | Poli(L-Lizin) |
| PSD | Kaynak sonrası parçalama |
| PSS | Polistiren sülfonat |
| rf | Radyo frekansı |
| QIT | Dört kutuplu iyon tuzaklı |
| Q/ToF | Dört kutuplu uçuş zamanlı |
| SID | Yüzeyde uyarmayla parçalama |
| THAP | 2,4,6-Trihidroksiasetofenon monohidrat |
| TM | Gidiş izi metodu |
| ToF | Uçuş zamanlı |
| TWIM | Kaydırmalı dalga iyon hareketliliği |

1. GİRİŞ

Polielektrolitler, yapılarında çok sayıda yüklü veya belli koşullarda yük oluşturabilir fonksiyonel gruplar bulunduran moleküllerdir. Bu tür yapılar, yüklü biyomoleküllerle etkileşebilme özellikleri sayesinde biyomedikal ve kimyasal sensör üretimi, doku mühendisliği ve ilaç taşıma sistemleri geliştirilmesi gibi çeşitli uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Polielektrolitler, kullanıldıkları uygulamalarda genel olarak malzeme yüzeylerinin biyoyumlu hale getirilmesini sağlamaktadır. Bu yapıların malzeme yüzeyine yerleştirilmesinde genellikle kolay uygulanabilir ve düşük maliyetli bir teknik olan çoklu tabaka yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde polikasyon ve polianyonlar, elektrostatik etkileşimler üzerinden yüzeye sıralı olarak eklenmektedir. Oluşturulan tabakalar arasına biyomoleküllerin ve ilaçların yerleştirilmesi de mümkündür. Polielektrolit çoklu tabakalarının oluşturulması ile dayanıklı, yüzey özellikleri kontrol edilebilir ve biyolojik sistemlere uyumlu malzemeler elde edilebilmektedir.

Moleküllerin çevreleri ile etkileşimleri, sahip oldukları fonksiyonel özellikleri belirleyen en önemli parametredir. Örneğin, proteinlerin canlı sistemlerde sahip oldukları fonksiyon özellikleri, kovalent olmayan etkileşimlere dayalı ikincil ve üçüncül yapılarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bunlara bağlı olarak meydana gelen konformasyon değişiklikleri, bir proteinin etkileşim özelliklerine direkt olarak etki etmektedir. Kovalent olmayan komplekslerin konformasyonlarının karakterize edilmesi, bu tür yapıları içeren sistemlerin sahip oldukları özellikler ile ilgili önemli veriler sağlamaktadır. Kovalent olmayan komplekslerin konformasyonlarının analiz edildiği çalışmalarda biyomoleküller arası tanıma, ilaç taşıma veya biyomolekül transferi gibi sistemlerdeki etkileşimlerin temeli ile ilgili faydalı bilgiler elde edilmektedir.

Kütle spektrometrik sistemler kullanılarak, kovalent olmayan kompleks yapıları yüksek hassasiyet ve doğrulukla analiz edilebilmektedir. Kütle spektrometrik analizlerde özellikle matriks-yardımlı lazer desorpsiyon/ionlaştırma (MALDI) ve elektrosprey iyonlaştırma (ESI) gibi yumuşak iyonlaştırma tekniklerinin kullanılması, kompleks yapılarının bozulmadan, konformasyonları korunarak bütün hallerinde

analiz edilebilmelerini sağlamaktadır. Kütle spektrometrik analizlerde örneğin kesin kütlelerinin ve izotopik dağılımının ayrıntılı bir şekilde belirlenebilmesi, türlerin kimyasal yapılarının aydınlatılması açısından oldukça önemlidir. Bu sayede elde edilen veriler, kovalent olmayan kompleksler gibi yapıların stokiyometrilerinin belirlenmesinde yeterli olmaktadır. Kompleks yapıların parçalanması veya ortamdaki diğer türlerle etkileşmeleri gibi gaz fazında meydana gelebilecek olaylar da kütle spektrometrik analizlerde elde edilen veriler ile izlenebilmektedir. İyon hareketliliği analizi ile birlikte yapılan kütle spektrometrik analizlerde komplekslerin kimyasal yapılarının belirlenmesinin yanı sıra, konformasyon özellikleri de detaylı bir şekilde incelenebilmektedir. Kütle spektrometrisinin kovalent olmayan komplekslerin hem çözelti hem de gaz fazında sahip oldukları özelliklerin bir arada incelenebilmesini sağlaması da oldukça önemlidir.

Bu tez çalışmasında, kütle spektrometrik sistemler kullanılarak polielektrolitlerin ve komplekslerinin gaz fazındaki konformasyon ve kararlılık özellikleri incelenmiştir. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, analiz edilen polielektrolitlerin çözelti fazında yürütülen çoklu tabaka uygulamalarındaki etkileşim özelliklerinin temellerinin anlaşılmasına katkıda bulunacaktır. Bu sayede, polielektrolit komplekslerinin konformasyonlarının içerisinde buldukları malzemenin canlı ortamdaki biyomolekül veya ilaçlarla etkileşimleri üzerindeki etkileri ile ilgili faydalı değerlendirmeler yapılabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sentetik Polimerler

Canlı yaşamının en önemli parçaları olan biyomoleküllerin çok büyük bir kısmı, yapıları itibariyle doğal polimerler olarak adlandırılabilir. Bu moleküller, zamanın başlangıcından bu yana evrende bulunmaktadır. Sentetik polimerler ise, insanoğlunun hayatının hemen her alanında; araba parçaları, paketleme malzemeleri, mutfak eşyaları, duvar boya ları, plastik eşyalar, oyuncaklar, bilgisayar parçaları, medikal malzemeleri, uçak parçaları, kıyafet, yalıtım malzemeleri gibi uzunca sıralanabilecek farklı eşya ve malzemelerin üretiminde yer almaktadır.

Doğal kauçuk 1800'lü yılların başında oldukça önemli bir üretim malzemesi olarak kullanılıyordu. Fakat bu malzeme, soğuk ortamlarda çok kırılgan ken, sıcak ortamlarda kolaylıkla eriyordu. Charles Goodyear, 1839 yılında kauçuk sentezinde yanlışlık yaparak, tesadüfen ortam şartlarına daha dayanıklı olan lastiği üretti ve daha sonra bu üretim işlemi vulkanizasyon olarak adlandırıldı [1].

1920'li yıllara kadar birbirine bağlı küçük birimlerin meydana getirdiği makromolekül yapıları hakkında çok az şey biliniyordu. Makromolekül yapılarının varlığı, ilk olarak Hermann Staudinger tarafından yapılan X-ışınları çalışmalarıyla ortaya konuldu [2]. Staudinger, bu çalışmasıyla 1953 yılında Nobel Kimya Ödülü'ne layık görüldü. Staudinger'in polimer zincirlerinin oluşumu ve yapıları üzerine yaptığı çalışmaları literatürde tartışılmaya devam ediyorken, polimerlerin çözelti içerisindeki özellikleri hakkında bilgi eksikliği bulunmaktaydı. Paul Flory, 1953 yılında yayınladığı çalışmada polimer zincirlerinin ideal katlanmış hallerinin bolluklarının yüksek olduğu sıcaklığı, teta sıcaklığı olarak adlandırdı [3]. Paul Flory, bu çalışmada ortaya atılan teorisi ile doğal ve sentetik polimerlerin teta sıcaklığındaki davranışlarının anlaşılmasına sağladığı katkı nedeniyle 1974 yılında Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülmüştür.

Günümüzde polimer bilimi alanında özgün ve literatüre yenilik katan çalışmalar yoğun bir şekilde yürütülmektedir. Bu alanda karmaşık sistemlerin analizinde çok önemli ve hızlı gelişmeler yaşanıyor olmasına rağmen, büyük sentetik polimer yapılarının hızlı bir şekilde, detaylı olarak ve yüksek doğrulukla karakterize

edilebilmeleri için oldukça zor ve yüksek maliyetli çalışmaların yapılması gerekmektedir. Polimerler, düz zincir, halkalı, dallanmış yapıda, homopolimer veya kopolimer olarak, dendrimer ve her biri farklı uzunlukta kollara sahip olan yıldız polimerler gibi çok çeşitli yapısal özelliklere sahip olabilmektedir. Bu tür yapısal çeşitliliğin belirlenmesinin yanı sıra, polimer karakterizasyonunda genel olarak, ortalama molekül ağırlıklarının hesaplanması, molekül kütlesi dağılımlarının belirlenmesi, tekrar eden birimlerin yapılarının aydınlatılması, zincir sonu gruplarının tanımlanması, kopolimer zincirlerinin dizilimlerinin belirlenmesi, safsızlık ve katkı maddelerinin varlığının tespit edilmesi konularında karakterizasyon çalışmaları yapılmaktadır [4].

2.2. Polimer Karakterizasyonu

Sentetik polimerlerin karakterizasyonları, bu polimerlerin kullanım özelliklerini doğrudan etkileyen fiziksel ve kimyasal karakteristiklerinin doğru bir şekilde belirlenebilmesi için olabildiğince kapsamlı bir şekilde yürütülmelidir. Bu tür çalışmalarda polimerlerin fonksiyonel özelliklerinin aydınlatılabilmesi için malzemelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirleyen önemli parametrelerin üzerinde ayrıntılı analizlerin yapılması oldukça önemlidir. Polimer karakterizasyonu çalışmalarında kimyasal bileşimin, kimyasal bileşim dağılımının, molekül kütlesinin, molekül kütlesi dağılımının ve zincir sonu gruplarının belirlenmesi ile elde edilen veriler değerlendirilmektedir. Günümüzde polimer biliminde polimerlerin dizilim özelliklerinin kontrol edilmesi ile birçok polimerik malzemenin genel malzeme bilimi alanlarının yanı sıra biyolojik ve medikal bilimlerdeki kullanım özellikleri de belirlenebilmektedir [5-7].

Çeşitli birimlerin farklı dizilim kombinasyonlarında bir araya gelerek oluşturdukları biyomakromoleküllerin (örn; proteinler, genler, metabolitler, lipidler vb.) bütünü, canlı sistemlerin temel yapıtaşlarını meydana getirmektedir. Aynı şekilde küçük birimlerin diziliminden meydana gelen sentetik makromoleküllerin de günümüzde ve gelecekte biyomakromoleküllere benzer uygulamalarda kullanılabilmesi mümkün görünmektedir. Bu uygulamalarda belirli polimerler, özellikle ilaç sistemlerinin geliştirilmesinde tedavi edici (therapeutic) polimer, polimer-ilâç, polimer-protein birleşimleri (conjugates), polimerik iyon öbekleri (micelles) şekillerinde kullanılabilir. Bu alanda yapılan araştırmalarda genellikle bir ilacın veya

tedavi edici biyolojik molekülün polimerik yapılar vasıtasıyla, uygun koşullarda, hedefe yönelik olarak canlı sistem içerisinde taşınması ve tedavinin gerçekleştirilmesi amaçlanmaktadır.

Bu tür uygulamalarda kullanılmak üzere, farklı molekül kütlesi aralıklarında ve bileşimlerde düz zincir veya dallanmış haldeki kopolimerler veya çapraz bağlı polimer yapılarından oluşan ürünler piyasada bulunmaktadır. Bu polimerlerin bozunma zamanları, molekül ağırlıklarına ve kopolimer oranlarına bağlı olarak birkaç ay ila birkaç yıl arasında değişiklik göstermektedir. Malzemelerin ticari ürün olarak Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Yönetimi Dairesi (FDA) ve Avrupa Tıbbi Ürünler Ajansı (EMA) tarafından onaylanabilmeleri için mekanik özellikleri ve biyobozunma hızları incelenerek değerlendirilmelidir. Bu nedenle, kopolimer zincirlerinin dizilimlerinin yüksek doğrulukla belirlenmesi, bu alanda üretilen malzemelerin uygulamalarda kullanılabilirliklerinin onaylanması açısından oldukça büyük öneme sahiptir.

Sentetik polimerlerin dizilim özellikleri, sadece medikal ve ilaç uygulamalarında değil, fotoniks, güneş pili, nanolitografi, kendiliğinden oluşan sistemler (self-assembled systems), uyarı-cevap malzemeleri, çeşitli membranlar ve nanoyapılar gibi farklı uygulama ve malzeme alanları için de oldukça önemlidir [8, 9]. Farklı makroskopik özelliklere sahip polimerler, üretiminde kullanılacakları malzemenin kullanım amacına göre yapısal olarak birbirinden farklılık gösteren çeşitli monomerlerin bir araya getirilmesiyle hazırlanmaktadır.

Polimerik yapıların sahip oldukları birincil özellikler, monomerin kimyasal özelliklerinden çok meydana gelen makromolekülün molekül kütlesi, molekül kütlesi dağılımı ve zincir sonunda bulunan grupların özelliklerine bağlıdır. Polimer sentezinde iki veya daha fazla monomer türünün kullanılmasıyla, ikinci dereceden yapısal karmaşıklığa sahip kopolimerler meydana gelmektedir. Bu yapılarda monomerlerin türlerinin, oranlarının ve blok, rastgele, aşı gibi dizilim özelliklerinin belirlenmesi, malzemenin sahip olduğu kimyasal ve fiziksel özelliklere doğrudan etki etmektedir. Polimerik yapılarda üçüncü dereceden farklılaşma, konformasyonel özelliklere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Polimerler, halkalı, yıldız şeklinde, fırça biçiminde veya dendritik gibi farklı konformasyonel özelliklere sahip olabilmektedir. Bu tür farklı konformasyonlara sahip kompleks yapıları

makromoleküller, iyon öbekleri, amfifilik blok kopolimerler ve poliyon kompleksleri tümör hedefli ileri uygulamalarda hapsetme birimi olarak kullanılmaktadır [10].

Nükleer manyetik rezonans (NMR), jel geçirgenliği kromatografisi/çoklu açılı ışık saçılması (GPC/MALS), polimer karakterizasyonunda yoğun olarak kullanılmakta olan analitik tekniklerdir. NMR tekniği ile polimerlerin zincir sonu grupları ve kimyasal bileşimleri karakterize edilebilmektedir. Bunun yanı sıra, NMR analizinde kısa polimerik zincirlerin stereokimya özellikleri bakımından birbirlerinden ayırt edilmeleri de mümkündür [11]. Fakat NMR tekniği ile uzun ve karmaşık bir polimer zinciri analiz edildiğinde, zincir sonu gruplara ait NMR sinyallerinin şiddetleri, bütün zincire ait sinyal şiddetine kıyasla çok düşük olacağından dolayı zincir sonu gruplarının belirlenmesi zorlaşabilmektedir.

GPC ise karışım içerisindeki moleküllerin boyutlarına göre birbirlerinden ayrılmasını sağlayan kromatografik bir tekniktir. GPC tekniği ile farklı fraksiyonlara ayrılan polimer örnekleri, bir veya daha fazla dedektörle (örn; kırınım indeksi, DAD (diode array dedektor), MALS) tayin edilebilmektedir. Bu yöntemle yapılan ayırmada, büyük moleküller daha küçük moleküllere göre kolon içerisinde daha az zaman geçirerek dedektöre daha önce ulaşırlar. GPC tekniği ile polimerlerin ağırlıkça ortalama molekül kütlesi (M_w), sayıca ortalama molekül kütlesi (M_n) ve polidispersite indeksi gibi veriler düşük doğruluk değerlerinde elde edilebilmektedir. Fakat bu teknik ile polimerlerin zincir sonu gruplarının ve kimyasal bileşimlerinin belirlenmesi mümkün değildir. Zincir sonu gruplar, polimerlerin reaktivite özelliklerini belirleyen birimlerdir. Dolayısıyla, bu birimlerin belirlenememesi GPC tekniğinin en önemli eksikliği olarak ön plana çıkmaktadır.

Sentezlenen polimerik malzemenin yapısal ve konformasyonel karmaşıklığı arttıkça takip edilmesi gereken sentez işleminin zorlaşması, elde edilmesi hedeflenen ürünün hatalı veya eksik olması ihtimalini artırır. Öte yandan, karmaşık polimerik sistemlerin yüksek teknolojiye sahip uygulamalarda, kararlı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olması ve tekrarlanabilirliği yüksek kullanım koşullarını sağlaması beklenmektedir. Sentez işlemlerinin zor olması ve uygulama alanlarındaki beklentilerin yüksek olması, bu tür yapıların yüksek hassasiyet ve doğrulukta veriler sağlayan hızlı ve güvenilir analitik yöntemlerle karakterize edilmelerini gerektirmektedir. NMR ve GPC gibi teknikler, polimer bilimi alanında yürütülen karakterizasyon çalışmalarında uzun süredir yoğun olarak kullanılmaktadır. Fakat

bahsedildiği gibi, bu tür sistemlerin polimer analizinde eksiklikleri bulunmaktadır. Bu nedenle, günümüzde polimer bilimi ve mühendisliği alanında yürütölen araştırmalarda söz konusu geleneksel analitik yöntemlerin yerine çok daha ileri teknolojiye sahip bir analitik teknik olan kütle spektrometrisi, yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır.

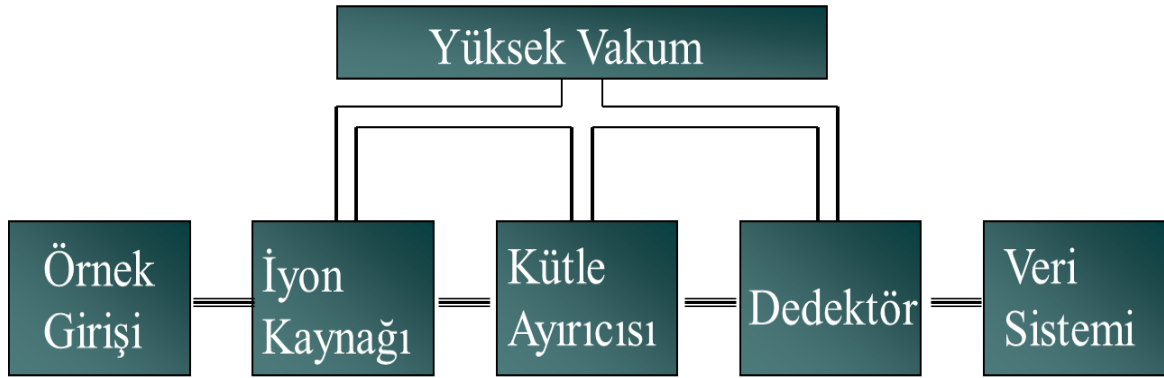
Polimer örneklerindeki moleküler karmaşıklık arttıkça kütle spektrometrisi gibi yüksek hassasiyet ve doğrulukta tanımlama ve ayırt etme özelliklerini sağlayan bir analitik yöntemin kullanım zorunluluğu ortaya çıkmıştır. Kütle spektrometrisi, sentetik polimer analizinde kimyasal bileşimin, moleköl kütle dağılımının, polidispersite indeksinin, zincir sonu gruplarının yapılarının, polimerlerin konformasyon özelliklerinin, kararlılıklarının bütünüyle en doğru şekilde belirlenebilmesini sağlayacak tek analitik teknik olması nedeniyle diğer analitik teknikler arasında ön plana çıkmaktadır.

2.3. Kütle Spektrometrik Polimer Analizi

Kütle spektrometrik teknikler, yüksek hassasiyet ($<10^{-15}$ mol), seçicilik (karışımda bulunan tüm türler için ayrı sinyal elde edilebilmesi), özgünlük (tam kütle analizinin yapılabilmesi, izotopik dağılımın belirlenmesi veya parçalanma ürünlerinin özgün olması) ve analiz hızı gibi özellikleri sağladığından dolayı günümüzde polimer analizlerinde aranan bir analitik yöntem durumundadır [12, 13]. Üstün özelliklerinin sağladığı avantajlar ve veri zenginliği göz önüne alındığında yakın gelecekte kütle spektrometrisinin organik veya inorganik polimer analizlerinde kullanılmasının zorunlu hale geleceği görölmektedir.

Örnek giriş sistemi, iyon kaynağı, kütle ayırıcısı, dedektör ve veri analiz sistemi bir kütle spektrometresinin temel bileşenleridir (şekil 2.1). Örnek giriş sistemleri, analiz edilen örneğin iyon kaynağına uygun olarak iletilmesini sağlamaktadır. Bu aşamada örnekler, iyon kaynağına çoğunlukla doğrudan enjeksiyon veya kromatografik yöntemlerle (sıvı veya gaz kromatografisi) iletilmektedir. Analiz edilen örnek, iyon kaynağında gaz fazındaki analize uygun iyonları haline dönüştürölür. Kütle ayırıcısında, iyon kaynağında oluşturulan iyonlar kütle/yük (m/z) oranlarına göre birbirlerinden ayrılır. Kütle/yük oranlarına göre ayrılan iyonlar, dedektör tarafından algılanır ve aynı anda ölçüm ve sinyal dönüştürme işlemleri de gerçekteşir. Son olarak dedektör tarafından oluşturulan sinyaller, bilgisayar sistemi yardımıyla kütle

spektrumu verilerine dönüştürülerek kaydedilir [14]. Kütle spektrometrelerinin kütle ayırıcısı, dedektör ve bazı durumlarda iyon kaynağı bölümleri vakum altında tutulmaktadır. Kütle spektrometrelerindeki vakum, yüksek teknolojiye sahip pompalar yardımıyla 10^{-5} - 10^{-10} torr düşük basınç değerleri sağlanarak sürdürülmektedir. Analiz edilen iyonların gaz fazında bulunan diğer gaz molekülleri ile etkileşimlerinin engellenebilmesi için bu sistemlerin sürekli olarak vakum altında tutulmaları gerekmektedir [15].



Şekil 2.1. Kütle spektrometrelerinin genel bileşenleri.

2.3.1. İyonlaştırma Yöntemleri

İyonların oluşturulması, kütle spektrometrik analizlerin en önemli basamağıdır. Bir molekülün iyonlaşması, bir elektronun yapıdan ayrılması veya eklenmesi; bir başka iyonun yapıdan ayrılması veya eklenmesi şekillerinde olabilir. Analiz edilen örneğin özelliklerine göre en uygun iyonlaştırma yöntemi seçilmelidir. İyonlaştırma yöntemleri, genel anlamda “sert” ve “yumuşak” olarak sınıflandırılmaktadır. Sert iyonlaştırma yöntemleri, iyonlaştırma sırasında uygulanan yüksek enerjiden dolayı analiz edilen iyonların aşırı oranda parçalanmalarına neden olmaktadır. İyonlaştırma sırasında bu şekilde meydana gelen aşırı parçalanmalar nedeniyle, örneğin analizi sonucunda anlamlı veriler elde edilememektedir. Bazı durumlarda ise, bu tür parçalanmalar, yapıların aydınlatılabilmesi açısından faydalıdır ancak değerlendirilmeleri zor olan karmaşık verilerin elde edilmesine neden olmaktadır. Elektron iyonlaştırma (EI), kimyasal iyonlaştırma (CI), hızlı atom bombardımanı (FAB) ve alan desorpsiyonu yöntemleri sert iyonlaştırma kaynaklarına örnek olarak verilebilir.

Geçmişte kütle spektrometrisi, sert ve tahrip edici bir analitik teknik olarak bilinmekteydi. Bu düşünce, elektrosprey iyonlaştırma (ESI) ve matriks-yardımlı lazer desorpsiyon iyonlaştırma (MALDI) gibi yumuşak iyonlaştırma yöntemlerinin kullanılması ile büyük moleküllerin bütün hallerinde analiz edilebilmesi sonucunda tamamen değişmiş durumdadır. Yumuşak iyonlaştırma yöntemlerinde sert iyonlaştırmanın aksine, analiz edilen moleküllerin bütün halinde, parçalanmadan tayin edilebilmeleri sağlanmaktadır.

ESI ve MALDI tekniklerinin yaygın olarak kullanılmaları ile birlikte kütle spektrometrisi, polimer analizlerinde de oldukça önemli bir analitik teknik durumuna gelmiştir [16-18]. Polimer zincirlerinin bütün hallerinde parçalanmadan analiz edilmesini sağlayan bu iki teknik, günümüzde yürütülen polimer analizlerinde yoğun olarak kullanılmaktadır. Kütle spektrometrisinin polimer analizlerinde sağladığı en önemli avantajlardan biri de, polimer örneğindeki her zincirin molekül kütlelerinin tek tek belirlenebilmesidir. Bu analizlerden elde edilen veriler kullanılarak zincirin tekrar eden birimleri ve zincir sonu grupları belirlenebilmektedir. Bunun yanı sıra, yan zincir gruplarının varlığı ve ne oldukları, zincirin halkalı yapıda olup olmadığı hakkında detaylı bilgi sağlayan veriler de elde edilebilmektedir [19, 20]. Kopolimerlerin bileşimleri ve dizilimleri de kütle spektrometrik analizle hızlı bir şekilde belirlenebilmektedir [21-25].

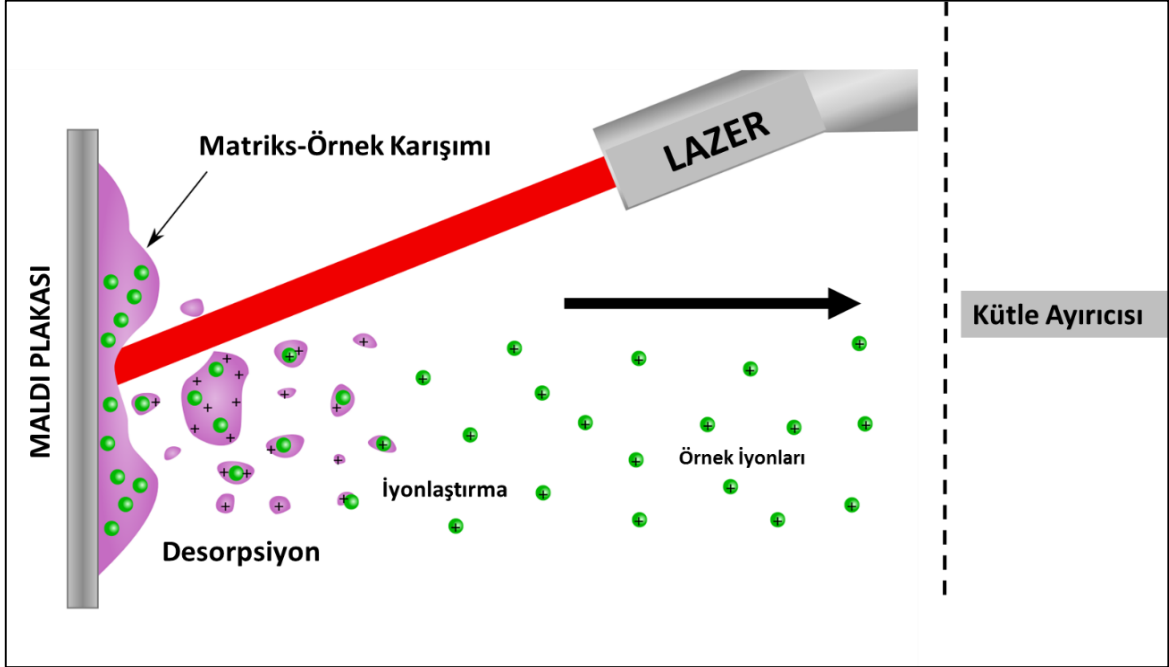
2.3.1.1. Matriks-Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma (MALDI)

MALDI işlemi sonucunda büyük olasılıkla tek yüklü iyonlar oluşmaktadır. Bu nedenle MALDI tekniğinin kullanıldığı polimer analizlerinden elde edilen veriler, daha hızlı ve kolay bir şekilde değerlendirilerek yorumlanabilmektedir. Aynı zamanda MALDI tekniği, safsızlık ve tuz varlığını tolere edebildiğinden dolayı, bu iyon kaynağının kullanıldığı kütle spektrometrik analizler, hassasiyet problemi yaşanmadan daha hızlı bir şekilde yürütülebilmektedir.

Tüm MALDI uygulamalarında olduğu gibi, MALDI kütle spektrometresiyle yapılan polimer analizlerinde de örnek hazırlama basamağı oldukça önemlidir. Polimerlerin başarılı bir şekilde analiz edilebilmeleri için uygun çözücü, matriks ve tuz kombinasyonlarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu parametrelerin optimize edilmemesi, polimerik zincirlerin iyonlaşma verimlerinin düşmesinin yanı sıra bu moleküllerin gaz fazında parçalanmalarına da neden olabilmektedir. Birleşik

Devletler Ulusal Standart ve Teknoloji Enstitüsü (NIST), polimer analizi için bu alandaki kaliteli yayınlarda sunulan MALDI örnek hazırlama yöntemlerini derleyerek bir veri tabanı oluşturmuş durumdadır. Fakat bu alanda yeni tür polimerik sistemlerin hızlı bir şekilde, sürekli olarak geliştirilmesi nedeniyle yeni örnek hazırlama yöntemlerinin kullanılması gerekebilmektedir.

MALDI analizleri için sıklıkla uygulanan örnek hazırlama yöntemlerinde uygun çözücü içerisinde bulunan polimer örnekleri, matriksle 1:100-1:50000 (örnek:matriks, molar oranı) oran aralığında karıştırılmaktadır. Özellikle polimer analizlerinde moleküllerin iyonlaşma verimliliklerinin artırılması amacıyla ortama iyonlaştırıcı metal iyon tuzları eklenebilmektedir [26]. MALDI plakası üzerinde bulunan çözücüsü uzaklaştırılmış matriks ve örnek karışımı üzerine lazer ışını gönderilir (Şekil 2.2). Bu işlemde kullanılan matriks molekülleri, gönderilen lazer ışınının dalga boyu aralığında kuvvetli absorpsiyon yapma özelliğine sahip olmalıdır. Lazer ışınının gönderilmesiyle matriks ve örnek karışımına yüksek enerji aktarılır ve böylece örnek moleküllerinin bütün halindeki iyonları oluşturulur [26-28].



Şekil 2.2. MALDI sisteminin şematik gösterimi.

Sentetik polimer analizinde yaygın olarak kullanılmakta olan 2,5-dihidroksibenzoik asit (DHB), 2-(4-hidroksifenilazo)-benzoik asit (HABA), α -siyano-4-hidroksisinnamik

asit (α -CHCA), trans-3-indolakrilik asit (IAA), ditranol gibi matrikslerin çoğu okzo, hidroksil ve karboksil grupları içeren aromatik organik bileşiklerdir [28]. Analiz için kullanılacak matriksin seçimi oldukça önemlidir ve farklı türdeki maddelerin analizinde hangi matriksin daha iyi sonuç vereceği kesin olarak bilinmemektedir. Analiz için uygun olan matriks, genelde deneme/yanılma yöntemi ile tespit edilir [29]. MALDI işleminde analiz edilen örnekler, doğrudan lazer ışınından gelen enerjiye maruz kalmamaktadır. Bu enerjinin büyük bir kısmı matriks molekülü tarafından soğurulur. Bu olay sonucunda yapısı bozulan ve süper-sıkıştırılmış gaz haline gelen matriks, meydana gelen transfer reaksiyonları ile örnek molekülüne H^+ veya metal iyonlarını aktarabilmektedir. Bu olayın devamında gaz genişletikçe, örnek molekülleri ve yüzeyde bulunan diğer moleküller gaz fazına yönelirler. Yük transfer reaksiyonlarının ardından yüzeye yakın bölümlerde bulunan yüksüz örnek molekülleri de yüklenebilmektedir. Oluşan örnek iyonları, iç enerjilerinin büyük bir kısmını genişleyen gaz bulutu içerisinde meydana gelen çarpışmalarla harcarlar.

Miktarları 10^{-12} - 10^{-15} mol aralığında olan örneklerin analizi, MALDI yöntemi ile kolaylıkla yapılabilmektedir. Bu iyonlaştırma yöntemi ile 10^6 Da mertebelerinde molekül kütlesine sahip makro yapıların analiz edilmeleri mümkündür [30]. Elli bin Da molekül kütlesine kadar tek yüklü iyonların oluşumunun baskın olduğu bu yöntemde, daha yüksek molekül kütlesi değerlerine çıkıldıkça çoklu yüke sahip iyonların oluşum olasılıkları da artmaktadır. MALDI yönteminin dezavantajlarından birisi, matriksle seyreltilen örnek moleküllerinin matriks molekülleri ile gaz fazında birleşerek kümeler (cluster) oluşturmalarıdır. Böyle durumlarda, molekül kütlesinin yüksek doğrulukla tayin edilmesi zorlaşmaktadır [31].

MALDI, diğer iyonlaştırma yöntemleri ile kıyaslandığında polimer analizleri için öncelikli olarak tercih edilmektedir. Çünkü polimerler gibi makromoleküllerin MALDI ile analizlerinde tek yüklü iyonların ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ veya $[M+H]^+$) oluşum ihtimali çok daha yüksektir [29]. MALDI kaynağı, genellikle geniş kütle aralığı, yüksek hassasiyet ve ayırıcılık sağlayan uçuş zamanlı kütle ayırıcısıyla birlikte kullanılmaktadır. MALDI analizlerinde örnek hazırlama aşamasının ardından analiz için harcanan süre çok kısadır. MALDI plakası üzerinde bulunan birden fazla örneğe ait veri, birbirlerinin sinyaline girişim yapmadan, anlık olarak elde edilebilmektedir. Bu iyonlaştırma tekniğinin örnek analizlerinde bunca avantaj sağlamasına rağmen bazı eksiklikleri de bulunmaktadır. Analiz sonucunda elde edilen verilerin kalitesi,

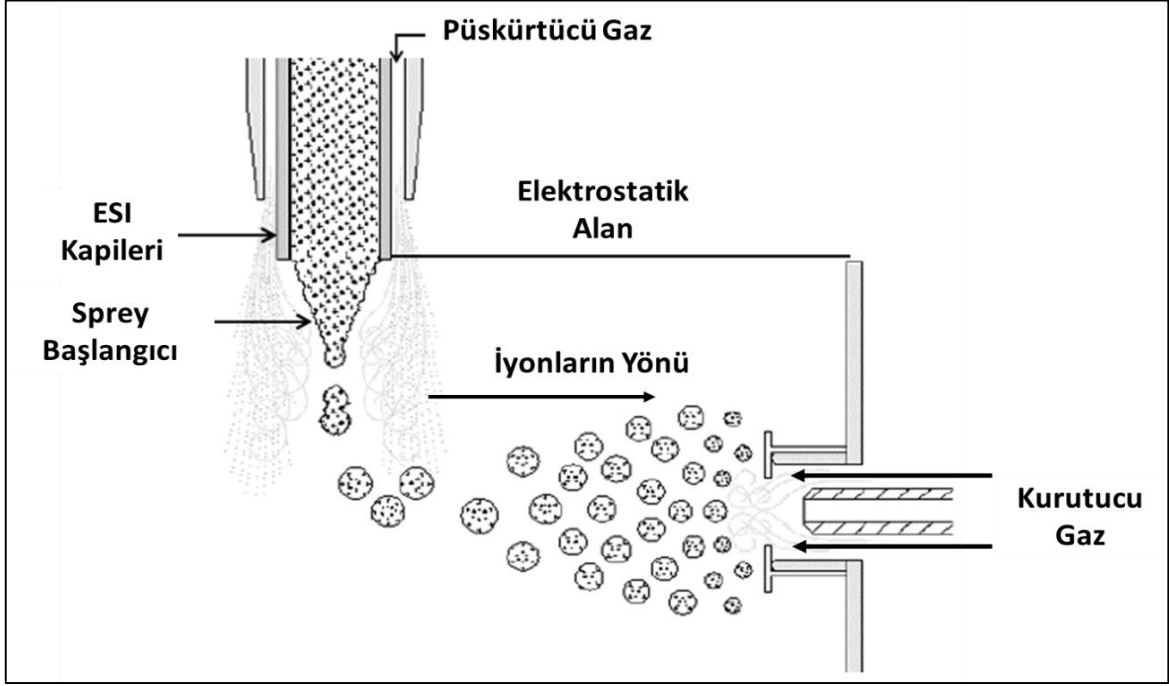
örnek hazırlama basamağına doğrudan bağımlıdır. Ayrıca MALDI plakası üzerinde örnek ve matriks karışımlarının damlatıldıkları yüzeylerde matriks kristallerinin homojen olarak dağılım göstermemeleri nedeniyle, bu yüzeylerin her bölgesinde tekrarlanabilir sonuçlar elde edilememektedir [22]. Özellikle polimer örneklerinin analizlerinde zincirlerin iyonlaştırma verimlerinin farklılıklarına göre yanıltıcı sonuçlar alınabilmektedir. Zincir uzunluklarına ve zincir sonu grupların kimyasal yapılarına bağlı olarak örnekte bulunan türlerin iyonlaşma verimleri farklılık gösterebilir. Bu nedenle, karışım içerisindeki farklı polimer türlerinin miktar analizlerinde sorunlarla karşılaşmaktadır. Geniş polimer zinciri dağılımlarına sahip örneklerde ($M_w/M_n > 1.10$), kısa zincirlerin daha uzun zincirlere göre daha yüksek sinyal şiddetlerine sahip olmaları nedeniyle ortalama molekül kütleleri yüksek doğrulukla hesaplanamamaktadır. Daha düşük polidispersiteye sahip polimer örneklerinde ise ortalama molekül kütleleri, daha yüksek doğrulukla hesaplanabilir ve bu tür örneklerin MALDI kütle spektrometrisi ile analizlerinden elde edilen sonuçlar, farklı analitik yöntemlerle alınan sonuçlarla uyum içerisinde olmaktadır [32, 33].

2.3.1.2. Elektrosprey İyonlaştırma (ESI)

ESI tekniği, MALDI'ye kıyasla daha yumuşak bir iyonlaştırma yöntemidir. Bu nedenle, polimerler gibi makromoleküllerin parçalanmadan karakterize edildiği veya kovalent olmayan etkileşimlerle bütün halinde bulunan protein komplekslerinin analiz edildiği çalışmalarda kullanılmak için oldukça uygundur. ESI tekniğiyle yapılan iyonlaştırma işleminde çok yüklü iyonların oluşma olasılığının yüksek olması, daha karmaşık verilerin elde edilmesine neden olsa da, bu durum aynı zamanda yüksek molekül kütlelerine sahip makro yapılara ait sinyallerin tayin edilebilir sınırdan gözlenebilmesini sağlamaktadır.

ESI tekniğinde çözücü içerisinde bulunan örnek, atmosferik basınçta kuvvetli elektriksel alanın uygulandığı kapilerden püskürtücü gaz eşliğinde sprej halinde püskürtülmektedir [15]. Aralarında yaklaşık olarak 0.3-2.0 cm mesafe bulunan kapiler ile karşıt elektrot arasında genellikle 2-6 kV aralığında potansiyel fark uygulanmaktadır. Bu koşullarda örneğin içerisinde bulunduğu çözeltinin sprej halinde püskürtülmesiyle kapilere uygulanan elektriksel yüke bağlı olarak, çoklu yüke sahip damlacıklar oluşur. Sprej yönüne ters yönde gönderilen ısıtılmış

kurutucu gaz (N_2 vb.), çözücünün damlacıklardan uzaklaştırılmasını sağlar (Şekil 2.3).

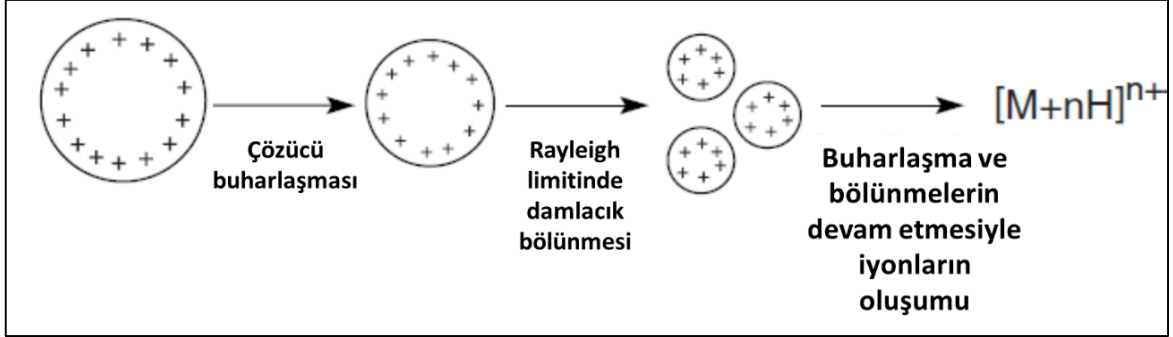


Şekil 2.3. ESI sisteminin şematik gösterimi.

Farklı ESI kaynağı tasarımlarında kurutucu gaz etkisini ortadan kaldırmak amacıyla örneği içeren çözelti, açık havayla kütle spektrometresinin ilk vakum bölgesi arasında bulunan, ısıtılmış, uzun, metal kapilerden geçirilmektedir (transfer kapileri). Bu tür bir ESI kaynağında örnek çözeltisinden sıyrılan çözücü molekülleri, kapilerin ucundaki çarpışmayla aktifleştirilmiş parçalamaya (CAD) bölümündeki çıkış kullanılarak kütle spektrometresinden uzaklaştırılır [15, 31, 34-39]. ESI kapilerine doğrudan enjeksiyon veya kromatografik yöntemlerle 0.1-10 $\mu\text{L}/\text{dk}$. akış hızı aralığındaki değerlerde çözelti gönderilebilmektedir. Bu çözelti akışına sistemin çalışma prensibine göre püskürtücü gaz da eşlik edebilmektedir.

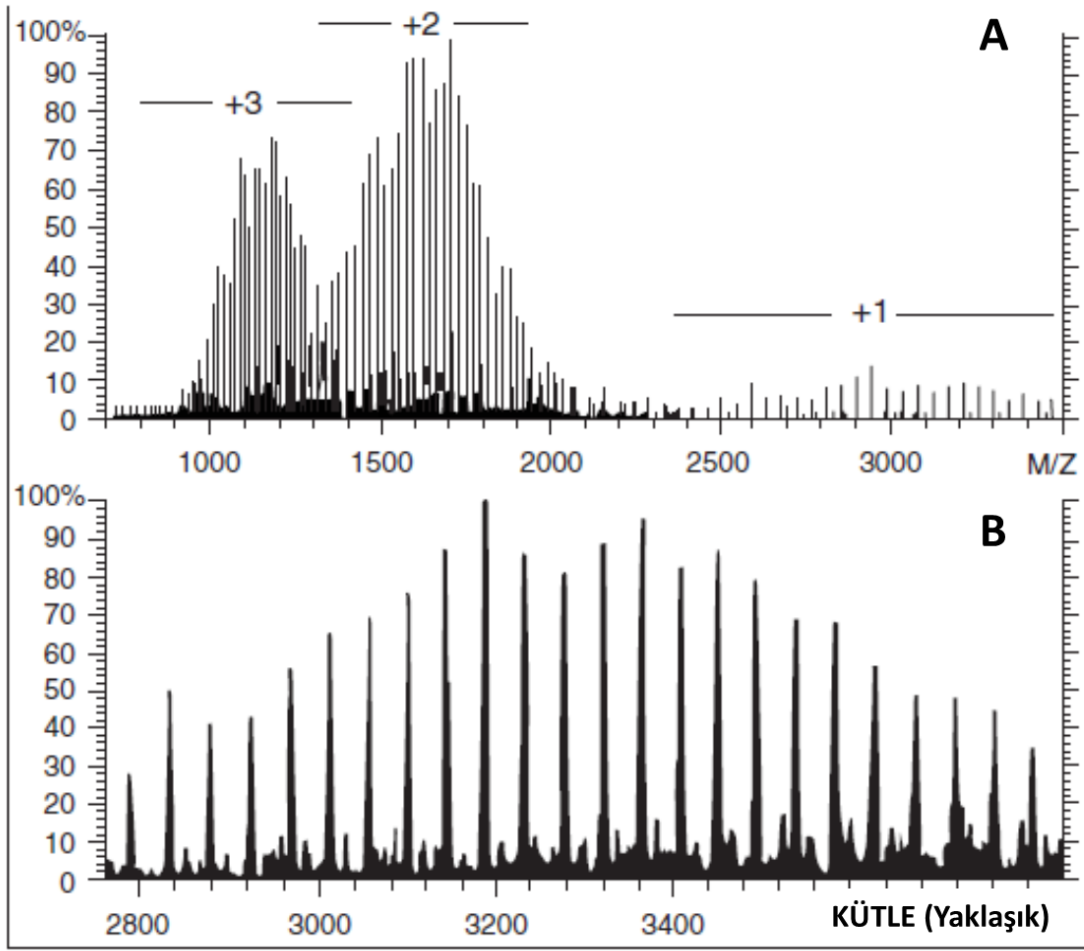
ESI sırasında meydana gelen damlacıkların hangi mekanizmayla iyonları oluşturdukları tam olarak bilinmemektedir. Bununla ilgili literatürde farklı mekanizma önerileri bulunmaktadır [40]. Bu mekanizmalar arasında en yaygın olarak kabul görmüş olanında, çözücünün buharlaşması ile damlacıkların büzüşmeleri sonucunda iyonların yüzeyde birikmesiyle yükler arasındaki kulombik itme kuvvetlerinin en aza indirildiği kabul edilmektedir. Bu işlem, damlacığın bütünlüğünün bozulduğu (kulombik patlama), Rayleigh kararsızlık limitine

ulaşılıncaya kadar devam edebilir (Şekil 2.4). Rayleigh limit değerinde birbirini izleyen kulombik patlamalar, damlacık tek bir örnek molekülü içerece kadar devam edebilmektedir.



Şekil 2.4. ESI sırasında iyonların oluşumu [38].

ESI işlemi sonucunda özellikle 1000 Da değerinden daha yüksek molekül kütlesine sahip olan moleküllerin çoklu yüke sahip iyonları oluşmaktadır. Oluşan iyonlar, düzenli bir yük dağılımına sahip olabileceği gibi kendilerine özgü iyonlaşma verimlerine bağlı olarak farklı yük değerlerine sahip iyonların bollukları da değişiklik gösterebilmektedir. Bazik ve asidik türler sırasıyla $[M + nH]^{n+}$ katyon ve $[M - nH]^{n-}$ anyonları halinde iyonlaşırlar. Sentetik polimerler gibi birden fazla iyonlaşabilecek grup içeren yapılar, ortama eklenen metal tuzları (Na^+ , K^+ , Li^+ vb.) ile birleşerek de iyon oluşturabilmektedir. ESI kütle spektrometrisi ile yapılan polimer örneği analizlerinde kullanılan çözücünün ve tuzun türü oldukça önemlidir.



Şekil 2.5. (A) Polietilen glikolün (3400) ESI kütle spektrumu ve (B) Kütle/yük oranı ekseninin kütle eksenine dönüştürülmüş hali [41].

Sentetik polimerlerin ESI ile iyonlaştırılmaları sonucunda farklı uzunluktaki zincir gruplarına karşılık gelen yüklü iyon serileri oluşmaktadır. Şekil 2.5’de verilen PEG 3400 örneğine ait ESI kütle spektrumunda +1, +2 ve +3 yük değerlerine sahip $[M + nNa]^{n+}$ halindeki iyon serileri görülmektedir [41]. Her oligomere ait toplam iyon bolluğu belirlenerek farklı yük değerlerinde gözlenen aynı türe ait sinyaller, kütle spektrumunda bütünleştirilebilir (deconvolution) (Şekil 2.5B). Fakat karmaşık polimer örneklerinin analizinde farklı yük değerlerine sahip sinyaller, birbirlerinden yeteri kadar ayrılamazlarsa bütünleştirme işlemleri sonucunda elde edilen veriler uygun bir şekilde değerlendirilemez. Bu nedenden dolayı ESI, düşük molekül kütle aralığındaki oligomer veya dendrimer örneklerinin analizleri için daha pratik bir yöntemdir. Daha büyük polimer örneklerinin ESI kütle spektrumlarının

yorumlanabilmesi için yüksek ayırıcılığa sahip kütle spektrometrik tekniklerin kullanılması gerekmektedir. Örneğin, yaklaşık 20000 Da ortalama molekül kütlesine sahip olan polimer örneği, ayırıcılığı en az 50000 değerinde olan bir kütle spektrometrik sistem ile rahatlıkla analiz edilebilir.

Kütle spektrometrik analiz öncesinde karmaşık polimer örnekleri, çeşitli ayırma yöntemleri ile sadeleştirilebilmektedir. Fakat tüm polimer örnekleri için bu şekilde bir ön ayırmaya gerek duyulmayabilir. Polimer örneklerinin doğrudan enjeksiyon yöntemi ile analiz edilmeleri sonucunda da molekül kütlesi dağılımları, zincir sonu grupları, blok uzunlukları ve bileşimleri, kopolimer dizilim ve konformasyon özellikleri belirlenebilmektedir. Özellikle tandem kütle spektrometrik analizlerle (MS/MS) zincir sonu gruplarının belirlenmesi, izobarik (aynı ortalama kütleyle sahip farklı türler) ve izomerik (aynı kesin kütleyle sahip farklı yapıdaki türler) türlerin ayırt edilmesi ve makromolekül konformasyonlarının aydınlatılması mümkün olabilmektedir.

MALDI ve ESI tekniklerinin polimer analizlerinde birbirlerine göre avantaj veya dezavantaj sağladıkları durumlar, önceki bölümlerde ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Bu hususların bir araya toplanarak karşılaştırılması, konunun anlaşılması açısından daha uygun olacaktır.

MALDI tekniğinin kullanıldığı analizlerde tek yüklü iyonların oluşum olasılıkları, daha yüksek iken ESI tekniği ile yapılan kütle spektrometrik analizlerde oluşan çoklu yüke sahip iyonlara karşılık gelen sinyaller, kütle spektrumunu karmaşık hale getirerek verilerin değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, polimer karakterizasyonu çalışmalarında öncelikli olarak MALDI kütle spektrometrisi analizlerinin yapılması tercih edilmektedir. ESI ise MALDI tekniğine göre daha yumuşak bir iyonlaştırma yöntemidir. Bu nedenle, polimerler gibi makromolekül yapılarının ESI kullanılarak yapılan analizlerinde MALDI tekniğiyle yapılan analizlere kıyasla yapılar parçalanmadan daha iyi korunabilmektedir.

Polimer örneklerinin analizlerinde türlerin iyonlaşma verimliliklerinin artırılması amacıyla ortama metal iyon tuzları eklenmektedir. MALDI tekniği, ortama eklenen tuz ve diğer katkı maddelerini tolere etmek açısından ESI tekniğinden daha üstündür. ESI analizlerinde kullanılan çözücü ve örnekler içerisine katkı maddelerinin eklenmesi, ortam safsızlığını artırarak cihazların kirlenmesine yol açmasının yanı sıra, örnek molekül iyonlarının baskılanmalarına da neden olmaktadır.

ESI tekniği ile birlikte üçlü dört kutuplu (triple quadrupole) veya dört kutuplu-uçuş zamanlı (Q/TOF) gibi hibrit kütle ayırıcı sistemlerinin tam uyumlu olarak çalışması, yapılan örnek analizlerinde MS/MS çalışmalarının da yürütülmesini sağlamaktadır. MALDI tekniğinin de bu tür kütle ayırıcılarla birlikte kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Ancak ESI tekniğinin sürekli akış sağlayan çalışma prensibi, bu tür kütle ayırıcılarla birlikte kullanılmaya daha uygundur. Aynı zamanda MALDI tekniğinde analiz edilen türlerin iyonlaşma verimleri, türlerin kimyasal yapılarına ve büyüklüklerine göre değişiklik göstermektedir. Bu durumda tekrarlanabilir iyonlaşma veriminin elde edilememesi de özellikle MS/MS çalışmaları için bir dezavantaj oluşturmaktadır.

Bu iki iyonlaştırma yönteminin birbirlerine göre üstün ve eksik oldukları durumlar mevcut olsa da MALDI ve ESI tekniklerinin geliştirilmesi ve ilgili çalışma alanlarında her ikisinin de yoğun olarak kullanımları, polimer örnek analizlerinde çığır açmış durumdadır. Bu alanda yapılan çalışmalarda elde edilen verilerin zenginliği ve literatüre sağladıkları katkı gün geçtikçe büyük bir hızla artmaktadır [42-45].

2.3.2. Kütle Ayırıcıları

Kütle ayırıcıları, gaz fazındaki iyonları m/z oranlarına göre ayırmaktadır. Kütle spektrometrelerinin kütle ayırıcısı bölümleri, iyonların ortamda bulunabilecek diğer gaz molekülleri ile çarpışmadan dedektöre iletebilmeleri için sürekli olarak vakum altında tutulur. Bazı kütle ayırıcılar, tarayıcı ayırıcılar olarak farklı kütleyle sahip iyonları belirli bir zaman aralığında m/z oranlarına göre tarayarak dedektöre iletirler. Dört kutuplu kütle ayırıcısı bu tür ayırıcılara örnek olarak verilebilir. Bir diğer kütle ayırıcısı grubu, iyonların akışlarıyla birlikte dedektöre iletilmelerini veya aynı anda bir dedektör gibi veri elde edilmesini sağlamaktadır. Uçuş zamanlı ve iyon tuzaklı kütle ayırıcıları, bu grubun en çok bilinen örnekleridir.

Kütle sınırı, iyon iletim verimi, ayırıcılık gücü, kütle doğruluğu, dinamik aralığı ve çalışma basıncı değeri, bir kütle ayırıcının özelliklerini belirleyen en önemli parametrelerdir. Her kütle ayırıcısının diğerlerine göre üstün olduğu ve eksiklerinin bulunduğu özellikleri vardır.

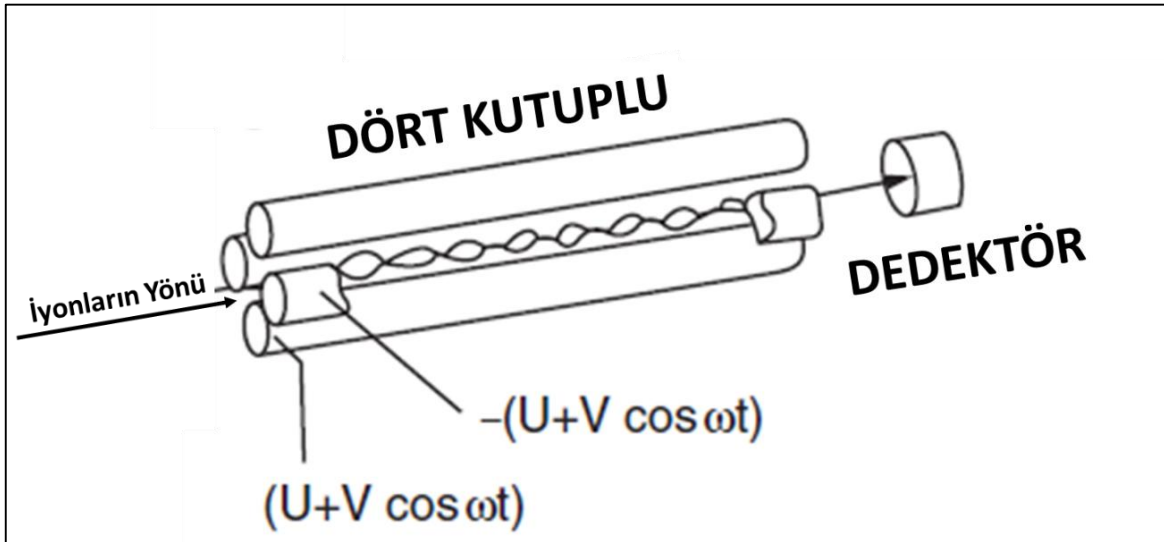
Polimer örneklerindeki karmaşık sinyallerin birbirlerinden ayrılabilmesi, kütle ayırıcının belli bir kütle aralığındaki ayırıcılığına doğrudan bağlıdır. Kütle spektrumlarında yorumlama yapılırken daha yüksek kütle doğruluğunu sağlamak için atomların monoizotopik kütle değerlerinin kullanılması tercih edilir. Bunun

yanında iyi bir ayırıcılık sağlayan kütle ayırıcısının kullanılmasıyla kendine has izotopik dağılımlara sahip atomların (brom, gümüş, lityum vb.) varlığı belirlenebilir. Böylece analiz edilen türlerin bileşim analizlerinin yapılmasına da çok büyük katkı sağlanmış olur.

Bundan sonraki bölümde, tez kapsamındaki çalışmalarda kullanılan dört kutuplu, uçuş zamanlı ve bunların birlikte kullanıldığı dört kutuplu/uçuş zamanlı kütle ayırıcılarla ilgili bilgiler, ayrıntılı olarak verilmektedir.

2.3.2.1. Dört Kutuplu Kütle Ayırıcısı

Dört kutuplu kütle ayırıcılar, dairesel veya hiperbolik şekil oluşturacak durumda birbirlerine paralel olarak konumlanmış dört adet metal çubuktan oluşmaktadır [15, 31, 34, 46]. Birbirlerine karşılık gelen metal çubuklar, aynı potansiyel farkına sahipken farklı polarite ile yüklenmiş durumdadır (Şekil 2.6). Her bir çifte doğru akımla (DC) uygulanan voltaj (U) ve $V \cos \omega t$ olarak ifade edilen radyo frekansı (rf) bileşenleri etki etmektedir. Böylece, her metal çubuğun toplam potansiyeli, $+(U + V \cos \omega t)$ veya $-(U + V \cos \omega t)$ değerlerinde iken, rf alanı bu çubukların polaritelerini periyodik olarak değiştirmektedir [15, 31].



