

**MALDI-KÜTLE SPEKTROMETRESİ'NDE İYON
OLUŞMA MEKANİZMALARINA ETKİ EDEN BAZI
FAKTÖRLERİN BELİRLENMESİ**

**DETERMINATION OF VARIOUS FACTORS AFFECTING
ION GENERATION MECHANISMS IN MALDI-MASS
SPECTROMETRY**

EMRE BİROL

PROF. DR BEKİR SALİH

Tez Danışmanı

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

2021

ÖZET

MALDI-KÜTLE SPEKTROMETRESİ'NDE İYON OLUŞMA MEKANİZMALARINA ETKİ EDEN BAZI FAKTÖRLERİN BELİRLENMESİ

EMRE BİROL

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bekir SALİH

Ocak 2021, 97 sayfa

MALDI kütle spektrometrisinin hızlı örnek hazırlama ve çalışma süresi, yüksek hassasiyet, karmaşık örneklerin ciddi ayrıştırma ön basamakları gerektirmeden analizi gibi önemli avantajları bulunmasına rağmen özellikle nicel analiz için kullanımı sınırlıdır. Bunun nedenleri arasında tekrar edilebilirliğin düşük olması ve iyonlaşma mekanizmalarının iyi anlaşılabilmesi sayılabilir. İyonlaşma mekanizmalarının aydınlatılmasıyla standart analiz yöntemleri geliştirilip tekniğin kullanımı yaygınlaştırılabilir.

Bu amaçla tez kapsamında MALDI'de iyon oluşumuna etki eden bazı parametreler incelenmiştir. Farklı örnek türlerinin MALDI çalışmalarının öncesinde matrikslerin LDI iyon oluşum profilleri araştırılmıştır. Pozitif modda 3-HPA ve PNA dışındaki matriksler hem radikal katyon şeklinde hem de protonlanarak iyonlaştıkları gözlenmiştir. Radikal katyon şeklinde iyonlaşan matrikslerin hepsinin aynı zamanda hidrojen atom transferi de yaparak indirgenme eğiliminde oldukları saptanmıştır. Asit varlığının hem matrikslerin hem de örneklerin iyonlaşma karakterine etki etmediği sadece kristallenme karakterini

değiştirdiği gözlenmiştir. 3-HPA ve PNA matriksin disproporsiyon reaksiyonuyla iyonlaştığı görülmüştür. İyonik organometalik bileşiklerin incelenmesinde matrikslerin katıda halihazırda iyon şeklinde bulunan bu türlerin iyonlaşma karakterine etki etmediği belirlenmiştir. Ancak metal merkezinden birden fazla iyonun ayrılmasıyla oluşan çok yüklü yapıların MALDI'de kararlı olmayışının bir sonucu olarak bu iyonların tek yüklü hale geçişlerinde matrikslere bağlı farklılıklar gözlenmiştir. CHCA, SA ve DHB matrikslerinin örneğe elektron aktararak, diğerlerinin ise örnekten proton alarak tek yüke düşme eğiliminde oldukları görülmüştür. Kolay verebileceği protonu olan bir diğer iyonik organometalik bileşikte elektron alımı sonucu tek yüke indirgenme gözlenmemiştir. Yan grupları farklı bazik perilen diimid türevi organik moleküllerde pozitif modda iyonlaşma büyük oranda protonlanarak gerçekleşmiştir. Yan gruplarında klor atomu bulunan molekülde radikal katyon oluşumu hiç gözlenmezken diğerlerinde matrikslerin elektron aktarma özelliklerine göre farklı bağlı şiddetlerde radikal katyon oluşumu görülmüştür. Buna göre matrikslerin elektron transferiyle radikal katyon oluşturma eğilimlerinin DCTB > PNA > 3-HPA sırasını izlediği tespit edilmiştir. Aynı moleküllerde hidrojen aktarımına ait izotopik pik dağılımları da gözlemlenmiştir. $[M+2H]^+/[M+H]^+$ piklerinin bağlı şiddet oranları incelenerek yapılan karşılaştırmada asidik özellikteki matrikslerin hidrojen atomu aktarma eğilimleri DHB > SA > CHCA olarak belirlenmiştir. Merkez metali değişen ftalosiyanın komplekslerinin MALDI incelemesinde radikal katyon ve protonlanma şeklinde iyonlaşmanın yarışma şeklinde olduğu görülmüştür. MnPc kompleksi tamamen radikal katyon şeklinde iyonlaşırken NiPc ve CoPc komplekslerinin hem protonlanarak hem de radikal katyon şeklinde iyonlaştığı saptanmıştır. Mangan ve kobaltın ftalosiyanın komplekslerinde +3/+2 indirgenme potansiyellerinin bu verilerle uyumlu olduğu görülmüştür. Nikel ftalosiyanın komplekslerinde nikel elektron transferlerinde aktif olmadığından mevcut iyonlaşma karakterinin ftalosiyanın üzerinden yürüdüğü çıkarımı yapılmıştır. +3 yükseltgenme basamaklı kompleksi bulunmayan çinko için de nikel benzer etkileşimlerle iyonlaşmanın ftalosiyanın üzerinden olduğu ve bu etkileşimlerin nikel kıyasla elektron aktarımını kolaylaştırarak radikal katyon şeklinde iyonlaşma eğilimini arttırdığı anlaşılmıştır. Bu bulgular matrikslerin ve örneklerin proton ilgisi, iyonlaşma enerjisi ve elektrokimyasal parametreleriyle yer yer örtüşürken iyonlaşma karakterini açıklamada tüm parametrelerin bir arada değerlendirilmesi gerektiği, daha çok ve güvenilir fizikokimyasal ölçümlere ihtiyaç olduğu kanaatini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: MALDI, iyonlaşma mekanizması, matriks, yük transferi, iyonlaşma verimi.

ABSTRACT

DETERMINATION OF VARIOUS FACTORS AFFECTING ION GENERATION MECHANISMS IN MALDI-MASS SPECTROMETRY

EMRE BİROL

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Bekir SALİH

January 2021, 97 pages

MALDI mass spectrometry has important advantages such as fast sample preparation and working time, high sensitivity, analysis of complex samples without requiring serious separation preliminary steps. Despite this fact, its usage is limited, especially for quantitative analysis. The reasons for this include the low reproducibility and the poor understanding of ionization mechanisms. By enlightening the ionization mechanisms, standard analysis methods can be developed and the use of the technique can be expanded.

For this purpose, various parameters that affect ion formation in MALDI were examined within the scope of the thesis. LDI ion formation profiles of matrices were investigated before MALDI studies of different sample types. In positive mode, it was observed that matrices other than 3-HPA and PNA were ionized both as radical cation and by protonation. It was determined that all the matrix molecules ionized in the form of radical

cations also tend to be reduced by hydrogen atom transfer. It was found that the presence of acid did not affect the ionization character of both matrices and samples, but only changed the crystallization behavior. It was observed that 3-HPA and PNA matrix were ionized by disproportionation reaction. In the study of ionic organometallic compounds, it was determined that matrices do not affect the ionization character of these species, which are already in the form of ions in the solid. However, as a result of the instability of the highly charged structures formed upon removal of more than one ion from the metal center in MALDI, differences due to matrices were observed in the transition of these ions to single charged state. It was observed that CHCA, SA, and DHB matrices tend to drop to single charge state by transferring electrons to the sample, while others tend to take protons from the sample. In another ionic organometallic compound that has a proton that it can give easily, charge reduction was not observed as a result of electron uptake. Ionization in positive mode in organic molecules of basic perylene diimide derivative with different side groups was mostly due to protonation. While no radical cation formation was observed for the molecule with chlorine in its side groups, radical cation formation with different relative intensities was observed with the others depending on the electron transfer properties of the matrix. Accordingly, it was found that the tendency of the matrices to induce radical cations by electron transfer follows the order of DCTB > PNA > 3-HPA. Isotopic distribution variations caused by hydrogen transfer were also observed in the same molecules. Examining the relative intensity ratios of $[M + 2H]^+ / [M + H]^+$ peaks, hydrogen atom transfer tendencies of acidic matrices were determined as DHB > SA > CHCA. In MALDI analysis of phthalocyanine complexes with different metal centers, it was observed that ionization in the form of radical cation and protonation competed. While the manganese complex was completely ionized as a radical cation, it was found that nickel and cobalt phthalocyanine complexes were ionized both by protonation and as radical cation. It was seen that +3 / +2 reduction potentials of manganese and cobalt phthalocyanine complexes were compatible with these data. As nickel is not active in electron transfers in nickel phthalocyanine complexes, it was concluded that the observed ionization character is based on phthalocyanine. It was found that for zinc, which does not have a known +3 oxidation state complex, ionization takes place through phthalocyanine with interactions similar to nickel, and these interactions increase the tendency of ionization in the form of radical cation by facilitating electron transfer stronger compared to nickel. While these findings partially

agree with the proton affinity, ionization energy and electrochemical parameters of the matrices and samples, it was concluded that all parameters should be evaluated together and more reliable physicochemical measurements were needed to explain the ionization character.

Keywords: MALDI, ionization mechanism, matrix, charge transfer, ionization yield.

TEŞEKKÜR

Bilimsel tartıőmalarda bulunmaktan büyük keyif aldığım, yoğun programına rağmen çalışmalarımnda farketmediğim ya da hatırlamadığım önemli detaylara dikkat çekerek bilgisi, hafızası ve yönetim becerisine hayran bırakan, yaşadığım problemlerde hep yanımda olan, sabrı ve pozitif yaklaşımını esirgemeyen çok değerli hocam Prof. Dr. Bekir Salih'e içten duygularla teşekkür ederim.

Laboratuvar işleyiş ve düzeni hakkında ekibe ilk katıldığım andan itibaren bana tecrübelerini aktaran, bu alanda neden olduğum aksaklıklarda göstermiş oldukları destek ve tahammülden ötürü başta Dr. Mehmet Atakay, Dr. Ülkü Güler, Nazire Barlas ve Öykü Ülkü olmak üzere tüm SAREG Lab ailesine,

Varlığı ile laboratuvarda geçirdiğim vakitleri daha eğlenceli kılan Buğra Balaban'a,

Deneylerde kullandığımız kimyasalları bize sağlayan Prof. Dr. Abdurrahman Şengül'e,

Çekilmez Beytepe yollarının EGO otobüs seferlerinde bana eşlik eden Tomris Beytepelii'ye,

Bana onlarca yıldır nasıl katlandıklarına hala anlam veremediğim, her zaman yanımda olan aileme

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Emre BİROL

Ocak 2021, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xviii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Kütle Spektrometrisi.....	5
2.1.1. Genel Cihaz Bileşenleri ve Kavramlar.....	5
2.1.2 İyon Kaynakları.....	7
2.1.2.1 İyon Kaynaklarının Gelişimi.....	8
2.1.2.2 MALDI İyonlaşma Kaynağı.....	11
2.1.3. Kütle Analizörleri.....	13
2.1.3.1 Uçuş Zamanlı Kütle Analizörü.....	14
2.1.4. Dedektörler.....	16
2.2. MALDI'de İyon Oluşumuna Etki Eden Faktörler.....	16
2.2.1. Lazer Dalga Boyu, Enerji Yoğunluğu, Dalga Profili ve Lazer Spot Büyüklüğü.....	16
2.2.2. Desorpsiyon.....	18
2.2.3. Matriks.....	20
2.3 MALDI İyonlaşma Mekanizmaları.....	22
2.3.1. Fotoiyonlaşma Mekanizmaları.....	23
2.3.1.1 Birleştirilmiş Fiziksel ve Kimyasal Dinamik Modeli (cpcd).....	25
2.3.2. Önceden Katı Halde Var Olan İyonların Desorpsiyonu.....	26
2.3.2.1 Küme İyonlaşma Modeli.....	27
2.3.3. İyonlaşmaya Katkıda Bulunan Diğer Mekanizmalar.....	28
2.3.4. Gaz Fazı İkincil İyonlaşma Reaksiyonları.....	29

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	30
3.1. Kullanılan Kimyasallar	30
3.2. Araç Gereçler	30
3.3. MALDI Cihaz Parametreleri	30
3.3.1. Pozitif ve Negatif Mod MALDI Yöntemleri	31
3.4. Matris ve Örnek Çözeltilerinin Hazırlanışı	31
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	34
4.1. Deneylerde Kullanılan MALDI Matrislerinin LDI Spektrumları	34
4.1.1. DHB LDI Spektrumu.....	34
4.1.2. 3-HPA LDI Spektrumu.....	37
4.1.3. CHCA LDI Spektrumu	40
4.1.4. SA LDI Spektrumu	43
4.1.5. PNA LDI Spektrumu.....	45
4.1.6. DCTB LDI Spektrumu	48
4.2. İyonik Organometalik Bileşiklerin MALDI İncelemesi.....	50
4.2.1. B-19 Yapısı	50
4.2.2. B-19 MALDI Deneyleri	51
4.2.3. Nitrato-2,6-bis(-benzimidazol-2-il)piridinplatin(II)nitrat (B-17_R) Yapısı.....	55
4.2.4. B-17_R MALDI Deneyleri.....	56
4.3. Yan Gruplarının Polaritesi Farklı Olan Organik Bileşiklerin MALDI İncelemesi	60
4.3.1. FP-49 Yapısı	60
4.3.2. FP-49 MALDI Deneyleri	60
4.3.3. FP-50 Yapısı	66
4.3.4. FP-50 Deneyleri	66
4.3.5. FP-53 Yapısı	71
4.3.6. FP-53 Deneyleri	72
4.4. Nötral Organometalik Bileşiklerin MALDI İncelemesi.....	76
4.4.1. MnPc Kompleksinin MALDI-MS Çalışmaları	77
4.4.2. NiPc Kompleksinin MALDI-MS Çalışmaları.....	78
4.4.3. CoPc Kompleksinin MALDI-MS Çalışmaları	79
4.4.4. ZnPc Kompleksinin MALDI-MS Çalışmaları.....	80

4.4.5. İndirgenme Potansiyellerinin MALDI İyonlaşmasına Etkisi	81
5. SONUÇLAR	83
6. KAYNAKLAR.....	86