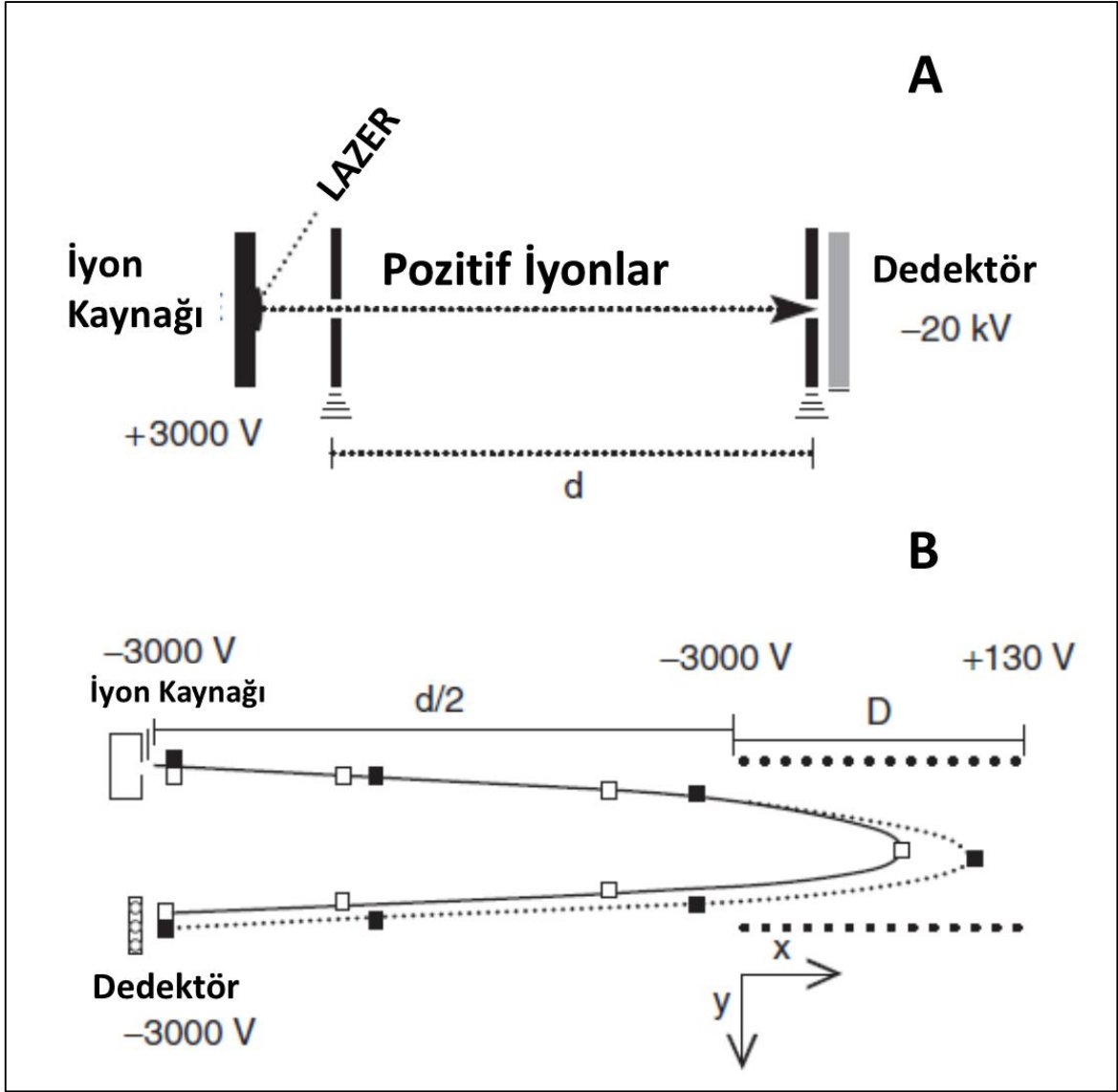
Şekil 2.6. Dört kutuplu kütle ayırıcısının şematik gösterimi.

İyonlar dört adet metal çubuğun aralarındaki alana girmeden önce hızlandırılmaktadır ($\sim 5-20$ eV). Bir katyon, negatif olarak yüklenmiş kutba doğru hızlandırılırken anyonlar için bunun tam tersi geçerlidir. Dört kutuplu kütle

ayırıcısında iyonlar kendilerine göre ters polariteye sahip çubuğa doğru yönelirler. İyonlar çubuklara temas etmeden hemen önce çubukların polariteleri tersine çevrilir ve iyon böylece diğer çubuklara doğru yönlendirilmiş olur. Bu durumun devam etmesiyle iyon dört çubuk arasında salınımlı olarak hareket eder. Bu süreçte, çubuklardaki DC ve rf voltaj değerleri kontrol edilerek bazı iyonların çubuklar arasından çıkmaları veya çubuklarla temas edip yüklerini kaybetmeleri sağlanabilir. Örneğin, “m” kütesine sahip olan iyon, belli U ve V değerlerinde sabit bir yönde dedektöre doğru iletebilirken, aynı koşullarda diğer iyonların çubuklarla temas edip yüklerini kaybettikleri görülmektedir [15, 46]. Ayırma sırasında U/V oranı sabit tutulurken tarama yapılmaktadır. Böylece farklı m/z oranlarına sahip iyonlar birbirlerinden ayrılarak, dedektör yönüne doğru sıralı olarak başarılı bir şekilde iletilmektedir. Eğer U=0 (DC yok) değerine ayarlanır ise sadece V değerine göre belirlenen kütle sınırının üstündeki iyonlar dedektöre ulaştırılabilir. Böylece dört kutuplu kütle ayırıcısı, çarpışma hücresi olarak tandem kütle spektrometrisi uygulamalarında kullanılabilir.

2.3.2.2. Uçuş Zamanlı Kütle Ayırıcısı

Uçuş zamanlı bir kütle ayırıcısında iyonlar, öncelikle kendilerine keV mertebesinde kinetik enerji sağlayacak potansiyele maruz bırakılarak hızlandırılırlar [47]. Bu şekilde “uçurulan” iyonlar, dedektöre ulaşmak için uçuş tüpündeki mesafeyi belli bir zamanında kat ederler [15, 31, 34, 47]. İyonların uçuş zamanı değerleri, m/z oranlarına göre değişen iyon hızlarına bağlıdır. Bir iyonun dedektöre ulaşma süresi, m/z değerinin karesi ile doğru orantılıdır. Buna göre, daha büyük iyonların dedektöre ulaşmaları daha fazla zaman almaktadır.



Şekil 2.7. (A) Lineer ve (B) reflektör uçuş zamanlı kütle spektrometrelerinin şematik gösterimi. Aynı m/z oranına, farklı kinetik enerjilere sahip iyonlar, “■” (yüksek kinetik enerjiye sahip) ve “□” (düşük kinetik enerjiye sahip) işaretleri ile gösterilmektedir [15].

Basit bir lineer uçuş zamanlı kütle ayırıcısı (Şekil 2.7 (A)), aynı kütleye sahip iyonların hızlarının farklı değerlerde olabilmelerinden dolayı, düşük ayırıcılığa sahip olabilmektedir. Başlangıçta iyon kaynağının farklı bölgelerinde, farklı kinetik enerjiye sahip olan iyonların hızlandırılma aşamasında da farklı kinetik enerjiye sahip olmaları, iyon hızlarında farklılaşmaya neden olmaktadır. Bunun yanı sıra, farklı zamanlarda farklı konumlardan hızlandırılan iyonlar, farklı yolları izleyerek dedektöre doğru hareket edebilirler. Ayırıcılığın düşmesine neden olan, başlangıç kinetik enerjisi, zaman ve konuma bağlı bu farklılıklar, aralıklı odaklama (time-lag

focusing veya delayed extraction) veya geciktirilmiş ayırma uygulamasının ve refletron biriminin kullanılması ile büyük oranda ortadan kaldırılabilir (Şekil 2.7 (B)) [48].

Aralıklı odaklama işleminde iyon oluşumu ile hızlandırılma olayları arasında bir bekleme süresi bulundurulmaktadır. Bu işlemin uygulanması ile dedektöre doğru yönelen daha hızlı iyonlar, aynı kütleyle sahip diğer iyonlara göre daha düşük kinetik enerjiyle hızlandırılmaktadır. Böylece, aynı kütleyle sahip olan iyonlar, dedektöre aynı anda ulaşırlar. Refletron ise, iyonların buldukları yönden geriye doğru yansıtılmalarını sağlayan, belli bir elektrik alanına sahip iyon aynası olarak tanımlanabilir (Şekil 2.7 (B)). Daha hızlı iyonlar (daha yüksek kinetik enerjiye sahip), refletron biriminin daha derin kısımlarına nüfuz ettiklerinden dolayı geriye dönmeye önce daha fazla zaman harcarlar. Böylece, aynı kütleyle sahip, daha yavaş iyonlar, refletron bölümünde daha az zaman harcadıklarından dolayı hızlı iyonlarla dedektöre aynı anda ulaşırlar. Refletron birimi bulunan uçuş zamanlı kütle ayırıcılarda tandem kütle spektrometrisi uygulamaları da yapılabilmektedir. Bu tür uygulamalarda kaynakta oluşturulan iyonlar arasından hedeflenen öncül iyonu seçmek için cihazda iyon geçidi bölümünün bulunması gerekmektedir. Belirli bir zaman aralığında sadece öncül iyonların geçişine izin veren bir saptırıcı elektrot iyon geçidi gibi kullanılabilir. Geçit ile refletron bölümleri arasında kaynak sonrası parçalama işlemi (Post-source decay, PSD)) gerçekleştirilebilir [49].

Yüksek iyon iletimi ve hızlı tepki özelliklerine sahip olan uçuş zamanlı kütle ayırıcıları, MALDI gibi kesikli olarak iyon paketi gönderen (pulsed) bir iyon kaynağı ile uyumlu olarak kullanılabilir. ESI gibi devamlı iyon akışının oluşturulduğu kaynakların uçuş zamanlı kütle ayırıcısı ile birlikte kullanılabilmesi için iyonların uçuş zamanlı ayırma tüpüne dik açıyla (ortogonal) yönlendirilmesi gerekmektedir. Bu tür cihazlarda iyonlar, öncelikle bir tuzaklama birimine taşındıktan sonra uçuş zamanlı ayırma tüpüne dik açıyla gönderilmektedir [50]. Uçuş zamanlı kütle ayırıcısı, kütle sınırlandırmasının olmaması, refletron ve aralıklı odaklama işlemleri kullanılarak ayırıcılık değerlerinin yükseltilebilmesi sebebiyle biyolojik makromolekül ve sentetik polimer analizleri için oldukça idealdir.

2.3.2.3. Dört Kutuplu/Uçuş Zamanlı Kütle Ayırıcısı (Q/TOF)

Kütle spektrometrelerinin performanslarını veya bu cihazlar kullanılarak yapılabilecek uygulamaların çeşitliliğini arttırmak amacıyla farklı kütle ayırıcıları aynı sistem üzerinde birlikte kullanılabilir. Bu tür uygulamalarda genel olarak kullanılan kütle ayırıcılarının üstün oldukları özelliklerden faydalanılarak en iyi performansın elde edilmesi amaçlanmaktadır. Tez çalışmalarında kullanılan dört kutuplu/uçuş zamanlı kütle ayırıcısı (Q/TOF), literatür çalışmalarında da yaygın olarak kullanılan hibrit kütle ayırıcısı sistemlerinden birisidir.

Q/TOF kütle ayırıcısında dört kutuplu ve uçuş zamanlı kütle ayırıcıları birbirlerine göre dikey pozisyonda bulunmaktadır. Bu tür sistemlerde çarpışma hücreleri, genellikle dört kutuplu birimle uçuş zamanlı ayırmanın yapıldığı tüpün arasında bulunur. Kütle spektrometrik analizlerde dört kutuplu ayırıcı bölümüne rf potansiyeli uygulanarak bu birimin kaynaktan gelen iyonları yönlendirme ve uçuş zamanlı ayırma tüpüne iletme görevini gerçekleştirmesi sağlanmaktadır. MS/MS analizlerinde ise, dört kutuplu ayırıcıya rf ve dc potansiyelleri uygulanarak sadece hedeflenen öncül iyonların geçişine izin verilmektedir. Seçilen öncül iyon dört kutuplu ayırıcı bölümünden geçerek çarpışma hücresine ulaşır ve burada gaz molekülleri (Ar ve N₂ gibi) ile çarpıştırılarak daha küçük iyon parçalarına ayrılır. Bu şekilde oluşturulan parçalanma iyonları uçuş zamanlı ayırma tüpüne gönderilir. Dört kutuplu ayırıcıların uçuş zamanlı ayırıcılarla birlikte kullanılması, çok daha yüksek ayırıcılık ve kütle doğruluğunda verilerin elde edilebilmesini sağlamaktadır. Günümüzde bu tür sistemlerle 50000 ayırıcılık değerinde 1-5 ppm kütle doğruluğu elde edilebilmektedir.

2.3.3. Dedektörler

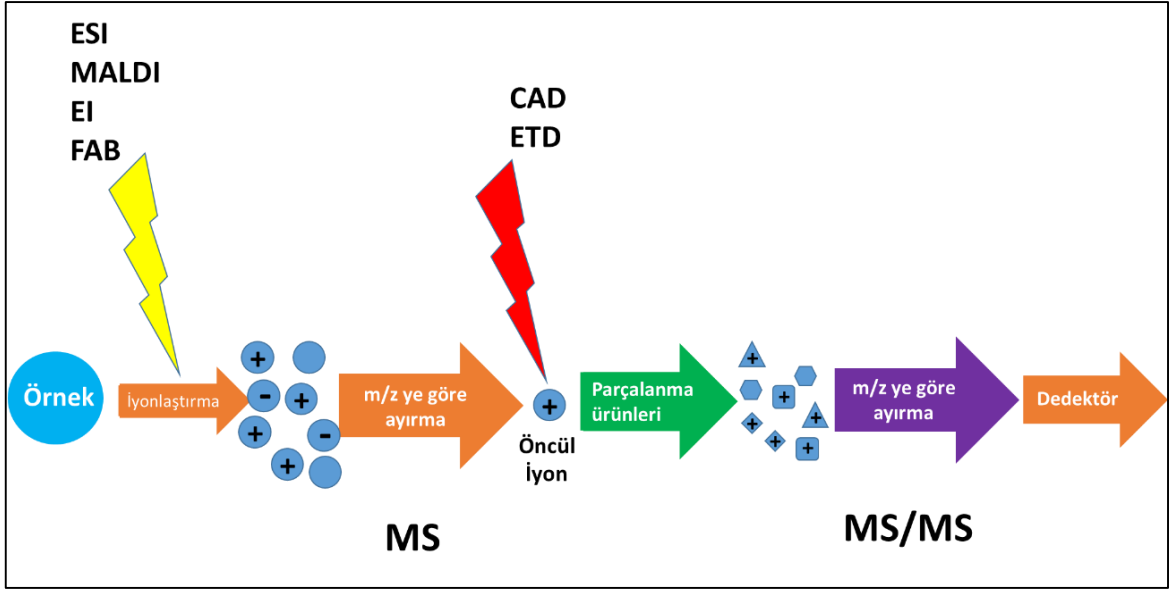
Kütle ayırıcısında m/z oranlarına göre ayrılan iyonlar, dedektöre doğru yönlendirilir. Bir dedektör, gelen iyonları bolluklarıyla orantılı olarak elektrik akımına dönüştürür. Kütle spektrometrelerinde yaygın olarak bulunan mikrokanallı plaka dedektörü (MCP), birbirlerine paralel konumda olan, delikli, silindirik kanallardan oluşmaktadır. Her kanal, 5-25 µm çapında ve birkaç mm uzunluğundadır. Kanalların her biri, gelen iyon demeti çarptığında elektron yayan yarı iletken bir malzeme ile kaplanmıştır. Plakanın giriş kısmı, genellikle çıkışına göre daha negatif polaritede, 1 kV potansiyel

değerinde tutulur. Çıkışta akan elektronları toplayan bir metal anot bulunur ve burada gerçekleşen elektron akışından akım değeri ölçülür.

Daly dedektörü, kütle spektrometrik cihazlarda yaygın olarak bulunan bir diğer dedektör türüdür. Elektro-optik iyon dedektörleri tipinde olan Daly dedektörü, gelen iyonları elektron ve fotonlara dönüştürür. Daly dedektörleri, dönüştürücü dinod, sintilatör ve fotoçoğaltıcı tüp birimlerinden oluşmaktadır. Kütle ayırıcısından gelen iyonlar, dönüştürücü dinoda çarparlar. Bunun sonucunda ikincil elektronlar oluşur. Daha sonra bu elektronlar, fosforesent plaka üzerine hızlandırılarak fotonların oluşumu sağlanır. Oluşan fotonlar, fotoçoğaltıcı ile algılanır ve sinyale dönüştürülür [15].

2.4. Tandem Kütle Spektrometrisi

Daha önceki bölümlerde de bahsedildiği gibi MALDI ve ESI gibi yumuşak iyonlaştırma yöntemlerinin kullanılmasıyla iyon kaynağında meydana gelen parçalanma minimize edilebilmektedir. Tandem kütle spektrometrisinde ise iyon kaynağında bütün halinde oluşturulan iyonlar, genellikle kütle ayırıcıları bölümünde parçalanmaktadır. Bu parçalama işlemi sonucunda oluşan anlamlı parçalanma ürünleri değerlendirilerek yapı hakkında ayrıntılı bilgiler elde edilebilmektedir. MS/MS veya MS^n olarak da ifade edilen tandem kütle spektrometrik analizleri genel olarak; (1) iyon oluşumu, (2) öncül iyonun seçimi, (3) parçalanma ürünlerinin oluşumu, (4) kütle spektrometrik tayin ve parçalanma ürünlerinin analizi gibi temel basamaklardan oluşmaktadır (Şekil 2.8) [51].



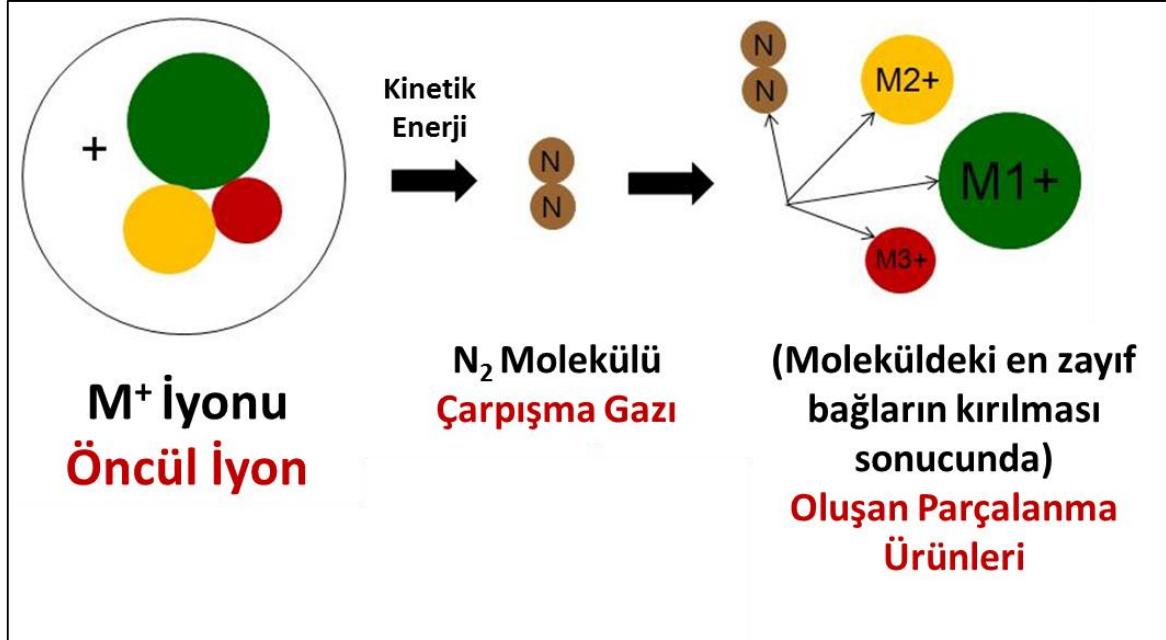
Şekil 2.8. Tandem kütle spektrometrisinin temel basamakları.

Öncül iyon iki farklı yöntemle parçalanmaktadır. Bunlardan birinde parçalama işlemi, mekan temelli olarak gerçekleştirilir ve bu işlemde iki veya daha fazla kütle ayırıcısı bir arada kullanılmalıdır. Zaman temelli parçalama işlemlerinde ise, iyon depolama birimlerinin kullanılması gerekmektedir. Dört kutuplu-iyon tuzaklı sistemler, zaman temelli parçalama işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sistemin kullanıldığı tekniklerde tüm iyonlar, aynı yerde tuzaklanırlar. İlk olarak öncül iyon haricindeki tüm iyonlar, dedektöre gönderilmeden tuzaktan çıkarılırlar. Bunun ardından, tuzaklanmış öncül iyonlar, belli bir süre boyunca nötral bir gazla çarpıştırılarak parçalanmaya maruz bırakılırlar. Bu işlem sonucunda elde edilen parçalanma ürünleri, tayin edilmek üzere tuzaktan çıkarılırlar.

Mekan temelli parçalama işlemleri ise, uçuş zamanlı, Q/TOF ve üçlü dört kutuplu gibi kütle ayırıcı sistemlerde yapılabilmektedir. Bu işlemde öncül iyon, ilk kütle ayırıcısı bölümünde izole edildikten sonra çarpışma hücreğine gönderilir. Öncül iyonun çarpışma hücreğinde nötral gaz molekülleri ile çarpıştırılmasıyla parçalanma ürünleri meydana gelir. Oluşan parçalanma ürünleri, ikinci bir kütle ayırıcısı ile analiz edilir. Bu bölümde yapılan analiz iyonların m/z oranlarına göre ayrılmasıdır.

Çarpışmayla aktifleştirilmiş parçalama (Collisionally activated dissociation, CAD) işlemi, literatürde çarpışmayla indüklenmiş parçalama (Collision-induced dissociation, CID) adıyla da ifade edilmektedir. CAD yöntemi, tandem kütle spektrometrik analizlerde en çok kullanılan parçalama tekniğidir. CAD işlemi temel

olarak; (1) öncül iyonun hızlandırılarak nötral gaz molekülleri ile çarpışmaya teşvik edilmesi, (2) öncül iyon molekülünün potansiyel enerjisinin artırılması, (3) parçalanma eşiğine ulaşılması, (4) parçalanma ürünlerinin oluşumu basamaklarını içermektedir.



Şekil 2.9. Çarpışmayla aktifleştirilmiş parçalamanın şematik gösterimi.

Seçilen öncül iyonlar hızlandırılarak aktive edilmektedir. Böylece bu iyonlar gaz molekülleri (Ar, N₂, He vb.) ile enerjili çarpışmalar yapabilmektedir. Çarpışmalar esnasında öncül iyonların kinetik enerjilerinin bir kısmı, iç enerjiye dönüştürülerek hızlı bir şekilde iyonun dönme ve titreşim enerji transferlerinin gerçekleştirilmesini sağlar. Bu olay esnasında öncül iyon molekülündeki en zayıf bağların kırılma eğilimleri diğer bağlara göre daha yüksektir (Şekil 2.9). Bunun yanında enerji durumu açısından en kararlı parçalanma ürünlerinin oluşumu da tek moleküllü (unimolecular) yer değiştirme mekanizmalarının tetiklenmesi ile sağlanır.

CAD işlemi, iletim ve tuzaklama prensibine göre çalışan kütle spektrometrelerinde gerçekleştirilebilir. Öncül iyonunun, çarpışma gazı atomunun veya molekülünün kütlelerine ve öncül iyonun çarpışma öncesinde sahip olduğu kinetik enerjiye bağlı olan maksimum miktardaki kinetik enerji, meydana gelen çarpışma sonrasında iç enerjiye dönüştürülmektedir. Bu parametreler arasındaki ilişki;

$$E = \frac{N}{m_p + N} E_k \quad (2.1)$$

eşitliği ile ifade edilebilir. Bu eşitlikte N nötral çarpışma gazının atom/molekül kütlelerini, m_p seçilen öncül iyonun molekül kütlelerini ve E_k ise öncül iyonun çarpışma öncesinde sahip olduğu kinetik enerjisini ifade etmektedir. Bu ifadede yer alan E birimi, kütle merkezi (center-of-mass, E_{com}) kinetik enerjisi olarak da isimlendirilebilir. Öncül iyonunun çarpışma öncesinde sahip olduğu kinetik enerjinin değiştirilebildiği cihazlarda, CAD işlemi, E_k değerinin büyüklüğüne göre “yüksek enerjili” veya “düşük enerjili” olarak adlandırılmaktadır. Yüksek enerjili CAD işleminde öncül iyonların kinetik enerjileri birkaç keV mertebesinde ve çarpışmalar 2-10 mbar gibi görece düşük basınçlarda meydana gelmektedir [52]. Polimerler gibi büyük öncül iyonların parçalandığı uygulamalarda dönme ve titreşim modlarının keV mertebesindeki çarpışma enerjileri ile doğrudan uyarılması tercih edilmektedir. Çünkü bu tür yapılar için kütle merkezi kinetik enerjileri, uyarılmış elektronik seviyelere ulaşmak için yeterli değildir.

Düşük enerjili CAD işlemi, ilk kinetik enerjileri daha düşük olan iyonlara (≤ 200 eV) uygulanmaktadır. Düşük enerjili CAD işleminde yüksek enerjili CAD işleminden farklı olarak tek bir çarpışmayla aktarılan ilk enerji miktarı, parçalanmanın gerçekleşmesi için yeterli değildir. Bu teknikte parçalanmanın gerçekleşmesi için çarpışma gazının basıncının veya iyon tuzaklı gibi sistemlerde uyarma süresinin artırılmasıyla birden fazla çarpışmanın meydana gelmesi sağlanmalıdır [52].

Kütle spektrometrik polimer analizlerinde örneklerin karmaşıklığına ve alınması hedeflenen sonuçların türüne göre her basamakta (örnek hazırlama, ön ayırma, iyonlaştırma, veri toplama, veri analizi) çeşitli analitik stratejiler uygulanmaktadır. Söz konusu analitik yöntemlerle birlikte tandem kütle spektrometrisi analizlerinin yapılması, polimerler gibi makromoleküllerin yapıları hakkında çok faydalı verilerin elde edilmesini sağlamaktadır. MS/MS analizlerinde meydana gelen parçalanma mekanizmalarının belirlenmesi, incelenen polimerin yapısı hakkında çok daha ayrıntılı sonuçların elde edilmesini sağlamaktadır. Bu tür analiz verilerinin değerlendirilmesinde çeşitli veri analiz programlarının kullanılması ile daha hızlı ve doğru sonuçlar elde edilebilmektedir. Tandem kütle spektrometrisi alanındaki gelişmeler sürdükçe, bu yönetime dayalı teknikler, polimer mühendisliği ve bilimi

alanlarında dizilim kontrollü polimer sistemleri üzerine yapılan çalışmalar için vazgeçilmez analiz araçları haline gelecektir.

2.5. İyon Hareketliliği-Kütle Spektrometrisi (IM-MS)

İyon hareketliliği-kütle spektrometrisinin (IM-MS), temel ve uygulamalı çalışmalardaki yeri ve kullanımı, son yıllarda çok hızlı bir şekilde artış göstermektedir. Bu analitik yöneme olan ilgi, gelişen teknoloji ile birlikte farklı türdeki örneklerin analizlerinde yüksek hassasiyet, ayırıcılık gücü ve düşük miktarda örneğin analiz edilebilmesi gibi parametrelerdeki iyileştirmelere paralel olarak artmaktadır.

İyon hareketliliği ve kütle spektrometrisi alanlarının her ikisinin de temelleri, 1800'lü yılların sonuna doğru Thomson ve Rutherford'un X-ışınları üzerine yaptıkları çalışmalara dayanmaktadır. İyon hareketliliğinin analitik yöntem olarak geliştirilmesi ile ilgili kayda değer ilk çalışmalar ise, 1930'lu yıllarda Tyndall tarafından yapılmıştır [53-55].

Bu alanda yapılan ilk çalışmalarda iyon hareketliliğinin bağlı olduğu basınç, sıcaklık, elektrik alanı ve iyonların sürüklenme bölümünde geçirdikleri zaman gibi temel parametreler deneysel olarak incelenmiştir [56-61]. 1960'lı yıllarda gaz fazı iyon kimyası üzerine çalışmalar yapan bazı araştırma grupları, farklı konfigürasyonlara sahip hibrit IM-MS cihazları geliştirmiştir [62, 63]. ESI tekniğinin geliştirilmesine katkıda bulunan ilk çalışmaların yapıldığı dönemde iyon hareketliliği ölçümleri de yapılmıştır [64, 65]. Ticari üretimlerin ardından iyon hareketlilik cihazları, yapı aydınlatma ve kimyasal izomerlerin ayırt edilmesi çalışmalarında kullanılmıştır [66-69]. 1982 yılında yapılan bir çalışmada, lazer iyonlaştırma kullanılarak oluşturulan protonlanmış türlerin iyon hareketliliklerinin analiz edilmesi ile bu türlerin iyon hareketliliği spektrumları elde edilmiştir [70]. Günümüzde kullanılmakta olan, yüksek ayırıcılık, hassasiyet ve farklı örnekler için uygulanabilirlik özelliklerine sahip olan modern IM-MS teknikleri, 1990'lı yıllarda geliştirilmeye başlanmıştır. Bu gelişmeler ESI ve MALDI gibi iyonlaştırma tekniklerinin kütle spektrometrik analizlerde ilk olarak kullanılmaya başladıkları döneme denk gelmektedir [71-73]. Son yirmi yıllık dönemde, iyon hareketliliği ile kütle spektrometrisinin birleştirildiği sistemlerin geliştirilmesinde çok hızlı ve önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu ilerlemeler özellikle, elektrodinamik alanlar kullanılarak iyonların birbirinden farklı vakum

değerleri altındaki bölgeler arasında hapsedilmelerinin, iletilmelerinin ve odaklanmalarının gerçekleştirilebilmesi konuları ile ilgilidir.

İyon hareketliliği alanında yapılan ilk çalışmalardan bu yana, modern iyon hareketliliği teknolojisinin sahip olduğu özellikler ve parametrelerin üzerine araştırmalar yapılmaktadır. IM-MS teknolojisinde gelişmeler kaydedildikçe bu tekniğin kullanıldığı alanlardaki uygulamaların, yayınların sayıları ve kaliteleri de hızla artış göstermektedir. Temel bilim çalışmalarında önemli bir yere sahip olan IM-MS tekniği, endüstriyel boyutta yürütülen çeşitli araştırma geliştirme faaliyetlerinde de aranan ve ilgi gören bir analitik sistem haline gelmiştir.

İyon hareketlilik teknikleri çalışma prensiplerine göre üç temel gruba ayrılabilir. Bunlar; (1) zamana göre ayıran, (2) konuma göre ayıran ve (3) iyon hapsedme ve seçimli salma prensibine göre ayıran sistemlerdir. Zamana göre ayıran iyon hareketliliği tekniklerinde aynı düzlemde sürüklenen iyonların belli bir noktaya varış süreleri üzerinden veriler elde edilmektedir. Konuma göre ayıran iyon hareketliliği tekniklerinde ise iyonlar, hareketlilik özelliklerine göre farklı sürüklenme yollarını takip ederek birbirlerinden ayrılırlar. Konuma göre ayıran iyon hareketliliği tekniklerinde voltaj değerlerinde tarama yapılarak geniş bir spektrumda iyon hareketliliği verisi elde edilir. Alan asimetrik iyon hareketliliği spektrometrisi (Field Asymmetric Ion Mobility Spectrometry, FAIMS), tekdüze alan hareketlilik analizörleri (uniform-field differential mobility analyzers, DMA) ve yeni geliştirilen frekans taramalı iyon hareketliliği seçimi yapan çapraz ayarlı iyon hareketlilik spektrometresi konuma göre ayırma prensibine dayalı öne çıkan yöntemlerdir [74-80]. İyon hapsedme ve salma yöntemlerinde iyonlar, basınçlı bir alanda tuzaklandıktan sonra hareketliliklerine göre seçimli olarak birbirlerinden ayrılmaktadır. İyon hapsedme ve salma yöntemleri, iyon hareketliliği çalışma alanına son zamanlarda dahil olmuştur. Bu teknikte iyonların yüksek basınçlı ortamlardaki konumlarının kontrol edilebilmesi, elektrodinamik alanın ayarlanabilir duruma getirilmesiyle mümkün olmuştur.

İyon hareketliliği ayırmalarının temel prensipleri, kütle spektrometrik tekniklerin dayandıkları prensiplerle benzerlik göstermektedir. Bu sayede, bu iki teknik rahatlıkla tek bir sistem dahilinde birlikte kullanılabilir. Zamana göre ayıran iyon hareketliliği teknikleri, modern IM-MS yöntemleri arasında oldukça önemli bir yere sahiptir. Zamana göre ayırmanın yapıldığı bu sistemlerde çalışma prensiplerinin gereği olarak analizin bütününde tüm sinyaller kaydedilmektedir. Bu tekniklerin

kullanıldığı çalışmalarda öncelikli olarak spesifik bir moleküler hedefe yönelmeden analizler yürütülmektedir [81]. Analizlerin sadece zaman ayırımı işlemi üzerinden geniş bir aralıkta yapılması, hassasiyet problemleriyle karşılaşılmasına neden olmaktadır. İyon hareketliliği ölçümlerinin tam anlamıyla gerçekleştirilebilmesi için ise, daha fazla ayırma işlemi yürütülerek verilerin istatistiki olarak elde edilmesi gerekmektedir. Günümüzde bilimsel çalışmalarda yaygın olarak kullanılan sürüklenme tüpü iyon hareketliliği spektrometrisi (drift tube ion mobility spectrometry, DTIMS) ve kaydırmalı dalga iyon hareketliliği spektrometrisi (traveling wave ion mobility spectrometry, TWIMS) yöntemleri, zamana göre ayırma yapan tekniklere örnek olarak verilebilir [82]. Bu yöntemlerin yanı sıra, radyo frekansının kullanıldığı kütle spektrometrik sistemlere benzer şekilde çalışan art dalga hareketlilik spektrometrisi (overtone mobility spectrometer, OMS) de zamana göre ayıran iyon hareketliliği tekniklerinden birisidir [83]. Çok boyutlu ayırma işlemlerinde örnek molekülleri, birbirini takip eden ayırma basamaklarında ilerlerken elde edilen ayırıcılık değerleri, belli bir seviyenin altına inmemelidir [84]. Zamana göre ayırmanın yapıldığı, tüm örnek iyonlarının aynı yolda ilerlediği sistemlerde bu gerekliliğin yerine getirilmesi çok zordur. Her ayırma boyutunda ölçüm sıklığının artırılması ve çoklu ölçüm alınması ile bu sorun çözülebilmektedir. Bu yöntemle her ayırma boyutundaki varış zamanları, her aşamada elde edilen sinyaller ile yeniden hesaplanıp düzenlenmektedir. Benzer bir yöntemden GC veya LC gibi kromatografik yöntemlerin kütle spektrometrik sistemlerle birlikte kullanıldığı analizlerde de faydalanılmaktadır [85-87].

2.5.1. Kaydırmalı Dalga İyon Hareketliliği Spektrometrisi (Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry, TWIMS)

Kayırmalı dalga iyon hareketliliği tekniği ile ilgili ilk yayın, Giles ve çalışma arkadaşları tarafından 2004 yılında yayınlanmıştır. Bu sistem, 2006 yılında (SYNAPT HDMS) ticari platformda yer almıştır [88, 89]. TWIMS teknolojisinde 2009 yılında (SYNAPT G2) yapılan düzenlemelerle, kaydırmalı dalga formlarının potansiyeli değiştirilmiş ve sürüklenme bölgesindeki basınç değeri 6 kat arttırılmıştır. Bu düzenleme, iyon hareketliliği ayırımının daha yüksek elektriksel alanda ve gaz yoğunluğunda yapılarak TWIMS cihazının ayırma gücünü 4 kat arttırmıştır [90, 91]. Cihazda 2011 ve 2013 yıllarında (SYNAPT G2-S ve SYNAPT G2-Si) yapılan son düzenlemelerle aynı konfigürasyonda sistemin iyon kaynağı ve iyon transfer

optikleri geliştirilerek iyon iletimi iyileştirilmiştir. Yapılan bu değişikliklerle TWIMS cihazının iyon oluşturma verimliliği ve iyon aktivasyon kapasitesi arttırılmıştır. TWIMS ile birlikte ESI, MALDI, nanoESI, kimyasal iyonlaştırma ve termal desorpsiyon korona boşalım gibi çeşitli iyonlaştırma kaynakları birlikte kullanılabilir [92-95]. CAD parçalama tekniği, standart bir özellik olarak, tüm TWIMS cihazlarında bulunmaktadır. Bu cihazlarda CAD parçalaması, iyon hareketliliği analizinden önce (MS/IM-MS) veya sonra (MS-IM/MS ve MS/IM/MS) yapılabilmektedir [96, 97]. SYNAPT G2 cihazında çift polaritede iyon reaksiyonlarının gerçekleştirilebilmesi özelliği kullanılarak elektron transferi ile parçalama (Electron Transfer Dissociation, ETD) işlemi de yapılabilmektedir [98-100]. Wysocki ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilen yüzeyde uyarımla parçalama (Surface Induced Dissociation, SID) işlemi, son zamanlarda TWIMS ile birlikte kullanılan bir başka MS/MS yöntemidir [101]. SID yönteminde CAD yöntemindeki gaz ile çarpıştırma işlemi ile parçalama yerine bir yüzey ile çarpıştırarak parçalama yapılmaktadır. Yüzeyle çarpışma, ulaşılan aktivasyon enerjisini arttırarak parçalanma mekanizmalarının gerçekleşmesine yol açan enerji transferini sağlamaktadır [102]. Cihaz konfigürasyonunda herhangi bir değişiklik yapmadan SID modülünü kullanmak mümkündür [103, 104]. SID ve CAD parçalamalarının bir arada kullanıldığı çalışmalarda protein-ligand etkileşimleri ile ilgili önemli yapısal bilgiler elde edilebilmektedir. Bu alandaki çalışmalarda MDa mertebesinde molekül kütlelerine sahip protein yapılarının konformasyon özellikleri ayrıntılı bir şekilde değerlendirilebilmektedir [105-109].

Bu alanda yapılan çalışmalarda TWIMS analizinden verilerin elde edilmesi ve değerlendirilmesi aşamalarında kullanılmak üzere daha pratik ve yüksek doğruluk veren hesaplama yöntemlerinin geliştirilmesi amaçlanmaktadır [110-112]. Bu çalışmalarda iyon hareketliliği ölçümlerinin tanımlama ve karakterizasyon araştırmalarında kullanılabilmesi için TWIMS yöntemine özgü etkin çarpışma kesiti (CCS) veri tabanları oluşturulmaktadır. Bu çalışmaların birinde standart polialanin oligomerleri kullanılarak TWIMS için geliştirilen kalibrasyon yöntemiyle binlerce peptidin CCS değerleri %3-4 hata oranıyla hesaplanmıştır [113]. Bir başka çalışmada farklı laboratuvarlarda TWIMS kullanılarak yapılan metabolit analizlerinde 125 adet metabolite ait CCS değerleri %5 doğrulukla hesaplanmıştır [114]. Aynı araştırma grubu, yaklaşık 200 lipid yapısının CCS değerlerini %3

doğrulukla hesaplayarak bu türleri içeren bir veri tabanı oluşturmuştur. CCS değerlerinin hesaplanması ile ilgili gelişmeler kaydedildikçe bu alanda yapılan analizlerde elde edilen sonuçların doğruluğunun ve güvenilirliğinin hızla artacağı öngörülmektedir.

2.5.2. Etkin Çarpışma Kesiti (Collision Cross Section, CCS)

İyon hareketlilik spektrometreleri, basit olarak iyonların sürükleyici gaz yardımıyla bir elektriksel alanda ilerlerken harcadıkları zamanı ölçer. Bu elektriksel alanda iyonların sürüklenme hızı (v_D), elektriksel alanın şiddeti (E) ile doğru orantılıdır (Eşitlik 2.2). İyon hareketliliği sabiti olarak tanımlanan K ifadesi, iyonların sürüklenme hızı ile doğru, sürüklenme zamanları (t_D) ile ters orantılıdır (Eşitlik 2.2 ve 2.3).

$$v_D = KE \quad (2.2)$$

$$\frac{L}{t_D} = KE \quad (2.3)$$

İyon hareketliliği (K), CCS değeri (Ω), sayıca sürükleyici gaz yoğunluğu (hacim başına düşen molekül sayısı, N), iyonun kütlesi (m_1), sürükleyici gaz atomlarının veya moleküllerinin kütlesi (m_N), iyonun yükü (z) ve bir elektronun yükü (e , 1.602×10^{-19} C) ifadelerinin ilişkisi, Mason-Champ eşitliği ile tanımlanmaktadır (Eşitlik 2.4) [115]:

$$K = \frac{\sqrt{18\pi}}{16} \frac{ze}{\sqrt{k_B T}} \sqrt{\left(\frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_N}\right)} \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{\Omega} \quad (2.4)$$

Bir iyonun etkin çarpışma kesiti, boyutu ve yapısı hakkında ayrıntılı bilgi sağlayabilmektedir. Klasik sürüklenme tüpünde ayırımın yapıldığı iyon hareketliliği spektrometrelerinde CCS değerleri direkt olarak belirlenen sürüklenme zamanları kullanılarak eşitlik 2.5 ile hesaplanabilmektedir [116].

$$\Omega = \frac{\sqrt{18\pi}}{16} \frac{ze}{\sqrt{k_B T}} \sqrt{\left(\frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_N}\right)} \frac{t_D E}{L} \frac{760}{P} \cdot \frac{T}{273.2} \cdot \frac{1}{N} \quad (2.5)$$

Fakat TWIMS cihazlarında elde edilen sonuçlar için bu durum geçerli değildir. Sürüklenme tüpünde yapılan analizlerde ayırma bölümüne sürekli olarak bir statik elektriksel alan uygulanmaktadır. TWIMS cihazlarında ise iyonlar, değişken elektriksel alan uygulanarak meydana getirilen dalgalar üzerinde taşınmaktadır. Ayrıca bu cihazla yapılan analizlerde sürükleyici gazın saflığını, basıncını ve sıcaklığını doğrudan ölçmek mümkün değildir. Bu nedenlerden dolayı, TWIMS cihazı ile elde edilen sürüklenme zamanı verileri, CCS değeri bilinen yapılar kullanılarak yapılan kalibrasyon hesaplarına göre analiz edilen türlerin CCS değerlerine dönüştürülmelidir. Kaydırmalı dalga alanında yapılan analizlerde CCS değerlerinin hesaplanmasında eşitlik 2.5 yerine, elektrik alanı (A) ve doğrusal olmayan dalgalar ile ilgili dönüşüm faktörü (B) parametrelerini içeren eşitlik 2.6 kullanılmaktadır.

$$\Omega = \frac{\sqrt{18\pi}}{16} \frac{ze}{\sqrt{k_B T}} \sqrt{\left(\frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_N}\right)} \frac{760}{P} \cdot \frac{T}{273.2} \cdot \frac{1}{N} \cdot A \cdot t_D^B \quad (2.6)$$

Eşitlik 2.6'ya göre, iyonun CCS değeri kütesine yüküne bağlıdır. Bu eşitliği “ze” ve $\sqrt{\frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_N}}$ ifadelerine bölerek kütle ve yük değerlerinden bağımsız düzeltilmiş CCS'ye (Ω') ait eşitlik elde edilir.

$$\Omega' = \frac{\sqrt{18\pi}}{16} \frac{1}{\sqrt{k_B T}} \cdot \frac{760}{P} \cdot \frac{T}{273.2} \cdot \frac{1}{N} \cdot A \cdot t_D^B \quad (2.7)$$

Bu eşitliğin A parametresini içeren kısmı, yeni bir sabit olarak A' ifadesine eşitlenirse eşitlik 2.8 olarak verilen daha sade bir ifade elde edilmiş olur.

$$\Omega' = A' \cdot t_D^B \quad (2.8)$$

Böylece, iyonun CCS değeri ile düzeltilmiş CCS değeri arasındaki ilişki eşitlik 2.9 ve 2.10'da verildiği gibi ifade edilebilir [115, 116].

$$\Omega = ze \sqrt{\left(\frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_N}\right)} \Omega' \quad (2.9)$$

$$\Omega = ze \sqrt{\left(\frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_N}\right)} A' \cdot t_D^B \quad (2.10)$$

SYNAPT cihazında iyonlar için belirlenen deneysel sürüklenme zamanları, iyon hareketliliği hücresi ve uçuş zamanlı kütle ayırıcısı içerisinde geçirdikleri sürelerin toplamıdır. Bu nedenle, iyonların sürüklenme zamanı değerleri, düzeltilmiş CCS değerlerine göre düzeltilerek iyon hareketliliği hücresinde geçirilen zamana dönüştürülmelidir. Düzeltilmiş sürüklenme zamanı değerleri (t_D') eşitlik 2.11 ile ifade edilir.

$$t_D' = t_D - \left(\frac{c\sqrt{m/z}}{1000}\right) \quad (2.11)$$

Bu eşitlikteki “c” harfi, geliştirilmiş kapasite çevrimi (Enhanced Duty Cycle, EDC) gecikmesi sabiti olarak ifade edilmektedir. Analizde kullanılan cihaza göre 1.4-1.6 arasında bir sayısal değere karşılık gelmektedir.

Aynı m/z oranına sahip iki farklı molekül, iyon hareketliliği kütle spektrometresi ile analiz edildiğinde iyon hareketliliği hücresinde şekil ve boyut özelliklerine bağlı olarak farklı hızlarda hareket etmeleri sayesinde birbirlerinden ayrılabilirler. TWIMS cihazında analiz edilen örnekler içerisinde daha küçük CCS değerine sahip olan iyonlar daha hızlı hareket ederken, daha büyük CCS değerine sahip olan iyonlar, kendilerine göre ters yönde gönderilen sürükleyici gazla daha fazla çarpışarak yavaşlarlar. Buna göre, daha küçük CCS değerine sahip olan iyonların ayırma hücrelerinde geçirdikleri sürüklenme zamanları, CCS değerleri daha büyük olan iyonlara göre daha kısa olacaktır. Bazı durumlarda daha yüksek molekül kütlesine sahip iyonlar için daha kısa sürüklenme zamanı değerleri tespit edilmiştir. Bu durum, bir iyonun sürüklenme zamanının sahip olduğu yüke de bağımlı olmasından kaynaklanmaktadır.

Bir iyonun hareketliliği ve kullanılan sürükleyici gazın türüne bağlı olan CCS değerleri, uygun teorik yöntemlerle hesaplanabilmektedir. Böylece elde edilen teorik değerler ile deneysel değerler kıyaslanabilir. Analiz koşullarına en yakın ortamın temsil (simüle) edilmesiyle iyonların ortamdaki sürükleyici gaz ile çarpışmaları da hesaba katılarak teorik ortalama CCS değerleri belirlenmektedir. Teorik CCS

değerlerinin hesaplanması konusunda Jarrold ve Bowers'ın araştırma grupları tarafından gerçekleştirilen çalışmalar, önemli bir dönüm noktasını oluşturmaktadır [117-119]. Günümüzde teorik CCS değerlerinin belirlendiği çalışmaların neredeyse tümünde söz konusu araştırma grupları tarafından geliştirilen MOBCAL programı kullanılmaktadır. Açık kaynaklı bir program olan MOBCAL, analiz edilen iyon ile sürükleyici gazın çarpışmalarını temel almaktadır. Bu programda analiz edilen yapıların X-ışını kristallografi, NMR gibi tekniklerle yapılan analizlerinden veya moleküler dinamik simülasyon gibi uygulamalardan elde edilen koordinat dosyalarından ortalama CCS değerleri hesaplanmaktadır. Bu programda bahsi geçen koordinat verileri alınarak sürükleyici gazla etkileşimler hesaplanır ve böylece ortalama moleküler yönelimler belirlenmektedir [120]. MOBCAL hesaplamaları sonucunda belirlenen etkin çarpışma kesiti modelleri, kesin katı küre yayılması (Exact Hard Sphere Scattering, EHSS), gidiş izi metodu (Trajectory Method, TM) ve izdüşümü yaklaşımıdır (Projection Approximation, PA) [117, 119, 121, 122].

2.5.3. IM-MS ile Polimer Karakterizasyonu

2000'li yılların başından beri polimer örneklerinin IM-MS teknikleri ile yapısal olarak karakterize edildiği çalışmalar yapılmaktadır [123, 124]. Bu alanda yeni ufuklar açan bir çalışmada karmaşık polimer örneklerindeki kimyasal gürültü etkisini azaltmak için iyon hareketliliği ayırması kullanılmıştır [125]. Bu tekniklerde ayırıcılığın artmasıyla birlikte polimer örneklerinde çok düşük miktarlarda bulunan iyon serilerinin yapısal özellikleri hakkında bilgi sağlayan veriler elde edilebilmektedir.

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda IM-MS tekniği ile yapılan polimer analizleri için özel ve yeni iyonlaştırma tekniklerinin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Trimpin ve çalışma arkadaşları, kendilerinin geliştirdikleri matriks yardımcı vakumda iyonlaştırma (MAIV) yöntemini kullanarak IM-MS analizleri yapmışlardır. Bu tür çalışmalarda daha verimli iyonlaştırma yöntemlerinin geliştirilmesiyle birlikte gaz fazındaki gürültü azaltılarak polimer örneklerinde düşük miktarlarda bulunan katkı maddeleri tayin edilebilmektedir [126]. Afonso ve çalışma arkadaşları tarafından yürütülen bir başka çalışmada düşük molekül kütlelerine sahip poli(eter eter keton) örnekleri, atmosferik katı analiz probu (Atmospheric Solid Analysis Probe, ASAP) adı verilen iyon kaynağının kullanıldığı IM-MS sistemi ile analiz edilmiştir. Bu kaynaktan elde edilen iyonların aynı örnekler için yapılmış olan MALDI-TOF

analizlerinden elde edilen iyonlardan farklı oldukları görülmüştür [127]. Hercules ve Geis, yaptıkları çalışmada poliüretan zincirlerinin parçalanma mekanizmalarını doğrulamak için IM-MS tekniğini kullanmışlardır [128]. Charles ve Pricl, IM-MS tekniğinden faydalanarak dendrimer ve düz polimer zincirlerinin bir araya gelerek oluşturdukları yapıların konformasyonel çeşitliliklerini incelemiştir [129]. Bu çalışmada moleküllere katılan metal iyonlarının ve yüklerin miktarına göre yapılarında meydana gelen değişiklikler izlenmiştir.

IM-MS çalışmalarında tamamlayıcı olarak hesaplamalı analiz yöntemlerinin kullanılması, yapısal farklılıkların incelenmesi açısından çok değerli bilgiler sağlamaktadır. Chang ve çalışma arkadaşlarının yaptıkları çalışmada halkalı ve düz zincirli polilaktid iyonlarının konformasyonel özellikleri, IM-MS tekniği ile analiz edilirken moleküler dinamik simülasyon programlarından alınan teorik verilerden de faydalanılmıştır [130]. Bu çalışmada polimer uzunluğuna ve yan zincir gruplarının yapılarına bağlı olarak polimerik zincirlerin düz zincirli veya halkalı konformasyona sahip olup olmadıkları incelenmiştir. Moleküler dinamik simülasyonu ise molekül içindeki etkileşimleri ve yük dağılımı ile ilgili bilgi sağlayarak gözlenen yapısal değişikliklerin yorumlanmasına katkıda bulunmaktadır.

Hilton tarafından yapılan bir çalışmada farklı zincir sonu grubuna sahip iki seriyi içeren PEG karışımı, IM-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiştir [131]. Bu çalışmada aynı m/z oranlarına sahip, diol zincir sonu grupları bulunan, izobarik PEG zincirleri içeren örnek analiz edilmiştir. Örnekteki zincir sonu gruplarının farklılıklarına bağlı olarak iyon hareketliliği spektrumlarında birbirinden farklı iki seriye ait sürüklenme zamanı verileri elde edilmiştir. Yapılan MS/MS çalışmaları da zincir sonu gruplarının yapısal farklılıklarını ortaya çıkarmıştır. Bir başka çalışmada, radikal polimerizasyonu ile sentezlenen PMMA homopolimer zincirleri, ESI-IM-MS tekniği kullanılarak analiz edilmiştir [132]. Bu çalışmada, PMMA örneğinde bulunan, farklı zincir sonu gruplarına sahip seriler, herhangi bir ön ayırma işlemi kullanılmadan IM-MS tekniği ile hızlı bir şekilde belirlenmiştir. Farklı zincir sonu gruplarına sahip polimer zincirleri, kritik koşullarda sıvı adsorpsiyon kromatografisi (liquid adsorption chromatography at critical conditions, LACCC) gibi yöntemlerle uzun sürelerde ve zor analitik koşullarda ayrılırken, aynı tür örnekler IM-MS tekniği kullanılarak milisaniyeler içerisinde birbirlerinden ayırt edilebilmektedir. IM-MS tekniği ile

verilerin hızlı elde edilebilir ve yorumlanabilir olması, akademik ve endüstriyel çalışmalarda çok büyük avantaj sağlamaktadır.

Polisiloksan ve polifosfazen gibi sentetik inorganik polimerlerin de IM-MS tekniği kullanılarak analiz edildikleri çalışmalar mevcuttur [133]. Bu tür polimer örneklerinin analiz edildiği bir çalışmada IM-MS analizlerinden elde edilen verilerle büyük polisiloksan yapılarının varlığı tespit edilebilmiştir. Çalışmada analiz edilen farklı konformasyonlara sahip polidiklorofosfazen zincirlerinin NH_4Cl 'nin PCl_5 ile aerobik koşullarda reaksiyona sokularak elde edildikleri doğrulanmıştır. ESI kaynağının kullanıldığı bir çalışmada ise, yüksek molekül kütlelerine sahip PEG zincirleri, IM-MS tekniği ile analiz edilmiştir [125]. Teorik olarak hesaplanan etkin çarpışma kesiti değerleri, deneysel veriler ile elde edilen değerlerle kıyaslanmıştır. Sonuçlara göre yüksek yük değerlerine sahip zincirlerin daha açık ve değişken bir konformasyona sahip oldukları görülmüştür. ESI tekniğinin çalışma prensibinden kaynaklı olarak, bu iyonlaştırma yönteminin kullanıldığı çalışmalarda tayin edilebilir örneklerin molekül kütlesi aralıkları MALDI tekniğine kıyasla daha sınırlıdır. Bu iki iyon kaynağının aynı IM-MS cihazında kullanılabilir olması, polimer alanında yapılan çalışmalarda daha hızlı denemelerin yapılabilmesi açısından oldukça büyük avantaj sağlamaktadır.

Düz zincirli poliester örneklerinin ETD yöntemi ile parçalandığı bir çalışmada elde edilen ana parçalanma ürünlerinin IM-MS tekniği ile analiz edilmesi sonucunda yapı hakkında destekleyici veriler elde edilmiştir [134]. Düz zincirli ve halkalı poli(kaprolakton) zincirleri içeren polimer örneği de IM-MS tekniği ile analiz edilmiştir [135]. Burada da farklı konformasyonel özelliklere, aynı m/z oranına sahip olan zincirlerin, IM-MS analizinde farklı sürüklenme zamanlarına sahip oldukları belirlenerek yorumlama ve değerlendirme çalışmaları yapılmıştır.

Örnek olarak verilen çalışmalara bakıldığında IM-MS tekniğinin polimer karakterizasyonu alanı için çok değerli bir analitik yöntem olduğu anlaşılmaktadır. Karmaşık polimer örneklerindeki zincirlerin konformasyonlarındaki farklılıkların gaz fazında izlenerek ayırt edilebilmesi, bu yöntemi kromatografi gibi diğer ayırma tekniklerinin kullanıldığı analitik yöntemlerden çok daha avantajlı bir konuma getirmektedir.

2.6. Kovalent Olmayan Kompleksler

Bir dipol momente veya anlık polariteye sahip olan moleküller, kovalent olmayan etkileşimler üzerinden birbirleriyle etkileşebilmektedir. Kulombik etkileşimler, van der Waals etkileşimleri, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler, biyolojik sistemlerde sıklıkla karşılaşılan kovalent olmayan etkileşim türleridir. Bu etkileşimlerin enerji değerleri yaklaşık olarak, 1-5 kcal/mol aralığındadır [136]. Eğer etkileşen moleküller ters yüklere sahipse, bu birimler Kulomb yasalarına göre elektrostatik etkileşimlerle birbirlerini çekerler. Bu birimler arasındaki kulomb enerjisi (E_c), dielektrik sabitinin ϵ , birimler arasındaki mesafenin r olduğu ortamda türlerin yük değerlerine (Q_1 and Q_2) bağlıdır (Eşitlik 2.12).

$$E_c = \frac{Q_1 Q_2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 r} \quad (2.12)$$

Enerji ifadesinin negatif işaretli olması, kulombik etkileşimdeki türlerin birbirlerini çektiğini gösterir. Birimlerin aynı tür yüke sahip olup birbirlerini ittikleri sistemlerde de bu tür etkileşimlerin varlığından söz edilebilir. Kulombik etkileşim haricindeki tüm kovalent olmayan etkileşimlerde birimler birbirlerini karşı çekme kuvveti uygularlar. Çünkü dipol momente sahip veya anlık olarak dipol momente sahip olan moleküller üzerlerine etki eden kuvvetlere göre yönelme gösterirler. u_1 ve u_2 dipol momentlerine sahip serbest moleküllerin arasındaki etkileşim enerjisi, Keesom enerjisi (E_K) olarak adlandırılır (Eşitlik 2.13):

$$E_K = - \frac{u_1^2 u_2^2}{3(4\pi\epsilon\epsilon_0)^2 k T r^6} \quad (2.13)$$

Aynı eşitlik, kutuplaşabilirlik ifadesi paydaki bir terim ile yer değiştirdiğinde dipol-anlık dipol etkileşim enerjisi (Debye enerjisi) için de geçerli olmaktadır (Eşitlik 2.13). Keesom ve Debye enerjileri birbirlerine çok yakın olan moleküller arasındaki etkileşimlerle ilgilidir ve bu tür etkileşimlerin hepsi birden van der Waals etkileşimleri olarak ifade edilmektedir. van der Waals enerjileri, moleküller arasındaki mesafeye $1/r^6$ oranıyla bağlıdır. Bu enerjiler, kütle spektrometrik sistemlerdeki vakum ortamında bağlı dielektrik sabitine daha çok bağlıdır. Örneğin, çözelti ortamından ($\epsilon=80$) vakum ortamına ($\epsilon=1$) geçiş yapıldığı varsayıldığında kulombik etkileşim enerjileri 80 kat artıyorsa, aynı geçişte van der Waals etkileşim enerjilerinin 6400 kat arttığı görülür. Gerçek koşullarda bu faktörler genellikle daha küçük değerlerde

olabilmektedir. Eğer kovalent olmayan kompleksler, etkileşim enerjilerindeki artış nedeniyle iyon oluşumu ve çözücü uzaklaştırma basamaklarında parçalanmazsa, kütle spektrometrik vakum ortamında parçalanma ihtimallerinin çözeltide parçalanma ihtimallerinden daha düşük olduğu söylenebilir. Bu etkileşim kuvveti, her tür kovalent olmayan kompleksi bir arada tutamayabilir.

Hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları proteinlerin üç boyutlu yapılarını muhafaza eden kovalent olmayan etkileşimler arasında en yaygın olanlarıdır. Hidrofobik etkileşimler, doğrudan etkileşim yüzeylerinin yapısına ve büyüklüğüne bağlıdır. Hidrojen bağı ise, daha spesifik, öncelikli olarak elektrostatik çekime dayalı bir kovalent olmayan etkileşim türüdür. Bu tür etkileşimlerin enerjileri, zayıftan (1–2 kJ mol⁻¹) kuvvetliye (40 kJ mol⁻¹) doğru değişim gösterir. Hidrofobik etkileşimlerde, çözeltide yapısal olarak düzenli bir şeklide bulunan çözücü moleküllerinin (su gibi) kompleks oluşumu ile birlikte türler arasındaki etkileşim bölgesinden ayrılmaları sonucunda entropi artar. Vakum ortamında ise çözücü ortamdan uzaklaşınca entropi sadece hidrofobik kompleksin bozulması ile artar. Bu nedenden dolayı, hidrofobik komplekslerin, çözelti fazına kıyasla vakumda bozunma eğilimleri daha yüksektir. Kütle spektrometrik bozunma deneylerinde, bu gibi farklı etkileşim özelliklerine bağlı olarak komplekslerin bağlanma enerji değerleri belirlenerek komplekslerin çözelti ve vakum ortamlarındaki yapı ve bileşim durumları incelenmektedir [137].

Kovalent olmayan komplekslerin kütle spektrometrik olarak incelendiği çalışmaların çok büyük bir kısmında iyon kaynağı olarak ESI tekniği kullanılmaktadır. ESI ve türevleri, modern yumuşak iyonlaştırma yöntemleri arasında en yumuşak iyonlaştırma kaynakları oldukları için bu alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat kovalent olmayan komplekslerin analizinde ESI tekniği kullanılırken bile, çözeltinin pH değeri, kurutucu/püskürtücü gaz sıcaklığı, kullanılan çözücünün türü/bileşimi, ortamda bulunan katkı maddelerinin türü gibi parametrelere dikkat edilmelidir [138].

ESI ile yapılan protein kompleksi analizlerinde kullanılan çözücünün çeşidi, analiz edilen proteinin konformasyonunu direkt olarak etkilemektedir. Biyokimyasal örnek hazırlama işlemlerinde kullanılan tuzlar ve tampon çözeltiler genel olarak kütle spektrometrik analizlerle uyumlu değildir. Ortamda düşük miktarda uçucu olmayan tuzların bulunması, çoğunlukla ESI kütle spektrumlarının kalitesini düşürmekte ve

bazı durumlarda analiz edilen örneklere ait sinyallerin gözlenememesine neden olmaktadır. ESI-MS analizlerinde genellikle metanol, asetonitril, izopropanol ve organik asitler (asetik asit, formik asit vb.) gibi tamamlayıcı maddelerin kullanılması, kovalent olmayan komplekslerin bozulmasına neden olabilmektedir. Tuz, organik çözücü ve kuvvetli asitlerin yapı üzerindeki etkilerini azaltmak için örnekler, uygun saflaştırma işlemlerinden geçirilerek en uygun çözücü karışımları içerisinde ESI-MS analizlerine hazır hale getirilmelidir. Örneğin diğerlerine göre daha uçucu olan amonyum tuzları, ESI-MS ile yapılan kovalent olmayan kompleks analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır [139].

ESI tekniğinin kullanıldığı kovalent olmayan kompleks analizlerinde kütle aralığı sınırlaması da sorun yaratabilmektedir. ESI tekniğinde çoklu yüke sahip iyonların oluşma olasılığının yüksek olması sayesinde kovalent olmayan kompleksler gibi büyük yapılara ait sinyaller, tayin edilebilir m/z oranı aralığında gözlenebilmektedir. Fakat protein yapılarının üzerindeki yük miktarı arttıkça doğal konformasyonlarının bozulma ihtimalinin artması, bazı ESI-MS analizlerinde iyonların çoğunlukla çoklu yüke sahip olması durumunu dezavantaja dönüştürebilmektedir. Özellikle birden çok birime sahip çok büyük protein yapılarının ESI tekniği ile uygun m/z değerlerinde analiz edilebilmesi için özel cihaz donanımlarının kullanılması gerekebilmektedir.

NanoESI iyon kaynaklarında çok daha küçük sprey kapillerleri bulunur ve bu sayede sprey sırasında daha küçük hacimde damlacıklar oluşturulabilir. Kovalent olmayan komplekslerin analizinde bu tür kaynakların kullanılması avantaj sağlamaktadır. Bu teknikte gerçekleştirilen iyonlaştırmadaki çözücü uzaklaştırma işlemi sırasında analiz edilen kovalent olmayan kompleks molekülü daha küçük bir damlacık içerisinde, daha az çözücü ile çevrili olduğundan dolayı çözelti fazı dengesi çok zorlanmamaktadır. Bu işlem, normal bir ESI kaynağıyla yapılan çözücü uzaklaştırmasına göre daha az zaman alır.

ESI-MS tekniği ile protein-protein, protein-peptit, protein-küçük molekül, protein-metal iyonu komplekslerinin yanı sıra karbonhidrat, lipit, nükleik asit gibi yapıların dahil olduğu kompleksler de incelenebilmektedir [140-146]. Membran proteinlerinin bütün hallerinin analiz edildiği çalışmalar bu alanda son zamanlarda yapılmakta olan en çarpıcı çalışmalardır [147]. Sinyal iletimi ve moleküler taşıma gibi temel yaşamsal faaliyetlerde çok önemli fonksiyonlara sahip olan bu tür proteinlerin saf ve doğal hallerinin kristalize edilmeleri zor olduğundan dolayı yapısal olarak analiz edilmeleri

oldukça zordur. ESI-MS kullanılarak yapılan bazı çalışmalarda membran protein kompleksleri, öbek halindeki deterjan molekülleri yardımıyla korunarak analiz edilmek üzere gaz fazına transfer edilebilmiştir. Gaz fazında meydana gelen çarpışmalarla öbek yapısı bozulan deterjan molekülleri korumuş oldukları kompleks yapılarından ayrılmaktadır. Birden fazla protein biriminden meydana gelen kompleks yapıları, bu şekilde bütün hallerinde analiz edilebilmiştir.

Protein konformasyonlarının ve kovalent olmayan etkileşimlerin analiz edildiği ESI-MS çalışmalarında hidrojen/döteryum (H/D) değişim yöntemi de yoğun olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde analiz edilen yapıdaki hidrojen atomları döteryum atomları ile yer değiştirmektedir. Genellikle proteinin temel zincirindeki amit gruplarında bulunan hidrojen atomları değiştirilmektedir. H/D değişimi, çözücü erişilebilirliği, hidrojen bağı varlığı, α -heliks, β -tabaka gibi farklı konformasyonlarda aminoasitlerin konumsal durumları gibi parametrelere bağlıdır. Böylece proteinlerin farklı konformasyonlardaki çözücü erişilebilirliği durumları (çözünür ve kümelenmiş olması), H/D yönteminin birlikte kullanıldığı kütle spektrometrik analizlerle izlenebilmektedir. Kovalent olmayan komplekslerin incelendiği çalışmalarda birimler arasındaki etkileşim bölgelerinin çözücü erişilebilirliğinin düşük olması nedeniyle bu bölgelerdeki kimyasal gruplar H/D değişimine karşı korumalı durumdadır. Bu nedenle, kovalent olmayan kompleks yapılarında özellikle etkileşen bölgelerin H/D değişimine uğrama hızları, serbest türlere göre daha düşüktür. H/D değişiminin uygulandığı kütle spektrometrik analizlerde protein-protein, protein-ligand ve protein-membran etkileşimleri analiz edilmektedir [148, 149]. Proteinlerin konformasyonel dinamiklerinin incelendiği çalışmalarda da bu tür analizler yapılmaktadır. Böyle bir çalışmada insülin proteininin farklı dört konformasyonu H/D değişiminin uygulandığı ESI-MS yöntemi ile analiz edilmiştir [150].

MALDI işlemi, ESI ile kıyaslandığında daha sert bir iyonlaştırma tekniğidir. MALDI-MS analizlerindeki örnek hazırlama işlemleri ve desorpsiyon/iyonlaştırma gibi iyon oluşturma basamaklarında kovalent olmayan komplekslerin muhafaza edilmesi zordur. Örnek hazırlama aşamasında organik çözücü, kuvvetli asidik özelliğe sahip matriksler gibi yapıyı bozabilecek maddelerin kullanımından kaçınılmalıdır. Desorpsiyon/iyonlaştırma işlemlerinde ise örnek-matriks karışımlarına makul enerji değerlerine sahip lazer ışını gönderilmelidir. Çoğu zaman bu hususlara dikkat edilse bile yüksek molekül kütesine sahip komplekslerin MALDI-MS ile analiz

edilebilmeleri mümkün olmamaktadır. Bu konuda yapılan derleme yayınlarda literatürde MALDI-MS ile kovalent olmayan komplekslerin analizinde kullanılan en uygun örnek hazırlama yöntemi ve cihaz parametreleri sunulmaktadır [151, 152]. Ayrıca MALDI tekniği ile yapılan iyonlaştırma işlemlerinde tek yüke sahip iyonların oluşma olasılığının yüksek olması da büyük kompleks yapıların analizini zora sokmaktadır.

2.7. Polielektrolitler

Polielektrolitler, ana zincirleri üzerindeki her tekrar eden birimde ve zincir sonu gruplarında iyonik veya iyonlaşabilen kimyasal grup içeren polimerik türlerdir. Çözeltideki türler, sahip oldukları yük grubuna göre negatif veya pozitif yüklü olarak nitelendirilir [153]. Çözelti içerisinde yüklü olan bileşiklerin kütle spektrometrisi ile hem negatif hem de pozitif modda analiz edilebilmeleri, bu örneklerin analizi için ilginç ve çok yönlü verilerin elde edilebilmesini sağlamaktadır. Asidik bir proton veya katyonun kütle spektrometrik koşullarda polimer zincirinden ayrılmasıyla negatif yüklü iyon oluşur. Polielektrolitlere bir katyonun eklenmesi veya bulunduğu ortamda katyonlaştırıcı türlerin bulunması, polielektrolitin pozitif iyonlarının oluşmasını sağlar.

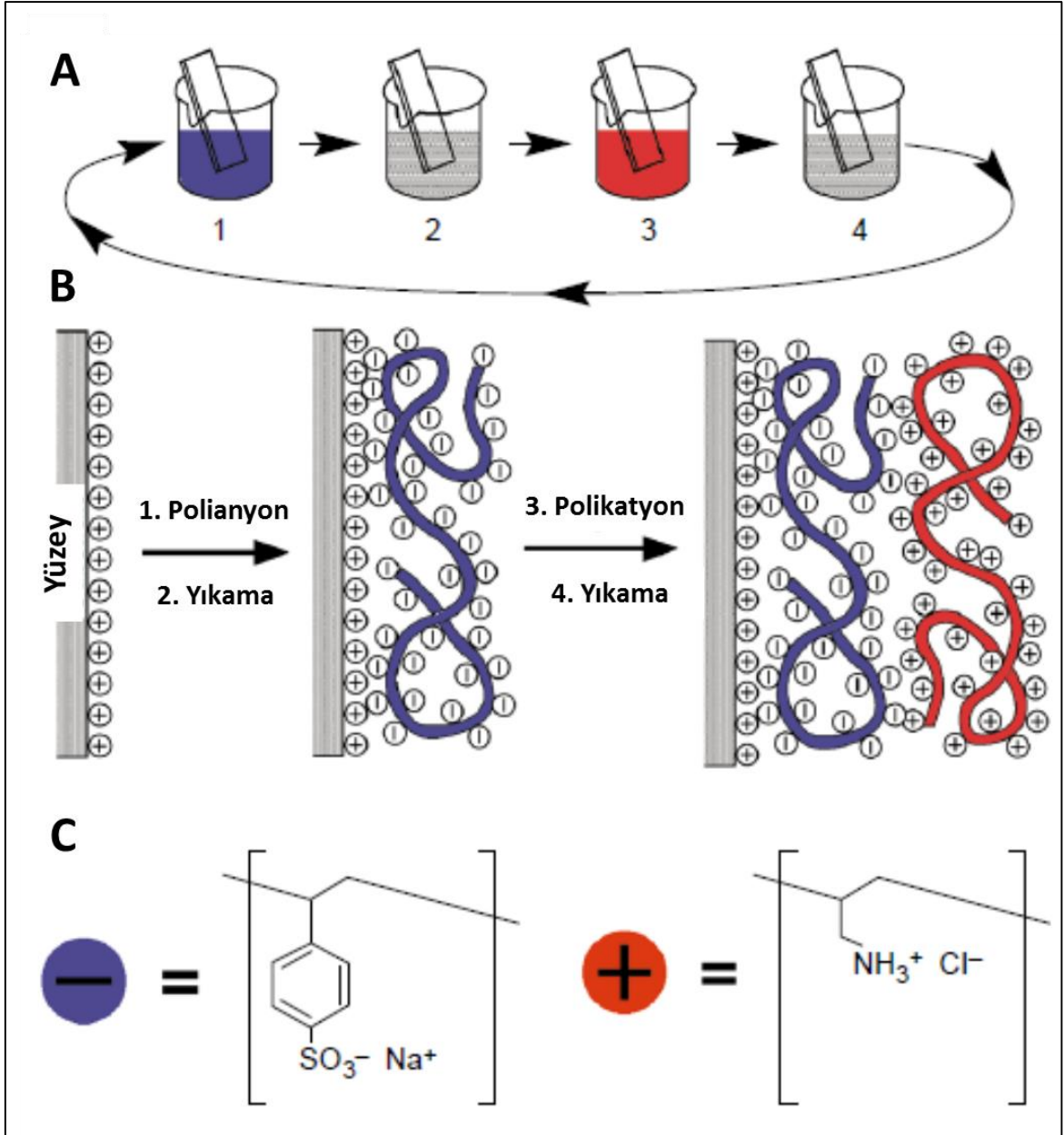
Polielektrolitler, polimer elektrolit yakıt hücresi (PEFC) üretimi gibi önemli uygulamalarda kullanılmaktadır. Bu tür yakıt hücreleri, gereksinim olduğu anda hızlı bir şekilde enerji sağlayabilmeleri ve makul sıcaklık değerlerinde çalışmalarını nedeniyle yer aldıkları uygulamalar açısından oldukça önemlidir. PEFC üretiminde kullanılan polielektrolitin türü, hücrenin fonksiyonunu belirlemektedir. DuPont firması tarafından Nafion ismiyle üretilen sülfonik asit yan zincirlerine sahip, yüksek oranda florlanmış polimer, PEFC üretiminde kullanılan oldukça pahalı bir polielektrolittir [154]. Yakıt hücrelerinin üretiminde farklı polimerik malzemelerin kullanılmasıyla PEFC uygulamalarında kullanılan polielektrolitlerin satış fiyatlarının düşmesi beklenmektedir. Yapısında yüksek oranda sülfonik asit grupları bulduran polimerlerin gelecekte bu tür uygulamalarda kullanılabilmesini hedefleyen çalışmalar mevcuttur [155, 156]. Günümüzde sülfonlanmış poli(eterketon)lar ve poli(stiren)ler PEFC uygulamalarında kullanılan polimerik türlerdir [157]. Bunlar, Nafion'dan daha ucuz, proton transfer özellikleri iyi olan polielektrolitlerdir [158]. Yapılan bir çalışmada, poli(stiren sülfonat)ın, poli(vinil alkol) ile birleşimlerinden elde

edilen malzemenin Nafion yerine kullanılabilir bir alternatif olduğu gösterilmiştir [159].

2.7.1. Polielektrolit Çoklu Tabakaları

Çoklu tabaka oluşturma yöntemi (Layer-by-Layer, LbL), bir yüzey üzerine organik veya inorganik bileşiklerin tabakalı olarak yerleştirilmesiyle modifiye edilmesi işlemidir. Yüzey üzerinde çoklu tabakaların oluşturulmasıyla yüzeyin morfolojisi, ıslanabilirliği, yapışkanlığı, biyouyumluluğu ve yükleme kapasitesi gibi özellikleri değiştirilebilmektedir [160, 161]. Buna ek olarak, bu yöntemle yüzey üzerinde nano mertebede yapıların oluşturulmasıyla yüzeyin çoklu fonksiyona sahip olması sağlanabilir. LbL, farklı türde bileşiklerin kullanılabilildiği, basit bir yöntem olduğundan dolayı, elektroluminesans, biyosensör, ayırma, kataliz, ilaç taşıma, nanomühendislik gibi uygulamalarda yaygın olarak uygulanmaktadır [162-164].

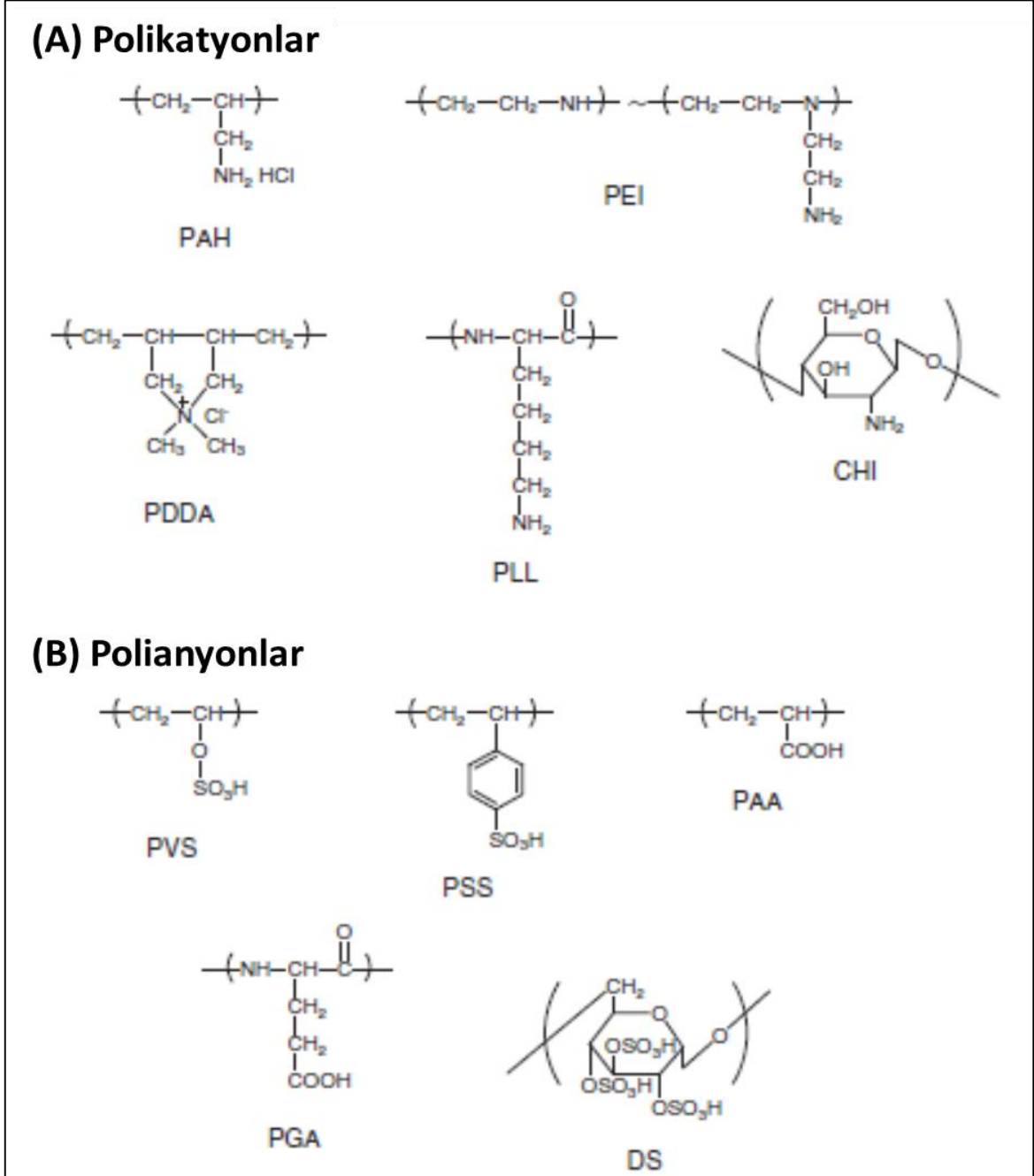
LbL yönteminin ilk olarak 1966 yılında uygulandığı çalışmada elektrostatik temelli LbL yöntemi ile bir malzeme geliştirilmiştir [165]. 1997 yılında Science dergisinde bu konu ile ilgili bir makalenin yayınlanmasıyla birlikte bu yöntemle olan ilgi hızlı bir şekilde artmıştır (Şekil 2.10) [166]. Yüzeylerin LbL yöntemi ile kolaylıkla modifiye edilebilmesi, fonksiyon ve yapı özellikleri bakımından çok çeşitli malzemelerin üretilmesini sağlamıştır.



Şekil 2.10. (A) Daldırma yöntemi ile yüzey modifikasyonu basamaklarının basit gösterimi, (B) Sıra ile polikasyon ve polianyon zincirlerinin yüzeye yerleştirilmesi ve (C) Örnek olarak verilen polikasyon ve polianyonların tekrar eden birimleri [166].

Polielektrolit tabakalarının oluşturulduğu LbL uygulamalarında üretilen malzemenin fonksiyon ve yapı özellikleri, kullanılan çözücüye, çözeltinin dielektrik sabitine, tuz derişimine, pH değerine ve polimerlerle yüzey arasındaki etkileşimin türüne bağlıdır [167]. LbL yöntemi ile çoklu tabaka oluşturulan çalışmalarda polikasyonlar ve polianyonlar sıklıkla kullanılmaktadır. Bu türler malzemenin kullanılacağı uygulamaya göre, yük durumlarına uygun olarak yüzey üzerinde sıralı bir şekilde biriktirilirler. Polietilenimin (PEI), poliialilamin hidroklorür (PAH),

polidialildimetilamonyum klorür (PDDA), poli-L-lizin (PLL), kitosan (CHI) bu tür işlemlerde kullanılan polikasyonlardan bazılarıdır. Polianyonlara ise polistiren sülfonat (PSS), poliakrilik asit (PAA), poliglutamik asit (PGA), dekstran sülfat (DS), polivinil sülfonat (PVS) gibi model polimerler örnek olarak verilebilir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. LbL yönteminde en sık kullanılan polielektrolitlerin molekül yapıları [168].

Polielektrolitlerden meydana gelen çoklu tabakaların çoğunun oluşum temelinde elektrostatik etkileşimler bulunmaktadır [169]. Bu tür malzemelerin kullanıldıkları uygulama ortamındaki pH ve iyon şiddetindeki değişimlere verdikleri tepkiler oldukça önemlidir. Polielektrolitlerden meydana gelen çoklu tabakalar arasında hidrojen bağları da yer alabilmektedir. Bir çalışmada geliştirilen çoklu tabaka yapısını oluşturan polimetakrilik asit ve polivinilprolidon molekülleri arasında hidrojen bağları bulunduğu belirtilmiştir [170]. Bir başka çalışmada imitleştirme yapıp poliakrilik asit ile poliakrilamid zincirleri arasında hidrojen bağlarının meydana gelmesi sağlanarak yüzey üzerinde uyarı-cevap özelliğine sahip çoklu tabakalı yapı oluşturulmuştur [171]. Bu tür yüzeyler, tabakaları arasında elektrostatik yüklere sahip iyonlaşabilir birimler bulundurduğu için aldıkları uyarılara tepki verebilme özelliğine sahiptir.

Çoklu tabaka yöntemi ile modifiye edilmiş malzeme yüzeyleri, ortamın pH değeri ve iyonik şiddetinin yanı sıra sıcaklık ve ışık değişimlerine de tepki verme özelliğine sahip olabilmektedir [172]. LbL yöntemi ile kararlı malzeme hazırlanırken kinetik parametrelere dikkat edilmelidir. Yüzeylerin hazırlanması aşamasında sıcaklıkta meydana gelen bir artış, kinetik sınırların aşılmasıyla birlikte yüzeydeki çoklu tabakada yer değiştirmelerin meydana gelmesine neden olabilir. Bu konuda yapılan bir çalışmada farklı sıcaklıklardaki sentez koşullarına göre PDADMAC ve PSS polimerlerinden oluşan bir filmin yüzey kalınlıkları ve geçirgenlikleri kıyaslanmıştır [173]. Yapılarında ışığa hassas gruplar bulduran polielektrolitler ise dışarıdan gelen ışık uyarılarına göre yanıt veren malzemelerin üretiminde kullanılmaktadır. Bu tür çoklu tabakalı yüzeye sahip malzemelerin elde edilmesinde azobenzen türevleri kullanılmaktadır [174, 175]. Bu türlere örnek olarak verilebilecek poli(1-(4-(3-karboksi-4-hidroksi fenilazo) benzen-sülfonamido)-1,2-etandil) yapısının sodyum tuzu, yan zincirinde ışığa duyarlı gruplar bulundurmaktadır [176]. Işığa duyarlı çoklu tabaka üretiminin yapıldığı çalışmalarda tabakalar arasına ışığa duyarlı parçacıklar da yerleştirilmektedir [174].

2.7.2. Polielektrolit Kompleksleri

Birbirine göre zıt yüke sahip polimer yapıları, aralarında kovalent olmayan etkileşimler kurarak daha kompleks yapıları meydana getirebilmektedir [177-179]. Genelde kulombik etkileşimlere dayalı olan bu yapıların oluşumları oldukça hızlıdır.

Bu oluşumun sonraki aşamalarında başka bağlantı noktaları üzerinden etkileşimler meydana gelmesiyle polimer zincirlerinin konformasyonları değişebilir. Polimer kompleksleri, stokiometrik olan ve stokiometrik olmayan olmak üzere iki genel sınıfa ayrılabilir. Stokiometrik olanlarda polimer zincirleri eşdeğer molar orandadır. İkincisinde ise polielektrolit yapılarından biri diğerine göre miktarsal olarak daha fazladır. Miktarsal olarak fazla olan polielektrolitler, toplam kompleksin fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirleyici unsur olabilmektedir.

Polielektrolit kompleksleri, ilaç taşınımı sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tür uygulamalarda kullanılan, polielektrolit yapıları arasındaki etkileşimlerin ilaç ile kompleks arasındaki etkileşimlere göre daha belirleyici olduğu yapılar, polielektrolitler arası kompleksler (Interpolyelectrolyte Complexes, IPEC) olarak sınıflandırılmaktadır. IPEC sistemlerinin ilaç taşınımının ağız yolu ile yapıldığı uygulamalarda kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. [180, 181]. Bu alanda yapılan çalışmalarda sentez sırasında pH değerinin değiştirilmesi ile farklı özelliğe sahip malzemelerin üretildiği belirtilmiştir [182, 183]. İlaç taşınımında bu tür kompleks yapılarının kullanılması, sadece tek bir polimerden oluşan sistemlerin kullanılmasından daha etkin oranda ilacın taşınabilmesini sağlamaktadır.

Kompleksi oluşturan polimerlerin mol oranlarına göre üretilen malzemenin pH bağımlılığı değişmektedir. Bu tür malzemelerin şişme oranları, ortam pH değerine bağlıdır [184, 185]. Yapılan bir çalışmada kompleks yapıların asidik ortamda (pH \approx 1.2) ilk 30 dakikada maksimum oranda şiştiğini ve ortam pH değeri 6.8 değerine doğru değiştirildikçe şişme oranının azaldığı belirtilmiştir. Polimerik komplekslerde zincirler arasında etkileşim olan ve olmayan bölgelerin varlığı, yapıda boşluklar oluşmasına neden olmaktadır. Boşluklarda amin grupları bulunduran yapılarda asidik ortamda amin gruplarının protone olmaları sonucunda kompleksin hidrofilik özelliğinin artmasıyla birlikte su tutma kapasitesi de artmaktadır. IPEC malzemelerinin konformasyon özellikleri, yapısında dinamik ve elektrostatik bölgelerin bulunması nedeniyle ortama bağlı olarak değişebilmektedir. Aynı malzeme, pH değeri 6.8 olan bir ortamda amino gruplarının tekrar deprotone hallerine dönmeleri ile yapıdaki hidrofobik bölümlerin sayısının artması sonucunda daha sıkı hale gelir. Bu tür pH değerine duyarlı malzemeler, kolon tedavilerine özgü ilaç taşınım sistemlerinde kullanılabilir. Aynı grup tarafından yapılan bir başka çalışmada polielektrolit kompleksi kitosan yapısını da içermektedir [186].

Çalışmada elde edilen verilere göre, kullanılan kitosanın molekül kütlesine bağlı olarak kompleksin çeşitli bileşim, şişme oranı ve ilaç salma özelliklerine sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Katyonik polimer yapısında olan kitosanın negatif yüklü moleküller ve polimerler ile etkileştirilmesi ile polielektrolit kompleksleri oluşturulmaktadır. Bu tür sistemler, ilaç salınımı uygulamalarında yoğun olarak kullanılmaktadır [187]. Bir diğer çalışmada kitosan ve poliakrilik asit yapılarından oluşan komplekslerin bileşimlerinin, taşıdıkları amoksisilin ilacının midedeki salınım miktarlarına etkileri incelenmiştir. [188]. Polielektrolitlerin 2.5:1 bileşim oranında hazırlanan komplekslerinin kullanılmasının, taşıdıkları amoksisilin %70 kadarının 2 saat içerisinde midede ilaç salınımını sağladığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada, amoksisilin polimerler ile aralarında meydana gelen elektrostatik etkileşimler sayesinde gecikmeli olarak, belli bir zaman aralığında midede salınımının sağlandığı yorumu yapılmıştır.

Kompleks yapılarını oluşturan polimerik türler arasındaki etkileşim dereceleri, şişme, viskozite gibi fiziksel özellikleri de etkileyerek bu yapılar vasıtasıyla transfer edilen molekül miktarlarını belirlemektedir. Aralarında kuvvetli etkileşimler olan türlerin meydana getirdikleri komplekslerde yüklü bölgelerin az ve şişme oranlarının düşük olmasına bağlı olarak transfer edilen molekül miktarı yüksektir [189].

Bir başka çalışmada pH değişimine duyarlı, zamana göre salınım uygulamaları için elverişli, elektrostatik etkileşim temeline dayalı kompleks yapıları geliştirilmiştir [190]. Benzer katyonik türlerle birlikte deniz yosunlarından elde edilen, yapılarında sülfat grupları bulduran polisakkaritler ve karajenan türlerinin etkileştirildiği kompleksler de bu tür uygulamalarda kullanılmaktadır. [191, 192]. Mesalazin salınımı uygulamalarında kullanılmak üzere karboksimetil nişastası ile lektin yapılarının oluşturduğu kompleks sistemleri geliştirilmiştir [193]. Bu sistemlerdeki polimerik türler arasında elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler bulunmaktadır. Bu malzeme ile ilgili yapılan çalışmada, lektin yapısındaki amin grupları ile modifiye nişastanın karboksil grupları arasındaki elektrostatik etkileşimlerin yanı sıra trigliserit grubunun dialkil zinciri ile nişastadaki tekli sarmal yapısı arasında hidrofobik etkileşimlerin bulunduğu belirtilmektedir. Sistemin bu iki farklı etkileşim türünü içermesi sayesinde hedeflenen yüksek kararlılık ve pH duyarlılığı özellikleri edinilebilmiştir.

Suda çözünen polielektrolit kompleksleri ile ilgili yapılan çalışmaların sayısı bu alanda geliştirilen malzemelerle ilgili yapılan çalışmaların sayısına kıyasla oldukça azdır [194-196]. Bu tür uygulamalarda düz zincirli bir polielektrolitin zıt yüke sahip, daha kısa polielektrolit zincirleri ile meydana getirdikleri kompleks makromoleküler yapılar kullanılmaktadır [197]. Bu tür polielektrolit yapılarının kullanılması, sterik ve elektrostatik mekanizmaların geçerli olması ile kolloidal kararlılığın elde edilmesini sağlamaktadır [198]. Çeşitli polielektrolit niteliğinde ana zincirler ve suda çözünür iyonik olmayan yan zincirler bulunduran, fırça tipi kopolimer yapıları suda çözünür polielektrolit komplekslerin geliştirilmesi çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu tür yapılarda yüklü veya suda çözünebilir bölgelerin yoğunluğunun ve uzunluklarının değiştirilmesi ile kompleks sistemlerinin özellikleri belirlenebilmektedir. Bu alanda yapılan bir çalışmada polisodyum akrilat-ko-sodyum 2-akrilamido-2-metil-1-propansülfonat-graft-poli(N,N-dimetilakrilamit) ve polidialildimetilamonyum klorür türleri kullanılarak suda çözünebilir, stokiyometrik polielektrolit kompleksleri geliştirilmiştir.

Polipeptitler gibi zayıf polielektrolitlerin oluşturdukları kompleks yapılarında elektrostatik etkileşimlerin yanında hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler de bulunmaktadır [199]. Çok tabakalı filmleri oluşturan polielektrolit kompleksi yapılarındaki yük yoğunluğu ve polipeptitlerin yapılarına göre meydana gelen molekül içi veya moleküller arası etkileşimlerin türleri, bu filmlerin yapılarını doğrudan belirleyen en önemli unsurlardır [200]. Polipeptitler, meydana getirdikleri malzemedeki kinetik ve termodinamik parametrelere bağlı olarak farklı konformasyonlara sahip olmaktadır. Yüzeğe yakın olanlar, yüksek aktivasyon bariyerinden etkilenerek konformasyonel değişikliklere uğrayabilir [201]. Belirli bir konformasyona sahip olmayan polipeptitler, sistemin serbest enerjisini minimize edecek şekilde yeniden farklı konformasyonlara sahip olabilirler. Çok tabakalı sistemleri meydana getiren polipeptitlerin molekül ağırlıkları ve miktarsal yoğunlukları da kinetik parametrelere etki ederek konformasyon özelliklerini belirlemektedir [202].

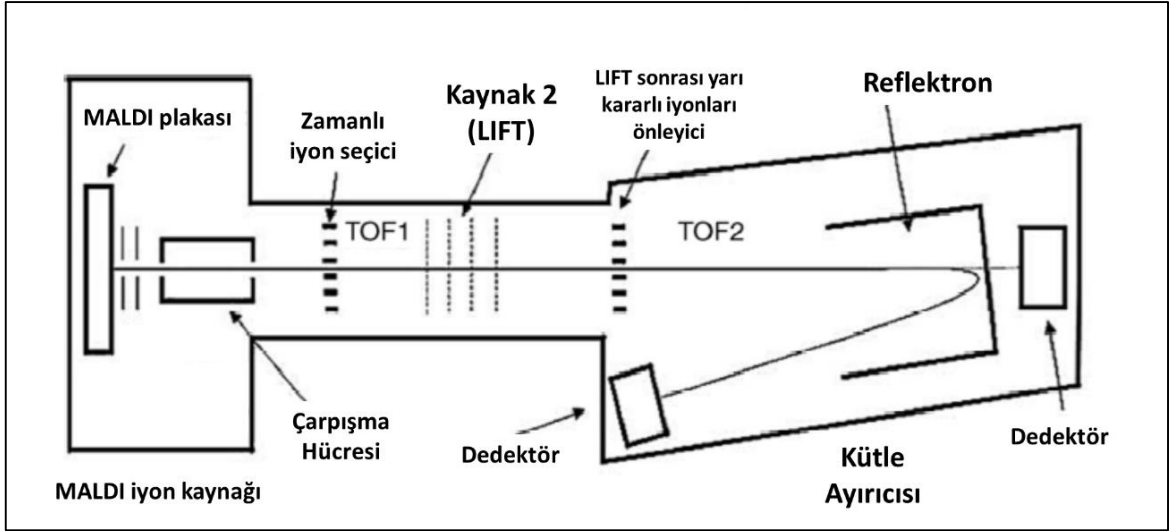
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Poli(L-Lizin) (PLL, Mw ~ 500-2000 Da), poli(akrilik asit) (PAA, Mw ~ 1800 Da), poli(L-glutamik asit) (PGA, Mw ~ 1500-5000 Da), Lizozim (Tavuk yumurtası beyazından), sitokrom c (at kalbinden), miyoglobin (at kalbinden), ubikitin (sığır kırmızı kan hücrelerinden), metanol (CHROMASOLV, ≥%99.9), asetonitril (CHROMASOLV, ≥%99.9), izopropanol (≥%99.5), formik asit (%98-100), amonyum asetat Sigma-Aldrich (St Louis, MO, ABD) firmasından satın alınmıştır. Deneylerde kullanılan MALDI matriksleri, 2,5-dihidroksi benzoik asit (DHB), 2,4,6-Trihidroksiasetofenon monohidrat (THAP), 6-aza-2-tiyotimin (ATT), trans-2-[3-(4-tert-bütilfenil)-2-metil-2-propeniliden] malononitril (DCTB) ve α-siyano-4-hidroksisinnamik asit (α-CHCA) Fluka-Sigma-Aldrich'den satın alınmıştır. Polistiren sülfonat (PSS) sodyum tuzu (Mw ~ 1100 Da) Polymer Standards Service-USA, Inc. firmasından temin edilmiştir. Tüm deneylerde, örnek hazırlama aşamalarında yüksek saflıkta çözücüler kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan deiyonize su, Expe-Ultracure Water System (Mirae St Co., Güney Kore) cihazı ile hazırlanmıştır.

3.2. MALDI-MS Analizleri

PLL ve PSS polielektrolitlerinin ve bu yapıların komplekslerinin MS ve MS/MS analizleri, Bruker Ultraflex III MALDI tandem uçuş zamanlı (ToF/ToF) kütle spektrometresi (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) kullanılarak yapılmıştır. MALDI-MS cihazında desorpsiyon ve iyonlaştırma işlemlerinin gerçekleştirilmesinde, 355 nm dalga boyundaki Nd-YAG lazeri kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Bruker Ultraflex MALDI-ToF/ToF cihazının şematik gösterimi.

Ultraflex III ToF/ToF kütle spektrometresinde kısa bir lineer ToF tüpüyle eksensel olarak birleşmiş reflektoron ToF bölümü bulunmaktadır [203]. Bu cihaz ile kendine özgü olan ve "LIFT" adı verilen teknoloji kullanılarak MS/MS analizleri yapılabilmektedir. "LIFT" ifadesi, birkaç kelimedenden oluşan bir terimin kısaltması değildir. Bruker Daltonics firması tarafından tescillenmiş bu terim, firmanın ToF/ToF kütle spektrometresi ile yapılan analizlerde çarpıştırma hücresindeki potansiyelin iyon kaynağı bölümündeki ilk potansiyele göre artırılması işlemini ifade etmek için kullanılmaktadır [204]. Bu teknolojiye lineer ToF bölümünde fazladan lazer enerjisi kullanılarak ilk bölümde parçalanma gerçekleştirilmektedir. Bunun ardından, reflektoron ToF bölümünde hedeflenen öncül iyon ve onun parçalanma ürünleri, yüksek zaman çözünürlüklü iyon seçici ile izole edilirler ve seçilen iyonlar, kütle spektrometrik analizleri için son olarak hızlandırılırlar (post-acceleration, "lifting") [205].

Tez kapsamında yapılan analizlerde MALDI işlemleri sonucunda elde edilen iyonlar, uçuş zamanlı ayırma yapılan tüpte 25 kV voltaj değeri ile hızlandırılmışlardır (IS1). Buna ek olarak; uygun lazer enerjisi değerlerinde IS2 voltajı: 21.65 kV, lens voltajı: 9.65 kV ve gecikme zamanı: 150 ns olarak ayarlanmıştır. Reflektoron lenslerinden birincisi: 26.3 kV ve ikincisi: 13.7 kV değerlerindedir. MS/MS deneylerinde LIFT parametreleri; IS1: 8 kV, IS2: 7.15 kV, lens potansiyeli: 3.6 kV, reflektoron 1 ve 2 lensleri sırasıyla: 29.5 kV ve 13.85 kV, LIFT 1 ve 2 potansiyelleri sırasıyla: 19 kV ve 2.9 kV olarak ayarlanmıştır. Örnek analizleri, hem pozitif hem de negatif iyon

modunda yapılmıştır. Her örneğe ait kütle spektrumları, yaklaşık 1000 lazer vuruşunun toplamı olarak hem lineer hem de refletron modunda kaydedilmiştir.

PLL ve PSS çözeltileri 1.0 mg/mL derişimde, suda hazırlanmıştır. Bu derişimdeki örnekler seyreltilmeden MALDI-MS ile analiz edilmiştir. PLL-PSS komplekslerinin MALDI-MS ile analiz edildiği çalışmalarda PLL:PSS çözeltileri, 1:1, 1:5, 1:10, 5:1 ve 10:1 mol oranlarında karıştırılmış ve karışımlar oda sıcaklığında 30 dakika süreyle inkübe edildikten sonra analiz edilmiştir.

MALDI-MS analizlerinde DHB, THAP, ATT ve α -CHCA matriksleri kullanılmıştır. En iyi sonuç veren MALDI matriksinin α -CHCA olduğu belirlenmiştir ve bu bölümde bu matriksin kullanıldığı örnek hazırlama yöntemi verilmektedir. 10 mg/mL derişimindeki α -CHCA çözeltisi, su:asetonitril (1:1, v/v) karışımı içerisinde hazırlanmıştır. Matriks ve örnek (1.0 mg/mL) çözeltileri 5:1 (matriks:örnek) (v/v) oranında karıştırılıp MALDI örnek plakası üzerine damlatılmıştır (1.0 μ L). Kütle spektrometrik analiz öncesinde matriks-örnek karışımının oda koşullarında örnek plakası üzerinde kurumması beklenmiştir. Veri analizi, Bruker tarafından sağlanan flexAnalysis programıyla yapılmıştır.

3.3. İyon Hareketliliği Kütle Spektrometrisi (IM-MS) Analizleri

IM-MS analizleri, elektrosprey iyonlaştırma (ESI) kaynağı ve "T-wave" adı verilen kaydırmalı dalga iyon hareketliliği teknolojisine sahip olan (Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry (TWIM-MS)) SYNAPT HDMS hibrit dört kutuplu/uçuş zamanlı (Q/ToF) kütle spektrometresi (Waters, Milford, MA) kullanılarak yapılmıştır. Analiz edilen polielektrolitlerin çözeltileri, 7:3 (v/v) su:metanol karışımı ile 0.03 mg/mL derişime seyreltilmiştir. Polielektrolit karışımları ise, 1:1, 1:5, 1:10, 5:1 ve 10:1 (polikasyon: polianyon) mol oranlarında karıştırılıp 30 dakika süresince oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra analiz edilmiştir. Analiz edilen örnekler, 5 μ L/dk. akış hızıyla direkt olarak ESI kaynağına gönderilmiştir.

Kütle spektrumları, hem pozitif hem de negatif iyon modunda kaydedilmiştir. Cihazın genel ayarları; kapiler voltajı: 2.5 kV, örnekleme koni voltajı: 45 V, ekstraksiyon voltajı: 2.7 V, ESI kaynak sıcaklığı: 80 °C ve çözücü uzaklaştırma (desolvation) gazı akışı: 500 L/saat (N₂), çözücü uzaklaştırma gazı sıcaklığı: 150 °C, tuzak hücresi çarpışma enerjisi: 4 eV, transfer hücresi çarpışma enerjisi: 6 eV, tuzak hücresi gaz akışı: 1.5 mL/dk. (Ar) olarak optimize edilmiştir.

Veri analizleri, Waters şirketi tarafından sağlanan MassLynx 4.1 ve DriftScope 2.0 programlarıyla yapılmıştır. TWIM-MS deneylerinde elde edilen sürüklenme zamanı verileri, polialanin oligomerleri ve denatüre edilmiş standart proteinlerin (sitokrom c, miyoglobin, ubiquitin) yayınlanmış çarpışma etkin kesiti değerleri (Collision Cross Section, CCS) kullanılarak deneysel CCS verilerine dönüştürülmüştür [206, 207]. Polialanin oligomerleri ve denatüre edilmiş standart proteinlerin düzeltilmiş CCS değerleri, aynı dalga hızı (350 m/s), dalga yüksekliği (8.0 V) ve iyon hareketliliği gaz akışı (22.7 mL/dk.) (N₂) değerleri kullanılarak TWIM-MS ile analiz edilen örneklerin düzeltilmiş sürüklenme zamanlarına karşı grafiğe geçirilerek gerekli hesaplamalar yapılmıştır. Analiz edilen türlerin sürüklenme tüpünde geçirdikleri zamanı doğrudan etkileyen bu parametreler, tüm örnekler için farklı aralıklarda taranmıştır. Bu denemeler sonucunda yukarıda verilen en uygun değerler belirlenerek tüm analizlerde bu değerler kullanılmıştır.

Tuzak, iyon hareketliliği ve transfer hücreleri olarak adlandırılan üç bölümden oluşan üçlü dalga (triwave) bölümü, cihazın dört kutuplu ve uçuş zamanlı kütle ayırıcıları arasında bulunmaktadır. TWIM-MS cihazında hem tuzak hem de transfer hücresinde çarpışmayla aktifleştirilmiş parçalama (Collisionally Activated Dissociation, CAD) olayı uygulanabilmektedir. Tez kapsamında CAD ile gerçekleştirilen MS/MS analizleri, kütle spektrometresinin tuzak hücresinde yapılmıştır. Seçilen öncül iyonlar, tuzak hücresinde akış hızı 1.5 mL/dk. olan Ar gazı ile çarpıştırılarak parçalanmıştır. MS/MS spektrumları, tuzak hücresinde 6-45 eV arasında değiştirilen çarpışma enerjisi sonucunda oluşan parçalanma ürünlerine ait sinyallerin kaydedilmesi ile oluşturulmuştur.

3.4. Moleküler Modelleme ve Simülasyon

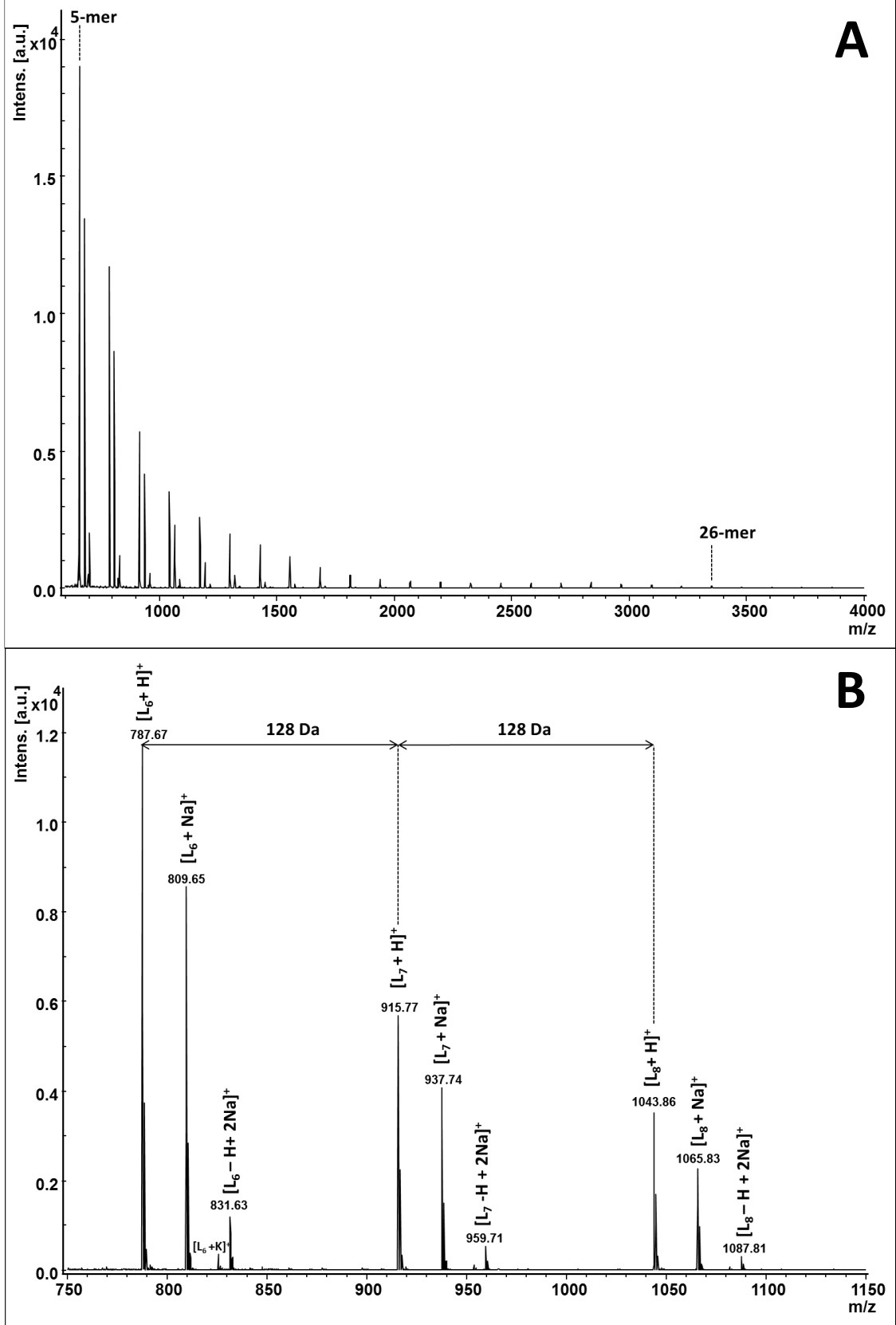
PLL-PSS komplekslerinin minimum enerji optimizasyonu, Forcite modülündeki geometri optimizasyonu birimlerinin kullanıldığı Materials Studio (versiyon 4.2) programı (Accelrys Software, Inc.) ile yapılmıştır. Minimum enerji optimizasyonu ve geometri optimizasyonu basamaklarının ardından yapılar, 50 döngü içerisinde başlangıç sıcaklığı 50 K olmak üzere orta döngü sıcaklığı olan 1400 K değerine 20 K'lik basamaklarla getirilmiştir. Her bir basamakta 1000 dinamik adım bulunmakta ve femto saniye başına bir dinamik adım karşılık gelmektedir. Modellemesi yapılan her PLL-PSS kompleks yapısının CCS hesaplaması için 50 aday yapı seçilmiştir.

MOBCAL programının algoritması ile kesin katı küre yayılması (Exact Hard Sphere Scattering, EHSS), gidiş izi metodu (Trajectory Method, TM) ve izdüşümü yaklaşımı (Projection Approximation, PA) yöntemleri kullanılarak teorik CCS hesaplamaları yapılmıştır [117, 118, 208].

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Standart Bir Polikasyon-Polianyon Çiftinin MALDI-MS ile Analizi

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda kullanılan standart Poli(L-Lizin) (PLL) örneği, içerisinde bulunan zincirlerdeki tekrar eden birimlerin doğrulanması ve zincir sonlarındaki grupların belirlenmesi amacıyla çalışmaların başlangıcında UltraFlex III MALDI-ToF/ToF kütle spektrometresiyle analiz edilmiştir. MALDI kütle spektrometresiyle elde edilen kütle spektrumları, genellikle tek yüklü iyonlara karşılık gelen sinyaller içerdiğinden dolayı, bu sistemle elde edilen sade verilerin değerlendirilmesi daha kolaydır. Bu durum, özellikle polimerler gibi çoklu dağılıma sahip (polydisperse), farklı moleköl kütlelerindeki zincirleri içeren örneklerin analizi için avantaj sağlamaktadır.



Şekil 4.1. (A) PLL'ye ait pozitif iyon MALDI kütle spektrumu (B) MALDI kütle spektrumunun m/z 750-1150 aralığının genişletilmiş hali. Alt indislerle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir. Ardışık PLL zincirleri arasındaki kütle farkı 128 Da'dır. İşaretlenen tüm iyonlar protonlanmış haldedir.

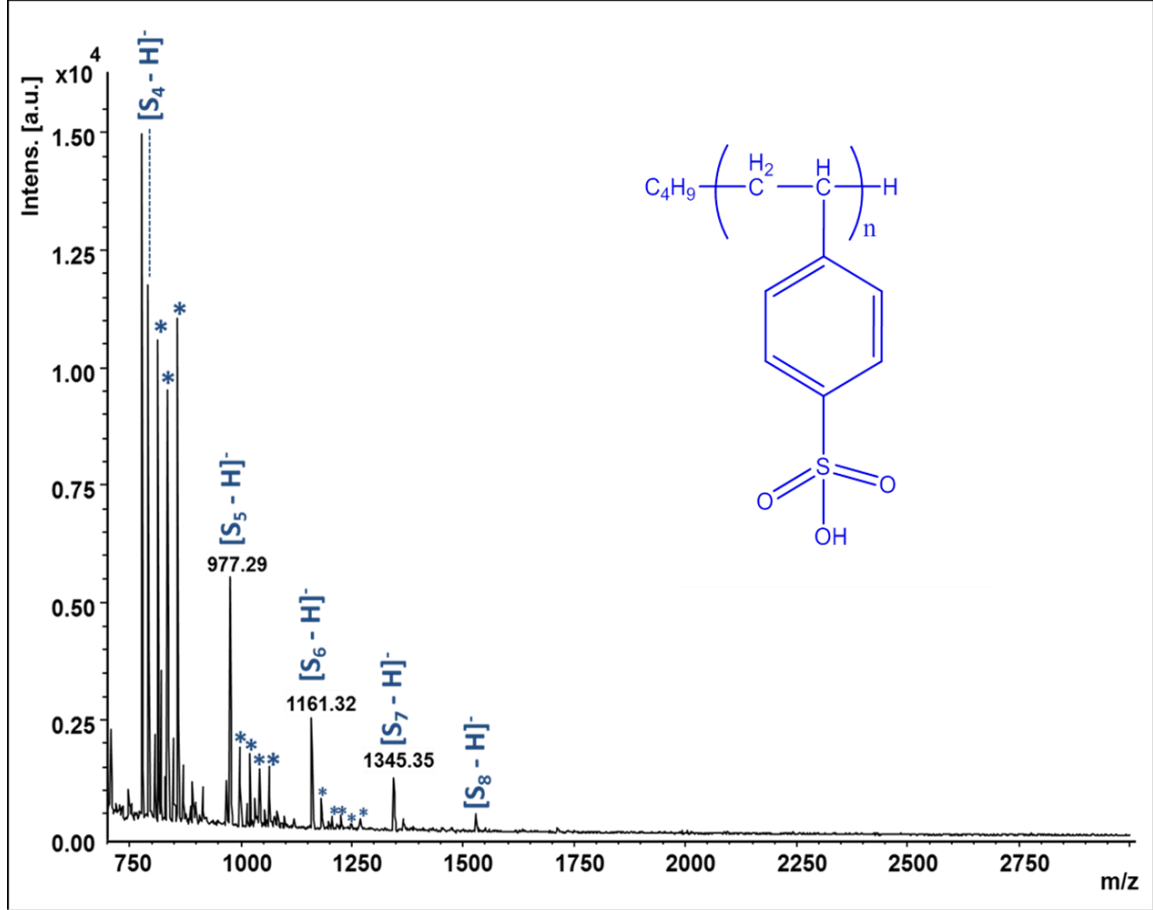
Yapılan MALDI-MS analizlerinde PLL örneğinde bulunan zincirlerin molekül kütlelerinin 500-2000 Da aralığında olduğu belirlenmiştir. MALDI kütle spektrumunda 5 birim (m/z 659) ile 26 birim (m/z 3347) içeren tek yüklü protonlanmış haldeki PLL iyonları arasında bir dağılım gözlenmiştir (Şekil 4.1 (A)). Şekil 4.1'de sunulan kütle spektrumu, pozitif iyon modunda yapılan MALDI-MS analizi sonucunda elde edilmiştir. Ardışık sinyaller arasındaki farkın tekrar eden bir lizin biriminin kütlesine karşılık gelen 128 Da olduğu tespit edilmiştir. Kütle spektrumlarında gözlenen sinyallere ait m/z oranları kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda PLL örneğinde bulunan polimerik zincirlerin zincir sonu grupları belirlenebilmiştir. Tüm zincirlerin her birinde 18 Da molekül ağırlığına karşılık gelen aynı zincir sonu gruplarının $[H-(C_6H_{12}N_2O)_n-OH + H]^+$ bulunduğu belirlenmiştir.

Şekil 4.1 (B)'de 6-, 7- ve 8- birimli PLL oligomerlerine ait sinyallerin gözlendiği 750-1150 m/z aralığı ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Bu MALDI-MS spektrumunda protonlanmış haldeki sinyallerin yanı sıra metal iyonlarının katılımıyla oluşan $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ ve $[M-H+2Na]^+$ halindeki oligomer iyonlarına ait sinyaller de detaylı bir şekilde gözlenebilmektedir.

Kütle spektrometrik polimer analizlerinde, örnek-MALDI matrisi karışımlarına fazladan tuz ilave edilmese bile $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ ve $[M-H+2Na]^+$ gibi iyonların oluşması mümkündür. Bu tür örnekler içerisinde veya MALDI matrisinde bulunabilecek çok düşük miktardaki Na^+ veya K^+ iyonlarının polimer zincirlerine gaz fazında gösterdikleri büyük ilgiden dolayı, MALDI-MS analizlerinde bu tür iyon oluşumları gözlenebilmektedir. Hatta ortamda bulunan Na^+ ve K^+ iyonlarının miktarlarına ve analiz edilen polimerin türüne bağlı olarak, polimer zincirlerinin $[M+Na]^+$ veya $[M+K]^+$ iyonlarının sinyal şiddetleri, zincirlerin $[M+H]^+$ iyonlarına ait sinyal şiddetlerinden daha yüksek olabilmektedir.

Tez kapsamında kullanılan poli(stiren sülfonik asit) (PSS) örneği, öncelikli olarak MALDI-MS ile hem pozitif hem de negatif iyon modunda analiz edilmiştir. PSS zincirlerinin tekrar eden birimlerinin her birinde bulunan düşük pKa değerlerine sahip sülfonik asit gruplarının gaz fazında pozitif olarak yüklenmelerinin oldukça zor olması nedeniyle, pozitif iyon modunda yapılan MALDI-MS analizlerinde PSS zincirlerine ait sinyal gözlenememiştir. PSS örneği, negatif iyon modunda analiz edildiğinde elde edilen kütle spektrumunda C_4H_9- ve $-H$ zincir sonu gruplarına sahip,

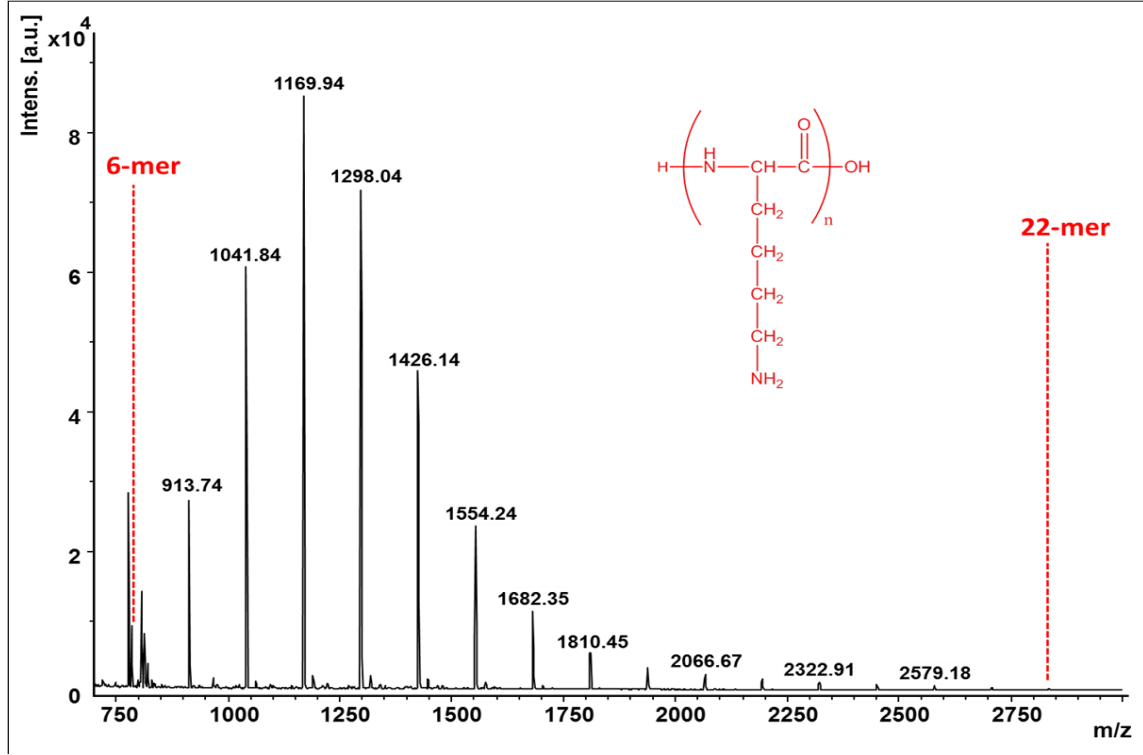
deprotonlanmış $[C_4H_9-(C_8H_8SO_3)_n-H - H]^-$ iyonlarına ait sinyaller gözlenmiştir (Şekil 4.2). Bunun yanı sıra, PSS örneğinde yoğun miktarda sodyum iyonunun bulunması ve PSS moleküllerindeki sülfonik asit gruplarının her birinde gaz fazında Na^+/H^+ değişimi olması gibi nedenlerden dolayı, bu oligomerlere ait sodyum içeren yüksek şiddetli sinyaller de MALDI-MS analizinde tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. PSS'ye ait negatif iyon MALDI kütle spektrumu. Alt indisle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir. (*) ile Na^+/H^+ değişimine uğramış anyonlar gösterilmektedir. Ardışık PSS zincirleri arasındaki kütle farkı 184 Da'dır.