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Genel kütle spektrometrisinin şematik gösterimi.	6
Şekil 2.2. ESI iyon kaynağının şematik gösterimi.....	11
Şekil 2.3. Şematik MALDI iyonlaşma işlemi (m = matriks, A = analit).....	12
Şekil 2.4. TOF kütle analizörünün şematik gösterimi.	15
Şekil 2.5. Reflektron TOF [2].	16
Şekil 2.6. Farklı yüzeyden kalkış şekillerine ait moleküler dinamik simülasyonlarından anlık çekimler. (a) monomerlerin desorpsiyonu, (b) aşırı ısıtılmış materyalin faz patlaması ile iyon/molekül kümelerinin oluşumu, (c) hızlı erime üzerine sıvının hareketi ile hidrodinamik püskürtme, (d) mekanik stres etkisiyle soğuk halde yüzeyden kalkma [44].....	19
Şekil 2.7. Sık kullanılan MALDI matriksleri.	22
Şekil 2.9. Küçük organik moleküller için fotoiyonlaşma ve takip eden fotokimyasal reaksiyon yolları [71].	25
Şekil 2.10. Eksiton ortaklama ve atlama [45].	26
Şekil 2.11. Küme iyonlaşmasında gerçekleşen olaylar [45].	28
Şekil 4.1.1. DHB'nin 150-160 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=154,02$ Da) (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) TFA ilavesiz çözeltisinin, (C) teorik pozitif mod LDI spektrumları. Teorik spektrum DHB molekülünün hesaplanmış doğal izotopik dağılımını göstermektedir.	35
Şekil 4.1.2. DHB'nin 120-185 m/z bölgesindeki asit ilavesiz çözeltisinin ($M_{\text{mono}}=154,02$ Da) (A) 40%, (B) 50%, (C) 60%, (D) 70%, (E) 80% lazer şiddetinde pozitif mod LDI spektrumları.	36
Şekil 4.1.3. DHB'nin 150-160 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=154,02$ Da) (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) asit ilavesiz çözeltisinin, (C) teorik negatif mod LDI spektrumları. Teorik spektrum DHB molekülünün hesaplanmış doğal izotopik dağılımını göstermektedir.	36
Şekil 4.1.4. 3-HPA'nin 135-145 m/z ($M_{\text{mono}}=139,02$ Da) bölgesindeki (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) asit ilavesiz çözeltisinin, (C) teorik pozitif mod LDI spektrumları. Teorik spektrum 3-HPA nötral molekülüne ait doğal izotopik dağılımını göstermektedir.	38

Şekil 4.1.5. 3-HPA'nın 135-165 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=139,02$ Da) (A) 60%, (B) 70%, (C) 80% lazer şiddetinde asit ilavesiz çözeltisinin pozitif mod LDI spektrumları.	39
Şekil 4.1.6. 3-HPA'nın 135-145 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=139,02$ Da) (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) asit ilavesiz çözeltisinin, (C) teorik negatif mod LDI spektrumları. Teorik spektrum nötral moleküle ait doğal izotopik dağılımı göstermektedir.	40
Şekil 4.1.7. CHCA'nın 185-195 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=189,04$ Da) (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) asit ilavesiz çözeltisinin, (C) teorik pozitif mod LDI spektrumları. Teorik spektrum CHCA nötral molekülüne ait doğal izotopik dağılımı göstermektedir.	41
Şekil 4.1.8. CHCA'nın 170-215 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=189,04$ Da) (A) 30%, (B) 40%, (C) 50%, (D) 60%, (E) 70% lazer şiddetinde asit ilavesiz çözeltisinin pozitif mod LDI spektrumları.	42
Şekil 4.1.9. CHCA'nın 185-195 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=189,04$ Da) (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) asit ilave edilmemiş çözeltisinin, (C) teorik negatif mod LDI spektrumları. Teorik spektrum CHCA molekülüne ait doğal izotopik dağılımı göstermektedir.	42
Şekil 4.1.10. SA'nın 220-230 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=224,06$ Da) (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) asit ilavesiz çözeltisinin, (C) teorik pozitif mod LDI spektrumları. Teorik spektrum SA molekülüne ait doğal izotopik dağılımı göstermektedir.	43
Şekil 4.1.11. SA'nın 220-230 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=224,06$ Da) (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) asit ilavesiz çözeltisinin, (C) teorik negatif mod LDI spektrumları. Teorik spektrum SA molekülüne ait doğal izotopik dağılımı göstermektedir.	44
Şekil 4.1.12. SA'nın 220-250 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=224,06$ Da) asit ilavesiz çözeltisinin (A) 60%, (B) 70%, (C) 80% lazer şiddetindeki pozitif mod LDI spektrumları.	45
Şekil 4.1.13. PNA'nın 135-145 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=138,04$ Da) (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) asit ilavesiz çözeltisinin, (C) teorik pozitif mod LDI spektrumları. Teorik spektrum PNA molekülüne ait doğal izotopik dağılımı göstermektedir.	46

Şekil 4.1.14. PNA'nın 135-145 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=138,04$ Da) (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) asit ilavesiz çözeltisinin, (C) teorik negatif mod LDI spektrumları. Teorik spektrum PNA molekülüne ait doğal izotopik dağılımı göstermektedir.	47
Şekil 4.1.15. PNA'nın 135-165 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=138,04$ Da) molekül ve sodyum kütle bölgelerine ait (A) 40%, (B) 50%, (C) 60%, (D) 70%, (E) 80%, (F) 90%, (G) 100% lazer şiddetindeki asit ilavesiz çözeltisinin pozitif mod LDI spektrumları.	48
Şekil 4.1.16. DCTB molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=250,14$ Da) (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) asit ilavesiz çözeltisinin, (C) teorik pozitif mod LDI spektrumları. Teorik pikler DCTB molekülünün doğal izotopik dağılımını gösterir.	49
Şekil 4.1.17. DCTB molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=250,14$ Da) (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) asiti ilavesiz çözeltisinin, (C) teorik negatif mod LDI spektrumları. Teorik pikler DCTB nötral molekülünün doğal izotopik dağılımını göstermektedir.	50
Şekil 4.2.1. B-19 molekülünün yapısı.	51
Şekil 4.2.2. B-19'un 565-575 m/z bölgesindeki yapıdan 1 klor iyonu ayrılmış halinin 1% TFA ilave edilmiş farklı matrikslerde MALDI ve TFA ilave edilmiş LDI pozitif mod spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.	52
Şekil 4.2.3. B-19 530-540 m/z bölgesindeki yapıdan ikinci bir klor iyonu ayrılmış halinin 1% TFA ilave edilmiş farklı matrikslerde MALDI ve TFA ilave edilmiş LDI pozitif mod spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.	53
Şekil 4.2.4. B-19 565-575 m/z bölgesindeki yapıdan bir klor iyonu ayrılmış halinin asit ilavesiz farklı matrikslerde MALDI ve asit ilavesiz LDI pozitif mod spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.	54
Şekil 4.2.5. B-19 530-540 m/z bölgesindeki yapıdan iki klor iyonu ayrılmış halinin asit ilavesiz farklı matrikslerde MALDI ve asit ilavesiz LDI pozitif mod spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.	55

Şekil 4.2.6. B-17_R molekül yapısı.	56
Şekil 4.2.7. B-17_R 565-575 m/z bölgesindeki yapıdan bir nitrat ayrılmış halinin 1% TFA ilave edilmiş farklı matrislerde MALDI ve TFA ilave edilmiş LDI pozitif mod spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DHB, (D) PNA, (E) SA, (F) LDI, (G) Teorik izotopik dağılım.....	57
Şekil 4.2.8. B-17_R 500-515 m/z bölgesindeki yapıdan iki nitrat ayrılmış halinin asit ilavesiz farklı matrislerde MALDI ve asit ilavesiz LDI pozitif mod spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DHB, (D) PNA, (E) SA, (F) LDI ve (G) Teorik izotopik dağılım.....	58
Şekil 4.2.9. B-17_R 565-575 m/z bölgesindeki yapıdan bir nitrat ayrılmış halinin asit ilavesiz farklı matrislerde MALDI ve asit ilavesiz LDI pozitif mod spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DHB, (D) PNA, (E) SA, (F) LDI, (G) Teorik izotopik dağılım.....	58
Şekil 4.2.10. B-17_R 500-515 m/z bölgesindeki yapıdan iki nitrat ayrılmış halinin asit ilavesiz farklı matrislerde MALDI ve asit ilavesiz LDI pozitif mod spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DHB, (D) PNA, (E) SA, (F) LDI, (G) Teorik izotopik dağılım.....	59
Şekil 4.3.1. Perilen dimid yapısı ve süstitüent bölgeleri.	60
Şekil 4.3.2. FP-49 yapısı.	60
Şekil 4.3.4. FP-49, 910-920 m/z aralığındaki molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=912,03$ Da) asit ilavesiz farklı matrislerde negatif mod MALDI spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.	62
Şekil 4.3.5. FP-49 910-920 m/z aralığındaki molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=912,03$ Da) 1% TFA ilave edilmiş farklı matrislerde pozitif mod MALDI spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) Teorik izotopik dağılım.	63
Şekil 4.3.6. Asit ilavesiz FP-49 MALDI deneylerinin matris kütle bölgelerindeki izotopik dağılımlar. A sütununun altında kalan pikler örneğin MALDI spektrumlarının (şekil 4.3.3) matris bölgesine ait iken B sütununun altındaki pikler matrislerin asit ilavesiz LDI spektrumlarına aittir.....	64
Şekil 4.3.7. Kırmızı renkli pikler FP-49'un tamamen $[\text{FP-49}+\text{H}]^+$ şeklinde iyonlaştığında beklenen teorik izotopik dağılım olup bunlar örneğin farklı matrislerde	

MALDI ve LDI spektrumundaki [FP-49+H] ⁺ piki ile üst üste gelecek şekilde çakıştırılmıştır. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, asit ilavesiz pozitif mod.	65
Şekil 4.3.8. FP-50 molekülü.	66
Şekil 4.3.9. FP-50'nin 1260-1275 m/z aralığındaki molekül kütle bölgesinde (M _{mono} =1264,33 Da) asit ilavesiz farklı matrikslerde pozitif mod MALDI spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.	67
Şekil 4.3.10. FP-50, 1260-1275 m/z aralığındaki molekül kütle bölgesinde (M _{mono} =1264,33 Da) 1% TFA ilave edilmiş farklı matrikslerde pozitif mod MALDI spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.	68
Şekil 4.3.11. FP-50'nin 1260-1275 m/z aralığındaki molekül kütle bölgesinde (M _{mono} =1264,33 Da) asit ilavesiz farklı matrikslerde negatif mod MALDI spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.	69
Şekil 4.3.12. FP-50 Na katılım iyonu bölgesi asit ilavesiz farklı matrikslerde pozitif mod MALDI spektrumu. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA (F) SA, (G) LDI, (H) teorik izotopik dağılım.	70
Şekil 4.3.13. Asit ilavesiz FP-50 MALDI deneylerinin matriks kütle bölgelerindeki izotopik dağılımlar. A sütununun altında kalan pikler örneğin MALDI spektrumlarının (şekil 4.3.9) matriks bölgesine ait iken B sütununun altındaki pikler matrikslerin asit ilavesiz LDI spektrumlarına aittir.	71
Şekil 4.3.14. FP-53 molekülü.	72
Şekil 4.3.15. FP-53, 1365-1375 m/z aralığındaki molekül kütle bölgesinde (M _{mono} =1368,54 Da) asit ilavesiz farklı matrikslerde pozitif mod MALDI spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.	73
Şekil 4.3.16. FP-53, 1365-1375 m/z aralığındaki molekül kütle bölgesinde (M _{mono} =1368,54 Da) asit ilavesiz farklı matrikslerde negatif mod MALDI spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.	74

Şekil 4.3.17. FP-53, 1365-1375 m/z aralığındaki molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=1368,54$ Da) 1% TFA ilave edilmiş farklı matrislerde pozitif mod MALDI spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.....	75
Şekil 4.3.18. Asit ilavesiz FP-53 MALDI deneylerinin matris kütle bölgelerindeki izotopik dağılımlar. A sütununun altında kalan pikler örneğin MALDI spektrumlarının (şekil 4.3.15) matris bölgesine ait iken B sütununun altındaki pikler matrislerin asit ilavesiz LDI spektrumlarına aittir.....	76
Şekil 4.4.1. MnPc Kompleksi.....	77
Şekil 4.4.2. MnPc Kompleksi molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=1523,61$ Da) DHB ve CHCA ile MALDI spektrumları. Kırmızı pikler örneğin doğal izotopik dağılımını gösterir.....	78
Şekil 4.4.3 NiPc kompleksi.....	78
Şekil 4.4.4. NiPc kompleksinin molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=1526,60$ Da) DHB ve CHCA matrisleri ile asitsiz pozitif mod MALDI spektrumları. Solda mavi, sağda ise kırmızı renkli pikler doğal izotopik dağılımı göstermektedir.	79
Şekil 4.4.5. CoPc Kompleksi.	79
Şekil 4.4.6. CoPc kompleksinin molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=1527,60$ Da) DHB ve CHCA ile alınmış asitsiz pozitif mod MALDI spektrumları. Kırmızı pikler teorik izotopik dağılımı aittir.	80
Şekil 4.4.7. ZnPc kompleksi.....	80
Şekil 4.4.8. ZnPc kompleksinin molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=2574,92$ Da) asitsiz pozitif mod DHB ile MALDI ve LDI spektrumları. Kırmızı pikler teorik dağılımı verir.	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.MALDI'de kullanılan bazı lazerler ve ilgili parametreler [33].	17
Çizelge 2.2. Bazı matrikslerin iyonlaşma enerjisi (IP) değerleri [45].	24
Çizelge 4.1. Deneylerde kullanılan matriksler için literatürde bildirilen bazı proton ilgisi değerleri.....	37
Çizelge 4.2. Deneylerde kullanılan matrikslerin iyonlaşma enerjisi verileri. Birden çok veri farklı teorik hesaplama (calc) veya deneysel (exp) ölçüme aittir. Değerlendirmelerde ortalamaları esas alınmıştır.....	67

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Celcius Derecesi
AC	Alternatif Akım
Da	Dalton
DC	Doğru Akım
e	Elektron Yüğü
eV	Elektronvolt
IE	İyonlaşma Enerjisi
IR	Mor Ötesi
J/cm ²	Joule/santimetre ²
k	Boltzmann Sabiti
K	Kelvin
kHz	kiloHertz
kV	Kilovolt
M	Kütle
m/z	Kütle/Yük
mL	mililitre
mTorr	MiliTorr
nm	nanometre
P	Basınç
PA	Proton İlgisi
S ₀	Singlet Temel Hal Enerji Seviyesi
S ₁	Singlet Uyarılmış Hal Enerji Seviyesi
S _n	Singlet n. Uyarılmış Hal Enerji Seviyesi
t	Uçuş Süresi
T	Sıcaklık
UV	Kızıl Ötesi
V _a	İvmelenme Potansiyeli
W/cm ²	Watt/santimetre ²
π	Pi Sayısı