Daha önceki bölümde MALDI-MS ile pozitif iyon modunda analiz edilen PLL örneği, kompleks oluşumlarının hangi modda daha iyi izlenebileceğine karar verebilmek için, ayrıca negatif iyon modunda da analiz edilmiştir. Negatif iyon modundaki MALDI-MS analizinden elde edilen kütle spektrumunda PLL zincirlerinin deprotonlanmış iyonlarına $[M-H]^-$ ait sinyaller gözlenmektedir (Şekil 4.3). Bu sinyaller, 6 ile 22 adet arasında tekrar eden birim içeren ve pozitif iyon modunda da

belirlendiği gibi, H- / -OH zincir sonu gruplarına sahip PLL zincirlerine karşılık gelmektedir.



Şekil 4.3. PLL'ye ait negatif iyon MALDI kütle spektrumu. Ardışık PLL zincirleri arasındaki kütle farkı 128 Da'dır.

4.1.1. Standart Bir Polikasyon-Polianyon Çiftinin Komplekslerinin MALDI-MS Analizleri

PLL ve PSS zincirlerinin tekrar eden birimlerinin ve zincir sonu gruplarının belirlenmesi amacıyla MALDI-MS ile ayrı ayrı analiz edilmelerinin ardından, gaz fazında bir araya gelerek meydana getirdikleri kovalent olmayan komplekslerin oluşumunu incelemek için farklı oranlardaki karışımları da aynı teknikle analiz edilmiştir. Gaz fazında kompleks oluşturma çalışmalarında PLL ve PSS'nin çeşitli mol oranlarındaki (1:1, 1:5, 1:10, 5:1, ve 10:1) karışımları hazırlanmıştır. Polielektrolitlerin bu oranlardaki karışımları, pozitif ve negatif iyon modunda analiz edilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda bu oranlardaki türlerin oluşturdukları kovalent olmayan komplekslere ait yeterli şiddete sahip sinyaller, negatif iyon modunda yapılan analizlerde gözlenmiştir (Şekil 4.4).

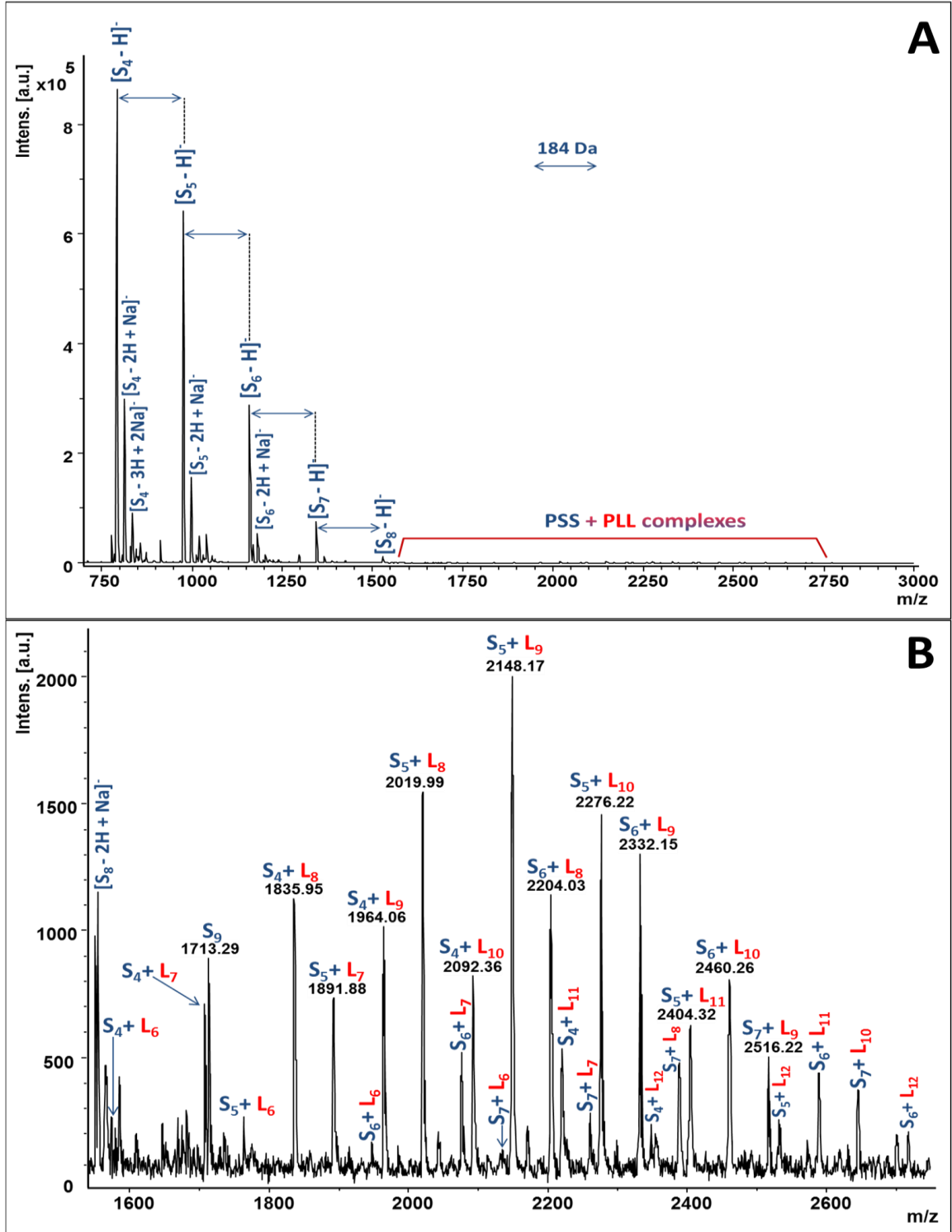
Şekil 4.4 (A)'da verilen MALDI kütle spektrumunda görüldüğü üzere, negatif yüklü ve deprotonlanmış haldeki PSS iyonları, daha yüksek m/z bölgesindeki kovalent olmayan kompleks iyonlarına ait sinyalleri baskılamaktadır. Bu nedenle, kovalent olmayan komplekslerin sinyallerinin bulunduğu m/z 1550-2750 aralığı genişletilerek ayrıntılı olarak incelenmiştir (Şekil 4.4 (B)). Bu şekillerde S ve L harflerinin sırasıyla PSS ve PLL'ye; m ve n alt indislerinin ise türlerin tekrar eden birim sayılarına karşılık geldiği " S_m+L_n " ifadesi, PSS ve PLL'nin bir araya gelerek meydana getirdikleri kovalent olmayan kompleksleri işaretlemek için kullanılmıştır.

Polikatyon ve polianyon karışımlarının MALDI-MS analizlerinde elde edilen kütle spektrumlarında farklı stokiyometrik oranlara sahip PLL ve PSS'nin kovalent olmayan komplekslerine ait sinyaller S_4+L_6 / S_6+L_{12} aralığında ve farklı şiddet değerlerinde gözlenmektedir. Bu sinyallerin şiddetleri, polielektrolitlerin tek başlarına analiz edildiklerinde farklı uzunluktaki zincirleri için elde edilen sinyallerin şiddetleri ile benzerlik göstermektedir. Kovalent olmayan komplekslere ait MALDI kütle spektrumunda PLL'nin 6 ile 12 ve PSS'nin 4 ile 7 adet tekrar eden birim bulunduran zincirlerinin oluşturdukları kovalent olmayan komplekslere ait sinyaller gözlenmektedir (Şekil 4.4 (A)). Polielektrolitlerin negatif iyon modundaki analizlerinde de bu miktarlarda tekrar eden birim içeren oligomerlerine ait sinyaller en yüksek iyon şiddetine sahiptir (Şekil 4.2 ve 4.3). Bu sonuçlar, MALDI-MS analizlerinde gözlenen kovalent olmayan komplekslerin stokiyometrik oranlarının ve bu iyonlara ait sinyal şiddetlerinin polielektrolit zincirlerinin iyonlaşma verimleri ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Fakat bu tür deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde kompleks stokiyometrilerindeki m-n farkının mutlak değerinin büyümesi ile birlikte kompleks kararlılıklarının azaldığı da gözlenebilir. Bu durum, MALDI-MS sisteminin mekanistik özelliğinden ve iki tür arasında meydana gelen kovalent olmayan etkileşimlerin zayıflamasından kaynaklanabilir. MALDI-MS ile pozitif ve negatif iyon modlarında yapılan analizlerde baskın olan sinyallerin karşılık geldikleri iyonlar genellikle tek yüke sahiptir. Yapılarında çok miktarda negatif veya pozitif olarak yüklenebilir fonksiyonel gruplar bulunduran polielektrolit kompleksi iyonlarının tek yüklü hale gelebilmeleri oldukça zordur. MALDI-MS analizlerinde bu tür yapıların tek yüklü iyonlarının oluşabilmesi için çok sayıda yük transferi gerçekleşmelidir. Gaz fazında bu şekilde yük transferleri geçiren iyonların ömürleri kısalmaktadır. Bu nedenle,

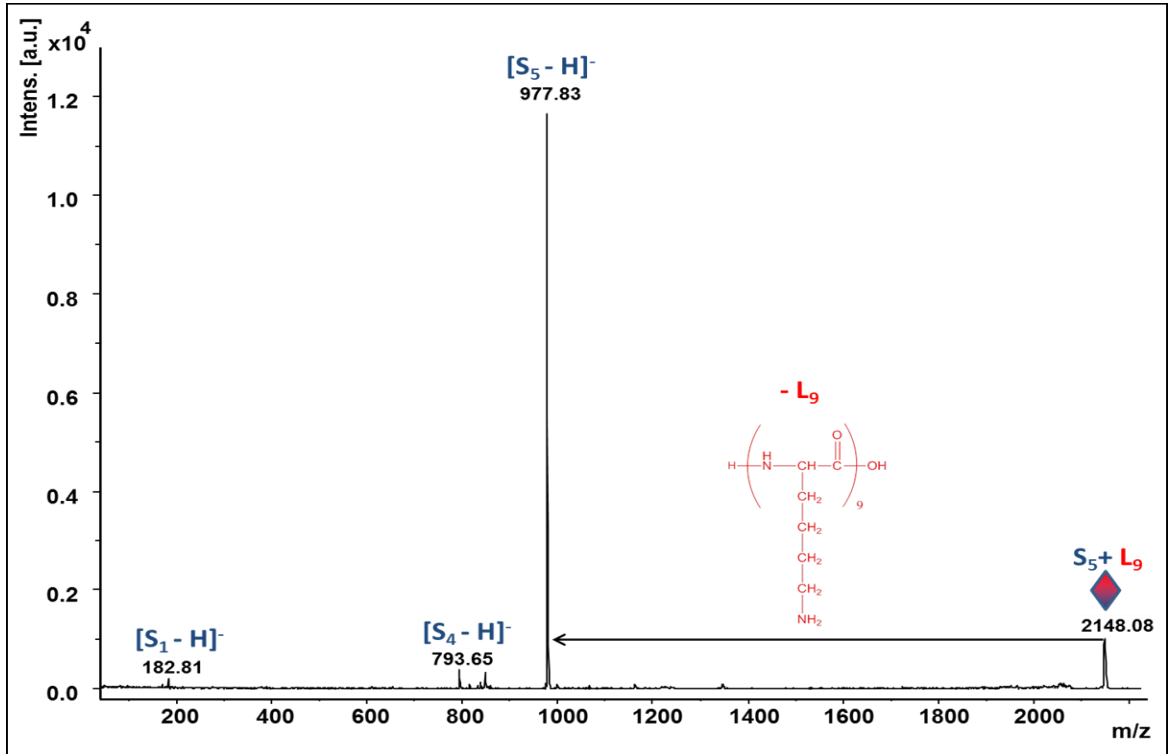
MALDI-MS analizlerinde çok sayıda yük transferi geçirerek net tek yüke sahip olan polielektrolit komplekslerinin iyonlarına ait sinyallerin şiddetleri düşük değerlerde gözlenmektedir.

Polielektrolitlerin oligomerlerinin bağıllı bollukları ayrı ayrı dikkate alındığında PLL-PSS komplekslerinin MALDI-MS ile analiz edildiği çalışmalarda elde edilen kütle spektrumunda S_4+L_9 kompleksine ait sinyalin en yüksek şiddete sahip olması beklenmektedir (Şekil 4.2 ve 4.3). Fakat bu tür bir kompleksin negatif iyon modunda net -1 yüke sahip olabilmesi için üzerinde bulunan çok sayıdaki pozitif yüklü grubun deprotone olmaları gerekmektedir. Bu nedenle, PLL-PSS karışımının analizi sonucunda elde edilen MALDI kütle spektrumunda S_4+L_9 kompleksine kıyasla S_5+L_9 , S_5+L_8 ve S_4+L_8 komplekslerine ait daha şiddetli sinyaller gözlenmektedir (Şekil 4.4(B)).



Şekil 4.4. (A) PLL ve PSS'nin 5:1 (PLL:PSS) mol oranındaki karışımına ait negatif iyon MALDI kütle spektrumu ve (B) PLL ve PSS karışımına ait, m/z 1550-2750 aralığı genişletilmiş MALDI kütle spektrumu. Ardışık PSS zincirleri arasındaki kütle farkı 184 Da'dır. Alt indisle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir.

PLL ve PSS karışımına ait MALDI kütle spektrumunda en yüksek şiddet değerinde gözlenen, S_5+L_9 stokiyometrisindeki kovalent olmayan kompleks iyonuna ait negatif iyon MALDI-MS/MS spektrumu Şekil 4.5’de verilmektedir. Negatif yüklü kompleks iyonu (m/z 2148.08), izole edilmiş ve fazladan lazer enerjisinin kullanıldığı cihaza özgü LIFT tekniğiyle parçalanmıştır. Deprotonlanmış haldeki S_5+L_9 kompleks iyonunun parçalanması sonucunda oluşan birimler arasında 9 birimli PLL’nin (m/z 1170.25) ayrılması ile serbest kalan 5 adet tekrar eden birim içeren deprotonlanmış PSS’nin (m/z 977.83) en yüksek sinyal şiddetine sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.5). Yüksek lazer enerjisi ile gerçekleştirilen bu parçalanma sırasında PSS zincirinden PSS birimlerinin de ayrıldığı görülmektedir. Fakat bu birimler oldukça düşük sinyal şiddetine sahiptir. Negatif iyon modunda elde edilen söz konusu MS/MS spektrumunda PLL birimlerine ait herhangi bir sinyal gözlenmemektedir. Bunun nedeni, gaz fazında kolaylıkla pozitif yüklenen, bazik PLL zincirlerinin negatif yüklü iyonlarının MALDI-MS/MS parçalama koşullarında düşük kararlılığa sahip olmalarıdır.

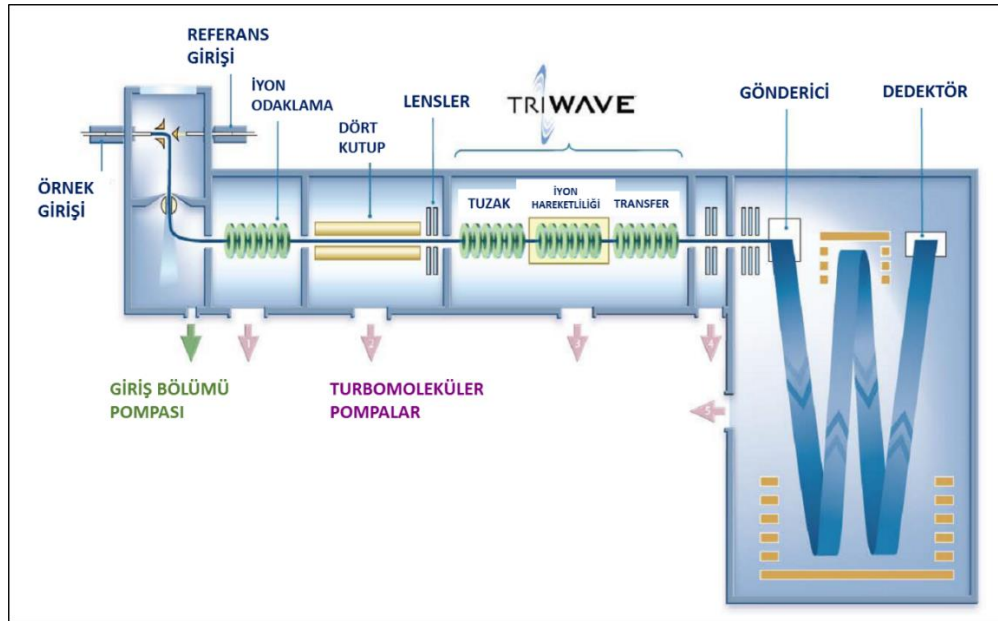


Şekil 4.5. Dokuz birimli PLL ve beş birimli PSS’nin oluşturduğu kovalent olmayan komplekse ait negatif iyon MALDI-MS/MS kütle spektrumu. Alt indisle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir.

MALDI-MS analizlerinde gözlenen yüksek şiddetli kovalent olmayan kompleks iyonlarının tümüne yüksek enerjili parçalama işlemi (LIFT) uygulanmıştır. Bu analizlerden elde edilen MALDI-MS/MS spektrumlarının tümü, PLL ve PSS'nin bir araya gelerek oluşturdukları kovalent olmayan komplekslerin varlığını ve stokiyometrisini doğrulamaktadır.

4.2. İyon Hareketlilik Kütle Spektrometrisi ile Polielektrolitlerin ve Komplekslerinin Analizleri

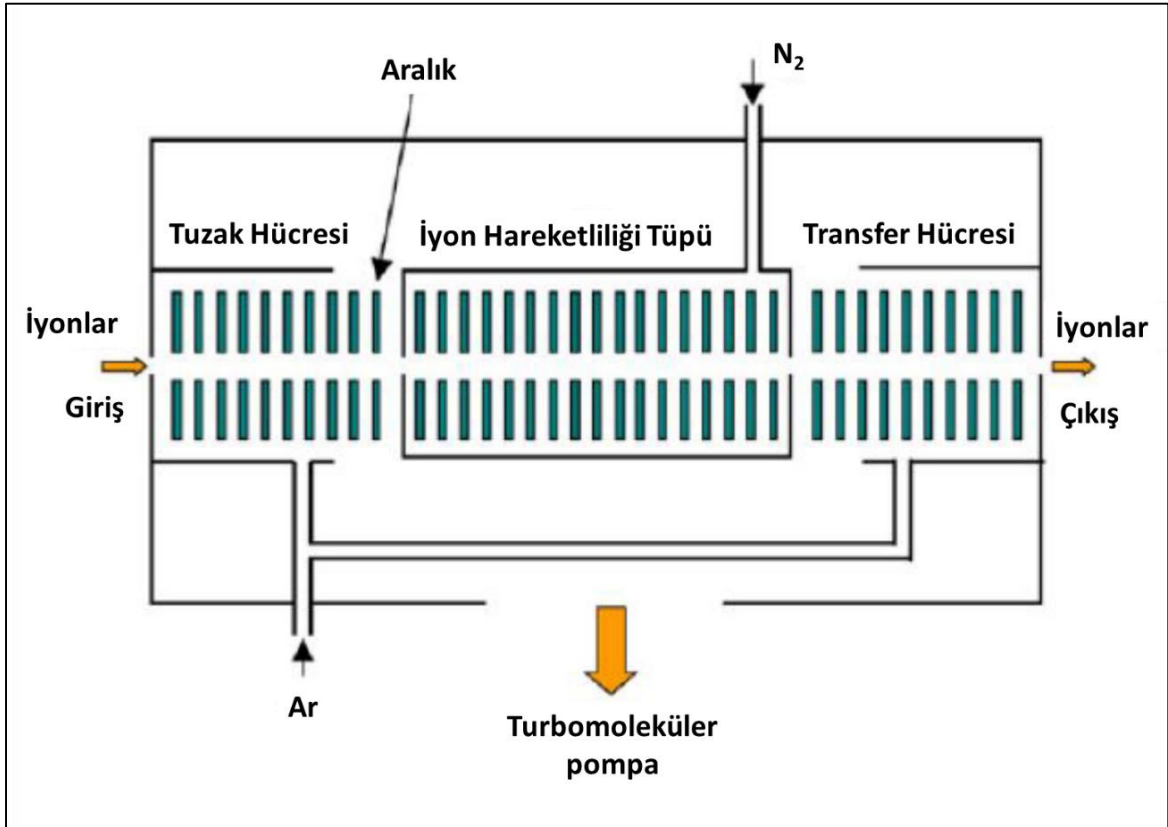
Bilinen klasik kütle spektrometreleri kullanılarak yapılan MS ve MS/MS analizlerinde iyonlar, gaz fazında kütle/yük oranlarına bağlı olarak tayin edilmektedir. İyon hareketlilik kütle spektrometrisi analizlerinde ise bu tayin özelliklerinin yanında iyonların büyüklük ve şekilleri hakkında da veri elde edilebilmektedir. İyon hareketlilik kütle spektrometrelerinde iyonlar, genellikle gaz dolu bir sürüklenme hücresi içerisinde uygulanan statik elektriksel alanın etkisinde etkin çarpışma kesitlerine bağlı olarak (Collision Cross Section, CCS) birbirlerinden ayırt edilmektedir. Bu teknik, günümüzde polimerlerin veya protein, peptit, lipid gibi biyomoleküllerin konformasyonlarının analiz edildiği birçok çalışmada yaygın olarak kullanılmaktadır [209-211].



©2007 Waters Corporation

Şekil 4.6. SYNAPT HDMS, Q/ToF kütle spektrometresinin şematik gösterimi.

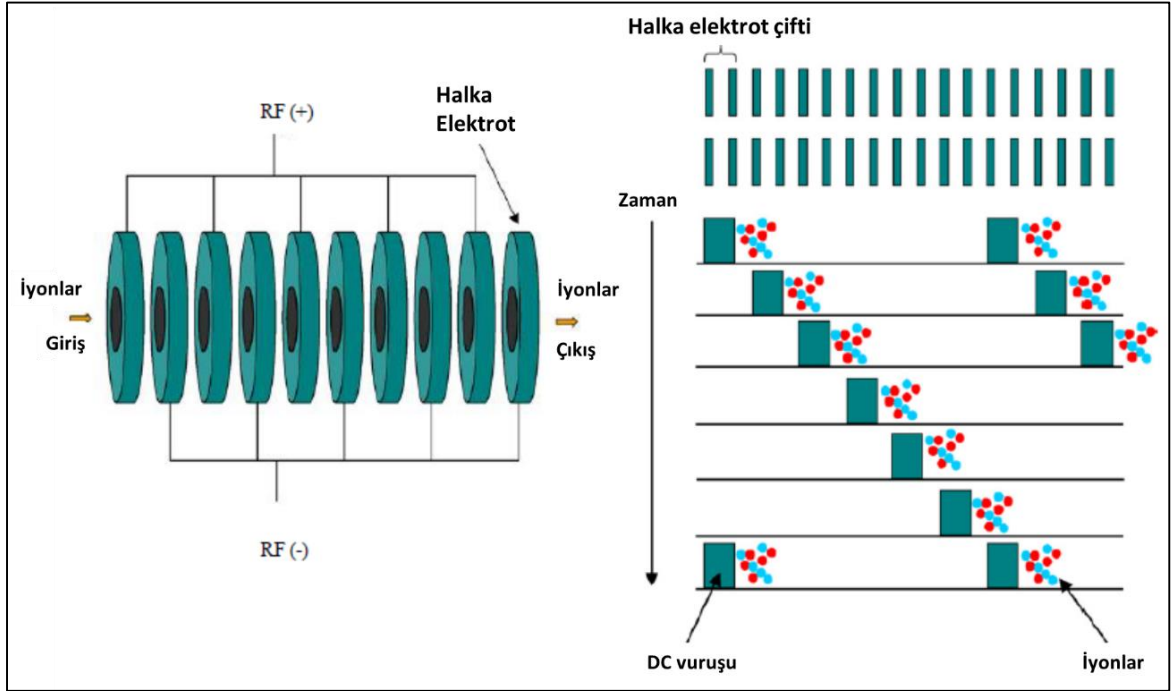
Şekil 4.6'da şematik olarak gösterilen, Waters şirketi (ABD) tarafından tasarlanan SYNAPT HDMS hibrit dört kutuplu/uçuş zamanlı (Q/ToF) kütle spektrometresi, "T-wave" adı verilen kaydırmalı dalga iyon hareketliliği teknolojisine sahiptir (Travelling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry (TWIM-MS)) [212]. Cihaz yumuşak iyonlaştırma sağlayan MALDI ve ESI gibi iyonlaştırma kaynakları ile uyumlu olarak kullanılabilir. Bu cihazın kullanıldığı analizlerde iyonlaştırma kaynağında oluşturulan iyonlar, ilk olarak çeşitli iyon odaklayıcılar yardımıyla dört kutuplu kütle ayırıcısı bölümüne gönderilmektedir. İyonlar, dört kutuplu kütle ayırıcısının ardından üçlü dalga (triwave) bölümüne geçmektedir. Bu bölüm tuzak, iyon hareketliliği ve transfer olarak adlandırılan 3 adet hücreden oluşmaktadır (Şekil 4.7) [213].



Şekil 4.7. SYNAPT HDMS cihazının üçlü dalga bölümünün şematik gösterimi [89].

Üçlü dalga bölümünde yan yana istiflenmiş halka elektrot dizisi bulunmaktadır. Bu halka elektrotlara kısa süreli voltaj paketleri sürekli olarak uygulanır. Bitişik elektrotlara zıt fazda rf voltajı uygulanarak iyonların eksen boyunca hareket etmeleri sağlanmaktadır. Her halka elektroda rf voltajının yanı sıra kısa süreli DC voltajı da

uygulanmaktadır. İyon hareketliliği hücresi boyunca belirli zaman aralıklarında art arda tekrarlayarak DC voltajının uygulanması, iyonların üçlü dalga bölümünde net bir hareketle ilerlemelerini sağlamaktadır. DC voltajının bir diğer uygulanma nedeni, elektriksel alanda kısmi değişikliklerin meydana gelmesini sağlamaktır. Bu sayede, iyonlar ileri-geri hareket ederek elektrotlar üzerinden iletilebilirler. Bu durumda, iyonların bir doğrultuda ilerleyebilmeleri için iletimleri boyunca bitişik elektrotlara uygulanan DC voltaj değerleri belli zaman aralıklarıyla değiştirilir. İyonlar bu şekilde oluşturulan sürekli ve ardışık kaydırmalı dalgaların etkisiyle üçlü dalga bölümünün çıkışına doğru itilmektedir. DC voltajının uygulanması, iyonların iyon hareketliliği bölümünde daha az zaman geçirmelerini sağlar (Şekil 4.8). Aynı zamanda iyon hareketliliği hücresi içerisinde iyonların hareket yönünün tersi yönde ilerleyen düşük basınçlı azot gazı, iyonların akış hızını azaltmaktadır [88, 89]. Üçlü dalga bölümünden çıkan iyonlar, uçuş zamanlı kütle ayırıcısına doğru dikey doğrultuda hızlandırılmaktadır.

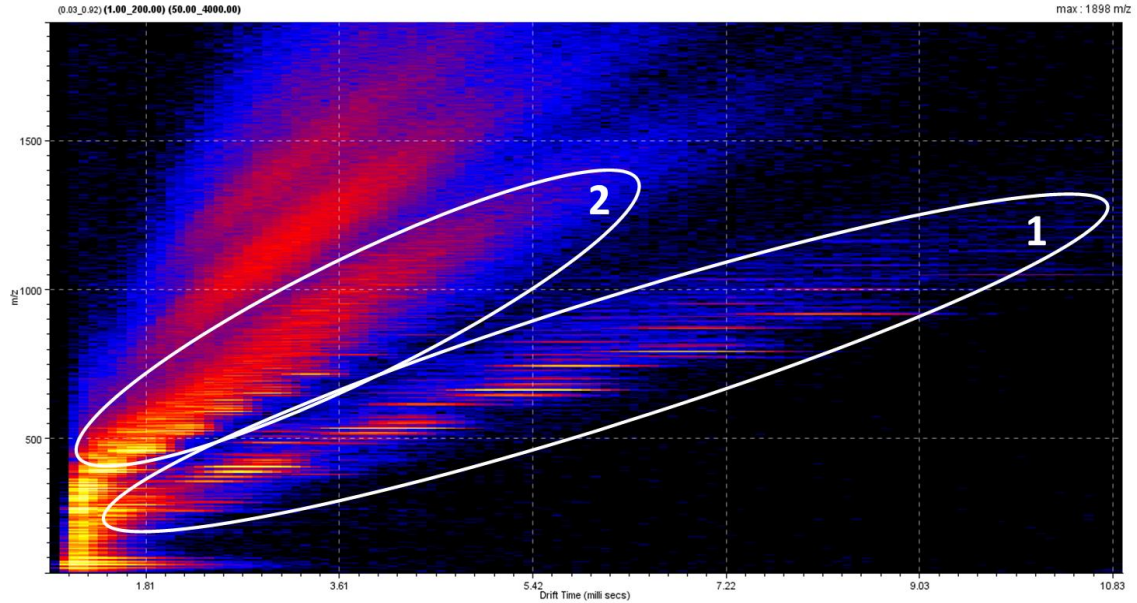


Şekil 4 8. Halka elektrotlar (solda); halka elektrotlarda iyonların kaydırmalı dalga ile iletiminin şematik gösterimi (sağda) [89].

İyonların üçlü dalga bölgesindeki sürüklenme zamanları kullanılarak büyüklük ve şekil özellikleri ile doğrudan ilişkili olan CCS değerleri hesaplanabilmektedir.

Örneklerin etkin çarpışma kesitlerinin tespit edildiği çalışmalarda, iyon hareketliliği hücresi içerisindeki sürüklenme zamanları ile etkin çarpışma kesitlerinin ilişkisine dayanan kalibrasyon hesaplamaları, standart örneklerin belirli deney koşullarındaki etkin çarpışma kesitleri kullanılarak yapılmaktadır [214].

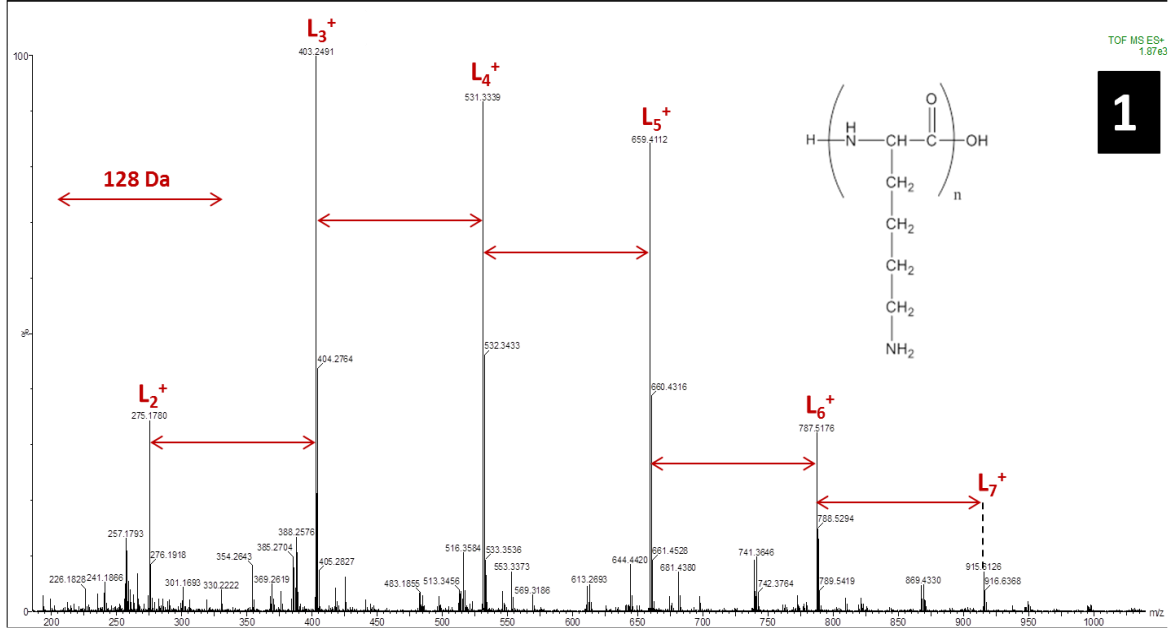
Yukarıda bahsedilen IM-MS sistemi kullanılarak PLL oligomerlerinin tayin edildiği analizler sonucunda elde edilen iki boyutlu ESI-IM-MS grafiği Şekil 4.9'da verilmiştir. Bu grafiğin x-ekseni, milisaniye cinsinden sürüklenme zamanını; y-ekseni ise m/z oranını ifade etmektedir. Grafik üzerindeki farklı bölgeler, bantların dağılımına ve renklerin şiddetlerine göre görsel olarak ayırt edilebilmektedir. Şekil 4.9'da verilen grafikte 1+ ve 2+ yüklü PLL iyonlarının sinyallerine karşılık gelen iki farklı bölge daire içerisine alınmıştır. Bu bölgeler haricinde grafikte 3+ ve 4+ yüklü PLL iyonlarına ait serilerin sinyalleri de gözlenmektedir. Fakat bu alanlardaki veriler, gözlenen sinyal şiddetleri çok düşük olduğundan dolayı ayrı olarak değerlendirmeye alınmamıştır.



Şekil 4.9. PLL'ye ait iki boyutlu ESI-IM-MS grafiği. Daire içine alınan bölümler (1) 1+ yüklü, (2) 2+ yüklü PLL iyonlarına karşılık gelmektedir.

Farklı daireler içerisine alınan bölgelerdeki iyonlar, iyon hareketliliği kütle spektrometresinde kütle, yük ve şekil özelliklerine göre birbirinden ayrılmıştır. İyonlar yüklerinin artmasıyla kaydırmalı dalga alanında daha hızlı hareket ederek iyon hareketliliği bölümünde daha düşük sürüklenme zamanlarına sahip olmaktadır. Bu

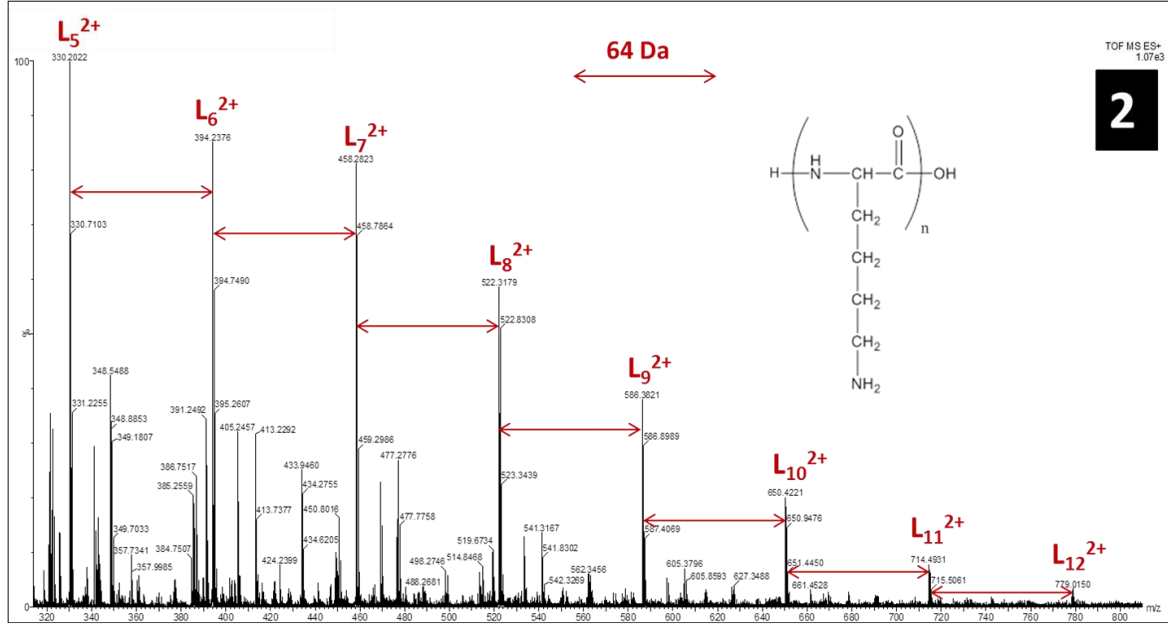
nedenle, Şekil 4.9'dan da takip edilebileceği gibi, IM-MS grafiğinin sol tarafındaki daha düşük sürüklenme zamanına karşılık gelen bölgede daha yüksek yük değerlerine sahip iyon gruplarına ait veriler gözlenmektedir [212].



Şekil 4.10. PLL'ye ait iki boyutlu ESI-IM-MS grafiğindeki 1. bölgenin kütle spektrumu. H / OH zincir sonu gruplarını içeren PLL zincirleri L_n ile işaretlenmiştir. İşaretlenen tüm iyonlar tek yüklü ve protonlanmış haldedir. Alt indisle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir. Ardışık PLL zincirleri arasındaki kütle farkı 128 Da'dır.

İyon hareketliliği grafiğinde işaretlenen, birinci bölgeye karşılık gelen ESI kütle spektrumu, Şekil 4.10'da verilmektedir. Bu kütle spektrumunda iki (m/z 275.1780) ile yedi (m/z 915.6128) adet arasında tekrar eden birim içeren tek yüklü ve protonlanmış PLL oligomerleri gözlenmektedir. Tüm bu iyonların H / OH zincir sonu gruplarını içerdikleri ve ardışık zincirler arasındaki kütle farkının 128 Da olduğu belirlenmiştir. İki boyutlu ESI-IM-MS grafiğindeki ikinci bölgede birinci bölgedeki iyonlara kıyasla daha yüksek yük değeri, m/z oranı ve kısa sürüklenme zamanlarına sahip olan iyonlar bulunmaktadır. Bu bölgenin Şekil 4.11'de verilen ESI spektrumunda bariz olarak 2+ yüklü protonlanmış PLL iyonlarına ait sinyaller gözlenmektedir. İkinci bölgeden elde edilen kütle spektrometrik veriler, birinci bölgenin ESI-MS spektrumuyla zincir sonu gruplarının ve tekrar eden birimlerin

kütlesi açısından uyumluluk göstermektedir. Bu kütle spektrumlarında sodyumlu ve potasyumlu iyonlara ait sinyaller de bulunmaktadır (Şekil 4.10 ve 4.11).

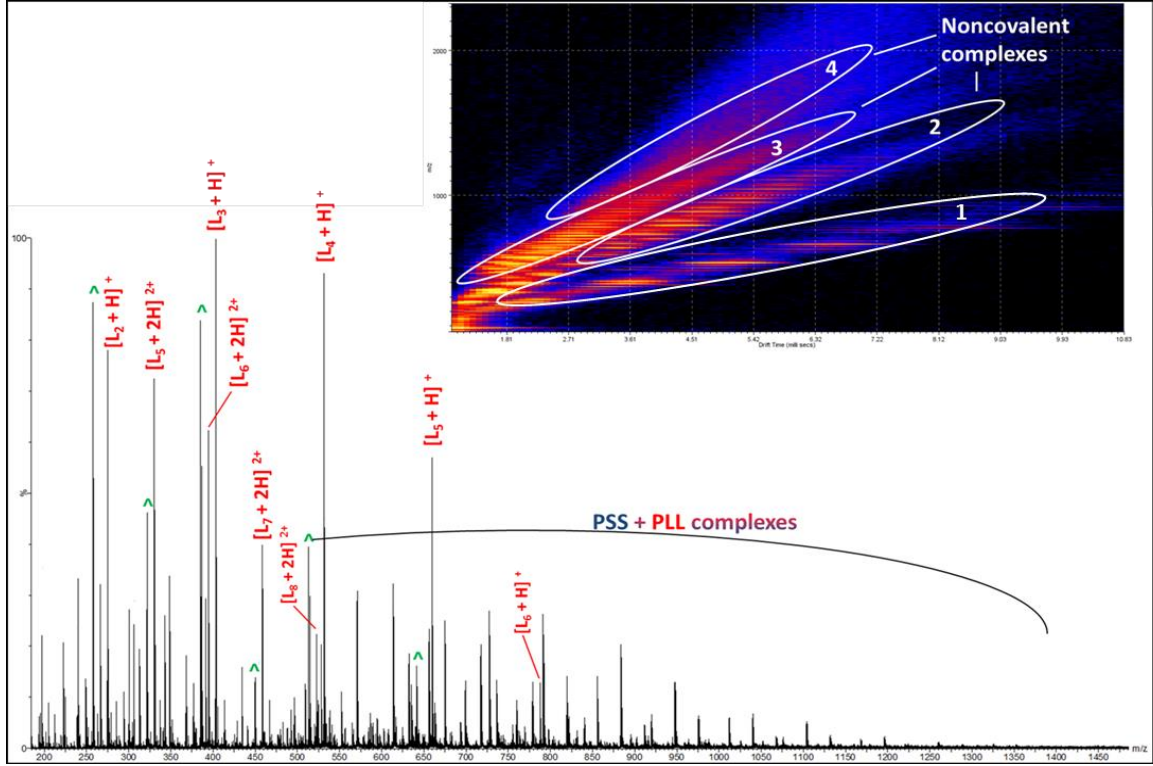


Şekil 4.11. PLL'ye ait iki boyutlu ESI-IM-MS grafiğindeki 2. bölgenin kütle spektrumu. H / OH zincir sonu gruplarını içeren PLL zincirleri L_n ile işaretlenmiştir. İşaretlenen tüm iyonlar $2+$ yüklü ve protonlanmış haldedir. Alt indisle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir. Ardışık PLL zincirleri arasındaki kütle farkı 64 Da'dır.

4.2.1. PLL-PSS Komplekslerinin IM-MS Analizleri

PLL ve PSS karışımları (PLL:PSS, 5:1 mol oranında) SYNAPT HD kütle spektrometresiyle analiz edilmiştir. PLL ve PSS karışımlarının pozitif iyon modunda yapılan iki boyutlu ESI-IM-MS analizinde elde edilen iyon hareketliliği grafiğinde iyonlar, yüklerine göre dört farklı hareketlilik bölgesine ayrılmış olarak gözlenmiştir (Şekil 4.12). Bu bölgelerden üçünde (2, 3 ve 4) kovalent olmayan komplekslere ait sinyaller bulunmaktadır. Komplekslerin bulunduğu bölgeler Şekil 4.12'de daire içine alınarak gösterilmiştir. İki boyutlu ESI-IM-MS grafiğinde işaretlenen 1. bölgede ise tek yüklü PLL zincirlerinin ve bunlara ait kayıplar sonucunda oluşan iyonların ($[M+H-H_2O]^+$, $[M+H-NH_3]^+$) bulunduğu belirlenmiştir. PLL ve PSS karışımının pozitif iyon modundaki ESI-MS analizi sonucunda elde edilen toplam kütle spektrumu da Şekil 4.12'de verilmektedir. Bu kütle spektrumunda yüksek sinyal şiddetine sahip tek ve çift yüklü, protonlanmış PLL iyonlarının baskın olduğu gözlenmektedir. Tüm bu

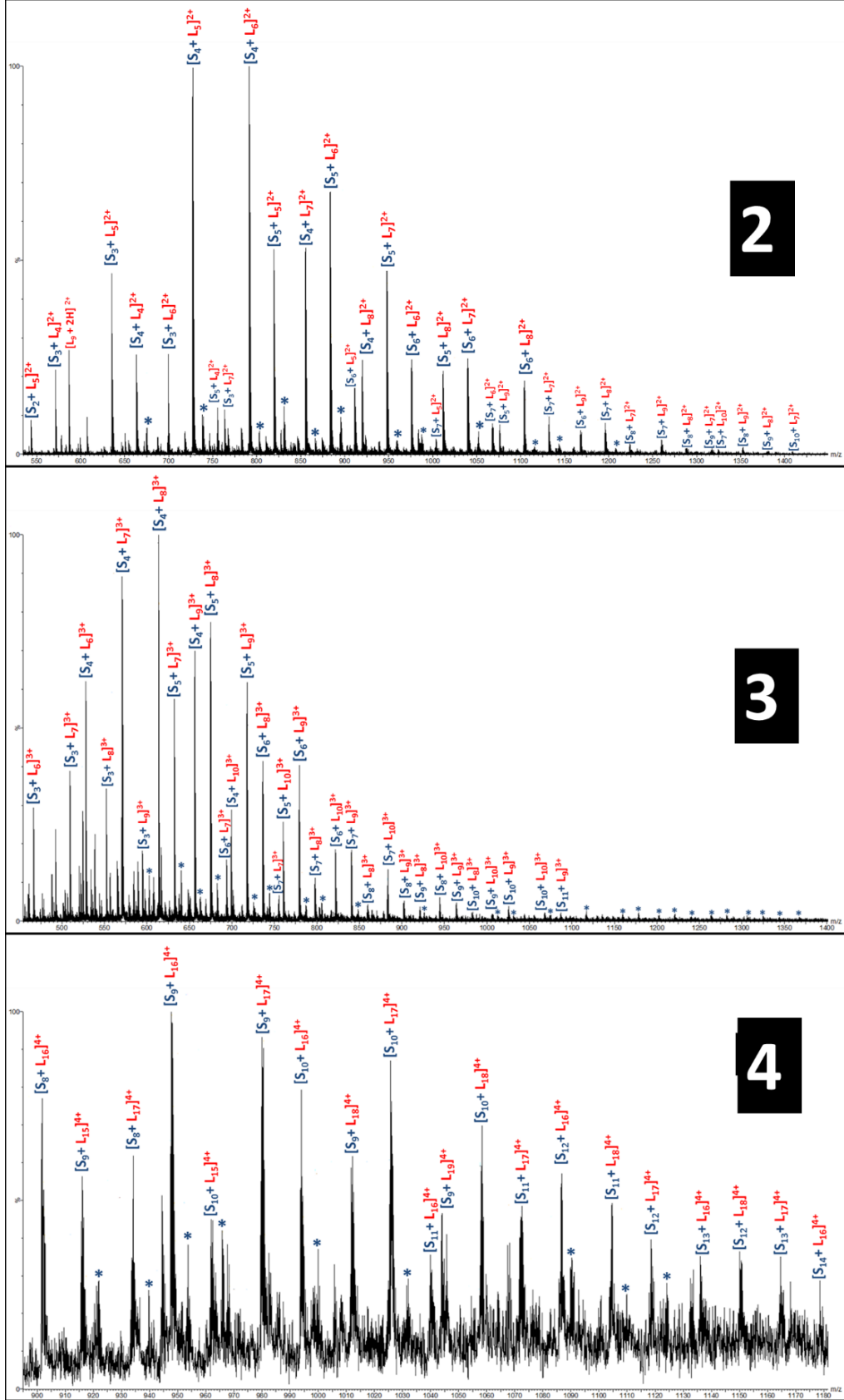
sinyallerin H/OH zincir sonu gruplarına sahip PLL zincirlerine ait olduğu tespit edilmiştir. Gaz fazında PLL zincirlerinde meydana gelen kayıplar sonucunda oluşan iyonlar da ESI kütle spektrumunda “^” işareti ile ayrıca gösterilmektedir. Aynı kütle spektrumunda kovalent olmayan komplekslere ait düşük sinyal şiddetinde bir dağılım gözlenebilmektedir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. PLL ve PSS'nin 5:1 (PLL:PSS) mol oranındaki karışımına ait pozitif iyon ESI kütle spektrumu. “^” işareti ile PLL zincirlerinden su veya amonyak ayrılması sonucunda oluşan iyonlar gösterilmektedir. Aynı örneğe ait iki boyutlu ESI-IM-MS grafiği şekil içerisinde ayrıca verilmiştir.

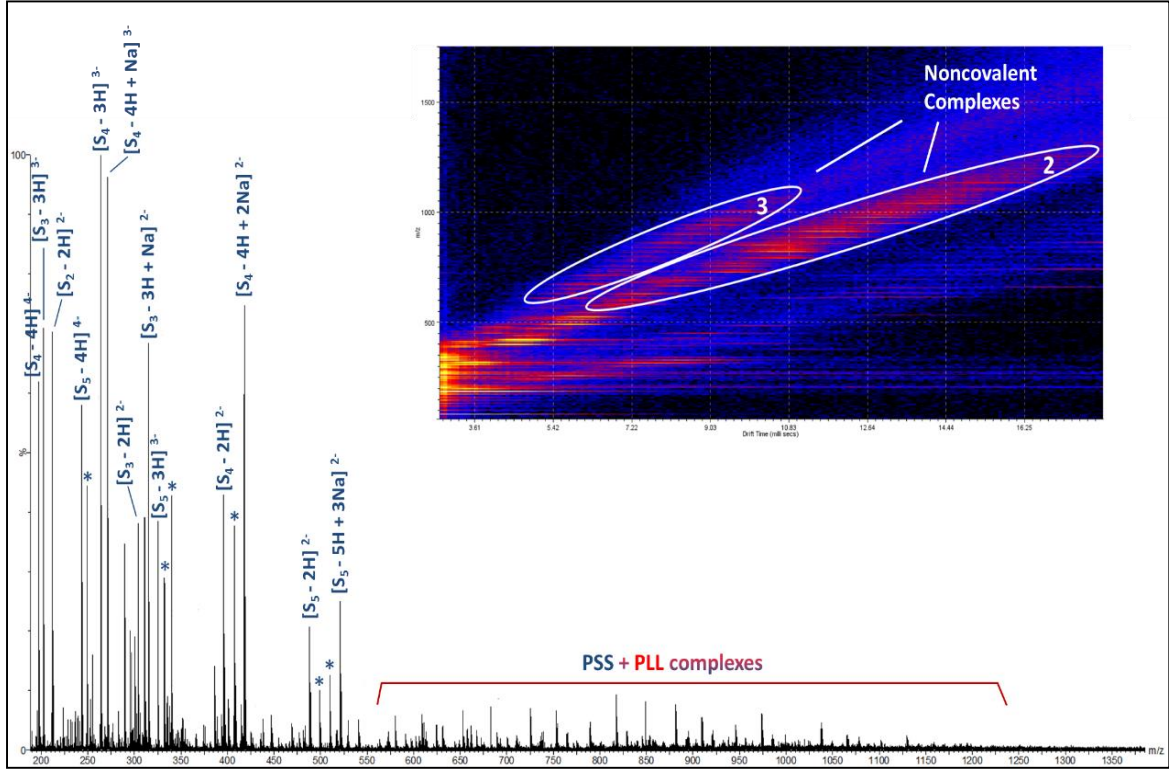
Gaz fazında oluşan kompleks iyonlarının miktarının, analiz ortamında bulunan türlere ait iyonların miktarından düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca kompleks iyonlarının yanı sıra, çoklu dağılıma sahip olan polikasyon ve polianyon örneklerindeki zincirlerin çoklu yüklenmeleri sonucunda elde edilen kütle spektrumlarının oldukça karmaşık olması, verilerin değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenlerden dolayı, iyon hareketliliği ayırması yapılmadan kovalent olmayan komplekslere ait sinyallerin ESI kütle spektrumunda ayrı ayrı tanımlanmasının oldukça zor olduğu görülmüştür.

İki boyutlu-ESI-IM-MS grafiğinde gözlenen 2., 3. ve 4. bölgelere karşılık gelen ESI kütle spektrumları Şekil 4.13'de ayrı ayrı verilmiştir. Bu kütle spektrumlarında PLL ve PSS'nin 2+, 3+ ve 4+ yüklü kovalent olmayan kompleks iyonlarına ait sinyallerin yanında Na^+/H^+ yer değiştirmesi sonucunda meydana gelen iyonlar da gözlenmiştir ve bu iyonlar "*" işareti ile gösterilmektedir. Elde edilen sonuçlarda PLL ve PSS'ye ait 2+, 3+ ve 4+ yüklü, kovalent olmayan kompleks iyonları sırasıyla $\text{S}_2+\text{L}_5 / \text{S}_{10}+\text{L}_7$, $\text{S}_3+\text{L}_6 / \text{S}_{11}+\text{L}_9$ ve $\text{S}_8+\text{L}_{16} / \text{S}_{14}+\text{L}_{16}$ stokiometrik oran aralıklarında gözlenmiştir (Şekil 4.13). İyon hareketliliğine göre ayırma özelliğinden faydalanılarak farklı yük ve stokiometrilere sahip kovalent olmayan komplekslere ait sinyaller, kolaylıkla gözlenebilmiş ve birbirinden ayırt edilebilmiştir. Büyük kütleyle sahip kompleks iyonları, çoklu yüklenerek analiz aralığında tayin edilebilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, stokiometrik olarak PSS birimlerine oranla daha fazla oranda PLL içeren kompleks birimlerinin pozitif iyon modunda daha yüksek sinyal şiddetine ve iyon kararlılığına sahip oldukları görülmüştür.



Şekil 4.13. PLL ve PSS'nin 5:1 (PLL:PSS) mol oranındaki karışımına ait pozitif iyon iki boyutlu ESI-IM-MS grafiğindeki (2), (3) ve (4) bölgelerinin kütle spektrumları. Alt indisle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir. Na⁺/H⁺ yer değiştirmesi sonucunda meydana gelen iyonlar "*" işareti ile gösterilmektedir.

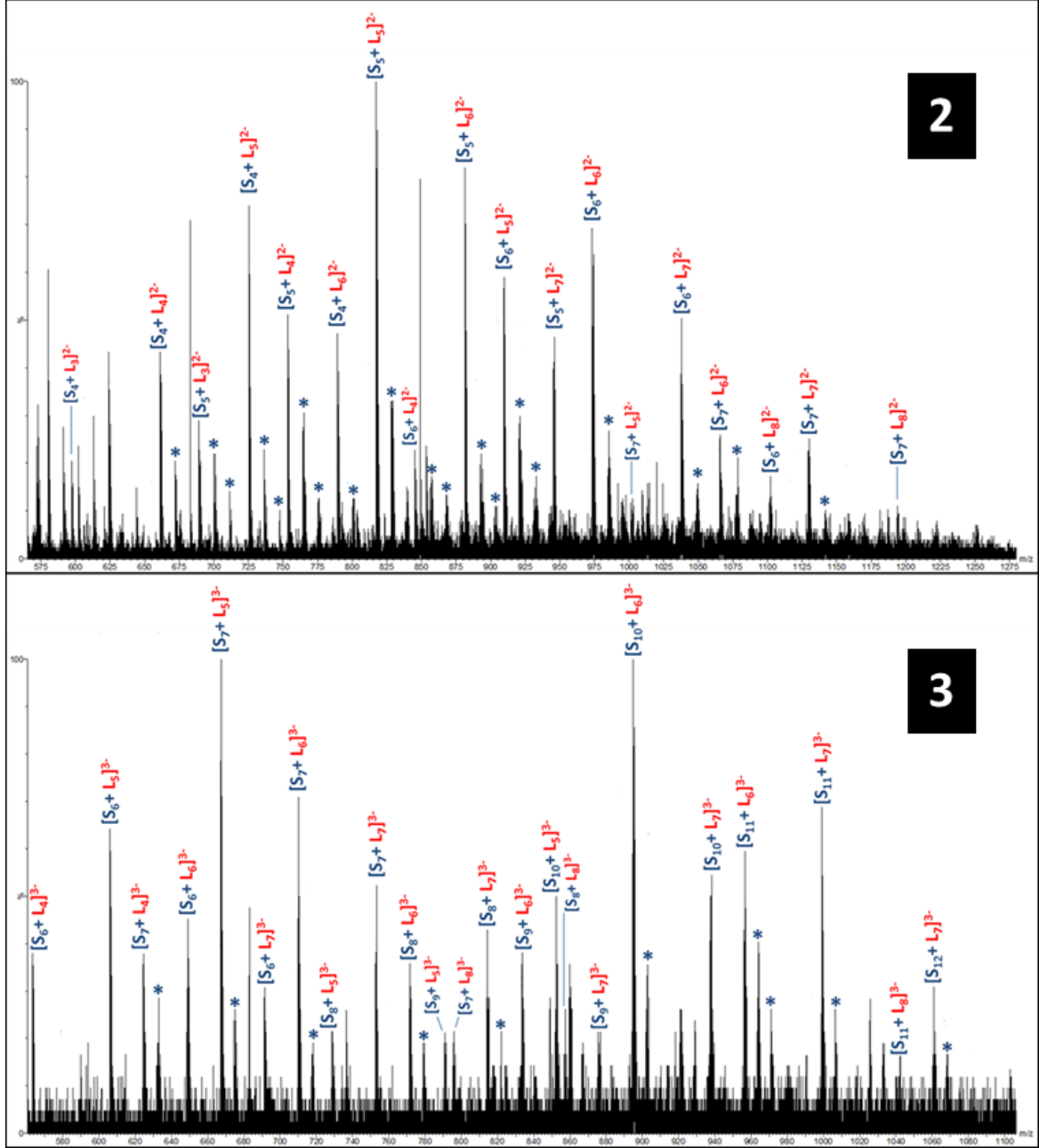
PLL ve PSS'nin kovalent olmayan kompleksleri ESI-IM-MS sistemi kullanılarak negatif iyon modunda da analiz edilmiştir. Fakat kütle spektrometrik analiz sonuçlarına göre, negatif iyon modunda elde edilen iyonlara ait toplam sinyal şiddetlerinin, pozitif iyon modunda elde edilen toplam sinyal şiddetinden düşük olduğu açıkça görülmüştür.



Şekil 4.14 PLL ve PSS'nin 5:1 (PLL:PSS) mol oranındaki karışımına ait negatif iyon ESI kütle spektrumu. Alt indislerle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir. Na⁺/H⁺ yer değiştirmesi sonucunda meydana gelen anyonlar "*" işareti ile gösterilmektedir. Aynı örneğe ait iki boyutlu ESI-IM-MS grafiği şekil içerisinde ayrıca verilmiştir.

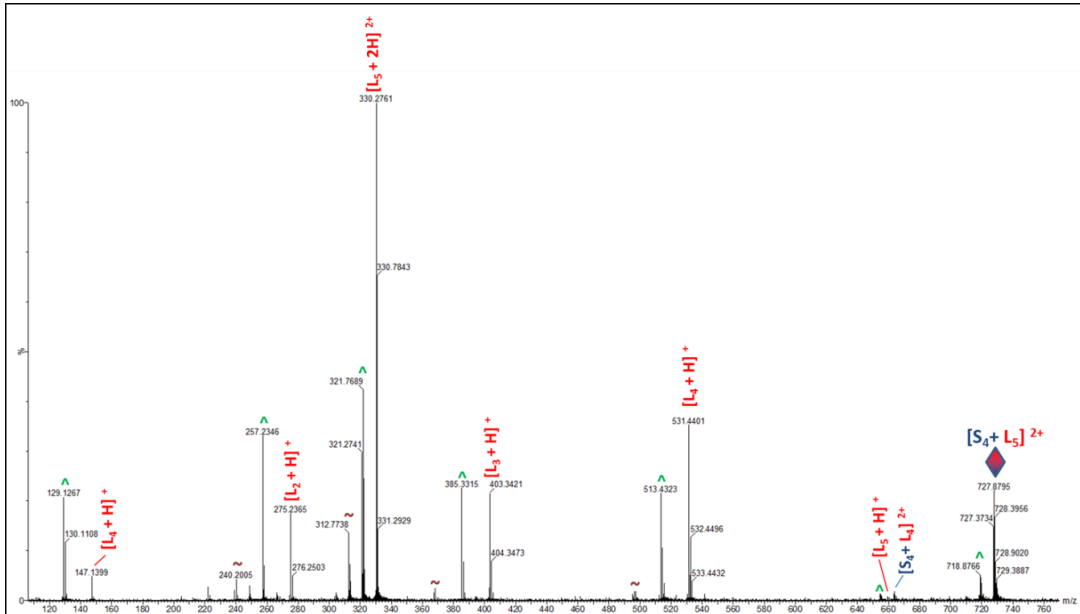
PLL-PSS karışımı, ESI-IM-MS ile negatif iyon modunda analiz edildiğinde elde edilen iki boyutlu ESI-IM-MS grafiğinde yüklerine göre üç farklı iyon grubuna karşılık gelen bölgeler gözlenmiştir. Bu bölgelerden ikisi 2- ve 3- yüklü kovalent olmayan kompleks iyonlarına karşılık gelmektedir ve bu iki bölge Şekil 4.14'de daireler içerisinde alınarak ayrıca gösterilmektedir. Toplam ESI kütle spektrumunda çoklu yüke sahip, deprotonlanmış haldeki PSS iyonları, Na⁺/H⁺ yer değişimine uğrayan PSS iyonları ile birlikte yüksek sinyal şiddetinde gözlenmektedir. 2- ve 3- yüklü kompleks iyonları sırasıyla, S₄+L₃ / S₇+L₈, ve S₆+L₄ / S₁₂+L₇ stokiometrik oran

aralıklarında gözlenmiştir (Şekil 4.15). Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, negatif iyon modunda beklendiği gibi, stokiyometrik olarak PLL'ye oranla daha fazla PSS içeren kompleks birimlerinin daha yüksek sinyal şiddetine ve iyon kararlılığına sahip oldukları görülmüştür.



Şekil 4.15. PLL ve PSS'nin 5:1 (PLL:PSS) mol oranındaki karışımına ait negatif iyon iki boyutlu ESI-IM-MS grafiğindeki (2) ve (3) bölgelerinin kütle spektrumları. Alt indisle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir. Na^+/H^+ yer değiştirmesi sonucunda meydana gelen anyonlar "*" işareti ile gösterilmektedir.

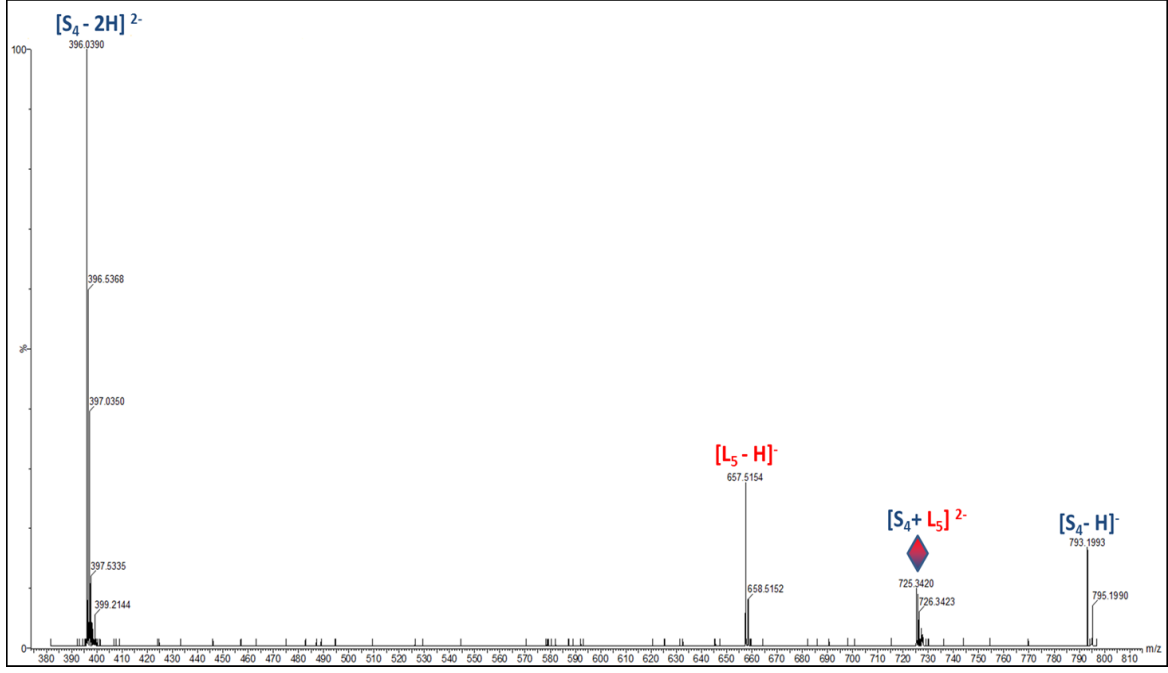
Tez çalışmasında pozitif ve negatif iyon modlarında yapılan kütle spektrometrik analizlerde gözlenen kompleks iyonlarının çoğu, 30-48 eV aralığında çarpışma enerjisi uygulanarak gaz fazında parçalanmıştır. S_4+L_5 stokiyometrik oranına sahip $2+$ yüklü iyonun (m/z 727.37) CAD yöntemi ile parçalanmasına ait MS/MS spektrumu Şekil 4.16'da gösterilmektedir. Bu spektrumda iki ile beş birim arasında tekrar eden birim içeren $1+$ ve $2+$ yüklü PLL zincirlerinin iyonlarına ait sinyaller gözlenmiştir. Aynı kütle spektrumunda parçalanma sonucunda kovalent olmayan kompleks iyonu bozulmadan S_4+L_5 kompleks iyonundan bir lizin biriminin ayrıldığı da görülmektedir. Bu durum, kovalent olmayan komplekslere ait çoğu MS/MS spektrumunda gözlenmiştir. Kompleks parçalanmadan toplam yapıdan bir lizin biriminin ayrılması, gaz fazında PLL ve PSS arasında meydana gelen etkileşimlerin kuvvetli olduğunu göstermektedir. MS/MS spektrumlarında PLL oligomerlerinden su ve amonyak gibi yüksüz ayrılmaların da gerçekleştiği belirlenmiştir ve bu kayıplar sonrasında kalan iyonlara ait sinyaller Şekil 4.16'da sırasıyla " \wedge " ve " \sim " işaretleri ile gösterilmektedir. Parçalanma sonucu pozitif iyon modunda elde edilen kütle spektrumlarında yapısında yüksek oranda negatif yüklü olma eğilimindeki sülfonik asit grupları içeren PSS zincirlerine ait bir sinyal gözlenmemiştir.



Şekil 4.16. 5 birimli PLL ve 4 birimli PSS'nin oluşturduğu kovalent olmayan komplekse ait pozitif iyon ESI MS/MS kütle spektrumu. Alt indislerle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir. PLL oligomerlerinden " \wedge " ve " \sim " işaretleri sırasıyla su ve amonyak kayıplarına uğrayan PLL oligomerlerine ait sinyalleri göstermektedir.

S₄+L₅ stokiyometrik oranına sahip 2- yüklü negatif iyonun (m/z 725.34) CAD yöntemi ile parçalanmasına ait MS/MS spektrumu ise Şekil 4.17'de gösterilmektedir. CAD sonucunda elde edilen kütle spektrumunda gözlenen parçalanma ürünleri arasında en yüksek şiddete sahip olan sinyal, 5 birimli PLL zincirinin S₄+L₅ kompleks yapısından ayrılması sonucunda kalan 2- yüklü, 4 birimli PSS iyonuna aittir (Şekil 4.17). Dört adet tekrar eden birim içeren PSS iyonuna ait tek yüklü ve negatif iyon da MS/MS spektrumunda gözlenmektedir. Kompleksin polikasyon bölümüne karşılık gelen 5 birimli PLL zincirine ait sinyalin de kütle spektrumunda gözlenmesi, söz konusu kompleks için ön görülen stokiyometrik oranı doğrulamaktadır. Benzer durum, negatif yüklü tüm kompleks iyonlarının MS/MS spektrumlarında gözlenmektedir.

Yapılan CAD çalışmalarında negatif yüklü kompleks iyonlarını parçalamak için uygulanan enerji aralığının genel olarak pozitif yüklü kompleks iyonlarını parçalamak için gerekli olan enerji aralığından düşük değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.17'de de görüldüğü üzere, gaz fazındaki negatif yüklü kompleks iyonuna CAD uygulandığı zaman, polimerik birimlerin ana zincirlerinde herhangi bir parçalanma olmadan kompleks iyonunun polikasyon ve polianyon birimlerinin birbirlerinden ayrıldığı gözlenmektedir. Tez kapsamında yapılan CAD çalışmalarında elde edilen tüm ESI MS/MS spektrumlarında pozitif ve negatif yüklü kompleks iyonlarının stokiyometrilere doğrulanmıştır.



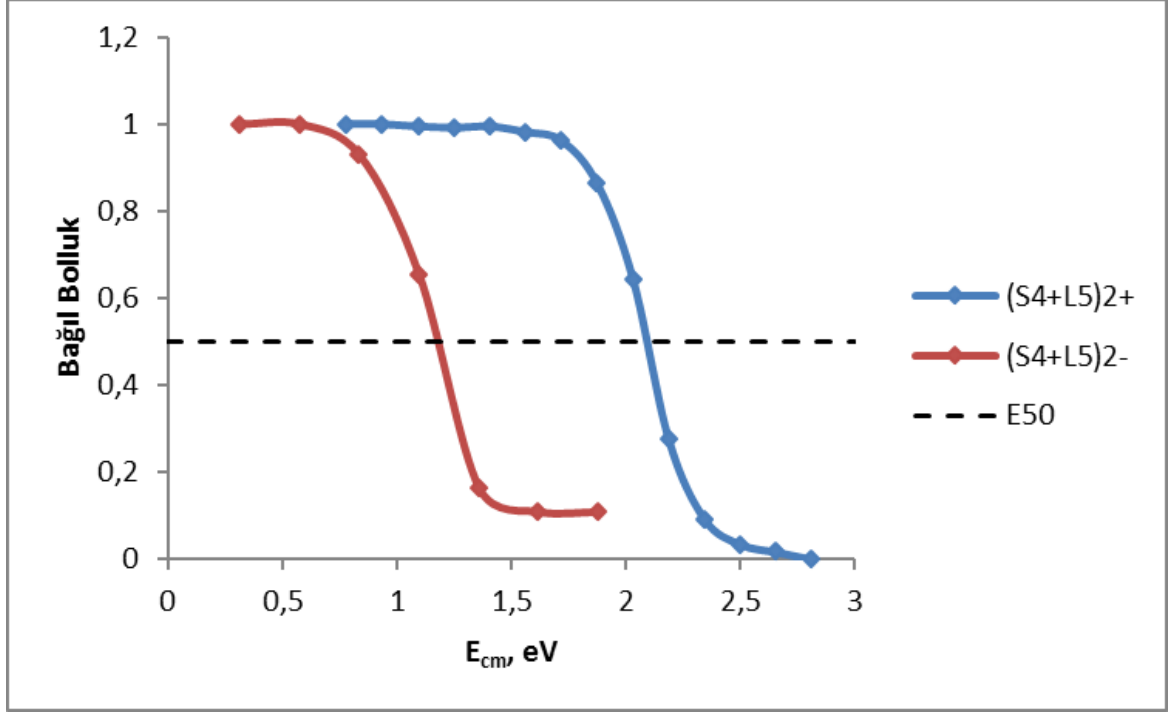
Şekil 4.17. 5 birimli PLL ve 4 birimli PSS'nin oluşturduğu kovalent olmayan komplekse ait negatif iyon ESI MS² kütle spektrumu. Alt indislerle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir.

S₄+L₅ stokiyometrisine sahip olan, 2+ yüklü, pozitif ve negatif yüklü kompleks iyonlarının ([S₄+L₅]²⁺ ve [S₄+L₅]²⁻) parçalanma verimliliklerini kıyaslayan eğriler oluşturulmuştur (Şekil 4.18). Kompleks iyonlarının bağıl bollukları, kütle merkezi çarpışma enerjilerine (E_{cm}) karşı grafiğe geçirilerek elde edilen eğriler üzerinden değişim gözlenmiştir [215]. Bağıl bolluk değerleri, öncül iyon olarak seçilen kompleksin sinyal şiddetinin seçilen parçalanma ürünlerinin iyon şiddetlerinin ortalaması ile kendisinin toplamına bölünmesi ile elde edilmektedir (Eşitlik 4.1) [216, 217].

$$\text{Bağıl bolluk} = \frac{\text{Şiddet}_{(\text{kompleks})}}{\text{Şiddet}_{(\text{kompleks})} + \text{Ortalama Şiddet}_{(\text{parçalanma ürünleri})}} \quad (4.1)$$

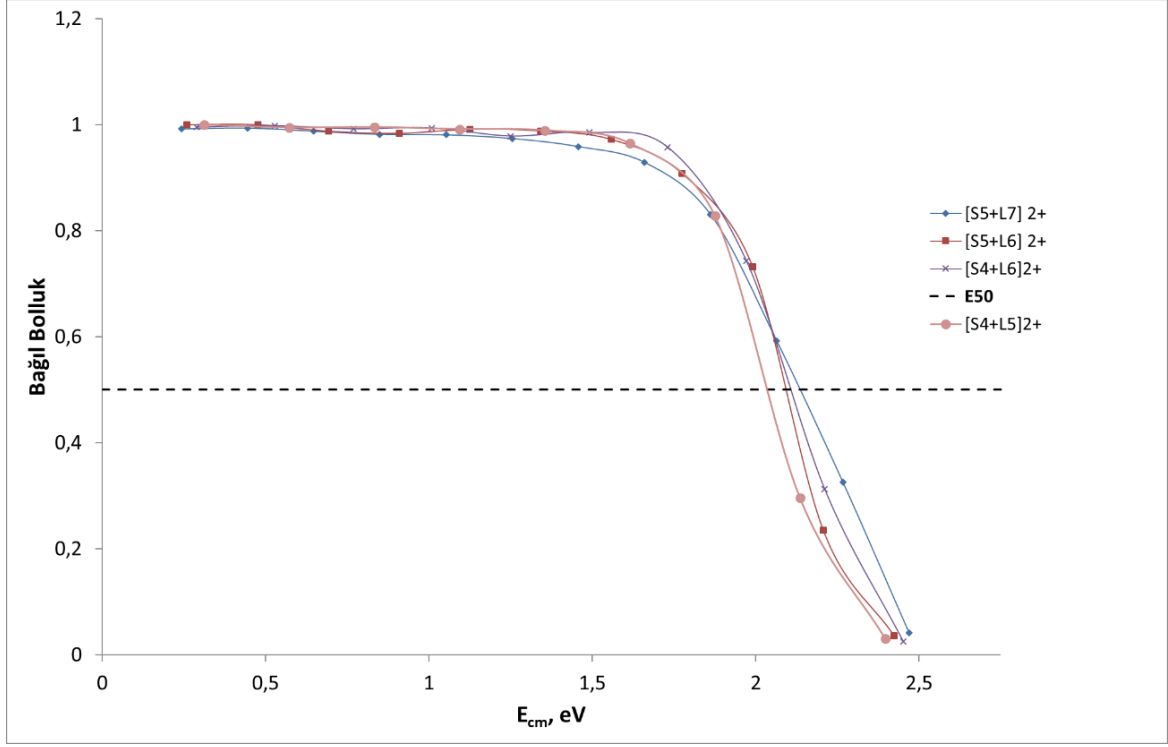
E_{cm} değeri, E_{lab}, m_{Ar} ve m_{öncül iyon} ifadelerinin sırasıyla, laboratuvar ölçeğindeki çarpışma enerjisine, çarpışma gazı olan Ar atomlarının kütesine ve öncül iyonun kütesine karşılık geldiği eşitlikle hesaplanmaktadır (Eşitlik 4.2).

$$E_{cm} = E_{lab} \times \left(\frac{m_{Ar}}{m_{Ar} + m_{\text{öncül iyon}}} \right) \quad (4.2)$$



Şekil 4.18. 2+ ve 2- yüklü, S_4+L_5 stokiyometrisindeki kompleks iyonlarının parçalanma verimliliği eğrileri.

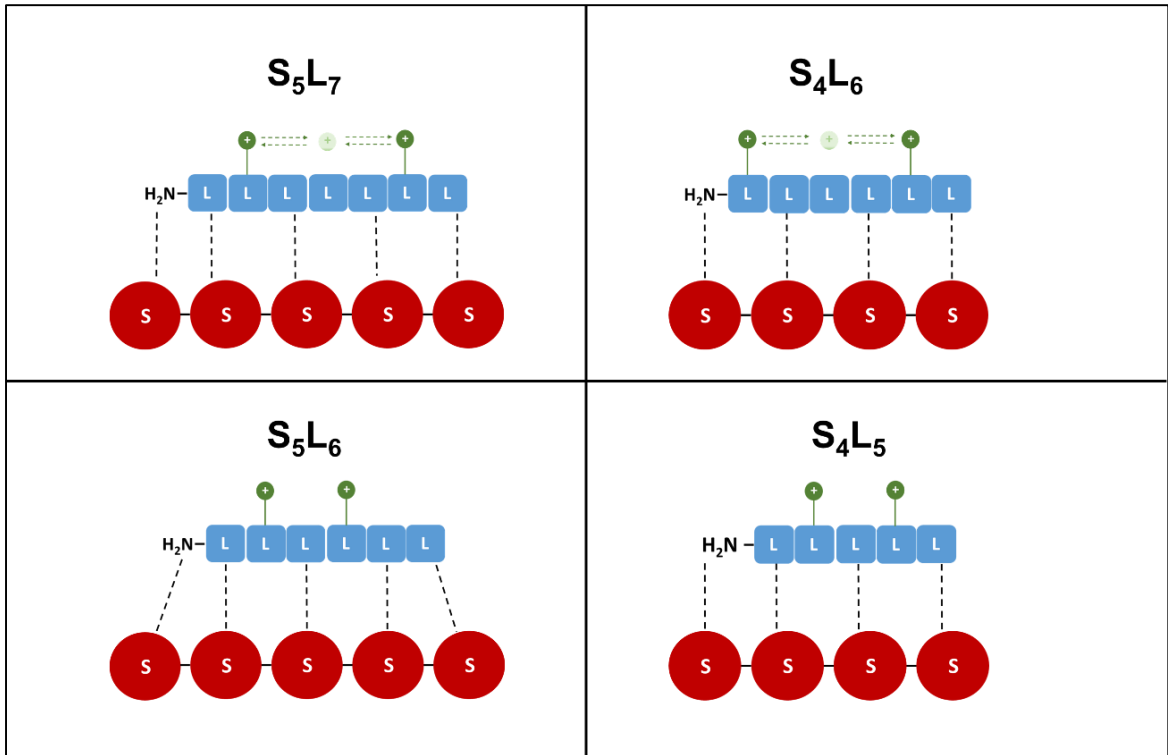
Şekil 4.18'de verilen parçalanma verimliliği grafiğinde öncül iyonun %50'sinin parçalanmış olduğu çarpışma enerjisi değerlerine karşılık gelen E_{50} düzlemi bulunmaktadır [218]. E_{50} düzlemindeki değerler, kompleks iyonlarının gaz fazı kararlılıklarının bir ölçüsü olarak değerlendirilmektedir. Bağıl bolluk eğrileri, daha yüksek E_{cm} değerlerinde E_{50} düzlemi ile kesişen iyonların gaz fazında daha kararlı oldukları söylenebilir. Şekil 4.18'de verilen grafiğe göre, aynı stokiyometrik orana sahip pozitif kompleks iyonlarının, negatif kompleks iyonlarına kıyasla gaz fazında daha kararlı oldukları ifade edilebilmektedir. Deneyler sonucunda elde edilen tüm kompleks iyonları için parçalanma eğrileri oluşturulmuştur ve beklendiği gibi, aynı stokiyometrik orana sahip, pozitif yüklü iyonların negatif yüklü iyonlardan gaz fazında daha kararlı oldukları belirlenmiştir.



Şekil 4.19. Bazı 2+ yüklü PLL-PSS kompleks iyonlarının parçalanma verimliliği eğrileri.

Parçalanma verimliliği grafikleri oluşturularak pozitif ve negatif yüklü PLL-PSS kompleks iyonlarının gaz fazı kararlılıkları, etkileşim durumlarındaki farklılıklara göre değerlendirilmiştir. Şekil 4.19'da verilen pozitif yüklü kompleks iyonları için elde edilen grafikteki eğrilerin E_{50} düzlemi ile kesiştikleri E_{cm} değerleri incelendiğinde, kararlılık artışı sırasının; $[S_4+L_5]^{2+}$, $[S_5+L_6]^{2+}$, $[S_4+L_6]^{2+}$ ve $[S_5+L_7]^{2+}$ şeklinde olduğu görülmektedir. Bu komplekslerin gaz fazındaki etkileşim durumları Şekil 4.20'de şematik olarak gösterilmektedir. Bu gösterimler, PLL zincirlerinin tekrar eden birimlerinin (128 Da) PSS zincirlerinin tekrar eden birimlerine (184 Da) göre daha küçük oldukları göz önünde bulundurularak düzenlenmiştir. Tekrar eden birim uzunluklarındaki fark nedeniyle, birbirini takip eden stiren sülfonik asit birimlerinin ardışık lizin birimleriyle birebir etkileşime girmekte zorlandığı düşünülmektedir. Gaz fazında kompleks iyonlarının net 2+ yüke sahip oldukları bilgisi de hesaba katılarak oluşturulan etkileşim gösterimlerinde iyonların yükleri, oluşabilecek itme kuvvetleri nedeniyle, kompleks yapıları üzerinde birbirlerine göre en uzak kısımlara yerleştirilmiştir. $[S_5+L_7]^{2+}$ ve $[S_4+L_6]^{2+}$ komplekslerinin 2+ yükü taşıyabilecek yapıları oluşturma olasılıklarını yüksek olmasının yapılarını daha kararlı bir hale getirdiği düşünülmektedir. Ayrıca bu kompleksler için PLL zincirleri ile PSS zincirlerinin tekrar

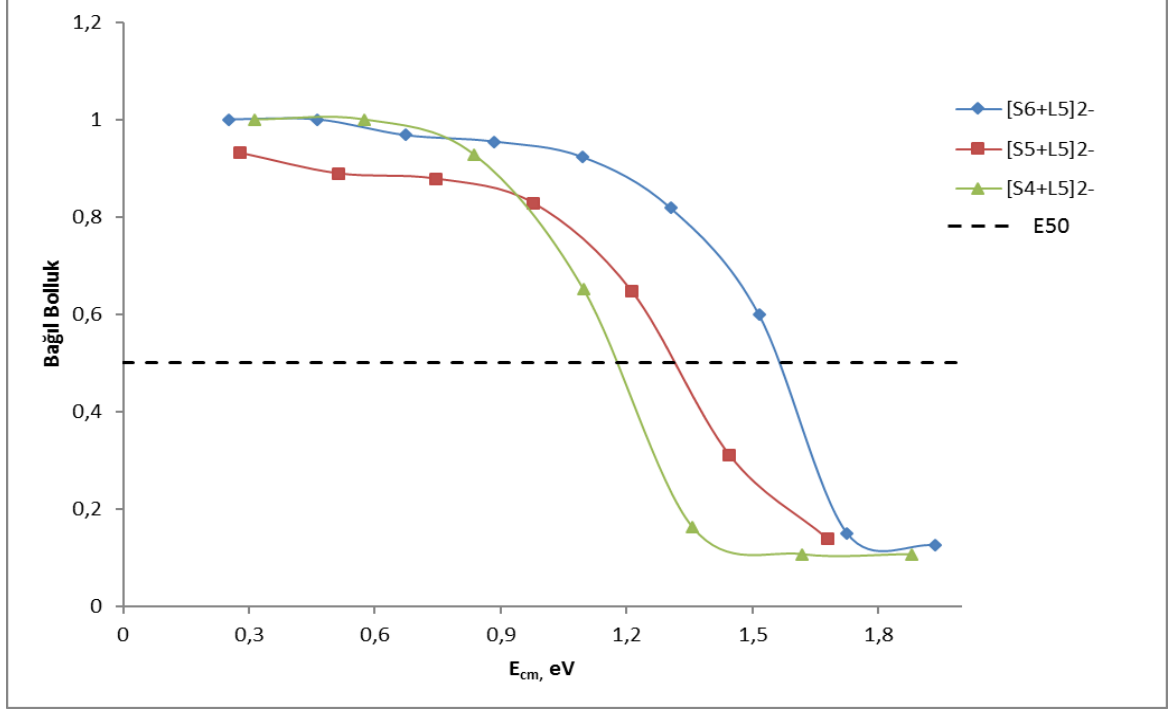
eden birimlerinin sayıca farklarının net 2+ yükü oluşturabilecek olması da yapılarının daha kararlı olabileceğini açıklamaktadır. Şekil 4.20’de yük dolaşımı olarak gösterilen bu durum, yapıların diğerlerine göre daha yüksek olasılıkla 2+ yükü taşıyabilecek olduklarını gösterir. Bunun yanı sıra, $[S_5+L_7]^{2+}$ kompleksinin $[S_4+L_6]^{2+}$ kompleksine göre daha fazla sayıda etkileşim bölgesine sahip olduğu da görülmektedir. Bu gösterim, $[S_5+L_7]^{2+}$ kompleksinin $[S_4+L_6]^{2+}$ kompleksine göre gaz fazında daha kararlı olduğu sonucunu desteklemektedir. Benzer şekilde etkileşim noktalarının sayıca farklı olduğu $[S_5+L_6]^{2+}$ ve $[S_4+L_5]^{2+}$ kompleksleri için de yapıların gaz fazındaki kararlılık durumları gösterimler için yapılan kabulleri desteklemektedir. $[S_5+L_6]^{2+}$ kompleksinin sayıca daha fazla etkileşim olasılığı içermesinden dolayı, $[S_4+L_5]^{2+}$ kompleksinden daha kararlı olduğu düşünülmektedir. Bu komplekslerin gaz fazında net 2+ yüke sahip oldukları durumda yük taşıyabilir kısımlarının sınırlı olması, yapılarının oluşum olasılıklarının düşük olmasına neden olabilir.



Şekil 4.20. Bazı 2+ yüklü PLL-PSS kompleks iyonlarının etkileşimlerinin şematik gösterimi.

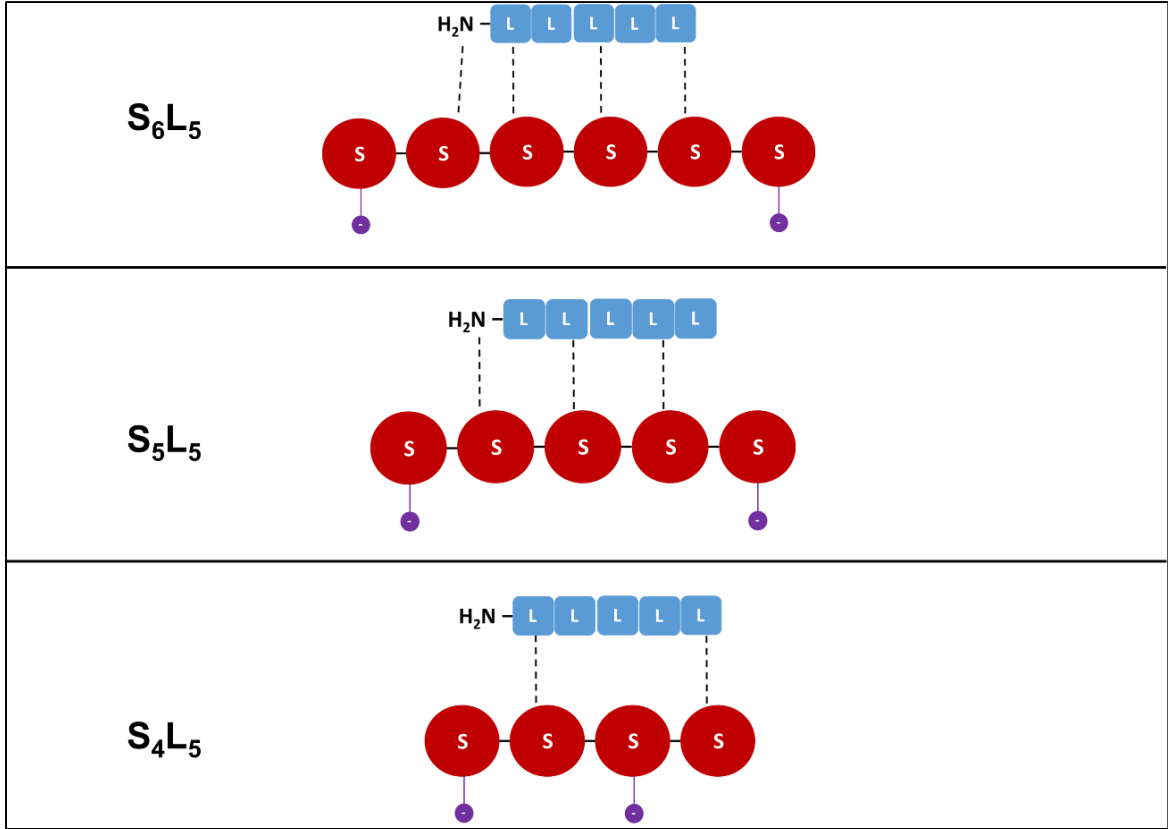
Negatif yüklü PLL-PSS komplekslerinin de parçalanma verimliliği eğrileri çizilerek şekil 4.21’deki grafik düzenlenmiştir. Bu grafikteki eğrilerin E_{50} düzlemi ile kesiştiği

noktalar değerlendirildiğinde, kararlılık artışının $[S_4+L_5]^{2-}$, $[S_5+L_5]^{2-}$, $[S_6+L_5]^{2-}$ sıralamasında olduğu görülmektedir.



Şekil 4.21. Bazı 2- yüklü PLL-PSS kompleks iyonlarının parçalanma verimliliği eğrileri.

Pozitif yüklü kompleksler için oluşturulan etkileşim gösterimleri, aynı kabuller yapılarak negatif yüke sahip kompleksler için de oluşturulmuştur (Şekil 4.22). Şekil 4.22'de farklı stokiyometriye sahip PSS-PLL komplekslerinin farklı etkileşim sayılarına sahip oldukları görülmektedir. Buna göre, $[S_6+L_5]^{2-}$ kompleksinin bileşenleri arasında sayıca daha fazla etkileşimin meydana gelme olasılığı yüksek olmasından dolayı, kararlılık eğrileri verilerinden elde edilen sonuçla da uyumlu olarak, gaz fazında diğer komplekslere göre daha kararlı yapıda olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.22. Bazı 2- yüklü PLL-PSS kompleks iyonlarının etkileşimlerinin şematik gösterimi.

Tez çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre, pozitif yüklü kompleks iyonlarının aynı stokiyometriye sahip negatif yüklü kompleks iyonlarından daha kararlı oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.18). PLL-PSS kompleks iyonlarının gaz fazı kararlılıklarının kıyaslandığı grafiklerdeki eğrilerin E_{50} düzlemi ile kesişim noktalarının pozitif yüklü kompleks iyonları için negatif yüklü kompleks iyonlarına kıyasla daha dar bir enerji aralığında buldukları görülmektedir (Şekil 4.19 ve 4.21). Bu durum, pozitif yüklü kompleks iyonlarının gaz fazındaki kararlılıklarının, negatif kompleks iyonlarının kararlılıklarına göre stokiyometrik orana daha az bağımlı olduğunu göstermektedir.

4.2.2. Polikasyon-Polianyon Komplekslerinin Etkin Çarpışma Kesitlerinin Hesaplanması

IM-MS analizlerinden elde edilen sürüklenme zamanı verileri kullanılarak iyonların boyutları ve büyüklükleri ile doğrudan ilişkili olan CCS değerleri belirlenmektedir. Bir iyonun etkin çarpışma kesiti, molekülün ortalama momentumuna bağlı olarak meydana getirdiği etki alanını ifade eden bir boyut parametresidir [219]. Bu değer,

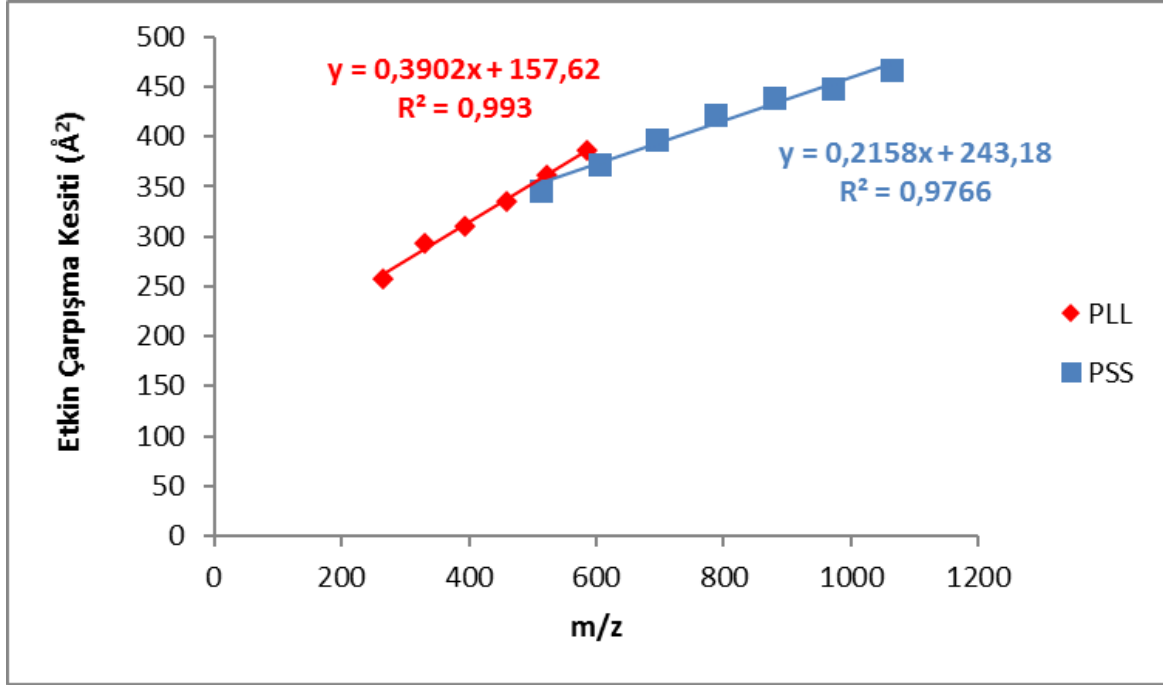
molekölün üç boyutlu geometrisi ile ilgili konformasyonu hakkında bilgi sağlamaktadır. SYNAPT cihazı ile yapılan CCS belirleme deneylerinde CCS değeri bilinen standart örnekler kullanılarak iyon hareketlilik verilerinin ölçeklendirilmesi, kullanılan deneysel parametrelere göre kalibre edilir. Böylece, CCS değeri bilinmeyen örneklerin konformasyon ve boyut özellikleri hakkında ayrıntılı ve yüksek doğrulukta veri elde edilebilmektedir.

Tez çalışmasında polialanin oligomerlerinin ve standart proteinlerin (sitokrom c, miyoglobin, ubiquitin) deneysel sürüklenme zamanları ve standart CCS değerleri kullanılarak aynı koşullarda analiz edilen türlerin sürüklenme zamanı verilerinden CCS değerleri hesaplanmıştır (Şekil EK-1). Bu kalibrasyon yöntemi kullanılarak 2+ yüklü polielektrolit iyonlarının ve komplekslerinin CCS değerleri ayrı ayrı hesaplanmış ve elde edilen sonuçlara göre bu türlerin farklı uzunluktaki zincirlerinin ve komplekslerinin gaz fazındaki sıklıkları karşılaştırılmıştır.

2+ yüklü PLL ve PSS iyonlarının deneysel CCS değerlerinin kütle/yük oranına göre değişimini gösteren grafik Şekil 4.23'de verilmektedir. Bu grafikte her polielektrolite ait değişimi ayrı olarak gösteren doğrular bulunmaktadır. Bu doğruların eğimlerinin değerlendirilmesiyle farklı türdeki polielektrolit iyonlarının gaz fazındaki sıklıkları karşılaştırılabilmektedir. Grafikte bir türe ait doğrunun eğiminin diğerlerinden daha büyük olması, bu türün gaz fazında daha yayvan bir yapıda olmasına bağlı olarak, zincir uzunluğunun artmasıyla yapının CCS değerinin de yüksek oranda arttığını göstermektedir.

PLL ve PSS polielektrolitlerinin deneysel olarak hesaplanan CCS değerlerinin kullanılmasıyla oluşturulan grafikte PLL zincirlerinin m/z oranları arttıkça CCS değerlerinin PSS'ye ait CCS değerlerine göre daha fazla arttığı görülmektedir (Şekil 4.23). Bu sonuç, PSS zincirlerinin gaz fazında PLL zincirlerine göre daha sıkı konformasyona sahip olduklarını göstermektedir. PSS zincirlerinin daha büyük molekül ağırlığına sahip tekrar eden birimlerden oluşmalarına rağmen yapılarında bulunan aromatik halkalar arasında meydana gelebilecek π - π etkileşimleri sayesinde gaz fazında PLL zincirlerine göre daha sıkı bir yapıya sahip olacağı öngörülmüştür. Bunun yanı sıra, PLL zincirlerinin tekrar eden birimlerinin her birinde uzun alkil zinciri sonunda pozitif yüklü amin grupları bulunmaktadır. Bu yapıların gaz fazında küçük hacimlere sıkışmasının zor olduğu düşünülmektedir. Ayrıca pozitif

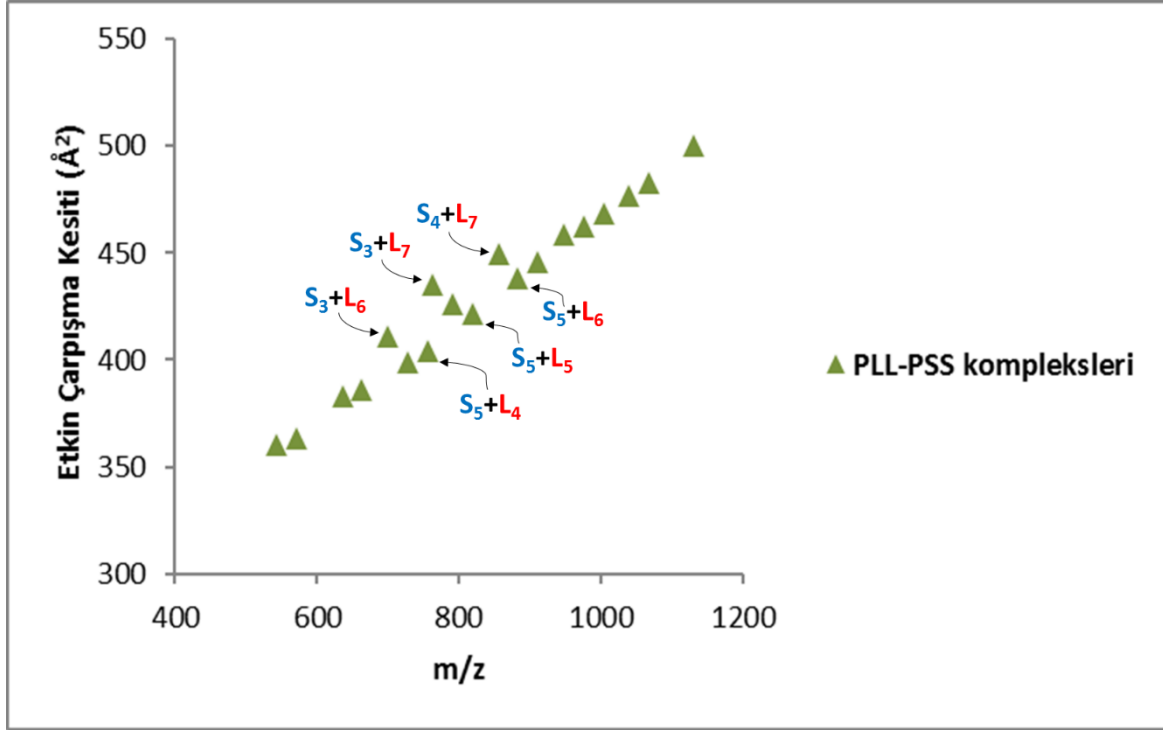
yüklü grupların serbest durumda birbirlerini iterek yapının sıkılaşmasını engelleyebileceği rahatlıkla söylenebilir.



Şekil 4.23. 2+ yüklü PLL ve PSS iyonlarının deneysel CCS değerlerinin kütle/yük oranına göre değişimi.

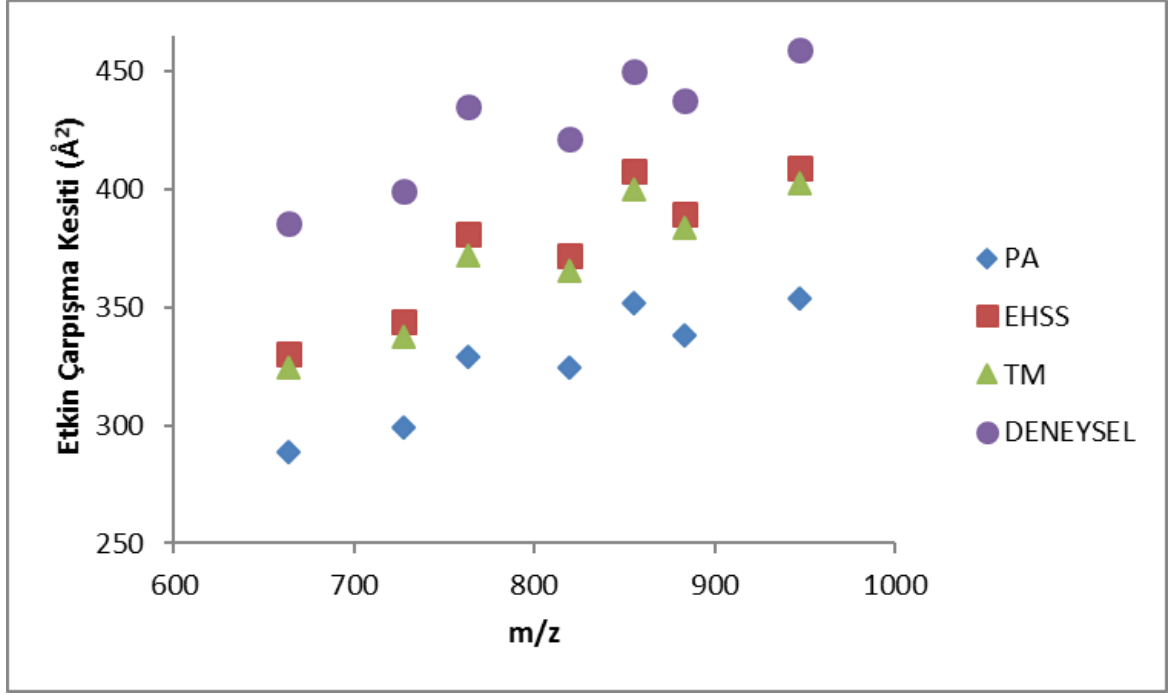
PLL ve PSS zincirlerinin CCS değerlerinin m/z oranı ile değişiminin ayrı ayrı değerlendirilmesinin ardından bu polielektrolitlerin gaz fazında meydana getirdikleri komplekslerin CCS değerleri de deneysel sonuçlara göre hesaplanmıştır. PLL-PSS komplekslerinin deneysel CCS değerlerinin m/z oranına göre değişimi neredeyse bir doğru meydana getirmektedir. Fakat bu değişim eğiliminden sapan bazı veriler bulunmaktadır (Şekil 4.24). Sapan noktaların genel verilerin oluşturduğu doğruya göre daha büyük CCS değerlerinde oldukları görülmektedir. Bu noktadaki verilerin içerdikleri polikasyon ve polianyon sayısı bakımından, stokiyometrik olarak, daha yüksek PLL / PSS oranına sahip komplekslere ait olduğu belirlenmiştir (S_3+L_6 /m/z 699.3724, S_3+L_7 /m/z 763.4637, S_4+L_7 /m/z 855.4930). Bu komplekslerin yapılarında geniş konformasyona sahip PLL zincirlerinin daha yüksek oranda bulunmasından dolayı gaz fazında daha büyük CCS değerlerine sahip oldukları gözlenmiştir. Bu sonuçlar, PLL ve PSS'nin konformasyon değişimleri ile ilgili önceki bölümde yapılan yorumları desteklemekle birlikte, polikasyon ve polianyonların gaz fazında sahip

oldukları konformasyonu meydana getirdikleri komplekslerin konformasyonlarına yansıttıklarını göstermektedir.



Şekil 4.24. 2+ yüklü PLL-PSS kompleks iyonlarının deneysel CCS değerlerinin kütle/yük oranına göre değişimi.

PLL-PSS komplekslerinin deneysel CCS değerlerinin doğrulanması için aynı m/z oranına ve yapıya sahip kompleks iyonlarının teorik CCS değerleri hesaplanmıştır. Kompleksler için farklı etkin çarpışma kesiti yaklaşımlarıyla hesaplanan teorik CCS değerlerinin m/z oranına göre değişiminin deneysel olarak belirlenen CCS değerlerinin m/z oranına göre değişimiyle aynı eğilime sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.25). Böylece tez kapsamında yapılan çalışmalarda CCS değerlerinin m/z oranına göre değişimlerinin deneysel olarak doğru bir şekilde belirlendiği anlaşılmıştır.



Şekil 4.25. 2+ yüklü PLL-PSS kompleks iyonlarının deneysel ve teorik CCS değerlerinin kütle/yük oranına göre değişimi.

Tez çalışmalarında sürüklenme tüpünde sürükleyici gaz olarak N₂ kullanılmıştır. Sürükleyici gaz olarak N₂'nin kullanıldığı göz önüne alınarak türlerin CCS değerleri hesaplanmıştır. Sürükleyici gazın temelde molekül kütesine ve polaritesine bağlı olarak, sürüklenme tüpü içerisinde analiz edilen iyonlarla sürükleyici gaz moleküllerinin etkileşimleri değişiklik göstermektedir. Bu tür cihazlarda N₂ moleküllerine kıyasla daha küçük yarıçapa sahip atomlardan meydana gelen He gazı da sürükleyici gaz olarak kullanılmaktadır.

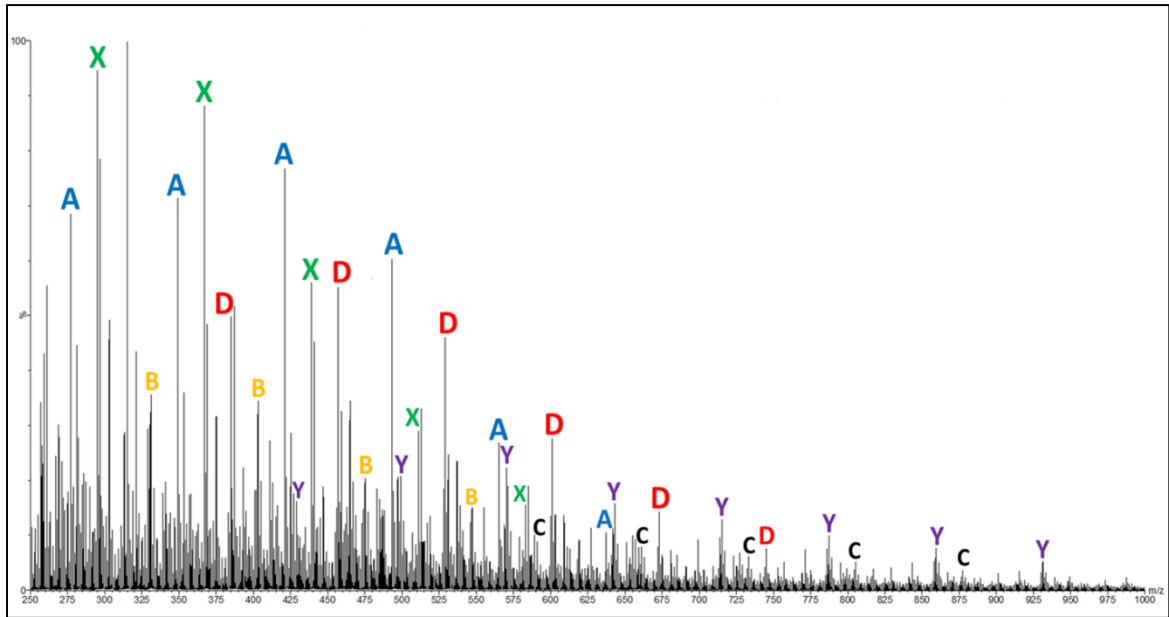
İyonlar, daha yüksek molekül kütesine ve polariteye sahip olan N₂ molekülleri içerisinde He gazına kıyasla daha az hareketlidir ve bu nedenle N₂ sürükleyici gazının kullanıldığı, aynı elektriksel alanın uygulandığı analizlerde daha uzun sürüklenme zamanları belirlenmektedir [206].

Teorik CCS değerlerinin belirlenmesinde kullanılan MOBCAL programında CCS değerleri, sürükleyici gaz He olacak şekilde hesaplanmaktadır. Fakat tez kapsamında yapılan çalışmalarda sürükleyici gaz olarak N₂ kullanılmıştır. Bunun sonucu olarak, analiz sonuçlarından elde edilen sürüklenme zamanı değerlerinin daha yüksek olmalarından dolayı, şekil 4.25'de görüldüğü gibi teorik değerlerden daha yüksek deneysel CCS değerleri hesaplanmıştır. Fakat kütle/yük oranına göre

CCS değerlerinin değişim eğiliminin deneysel ve teorik hesaplamalar için benzer olması, deneysel CCS değerlerinin doğru olarak hesaplandığını ve bu verilerin yapıların gaz fazı konformasyonlarının değerlendirilmesinde kullanılabileceğini göstermiştir.

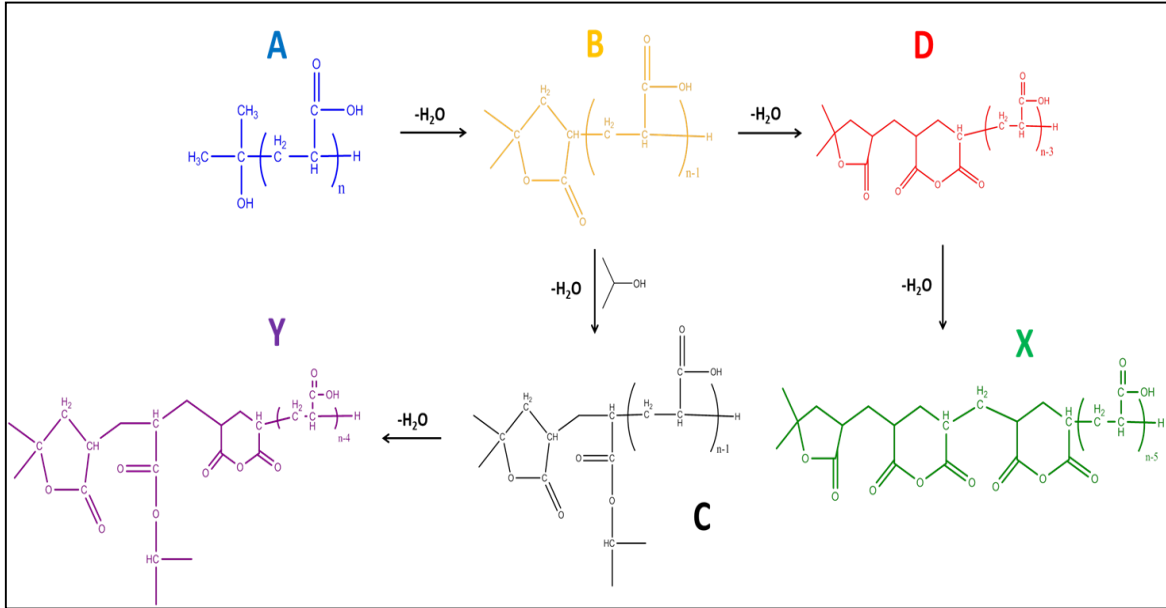
4.2.3. Bir Polielektrolitin Farklı Zincir Sonu Gruplarına Sahip Oligomerlerinin Analizi

Poli(akrilik asit) (PAA), çok tabakalı polielektrolit uygulamalarında sıklıkla kullanılmakta olan bir polianyondur [220, 221]. PAA örneği, SYNAPT HDMS cihazı ile kütle spektrometrik olarak analiz edildiğinde, örnek içerisinde farklı zincir sonu gruplarına sahip PAA oligomerlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. PAA'nın pozitif iyon modundaki analizi sonucunda elde edilen iki boyutlu ESI-IM-MS grafiğinde tek yüklü iyonlara karşılık gelen bölgenin ESI kütle spektrumu Şekil 4.26'da verilmiştir. Bu kütle spektrumu, PAA'nın farklı zincir sonu gruplarına sahip altı farklı iyon serisini içermektedir. Kütle spektrumunda gözlenen birbirini tekrar eden zincirlere ait sinyallerin aralarındaki kütle farklarının bir akrilik asit biriminin kütlesine karşılık gelen 72 Da olduğu görülmektedir.



Şekil 4.26. PAA'nın iki boyutlu ESI-IM-MS grafiğinden elde edilen 1+ yüklü iyonlara ait kütle spektrumu.

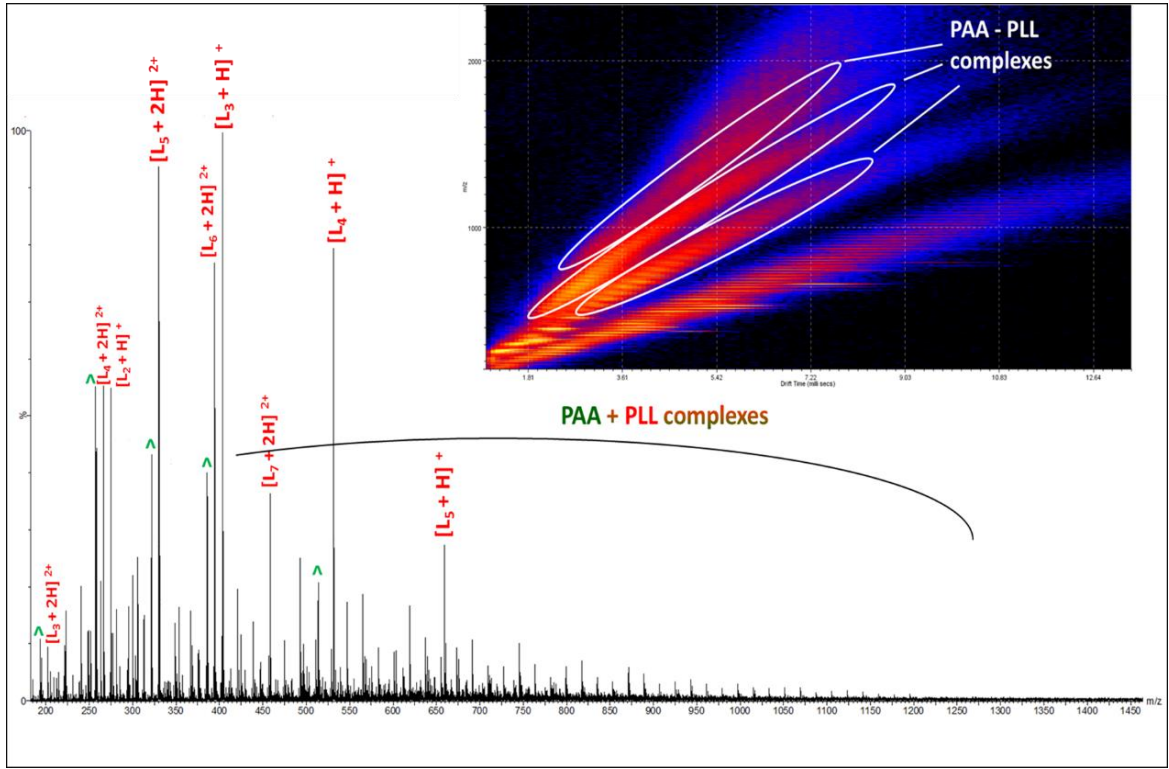
Bu tez çalışmalarında kullanılan PAA örneğinin kullanıldığı bir başka çalışmada, farklı zincir sonu gruplarına sahip PAA iyon serilerinin örnek içerisinde bulunmasının nedenleri ve bazı serilerin gaz fazında oluşum mekanizmaları üzerine yorumlar yapılmıştır [222]. Kullanılan PAA örneği, izopropanol içerisinde radikal polimerizasyonu yöntemi ile hazırlanmıştır. Bu reaksiyon sonucunda oluşan PAA zincirlerinin, A serisindeki PAA iyonlarının zincir sonu gruplarına sahip olmaları beklenmektedir (Şekil 4.27). Fakat gaz veya çözelti fazında meydana gelen su kayıpları, diğer zincir sonu gruplarına sahip serilerin oluşumuna neden olmaktadır. C serisi, bir -COOH grubunun izopropanol varlığında esterifikasyona uğraması sonucunda oluşmuştur. Bu bilgilere göre, bu tez kapsamında yapılan kütle spektrometrik analizlerde izopropanol kullanılmadığından dolayı, A, B ve C serilerinin kütle spektrometrik analizden önce PAA örneğinde bulunuyor olduğu düşünülmektedir. D, X ve Y serilerinin ise kütle spektrometrik koşullarda, gaz fazında oluşma ihtimali bulunmaktadır (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. Analiz edilen PAA örneğinde tespit edilen farklı zincir sonu gruplara sahip serilerin gösterimi.