Kısaltmalar

3-HPA	3-hidroksipikolinik asit
ACN	Asetonitril
APCI	Atmosferik Basınç Kimyasal İyonlaşma
ASE	Analit Baskılanma Etkisi
B-17_R	Nitrato-2,6-bis(-benzimidazol-2-il)piridinplatin(II)nitrat
B-19	Kloro-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il)piridinplatin(II)klorür
CCS	Çarpışma Kesiti
CE	Kapiler Elektroferez
CHCA	α -siyano-4-hidroksisinamik asit
CI	Kimyasal İyonlaşma
CID	Çarpışmayla İndüklenmiş Parçalanma
CoPc	Kobalt (II) 2,2',2'',2'''-(ftalosiyanın-2,9,16,23-tetrailetetrakis(oksi))tetraakis (N,N-dibenziletanamin)
CPCD	Birleştirilmiş Fiziksel ve Kimyasal Dinamik Modeli
CW	Sürekli Dalga
DCTB	trans-2-[3-(4-tert-bütilfenil)-2-metil-2-propenildien]malononitril
DE	Gecikmeli Ekstraksiyon
DHB	2,5-dihidroksibenzoik asit
DIOS	Gözenekli Silikon Üzerinden Desorpsiyon/İyonlaşma
EI	Elektron İyonlaştırması
ESI-MS	Elektrosprey İyonlaştırmalı-Kütle Spektrometrisi
ESPT	Uyarılmış Hal Proton Transferi
ET	Elektron Transferi
FAB	Hızlı Atom Bombardımanı
FD	Alan Desorpsiyonu
FI	Alan İyonlaşması
FP-49	5,6,12,13-tetrakloro-2,9-bis(2-(piridin-2-il)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-5-il)antra[2,1,9- <i>def</i> :6,5,10- <i>d'e'f'</i>]diizokinolin-1,3,8,10(2 <i>H</i> ,9 <i>H</i>)-tetraon
FP-50	5,6,12,13-tetrakis(4-metoksifenoksi)-2,9-bis(2-(piridin-2-il)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-5-il)antra[2,1,9- <i>def</i> :6,5,10- <i>d'e'f'</i>]diizokinolin-1,3,8,10(2 <i>H</i> ,9 <i>H</i>)-tetraon

FP-53	5,6,12,13-tetrakis(4-(tert-bütül)fenoksi)-2,9-bis(2-(piridin-2-il)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-5-il)antra[2,1,9- <i>def</i> :6,5,10- <i>d'e'f'</i>]diizokinolin-1,3,8,10(2 <i>H</i> ,9 <i>H</i>)-tetraon
FT-ICR	Fourier Dönüşümlü-İyon Siklotron Rezonansı
FWHM	Yarı Yüksekliğindeki Tam Genişliği
GB	Gaz Fazı Bazlık
GC	Gaz Kromatografisi
ICP-MS	Eşlenmiş İndüktiflenmiş Plazma-Kütle Spektrometrisi
IM	İyon Hareketliliği
L	İyon Ortalama Serbest Yol
LC	Sıvı Kromatografisi
LDI	Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırması
MALDI-MS	Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırmalı-Kütle Spektrometrisi
Metastable	Yarı Kararlı
M _{mono}	monoizotopik kütle
MnPc	Mangan (II) 2,2',2'',2'''-(ftalosiyenin-2,9,16,23-tetrailtetrakis(oksi))tetrakis (N,N-dibenziletanamin)
MS/MS	Ardışık Kütle Spektrometrisi
MSE	Matriks Baskılanma Etkisi
NALDI	Nanoyapıyla Geliştirilmiş Lazer Desorpsiyon/İyonlaşması
NiPc	Nikel (II) 2,2',2'',2'''-(ftalosiyenin-2,9,16,23-tetrailtetrakis(oksi))tet rakis(N,N-dibenziletanamin)
PD	Plazma Desorpsiyonu
PFM	Polar Akışkan Modeli
PNA	4-nitroanilin
R	Kütle Ayırma Gücü
SA	3,5-dimetoksi-4-hidroksisinamik asit, Sinapinik asit
SELDI	Geliştirilmiş Yüzey Lazer Desorpsiyon/İyonlaşması
SIMS	İkincil İyon Kütle Spektrometrisi
TFA	Trifloroasetik asit
THF	Tetrahidrofuran
TOF	Uçuş Zamanlı Kütle Analizörü

1. GİRİŞ

Kütle spektrometrisi, gelişen cihaz teknolojileriyle beraber günümüzde kullanılan en güçlü kimyasal analiz yöntemlerinden biri haline gelmiştir. Tekniğin kökeni 1897’de J.J. Thompson’ın [1] bir parçacık olarak elektronu keşfedip kütle/yük oranını hesapladığı katod ışın tüpü deneylerine kadar dayanmakta olup, yaklaşık 120 yıllık süreçte yaşanan gelişmelerle analiz edilebilen kimyasal tür yelpazesi sürekli artış göstermiştir. Bütün kütle spektrometrik yöntemlerde analitlerin gözlenebilmesi için gaz fazında iyonik halde bulunmaları gerekir. Bu nedenle örneklerin gaz fazına geçme ve iyonlaşma süreçleri birinci derece öneme sahiptir. İlgili süreçlerde örneğe enerji aktarımı gerçekleşir. Kontrollü enerji aktarımı, oluşan kimyasal türler ve gözlenen iyon verimlerini etkiler. Buharlaşma enerjileri türden türe değiştiğinden başlarda örneklerin gaz fazına geçişi önemli bir problemdi. Özellikle büyük moleküllerin faz geçişi için gerekli enerji yüksek olduğundan, sistemdeki fazla enerji kimyasal bağların kopmasına ve parçalanma ürünlerinin oluşmasına neden olur. Bu nedenle büyük moleküllerin analizi “yumuşak iyonlaşma” yöntemlerinin ortaya çıktığı 1980’lerden sonra mümkün olmuştur. Yumuşak iyonlaşma yöntemleri enerjinin örneğe kontrollü aktarımını sağlayarak parçalanma ürünlerinin oluşmasını engeller ve molekülün bir bütün olarak analizine olanak tanır. Önceleri kütle spektrometreleri daha çok fizikçiler tarafından kullanılmaktaydı. Biyomoleküller ve polimerler gibi kimyasal araştırma konularının büyük çoğunluğunu oluşturan iki önemli molekül sınıfının analizleri de bu iyonlaşma yöntemlerinin gelişimiyle birlikte başarıyla yapılınc kimyacılar kütle spektrometrisini daha aktif bir şekilde kullanmaya başlamıştır.

Günümüzde kullanımları en yaygın olan yumuşak iyonlaşma esaslı iki kütle spektrometrik yöntem Elektrosprey İyonlaştırmalı-Kütle Spektrometrisi (ESI-MS) ve Matris-Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırmalı-Kütle Spektrometrisi’dir (MALDI-MS). Her ikisi de yumuşak iyonlaşma nedeniyle büyük moleküllerin analizine olanak tanısa da spektrumlarda ortaya çıkan iyon karakterleri birbirinden ciddi farklılıklar göstermektedir. Örneğin ESI’da çok yüklü iyonlar gözlemlenirken MALDI’de çoğunlukla tek yüklü iyonlara rastlanır. Benzer şekilde ESI’da iyonik türlerin bağlı izotopik dağılımları çözelti fazındaki dağılımlarını yansıtırken MALDI’de bu

dağılımlardan ciddi sapmalar gözlenir. Bunun temel nedeni enerjinin örneğe aktarılış biçimidir.

ESI'da enerji aktarımı çözelti fazındaki örnek üzerine uygulanan yüksek elektriksel potansiyel vasıtasıyla gerçekleşir. Bu tür enerji aktarımıyla ortaya çıkan süreçler iyi tanımlanmıştır. Bu nedenle iyonlaşma mekanizmaları aydınlatılabilmektedir ve oluşan iyonlar önerilen mekanizmalarla uyum gösterir.

Buna karşılık MALDI'de durum daha karışıktır. Enerji aktarımı katı haldeki örnek-matriks karışımına uygulanan lazer ışığı vasıtasıyla olup, ilgili deneysel parametrelerin çokluğu sebebiyle mekanistik bir değerlendirme yapmak güçtür. Bahsi geçen parametreler arasında lazer dalgaboyu, lazer enerji yoğunluğu, lazer ışın profilleri, örnek ve matriksin kristal yapıları, örneğin ve matriksin vakum ortamında süblimleşme sıcaklıkları, örnek ve matriks arasındaki kimyasal reaksiyonlar önemli değişkenlerin sadece bir kısmını oluşturur. Bütün bu değişkenler MALDI deneylerinin tekrar edilebilirliğini düşürür. Spektrumda gözlenen izotopik dağılımlar her bir lazer vuruşunda farklılık gösterir, bu da genel bir mekanizma ileri sürmeyi zorlaştırır. Deney tekrarlanabilirliğinin düşüklüğü, standart analiz yöntemlerinin oluşturulmasını güçleştirir. İyonlaşma mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, bu parametreleri kontrol ederek güvenilir yöntemler geliştirmemize olanak sağlayacaktır.

MALDI-MS yönteminin gelişimi tekniğin öne sürüldüğü 1987'den beri daha çok deneme yanılma şeklinde seyretmiş olup, birçok matriks, örnek hazırlama şekli bulunmuştur. Buna rağmen iyonlaşma mekanizmaları halen tartışılan bir konudur. Genel kanı iyonlaşmanın iki basamakta gerçekleştiği yönündedir. Matriks, lazer dalgaboyunda yüksek absorbanza sahip bir madde olup, deneylerde örneğe kıyasla konsantrasyonu yüksek tutulduğundan sisteme aktarılan lazer enerjisinin çoğu ilk önce matriks moleküllerinde birikir. Bu nedenle MALDI iyonlaşma mekanizmasının temelinde matriksin rol aldığı düşünülür. İyonlaşma teorilerinin çoğu ilk basamakta matriksin uyarılması/iyonlaşmasını ele alırken, ikinci basamakta ise matriksten örneğe yük transferi üzerinde durur. Lazer dalgaboyunda absorbanası olan örnek moleküllerinin bir kısmı da birinci basamakta uyarılır veya iyonlaşır ancak bu miktar matriks moleküllerine göre daha azdır. İkinci basamakta gerçekleşen reaksiyonlar daha iyi bilinmektedir ve bu konuda kısmen fikir birliği oluşmuştur. Birinci basamaktaki olaylar ise tartışılmakta olup,

iyonlaşma hakkındaki teoriler tek başına gözlenen bütün iyonların oluşumunu açıklayamamaktadır.

Bu tezde MALDI'de iyon oluşumuna etki eden faktörlerden bazıları değiştirilerek seçilmiş kütle bölgelerinde izotopik dağılımlarda meydana gelen değişiklikler gözlemlenmiştir. Bu kapsamda ilk önce tez çalışmasında kullanılan matrikslerin iyonlaşma profilleri gözden geçirilmiş ve örneklerin iyonlaşmasına olası etkileri tartışılmıştır. Bunu takiben iyonik organometalik bileşikler incelenmiş olup, katı fazdaki iyonların desorpsiyonuna matriks, lazer ve organik asit varlığının etkileri araştırılmıştır. Nötral bileşiklere göre iyonik bileşikler farklı iyonlaşma yollarına sahiptirler. Karşıt yüklü iyonların birbirinden ayrılması için gerekli enerji, molekülden elektron uzaklaştırılması, elektron yakalaması veya iyonik türlerle oluşan katılma iyonları (adduct) gibi iyonlaşma süreçlerinde gözlenen enerji değişimlerine göre farklılık gösterir. Yapılan deneylerle birbiriyle yarışma ihtimali olan bu iyonlaşma süreçlerinin hangilerinin baskın çıktığı incelenmiştir.

Diğer bir molekül sınıfı olarak amin grupları içeren aromatik organik bileşikler çalışılmıştır. Burada asidik proton içeren ve içermeyen matrikslerle alınan MALDI spektrumları incelenerek matriks ve örnek arasında gerçekleşmesi olası iyon/molekül reaksiyonları gözlenmiştir. Moleküllerin matriksli ve matriksiz (Lazer desorpsiyon iyonlaştırması, LDI) spektrumları alınarak matriks etkileşimlerinin iyon oluşumuna katkısı tartışılmıştır.

Metallerin kararlı yükseltgenme basamakları elektronik yapılarına göre değişkenlik gösterir. Kararlı yükseltgenme basamakları redoks tepkimelerinde metallerin yük transfer eğilimleri gözlenerek saptanabilir. Çalışmanın bir sonraki bölümünde farklı geçiş metallerinin nötral kompleksleri incelenmiş olup, yük transfer eğilimlerinin iyonlaşmaya etkisi araştırılmıştır.

Bütün bu çalışmaların MALDI'de iyonların oluşum mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir. Kütle spektrometrik yöntemlerin diğer analitik yöntemlere göre birçok üstünlüğü bulunmasına rağmen bazı alanlarda kullanımı henüz yaygınlaşmamıştır. Örneğin hastalıkların teşhisi için yapılan tetkikler, yine hasta durumlarının incelenmesi için yapılacak takipler, ilaçlara verilen cevapların izlenmesi

gibi uygulamalar kütle spektrometrik yöntemlerle çok daha kolay gerçekleştirilebilecek olmalarına rağmen standart kütle spektrometrik yöntemlerin henüz olgunlaşmamış olması nedeniyle farklı yöntemler vasıtasıyla yapılmaktadır. MALDI'de iyonlaşma mekanizması hakkında bilinenlerin çoğalmasıyla farklı analit türleri için çok daha gelişmiş rutin analiz yöntemleri bulunarak yöntemin daha etkin ve yaygın kullanımına yol açacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kütle Spektrometrisi

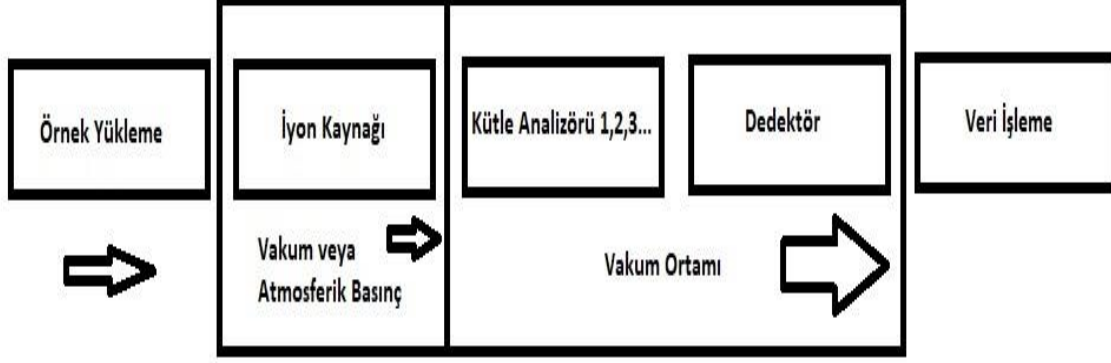
Günümüzde yüksek hassasiyet, hız ve kullanım kolaylığı getiren cihaz konfigürasyonlarıyla birlikte çok farklı alanlarda kütle spektrometrelerine rastlamak mümkündür. Bu alanlar arasında metabolomiks, genomiks, proteomiks gibi önemli biyokimyasal çalışmalar yer almakta olup ilaç keşiflerinde kütle spektrometrisi kullanımı hızla artmaktadır. Bununla birlikte moleküllerin karakterizasyonu, toksisite kontrolleri, yiyeceklerin analizleri, çevresel kimyasalların incelenmesi gibi rutin analizlerde de hızı ve örnek hazırlama kolaylığı nedeniyle kütle spektrometrik analizlere sıklıkla başvurulmaktadır. Analitik uygulamalar dışında, izotopik ölçümlerin yapılması, gaz fazı reaksiyon mekanizmalarının aydınlatılması, reaksiyon kinetiklerinin belirlenmesi gibi önemli kullanımlar da mevcuttur.