PLL ve PAA'nın karışımları da ESI-IM-MS cihazı ile analiz edilmiştir. PLL ve PAA karışımının (molar oran 5:1 (PLL:PAA)) pozitif iyon modundaki iki boyutlu ESI-IM-MS analizinde iyon gruplarının yüklerine göre dört farklı bölgeye ayrıldıkları

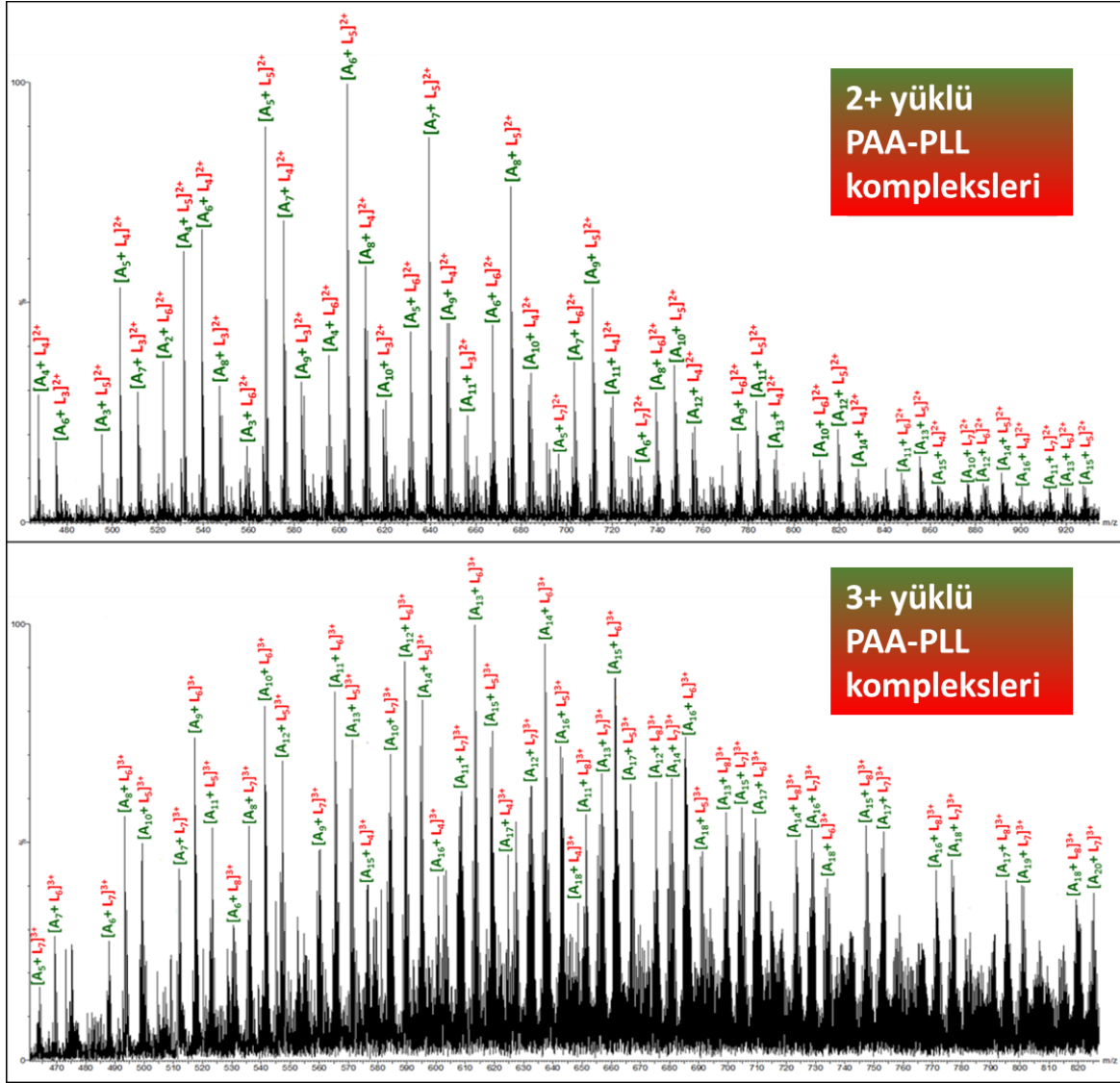
gözlenmiştir (Şekil 4.28). Tek yüklü iyonlara ait bölgede PLL-PSS karışımlarının analizinde olduğu gibi sadece PLL zincirlerine ait iyonlar bulunmaktadır. Şekil 4.28’de verilen toplam kütle spektrumunda PLL zincirlerinin tek ve çift yüklü iyonlarına ait sinyaller yüksek şiddet değerlerinde gözlenmektedir. Yüksek şiddetli bu sinyaller, H- ve –OH zincir sonu gruplarına sahip PLL zincirlerine aittir. PLL zincirlerinden su ayrılması sonucunda oluşan iyonlara ait sinyaller, ESI kütle spektrumunda “^” işareti ile gösterilmiştir. PLL ve PAA’nın bir araya gelerek oluşturdukları kompleks iyonlarına ait sinyal dağılımı kütle spektrumunda gözlenmektedir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. PLL ve PAA’nın 5:1 (PLL:PAA) mol oranındaki karışımına ait pozitif iyon ESI kütle spektrumu. “^” işareti ile PLL zincirlerinden su ayrılması sonucunda oluşan iyonlar gösterilmektedir. Aynı örneğe ait iki boyutlu ESI-IM-MS grafiği şekil içerisinde ayrıca verilmiştir.

İki boyutlu ESI-IM-MS grafiğinde işaretlenen PLL ve PAA’nın 2+ ve 3+ yüklü kompleks iyonlarının sinyallerinin bulunduğu iki bölgeye ait ESI kütle spektrumları Şekil 4.29’da verilmektedir. Gözlenen bu komplekslerin stokiyometrilere, 2+ yüklü iyonlar için A_4+L_4 / $A_{15}+L_5$, 3+ yüklü iyonlar için A_5+L_7 / $A_{20}+L_7$ aralığında

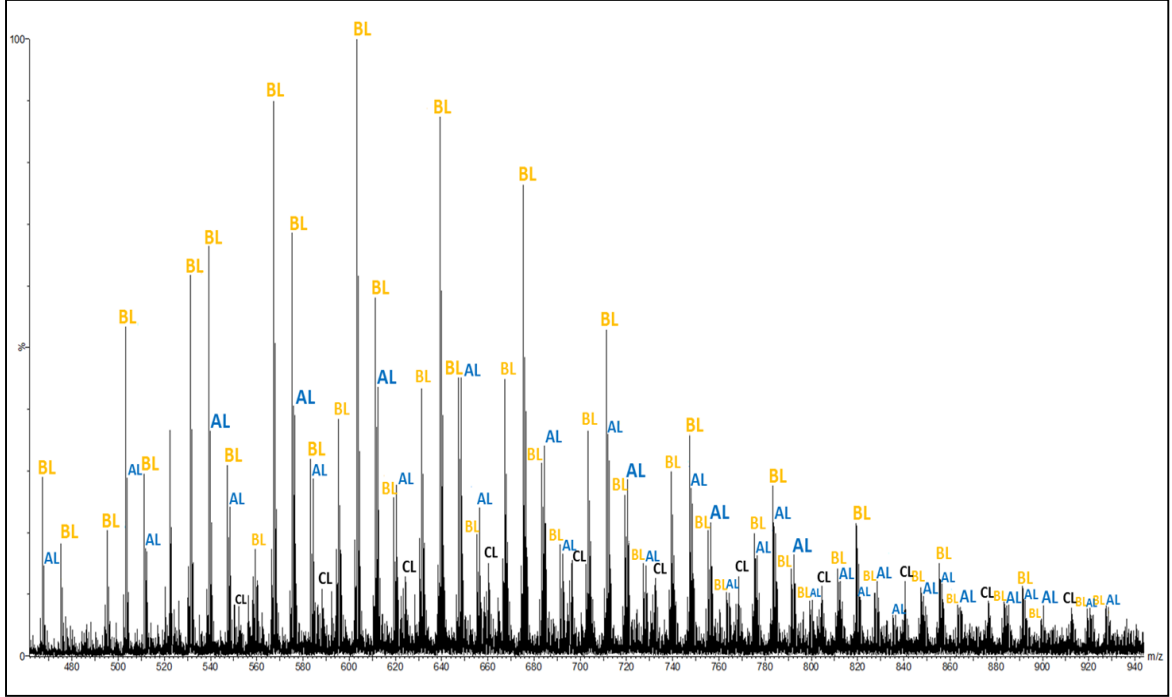
gözlenmektedir. İki boyutlu ESI-IM-MS analizinde 4+ yüklü kompleks iyonlarının varlığı da tespit edilmiştir, ancak elde edilen kütle spektrumunda komplekslere ait sinyallerin şiddetlerinin çok düşük olduğu görülmüştür. Analiz sonuçlarına göre, beş birimli PLL içeren, 2+ yüklü komplekslerin ve altı birimli PLL içeren 3+ yüklü komplekslerin kütle spektrumunda en yüksek şiddete sahip oldukları gözlenmiştir. 2+ ve 3+ yüklü komplekslerde bulunan en uzun PLL zincirleri sırasıyla 7 ve 8 birime sahiptir. Bu dağılım, farklı uzunluklardaki PAA zincirlerinin benzer uzunluktaki PLL zincirleri ile etkileşime girerek gaz fazında kompleks iyonları oluşturduğunu göstermektedir. Aynı zamanda PLL-PAA kompleks iyonlarının stokiyometrilerinin gaz fazındaki yük değerleri ile ilişkili olmadığı gözlenmiştir. PLL-PSS komplekslerinin incelendiği önceki bölümde ise bu durumun aksine, türler arasındaki stokiyometrik oranın net yükün değerini belirleyici bir parametre olduğu ifade edilmiştir. PSS zincirlerinde bulunan sülfonik asit grupları, PAA zincirlerinde bulunan karboksilik asit gruplarından çok daha asidiktir. pKa değeri yaklaşık 2.1 olan PSS zincirlerinin gaz fazında protonlanmış olmaları oldukça zordur [223]. Poliakrilik asidin pKa değeri ise 4.5'dir [224, 225]. Bu nedenle, PAA zincirleri polianyon özellikleri gösterse de PSS kadar asidik olmadığından dolayı, gaz fazında kolaylıkla protonlanmış olarak toplam kompleks yapısının makul bir net yüke sahip olmasını mümkün kılmaktadır.



Şekil 4.29. PLL ve PAA'nın 5:1 (PLL:PAA) mol oranındaki karışımına ait pozitif iyon iki boyutlu ESI-IM-MS grafiğindeki 2+ ve 3+ yüklü iyonlara karşılık gelen bölgelerinin kütle spektrumları. Alt indislerle verilen sayılar tekrar eden birim sayısını ifade etmektedir.

2+ yüklü PLL-PAA komplekslerine ait ESI kütle spektrumu, kompleksleri oluşturan PAA serilerinin dağılımı açısından incelenmiştir (Şekil 4.30). Bu kütle spektrumunda 2+ yüklü PLL-PAA komplekslerine ait üç farklı sinyal dağılımı bulunmaktadır. Bunların Şekil 4.27'de gösterilen PAA'nın A, B ve C serilerini içeren komplekslere ait olduğu belirlenmiştir. Alınan kütle spektrometrik verilerde PAA örneğinin tek başına analizinde varlıkları tespit edilen D, X ve Y serilerinin PLL ile kompleks oluşturmadıkları gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, PLL ile PAA arasındaki kompleks oluşumunun gaz fazında D, X ve Y serilerinin meydana gelmesini engellediği belirlenmiştir. Bu veriler aynı zamanda, A, B ve C serilerinin çözelti fazında da

bulduğunu; D, X ve Y serilerinin ise sadece gaz fazında oluştuğunu öne süren değerlendirmeleri de desteklemektedir.

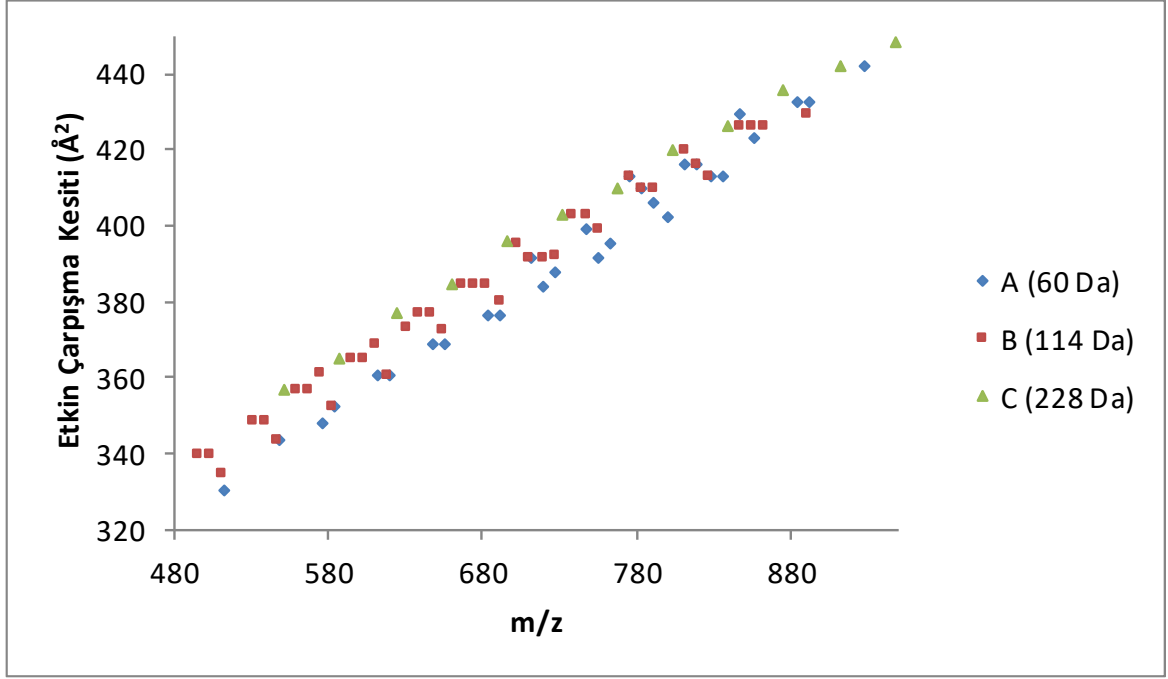


Şekil 4.30. PLL ve PAA'nın 5:1 (PLL:PAA) mol oranındaki karışımına ait pozitif iyon iki boyutlu ESI-IM-MS grafiğindeki 2+ yüklü iyonlara karşılık gelen bölgelerinin kütle spektrumları. A, B ve C harfleri PAA'nın serilerini ifade etmektedir.

Kütle spektrometrik sistemler ile yapılan çalışmalarda, analiz edilen yapıların çözelti ve gaz fazlarındaki konformasyon ve etkileşim özellikleri kıyaslanabilmektedir. Fakat bu konuda yapılan çalışmalarda elde edilen veriler ile yapıların konformasyonları hakkında kesin sonuçlara varılamamaktadır. Bu tez çalışmasında IM-MS sistemi ile elde edilen iki boyutlu ayırma verilerinin sağladığı bilgiye göre, farklı net yüke sahip iki polielektrolitin etkileşimleri üzerinden farklı zincir sonu gruplarına sahip oligomerlerin çözelti fazında var oldukları veya gaz fazında oluştuğu ayırt edilerek belirlenebilmiştir.

4.2.4. Polielektrolitlerin Zincir Sonu Gruplarının Komplekslerin Etkin Çarpışma Kesitlerine Etkilerinin İncelenmesi

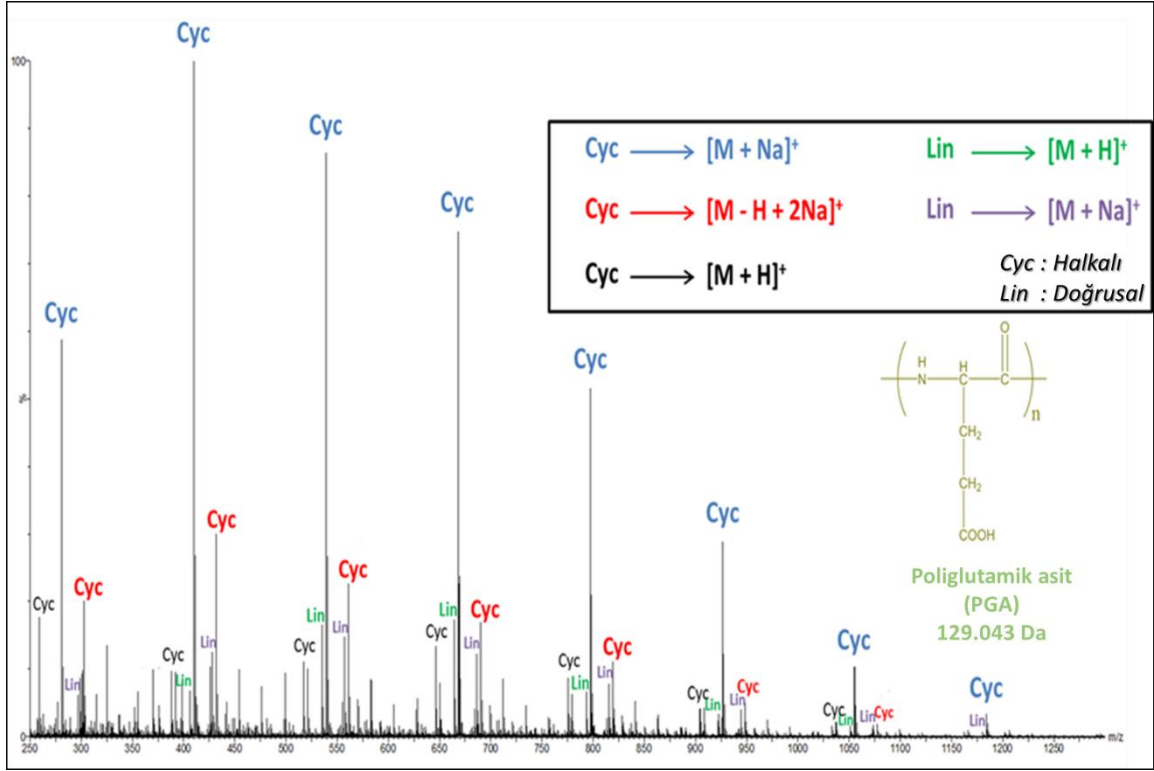
2+ yüklü PAA-PLL kompleks iyonlarının farklı PAA serileri içeren gruplarının CCS değerleri, gaz fazındaki büyüklük özelliklerinin karşılaştırılması açısından değerlendirilmiştir. Kompleks iyonlarının deneysel CCS değerlerinin kütle/yük oranına göre değişiminin gösterildiği grafik Şekil 4.31'de verilmiştir. Bu grafikteki veri dağılımı değerlendirildiğinde PAA-PLL kompleks iyon serilerinin genişliklerinin A, B ve C sırasında arttığı görülmektedir. Bu kompleksleri oluşturan PAA serilerinin zincir sonu gruplarının kütleleri, A, B ve C için sırasıyla; 60, 114 ve 228 Da'dır. Şekil 4.31'de verilen grafikteki değerlerin dağılımına göre, en büyük zincir sonu gruplarına sahip PAA'nın C serisinin PLL ile yaptığı komplekslerin gaz fazında en geniş etkin çarpışma kesitlerine sahip oldukları belirlenmiştir. Bunun yanında en küçük zincir sonu grubuna sahip olan PAA'nın A serisinin PLL ile yaptığı komplekslerin en küçük etkin çarpışma kesiti değerlerine sahip oldukları gözlenmektedir. Bu sonuçlar, PAA serilerinin zincir sonu gruplarının büyüklüklerinin PLL ile oluşturdukları kompleks iyonlarının konformasyonuna etki ettiğini göstermektedir. Kompleksi oluşturan türlerin zincir sonu gruplarının büyük olması, gaz fazındaki kompleksin küçük bir hacme sıkışmasını engellemektedir. Küçük zincir sonu gruplarına sahip olan türlerin oluşturduğu kompleks iyonları ise daha küçük hacme sıkışabilmiş durumdadır. Bu sonuçların yanı sıra, farklı zincir sonu gruplarına sahip PAA serilerinin, CCS değişim eğrilerinin incelenmesiyle kolaylıkla birbirlerinden ayırt edilebildikleri tespit edilmiştir.



Şekil 4.31. 2+ yüklü PLL-PAA kompleks iyonlarının deneysel CCS değerlerinin kütle/yük oranına göre değişimi.

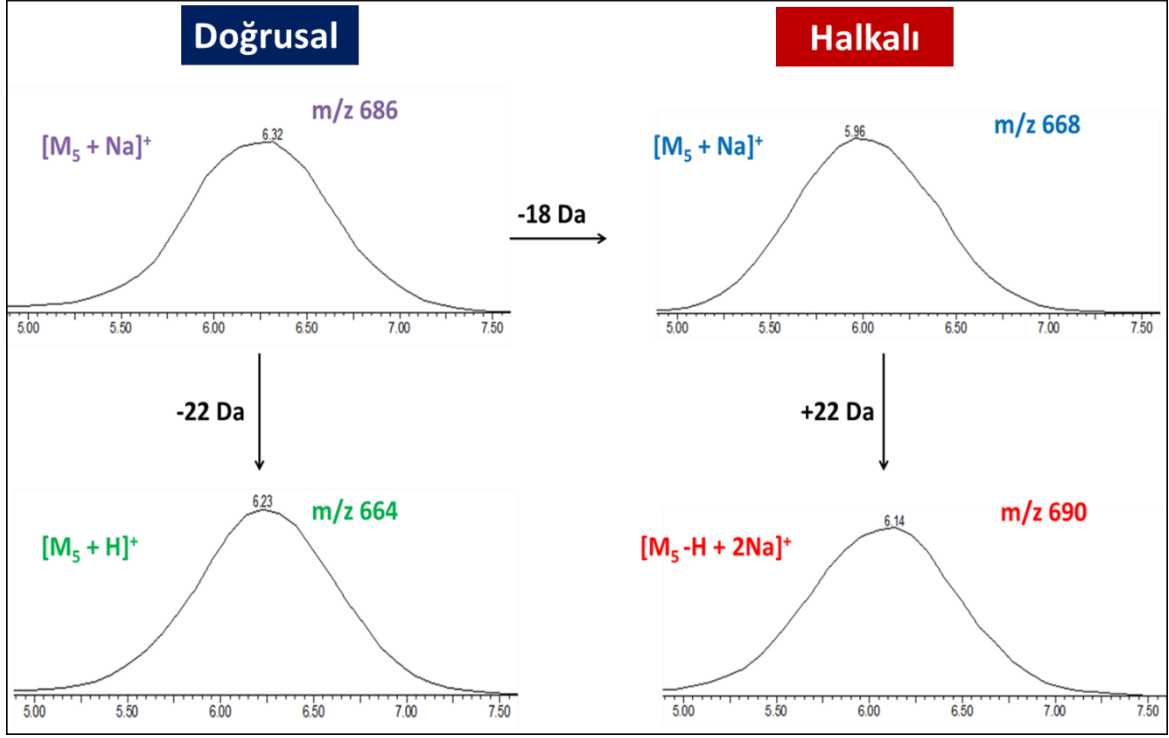
4.2.5. Halkalı Yapıdaki Polielektrolitin Komplekslerinin İncelenmesi

Tez çalışmasında PLL'nin bir başka negatif yüklü polielektrolit olan poli(L-glutamik asit) (PGA) ile birlikte oluşturduğu kompleksler de incelenmiştir. PGA öncelikle SYNAPT HDMS, Q/ToF kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. Bu analizden elde edilen tek yüklü PGA iyonlarının bulunduğu ESI kütle spektrumu Şekil 4.32'de verilmiştir. Analiz edilen PGA örneğinde zincirlerin molekül kütlelerinin 250-1250 Da arasında olduğu tespit edilmiştir. ESI kütle spektrumunda protonlanmış ($[M+H]^+$) ve sodyum ekli ($[M+Na]^+$, $[M-H+2Na]^+$) PGA iyonları gözlenmiştir. Bu iyonların bir kısmının doğrusal olduğu ve H/OH zincir sonu gruplarına sahip oldukları belirlenmiştir. Diğer bir kısmının ise daha kompakt olan halkalı bir yapıda oldukları tespit edilmiştir. Birbirini tekrar eden PGA zincirlerinin sinyalleri arasında bir glutamik asit biriminin kütlesine karşılık gelen 129 Da'luk fark bulunmaktadır.



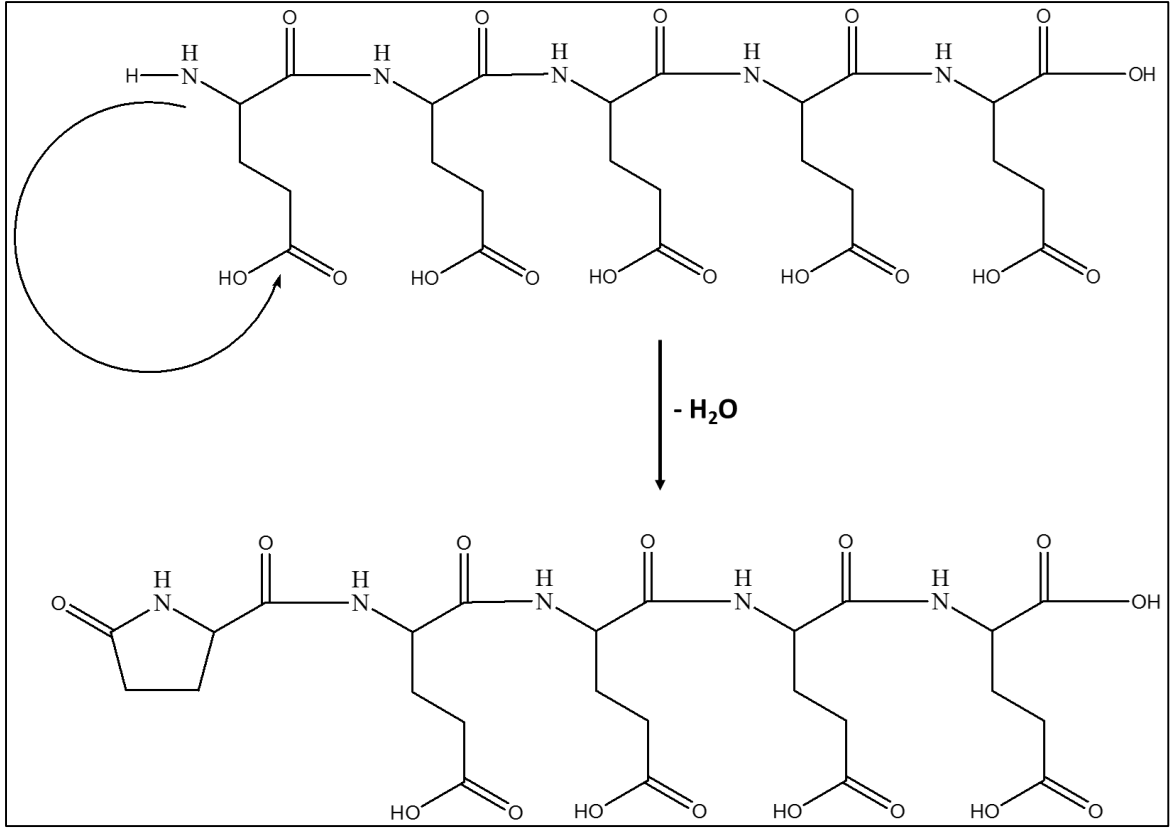
Şekil 4.32. PGA örneğinin ESI-IM-MS analizinde elde edilen 1+ yüklü iyonların gözlemlendiği kütle spektrumu.

Yapılan analizlerde doğrusal PGA iyonlarının beklediği gibi halkalı PGA iyonlarından daha yüksek etkin çarpışma kesidine ve daha uzun sürüklenme zamanlarına sahip oldukları gözlenmiştir. Aynı kütle/yük oranlarına sahip doğrusal ve halkalı PGA iyonlarının sürüklenme zamanları karşılaştırılmış ve değerleri Şekil 4.33'de verilmiştir. Beş adet tekrar eden birim içeren, halkalı PGA'nın $[M-2H+Na]^+$ iyonunun (m/z 690) kendisinden daha küçük, beş birimli ve doğrusal PGA iyonlarından (m/z 664 ve 686) daha kısa sürüklenme zamanlarına sahip olduğu belirlenmiştir. Beş birimli, sodyum ekli ve halkalı PGA iyonunun (m/z 668) da doğrusal yapıdaki aynı zincirin protonlanmış iyonundan (m/z 664) daha kısa sürüklenme zamanına sahip olduğu gözlenmiştir. Şekil 4.33'de verilen bu sonuçlar, PGA zincirlerinin gaz fazında doğrusal ve halkalı olmak üzere farklı konformasyonlarda bulunduğunu göstermektedir.



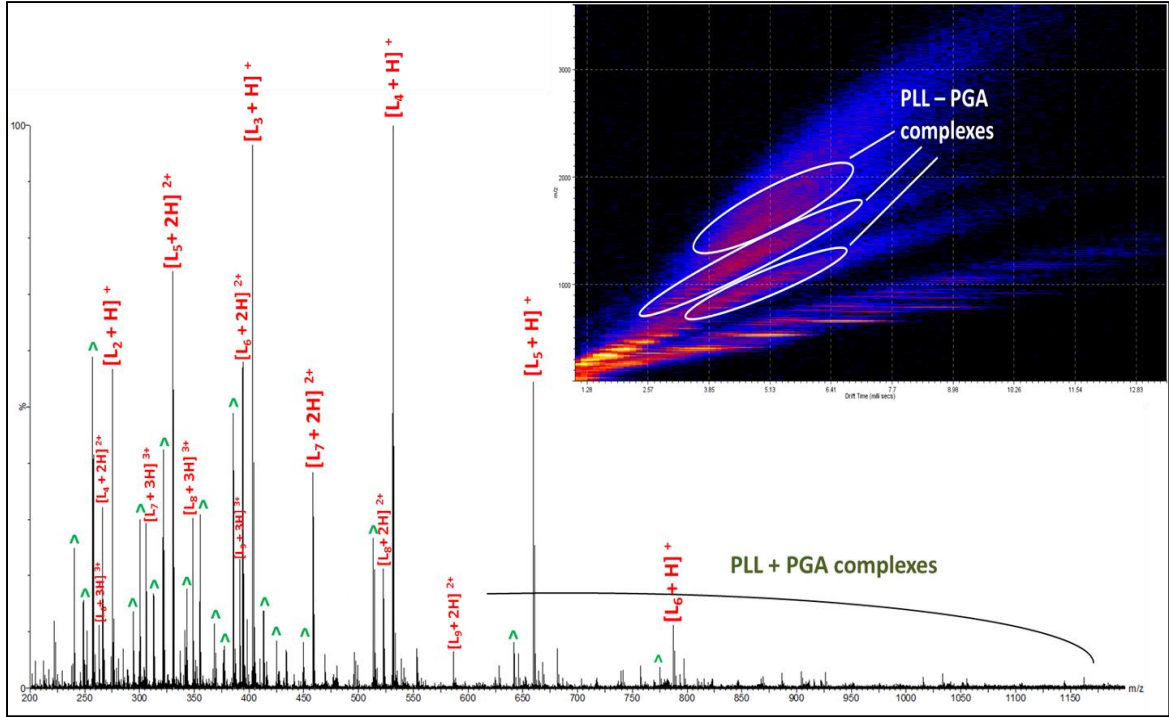
Şekil 4.33. Doğrusal $[M_5+Na]^+$ (m/z 686), $[M_5+H]^+$ (m/z 664) ve halkalı $[M_5+Na]^+$ (m/z 668), $[M_5-H+2Na]^+$ (m/z 690) iyonlarının sürüklenme zamanları.

Aynı sayıda tekrar eden birim içeren doğrusal ve halkalı yapıdaki PGA iyonlarının sürüklenme zamanları arasında küçük farkların olması, bu yapıların etkin çarpışma kesitlerinin birbirlerine çok yakın değerlerde olduğunu göstermektedir. Sürüklenme zamanı verilerine göre, halka yapılarının PGA zincirlerinin küçük bir bölümünde oluştuğu anlaşılmaktadır. Eğer PGA oligomerlerinin zincir sonu grupları arasında meydana gelen bir değişiklik sonrasında zincir yapısının bütünü halkasal bir yapıya dönüşmüş olsaydı, yapıların etkin çarpışma kesitlerinde çok daha belirgin bir azalmanın gözlenmesi gerekirdi. Bu değerlendirmelere göre, şekil 4.34'de gösterildiği gibi, PGA zincirlerinin N-uçlarındaki amin grubunun kararlı beşli halka yapısı oluşturacak şekilde kendisine en yakın karboksilik asit grubuna bağlanmasının daha olası olduğu sonucuna varılmıştır. Bu alanda yapılan çalışmalarda N-uçlarında glutamik asit bulduran peptitlerin bu uçlarında beşli halka yapısının kendiliğinden oluştuğu ifade edilmektedir [226, 227]. Bu oluşumda bir glutamik asit birimi piroglutamik asit grubuna dönüşmektedir. Halkalaşma sonucunda yapının çarpışma etki kesitinde küçük bir azalmanın olması, alınan deneysel sonuçlara göre yapılan yorumları desteklemektedir.



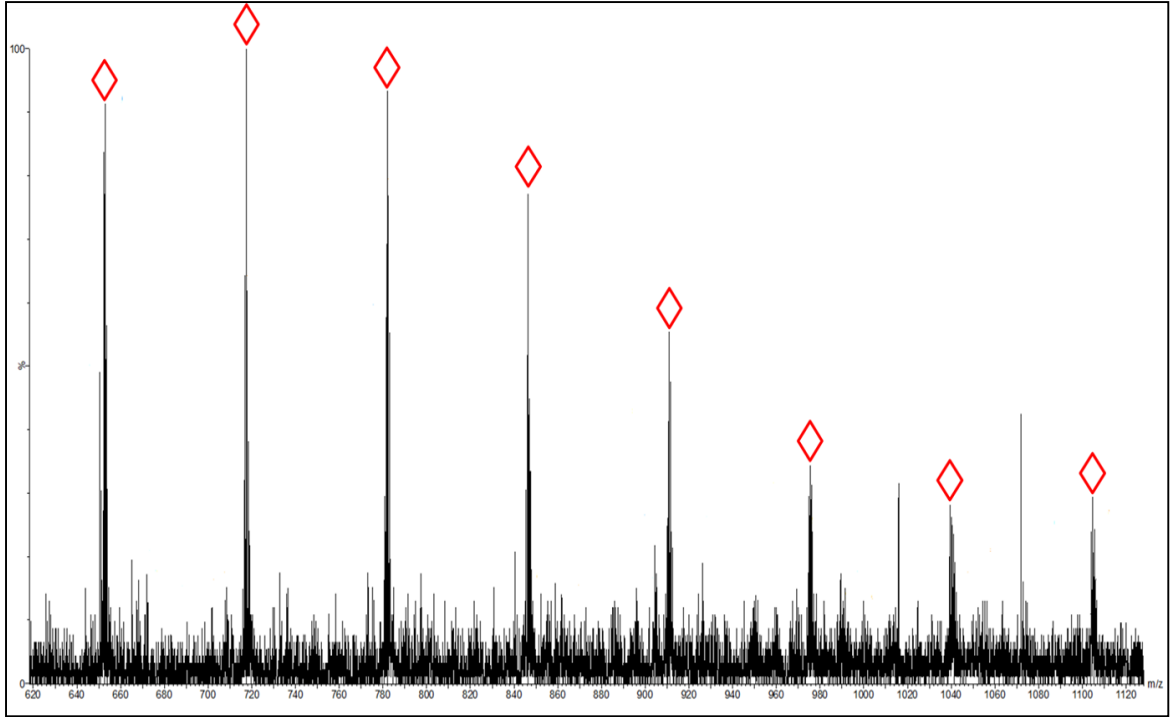
Şekil 4.34. 5 birimli PGA molekülünün zincir sonundaki halkalaşmanın gösterimi.

PLL ve PGA karışımı da ESI-IM-MS ile analiz edilerek bu iki polielektrolitin oluşturdukları kovalent olmayan kompleksler incelenmiştir. Yapılan denemelerde PLL'nin diğer polianyonlarla etkileşimlerinin incelendiği çalışmalarda olduğu gibi karışımdaki molar oran 5:1 (PLL:PGA) olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.35. PLL ve PGA'nın 5:1 (PLL:PGA) mol oranındaki karışımına ait pozitif iyon ESI kütle spektrumu. “^” işareti ile PLL zincirlerinden su ayrılması sonucunda oluşan iyonlar gösterilmektedir. Aynı örneğe ait iki boyutlu ESI-IM-MS grafiği şekil içerisinde ayrıca verilmiştir.

PLL ve PGA'nın karışımları, SYNAPT HDMS, Q/ToF kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. Karışımın pozitif iyon modunda yapılan ESI-IM-MS analizinde elde edilen veride iyonların yük durumlarına göre dört farklı hareketlilik bölgesine ayrıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.35). Kovalent olmayan kompleks iyonlarına karşılık gelen üç bölge, ayrı ayrı beyaz daire içerisine alınarak gösterilmektedir. Tek yüklü iyonları içeren bölgede tek yüklü PLL ve onların yapılarında meydana gelen yüksüz kayıplar sonucunda oluşan iyonlara ait sinyaller bulunmaktadır. Bu analizden elde edilen toplam ESI kütle spektrumunda 1+ ve 2+ yüklü PLL iyonlarına ait sinyallerin baskın oldukları görülmektedir. PLL ve PGA'nın bir araya gelerek oluşturdukları komplekslere ait düşük şiddetli sinyallerin dağılımı da aynı kütle spektrumunda gözlenmiştir (Şekil 4.35).

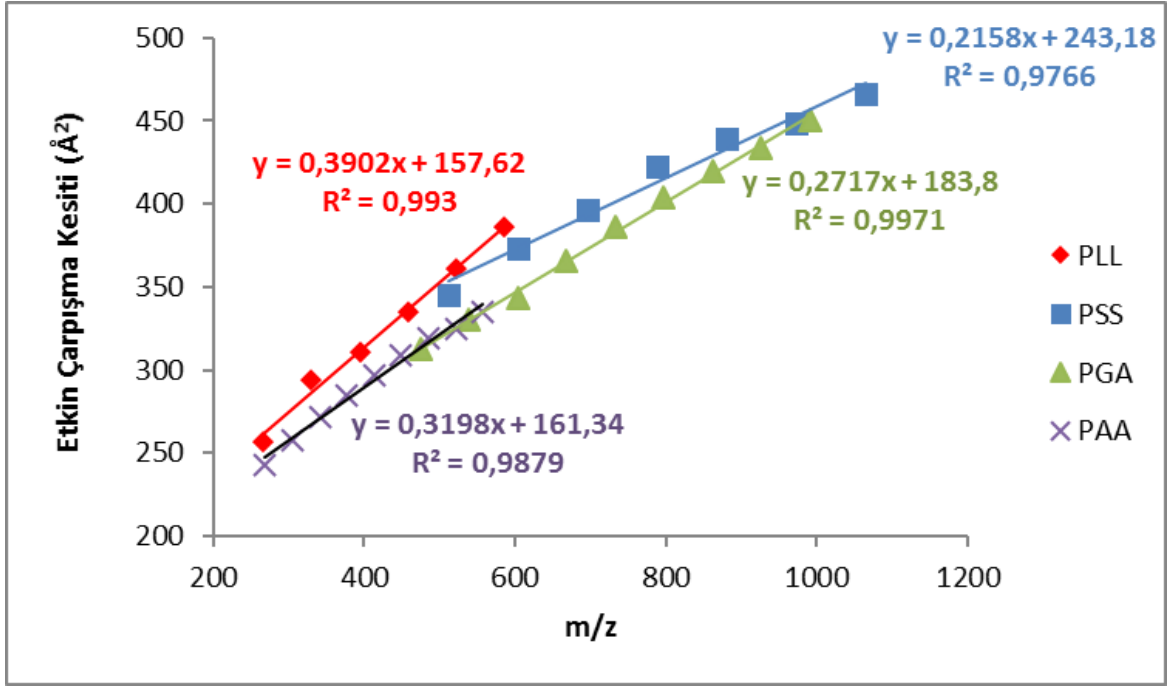


Şekil 4.36. PLL ve PGA'nın 5:1 (PLL:PGA) mol oranındaki karışımına ait pozitif iyon iki boyutlu ESI-IM-MS grafiğindeki 2+ yüklü iyonlara karşılık gelen bölgelerinin kütle spektrumları. "◇" işareti ile PLL'nin halkalı PGA oligomerleri ile yaptığı komplekslere ait sinyaller gösterilmektedir.

PLL-PGA karışımının analizi sonucunda elde edilen iki boyutlu ESI-IM-MS grafiğinde gözlenen 2+ yüklü iyonların bulunduğu bölgeye ait ESI kütle spektrumu Şekil 4.36'da verilmiştir. Bu kütle spektrumunda sadece PLL ile halkalı PGA zincirlerinin oluşturduğu farklı stokiyometrilere ait komplekslerin 2+ yüklü iyonlarına ait sinyaller gözlenmektedir. Bunun yanı sıra, düz zincir halindeki PGA türlerinin PLL zincirleri ile oluşturdukları komplekslere ait sinyaller de çok düşük şiddette gözlenebilmiştir. PGA örneği, tek başına analiz edildiğinde düz zincirli PGA iyonlarının halkalı yapıda olanlara göre çok daha düşük sinyal şiddetine sahip oldukları görülmektedir (Şekil 4.32). Bu verilere göre, PLL zincirleri ile halkalı yapıdaki PGA zincirlerinin oluşturdukları kompleks iyonlarının bağıl bollukları veya iyonlaşma verimlerinin yüksek olması nedeniyle PLL ile düz zincirli PGA türlerinden meydana gelmiş olan kompleks iyonlarını baskıladıkları düşünülmektedir.

4.2.6. Polielektrolit Komplekslerinin CCS Değişimlerinin Kıyaslanması

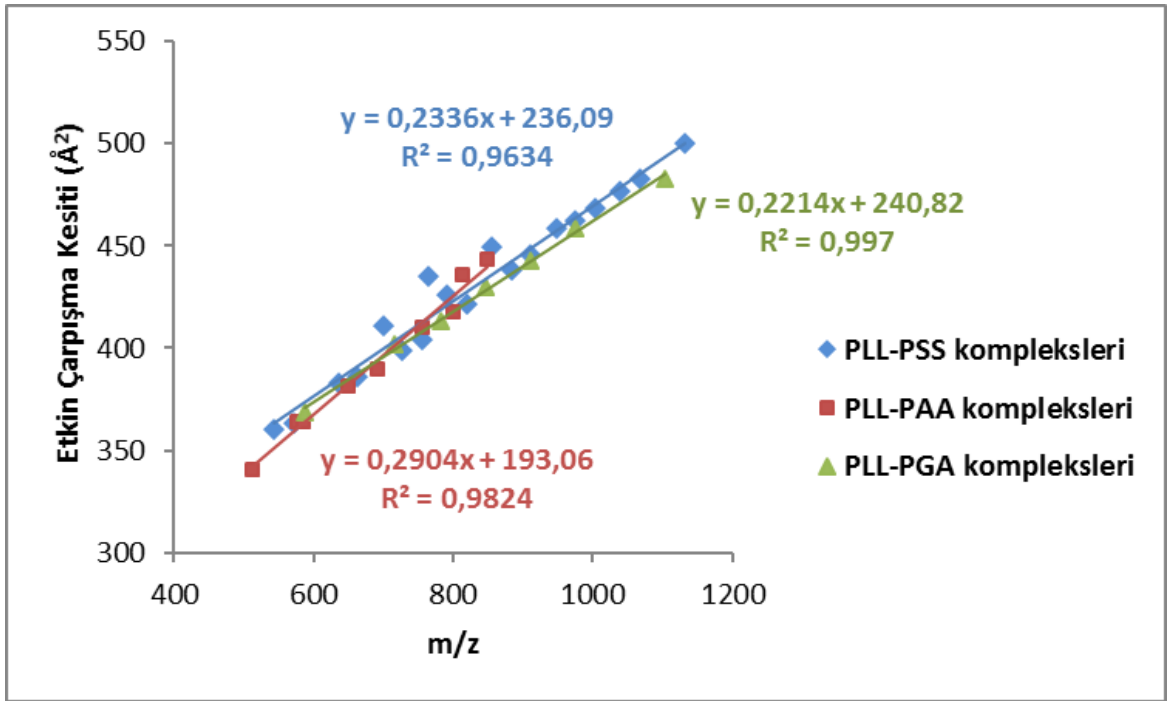
Tez çalışmasında kullanılan, farklı tekrar eden birimlere, zincir sonu gruplarına ve konformasyonel özelliklere sahip olan polielektrolitlerin 2+ yüklü iyonlarının gaz fazında kendi başlarına sahip oldukları CCS değerleri bir araya getirilip kıyaslama yapılmıştır (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. 2+ yüklü polielektrolit iyonlarının deneysel CCS değerlerinin kütle/yük oranına göre değişimi.

Şekil 4.37'deki doğruların eğimlerine göre, polielektrolit iyonlarının gaz fazı konformasyonlarının PLL, PAA, PGA ve PSS sıralamasında giderek daha sıkı hale geldiği görülmektedir. Daha önceki bölümlerde bahsedildiği gibi, PLL zincirleri, uzun alkil zincirlerinin sonunda pozitif yüklü amin grupları bulundurmaktadır. Yapının dışa bakan uç kısımlarında bulunan pozitif yüklü amin grupları, gaz fazında birbirlerini iterek diğerlerine göre daha geniş konformasyona sahip bir yapının oluşumuna neden olmaktadır. Grafikte daha düşük m/z oranının bulunduğu bölgedeki CCS değerlerinin değişimine bakıldığında PAA ve PGA zincirlerinin gaz fazında benzer sıklığa sahip oldukları gözlenmektedir. Fakat daha yüksek molekül ağırlığına sahip, uzun zincirlerin CCS değişimlerine bakıldığında PGA zincirlerine ait verilerin meydana getirdiği doğrunun eğiminin azalması, PGA zincirlerinin gaz fazında daha

sıkı olduğunu göstermektedir. Tez çalışmasında PGA örneğindeki zincirlerin büyük oranda halkalı yapıda oldukları belirlenmiştir. Halkalı PGA iyonlarının gaz fazında düz zincir halindeki PAA iyonlarına göre daha sıkı olduğu sonucu, alınan CCS verileri ile de desteklenmektedir. En büyük molekül ağırlığına sahip tekrar eden birimlerden oluşan PSS zincirlerinin, özellikle yüksek kütle/yük oranlarında, diğer polielektrolitlere göre gaz fazında daha sıkı konformasyona sahip oldukları gözlenmiştir. Önceki bölümde de açıklandığı gibi, PSS zincirlerindeki her tekrar eden birimde bulunan aromatik halkalar arasında meydana gelebilecek π - π etkileşimlerinin yapının gaz fazında daha sıkı bir konformasyona sahip olmasında oldukça etkin ve belirleyici oldukları görülmüştür.



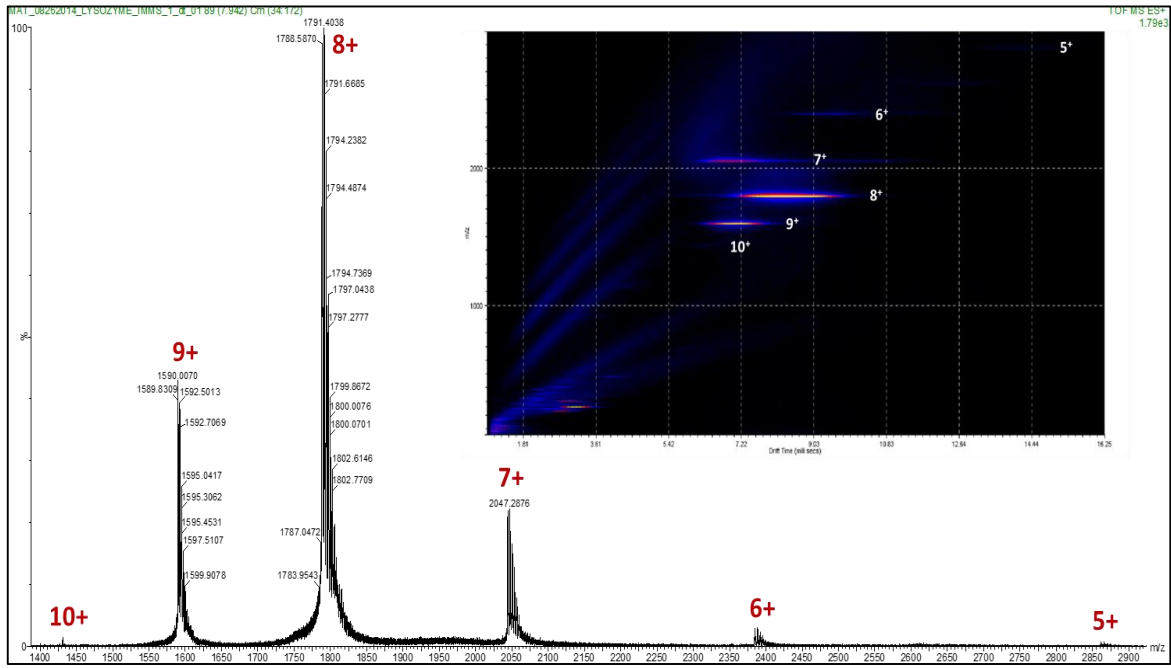
Şekil 4.38. 2+ yüklü kovalent olmayan polielektrolit kompleks iyonlarının deneysel CCS değerlerinin kütle/yük oranına göre değişimi.

Polielektrolit komplekslerinin 2+ yüklü iyonlarının (PLL-PSS, PLL-PAA ve PLL-PGA) CCS değerleri de hesaplanarak gaz fazındaki sıklılıkları karşılaştırılmıştır. 2+ yüklü kovalent olmayan polielektrolit kompleks iyonlarının deneysel CCS değerlerinin kütle/yük oranına göre değişimini gösteren grafik Şekil 4.38'de verilmektedir. Şekil 4.38'deki verilere göre, polielektrolit komplekslerinin gaz fazındaki konformasyonel genişlikleri, PLL-PGA < PLL-PSS < PLL-PAA sırasıyla artmaktadır. PSS zincirleri

tek başınayken en sıkı konformasyona sahip olmalarına rağmen, alınan veriler değerlendirildiğinde PLL-PSS komplekslerinin PLL-PGA komplekslerine göre daha geniş bir konformasyona sahip oldukları görülmüştür. PSS zincirleri tek başınayken tekrar eden birimlerinde bulunan aromatik halkalar arasında meydana gelen π - π etkileşimlerinin PLL ile kompleks oluşturdukları zaman bozulması nedeniyle kompleks yapılarının daha yayvan konformasyonlara sahip oldukları düşünülmektedir. Bu durumda halkalı PGA oligomerlerinin PLL ile meydana getirdikleri komplekslerin gaz fazında daha sıkı konformasyonlara sahip oldukları gözlenmiştir. PLL-PGA komplekslerinin özellikle yüksek molekül ağırlığına sahip bölgelerde PLL-PSS komplekslerine göre daha düşük CCS değerlerine sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.38). Bu sonuç, kompleksi meydana getiren halkalı PGA zincirlerinin varlığına bağlı olarak PLL-PGA komplekslerinin gaz fazında diğerlerine göre daha sıkı yapıda olduklarını göstermektedir. Halkalı yapıdaki PGA zincirleri, dahil oldukları kompleks yapılarının daha sıkı konformasyonda bulunabilmelerini sağlamaktadır. Bu komplekslerin yanında PLL-PAA kompleksleri için oligomer artışı ile etkin çarpışma kesitlerinde daha büyük bir artış gözlenmiştir. Bu sonuca göre, PLL ve PAA oligomerlerinin tek başınayken sahip oldukları konformasyonel özellikleri, bir araya gelerek oluşturdukları kompleks yapılarında da korudukları ifade edilebilir.

4.3. Protein-Polielektrolit Etkileşiminin İyon Hareketliliği-Kütle Spektrometrisi ile İzlenmesi

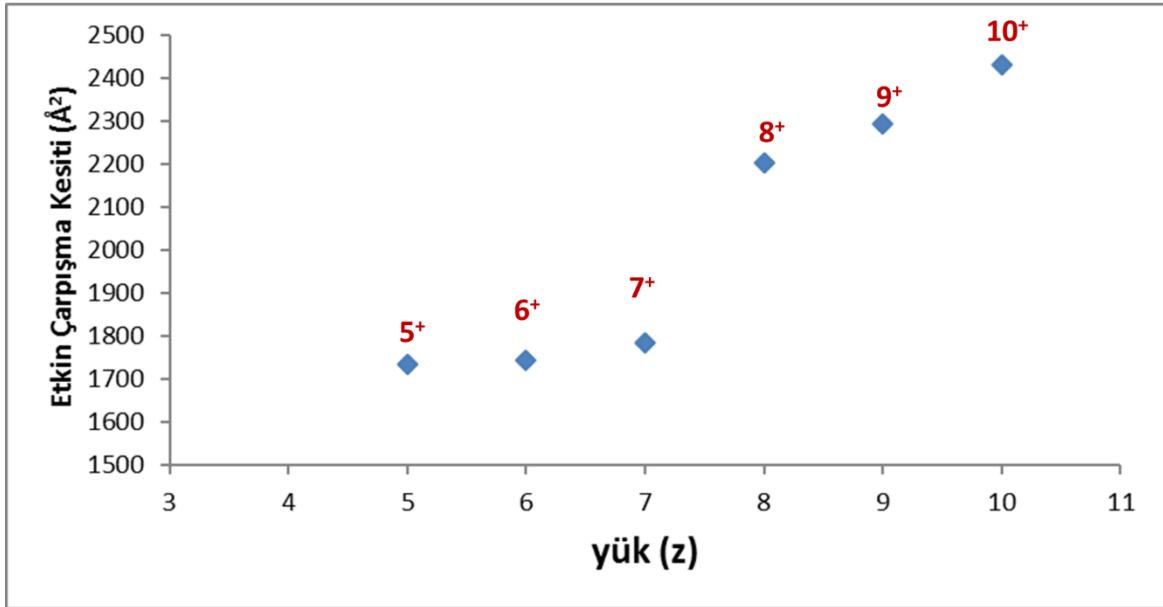
Protein-polielektrolit etkileşimleri, bazik bir protein olan lizozim (pI: 11.35)[228] ile birçok biyoyumlu malzeme üretimi uygulamasında polielektrolit olarak kullanılan polistiren sülfonik asit polianyonu model alınarak izlenmiştir. Standart lizozim proteini (tavuk yumurtası beyazından) ESI-IM-MS cihazı ile analiz edilmiştir. Kovalent olmayan etkileşimleri korumak amacıyla, analizlerde elektrosprey iyonlaştırma ve kütle spektrometrik analiz parametreleri olabildiğince yumuşak değerlerde tutulmaya çalışılmıştır. Lizozim proteini, 10 mM amonyum asetat çözeltisinde (20 μ M protein derişimi) çözülmüştür. Doğrudan enjeksiyon öncesinde protein çözeltisi, kendisinin hacmine göre %10'u oranında metanol ile karıştırılmıştır.



Şekil 4.39. Lizozimin pozitif iyon ESI kütle spektrumu. Aynı örneğe ait iki boyutlu ESI-IM-MS grafiği şekil içerisinde ayrıca verilmiştir.

IM-MS analizi sonucunda elde edilen kütle spektrumunda proteinin 5+ / 10+ aralığında yük değerlerine sahip pozitif yüklü iyonlarının sinyalleri gözlenmiştir (Şekil 4.39). Bu iyonların iyon hareketliliği bölümündeki sürüklenme zamanlarına göre elde edilen iki boyutlu ESI-IM-MS grafiğinde farklı yüklere sahip iyonların sinyallerinin oluşturduğu farklı renklerdeki bölgeler gözlenmektedir (Şekli 4.39). IM-MS analizlerinde iyonların yük değerlerinin artmasıyla sürüklenme tüpünde geçirdikleri zamanın kısaldığı bilinmektedir. Ancak, şekil 4.39'da verilen iki boyutlu ESI-IM-MS grafiğinde 8+ yüküne sahip iyonun sürüklenme zamanı değerinin genel olarak azalma eğiliminde olan sürüklenme zamanı değişimi eğiliminden saptığı gözlenmektedir. Bu veri, lizozim proteininin 8+ yüke sahip iyonunun konformasyonel olarak kendisinden daha az yüke sahip iyonlara göre daha geniş bir yapıda olduğunu göstermektedir. Bu sonuca göre, lizozim proteininin 7+ yüke sahip olana kadar yapısındaki yük fazlalığını dengeleyebildiği görülmektedir. Fakat lizozim, 8+ ve daha fazla yüke sahip olduğunda bünyesindeki fazla yükü kararlı kılamamasından dolayı, yapısındaki itme kuvvetlerinin artması sonucunda yapısının açılmasıyla birlikte daha yayvan ve geniş bir konformasyona sahip olmuştur. Yük artışına bağlı olarak yapıda oluşan itişmeler ile birlikte yapısında meydana gelen

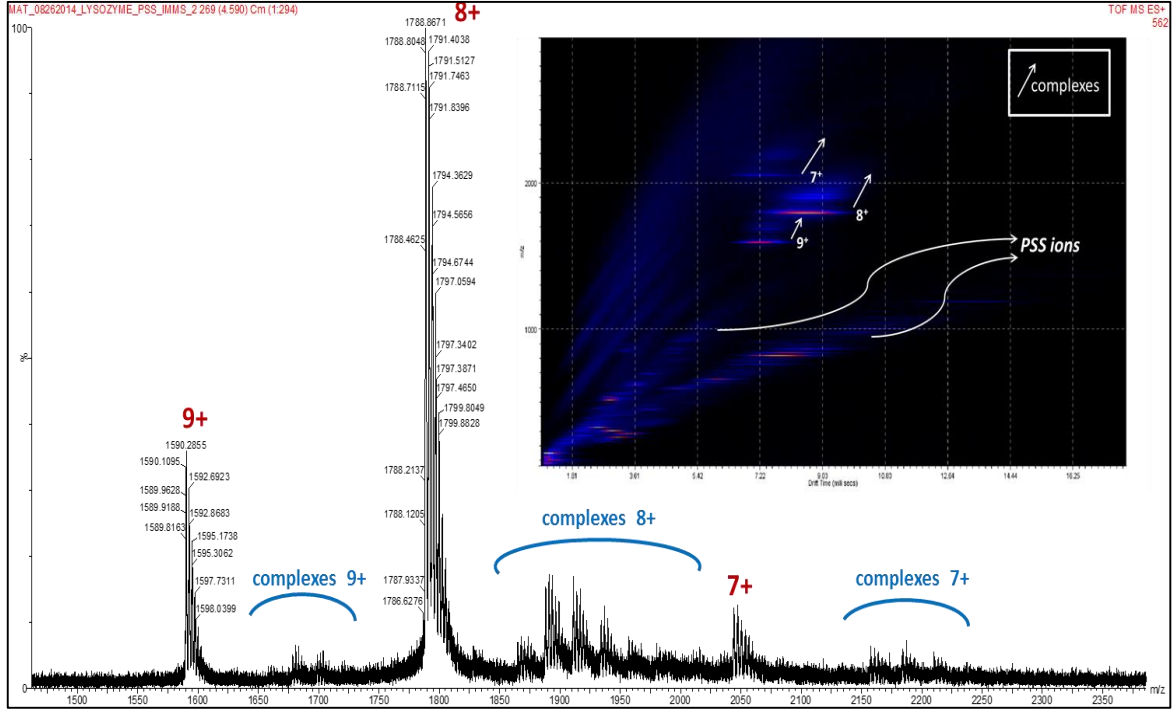
konformasyon değişimi sonucunda genişleyen protein yapısının CCS değerinin değişimi hesaplanmıştır. Buna göre oluşturulan grafikte lizozimin 8+ ve daha fazla yüke sahip iyonlarının CCS değerlerinin daha az yüke sahip iyonlara göre açık bir Şekilde yüksek oldukları görülmektedir (Şekil 4.40). Bu sonucu destekleyen verileri bulunduran yayınlarda lizozim proteininin gaz fazında 8+ ve daha fazla net yük değerlerine sahip olduğu halinde doğal konformasyonunun bozularak açıldığı ifade edilmektedir. Bu yayınlarda lizozimin gaz fazında 8+ yükten daha düşük yük değerlerine sahip olduğu durumlarda ise sıkı yapısını koruduğu belirtilmiştir [229, 230].



Şekil 4.40. Lizozim proteininin farklı yüke sahip iyonlarının deneysel CCS değerlerinin değişimi.

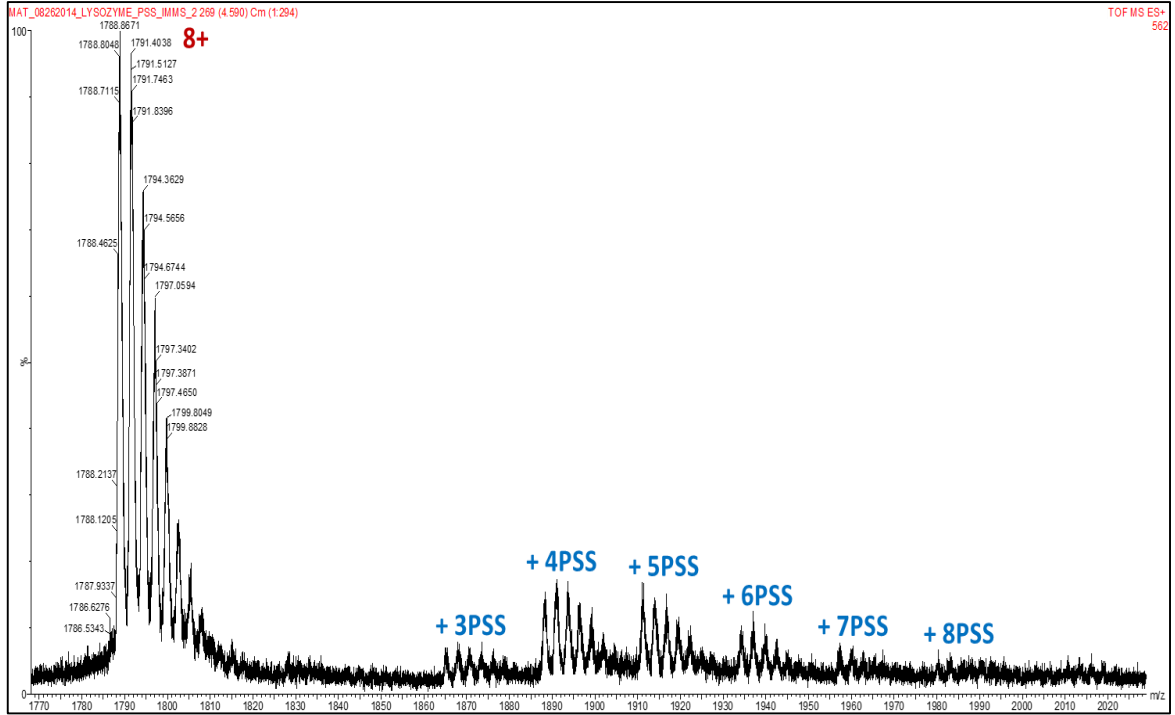
Lizozim proteini, PSS polianyonu ile farklı molar oranlarda karıştırılarak da analiz edilmiştir. Yapılan IM-MS analizlerinde bazik bir protein olan lizozimin oldukça asidik bir polianyon olan PSS ile gaz fazındaki etkileşimlerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Oluşturulan karışımlar analiz edildiğinde lizozim ile PSS'nin 7+ , 8+ ve 9+ yüklü komplekslerinin iyonlarına ait sinyaller gözlenmiştir (Şekil 4.41). Komplekslerin analizinden elde edilen iki boyutlu ESI-IM-MS grafikleri incelendiğinde, lizozim-PSS komplekslerinin lizozimin tek başına analiz edildiğinde farklı yüklere sahip iyonlarının oluşturdukları sürüklenme zamanı eğilimini gösterdikleri görülmektedir (Şekil 4.41). Bu grafiklerde lizozim yapısına farklı sayıda PSS molekülünün

katılmasıyla oluşan iyonların varlığını gösteren sinyaller ve renkli bölgeler de gözlenmektedir.



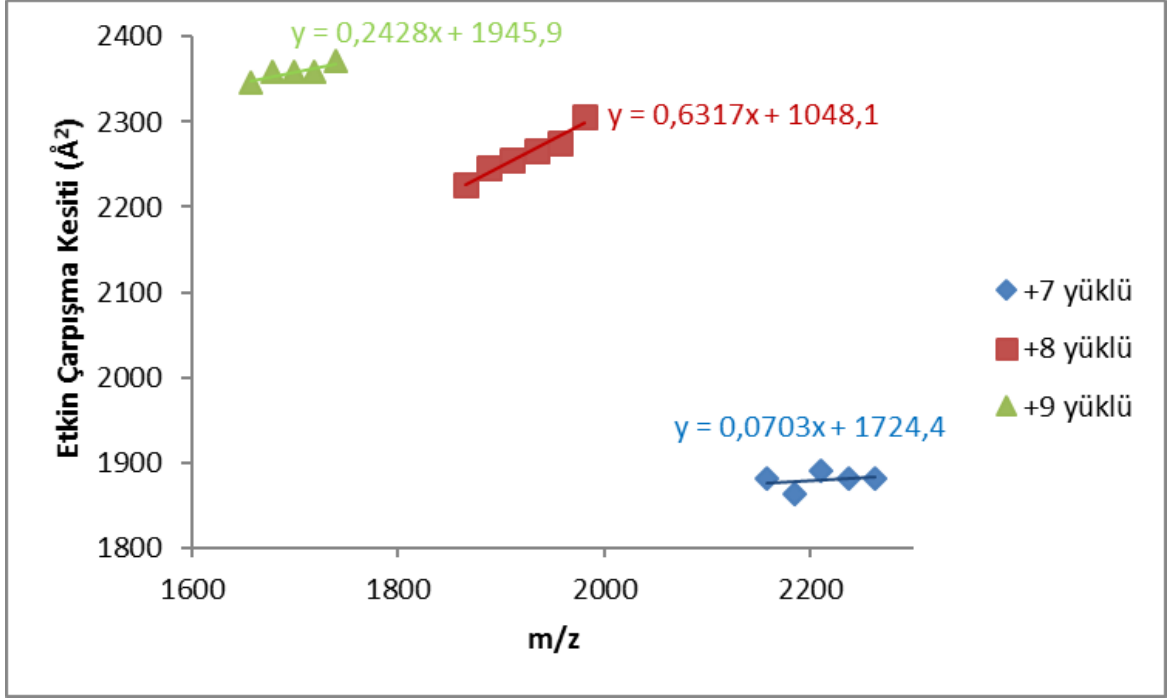
Şekil 4.41. Lizozim ve PSS karışımına ait pozitif iyon ESI kütle spektrumu. Aynı örneğe ait 2D ESI-IM-MS grafiği şekil içerisinde ayrıca verilmiştir.

Farklı yüklere sahip lizozim-PSS komplekslerinin sinyallerine karşılık gelen bölgeler ayrı ayrı incelenmiştir. Bu bölgelere ait ESI kütle spektrumları değerlendirildiğinde protein ile etkileşen PSS moleküllerinin zincir uzunlukları belirlenebilmektedir. Bu değerlendirmeye göre alınan bir ESI kütle spektrumunda 8+ yüklü lizozim proteinine ve aynı yüke sahip farklı sayıda PSS molekülü içeren lizozim-PSS komplekslerine ait sinyaller gözlenmektedir (Şekil 4.42). Yapılan IM-MS analizlerinde elde edilen kütle spektrumlarında gözlenen tüm lizozim-PSS komplekslerinin iyonlarına ait sinyaller bu şekilde incelenerek değerlendirilmiştir.



Şekil 4.42. Lizozim ve PSS karışımına ait pozitif iyon ESI kütle spektrumunun 8+ yüklü lizozim ve lizozim-PSS komplekslerine ait iyonların gözlemlendiği bölümü. Protein ile etkileşen PSS zincirlerinin sayısı sinyaller üzerinde ayrıca belirtilmektedir.

Tez çalışmasında lizozimin PSS ile birlikte meydana getirdikleri, 7+, 8+ ve 9+ yüklü komplekslerinin yapılarında bulunan PSS molekülü sayılarına göre CCS değerlerindeki değişimler incelenmiştir. Şekil 4.43’de verilen grafikte görüldüğü gibi, 8+ ve 9+ yüklü kompleksler için kompleks yapısındaki PSS miktarının artması, toplam yapının CCS değerini bariz olarak arttırmaktadır. Fakat PSS miktarının artması, 7+ yüklü lizozim-PSS kompleksinin CCS değerinde önemli bir artışı meydana getirememektedir. Bu durum, lizozim proteininin gaz fazında sahip olduğu konformasyonel özellikleri ile uyumluluk göstermektedir. Lizozimin 8+ ve 9+ yüklü iyonları daha geniş ve açık bir konformasyona sahip olduğundan dolayı, yapısına eklenen PSS zincirleri, CCS değerlerini serbest bir şekilde arttırabilmektedir. Ancak, daha sıkı ve kapalı bir yapıya sahip olan 7+ yüklü lizozim iyonunun yapısına PSS zincirlerinin katılması sonucunda protein yapısının yük artışına gösterdiği dirence bağlı olarak CCS değerinin artışını engellediği görülmektedir.



Şekil 4.43. Kovalent olmayan, farklı yüke sahip lizozim-PSS kompleks iyonlarının deneysel CCS değerlerinin yapılarındaki PSS zincir uzunluklarına bağlı olarak kütle/yük oranına göre değişimleri.

Protein-polielektrolit komplekslerinin ESI-IM-MS sistemi ile analizlerinden elde edilen verilere göre, kovalent olmayan komplekslerin oluşumu sonucunda yapıya negatif yük yoğunluğu fazla olan bir polianyonun eklenmesiyle proteinin yük dengesinde meydana gelen değişikliğin lizozim yapısının bozularak açıldığı yük değerini (8+) değiştirmedeği görülmüştür. Alınan veriler değerlendirildiğinde, bazik özelliğe sahip lizozim proteini ile PSS gibi bir polianyonun etkileşimleri sonucunda oluşturdukları komplekslerin konformasyonlarının proteinin gaz fazında sahip olduğu konformasyon ve yük özelliklerine bağlı oldukları belirlenmiştir.

5. SONUÇLAR

- Standart poli(L-Lizin) (PLL) örneği, çalışmaların başlangıcında UltraFlex III MALDI-ToF/ToF kütle spektrometresiyle analiz edilmiştir. Pozitif iyon modunda yapılan MALDI-MS analizi sonucunda ardışık sinyaller arasındaki farkın tekrar eden bir lizin biriminin kütesine karşılık gelen 128 Da olduğu tespit edilmiştir. Zincirlerin her birinde 18 Da molekül ağırlığına karşılık gelen aynı zincir sonu gruplarının $[H-(C_6H_{12}N_2O)_n-OH + H]^+$ bulunduğu belirlenmiştir.
- Poli(stiren sülfonik asit) (PSS) örneği, MALDI-MS ile hem pozitif hem de negatif iyon modunda analiz edilmiştir. Pozitif iyon modunda yapılan MALDI-MS analizlerinde PSS zincirlerine ait sinyal gözlenememiştir. PSS örneği, negatif iyon modunda analiz edildiğinde elde edilen kütle spektrumunda $C_4H_9^-$ ve $-H$ zincir sonu gruplarına sahip, deprotonlanmış $[C_4H_9-(C_8H_8SO_3)_n-H - H]^-$ iyonlarına ait sinyaller gözlenmiştir.
- PLL örneği, kompleks oluşumlarının hangi modda daha iyi izlenebileceğine karar verebilmek için, ayrıca negatif iyon modunda da analiz edilmiştir. Negatif iyon modundaki MALDI-MS analizinden elde edilen kütle spektrumunda PLL zincirlerinin deprotonlanmış iyonlarına $[M-H]^-$ ait sinyaller gözlenmiştir.
- PLL ve PSS'nin çeşitli mol oranlarındaki karışımları, MALDI-MS ile pozitif ve negatif iyon modunda analiz edilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda bu türlerin oluşturdukları kovalent olmayan komplekslere ait uygun şiddete sahip sinyaller, negatif iyon modunda gözlenmiştir.
- PLL ve PSS karışımlarının MALDI-MS analizlerinde elde edilen kütle spektrumlarında farklı stokiyometrik oranlara sahip kovalent olmayan komplekslere ait sinyaller S_4+L_6 / S_6+L_{12} aralığında ve farklı şiddet değerlerinde gözlenmiştir.
- MALDI-MS analizlerinde gözlenen kovalent olmayan komplekslerin stokiyometrik oranlarının ve yüklenebilir gruplarının sayısının kompleksi oluşturan türlerin iyonlaşma verimleri ile ilişkili olduğu görülmüştür.
- MALDI-MS analizlerinde gözlenen yüksek şiddetli kovalent olmayan kompleks iyonlarının tümüne yüksek enerjili parçalama işlemi (LIFT)

uygulanmıştır. Bu analizlerden elde edilen MALDI-MS/MS spektrumları ile PLL ve PSS'nin bir araya gelerek oluşturdukları kovalent olmayan komplekslerin varlığı ve stokiyometrilere doğrulanmıştır.

- İyon hareketliliği-kütle spektrometresi (IM-MS) sistemi kullanılarak PLL örneği analiz edilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen ESI-IM-MS grafiğindeki farklı bölgelerin 1+, 2+, 3+ ve 4+ yüklü PLL iyonlarına ait serilerin sinyallerine karşılık geldiği belirlenmiştir. Polimer örneklerinin ESI-MS analizlerinde oluşan farklı yüklere sahip iyon serilerinin birbirinden ayrılabilmesi, karmaşık kütle spektrumunun sadeleştirilerek deneysel sonuçların değerlendirilmesini kolaylaştırmıştır. Farklı bölgelerden elde edilen kütle spektrometrik verilerin tümü, zincir sonu grupların ve tekrar eden birimlerin kütlesi açısından uyumluluk göstermektedir.
- PLL ve PSS karışımları da IM-MS cihazı ile analiz edilmiştir. PLL ve PSS karışımlarının pozitif iyon modunda yapılan iki boyutlu ESI-IM-MS analizinde elde edilen iyon hareketliliği grafiğinde iyonların yüklerine göre dört farklı hareketlilik bölgesine dağılmış olduğu gözlenmiştir. Bu bölgelerden üçünde kovalent olmayan komplekslerin 2+, 3+ ve 4+ yüklü iyonlarına ait sinyallerin bulunduğu belirlenmiştir. İki boyutlu ESI-IM-MS grafiğinde 1+ yüklü iyonların yer aldığı bölgede ise tek yüklü PLL zincirlerinin ve bunlara ait yüksüz kayıplar sonucunda oluşan iyonların ($[M+H-H_2O]^+$, $[M+H-NH_3]^+$) bulunduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarda PLL ve PSS'ye ait 2+, 3+ ve 4+ yüklü, kovalent olmayan kompleks iyonları sırasıyla S_{2+L_5} / S_{10+L_7} , S_{3+L_6} / S_{11+L_9} ve $S_{8+L_{16}} / S_{14+L_{16}}$ stokiyometrik oran aralıklarında gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, stokiyometrik olarak PSS birimlerine oranla daha fazla oranda PLL içeren kompleks birimlerinin pozitif iyon modunda daha yüksek sinyal şiddetine ve iyon kararlılığına sahip oldukları görülmüştür.
- PLL ve PSS'nin kovalent olmayan kompleksleri ESI-IM-MS sistemi kullanılarak negatif iyon modunda da analiz edilmiştir. Kütle spektrometrik analiz sonuçlarına göre, negatif iyon modunda elde edilen iyonlara ait toplam sinyal şiddetlerinin, pozitif iyon modunda elde edilen toplam sinyal şiddetinden düşük olduğu görülmüştür.
- PLL-PSS karışımı, ESI-IM-MS ile negatif iyon modunda analiz edildiğinde elde edilen iki boyutlu ESI-IM-MS grafiğinde yüklerine göre üç farklı iyon grubuna karşılık gelen bölgeler gözlenmiştir. Bu bölgelerden ikisinin 2- ve 3-

yüklü kovalent olmayan kompleks iyonlarına karşılık geldiği belirlenmiştir. 2- ve 3- yüklü kompleks iyonları sırasıyla, S_4+L_3 / S_7+L_8 , ve $S_6+L_4 / S_{12}+L_7$ stokiyometrik oran aralıklarında gözlenmiştir. Negatif iyon modunda, stokiyometrik olarak PLL'ye oranla daha fazla PSS içeren kompleks birimlerinin daha yüksek sinyal şiddetine ve iyon kararlılığına sahip oldukları görülmüştür.

- Pozitif ve negatif iyon modlarında yapılan kütle spektrometrik analizlerde gözlenen kompleks iyonlarının çoğu, 30-48 eV aralığında çarpışma enerjisi uygulanarak gaz fazında parçalanmıştır. Yapılan CAD çalışmalarında elde edilen tüm ESI MS/MS spektrumlarında pozitif ve negatif yüklü kompleks iyonlarının stokiyometrilere doğrulanmıştır.
- Pozitif ve negatif yüklü kompleks iyonlarının parçalanma verimliliklerini kıyaslayan eğrilere göre aynı stokiyometrik orana sahip pozitif kompleks iyonlarının, negatif kompleks iyonlarına kıyasla gaz fazında daha kararlı oldukları belirlenmiştir.
- Parçalanma verimliliği grafikleri oluşturularak pozitif ve negatif yüklü PLL-PSS kompleks iyonlarının gaz fazı kararlılıkları, stokiyometrilere farklılıklarına göre de değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre, kompleks iyonlarının gaz fazında uygun net yüke sahip olabilmeleri ve bileşenleri arasında daha fazla sayıda etkileşimin meydana gelebilmesi gibi durumlara bağlı olarak gaz fazı kararlılıklarının etkilendiği gözlenmiştir.
- Polialanin oligomerlerinin ve standart proteinlerin deneysel sürüklenme zamanları ve standart CCS değerleri kullanılarak aynı koşullarda analiz edilen türlerin sürüklenme zamanı verilerinden CCS değerleri hesaplanmıştır.
- Deneysel olarak hesaplanan CCS değerlerine göre, PSS zincirlerinin gaz fazında PLL zincirlerine göre daha sıkı konformasyona sahip oldukları belirlenmiştir. PSS zincirlerinin yapılarında bulunan aromatik halkalar arasında meydana gelebilecek π - π etkileşimleri sayesinde gaz fazında PLL zincirlerine göre daha sıkı bir yapıya sahip olacağı öngörülmüştür. Bunun yanı sıra, PLL zincirlerinin tekrar eden birimlerinin her birinde uzun alkil zinciri sonunda pozitif yüklü amin gruplarının serbest durumda birbirlerini iterek yapının sıkılaşmasını engelleyebileceği düşünülmektedir.

- PLL ve PSS polielektrolitlerinin gaz fazında meydana getirdikleri komplekslerin CCS değerleri de deneysel sonuçlara göre hesaplanmıştır. Daha yüksek PLL / PSS oranına sahip komplekslerin genel değişim eğiliminden saptıkları gözlenmiştir. Alınan verilere göre, PLL ve PSS'nin gaz fazında sahip oldukları konformasyonu, meydana getirdikleri komplekslerin konformasyonlarına da yansıttıkları görülmüştür.
- PLL-PSS komplekslerinin deneysel CCS değerlerinin doğrulanması için aynı m/z oranına ve yapıya sahip kompleks iyonlarının teorik CCS değerleri hesaplanmıştır. Kompleksler için farklı etkin çarpışma kesiti yaklaşımlarıyla hesaplanan teorik CCS değerlerinin m/z oranına göre değişiminin deneysel olarak belirlenen CCS değerlerinin m/z oranına göre değişimiyle aynı eğilime sahip olduğu görülmüştür.
- Kütle/yük oranına göre CCS değerlerinin değişim eğiliminin deneysel ve teorik hesaplamalar için benzer olması, deneysel CCS değerlerinin doğru olarak hesaplandığını ve bu verilerin yapıların gaz fazı konformasyonlarının değerlendirilmesinde kullanılabileceğini göstermiştir.
- Poli(akrilik asit) örneği, ESI-IM-MS cihazı ile analiz edildiğinde elde edilen kütle spektrumunda farklı zincir sonu gruplarına sahip altı farklı iyon serisine (A, B, C, D, X ve Y) ait sinyaller gözlenmiştir.
- PLL ve PAA karışımının pozitif iyon modundaki iki boyutlu ESI-IM-MS analizinde bu polielektrolitlerin komplekslerine ait sinyaller gözlenmiştir. Gözlenen komplekslerin stokiyometrilere, 2+ yüklü iyonlar için $A_4+L_4 / A_{15}+L_5$, 3+ yüklü iyonlar için $A_5+L_7 / A_{20}+L_7$ aralığında gözlenmiştir. ESI-IM-MS analizinde 4+ yüklü kompleks iyonlarının varlığı da tespit edilmiştir. Ancak elde edilen kütle spektrumunda komplekslere ait sinyallerin şiddetlerinin çok düşük olduğu görülmüştür. PLL-PAA kompleks iyonlarının stokiyometrilere gaz fazındaki yük değerleri ile ilişkili olmadığı gözlenmiştir.
- PLL-PAA komplekslerine ait ESI kütle spektrumu, kompleksleri oluşturan PAA serilerinin dağılımı açısından incelendiğinde PAA'nın A, B ve C serilerini içeren PLL-PAA komplekslerine ait üç farklı sinyal dağılımı bulunduğu belirlenmiştir. Alınan kütle spektrometrik verilerde PAA örneğinin tek başına analizinde varlıkları tespit edilen D, X ve Y serilerinin PLL ile kompleks oluşturmadıkları gözlenmiştir. Buna göre, PLL ile PAA arasındaki kompleks

oluşumunun gaz fazında D, X ve Y serilerinin meydana gelmesini engellediği belirlenmiştir. Bu veriler aynı zamanda, A, B ve C serilerinin çözelti fazında da bulunduğunu; D, X ve Y serilerinin ise sadece gaz fazında oluştuğunu öne süren değerlendirmeleri de desteklemektedir[222].

- PAA-PLL kompleks iyonlarının farklı PAA serileri içeren gruplarının CCS değerleri, gaz fazındaki büyüklük özelliklerinin karşılaştırılması açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, PAA serilerinin zincir sonu gruplarının büyüklüklerinin PLL ile oluşturdukları kompleks iyonlarının konformasyonuna etki ettiğini göstermektedir. Kompleksi oluşturan türlerin zincir sonu gruplarının büyük olması, gaz fazındaki kompleksin küçük bir hacme sıkışmasını engellemektedir. Küçük zincir sonu gruplarına sahip olan türlerin oluşturduğu kompleks iyonlarının ise daha küçük hacme sıkışabilmiş durumda oldukları görülmüştür.
- Poli(L-glutamik asit) (PGA), SYNAPT HDMS kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. Sinyalleri gözlenen iyonların bir kısmının doğrusal olduğu ve H/OH zincir sonu gruplarına sahip oldukları belirlenmiştir. Diğer bir kısmının ise halkalı yapıda oldukları tespit edilmiştir.
- PLL ve PGA karışımı da ESI-IM-MS ile analiz edilerek bu iki polielektrolitin oluşturdukları kovalent olmayan kompleksler incelenmiştir. Elde edilen kütle spektrumlarında sadece PLL ile halkalı PGA zincirlerinin oluşturduğu farklı stokiyometrilere ait komplekslerinin 2+ yüklü iyonlarına ait sinyaller elde edilmiştir. Bunun yanı sıra, düz zincir halindeki PGA türlerinin de PLL zincirleri ile oluşturdukları komplekslere ait sinyaller çok düşük şiddette gözlenebilmiştir.
- Tez çalışmasında kullanılan, farklı tekrar eden birimlere, zincir sonu gruplara ve konformasyonel özelliklere sahip olan polielektrolitlerin 2+ yüklü iyonlarının gaz fazında kendi başlarına sahip oldukları CCS değerleri hesaplanarak birbirleriyle kıyaslanmıştır. Alınan verilere göre, polielektrolit iyonlarının gaz fazı konformasyonlarının PLL > PAA > PGA > PSS sıralamasında giderek daha sıkı hale geldiği görülmüştür. Polielektrolitlerin gaz fazındaki konformasyonlarının tekrar eden birimlerindeki ve zincir sonu gruplarındaki fonksiyonel gruplara bağlı olarak meydana gelen kovalent olmayan etkileşimlere göre değişiklik gösterdiği belirlenmiştir.

- Polielektrolit komplekslerinin 2+ yüklü iyonlarının CCS değerleri de hesaplanarak gaz fazındaki sıklıkları karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilere göre, polielektrolit komplekslerinin gaz fazındaki konformasyonel genişliklerinin, PLL-PGA < PLL-PSS < PLL-PAA sırasıyla arttığı belirlenmiştir. Komplekslerin CCS değerlerinin kıyaslanması sonucunda, yüklü grupların arasındaki kovalent olmayan etkileşimlerin oluşması veya bozulması gibi durumların kompleks iyonlarının konformasyonlarındaki farklılıkları meydana getirebildikleri görülmüştür.
- Lizozim proteini IM-MS cihazı ile analiz edilmiştir. Verilere göre, 8+ yüküne sahip lizozim iyonunun sürüklenme zamanı değerinin genel olarak azalma eğiliminde olan sürüklenme zamanı değişimi eğiliminden saptığı gözlenmiştir. Lizozimin 8+ ve daha fazla yüke sahip iyonlarının CCS değerlerinin daha az yüke sahip iyonlara göre açık bir şekilde yüksek oldukları görülmüş ve buna göre fazla yük değerine sahip protein iyonlarının doğal konformasyonlarının bozulması sonucunda daha geniş bir yapıda oldukları belirlenmiştir.
- Lizozim proteini, PSS polianyonu ile farklı molar oranlarda karıştırılarak da analiz edilmiştir. Oluşturulan karışımlar analiz edildiğinde lizozim ile PSS'nin 7+ , 8+ ve 9+ yüklü komplekslerinin iyonlarına ait sinyaller gözlenmiştir. Alınan ESI kütle spektrumları değerlendirildiğinde protein ile hangi zincir uzunluğunda PSS moleküllerinin etkileştikleri belirlenmiştir.
- Lizozimin PSS ile birlikte gaz fazında meydana getirdikleri, 7+, 8+ ve 9+ yüklü komplekslerinin yapılarında bulunan PSS molekülü sayılarına göre CCS değerlerindeki değişimler incelenmiştir. Lizozimin 8+ ve 9+ yüklü iyonları daha geniş ve açık bir konformasyona sahip olduğundan dolayı, yapısına eklenen PSS zincirlerinin toplam kompleksin CCS değerlerini serbest bir şekilde arttırabildiği gözlenmiştir. Daha sıkı ve kapalı bir yapıya sahip olan 7+ yüklü lizozim iyonunun yapısına PSS zincirlerinin katılması sonucunda proteinin yük artışına gösterdiği dirence bağlı olarak CCS değerinin artışını engellediği görülmüştür.

6. KAYNAKLAR

- [1] Goodyear, C., "Improvement in india-rubber fabrics," ed: Google Patents, **1844**.
- [2] Staudinger, H., Über polymerisation, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 53, 1073-1085, **1920**.
- [3] Flory, P. J., *Principles of polymer chemistry*: Cornell University Press, **1953**.
- [4] Montaudo, G., Samperi, F., Montaudo, M. S., Characterization of synthetic polymers by MALDI-MS, *Progress in Polymer Science*, 31, 277-357, **2006**.
- [5] Badi, N., Lutz, J. F., Sequence control in polymer synthesis, *Chemical Society Reviews*, 38, 3383-3390, **2009**.
- [6] Lutz, J.-F., Polymer chemistry: a controlled sequence of events, *Nature chemistry*, 2, 84-85, **2010**.
- [7] Chan-Seng, D., Zamfir, M., Lutz, J.-F., Polymer-Chain Encoding: Synthesis of Highly Complex Monomer Sequence Patterns by Using Automated Protocols, *Angewandte Chemie International Edition*, 51, 12254-12257, **2012**.
- [8] Schacher, F. H., Rugar, P. A., Manners, I., Functional Block Copolymers: Nanostructured Materials with Emerging Applications, *Angewandte Chemie International Edition*, 51, 7898-7921, **2012**.
- [9] Altuntaş, E., Schubert, U. S., "Polymeromics": Mass spectrometry based strategies in polymer science toward complete sequencing approaches: A review, *Analytica chimica acta*, 808, 56-69, **2014**.
- [10] Kataoka, K., Harada, A., Nagasaki, Y., Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, 113-131, **2001**.
- [11] Bovey, F. A., NUCLEAR-MAGNETIC-RESONANCE METHODS FOR POLYMER STEREOCHEMISTRY ANALYSIS, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 198, 70-POLY, **1989**.
- [12] Schulten, H. R., Lattimer, R. P., Applications of mass spectrometry to polymers, *Mass Spectrometry Reviews*, 3, 231-315, **1984**.
- [13] Montaudo, G., Mass Spectrometry of Synthetic Polymers-Mere Advances or Revolution?, *Eğilims in Polymer Science*, 3, 81-86, **1996**.
- [14] Dass, C., *Fundamentals of contemporary mass spectrometry* vol. 16: John Wiley & Sons, **2007**.
- [15] de Hoffmann, E., Stroobant, V., *Mass Spectrometry: Principles and Applications*: Wiley, **2007**.
- [16] Whitehouse, C. M., Dreyer, R., Yamashita, M., Fenn, J., Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules, *Science*, 246, 64-71, **1989**.

- [17] Karas, M., Hillenkamp, F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons, *Analytical chemistry*, 60, 2299-2301, **1988**.
- [18] Tanaka, K., The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (Nobel lecture), *Angewandte Chemie International Edition*, 42, 3860-3870, **2003**.
- [19] Montaudo, G., Montaudo, M. S., Puglisi, C., Samperi, F., Characterization of end groups in nylon 6 by MALDI-TOF mass spectrometry, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 34, 439-447, **1996**.
- [20] Jackson, A. T., Yates, H. T., Lindsay, C. I., Didier, Y., Segal, J. A., Scrivens, J. H., Critchley, G., Brown, J., Utilizing Time-lag Focusing Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry for the End Group Analysis of Synthetic Polymers, *Rapid communications in mass spectrometry*, 11, 520-526, **1997**.
- [21] van Rooij, G. J., Duursma, M. C., de Koster, C. G., Heeren, R. M., Boon, J. J., Schuyl, P. W., van der Hage, E. R., Determination of block length distributions of poly (oxypropylene) and poly (oxyethylene) block copolymers by MALDI-FTICR mass spectrometry, *Analytical chemistry*, 70, 843-850, **1998**.
- [22] Terrier, P., Buchmann, W., Cheguillaume, G., Desmazières, B., Tortajada, J., Analysis of poly (oxyethylene) and poly (oxypropylene) triblock copolymers by MALDI-TOF mass spectrometry, *Analytical chemistry*, 77, 3292-3300, **2005**.
- [23] Terrier, P., Buchmann, W., Desmazières, B., Tortajada, J., Block lengths and block sequence of linear triblock and glycerol derivative diblock copolyethers by electrospray ionization-collision-induced dissociation mass spectrometry, *Analytical chemistry*, 78, 1801-1806, **2006**.
- [24] Lederer, A., Voigt, D., Appelhans, D., Voit, B., Molar mass characterization and solution behaviour of poly (ether amide) dendrimers, *Polymer Bulletin*, 57, 329-340, **2006**.
- [25] Clark, C. G., Wenzel, R. J., Andreitchenko, E. V., Steffen, W., Zenobi, R., Müllen, K., Controlled MegaDalton assembly with locally stiff but globally flexible polyphenylene dendrimers, *Journal of the American Chemical Society*, 129, 3292-3301, **2007**.
- [26] Siuzdak, G., *Mass spectrometry for biotechnology*: Academic press, 1996.
- [27] Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R. C., Chait, B. T., Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers, *Analytical chemistry*, 63, 1193A-1203A, **1991**.
- [28] Raeder, H., Schrepp, W., MALDI-TOF mass spectrometry in the analysis of synthetic polymers, *Acta Polymerica*, 49, 272-293, **1998**.
- [29] Pasch, H., Schrepp, W., *MALDI-TOF mass spectrometry of synthetic polymers*. Berlin [etc.]: Springer, **2003**.
- [30] Schriemer, D. C., Li, L., Detection of high molecular weight narrow polydisperse polymers up to 1.5 million Daltons by MALDI mass spectrometry, *Analytical chemistry*, 68, 2721-2725, **1996**.

- [31] Chapman, J., *Practical Organic Mass Spectrometry: A Guide for Chemical and Biochemical Analysis*: John Wiley & Sons, **1995**.
- [32] Lloyd, P. M., Suddaby, K. G., Varney, J. E., Scrivener, E., Derrick, P. J., Haddleton, D. M., A comparison between matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry and size exclusion chromatography in the mass characterisation of synthetic polymers with narrow molecular-mass distributions: Poly (methyl methacrylate) and poly (styrene), *Eur Mass Spectrom*, 1, 293-300, **1995**.
- [33] Montaudo, G., Montaudo, M. S., Puglisi, C., Samperi, F., Characterization of polymers by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: Molecular weight estimates in samples of varying polydispersity, *Rapid communications in mass spectrometry*, 9, 453-460, **1995**.
- [34] Johnstone, R. A. W., Rose, M. E., *Mass spectrometry for chemists and biochemists*: Cambridge University Press, **1996**.
- [35] Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M., Fenn, J. B., Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers, *Analytical chemistry*, 57, 675-679, **1985**.
- [36] Smith, R. D., Loo, J. A., Edmonds, C. G., Barinaga, C. J., Udseth, H. R., New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization, *Analytical Chemistry*, 62, 882-899, **1990**.
- [37] Kebarle, P., Tang, L., From ions in solution to ions in the gas phase-the mechanism of electrospray mass spectrometry, *Analytical chemistry*, 65, 972A-986A, **1993**.
- [38] Gaskell, S. J., Electrospray: principles and practice, *Journal of mass spectrometry*, 32, 677-688, **1997**.
- [39] Saf, R., Mirtl, C., Hummel, K., Electrospray ionization mass spectrometry as an analytical tool for non-biological monomers, oligomers and polymers, *Acta polymerica*, 48, 513-526, **1997**.
- [40] Konermann, L., Ahadi, E., Rodriguez, A. D., Vahidi, S., Unraveling the mechanism of electrospray ionization, *Analytical chemistry*, 85, 2-9, **2012**.
- [41] McEwen, C. N., Simonsick, W. J., Larsen, B. S., Ute, K., Hatada, K., The fundamentals of applying electrospray ionization mass spectrometry to low mass poly (methyl methacrylate) polymers, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 6, 906-911, **1995**.
- [42] Gruending, T., Weidner, S., Falkenhagen, J., Barner-Kowollik, C., Mass spectrometry in polymer chemistry: a state-of-the-art up-date, *Polymer Chemistry*, 1, 599-617, **2010**.
- [43] Hart-Smith, G., Barner-Kowollik, C., Contemporary mass spectrometry and the analysis of synthetic polymers: eñilims, techniques and untapped potential, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 211, 1507-1529, **2010**.
- [44] Soeriyadi, A. H., R Whittaker, M., Boyer, C., Davis, T. P., Soft ionization mass spectroscopy: insights into the polymerization mechanism, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 51, 1475-1505, **2013**.

- [45] Voll, D., Junkers, T., Barner-Kowollik, C., A qualitative and quantitative post-mortem analysis: Studying free-radical initiation processes via soft ionization mass spectrometry, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 50, 2739-2757, **2012**.
- [46] March, R. E., Todd, J. F., *Quadrupole ion trap mass spectrometry* vol. 165: John Wiley & Sons, **2005**.
- [47] Cotter, R. J., Time-of-flight mass spectrometry, *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, **2005**.
- [48] Vestal, M., Juhasz, P., Martin, S., Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 9, 1044-1050, **1995**.
- [49] Spengler, B., Post-source decay analysis in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biomolecules, *Journal of Mass Spectrometry*, 32, 1019-1036, **1997**.
- [50] Boyle, J. G., Whitehouse, C. M., Time-of-flight mass spectrometry with an electrospray ion beam, *Analytical chemistry*, 64, 2084-2089, **2002**.
- [51] Johnson, J. V., Yost, R. A., Kelley, P. E., Bradford, D. C., Tandem-in-space and tandem-in-time mass spectrometry: triple quadrupoles and quadrupole ion traps, *Analytical Chemistry*, 62, 2162-2172, **1990**.
- [52] Cole, R. B., *Electrospray and MALDI mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, practicalities, and biological applications*: John Wiley & Sons, **2011**.
- [53] Thomson, J. J., Rutherford, E., XL. On the passage of electricity through gases exposed to Röntgen rays, *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 42, 392-407, **1896**.
- [54] Tyndall, A., Starr, L., Powell, C., The mobility of ions in air. Part IV. Investigations by two new methods, *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 121, 172-184, **1928**.
- [55] Tyndall, A., Powell, C., The Mobility of Ions in Pure Gases, *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 129, 162-180, **1930**.
- [56] Dempster, A., On The Mobility of Ions in Air at High Pressures, *Physical Review (Series I)*, 34, p.53, **1912**.
- [57] Haselfoot, C., The Diffusion of Ions into Gases at Low Pressure, *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 87, 350-357, **1912**.
- [58] Phillips, P., Ionic Velocities in Air at Different Temperatures, *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 78, 167-191, **1906**.
- [59] Erikson, H. A., The Mobility of Ions at Different Temperatures and Constant Gas Density, *Physical Review*, 3, p.151, **1914**.
- [60] Loeb, L. B., On the Mobilities of Gas Ions in High Electric Fields, *Physical Review*, 8, p.633, **1916**.

- [61] Tyndall, A., Grindley, G., The Mobility of Ions in Air. Part II. Positive Ions of Short Age, *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 110, 358-364, **1926**.
- [62] Barnes, W., Martin, D., McDaniel, E., Mass spectrographic identification of the ion observed in hydrogen mobility experiments, *Physical Review Letters*, 6, p.110, **1961**.
- [63] Bloomfield, C., Hasted, J., New technique for the study of ion-atom interchange, *Discussions of the Faraday Society*, 37, 176-184, **1964**.
- [64] Dole, M., Hines, R., Mack, L., Mobley, R., Ferguson, L., Alice, M., Gas phase macroions, *Macromolecules*, 1, 96-97, **1968**.
- [65] Dole, M., Mack, L., Hines, R., Mobley, R., Ferguson, L., Alice, M. d., Molecular beams of macroions, *The Journal of Chemical Physics*, 49, 2240-2249, **1968**.
- [66] Cohen, M. J., Karasek, F., Plasma chromatography™—a new dimension for gas chromatography and mass spectrometry, *Journal of Chromatographic science*, 8, 330-337, **1970**.
- [67] Lin, S. N., Griffin, G., Horning, E., Wentworth, W., Dependence of polyatomic ion mobilities on ionic size, *The Journal of Chemical Physics*, 60, 4994-4999, **1974**.
- [68] Carr, T. W., Plasma Chromatography off Isomeric Dihalogenated Benzene, *Journal of Chromatographic Science*, 15, 85-88, **1977**.
- [69] Hagen, D., Characterization of isomeric compounds by gas and plasma chromatography, *Analytical Chemistry*, 51, 870-874, **1979**.
- [70] Lubman, D. M., Kronick, M. N., Plasma chromatography with laser-produced ions, *Analytical Chemistry*, 54, 1546-1551, **1982**.
- [71] von Helden, G., Wyttenbach, T., Bowers, M. T., Inclusion of a MALDI ion source in the ion chromatography technique: conformational information on polymer and biomolecular ions, *International journal of mass spectrometry and ion processes*, 146, 349-364, **1995**.
- [72] Smith, R. D., Loo, J. A., Loo, R. R. O., Busman, M., Udseth, H. R., Principles and practice of electrospray ionization? mass spectrometry for large polypeptides and proteins, *Mass Spectrometry Reviews*, 10, 359-452, **1991**.
- [73] Wittmer, D., Chen, Y. H., Luckenbill, B. K., Hill Jr, H. H., Electrospray ionization ion mobility spectrometry, *Analytical Chemistry*, 66, 2348-2355, **1994**.
- [74] Buryakov, I., Krylov, E., Nazarov, E., Rasulev, U. K., A new method of separation of multi-atomic ions by mobility at atmospheric pressure using a high-frequency amplitude-asymmetric strong electric field, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 128, 143-148, **1993**.
- [75] Kolakowski, B. M., Mester, Z., Review of applications of high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS) and differential mobility spectrometry (DMS), *Analyst*, 132, 842-864, **2007**.

- [76] Purves, R. W., Guevremont, R., Day, S., Pipich, C. W., Matyjaszczyk, M. S., Mass spectrometric characterization of a high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometer, *Review of Scientific Instruments*, 69, 4094-4105, **1998**.
- [77] Lambertus, G. R., Fix, C. S., Reidy, S. M., Miller, R. A., Wheeler, D., Nazarov, E., Sacks, R., Silicon microfabricated column with microfabricated differential mobility spectrometer for GC analysis of volatile organic compounds, *Analytical chemistry*, 77, 7563-7571, **2005**.
- [78] De La Mora, J. F., Ude, S., Thomson, B. A., The potential of differential mobility analysis coupled to MS for the study of very large singly and multiply charged proteins and protein complexes in the gas phase, *Biotechnology journal*, 1, 988-997, **2006**.
- [79] Hogan Jr, C. J., Ruotolo, B. T., Robinson, C. V., Fernandez de la Mora, J., Tandem differential mobility analysis-mass spectrometry reveals partial gas-phase collapse of the GroEL complex, *The Journal of Physical Chemistry B*, 115, 3614-3621, **2011**.
- [80] Vidal-de-Miguel, G., Macía, M., Cuevas, J., Transversal Modulation Ion Mobility Spectrometry (TM-IMS), a new mobility filter overcoming turbulence related limitations, *Analytical chemistry*, 84, 7831-7837, **2012**.
- [81] May, J. C., Goodwin, C. R., McLean, J. A., Ion mobility-mass spectrometry strategies for untargeted systems, synthetic, and chemical biology, *Current opinion in biotechnology*, 31, 117-121, **2015**.
- [82] Tung, L. S., Barr, W., Lowder, R., Post, R., Mass, charge, and energy separation by selective acceleration with a traveling potential hill, *Journal of applied physics*, 80, 3646-3655, **1996**.
- [83] Bennett, W. H., Radiofrequency mass spectrometer, *Journal of Applied Physics*, 21, 143-149, **1950**.
- [84] Giddings, J., Concepts and comparisons in multidimensional separation, *Journal of High Resolution Chromatography*, 10, 319-323, **1987**.
- [85] Enke, C. G., Stults, J. T., Holland, J. F., Pinkston, J. D., Allison, J., "MS/MS by Time-Resolved Magnetic Dispersion Mass Spectrometry," DTIC Document **1982**.
- [86] Liu, X., Plasencia, M., Ragg, S., Valentine, S. J., Clemmer, D. E., Development of high throughput dispersive LC—ion mobility—TOFMS techniques for analysing the human plasma proteome, *Briefings in functional genomics & proteomics*, 3, 177-186, **2004**.
- [87] Valentine, S. J., Kulchania, M., Barnes, C. A. S., Clemmer, D. E., Multidimensional separations of complex peptide mixtures: a combined high-performance liquid chromatography/ion mobility/time-of-flight mass spectrometry approach, *International Journal of Mass Spectrometry*, 212, 97-109, **2001**.
- [88] Giles, K., Pringle, S. D., Worthington, K. R., Little, D., Wildgoose, J. L., Bateman, R. H., Applications of a travelling wave-based radio-frequency-only stacked ring ion guide, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18, 2401-2414, **2004**.

- [89] Pringle, S. D., Giles, K., Wildgoose, J. L., Williams, J. P., Slade, S. E., Thalassinou, K., Bateman, R. H., Bowers, M. T., Scrivens, J. H., An investigation of the mobility separation of some peptide and protein ions using a new hybrid quadrupole/travelling wave IMS/oa-ToF instrument, *International Journal of Mass Spectrometry*, 261, 1-12, **2007**.
- [90] Giles, K., Williams, J. P., Campuzano, I., Enhancements in travelling wave ion mobility resolution, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 25, 1559-1566, **2011**.
- [91] Zhong, Y., Hyung, S.-J., Ruotolo, B. T., Characterizing the resolution and accuracy of a second-generation traveling-wave ion mobility separator for biomolecular ions, *Analyst*, 136, 3534-3541, **2011**.
- [92] Ridenour, W. B., Kliman, M., McLean, J. A., Caprioli, R. M., Structural characterization of phospholipids and peptides directly from tissue sections by MALDI traveling-wave ion mobility-mass spectrometry, *Analytical chemistry*, 82, 1881-1889, **2010**.
- [93] Matusch, A., Fenn, L. S., Depboylu, C., Klietz, M., Strohmmer, S., McLean, J. A., Becker, J. S., Combined elemental and biomolecular mass spectrometry imaging for probing the inventory of tissue at a micrometer scale, *Analytical chemistry*, 84, 3170-3178, **2012**.
- [94] McEwen, C. N., McKay, R. G., Larsen, B. S., Analysis of solids, liquids, and biological tissues using solids probe introduction at atmospheric pressure on commercial LC/MS instruments, *Analytical Chemistry*, 77, 7826-7831, **2005**.
- [95] Barrère, C., Maire, F., Afonso, C., Giusti, P., Atmospheric solid analysis probe–ion mobility mass spectrometry of polypropylene, *Analytical chemistry*, 84, 9349-9354, **2012**.
- [96] El-Hawiet, A., Kitova, E. N., Klassen, J. S., Quantifying protein interactions with isomeric carbohydrate ligands using a catch and release electrospray ionization-mass spectrometry assay, *Analytical chemistry*, 85, 7637-7644, **2013**.
- [97] Rathore, D., Dodds, E. D., Collision-induced release, ion mobility separation, and amino acid sequence analysis of subunits from mass-selected noncovalent protein complexes, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 25, 1600-1609, **2014**.
- [98] Williams, J. P., Brown, J. M., Campuzano, I., Sadler, P. J., Identifying drug metallation sites on peptides using electron transfer dissociation (ETD), collision induced dissociation (CID) and ion mobility-mass spectrometry (IM-MS), *Chemical Communications*, 46, 5458-5460, **2010**.
- [99] Rand, K. D., Pringle, S. D., Morris, M., Engen, J. R., Brown, J. M., ETD in a traveling wave ion guide at tuned Z-spray ion source conditions allows for site-specific hydrogen/deuterium exchange measurements, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 22, 1784-1793, **2011**.
- [100] Lermyte, F., Konijnenberg, A., Williams, J. P., Brown, J. M., Valkenburg, D., Sobott, F., ETD allows for native surface mapping of a 150 kDa

- noncovalent complex on a commercial Q-TWIMS-TOF instrument, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 25, 343-350, **2014**.
- [101] Zhou, M., Dagan, S., Wysocki, V. H., Protein subunits released by surface collisions of noncovalent complexes: natively compact structures revealed by ion mobility mass spectrometry, *Angew Chem Int Ed Engl*, 51, 4336-4339, **2012**.
- [102] Cooks, R., Terwilliger, D., Ast, T., Beynon, J., Keough, T., Surface modified mass spectrometry, *Journal of the American Chemical Society*, 97, 1583-1585, **1975**.
- [103] Galhena, A. S., Dagan, S., Jones, C. M., Beardsley, R. L., Wysocki, V. H., Surface-induced dissociation of peptides and protein complexes in a quadrupole/time-of-flight mass spectrometer, *Analytical chemistry*, 80, 1425-1436, **2008**.
- [104] Zhou, M., Huang, C., Wysocki, V. H., Surface-induced dissociation of ion mobility-separated noncovalent complexes in a quadrupole/time-of-flight mass spectrometer, *Analytical chemistry*, 84, 6016-6023, **2012**.
- [105] Zhou, M., Wysocki, V. H., Surface induced dissociation: dissecting noncovalent protein complexes in the gas phase, *Accounts of chemical research*, 47, 1010-1018, **2014**.
- [106] Zhou, M., Jones, C. M., Wysocki, V. H., Dissecting the large noncovalent protein complex GroEL with surface-induced dissociation and ion mobility-mass spectrometry, *Analytical chemistry*, 85, 8262-8267, **2013**.
- [107] Quintyn, R. S., Zhou, M., Dagan, S., Finke, J., Wysocki, V. H., Ligand binding and unfolding of tryptophan synthase revealed by ion mobility-tandem mass spectrometry employing collision and surface induced dissociation, *International Journal for Ion Mobility Spectrometry*, 16, 133-143, **2013**.
- [108] Zhou, M., Dagan, S., Wysocki, V. H., Impact of charge state on gas-phase behaviors of noncovalent protein complexes in collision induced dissociation and surface induced dissociation, *Analyst*, 138, 1353-1362, **2013**.
- [109] Ma, X., Lai, L. B., Lai, S. M., Tanimoto, A., Foster, M. P., Wysocki, V. H., Gopalan, V., Uncovering the Stoichiometry of Pyrococcus furiosus RNase P, a Multi-Subunit Catalytic Ribonucleoprotein Complex, by Surface-Induced Dissociation and Ion Mobility Mass Spectrometry, *Angewandte Chemie*, 126, 11667-11671, **2014**.
- [110] Law, K. P., Lim, Y. P., Recent advances in mass spectrometry: data independent analysis and hyper reaction monitoring, *Expert review of proteomics*, 10, 551-566, **2013**.
- [111] Shah, V., Castro-Perez, J. M., McLaren, D. G., Herath, K. B., Previs, S. F., Roddy, T. P., Enhanced data-independent analysis of lipids using ion mobility-TOFMSE to unravel quantitative and qualitative information in human plasma, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27, 2195-2200, **2013**.

- [112] Shliaha, P. V., Bond, N. J., Gatto, L., Lilley, K. S., Effects of traveling wave ion mobility separation on data independent acquisition in proteomics studies, *Journal of proteome research*, 12, 2323-2339, **2013**.
- [113] Lietz, C. B., Yu, Q., Li, L., Large-scale collision cross-section profiling on a traveling wave ion mobility mass spectrometer, *J Am Soc Mass Spectrom*, 25, 2009-2019, **2014**.
- [114] Paglia, G., Williams, J. P., Menikarachchi, L., Thompson, J. W., Tyldesley-Worster, R., Halldórsson, S. d., Rolfsson, O., Moseley, A., Grant, D., Langridge, J., Ion mobility derived collision cross sections to support metabolomics applications, *Analytical chemistry*, 86, 3985-3993, **2014**.
- [115] Smith, D. P., Knapman, T. W., Campuzano, I., Malham, R. W., Berryman, J. T., Radforda, S. E., Ashcrofta, A. E., Deciphering drift time measurements from travelling wave ion mobility spectrometry-mass spectrometry studies, *cell [Equation (1)]*, 12, p.13, **2009**.
- [116] Ruotolo, B. T., Benesch, J. L., Sandercock, A. M., Hyung, S.-J., Robinson, C. V., Ion mobility–mass spectrometry analysis of large protein complexes, *Nature Protocols*, 3, 1139-1152, **2008**.
- [117] Shvartsburg, A. A., Jarrold, M. F., An exact hard-spheres scattering model for the mobilities of polyatomic ions, *Chemical Physics Letters*, 261, 86-91, **1996**.
- [118] Mesleh, M. F., Hunter, J. M., Shvartsburg, A. A., Schatz, G. C., Jarrold, M. F., Structural information from ion mobility measurements: Effects of the long-range potential, *Journal of Physical Chemistry*, 100, 16082-16086, **1996**.
- [119] Shvartsburg, A. A., Schatz, G. C., Jarrold, M. F., Mobilities of carbon cluster ions: critical importance of the molecular attractive potential, *The Journal of chemical physics*, 108, 2416-2423, **1998**.
- [120] Shvartsburg, A. A., Mashkevich, S. V., Baker, E. S., Smith, R. D., Optimization of algorithms for ion mobility calculations, *The Journal of Physical Chemistry A*, 111, 2002-2010, **2007**.
- [121] Wyttenbach, T., von Helden, G., Batka, J. J., Carlat, D., Bowers, M. T., Effect of the long-range potential on ion mobility measurements, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 8, 275-282, **1997**.
- [122] Shvartsburg, A. A., Smith, R. D., Optimum waveforms for differential ion mobility spectrometry (FAIMS), *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19, 1286-1295, **2008**.
- [123] Gidden, J., Wyttenbach, T., Batka, J. J., Weis, P., Bowers, M. T., Jackson, A. T., Scrivens, J. H., Poly (ethylene terephthalate) oligomers cationized by alkali ions: structures, energetics, and their effect on mass spectra and the matrix-assisted laser desorption/ionization process, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 10, 883-895, **1999**.
- [124] Gidden, J., Wyttenbach, T., Jackson, A. T., Scrivens, J. H., Bowers, M. T., Gas-phase conformations of synthetic polymers: poly (ethylene glycol), poly (propylene glycol), and poly (tetramethylene glycol), *Journal of the American Chemical Society*, 122, 4692-4699, **2000**.

- [125] Trimpin, S., Plasencia, M., Isailovic, D., Clemmer, D. E., Resolving oligomers from fully grown polymers with IMS-MS, *Analytical chemistry*, 79, 7965-7974, **2007**.
- [126] El-Baba, T. J., Lutomski, C. A., Wang, B., Trimpin, S., Characterizing synthetic polymers and additives using new ionization methods for mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 28, 1175-1184, **2014**.
- [127] Cossoul, E., Hubert-Roux, M., Sebban, M., Churlaud, F., Oulyadi, H., Afonso, C., Evaluation of atmospheric solid analysis probe ionization coupled to ion mobility mass spectrometry for characterization of poly (ether ether ketone) polymers, *Analytica chimica acta*, 856, 46-53, **2015**.
- [128] Gies, A. P., Hercules, D. M., Collision induced dissociation study of ester-based polyurethane fragmentation reactions, *Analytica chimica acta*, 808, 199-219, **2014**.
- [129] Tintaru, A., Chendo, C., Wang, Q., Viel, S., Quéléver, G., Peng, L., Posocco, P., Pricl, S., Charles, L., Conformational sensitivity of conjugated poly (ethylene oxide)-poly (amidoamine) molecules to cations adducted upon electrospray ionization—A mass spectrometry, ion mobility and molecular modeling study, *Analytica chimica acta*, 808, 163-174, **2014**.
- [130] Kim, K., Lee, J. W., Chang, T., Kim, H. I., Characterization of polylactides with different stereoregularity using electrospray ionization ion mobility mass spectrometry, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 25, 1771-1779, **2014**.
- [131] Hilton, G. R., Jackson, A. T., Thalassinou, K., Scrivens, J. H., Structural analysis of synthetic polymer mixtures using ion mobility and tandem mass spectrometry, *Analytical chemistry*, 80, 9720-9725, **2008**.
- [132] Song, J., Grün, C. H., Heeren, R., Janssen, H. G., van den Brink, O. F., High-Resolution Ion Mobility Spectrometry—Mass Spectrometry on Poly (methyl methacrylate), *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 10168-10171, **2010**.
- [133] Scionti, V., Katzenmeyer, B., Solak Erdem, N., Li, X., Wesdemiotis, C., Interfacing multistage mass spectrometry with liquid chromatography or ion mobility separation for synthetic polymer analysis, *European journal of mass spectrometry*, 18, p.113, **2012**.
- [134] Katzenmeyer, B. C., Cool, L. R., Williams, J. P., Craven, K., Brown, J. M., Wesdemiotis, C., Electron transfer dissociation of sodium cationized polyesters: reaction time effects and combination with collisional activation and ion mobility separation, *International Journal of Mass Spectrometry*, 378, 303-311, **2015**.
- [135] Hoskins, J. N., Trimpin, S., Grayson, S. M., Architectural differentiation of linear and cyclic polymeric isomers by ion mobility spectrometry-mass spectrometry, *Macromolecules*, 44, 6915-6918, **2011**.
- [136] Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., *Molecular Cell Biology: An Integrated View of Cells at Work*, **2000**.