Kütle spektrometrisinin diğer analitik yöntemlere göre avantajları aşağıdaki maddelerle sıralanabilir [2];

- Analiz hızı.
- Femto/attomolar seviyede duyarlılık.
- Karışımdaki birçok bileşenin aynı anda analizi.
- Moleküler yapı hakkında birçok bilgi sunması.
- Kantatif analiz imkanı.
- Bazı kütle spektrometreleri sıvı kromatografisi (LC), gaz kromatografisi (GC), kapiler elektroforez (CE) gibi ayırma ve saflaştırma yöntemleriyle kolayca birleştirilebilir.
- Element kompozisyon analizi.
- İzotopik kompozisyon analizi.
- Yapının tartışmaya açık bırakılmayacak şekilde tanımlanması.

2.1.1. Genel Cihaz Bileşenleri ve Kavramlar

Cihaz bileşenleri çok farklılıklar gösterse de temel işleyiş şekil 2.1 ile özetlenebilir.



Şekil 2.1. Genel kütle spektrometrisinin şematik gösterimi.

Örnekler katı, sıvı veya gaz halinde hazırlanarak kütle spektrometresine yüklenirler. İyon kaynağı öncesinde isteğe bağlı olarak kromatografik ayrıştırma cihazları bağlanabilir. İyon kaynağında enerji aktarımı sonucu örnek iyonlaşır. Bazen kaynak yoğun fazdan gaz fazına geçişe de yardımcı olur. Farklı basınç koşullarında çalışan kaynaklar mevcuttur. Kaynağın basıncı örneğin yükleme koşullarını etkiler. Elde edilen iyonlar elektriksel veya manyetik alanların varlığında kütle analizörüne taşınırlar. Analizörler temelde kütleleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayırma görevi görürler. Ancak ardışık yerleştirilmiş birden çok kütle analizörüne de rastlamak mümkündür. Bu analizörler, ardışık kütle spektrometrik analiz (tandem MS, MS/MS) yapmak için öncül iyonların seçiminde veya bazıları iyon tuzaklama için kullanılabilir. Analizörde ayrılan iyonlar dedektöre aktarılır. Burada iyon akımı, iyon yoğunluğuyla ilişkili fiziksel parametrelere dönüştürülerek değerlendirilmek üzere veri işleme birimine gönderilir. Kütleleri ifade ederken farklı tanımlar kullanılmaktadır. Ağırlıkça ortalama kütle, elementlerin doğada bulunma sıklıklarına göre katkı yaptıkları ortalama molekül kütesidir. Kütle spektrometrisinde izotop ayrımları yapılabildiği için molekül kütesine izotopların yaptıkları katkılar ayrı kütleler olarak ortaya çıkar. Bu nedenle ağırlıkça ortalama kütle, kütle spektrometrisinde pek bir anlam ifade etmez. Bunun yerine nominal kütle ve monoizotopik kütle terimleri kullanılmaktadır. Bir elementin nominal kütesi, en sık görülen izotopunu oluşturan nükleonların (proton ve nötronlar) toplam sayısıdır. Moleküller için de nominal kütle oluşturan atomların nominal kütlelerinin toplamıdır. Nükleonların kütlelerinin ayrı ayrı toplamları, bir elementi oluşturduklarındaki toplam kütleyle aynı değildir. Nükleer bağlanma enerjisinin kütle üzerinde yarattığı bu farklılığı da düşünerek hesaplanan monoizotopik kütle, elementlerin en sık görülen izotoplarının tam kütleleri kullanılarak bulunur. Kütle spektrometrik analizler yapılırken kullanılan iki önemli kavram kütle doğruluğu ve kütle ayırma gücüdür. Kütle doğruluğu, bir kütle için gerçek veya kabul

edilen değerinden uzaklığıdır. Cihaz kalibrasyonları iyi bir kütle doğruluğu sağlamak için önem teşkil etmektedir. Kütle ayırma gücü, çözünürlük (*mass resolving power*, *resolution*, R) cihazın birbirine yakın iki kütle değerini birbirinden ayırmasının bir ölçüsüdür. Genellikle yarı yüksekliğindeki tam genişliği (FWHM) yöntemine göre hesaplanır ve değeri aşağıdaki şekilde verilir.

$$R = M/\Delta M$$

Burada M, ayırma gücü ölçülecek kütle, ΔM ise o kütleyle ait pikin yüksekliğinin yarısındaki pik genişliğidir. Ayırma gücü değerlerinden bahsederken kütle ve yöntem (FWHM ya da başkası) belirtilmelidir. Kaynakta oluşan gaz fazındaki iyonik türlerin dedektöre ulaşabilmesi için belirli bir süre başka türlerle çarpışmadan ilerleyebilmeleri gerekir. İyonların başka bir kimyasal türle karşılaşmadan katedebilecekleri mesafeye iyonun ortalama serbest yolu (*ion mean free path*, L) denir ve aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$L = \frac{kT}{\sigma P\sqrt{2}}$$

Burada k Boltzman sabiti, T sıcaklık, σ etkin çarpışma kesiti ($\sigma = \pi d^2$) olup d çarpışan molekül ve iyonun çaplarının toplamı, P de basınçtır. Bu değişkenler için yaklaşımlar yaparak türetilmiş aşağıdaki basitleştirilmiş denklem kullanılabilir.

$$L = \frac{4.95}{P}$$

Burada P, mTorr değerindedir. Bu eşitliği kullanarak bir kütle spektrometresinde iyonların dedektöre çarpışmalarla kaybolmadan ulaşabilmeleri için gerekli basınç hesaplanabilir. Bu basınç vakum pompalarıyla sağlanır.

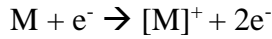
2.1.2 İyon Kaynakları

İyonlaşma kütle spektrometrik analizlerin kalbinde yer alıp, iyon kaynaklarının geliştirilmesi, kütle spektrometrisinden elde edilen bilgilerin miktarı ve kalitesini arttırmakta, kütle spektrometrelerinin kullanımını yaygınlaştırmaktadır. İyon kaynakları örneğe enerji aktarırlar. Sisteme sadece iyonlaşmaya ve gaz fazına geçişe yetecek kadar enerji aktarıp parçalanma ürünlerinin oluşumunu engelleyen iyon kaynaklarına yumuşak iyon kaynakları denir. Bu bölümde önce kütle spektrometrisinin gelişiminde rol oynayan

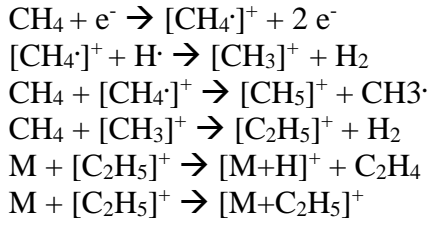
bazı iyon kaynakları özetlenmiş, sonunda da ESI ile birlikte en önemli iki yumuşak iyonlaşma kaynağından biri olan MALDI tanıtılmıştır.

2.1.2.1 İyon Kaynaklarının Gelişimi

Kütle spektrometrisinde ilk ortaya çıkan iyon kaynağı elektron iyonlaştırması (electron ionization, EI) iyon kaynağıdır. Dempster tarafından 1916'da keşfedilen bu kaynak [3, 4], halen organik kimyada küçük moleküllerin yapılarının aydınlatılmasında kullanılmaktadır. Bu kaynaktan örnek gaz halinde sisteme verilir. Kaynaktan bulunan ısıtılmış bir filamentten üretilen termal elektronlar, genellikle arasında 70 eV'luk (elektronvolt) potansiyel fark bulunan 2 plaka arasında hızlandırılır. Vakum ortamında bu elektronlarla çarpışan gaz fazındaki türler aşağıdaki tepkimeye göre bir elektron kaybeder ve radikalik katyonları halinde iyonlaşırlar. Elektronlardan aktarılan enerjinin fazlası yarı kararlı (*metastable*) iyonların üretilmesine neden olur ve bunlar da parçalanma reaksiyonlarını tetikler. Hem parçalanma ürünlerine hem de parçalanmadan kalabilen moleküller türlerine ait iyonlar analizöre gider ve EI spektrumunu oluştururlar.



EI spektrumlarının tekrar edilebilirliği çok yüksektir. Birçok moleküle ait standart EI spektrumları veri tabanlarında saklanmaktadır. Bu spektrumlar yapı tanımlamada kullanılmak üzere mevcut spektrumlarla karşılaştırılabilirler. EI iyonlaşmasında örneğe aktarılan enerji yüksektir ve özellikle büyük moleküller tamamen parçalanma ürünleri şeklinde görülür. EI'ın getirmiş olduğu handikapları gidermek üzere kimyasal iyonlaşma (*chemical ionization*, CI) ortaya atılmıştır [5]. CI'da EI sisteminin içinde örnek gaz akışına ek olarak bir reaktif gaz akışı mevcuttur. Bu reaktif gaz miktarı örnek miktarına göre çok fazladır. Bu şekilde örnekten önce elektronların reaktif gazla çarpışması sağlanır. İyonlaşan reaktif gaz molekülleri bir seri reaksiyon sonrası farklı iyonik türleri oluştururlar. Bu türlerin örnek gaz akışıyla etkileşimi sonucu örneğin gaz fazı iyonları oluşur. Reaktif gaz molekülleriyle gerçekleşen çarpışmalar, direk olarak elektronlarla olan çarpışmalara göre daha az enerjiktir. Örneğe fazladan aktarılan enerji azalır ve moleküller iyonların miktarı EI'a göre artar. Reaktif gaz örneğin türüne göre değiştirilebilir. Kullanılan reaktif gazlara örnek olarak CH₄ [6], NH₃ [7] ve izobütan [8] verilebilir. Aşağıda reaktif gaz olarak CH₄'ün kullanıldığı iyon ve molekül oluşumlarına dair tepkimeler yer almaktadır. EI'dan farklı olarak CI spektrumlarında protonlanmış molekül iyonları ve metan türevleriyle oluşmuş birleşme ürünleri göze çarpmaktadır.



Alan iyonlaşması (*field ionization*, FI), iyonlaşma için elektrik alan kullanılan ilk kaynaktır [9]. Gaz halinde örnek aralarında yüksek voltaj uygulanan 2 elektrottan birine yakın geçecek şekilde gönderilir. Yüksek elektrik alan örnekten bir elektron koparır. Oluşan iyon diğer elektrota oradan da kütle analizörüne yönelir. Bu iyonlaşma türünde yine $[\text{M}]^+$ ve $[\text{M}+\text{H}]^+$ türleri oluşur. $[\text{M}+\text{H}]^+$ türlerinin radikalik katyonlardan iyon molekül reaksiyonları sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Alan desorpsiyonu (*field desorption*, FD) aynı iyon kaynağında örneklerin yakın geçirildiği elektrota bu sefer direk olarak konumlandırılmasıyla uygulanan iyonlaşma yöntemidir. Bu da ilk desorpsiyona dayalı iyon kaynağı olup, ilk defa gaz fazı olmayan örneklerin incelenmesine olanak tanımıştır. Bu iki yöntem CI ve EI'ya göre örneğe daha az enerji aktarır. Parçalanma ürünleri daha az gözlenir, dolayısıyla daha yumuşak bir iyonlaşma yöntemidir. Yüksek molekül ağırlıklı moleküllerin incelenmesine izin veren bu yöntemin kullanımı zordur ve günümüzde yerini diğer etkin desorpsiyonlu kaynaklara bırakmıştır [10].

Atmosferik basınç kimyasal iyonlaşma yönteminde (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) [11] örnek çözücü içinde bir püskürtücü gaz (N_2 , O_2) yardımıyla damlacıklar halinde iyon kaynağına gönderilir. İyon kaynağı atmosferik basınç altında tutulur, ısıtılarak buharlaştırılan çözücü molekülleri kaynağa gelir. Kaynakta püskürtücü gaz molekülleri korona boşalımıyla iyonlaşır. Bu iyonların örnek molekülleriyle reaksiyonu sonucu CI yöntemindekine benzer şekilde iyonlar oluşur ve analizöre gider.

Plazma desorpsiyonunda (*plasma desorption*, PD) bir folyo üzerine konulan örnek ^{252}Cf fizyon ürünleriyle bombardımana tabi tutulur. Desorbe olan iyonlar analiz edilir. Günümüzde aynı FD gibi, bu iyon kaynağı da yerini MALDI ve türevlerine bırakmıştır.

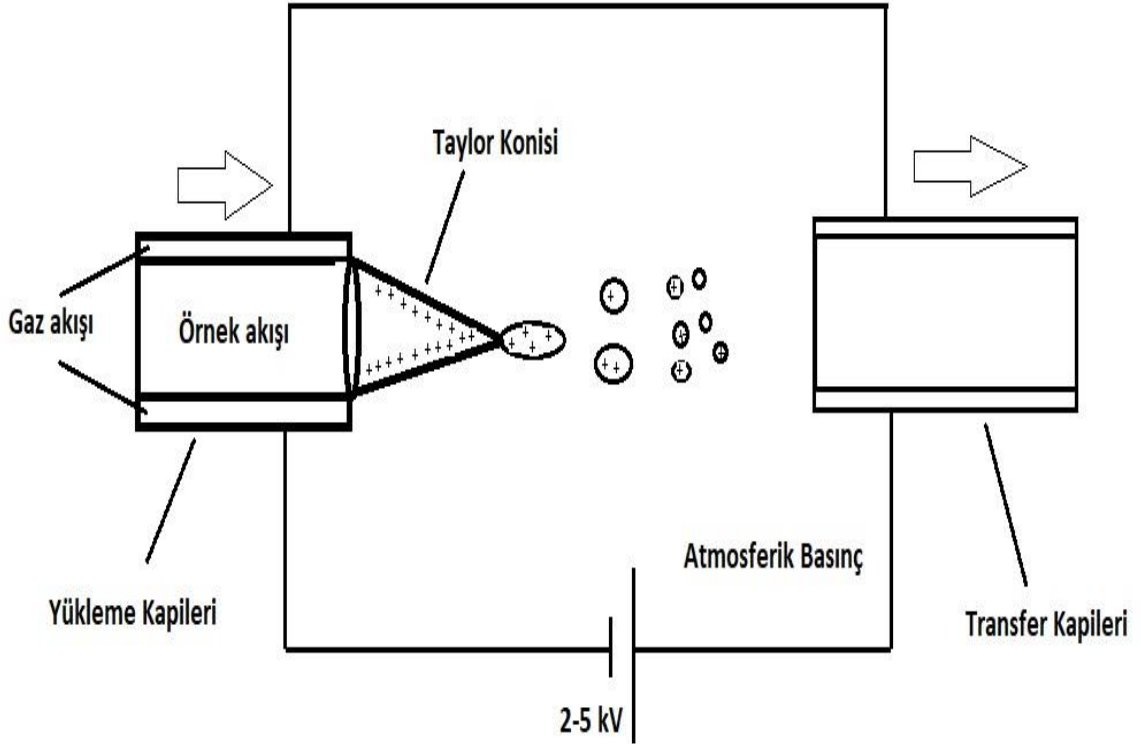
1980 yılında önerilen eşlenmiş-indüktiflenmiş plazma kütle spektrometrisi (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*, ICP-MS) [12], elementel analizde çok etkin bir yöntemdir. Örnek argon gazı ile birlikte sisteme gaz halinde veya çözelti haline spreylenecek verilir. Argon gazına uygulanan tesla kıvılcımları argon iyonları ve elektronların oluşumunu sağlar. Sistemi çevreleyen tüpün etrafı indüksiyon bobinleriyle

sarılmıştır. Bu bobinlerden radyo frekans akım geçirilir. Bu akımın yarattığı alan oluşan iyonların sürekli ivmelenmesine ve ısınmasına yol açar. Sonunda sıcaklığı 10,000 K'e kadar yükselen bir plazma oluşur. Bu plazmada örnek büyük bir yüzdeyle elementlerinin iyonlarına dönüşür. Oluşan iyonlar kütle spektrometresine gönderilir.

Hızlı atom bombardımanı (*fast atom bombardment*, FAB) kaynağı [13], 1981'de önerilmiş olup ikincil iyon kütle spektrometrisi (*secondary ion mass spectrometry*, SIMS) kaynağının gelişmiş halidir. Bu kaynaktan hızlandırılan ksenon veya argon atomları, yüzeyde bulunan örneklerle çarpıştırılır. Çarpışmanın etkisiyle hem iyonlar hem de nötral türler etrafa saçılır. Bu süreçte ortaya çıkan iyonlar kütle analizörüne gider. Örnek genellikle viskoz sıvı bir matriks içinde bulunur. Bu matriks çarpışmaların enerjisinin bir miktarını absorblayarak yumuşak iyonlaşma sağlar. Matriks olarak genellikle gliserin kullanılmaktadır. SIMS yönteminde çarpışma gazının iyonlaşmış hali kullanılır. Bu yöntemle yaklaşık 10,000 Da'a kadar kütleler gözlenebilmiştir. FAB üstte aktarılan diğer iyon kaynakları arasında en yumuşak iyonlaşmayı sağlayanıdır.

1980'lerin sonuna doğru yumuşak iyonlaşmada devrimsel nitelikte iki kaynak ortaya çıkmıştır. Bunlar MALDI [14-16] ve ESI'dır [17]. ESI kaynağına ait genel iyonlaşma şeması şekil 2.2'de verilmiştir. Örnek çözelti halinde kontrollü bir akıyla yükleme kapilerinden sisteme verilir. Eşlik eden gaz akışı (azot veya hava) örneğin spektrometre içine spreyleneceğini kolaylaştırır. Yükleme kapileri ile transfer kapileri arasında 2-5 kV arası değişen bir elektriksel potansiyel uygulanır. Bu potansiyel yükleme kapilerinin ucuna gelen örnek damlacığının polarlanmasına ve Taylor konisi oluşumuna neden olur. Kaynağın çalışma potansiyeline göre - veya + yükler damlacığın yüzeyinde birikirler. Elektrostatik kulomb itme kuvvetlerinin sıvının yüzey gerilimine baskın çıktığı noktada damlacık parçalanarak birden fazla yeni damlacıklar meydana getirir. Yüzeyde birikmiş olan yük yeni damlacıklar arasında dağılır ve oluşan damlacıklar yüklü olurlar. Eşlik eden gaz çözücüye buharlaştırmak için genellikle 50-400 °C arasında ısıtılır. Çözücü buharlaştıkça bir noktada küçülen damlacığın içindeki itme kuvvetleri yine yüzey geriliminden fazla hale gelir ve bu şekilde tekrar eden kulombik patlamalar meydana gelir. En sonunda çözücünün tamamı buharlaşır ve geride kalan gaz halindeki iyonlar analizöre gider. ESI'da çoklu yük oluşumu sıklıkla görülür. Kütle spektrometrisinde iyonlar m/z oranlarına göre ayrıldığından bu durum yüksek kütleli moleküllerin düşük m/z değerlerinde izlenebilmesine olanak tanır. Bu sayede ESI birçok kütle analizörüyle

uyumlu hale gelir. Ayrıca çoklu yükler spektrumu zenginleştirir ve yapı ile ilgili elde edilen bilgiler artar.

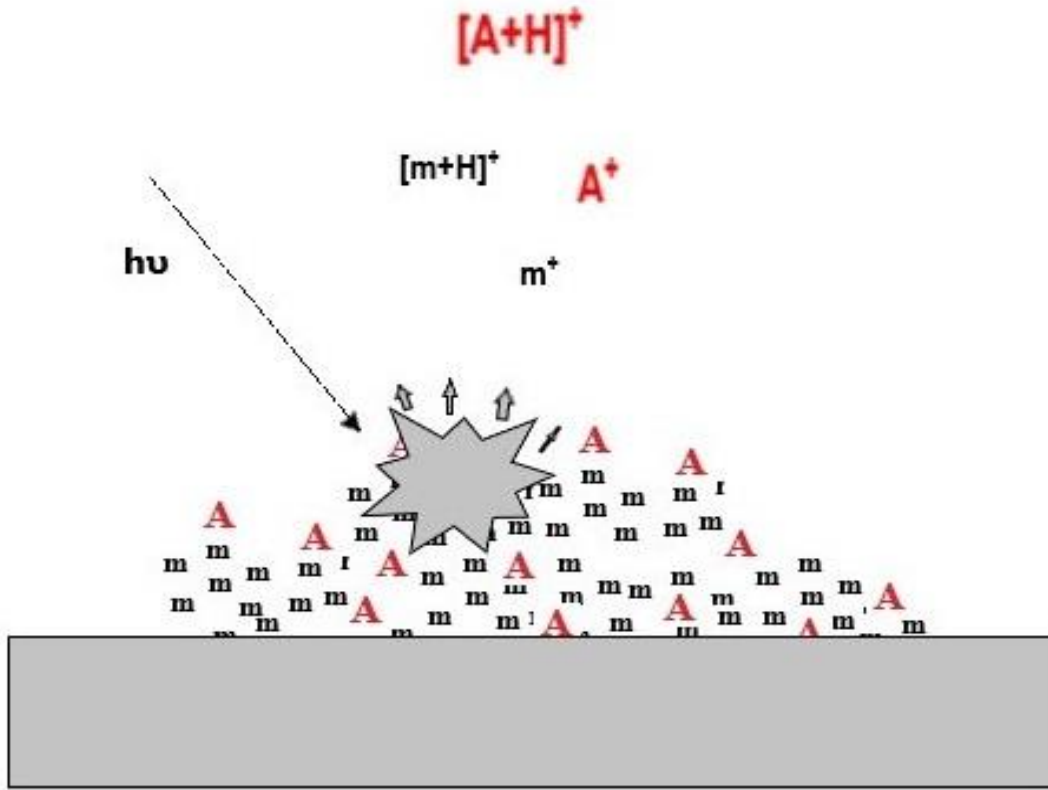


Şekil 2.2. ESI iyon kaynağının şematik gösterimi.

2.1.2.2 MALDI İyonlaşma Kaynağı

MALDI’de örnekler çözelti halinde hazırlanarak örnek yükleme amaçlı kullanılan özel metal plakalar (*plate*) üzerine matriks ile çözelti halinde karıştırıldıktan sonra beraber uygulanırlar. Çözücü buharlaşmasını takiben plate kütle spektrometresine yerleştirilir ve çalışmaya hazır hale gelir. Kaynak genellikle 10^{-6} Torr civarı vakum altında bulunur. Ancak MALDI’nin atmosferik basınç altında çalışan türevleri de mevcuttur [18]. Kırmızı Ötesi (*ultraviolet*, UV) veya Mor Ötesi (*infrared*, IR) bölgesinde dalga boyuna sahip atımlı veya sürekli lazer ışığıyla uyarılan örneğin bu enerji aktarımını takiben yüzeyden desorpsiyonu ve iyonlaşma süreçleri gerçekleşir. İki olay birbirine bağlı seyredir. Yüzeyde bulunan örnek, lazer vuruşu sonrası yoğun fazdan gaz fazına doğru geçiş yapar. Yüzeyin üstünde plume adı verilen heterojen bir bölge oluşur. Bu bölgede sistemin tek bir termodinamik halinden bahsetmek zordur. İyon oluşumları yoğun fazdan başlayarak plume içinde devam eder. En son elde edilen iyonlar kütle analizörüne doğru bir

potansiyel eşliğinde ivmelendirilirler. Şekil 2.3'te MALDI'de iyonlaşma şeması gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Şematik MALDI iyonlaşma işlemi (m = matriks, A = analit).

Pozitif mod MALDI'de sıkça görülen iyon türleri arasında radikalik katyonlar, protonlanmış iyonlar, sodyum ve potasyum katılım iyonları, matriks katılım iyonları bulunur. Negatif modda ise radikalik anyonlar, anyonik katılım iyonları, deprotone iyonlar gözlenir. MALDI'de kullanılan lazerler çoğunlukla atımlı yapıda oldukları için fazlaca sayıda iyon çok kısa bir sürede kütle analizörüne gönderilir. Bu nedenle hızlıca iyonları tarayan dedektörlere ihtiyaç duyulur. MALDI kütle spektrometrelerine bu yüzden sıklıkla uçuş zamanlı (*Time of Flight*, TOF) kütle analizörleri bağlanır. MALDI'nin dezavantajlarından biri düşük m/z bölgelerinde matrikse ait piklerin spektrumu baskılaması ve bu bölgeye düşen küçük moleküllerle bazı büyük moleküllerin parçalanma ürünlerinin kütlelerinin analizini zorlaştırmasıdır. Bu problemi çözmek adına matriks gibi davranan özel tasarlanmış yüzeylere örneklerin yerleştirildiği LDI türevleri tasarlanmıştır. Bunlardan Gözenekli Silikon Üzerinde Desorpsiyon/İyonlaşması'nda (DIOS) [19], özel hazırlanmış gözenekli silikon yüzeyleri kullanılır. Nanoyapıyla Geliştirilmiş Lazer Desorpsiyon/İyonlaşması'nda (NALDI) [20] nanoyüzeyler kullanılır.

Geliştirilmiş Yüzey Lazer Desorpsiyon/İyonlaşması'nda (SELDI) [21], örneğin yapısına göre özel oluşturulmuş hidrofobik, hidrofilik veya iyon değişim yüzeylerine örnek yerleştirilir. Belli bir inkübasyon süresinden sonra kirleticiler çözücüyle yıkanarak uzaklaştırılır ve yüzey analiz edilir.

2.1.3. Kütle Analizörleri

Kütle analizörleri iyon kaynağında oluşan kütleleri m/z oranına göre ayıran cihaz bileşenleridir. İlk çıkan kütle analizörleri manyetik sektör ve elektrostatik sektör cihazlarıdır. İyonların elektrostatik ve elektromanyetik alan altında sapmaları prensibine göre çalışan bu enstrümanlar günümüzde yerini daha güçlü kütle analizörlerine bırakmıştır.

Dört kutuplu (*quadrupole*) kütle analizörü [22], birbirlerine ve iyonların hareket yönüne paralel yerleştirilmiş 4 metal çubuktan oluşur. Bu analizörde ayırımın sağlanması için çubuklar arasında hiperbolik şekilli elektrik alan oluşturulur. Karşılıklı çubuklar birbirleriyle elektriksel olarak kontak halindedir ve aynı voltaja sahiptirler. Çubuklar hem AC hem DC voltajının etkisi altındadırlar. Voltajın doğru ayarlanmasıyla sadece m/z oranı belirli bir değer aralığına sahip iyonlar analizörden geçerek dedektöre gider. Bazı cihazlarda birden fazla dört kutuplu arka arkaya bağlanabilir. İki dört kutuplu arasında çarpışma hücresi (*collision cell*) yer alır. Burada seçilen iyon bir gazla çarpıştırılarak çarpışmayla indüklenmiş parçalanma (*collision induced dissociation, CID*) [23] ürünlerine ayrılır ve oluşan iyonlar ikinci dört kutuplu analizörde m/z oranlarına göre ayrılır. Dört kutuplu kütle analizörleri sadece belirli kütle aralığındaki iyonları dedektöre gönderir, geriye kalanlar yoldan saparak kütle spektrometresinin duvarlarına çarparak kaybolur. Bu durum cihaz hassasiyetini azaltır. Bu nedenle dört kutuplu analizörleri kısıtlı kütle (50-4000 m/z) aralıklarında ayırma yaparlar. ESI iyon kaynağının bağlanmasıyla çoklu yükler görülebildiğinden bu şekilde 100,000 Da üstü moleküller gözlemlenebilir.

Fourier Dönüşümlü-İyon Siklotron Rezonans (*Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance, FT-ICR*) [24] kütle analizöründe, helyum ile soğutulmuş süper iletken mıknatısların etkisinde iyonların dönmesi sağlanır. Bu dönme frekansı iyonların m/z oranıyla orantılıdır. Mevcut cihazlar arasında hassasiyeti, çözünürlüğü ($R > 500.000$ FWHM) ve kütle doğruluğu en yüksek olan kütle analizörüdür.