- [137] Renaud, J.-P., Delsuc, M.-A., Biophysical techniques for ligand screening and drug design, *Current opinion in pharmacology*, 9, 622-628, **2009**.
- [138] Yin, S., Loo, J. A., Mass spectrometry detection and characterization of noncovalent protein complexes, *Mass Spectrometry of Proteins and Peptides: Methods and Protocols*, 273-282, **2009**.
- [139] Lemaire, D., Marie, G., Serani, L., Lapr evote, O., Stabilization of gas-phase noncovalent macromolecular complexes in electrospray mass spectrometry using aqueous triethylammonium bicarbonate buffer, *Analytical chemistry*, 73, 1699-1706, **2001**.
- [140] Woods, A. S., Koomen, J. M., Ruotolo, B. T., Gillig, K. J., Russel, D. H., Fuhrer, K., Gonin, M., Egan, T. F., Schultz, J. A., A study of peptide-peptide interactions using MALDI ion mobility o-TOF and ESI mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 13, 166-169, **2002**.
- [141] Hofstadler, S. A., Griffey, R. H., Analysis of noncovalent complexes of DNA and RNA by mass spectrometry, *Chemical Reviews*, 101, 377-390, **2001**.
- [142] Li, Y., Heitz, F., Le Grimellec, C., Cole, R. B., Fusion peptide-phospholipid noncovalent interactions as observed by nanoelectrospray FTICR-MS, *Analytical chemistry*, 77, 1556-1565, **2005**.
- [143] Sannes-Lowery, K. A., Cummins, L. L., Chen, S., Drader, J. J., Hofstadler, S. A., High throughput drug discovery with ESI-FTICR, *International Journal of Mass Spectrometry*, 238, 197-206, **2004**.
- [144] Chevreux, G., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Bahloul, A., Houdusse, A., Wells, A., Sweeney, H. L., Electrospray ionization mass spectrometry studies of noncovalent myosin VI complexes reveal a new specific calmodulin binding site, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16, 1367-1376, **2005**.
- [145] Gao, H., Yu, Y., Leary, J. A., Mechanism and kinetics of metalloenzyme phosphomannose isomerase: measurement of dissociation constants and effect of zinc binding using ESI-FTICR mass spectrometry, *Analytical chemistry*, 77, 5596-5603, **2005**.
- [146] Wortmann, A., Rossi, F., Lelais, G., Zenobi, R., Determination of zinc to beta-peptide binding constants with electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of mass spectrometry*, 40, 777-784, **2005**.
- [147] Barrera, N. P., Isaacson, S. C., Zhou, M., Bavro, V. N., Welch, A., Schaedler, T. A., Seeger, M. A., Miguel, R. N., Korkhov, V. M., van Veen, H. W., Mass spectrometry of membrane transporters reveals subunit stoichiometry and interactions, *Nature methods*, 6, p.585, **2009**.
- [148] Kraus, M., Bienert, M., Krause, E., Hydrogen exchange studies on Alzheimer's amyloid- β peptides by mass spectrometry using matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization, *Rapid communications in mass spectrometry*, 17, 222-228, **2003**.
- [149] Demmers, J. A., van Duijn, E., Haverkamp, J., Greathouse, D. V., Koeppe, R. E., Heck, A. J., Killian, J. A., Interfacial positioning and stability of transmembrane peptides in lipid bilayers studied by combining

- hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry, *Journal of Biological Chemistry*, 276, 34501-34508, **2001**.
- [150] Ramanathan, R., Gross, M. L., Zielinski, W. L., Layloff, T. P., Monitoring recombinant protein drugs: a study of insulin by H/D exchange and electrospray ionization mass spectrometry, *Analytical chemistry*, 69, 5142-5145, **1997**.
- [151] Zehl, M., Allmaier, G., Investigation of sample preparation and instrumental parameters in the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of noncovalent peptide/peptide complexes, *Rapid communications in mass spectrometry*, 17, 1931-1940, **2003**.
- [152] Zehl, M., Allmaier, G., Instrumental parameters in the MALDI-TOF mass spectrometric analysis of quaternary protein structures, *Analytical chemistry*, 77, 103-110, **2005**.
- [153] Boris, D. C., Colby, R. H., Rheology of sulfonated polystyrene solutions, *Macromolecules*, 31, 5746-5755, **1998**.
- [154] Göktepe, F., Bozkurt, A., Günday, Ş. T., Synthesis and proton conductivity of poly (styrene sulfonic acid)/heterocycle-based membranes, *Polymer International*, 57, 133-138, **2008**.
- [155] Sahu, A., Selvarani, G., Bhat, S., Pitchumani, S., Sridhar, P., Shukla, A., Narayanan, N., Banerjee, A., Chandrakumar, N., Effect of varying poly (styrene sulfonic acid) content in poly (vinyl alcohol)–poly (styrene sulfonic acid) blend membrane and its ramification in hydrogen–oxygen polymer electrolyte fuel cells, *Journal of Membrane Science*, 319, 298-305, **2008**.
- [156] Bae, B., Kim, D., Sulfonated polystyrene grafted polypropylene composite electrolyte membranes for direct methanol fuel cells, *Journal of Membrane Science*, 220, 75-87, **2003**.
- [157] Fu, Y., Manthiram, A., Guiver, M. D., Blend membranes based on sulfonated poly (ether ether ketone) and polysulfone bearing benzimidazole side groups for proton exchange membrane fuel cells, *Electrochemistry Communications*, 8, 1386-1390, **2006**.
- [158] Colby, R. H., Boris, D. C., Krause, W. E., Tan, J. S., Polyelectrolyte conductivity, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 35, 2951-2960, **1997**.
- [159] Wang, D., Pu, H., Jiang, F., Yang, Z., Tang, L., Proton-conducting membrane composed of hollow sulfonated polystyrene microspheres, poly (vinyl alcohol) and imidazole, *Polymer Preprints*, 47, p.238, **2006**.
- [160] Kharlampieva, E., Kozlovskaya, V., Sukhishvili, S. A., Layer-by-Layer Hydrogen-Bonded Polymer Films: From Fundamentals to Applications, *Advanced Materials*, 21, 3053-3065, **2009**.
- [161] Krasowska, M., Kolasinska, M., Warszynski, P., Malysa, K., Influence of polyelectrolyte layers deposited on mica surface on wetting film stability and bubble attachment, *The Journal of Physical Chemistry C*, 111, 5743-5749, **2007**.

- [162] Jiang, C., Markutsya, S., Tsukruk, V. V., Collective and individual plasmon resonances in nanoparticle films obtained by spin-assisted layer-by-layer assembly, *Langmuir*, 20, 882-890, **2004**.
- [163] Krogman, K. C., Lowery, J. L., Zacharia, N. S., Rutledge, G. C., Hammond, P. T., Spraying asymmetry into functional membranes layer-by-layer, *Nature materials*, 8, 512-518, **2009**.
- [164] Ouyang, L., Dotzauer, D. M., Hogg, S. R., Macanás, J., Lahitte, J.-F., Bruening, M. L., Catalytic hollow fiber membranes prepared using layer-by-layer adsorption of polyelectrolytes and metal nanoparticles, *Catalysis today*, 156, 100-106, **2010**.
- [165] Iler, R., Multilayers of colloidal particles, *Journal of colloid and interface science*, 21, 569-594, **1966**.
- [166] Decher, G., Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites, *science*, 277, 1232-1237, **1997**.
- [167] Ott, P., Gensel, J., Roesler, S., Trenkenschuh, K., Andreeva, D., Laschewsky, A., Fery, A., Cross-Linkable Polyelectrolyte Multilayer Films of Tailored Charge Density, *Chemistry of Materials*, 22, 3323-3331, **2010**.
- [168] Yoshida, K., Hasebe, Y., Takahashi, S., Sato, K., Anzai, J.-i., Layer-by-layer deposited nano-and micro-assemblies for insulin delivery: a review, *Materials Science and Engineering: C*, 34, 384-392, **2014**.
- [169] Decher, G., Hong, J. D., "Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process, 1 consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces," in *Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia*, **1991**, pp. 321-327.
- [170] Sukhishvili, S. A., Granick, S., Layered, erasable, ultrathin polymer films, *Journal of the American Chemical Society*, 122, 9550-9551, **2000**.
- [171] Yang, S. Y., Rubner, M. F., Micropatterning of polymer thin films with pH-sensitive and cross-linkable hydrogen-bonded polyelectrolyte multilayers, *Journal of the American Chemical Society*, 124, 2100-2101, **2002**.
- [172] Zhao, Z., Yin, L., Yuan, G., Wang, L., Layer-by-layer assembly of two temperature-responsive homopolymers at neutral pH and the temperature-dependent solubility of the multilayer film, *Langmuir*, 28, 2704-2709, **2012**.
- [173] Köhler, K., Shchukin, D. G., Möhwald, H., Sukhorukov, G. B., Thermal behavior of polyelectrolyte multilayer microcapsules. 1. The effect of odd and even layer number, *The Journal of Physical Chemistry B*, 109, 18250-18259, **2005**.
- [174] Alessandri, I., Ferroni, M., Depero, L. E., In Situ Plasmon-Heating-Induced Generation of Au/TiO₂ "Hot Spots" on Colloidal Crystals, *ChemPhysChem*, 10, 1017-1022, **2009**.
- [175] Meng, S., Liu, Z., Shen, L., Guo, Z., Chou, L. L., Zhong, W., Du, Q., Ge, J., The effect of a layer-by-layer chitosan–heparin coating on the endothelialization and coagulation properties of a coronary stent system, *Biomaterials*, 30, 2276-2283, **2009**.

- [176] Yager, K. G., Barrett, C. J., All-optical patterning of azo polymer films, *Current opinion in solid state and materials science*, 5, 487-494, **2001**.
- [177] Moustafine, R. I., Zaharov, I. M., Kemenova, V. A., Physicochemical characterization and drug release properties of Eudragit® E PO/Eudragit® L 100-55 interpolyelectrolyte complexes, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 63, 26-36, **2006**.
- [178] Tsuchida, E., Formation of polyelectrolyte complexes and their structures, *Journal of Macromolecular Science—Pure and Applied Chemistry*, 31, 1-15, **1994**.
- [179] Thünemann, A. F., Müller, M., Dautzenberg, H., Joanny, J.-F., Löwen, H., Polyelectrolyte complexes, *Polyelectrolytes with defined molecular architecture II*, Springer 113-171, **2004**.
- [180] Moustafine, R., Kabanova, T., Kemenova, V., Van den Mooter, G., Characteristics of interpolyelectrolyte complexes of Eudragit E100 with Eudragit L100, *Journal of controlled release*, 103, 191-198, **2005**.
- [181] Moustafine, R., Bukhovets, A., Garipova, V., Sitenkov, A., Shamsutdinova, A., Kemenova, V., Rombaut, P., Van den Mooter, G., Comparative evaluation of new carriers for controlled drug delivery based on Eudragit EPO/L100 interpolyelectrolyte complexes, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 46, 507-511, **2012**.
- [182] Moustafine, R. I., Bobyleva, V. L., Bukhovets, A. V., Garipova, V. R., Kabanova, T. V., Kemenova, V. A., Van Den Mooter, G., Structural transformations during swelling of polycomplex matrices based on countercharged (meth) acrylate copolymers (Eudragit® EPO/Eudragit® L 100-55), *Journal of pharmaceutical sciences*, 100, 874-885, **2011**.
- [183] De Robertis, S., Bonferoni, M. C., Elviri, L., Sandri, G., Caramella, C., Bettini, R., Advances in oral controlled drug delivery: the role of drug-polymer and interpolymer non-covalent interactions, *Expert opinion on drug delivery*, 12, 441-453, **2015**.
- [184] Mustafin, R., Bukhovets, A., Sitenkov, A. Y., Garipova, V., Kemenova, V., Rombaut, P., Van den Mooter, G., Synthesis and characterization of a new carrier based on Eudragit® EPO/S100 interpolyelectrolyte complex for controlled colon-specific drug delivery, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 45, 568-574, **2011**.
- [185] Moustafine, R., Bukhovets, A., Sitenkov, A., Kemenova, V., Rombaut, P., Van den Mooter, G., Eudragit E PO as a complementary material for designing oral drug delivery systems with controlled release properties: comparative evaluation of new interpolyelectrolyte complexes with countercharged eudragit L100 copolymers, *Molecular pharmaceutics*, 10, 2630-2641, **2013**.
- [186] Moustafine, R. I., Margulis, E. B., Sibgatullina, L. F., Kemenova, V. A., Van den Mooter, G., Comparative evaluation of interpolyelectrolyte complexes of chitosan with Eudragit® L100 and Eudragit® L100-55 as potential carriers for oral controlled drug delivery, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 70, 215-225, **2008**.

- [187] Assaad, E., Wang, Y. J., Zhu, X. X., Mateescu, M. A., Polyelectrolyte complex of carboxymethyl starch and chitosan as drug carrier for oral administration, *Carbohydrate polymers*, 84, 1399-1407, **2011**.
- [188] de la Torre, P. M., Torrado, G., Torrado, S., Poly (acrylic acid) chitosan interpolymer complexes for stomach controlled antibiotic delivery, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 72, 191-197, **2005**.
- [189] Bigucci, F., Luppi, B., Cerchiara, T., Sorrenti, M., Bettinetti, G., Rodriguez, L., Zecchi, V., Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin, *European journal of pharmaceutical sciences*, 35, 435-441, **2008**.
- [190] Moustafine, R. I., Salachova, A. R., Frolova, E. S., Kemenova, V. A., Van den Mooter, G., Interpolyelectrolyte complexes of Eudragit® E PO with sodium alginate as potential carriers for colonic drug delivery: monitoring of structural transformation and composition changes during swellability and release evaluating, *Drug development and industrial pharmacy*, 35, 1439-1451, **2009**.
- [191] Prado, H., Matulewicz, M., Bonelli, P., Cukierman, A., Basic butylated methacrylate copolymer/kappa-carrageenan interpolyelectrolyte complex: preparation, characterization and drug release behaviour, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70, 171-178, **2008**.
- [192] Prado, H. J., Matulewicz, M. C., Bonelli, P. R., Cukierman, A. L., Preparation and characterization of controlled release matrices based on novel seaweed interpolyelectrolyte complexes, *International journal of pharmaceutics*, 429, 12-21, **2012**.
- [193] Friciu, M. M., Le, T. C., Ispas-Szabo, P., Mateescu, M. A., Carboxymethyl starch and lecithin complex as matrix for targeted drug delivery: I. Monolithic Mesalamine forms for colon delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85, 521-530, **2013**.
- [194] Sotiropoulou, M., Cincu, C., Bokias, G., Staikos, G., Water-soluble polyelectrolyte complexes formed by poly (diallyldimethylammonium chloride) and poly (sodium acrylate-co-sodium 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulphonate)-graft-poly (N, N-dimethylacrylamide) copolymers, *Polymer*, 45, 1563-1568, **2004**.
- [195] Sato, A., Choi, S. W., Hirai, M., Yamayoshi, A., Moriyama, R., Yamano, T., Takagi, M., Kano, A., Shimamoto, A., Maruyama, A., Polymer brush-stabilized polyplex for a siRNA carrier with long circulatory half-life, *Journal of Controlled Release*, 122, 209-216, **2007**.
- [196] Choi, S. W., Kano, A., Maruyama, A., Activation of DNA strand exchange by cationic comb-type copolymers: effect of cationic moieties of the copolymers, *Nucleic acids research*, 36, 342-351, **2008**.
- [197] Kramarenko, E. Y., Pevnaya, O., Khokhlov, A., Stoichiometric polyelectrolyte complexes as comb copolymers, *The Journal of chemical physics*, 122, p.084902, **2005**.

- [198] Naderi, A., Iruthayaraj, J., Pettersson, T. r., Makuska, R., Claesson, P. M., Effect of polymer architecture on the adsorption properties of a nonionic polymer, *Langmuir*, 24, 6676-6682, **2008**.
- [199] Haynie, D. T., Zhang, L., Rudra, J. S., Zhao, W., Zhong, Y., Palath, N., Polypeptide multilayer films, *Biomacromolecules*, 6, 2895-2913, **2005**.
- [200] Domard, A., Rinaudo, M., Polyelectrolyte complexes. Interaction of poly (L-lysine)-poly (L-glutamic acid) in dilute aqueous solution, *Macromolecules*, 13, 898-904, **1980**.
- [201] Haynie, D. T., Physics of polypeptide multilayer films, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 78, 243-252, **2006**.
- [202] Zhang, L., Li, B., Zhi, Z.-I., Haynie, D. T., Perturbation of nanoscale structure of polypeptide multilayer thin films, *Langmuir*, 21, 5439-5445, **2005**.
- [203] Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., Holle, A., A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376, 952-965, **2003**.
- [204] Watson, J. T., Sparkman, O. D., Abbreviations, *Introduction to Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, Ltd820-823, **2008**.
- [205] Yol, A. M., Dabney, D. E., Wang, S. F., Laurent, B. A., Foster, M. D., Quirk, R. P., Grayson, S. M., Wesdemiotis, C., Differentiation of linear and cyclic polymer architectures by MALDI tandem mass spectrometry (MALDI-MS2), *J Am Soc Mass Spectrom*, 24, 74-82, **2013**.
- [206] Bush, M. F., Campuzano, I. D., Robinson, C. V., Ion mobility mass spectrometry of peptide ions: effects of drift gas and calibration strategies, *Anal Chem*, 84, 7124-7130, **2012**.
- [207] Henderson, S. C., Li, J. W., Counterman, A. E., Clemmer, D. E., Intrinsic size parameters for Val, Ile, Leu, Gln, Thr, Phe, and Trp residues from ion mobility measurements of polyamino acid ions, *Journal of Physical Chemistry B*, 103, 8780-8785, **1999**.
- [208] Mack, E., AVERAGE CROSS-SECTIONAL AREAS OF MOLECULES BY GASEOUS DIFFUSION METHODS, *Journal of the American Chemical Society*, 47, 2468-2482, **1925**.
- [209] Maurer, M. M., Donohoe, G. C., Valentine, S. J., Advances in ion mobility-mass spectrometry instrumentation and techniques for characterizing structural heterogeneity, *Analyst*, 140, 6782-6798, **2015**.
- [210] Park, A. Y., Robinson, C. V., Protein-nucleic acid complexes and the role of mass spectrometry in their structure determination, *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 46, 152-164, **2011**.
- [211] Paglia, G., Kliman, M., Claude, E., Geromanos, S., Astarita, G., Applications of ion-mobility mass spectrometry for lipid analysis, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407, 4995-5007, **2015**.

- [212] Smiljanic, D., Wesdemiotis, C., Non-covalent complexes between single-stranded oligodeoxynucleotides and poly(ethylene imine), *International Journal of Mass Spectrometry*, 304, 148-153, **2011**.
- [213] Smiljanic, D., Wesdemiotis, C., Ternary complexes of poly(ethylene imine), single-stranded oligodeoxynucleotides and glutamic acid moieties, *International Journal of Mass Spectrometry*, 316-318, 235-243, **2012**.
- [214] Schalley, C. A., Springer, A., *Mass spectrometry and gas-phase chemistry of non-covalent complexes*: Wiley, **2009**.
- [215] Laskin, J., Denisov, E., Futrell, J., A comparative study of collision-induced and surface-induced dissociation. 1. Fragmentation of protonated dialanine, *Journal of the American Chemical Society*, 122, 9703-9714, **2000**.
- [216] Pan, S., Sun, X., Lee, J. K., DNA stability in the gas versus solution phases: a systematic study of thirty-one duplexes with varying length, sequence, and charge level, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17, 1383-1395, **2006**.
- [217] Gabelica, V., Pauw, E. D., Comparison between solution-phase stability and gas-phase kinetic stability of oligodeoxynucleotide duplexes, *Journal of mass spectrometry*, 36, 397-402, **2001**.
- [218] Wan, K. X., Gross, M. L., Shibue, T., Gas-phase stability of double-stranded oligodeoxynucleotides and their noncovalent complexes with DNA-binding drugs as revealed by collisional activation in an ion trap, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11, 450-457, **2000**.
- [219] McDaniel, E. W., Mason, E. A., *The mobility and diffusion of ions in gases*, **1973**.
- [220] Wu, J., Zhang, L., Wang, Y., Long, Y., Gao, H., Zhang, X., Zhao, N., Cai, Y., Xu, J., Mussel-inspired chemistry for robust and surface-modifiable multilayer films, *Langmuir*, 27, 13684-13691, **2011**.
- [221] Hong, J., Kang, S. W., Insulin release bio-platform from all nano-container assembled thin films, *Materials Science and Engineering: C*, 32, 1988-1992, **2012**.
- [222] Subel, B., "Applications of mass spectrometry to poly (electrolytes) and kinetics," University of Akron, **2009**.
- [223] Jayagopal, A., Sussman, E. M., Shastri, V. P., Functionalized solid lipid nanoparticles for transendothelial delivery, *IEEE transactions on nanobioscience*, 7, 28-34, **2008**.
- [224] Michaels, A., Morelos, O., Polyelectrolyte adsorption by kaolinite, *Industrial & Engineering Chemistry*, 47, 1801-1809, **1955**.
- [225] Schillén, K., Anghel, D. F., da Graça Miguel, M., Lindman, B., Association of naphthalene-labeled poly (acrylic acid) and interaction with cationic surfactants. Fluorescence studies, *Langmuir*, 16, 10528-10539, **2000**.
- [226] Chelius, D., Jing, K., Lueras, A., Rehder, D. S., Dillon, T. M., Vigel, A., Rajan, R. S., Li, T., Treuheit, M. J., Bondarenko, P. V., Formation of

pyroglutamic acid from N-terminal glutamic acid in immunoglobulin gamma antibodies, *Analytical chemistry*, 78, 2370-2376, **2006**.

- [227] Dimarchi, R. D., Tam, J. P., Kent, S. B., Merrifield, R., Weak acid-catalyzed pyrrolidone carboxylic acid formation from glutamine during solid phase peptide synthesis, *International journal of peptide and protein research*, 19, 88-93, **1982**.
- [228] Wetter, L., Deutsch, H., Immunological studies on egg white proteins IV. Immunochemical and physical studies of lysozyme, *Journal of Biological Chemistry*, 192, 237-242, **1951**.
- [229] Valentine, S. J., Anderson, J. G., Ellington, A. D., Clemmer, D. E., Disulfide-intact and-reduced lysozyme in the gas phase: conformations and pathways of folding and unfolding, *The Journal of Physical Chemistry B*, 101, 3891-3900, **1997**.
- [230] Gross, D. S., Schnier, P. D., Rodriguez-Cruz, S. E., Fagerquist, C. K., Williams, E. R., Conformations and folding of lysozyme ions in vacuo, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 3143-3148, **1996**.

EKLER

EK 1. Standart maddelerin iyonlarının teorik CCS değerleri ve deneysel sürüklenme zamanı verileri kullanılarak cihaz parametrelerine göre belirlenen düzeltilmiş sürüklenme zamanı ve CCS değerleri

Çizelge 1. 1+ yüklü polialanin oligomerlerinin teorik CCS değerleri ve deneysel sürüklenme zamanı verileri kullanılarak cihaz parametrelerine göre belirlenen düzeltilmiş sürüklenme zamanı ve CCS değerleri.

| z | m _{iyon} (Da) | m/z | t _D (ms) | t _D ' (ms) | İndirgenmiş Kütle | Ω' (Å ²) | Teorik Ω (Å ²) |
|---|------------------------|-----------|---------------------|-----------------------|-------------------|----------------------|----------------------------|
| 1 | 303,1418 | 303,1418 | 2,22 | 2,195450535 | 5,06367597 | 840,570211 | 166 |
| 1 | 374,1661 | 374,1661 | 2,78 | 2,752725843 | 5,104822477 | 923,9728683 | 181 |
| 1 | 445,1902 | 445,1902 | 3,39 | 3,360249662 | 5,133421113 | 1001,017117 | 195 |
| 1 | 516,2137 | 516,2137 | 4,06 | 4,027964325 | 5,154453098 | 1087,589604 | 211 |
| 1 | 587,24 | 587,24 | 4,94 | 4,90583142 | 5,170571621 | 1178,89033 | 228 |
| 1 | 658,2609 | 658,2609 | 5,71 | 5,6738242 | 5,183317262 | 1259,546095 | 243 |
| 1 | 729,2922 | 729,2922 | 6,41 | 6,371922371 | 5,193650602 | 1329,574554 | 256 |
| 1 | 800,3214 | 800,3214 | 7,29 | 7,250111167 | 5,202195954 | 1409,795103 | 271 |
| 1 | 871,3531 | 871,3531 | 8,12 | 8,078378646 | 5,209380887 | 1469,04541 | 282 |
| 1 | 942,3909 | 942,3909 | 9,05 | 9,006715276 | 5,21550662 | 1533,358946 | 294 |
| 1 | 1013,4231 | 1013,4231 | 9,84 | 9,795113627 | 5,220790494 | 1597,561891 | 306 |

Çizelge 2. 2+ yüklü polialanin oligomerlerinin teorik CCS değerleri ve deneysel sürüklenme zamanı verileri kullanılarak cihaz parametrelerine göre belirlenen düzeltilmiş sürüklenme zamanı ve CCS değerleri.

| z | m _{iyon} (Da) | m/z | t _D (ms) | t _D ' (ms) | İndirgenmiş Kütle | Ω' (Å ²) | Teorik Ω (Å ²) |
|---|------------------------|----------|---------------------|-----------------------|-------------------|----------------------|----------------------------|
| 2 | 1227,5054 | 613,7527 | 3,12 | 3,085068614 | 5,233078362 | 965,5029577 | 369 |
| 2 | 1298,5312 | 649,2656 | 3,39 | 3,354072226 | 5,236274163 | 994,8920909 | 380 |
| 2 | 1369,5564 | 684,7782 | 3,59 | 3,553102743 | 5,239143451 | 1029,491688 | 393 |
| 2 | 1440,6472 | 720,3236 | 3,88 | 3,842157229 | 5,241736131 | 1058,830698 | 404 |
| 2 | 1511,613 | 755,8065 | 4,15 | 4,111236371 | 5,244084347 | 1090,769544 | 416 |
| 2 | 1582,6408 | 791,3204 | 4,42 | 4,380336111 | 5,2462265 | 1122,692471 | 428 |
| 2 | 1653,6808 | 826,8404 | 4,74 | 4,699455686 | 5,248187256 | 1146,728915 | 437 |
| 2 | 1724,708 | 862,354 | 4,99 | 4,948594131 | 5,249988111 | 1175,997337 | 448 |
| 2 | 1795,736 | 897,868 | 5,32 | 5,277750132 | 5,251648166 | 1202,62743 | 458 |
| 2 | 1866,7638 | 933,3819 | 5,69 | 5,646922668 | 5,253183291 | 1234,498073 | 470 |

Çizelge 3. Sitokrom c proteininin farklı yüke sahip iyonlarının teorik CCS değerleri ve deneysel sürüklenme zamanı verileri kullanılarak cihaz parametrelerine göre belirlenen düzeltilmiş sürüklenme zamanı ve CCS değerleri.

| z | m _{iyon} (Da) | m/z | t _D (ms) | t _D ' (ms) | İndirgenmiş Kütle | Ω' (Å ²) | Teorik Ω (Å ²) |
|----|------------------------|---------|---------------------|-----------------------|-------------------|----------------------|----------------------------|
| 13 | 12367,485 | 951,345 | 5,78 | 5,736510128 | 5,286464417 | 1252,485416 | 3080 |
| 14 | 12368,524 | 883,466 | 5,32 | 5,27809035 | 5,286464918 | 1208,334839 | 3200 |
| 15 | 12369,525 | 824,635 | 4,96 | 4,919509793 | 5,286465402 | 1173,595319 | 3330 |
| 16 | 12370,4 | 773,15 | 4,78 | 4,740794139 | 5,286465824 | 1139,894193 | 3450 |
| 17 | 12372,328 | 727,784 | 4,51 | 4,471961764 | 5,286466755 | 1119,487077 | 3600 |
| 18 | 12374,064 | 687,448 | 4,24 | 4,203030886 | 5,286467592 | 1077,852004 | 3670 |
| 19 | 12375,612 | 651,348 | 3,97 | 3,934014656 | 5,286468339 | 1054,511316 | 3790 |

Çizelge 4. Miyogloblin proteininin farklı yüke sahip iyonlarının teorik CCS değerleri ve deneysel sürüklenme zamanı verileri kullanılarak cihaz parametrelerine göre belirlenen düzeltilmiş sürüklenme zamanı ve CCS değerleri.

| z | m _{iyon} (Da) | m/z | t _D (ms) | t _D ' (ms) | İndirgenmiş Kütle | Ω' (Å ²) | Teorik Ω (Å ²) |
|----|------------------------|----------|---------------------|-----------------------|-------------------|----------------------|----------------------------|
| 15 | 16961,625 | 1130,775 | 7,85 | 7,802585933 | 5,288082947 | 1431,307784 | 4060 |
| 16 | 16961,44 | 1060,09 | 7,22 | 7,174091777 | 5,288082899 | 1381,511657 | 4180 |
| 17 | 16962,413 | 997,789 | 6,77 | 6,725461204 | 5,288083149 | 1340,68461 | 4310 |
| 18 | 16964,496 | 942,472 | 6,32 | 6,276713413 | 5,288083684 | 1304,393975 | 4440 |
| 19 | 16965,385 | 892,915 | 6,05 | 6,007866826 | 5,288083913 | 1271,923341 | 4570 |
| 20 | 16966,5 | 848,325 | 5,78 | 5,738932313 | 5,288084199 | 1242,699787 | 4700 |
| 21 | 16966,467 | 807,927 | 5,51 | 5,46992208 | 5,288084191 | 1213,741229 | 4820 |
| 22 | 16969,282 | 771,331 | 5,23 | 5,190840287 | 5,288084914 | 1182,608081 | 4920 |
| 23 | 16969,17 | 737,79 | 5,05 | 5,011701171 | 5,288084885 | 1151,882838 | 5010 |
| 24 | 16972,176 | 707,174 | 4,78 | 4,742504232 | 5,288085657 | 1121,514833 | 5090 |

Çizelge 5. Ubikitin proteininin farklı yüke sahip iyonlarının teorik CCS değerleri ve deneysel sürüklenme zamanı verileri kullanılarak cihaz parametrelerine göre belirlenen düzeltilmiş sürüklenme zamanı ve CCS değerleri.

| z | m _{iyon} (Da) | m/z | t _D (ms) | t _D ' (ms) | İndirgenmiş Kütle | Ω' (Å ²) | Teorik Ω (Å ²) |
|----|------------------------|----------|---------------------|-----------------------|-------------------|----------------------|----------------------------|
| 7 | 8568,196 | 1224,028 | 8,12 | 8,070669583 | 5,283817921 | 1441,727461 | 1910 |
| 8 | 8568,328 | 1071,041 | 6,41 | 6,363855265 | 5,283818053 | 1314,349741 | 1990 |
| 9 | 8569,152 | 952,128 | 5,51 | 5,466492234 | 5,283818881 | 1227,020162 | 2090 |
| 10 | 8570,13 | 857,013 | 4,87 | 4,828722554 | 5,283819863 | 1162,44037 | 2200 |
| 11 | 8571,266 | 779,206 | 4,6 | 4,560640891 | 5,283821004 | 1124,012832 | 2340 |
| 12 | 8573,16 | 714,43 | 4,15 | 4,112312359 | 5,283822905 | 1091,990067 | 2480 |
| 13 | 8575,255 | 659,635 | 3,97 | 3,933786462 | 5,283825007 | 1056,765001 | 2600 |

- Standart maddelerin iyonlarına ait teorik CCS değerleri [206].

$$t_D' = t_D - \left(\frac{1.41\sqrt{m/z}}{1000} \right)$$

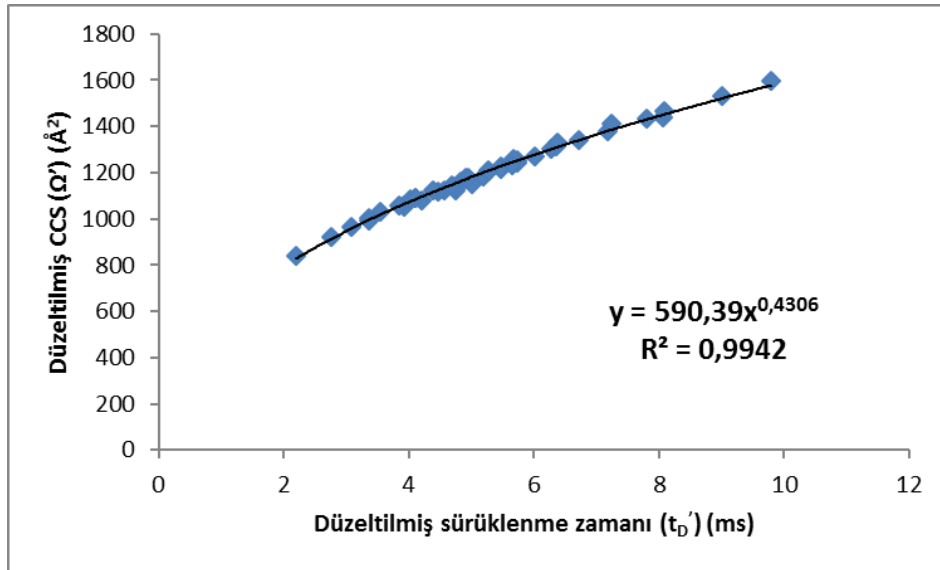
-

$$\text{İndirgenmiş Kütle} = \sqrt{\frac{m_1 * m_N}{m_1 + m_N}}$$

- *m₁: iyonun kütlesi, m_N: sürükleyici gazın molekül ağırlığı (N₂ = 28 Da)*

$$\Omega' = \text{Teorik } \Omega * \sqrt{\frac{m_1 * m_N}{m_1 + m_N}} / z$$

-



Şekil EK-1. Standart proteinler ve polialanin iyonlarının düzeltilmiş sürüklenme zamanlarının düzeltilmiş CCS değerlerine karşı grafiği. Sürüklenme zamanı verileri, 350 m/s dalga hızında ve 8 V dalga yüksekliği değerlerinde elde edilmiştir.

EK 2. Analiz edilen türlerin iyonlarının Şekil EK-1'de verilen kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak belirlenmiş deneysel CCS (Ω) değerleri

Çizelge 1. PLL oligomerlerinin 2+ yüklü iyonlarının Şekil EK-1'de verilen kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak belirlenmiş deneysel CCS değerleri.

| z | m/z | t_D (ms) | t_D' (ms) | m_{iyon} (Da) | İndirgenmiş Kütle | Ω' (\AA^2) | Ω (\AA^2) |
|---|----------|------------|-------------|-----------------|-------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 2 | 266,2036 | 1,33 | 1,306994797 | 532,4072 | 5,158492298 | 662,5314767 | 256,870201 |
| 2 | 330,24 | 1,83 | 1,804376766 | 660,48 | 5,183672695 | 761,225795 | 293,7013349 |
| 2 | 394,2853 | 2,1 | 2,072002168 | 788,5706 | 5,200885781 | 807,935359 | 310,6914449 |
| 2 | 458,3342 | 2,51 | 2,479813675 | 916,6684 | 5,21339573 | 872,9227979 | 334,8768607 |
| 2 | 522,3815 | 3 | 2,96777351 | 1044,763 | 5,222897815 | 943,1215653 | 361,1487717 |
| 2 | 586,4363 | 3,52 | 3,48585481 | 1172,8726 | 5,230361406 | 1010,78171 | 386,5054943 |

Çizelge 2. PSS oligomerlerinin 2+ yüklü iyonlarının Şekil EK-1'de verilen kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak belirlenmiş deneysel CCS değerleri.

| z | m/z | t_D (ms) | t_D' (ms) | m_{iyon} (Da) | İndirgenmiş Kütle | Ω' (\AA^2) | Ω (\AA^2) |
|---|----------|------------|-------------|-----------------|-------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 2 | 511,9944 | 2,71 | 2,678095517 | 1023,9888 | 5,221515066 | 902,3206475 | 345,6164106 |
| 2 | 603,9847 | 3,25 | 3,215347699 | 1207,9694 | 5,23213456 | 976,2281917 | 373,1663169 |
| 2 | 695,9867 | 3,76 | 3,722802001 | 1391,9734 | 5,239989163 | 1039,813827 | 396,8763275 |
| 2 | 787,9819 | 4,36 | 4,320419868 | 1575,9638 | 5,246033241 | 1108,655125 | 422,6641631 |
| 2 | 879,971 | 4,78 | 4,73817333 | 1759,942 | 5,250828146 | 1153,604829 | 439,3991944 |
| 2 | 971,956 | 5,02 | 4,976041545 | 1943,912 | 5,254724951 | 1178,195181 | 448,4326743 |
| 2 | 1063,956 | 5,51 | 5,464008143 | 2127,912 | 5,257954991 | 1226,623766 | 466,5782678 |

Çizelge 3. PLL-PSS komplekslerinin 2+ yüklü iyonlarının Şekil EK-1’de verilen kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak belirlenmiş deneysel CCS değerleri.

| z | m/z | t _D (ms) | t _D ' (ms) | m _{iyon} (Da) | İndirgenmiş Kütle | Ω' (Å ²) | Ω (Å ²) |
|---|-----------|---------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|----------------------|---------------------|
| 2 | 543,3055 | 2,99 | 2,95713443 | 1086,611 | 5,225525753 | 941,6642321 | 360,4093738 |
| 2 | 571,2775 | 3,05 | 3,016299009 | 1142,555 | 5,228743585 | 949,7311133 | 363,2731641 |
| 2 | 635,3215 | 3,46 | 3,424460126 | 1270,643 | 5,235061247 | 1003,077195 | 383,2150755 |
| 2 | 663,2914 | 3,52 | 3,483686234 | 1326,5828 | 5,237443537 | 1010,510895 | 385,879442 |
| 2 | 699,3724 | 4,08 | 4,042711634 | 1398,7448 | 5,240239371 | 1077,388375 | 411,1981528 |
| 2 | 727,3274 | 3,81 | 3,771973699 | 1454,6548 | 5,242217526 | 1045,705654 | 398,9554605 |
| 2 | 755,298 | 3,92 | 3,881249414 | 1510,596 | 5,244052232 | 1058,644494 | 403,7505528 |
| 2 | 763,4637 | 4,66 | 4,621040506 | 1526,9274 | 5,244562845 | 1141,237254 | 435,2077715 |
| 2 | 791,3697 | 4,45 | 4,410334876 | 1582,7394 | 5,246229342 | 1118,532093 | 426,4137231 |
| 2 | 819,3406 | 4,34 | 4,299639982 | 1638,6812 | 5,247787236 | 1106,355889 | 421,6466253 |
| 2 | 855,493 | 5,04 | 4,998759175 | 1710,986 | 5,249651709 | 1180,508347 | 449,7473024 |
| 2 | 883,3891 | 4,74 | 4,698092174 | 1766,7782 | 5,250987296 | 1149,392622 | 437,7815283 |
| 2 | 911,3579 | 4,95 | 4,907433926 | 1822,7158 | 5,252245213 | 1171,172655 | 445,9702879 |
| 2 | 947,4425 | 5,29 | 5,246599419 | 1894,885 | 5,253759621 | 1205,364563 | 458,8579039 |
| 2 | 975,4045 | 5,38 | 5,335963632 | 1950,809 | 5,2548569 | 1214,162599 | 462,1106234 |
| 2 | 1003,3727 | 5,55 | 5,505336757 | 2006,7454 | 5,255893876 | 1230,610271 | 468,2782037 |
| 2 | 1039,4502 | 5,78 | 5,734540887 | 2078,9004 | 5,257149923 | 1252,415728 | 476,461865 |
| 2 | 1067,4146 | 5,97 | 5,923933451 | 2134,8292 | 5,258065665 | 1270,06203 | 483,0909733 |
| 2 | 1131,5255 | 6,47 | 6,422570201 | 2263,051 | 5,259995817 | 1315,038379 | 500,0149906 |

Çizelge 4. PLL-PAA komplekslerinin 2+ yüklü A serisi iyonlarının Şekil EK-1'de verilen kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak belirlenmiş deneysel CCS değerleri.

| z | m/z | t _D (ms) | t _D ' (ms) | m _{iyon} (Da) | İndirgenmiş Kütle | Ω' (Å ²) | Ω (Å ²) |
|---|----------|---------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|----------------------|---------------------|
| 2 | 512,2764 | 2,62 | 2,588086731 | 1024,5528 | 5,221553332 | 862,4670752 | 330,3488523 |
| 2 | 548,2881 | 2,89 | 2,856984071 | 1096,5762 | 5,226122524 | 898,8758708 | 343,9934164 |
| 2 | 576,3291 | 2,98 | 2,946150334 | 1152,6582 | 5,229292003 | 910,5059918 | 348,2329888 |
| 2 | 584,3041 | 3,07 | 3,03591694 | 1168,6082 | 5,230138831 | 922,0093833 | 352,575491 |
| 2 | 612,3389 | 3,25 | 3,21510887 | 1224,6778 | 5,23294359 | 944,3944719 | 360,9419653 |
| 2 | 620,3203 | 3,25 | 3,214882215 | 1224,6778 | 5,23294359 | 944,3666223 | 360,9313214 |
| 2 | 648,3527 | 3,43 | 3,394097493 | 1296,7054 | 5,236196326 | 966,0407844 | 368,9857005 |
| 2 | 656,3196 | 3,43 | 3,393877583 | 1312,6392 | 5,236868426 | 966,0146019 | 368,9283455 |
| 2 | 684,356 | 3,61 | 3,57311412 | 1368,712 | 5,239111061 | 987,036004 | 376,7952206 |
| 2 | 692,3371 | 3,61 | 3,572899658 | 1384,6742 | 5,239716752 | 987,0112223 | 376,7422053 |
| 2 | 712,3894 | 3,97 | 3,93236622 | 1424,7788 | 5,241179517 | 1027,394489 | 392,047052 |
| 2 | 720,374 | 3,79 | 3,752155905 | 1440,748 | 5,241739628 | 1007,430678 | 384,3879131 |
| 2 | 728,3435 | 3,88 | 3,841947146 | 1456,687 | 5,242286608 | 1017,445901 | 388,1687428 |
| 2 | 748,3937 | 4,15 | 4,111426933 | 1496,7874 | 5,243611923 | 1046,71049 | 399,2326301 |
| 2 | 756,3747 | 3,97 | 3,931221803 | 1512,7494 | 5,244120182 | 1027,269408 | 391,7795063 |
| 2 | 764,3675 | 4,06 | 4,021017452 | 1528,735 | 5,244618699 | 1037,020193 | 395,4606626 |
| 2 | 776,4046 | 4,51 | 4,470711707 | 1552,8092 | 5,24535035 | 1084,041831 | 413,334385 |
| 2 | 784,3992 | 4,42 | 4,38050995 | 1568,7984 | 5,24582404 | 1074,838593 | 409,7882753 |
| 2 | 792,383 | 4,33 | 4,290309489 | 1584,766 | 5,246287675 | 1065,524579 | 406,2013543 |
| 2 | 800,3553 | 4,24 | 4,200110322 | 1600,7106 | 5,246741531 | 1056,096083 | 402,572178 |
| 2 | 812,4198 | 4,6 | 4,5598108 | 1624,8396 | 5,247411629 | 1093,02712 | 416,5966757 |
| 2 | 820,4181 | 4,6 | 4,559613452 | 1640,8362 | 5,247845151 | 1093,007332 | 416,5547193 |
| 2 | 828,4133 | 4,51 | 4,469417141 | 1656,8266 | 5,248270243 | 1083,910514 | 413,0543834 |
| 2 | 836,3728 | 4,51 | 4,469222644 | 1672,7456 | 5,248685463 | 1083,890783 | 413,0141884 |
| 2 | 848,426 | 4,96 | 4,918929868 | 1696,852 | 5,249299588 | 1128,243828 | 429,8645218 |
| 2 | 856,4272 | 4,78 | 4,738736664 | 1712,8544 | 5,249697827 | 1110,76743 | 423,1738538 |
| 2 | 884,4474 | 5,05 | 5,008067079 | 1768,8948 | 5,251036325 | 1136,751406 | 432,96269 |
| 2 | 892,4293 | 5,05 | 5,007878287 | 1784,8586 | 5,251402409 | 1136,733481 | 432,9256805 |
| 2 | 928,444 | 5,32 | 5,277036766 | 1856,888 | 5,252976796 | 1161,901384 | 442,3782662 |

Çizelge 5. PLL-PAA komplekslerinin 2+ yüklü B serisi iyonlarının Şekil EK-1'de verilen kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak belirlenmiş deneysel CCS değerleri.

| z | m/z | t _D (ms) | t _D ' (ms) | m _{iyon} (Da) | İndirgenmiş Kütle | Ω' (Å ²) | Ω (Å ²) |
|---|---------|---------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|----------------------|---------------------|
| 2 | 539,307 | 2,98 | 2,947255592 | 1078,614 | 5,225039025 | 938,4646573 | 359,2182385 |
| 2 | 603,352 | 3,34 | 3,305365853 | 1206,704 | 5,232072392 | 986,1935382 | 376,9800814 |
| 2 | 611,338 | 3,43 | 3,395137397 | 1222,676 | 5,232847808 | 997,6924201 | 381,3191045 |
| 2 | 675,379 | 3,79 | 3,753356843 | 1350,758 | 5,238412945 | 1041,937841 | 397,8066837 |
| 2 | 719,348 | 3,97 | 3,932182864 | 1438,696 | 5,241668342 | 1063,129875 | 405,6456098 |
| 2 | 783,411 | 4,42 | 4,380534833 | 1566,822 | 5,245766005 | 1113,967245 | 424,7109933 |
| 2 | 827,387 | 4,6 | 4,559442287 | 1654,774 | 5,24821613 | 1133,425535 | 431,9279186 |

Çizelge 6. PLL-PAA komplekslerinin 2+ yüklü C serisi iyonlarının Şekil EK-1'de verilen kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak belirlenmiş deneysel CCS değerleri.

| z | m/z | t _D (ms) | t _D ' (ms) | m _{iyon} (Da) | İndirgenmiş Kütle | Ω' (Å ²) | Ω (Å ²) |
|---|----------|---------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|----------------------|---------------------|
| 2 | 552,344 | 3,16 | 3,12686218 | 1104,688 | 5,226600501 | 962,7905568 | 368,4194178 |
| 2 | 588,366 | 3,34 | 3,305798678 | 1176,732 | 5,230561475 | 986,2494013 | 377,1103374 |
| 2 | 624,385 | 3,61 | 3,574767347 | 1248,77 | 5,23407266 | 1020,194016 | 389,8279914 |
| 2 | 660,369 | 3,79 | 3,753766319 | 1320,738 | 5,23720392 | 1041,987014 | 397,9172969 |
| 2 | 696,399 | 4,06 | 4,022790984 | 1392,798 | 5,240019761 | 1073,658988 | 409,7919613 |
| 2 | 732,419 | 4,24 | 4,201840831 | 1464,838 | 5,242561791 | 1094,076654 | 417,3824544 |
| 2 | 768,431 | 4,42 | 4,380913971 | 1536,862 | 5,244868219 | 1114,008953 | 424,7995971 |
| 2 | 804,44 | 4,69 | 4,650008661 | 1608,88 | 5,246970629 | 1143,11067 | 435,7221532 |
| 2 | 840,463 | 4,87 | 4,829123057 | 1680,926 | 5,248895814 | 1161,954697 | 442,7425265 |
| 2 | 876,436 | 5,14 | 5,098257427 | 1752,872 | 5,250662262 | 1189,538314 | 453,1002965 |
| 2 | 912,474 | 5,32 | 5,27740787 | 1824,948 | 5,252293828 | 1207,443892 | 459,7777396 |
| 2 | 948,468 | 5,51 | 5,466575937 | 1896,936 | 5,253800993 | 1225,980202 | 466,7021851 |
| 2 | 984,488 | 5,69 | 5,645759062 | 1968,976 | 5,255200081 | 1243,205336 | 473,1333982 |
| 2 | 1020,498 | 5,87 | 5,82495722 | 2040,996 | 5,256501058 | 1260,124399 | 479,4536841 |
| 2 | 1056,474 | 6,14 | 6,094170141 | 2112,948 | 5,257713113 | 1284,99615 | 488,804209 |

Çizelge 7. PGA oligomerlerinin 2+ yüklü iyonlarının Şekil EK-1'de verilen kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak belirlenmiş deneysel CCS değerleri.

| z | m/z | t _D (ms) | t _D ' (ms) | m _{iyon} (Da) | İndirgenmiş Kütle | Ω' (Å ²) | Ω (Å ²) |
|---|----------|---------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|----------------------|---------------------|
| 2 | 474,6215 | 2,15 | 2,119282008 | 949,243 | 5,216050049 | 815,8228575 | 312,8125113 |
| 2 | 539,1398 | 2,44 | 2,407260668 | 1078,2796 | 5,225018518 | 861,832462 | 329,8868546 |
| 2 | 603,6536 | 2,69 | 2,655357198 | 1207,3072 | 5,232102043 | 899,0137525 | 343,6529889 |
| 2 | 668,1756 | 3,11 | 3,073552779 | 1336,3512 | 5,237839401 | 957,4521254 | 365,5904858 |
| 2 | 732,6942 | 3,54 | 3,501833662 | 1465,3884 | 5,242580264 | 1012,774227 | 386,3647958 |
| 2 | 797,2132 | 3,93 | 3,890188701 | 1594,4264 | 5,246563724 | 1059,693725 | 403,9572491 |
| 2 | 861,7291 | 4,29 | 4,248609136 | 1723,4582 | 5,249957691 | 1100,682485 | 419,3109926 |
| 2 | 926,255 | 4,65 | 4,607087443 | 1852,51 | 5,252884559 | 1139,752161 | 433,9528686 |
| 2 | 990,782 | 5,07 | 5,025617867 | 1981,564 | 5,255434221 | 1183,235458 | 450,2902741 |

Çizelge 8. PAA oligomerlerinin 2+ yüklü iyonlarının Şekil EK-1'de verilen kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak belirlenmiş deneysel CCS değerleri.

| z | m/z | t _D (ms) | t _D ' (ms) | m _{iyon} (Da) | İndirgenmiş Kütle | Ω' (Å ²) | Ω (Å ²) |
|---|----------|---------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|----------------------|---------------------|
| 2 | 269,0794 | 1,17 | 1,146870868 | 538,1588 | 5,159870607 | 626,2762546 | 242,7488215 |
| 2 | 305,0913 | 1,35 | 1,325371723 | 610,1826 | 5,175002714 | 666,5267852 | 257,5947577 |
| 2 | 341,0984 | 1,53 | 1,503958922 | 682,1968 | 5,187032633 | 703,8122206 | 271,3737393 |
| 2 | 377,1108 | 1,71 | 1,682618729 | 754,2216 | 5,196828192 | 738,666568 | 284,275924 |
| 2 | 413,1189 | 1,9 | 1,87134129 | 826,2378 | 5,204957046 | 773,2645038 | 297,1261807 |
| 2 | 449,1459 | 2,08 | 2,050117782 | 898,2918 | 5,211815319 | 804,2497776 | 308,6255857 |
| 2 | 485,1543 | 2,26 | 2,228943032 | 970,3086 | 5,217673669 | 833,73956 | 319,5828689 |
| 2 | 521,1647 | 2,35 | 2,317811065 | 1042,3294 | 5,222738627 | 847,894061 | 324,6932774 |
| 2 | 557,1783 | 2,53 | 2,496717479 | 1114,3566 | 5,227161288 | 875,4800564 | 334,9734237 |

Çizelge 9. PLL-PAA komplekslerinin 2+ yüklü iyonlarının Şekil EK-1'de verilen kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak belirlenmiş deneysel CCS değerleri.

| z | m/z | t _D (ms) | t _D ' (ms) | m _{iyon} (Da) | İndirgenmiş Kütle | Ω' (Å ²) | Ω (Å ²) |
|---|---------|---------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|----------------------|---------------------|
| 2 | 512,276 | 2,62 | 2,588086744 | 1024,552 | 5,221553278 | 889,1349388 | 340,5633885 |
| 2 | 576,312 | 3,07 | 3,036150836 | 1152,624 | 5,229290162 | 952,4176269 | 364,2626809 |
| 2 | 584,295 | 3,07 | 3,035917205 | 1168,59 | 5,230137878 | 952,3860683 | 364,1915722 |
| 2 | 648,343 | 3,43 | 3,394097762 | 1296,686 | 5,236195497 | 999,2378972 | 381,6656188 |
| 2 | 692,327 | 3,61 | 3,572899928 | 1384,654 | 5,239715995 | 1021,57386 | 389,9348215 |
| 2 | 756,375 | 4,06 | 4,021221796 | 1512,75 | 5,244120201 | 1074,918555 | 409,9519132 |
| 2 | 800,386 | 4,24 | 4,200109557 | 1600,772 | 5,246743261 | 1095,254422 | 417,4987673 |
| 2 | 812,388 | 4,69 | 4,649811586 | 1624,776 | 5,247409888 | 1144,29146 | 436,1357258 |
| 2 | 848,448 | 4,87 | 4,828929336 | 1696,896 | 5,249300693 | 1163,068166 | 443,1326129 |

Çizelge 10. Lizozimin farklı yüke sahip iyonlarının Şekil EK-1'de verilen kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak belirlenmiş deneysel CCS değerleri.

| z | m/z | t _D (ms) | t _D ' (ms) | m _{iyon} (Da) | İndirgenmiş Kütle | Ω' (Å ²) | Ω (Å ²) |
|----|----------|---------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|----------------------|---------------------|
| 5 | 2861,409 | 13,99 | 13,91457608 | 14307,045 | 5,287274328 | 1834,497677 | 1734,823619 |
| 6 | 2385,022 | 9,3 | 9,231140271 | 14310,132 | 5,287275443 | 1537,368388 | 1744,605597 |
| 7 | 2044,393 | 6,86 | 6,7962469 | 14310,751 | 5,287275666 | 1347,454434 | 1783,939714 |
| 8 | 1788,587 | 8,21 | 8,150368718 | 14308,696 | 5,287274924 | 1457,108593 | 2204,702595 |
| 9 | 1590,007 | 6,86 | 6,803776402 | 14310,063 | 5,287275418 | 1348,097045 | 2294,730736 |
| 10 | 1431,189 | 6,14 | 6,086658207 | 14311,89 | 5,287276077 | 1284,968713 | 2430,303799 |

Çizelge 11. Lizozim-PSS komplekslerinin 7+ yüklü iyonlarının Şekil EK-1’de verilen kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak belirlenmiş deneysel CCS değerleri.

| z | m/z | t _D (ms) | t _D ' (ms) | m _{iyon} (Da) | İndirgenmiş Kütle | Ω' (Å ²) | Ω (Å ²) |
|---|----------|---------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|----------------------|---------------------|
| 7 | 2157,68 | 7,76 | 7,694504324 | 15103,76 | 5,287546829 | 1421,4395 | 1881,794493 |
| 7 | 2184,055 | 7,58 | 7,514105237 | 15288,385 | 5,287605928 | 1406,992384 | 1862,647637 |
| 7 | 2210,4 | 7,85 | 7,783709003 | 15472,8 | 5,287663554 | 1428,512152 | 1891,115983 |
| 7 | 2236,624 | 7,76 | 7,693316927 | 15656,368 | 5,28771957 | 1421,345043 | 1881,607973 |
| 7 | 2262,845 | 7,76 | 7,692927188 | 15839,915 | 5,287774282 | 1421,314037 | 1881,547458 |

Çizelge 12. Lizozim-PSS komplekslerinin 8+ yüklü iyonlarının Şekil EK-1’de verilen kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak belirlenmiş deneysel CCS değerleri.

| z | m/z | t _D (ms) | t _D ' (ms) | m _{iyon} (Da) | İndirgenmiş Kütle | Ω' (Å ²) | Ω (Å ²) |
|---|----------|---------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|----------------------|---------------------|
| 8 | 1865,003 | 8,39 | 8,32910819 | 14920,024 | 5,287486564 | 1470,783362 | 2225,304359 |
| 8 | 1888,315 | 8,57 | 8,508728807 | 15106,52 | 5,287547723 | 1484,35823 | 2245,817242 |
| 8 | 1911,112 | 8,66 | 8,598360064 | 15288,896 | 5,28760609 | 1491,071132 | 2255,948884 |
| 8 | 1934,273 | 8,75 | 8,687987677 | 15474,184 | 5,287663982 | 1497,744035 | 2266,01999 |
| 8 | 1957,084 | 8,84 | 8,777623092 | 15656,672 | 5,287719661 | 1504,378431 | 2276,033569 |
| 8 | 1980,308 | 9,12 | 9,057254081 | 15842,464 | 5,287775033 | 1524,830983 | 2306,952884 |

Çizelge 13. Lizozim-PSS komplekslerinin 9+ yüklü iyonlarının Şekil EK-1’de verilen kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak belirlenmiş deneysel CCS değerleri.

| z | m/z | t _D (ms) | t _D ' (ms) | m _{iyon} (Da) | İndirgenmiş Kütle | Ω' (Å ²) | Ω (Å ²) |
|---|----------|---------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|----------------------|---------------------|
| 9 | 1657,981 | 7,22 | 7,162587179 | 14921,829 | 5,287487163 | 1378,26301 | 2345,985288 |
| 9 | 1678,564 | 7,31 | 7,252231903 | 15107,076 | 5,287547903 | 1385,664528 | 2358,556552 |
| 9 | 1698,879 | 7,31 | 7,251883382 | 15289,911 | 5,287606411 | 1385,635854 | 2358,481648 |
| 9 | 1719,392 | 7,31 | 7,251533572 | 15474,528 | 5,287664088 | 1385,607072 | 2358,406934 |
| 9 | 1739,906 | 7,4 | 7,341185826 | 15659,154 | 5,28772041 | 1392,957692 | 2370,892986 |

- $$t_D' = t_D - \left(\frac{1.41\sqrt{m/z}}{1000} \right)$$

- $$\text{İndirgenmiş Kütle} = \sqrt{\frac{m_1 * m_N}{m_1 + m_N}}$$

m₁: iyonun kütlesi, m_N: sürükleyici gazın molekül ağırlığı (N₂ = 28 Da)

- Ω' değerleri, şekil EK-1’de verilen eğriye (y=590.39x^{0,4306}) göre hesaplanmıştır.

- $$\text{Deneysel } \Omega = \Omega' * \left(z / \sqrt{\frac{m_1 * m_N}{m_1 + m_N}} \right)$$

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Mehmet ATAKAY

Doğum Yeri: Adana

Medeni Hali: Evli

E-posta: mehmetatakay@hacettepe.edu.tr

Adresi: Hacettepe Üniversitesi Beytepe Kampüsü Kimya Bölümü, Fizikokimya Anabilim Dalı, 06800, Ankara/TÜRKİYE

Eğitim

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

Doktora: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

Yabancı Dil Düzeyi

İngilizce: İyi seviyede

İş Deneyimi

2009- Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Fizikokimya Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi

Deneyim Alanları

Kütle Spektrometrisi, Kovalent Olmayan Etkileşimlerin Analizi, Polimer Karakterizasyonu, Fosfopeptit Zenginleştirme.

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

- Atakay M, Alalwiat A, Salih B, Wesdemiotis C, 1st International Mediterranean Science and Engineering Congress, Adana, Turkey, 2016, “Conformational Analysis of Noncovalent Polyelectrolyte Complexes Using Ion Mobility-Mass Spectrometry”. (Sözlü Sunum)
- Atakay M, Wesdemiotis C, Salih B, XIV. ULUSAL SPEKTROSKOPİ KONGRESİ, Elazığ, Türkiye, 2015, “Polielektrolit Komplekslerinin Kütle Spektrometrik Karakterizasyonu”. (Poster Sunumu)
- Atakay M, Marino AJ, Wesdemiotis C, University of Akron Student Innovation Symposium, Akron OH, USA, 2014, “Mass Spectrometric Characterization of Biocompatible Polyelectrolyte Complexes”. (Poster sunumu)
- Atakay M, Marino AJ, Wesdemiotis C, Eleventh Annual Ohio Mass Spectrometry Symposium, Columbus OH, USA, 2014, “Characterization of Noncovalent Complexes of Polyelectrolytes by Ion-Mobility Mass Spectrometry”. (Sözlü sunum)
- Atakay M, Salih B, Wesdemiotis C, 62nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Baltimore MD, USA, 2014, “Characterization of Poly-L-Lysine and Its Noncovalent Complexes by Ion Mobility-Mass Spectrometry”. (Poster sunumu)
- Atakay M, Salih B, Wesdemiotis C, 31st Annual Trent Conference on Mass Spectrometry, Orillia ON, CANADA, 2014, “Conformational Characterization of Noncovalent Polyelectrolyte Complexes Utilizing Ion Mobility-Mass Spectrometry”. (Sözlü Sunum)



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 26/12/2016

Tez Başlığı / Konusu: **MODEL SENTETİK POLİMERLERİN VE KOMPLEKSLERİNİN GAZ FAZİ KARAKTERİSTİKLERİNİN İNCELENMESİ**


Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç ve e)Kaynakça kısımlarından oluşan toplam 139 sayfalık kısmına ilişkin, 26/12/2016 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 1 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç
- 3- 5 kelimededen daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

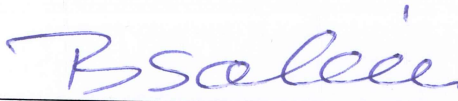
Gereğini saygılarımla arz ederim.


Mehmet Atakay
26.12.2016

Adı Soyadı: MEHMET ATAKAY
Öğrenci No: N10144722
Anabilim Dalı: KİMYA
Programı: DOKTORA
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.


Prof. Dr. BEKİR SALİH