İyon Hareketliliği (*Ion Mobility*, IM), aynı m/z oranına sahip olup çarpışma kesitleri (*collision cross section*, ccs) farklı olan iyonların birbirinden ayrılmasında kullanılır [25]. Dolaylı yoldan moleküllerin konformasyonel yapısı hakkında bilgiler sunar. Bu kütle analizöründe iyon hareketliliği bölmesinde iyonlar hareket yönüne ters veya aynı yönde gaz akışına maruz kalırlar. Bu gazla çarpışma sıklıkları çarpışma kesitleriyle orantılı olarak değişir ve moleküllerin analizördeki iyon hareketliliği değerlerini değiştirir. Bu değerlere göre aynı m/z değerindeki farklı konformasyondaki yapılar birbirinden ayrılabilir.

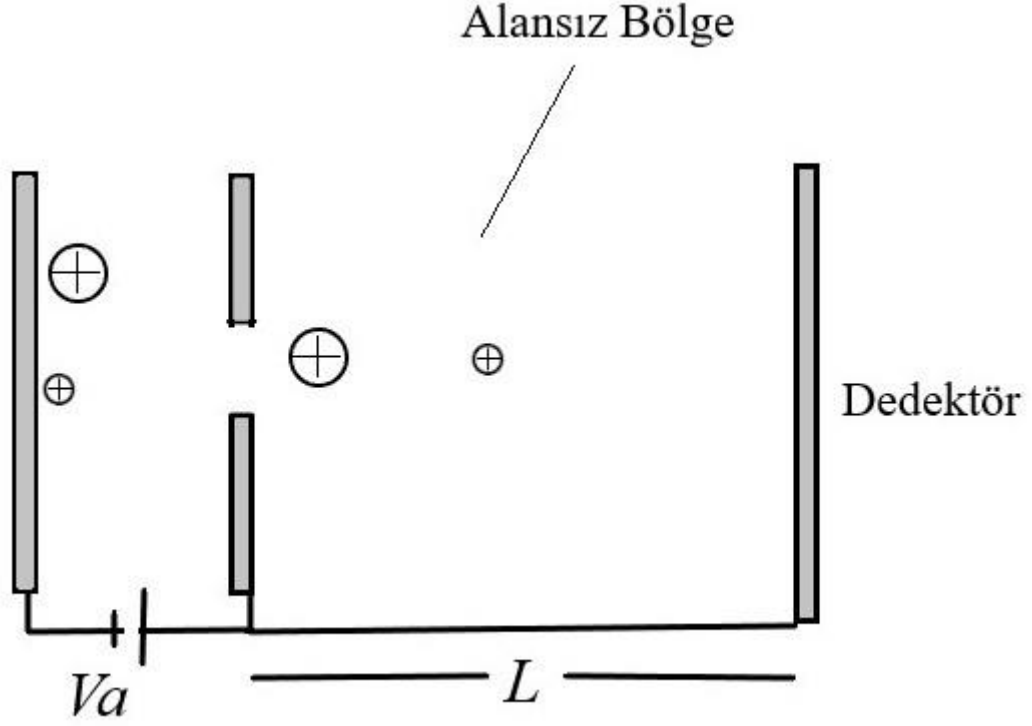
Orbitrap kütle analizörü bir diğer yüksek çözünürlük sağlayan analizör olup ulaşılan değerler FT-ICR kadar yüksek değildir. Ancak daha kompakt yapısı, kullanım kolaylığı ve daha ucuz olduğu için tercih edilen bir cihazdır. Orbitrap de iyonlar bir elektrodun etrafında elektrostatik kuvvetle çekilerek tuzaklanırlar. Geliş hızlarının etkisiyle oluşan merkezkaç kuvveti iyonların elektrota çarpmasını engeller. İyonlar kompleks spiral bir yol izlerler. Bu hareketin salınım frekansı iyonların m/z değerleriyle orantılıdır. Bu şekilde ayırım yapılır [26].

2.1.3.1 Uçuş Zamanlı Kütle Analizörü

TOF analizörü iki bölümden oluşur. İlk bölme iki elektrot arasında oluşturulan elektriksel potansiyelle iyonların ivmelendirildiği kısımdır. İkinci elektrot içinde bulunan delikten geçen iyonlar ikinci bölmeye girerler. İkinci bölmede herhangi bir elektriksel alan bulunmaz. İvmelenme potansiyeli etkisinde aşağıdaki formüle göre her bir iyon kütlesine bağlı olarak hız kazanır. Kütle analizörü bu hıza bağlı olarak alansız bölgeyi geçiş sürelerine göre iyonları ayırır.

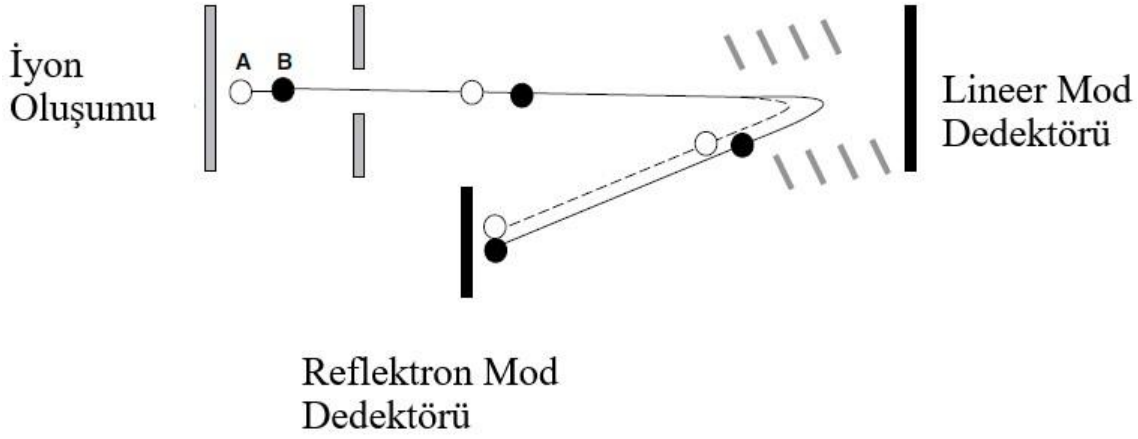
$$t^2 = \frac{m}{z} \left(\frac{L^2}{2eV_a} \right)$$

Burada t iyonun uçuş süresi, V_a ivmelenme potansiyeli, e elektronun yükü, L uçuş yoludur. Şekil 2.4'te TOF analizörünün şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.4. TOF kütle analizörünün şematik gösterimi.

İyon kaynağında oluşan aynı m/z oranındaki iyonların hepsi aynı kinetik enerjide olmaz. Ancak analizörde bu iyonların kütlelerinin doğru ölçülebilmesi için alansız bölgeye aynı anda girmeleri gerekir. Bunu başarma adına gecikmeli ekstraksiyon (*Delayed Extraction*, DE) sistemi geliştirilmiştir. Bu sisteme göre alansız bölge ile alanlı bölgenin elektrotları arasına bir elektrot daha yerleştirilir. Başlangıçta ivmelenme potansiyeli uygulanmaz, kısa bir süre sonra uygulanarak kinetik enerjisi az olan iyonların bu potansiyelden yararlanarak diğerlerinin enerjisine ulaşmaları sağlanır. DE'nin de yeterli olmadığı durumlar için reflektron sistemi geliştirilmiştir. Reflektron kullanılmayan TOF sistemlerine lineer TOF adı verilir. Reflektron sistemi lineer TOF dedektörünün bulunduğu yere yerleştirilir. Bir dizi elektrottan oluşan bu sistemde uygulanan potansiyel ile ulaşan iyonların yönü değiştirilir. İyonların reflektronda geçirdiği süre kinetik enerjileriyle doğru orantılıdır. Dolayısıyla reflektron aynı kütledeki iyonların kinetik enerjisini eşitler. Reflektronda saptırılan moleküller ikinci TOF dedektörüne doğru gider (şekil 2.5).



Şekil 2.5. Reflektron TOF [2].

2.1.4. Dedektörler

Kütle spektrometrisinde en sık kullanılan dedektörler elektron çoğaltıcılardan oluşur. Bunlar karşılıklı yerleştirilmiş birkaç elektrottan oluşur. Yeterli kinetik enerjiye sahip iyonlar ilk elektrota çarpar ve bir dizi elektronun elektrot yüzeyinden ayrılmasına neden olur. Bu elektronlar sırayla diğer elektrotlara da çarparak birçok elektron koparırlar ve İyon akımı ölçülebilir elektrik sinyaline dönüşmüş olur. Elektron çoğaltıcının diğer bir varyasyonu olan mikrokanal dedektörlerde de bir eğri şeklinde dizilmiş binlerce elektrot bulunur. Teorik olarak çalışma prensibi elektron çoğaltıcılar aynıdır. Bu dedektörün avantajı çok sayıda iyonun aynı anda kütesinin ölçülebilmesidir. MALDI görüntüleme sistemlerinde yüzeyin görüntüsü piksel piksel tüm alanın taranmasıyla oluşturulur. Bu işlem çok zaman alır. Bu probleme çözüm bulma adına yüzeyde teker teker lazer vuruşu uygulama yerine yüzlerce vuruşu aynı anda yapıp, oluşan tüm iyonları eş zamanlı inceleyebilecek bir dedektör üretme çalışmaları sürmektedir. Bu dedektöre medipix/timepix adı verilmiştir [27]. Orbitrap ve FT-ICR kütle analizörlerinin dedektörleri diğerlerinden mekanizma olarak farklıdır. Bu dedektörler iyonların sistemde yaptıkları m/z oranına bağlı periyodik hareketlerin frekanslarını ölçme esasına göre çalışırlar.

2.2. MALDI'de İyon Oluşumuna Etki Eden Faktörler

Bu bölümde sadece MALDI iyonlaşma mekanizmalarına etkisi büyük olan değişkenler ele alınmıştır.

2.2.1. Lazer Dalga Boyu, Enerji Yoğunluğu, Dalga Profili ve Lazer Spot Büyüklüğü

MALDI’de sisteme enerji lazer yoluyla aktarılır. Bu enerji hem örneğin yüzeyden desorpsiyonunu hem de iyonlarına ayrışmasını sağlar. Lazerler enerji aktarım türlerine göre ikiye ayrılır. Sürekli dalga (*continuous wave*, CW) lazerler sisteme devamlı enerji aktarıırken atımlı lazerler (*pulsed laser*) genellikle nano saniyelerle belirlenen süreçlerde çalışırlar. MALDI’de özellikle atımlı lazerler kullanılır. Atımlı lazerlerde atım süresince aktarılan enerji yoğunluğu (*fluence*) çok yüksektir. Hızlı enerji aktarımı enerjinin termal olarak çabuk dağılmasına izin vermez, desorpsiyon etkinliği artar [28]. Sürekli lazerlerde bu denli yüksek enerji yoğunluklarına ulaşamaz. Atımlı lazerlerde ayarlanabilen iki önemli parametre enerji yoğunluğu ve güçtür (*irradiance*). Enerji yoğunluğu, bir atımda birim alana aktarılan toplam enerji (J/cm^2) iken, güç ise enerji yoğunluğu/atım süresidir (W/cm^2). Atım sürelerinin spektrum üzerinde etkisi olmadığı bildirilmiştir [29-32]. Dolayısıyla bu ikisi arasında MALDI’de desorpsiyon/iyonlaşmayı etkileyen temel lazer parametresi enerji yoğunluğudur. Lazer ile enerji aktarımında en önemli parametre dalga boyudur. Hem infrared hem de UV dalgaboyunda lazerler mevcuttur. Aşağıda MALDI’de kullanılan lazerlerin bir listesi verilmiştir.

Çizelge 2.1.MALDI’de kullanılan bazı lazerler ve ilgili parametreler [33].

Lazer	Dalga boyu	Foton enerjisi (eV)	Atım Süresi
Azot	337 nm	3.68	< 1ns – birkaç ns
Nd: YAG μ^3	355 nm	3.49	5 ns
Nd: YAG μ^4	266 nm	4.66	5 ns
Excimer (XeCl)	308 nm	4.02	25 ns
Excimer (KrF)	248 nm	5.00	25 ns
Excimer (ArF)	193 nm	6.42	15 ns
Er: YAG	2.94 μm	0.42	85 ns
CO ₂	10.6 μm	0.12	100 ns + 1 μs kuyruk

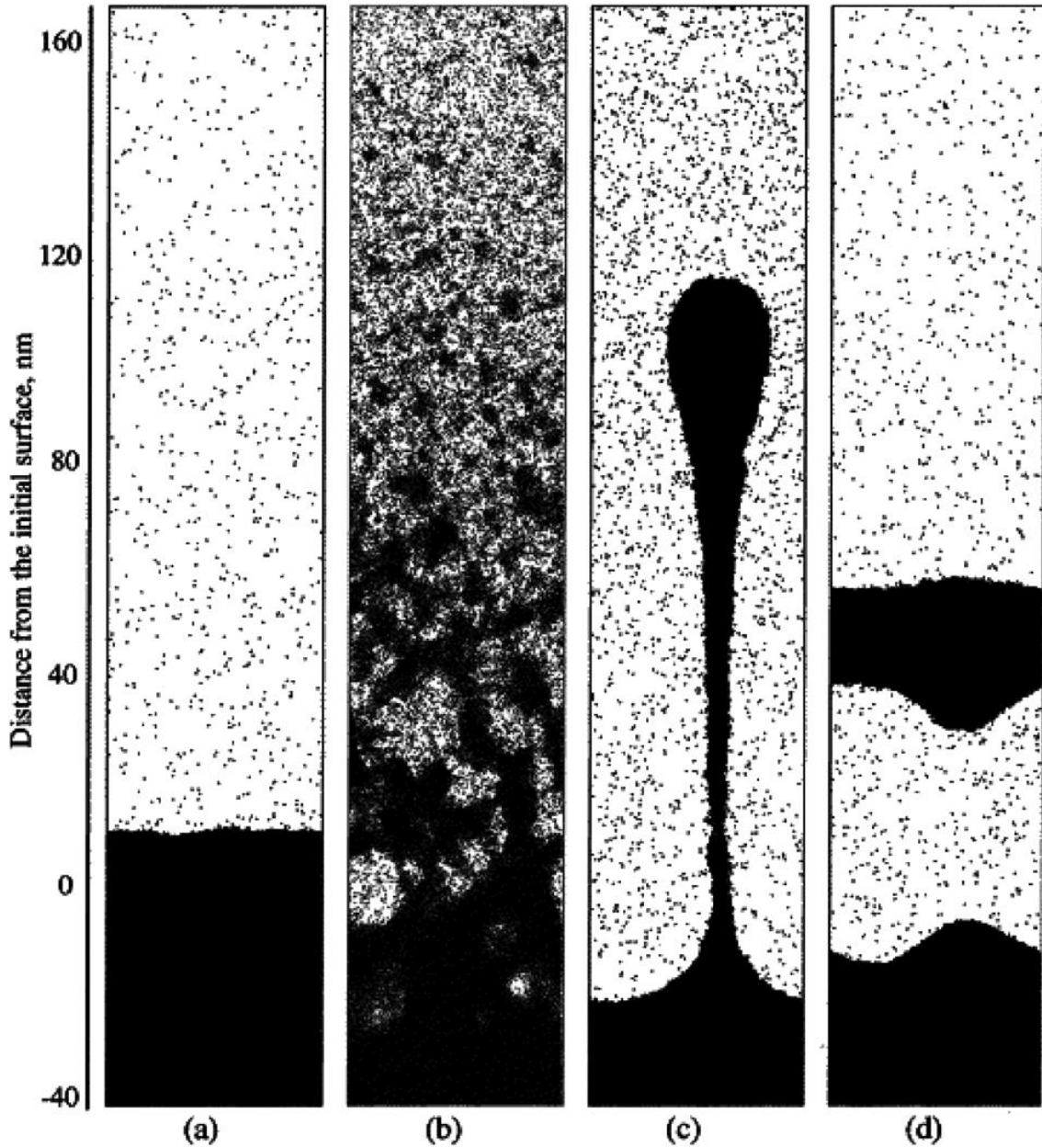
MALDI ile ilgili ilginç bir gözlem lazer spot büyüklüğü arttıkça iyonlaşmanın gözlemlendiği minimum eşik enerji yoğunluğu azalmaktadır [34-37]. Bu durum lazer spot büyüklüğü azaldıkça hassasiyetin düştüğünü göstermektedir. Lazer spot büyüklüğü azaldıkça iyonlaşan moleküllerden yüzey yerine, yığın madde içinden kalkarak gelenlerin sayısı arttığından, bu yığın içindeki moleküllerin çevrelerinden kurtularak desorbe olmaları için gereken enerji fazla olduğundan, eşik enerji yoğunluğunun arttığı düşünülmektedir. Cihazlarda gauss ışını (*gaussian*), düz yüzeyli (*flat-top*) ve modüle edilmiş (*modulated*)

olmak üzere üç tip farklı lazer odaklama profili kullanılmaktadır. Gauss ışını profilinde lazerin vurulduğu alanın merkezindeki noktada şiddet en yüksek değerinde iken çevreye doğru ilerledikçe şiddet giderek azalır. Lazer şiddetinin dağılım fonksiyonu gauss eğrisine benzer. Herhangi bir düzenlemeye tabi tutulmamış lazerler bu profilde ışık yayar. Düz yüzeyli lazerlerde, bağlanan optik düzeneklerle gelen ışığın sadece belirli yönde ilerlemesi sağlanır ve homojen bir lazer profili elde edilir. Modüle edilmiş profilli lazerler yüzey boyunca değişken homojenitede lazer şiddetleri oluşturan farklı optik düzeneklerdir. Bütün bu profiller zamanla değişim gösterirler. Lazere maruz bırakılacak yüzeyle lazer arasındaki uzaklık değiştikçe, yüzeydeki şiddet profili de değişir. Bu profillerin iyon verimleri üzerine etkisi bilinmektedir. Bruker tarafından geliştirilen smartbeam modülasyonu ile şekillendirilmiş lazer profili, modüle edilmemiş tipik gauss ışını lazer profili üreten Nd:YAG lazere göre matriks olarak CHCA'nın kullanıldığı ince tabaka metoduyla hazırlanan örneklerde yüksek iyon verimleri elde edilmiştir [38]. MALDI görüntüleme yöntemlerinde uzaysal çözünürlük (*spatial resolution*) çok önemli bir parametre olduğu için daha yüksek çözünürlük sağlama adına farklı lazer profilleri denenmektedir [39, 40].

2.2.2. Desorpsiyon

Örneğe lazer uygulanması sonucu birbiriyle yarışan iki süreç başlar: örneğin yüzeyden emisyonu ve parçalanması (*fragmentation*). UV-MALDI'de kullanılan lazer atım sürelerinde aktarılan enerji örneğin emisyonu için gerekli optimum enerjiyi sağladığı için bu süreç daha ağır basar [41]. MALDI için farklı yüzeyden kalkış rejimleri mevcuttur. Enerji yoğunluğu iyonlaşma eşiği ve çevresindeyken yüzeyden moleküllerin teker teker ayrılması "desorpsiyon" ağır basarken yoğunluk arttıkça küçük molekül/iyon kümelerinden (*clusters*) oluşan emisyon, tozlaşma (*ablation*) ağır basar. Enerji yoğunluğunun daha da arttığı durumlarda ise lazerin enerjiyi aktardığı bölgede mekanik stres oluşur ve bu çok daha büyük yığın halinde katı fazın soğuk halde yüzeyden kalkışına (*spallation*) neden olur. Bu yığın fazlar termal etkiden ziyade mekanik etkilerle kaldırıldıkları için soğukturlar ve moleküllerin bu yığın fazdan gaz fazına geçmeleri ve iyonlaşmaları için yeterli enerji elde edemezler. Dolayısıyla MALDI sürecinde katkısı olmadıkları düşünülmektedir. Kümelerin ve yüzeyden tekli moleküllerin oluşumu hem deneysel [42] hem de moleküler dinamik simülasyonlarıyla gösterilmiştir [43, 44]. Şekil 2.6'da bu simülasyonların sonucunda görülen temel desorpsiyon rejimleri görülmektedir. Desorpsiyonun ilk anlarında hem madde hem de enerji yoğunluğu çok yüksektir. Bu

nedenle iyonlarının çoğunluğu bu kısa aralıkta oluşur. Desorbe olan materyal hızlı bir şekilde genişir ve soğur. Bu olay çok hızlı olduğu için MALDI sürecinde moleküller yeterince birbirleriyle temas halinde olmazlar ve tam bir termal dengeden söz edilemez. Ancak genel kanı plume'da yerel termal dengeye ulaşıldığı yönündedir. MALDI'de erişilen sıcaklıklar lazer atım enerjisine bağlı olduğu için değişkendir. Yapılan deneyler plume sıcaklığının 500-1000 K arasında değiştiğini göstermektedir [45].

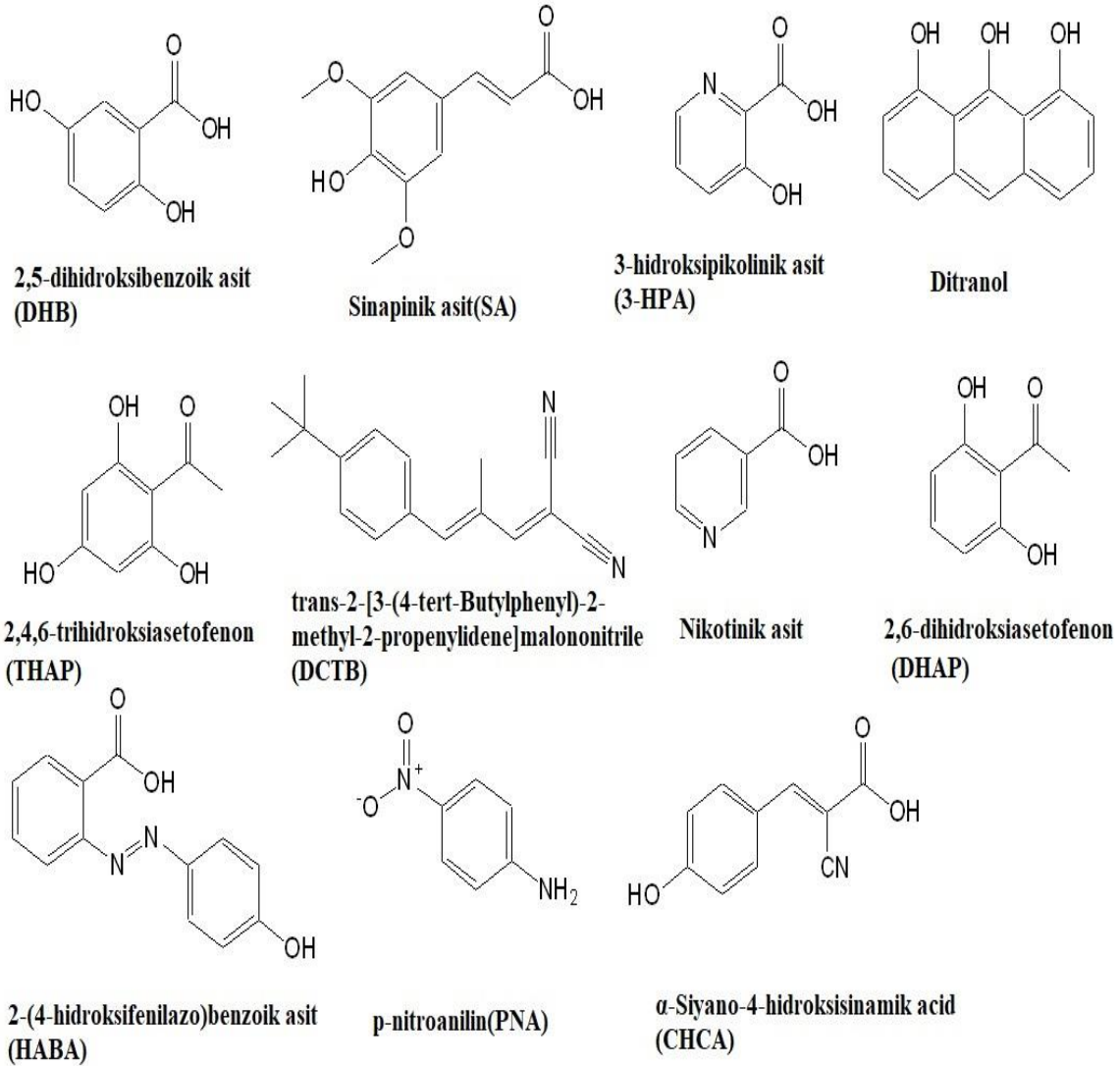


Şekil 2.6. Farklı yüzeyden kalkış şekillerine ait moleküler dinamik simülasyonlarından anlık çekimler. (a) monomerlerin desorpsiyonu, (b) aşırı ısıtılmış materyalin faz patlaması ile iyon/molekül kümelerinin oluşumu, (c) hızlı erime üzerine sıvının hareketi ile hidrodinamik püskürtme, (d) mekanik stres etkisiyle soğuk halde yüzeyden kalkma [44].

2.2.3. Matriks

MALDI tekniğinin keşfedilmesine önyak olan gelişmelerden biri LDI çalışmalarında örneklerin absorpsiyon maksimumuna yakın dalgaboyunda lazer kullanımının iyon verimini ve sinyal/gürültü oranını arttırdığıydı [46]. MALDI için kullanılan matrikslerin ortak noktası olan bu özellik takip eden yıllarda deneme yanılma yoluyla birçok etkin matriksin bulunmasına yardımcı oldu. Ancak katı fazla çözelti hali UV absorbans değerleri değişiklikler gösterdiğinden matrikslerin her örnek için uygunlukları test edilmelidir. Matrikslerin yük aktarma özellikleri iyonlaşma mekanizmaları konusunda tartışılacaktır. İlk zamanlarda bulunan benzoik asit, sinamik asit türevi matriksler özellikle proteinlerin analizinde oldukça etkindir ve hala kullanılmaktadırlar [47]. Oligonükleotitler için birçok farklı matriksin denendiği bir çalışmada 3-hidroksipikolinik asit (3-HPA) uygun bulunmuştur [48]. IR-MALDI'de birçok örnek türü için gliserin matriks olarak kullanılmaktadır [49]. En çok kullanılan UV-MALDI matrikslerinden olan 2,5-dihidroksibenzoik asit (DHB) de erken dönemlerde ortaya atılmıştır [50]. Diğer bir sık kullanılan matriks molekülü α -siyano-4-hidroksisinamik asit de (CHCA) 1992'de keşfedildi [51]. İyonlaşma mekanizmalarının anlaşılmasının faydasının güzel bir örneği proton ilgisinin proteinlerin iyonlaşmasında önemli bir parametre olduğu düşünülerek bu özelliği düşük olan bir CHCA türevi, 4-kloro- α -siyanosinamik asit matriksinin önerilmesi ve başarıyla kullanılmasıdır [52]. Aynı 3-HPA gibi, deneme yanılma yöntemiyle birçok matriksin tarandığı bir çalışmada kovalent olmayan komplekslerin incelenmesi için uygun olan bazik organik moleküller arasından 4-nitroanilin (PNA) öne çıkmıştır [53]. Matrikslerin lazer dalga boyunda kuvvetli absorbansının olması moleküllere enerjinin kontrollü aktarımını sağlar ve parçalanma ürünlerinin oluşumunu engeller. Ancak parçalanma ürünleri yine de görünür ve matriksler bu ürünleri oluşturmaya yatkınlıklarına göre sıcak veya soğuk matriksler olarak adlandırılırlar [33]. Önemli bir matriks özelliği; örneği matriks kristallerinin arasına hapsederek diğer örnek moleküllerinden izole etmesidir. Matriks miktarı çok fazla olduğu için bu durum genellikle sağlanır. Ancak örnek hazırlama yöntemine ve matriks türüne göre matriks ve örneğin kristal yapıdaki konumları değişebilir. Örneklerin matriks içinde dağılma özellikleri incelenmiştir [54-57]. Her ne kadar izolasyon iyon verimlerini arttırabilse de, bu durum desorpsiyon/iyonlaşma için gerekli koşul değildir. MALDI'de matriks ve örneğin yüzeye homojen dağılmamasının önemli bir sonucu spektrumların tekrar edilen lazer vuruşlarında yeniden aynı şekilde oluşmamasıdır. Sıcak nokta (*hot spot*) olgusu olarak

anılan bu durumu gidermek adına sıvı MALDI matrikslerinin kullanılması önerilmiştir. Sıvılar yüzeyi homojen hale getirirerek tekrar eden atışlarda bir nevi yüzeyi onarıp, bağlı iyon şiddetlerinin benzer şekilde oluşmasını sağlarlar. Bu amaçla genelde ikili matriks karışımları hazırlanır. Bu karışım absorban yapan bir katı matriks ile yapmayan bir sıvı bileşenden oluşur [58-60]. MALDI matriksleri ile ilgili önemli bir problem düşük kütle bölgelerinde ciddi matriks pikleri bulunmasıdır. Bunlar küçük moleküllerin incelenmesini zorlaştırır. Bu amaçla düşük kütle bölgesinde pik vermeyen farklı matriksler önerilmiştir [61]. Matrikslerde bulunması gereken bir başka özellik de vakum kararlılığıdır. Bu durum atmosferik basınç ya da orta seviye vakum koşullarında çalışan iyon kaynakları için geçerli değildir. DHB'nin vakumda değişen sıcaklıklarda yapılan LDI çalışmalarında belirli bir sıcaklığın üzerinde matriksin yüzeyden tamamen uçtuğu gözlenmiştir [62]. Protonlanarak iyonlaşmayan örnekler için elektron transfer matriksleri mevcuttur [63-66]. Bu matriksler örneklerin elektron vererek veya alarak, radikal katyon ya da anyon şeklinde oluşumunu teşvik eder. Şekil 2.7'de sık kullanılan bazı MALDI matriksleri verilmiştir.



Şekil 2.7. Sık kullanılan MALDI matriksleri.

2.3 MALDI İyonlaşma Mekanizmaları

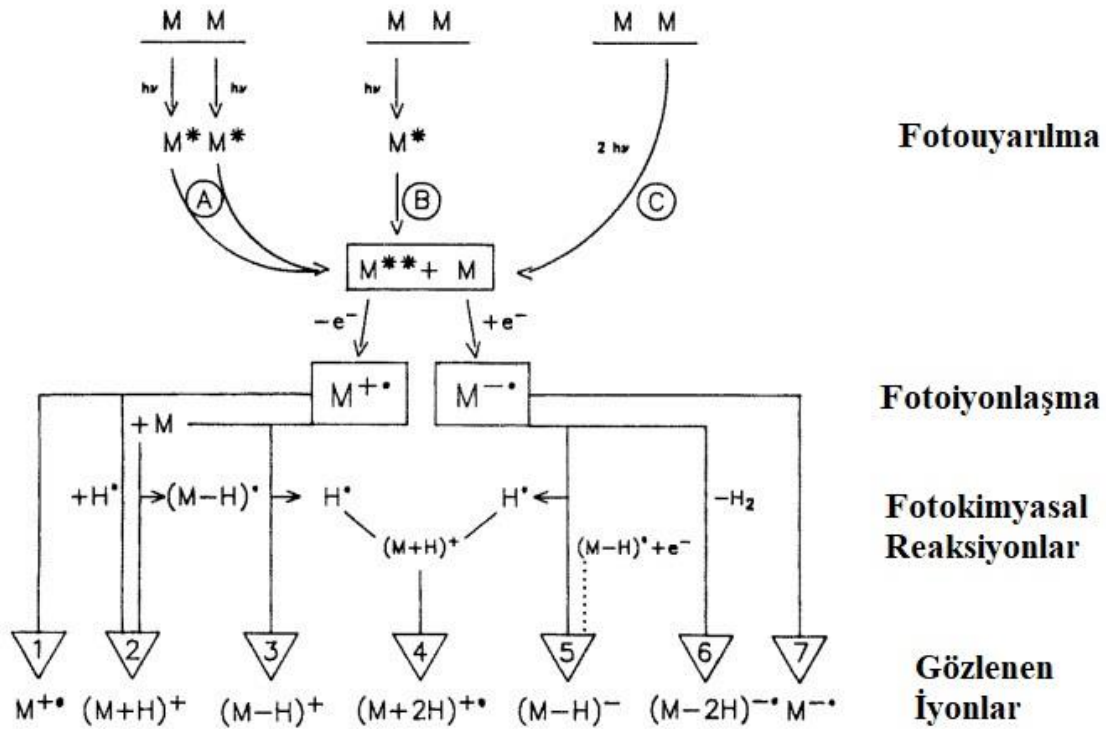
MALDI iyonlaşmasının temelde iki basamakta gerçekleştiği düşünülmektedir. İlk iyonlar lazer atımını takiben çok kısa bir süre içinde oluşurken, plume'ın ilk anlarında madde yoğunluğu yüksekken gerçekleşen iyon/molekül reaksiyonlarıyla nihai iyonların oluştuğu düşünülür. İki basamaklı iyonlaşma yaklaşımı, desorpsiyon rejimleriyle uyumludur. MALDI ile ilgili mekanistik çalışmaların hepsinde ikinci basamağı oluşturan plumedaki iyon/molekül reaksiyonlarına değinilir. Bu reaksiyonlara karşı bir argüman mevcut değildir. Ancak birincil iyonların oluşma mekanizmaları aydınlatılmamıştır ve temelde iki yaklaşım üzerinde durulmaktadır: Fotoiyonlaşmaya bağlı mekanizmalar ve örneklerin lazer atımından önce katı örnek içerisinde iyonik halde bulunmasına dayalı mekanizmalar.

2.3.1. Fotoiyonlaşma Mekanizmaları

Fotoiyonlaşma mekanizmaları MALDI'nin ilk zamanlarından itibaren değerlendirilmiştir. Hazırlanan örneklerde genellikle matriksin aşırı miktarı kullanılmaktadır. Bu nedenle lazer enerjisinin ilk etapta büyük miktarda matriks üzerinde birikeceği düşünülür. Matriks bir veya birkaç foton absorblayarak uyarılabilir veya iyonlaşabilir. Fotoiyonlaşma modelleri hem matriksin hem de örneğin iyonlaşması için ilk basamak olarak matriksin fotoiyonlaşmasını incelerler. Örneğin direk olarak fotoiyonlaşması da mümkündür ancak konsantasyonu düşük olduğu durumlarda toplam spektruma ciddi bir katkı yapması beklenemez. Sık kullanılan MALDI matrikslerinin çoğunun iyonlaşma enerjileri 8 eV civarındadır (Çizelge 2.2). Bu değer UV-MALDI lazerleriyle (örneğin azot 3.68 eV) enerjik olarak üç foton absorblanmasını gerektirmektedir. Bu fotonların absorblanması matriksin uyarılmış hal yaşam süresi içinde gerçekleşmelidir. Bu lazerlerle elde edilen enerji yoğunluğu ile üç fotonun aynı anda tek bir molekül üzerinde lokalize olması düşük olasılıklıdır [67]. Ancak iki foton absorpsiyonu mümkün olabilir. Matriks/analit kümelerinin matriks iyonlaşma enerjisini iki foton seviyesine çekebildiği bilinmektedir [68]. Fototermal modeller plumedada erişilen yüksek sıcaklıkların iki foton enerjisiyle uyarılmış matrikslerin termal enerji katkısıyla iyonlaşabileceklerini önermektedir [69]. Bu şekilde matrikslerin iyonlaşma enerjileri iki foton seviyesine düşebilir. Ehring ve ekibi, matrikslerin farklı şekillerde uyarılmaları ve bunların sonucunda yedi matriks iyonu oluşmasına dair mekanizmalar önermiştir (şekil 2.9). Başka bir çalışmada fotoiyonlaşma ile başlayıp sodyum katılma iyonlarının ve protonlanmış iyonların oluşumuna dair bazı mekanizmalar ayrıca Liao ve ekibince tartışılmıştır [70].

Çizelge 2.2. Bazı matrislerin iyonlaşma enerjisi (IP) değerleri [45].

Matriks	IP(eV)
2,5-DHB	8.054
	8.14
	8.19
	7.86
2,6-DHB	8.3
HABA	8.32
IAA	7.75
Ditranol	6.94
4HCCA	8.50
SA	7.72
	7.54
FA	7.82
THAP	8.44
Nikotinik asit	9.38
	9.21
3-HPA	8.95

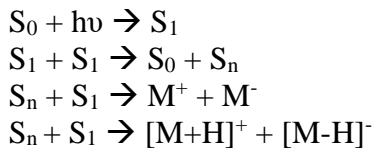


Şekil 2.9. Küçük organik moleküller için fotoiyonlaşma ve takip eden fotokimyasal reaksiyon yolları [71].

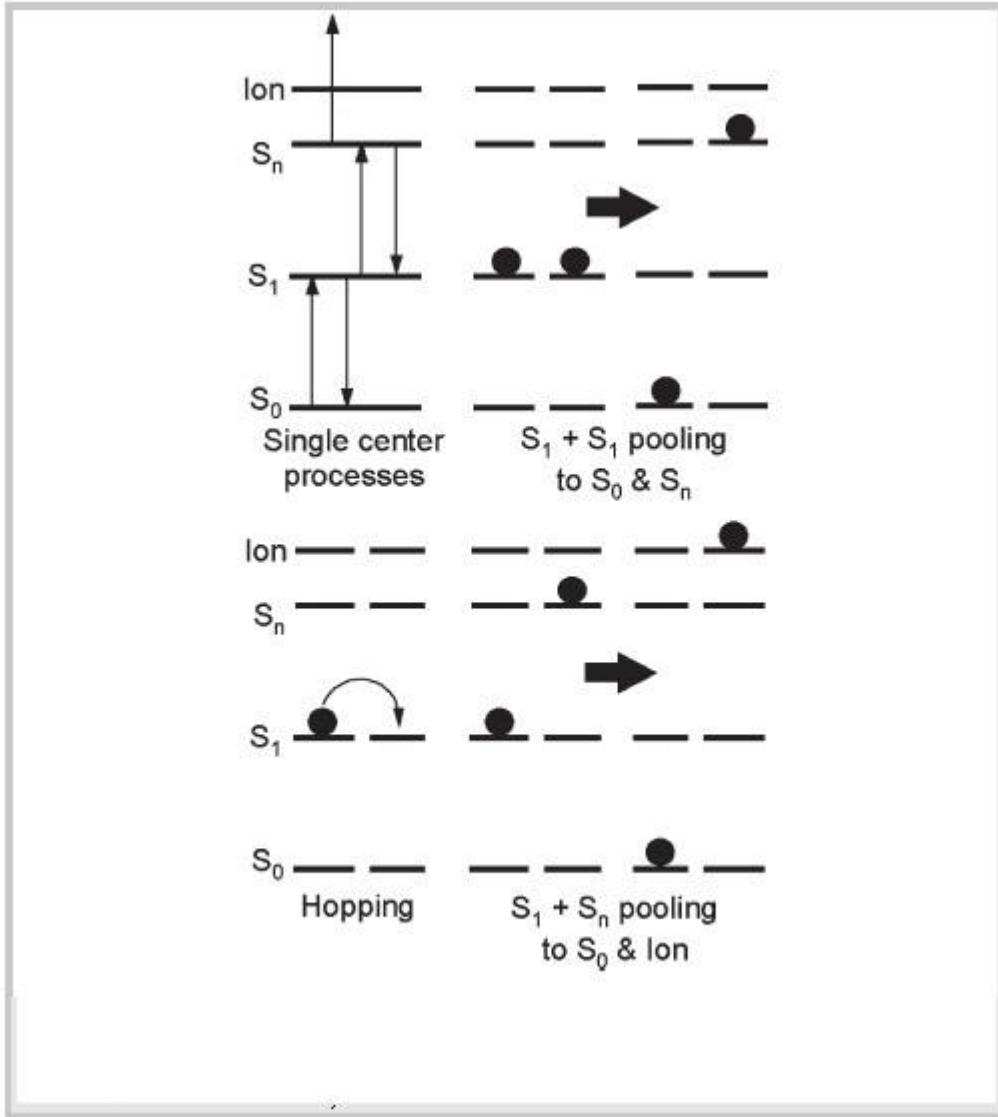
Matriksin uyarılmasına ait mekanizmalar temelde iki türe ayrılır: Matriksin direk olarak çoklu foton alarak uyarılması (şekil 2.9, A ve B) ya da birden fazla uyarılmış matriksin etkileşmesi sonucu enerjinin birisi üzerinde birikerek daha yüksek uyarılmış seviyelere geçmesi: ortaklama (*pooling*, şekil 2.9, C). Bunu takiben iyonlaşma için birkaç ihtimal vardır. Analit/matriks kümelerinin matriksin iyonlaşma enerjisini düşürmesiyle oluşabilecek direk iki foton matriks iyonlaşmasının toplam matriks iyonlarına katkısı, matriks:analit konsantrasyonu 10:1'in üstündeyken önemsenmeyecek değerdedir [72]. MALDI çalışmalarında matriks miktarları bundan çok daha fazla tutulmaktadır. Direk iki foton alımıyla veya ortaklama ile uyarılmış matriksin termal olarak iyonlaşması için gerekli enerjiyi alması olasılığı uyarılmış halin enerjisiyle iyonlaşma enerjisi arasındaki farkın büyüklüğüne bağlıdır. Bu nedenle ortaklama mekanizmalarının iyon oluşumunda ciddi katkısı olduğu düşünülerek birleştirilmiş fiziksel ve kimyasal dinamik modeli (*coupled physical and chemical dynamics model*) ortaya atılmıştır [73-75].

2.3.1.1 Birleştirilmiş Fiziksel ve Kimyasal Dinamik Modeli (cpcd)

Cpcd modeline göre matriks molekülleri lazer atışını takiben uyarılır. Eğer uyarılmış haldeki matrikslerin uyarılmış hal dalga fonksiyonları örtüşüyorsa yan yana gelen iki tanesinin etkileşimi sonucu enerjinin yeniden dağıtılmasıyla bir molekül üzerinde birikmesi sağlanabilir. Bu durumun gerçekleşebilmesi için birbiriyle temas halinde iki molekülün aynı anda uyarılması gerekir. Lazer şiddeti çok yüksek olmadıkça bu ihtimal düşüktür [76]. Ancak nötral ile uyarılmış matriks molekülleri arasındaki orbital örtüşmeleri mevcudiyetinde uyarılmış hal nötral moleküle aktarılabilir. Bu şekilde hareket eden uyarılmış hal türlerine eksiton (*exciton*), bu hareket türüne de eksiton atlaması (*exciton hopping*) denir. Florasans sönmülmesi (*quenching*) ve tuzaklama (*trapping*) deneyleriyle DHB matriksi için eksiton atlama olayının varlığı ve matriks iyon oluşumuna etkisi gösterilmiştir [76, 77]. Uyarımların hareketiyle daha yüksek uyarılmış hal moleküllerin birbiriyle karşılaşarak etkileşimleri sonucu matriks iyonları meydana gelir. Aşağıda bu olaya ilişkin denklemler verilmiştir.



Burada S_0 temel halde matriks, S_1 birinci uyarılmış haldeki matriks, S_n n. elektronik enerji seviyelerine uyarılmış matriks ve M ile gösterilen iyonik türler de matrikse ait iyonlardır. Radikalik katyonların ya da protone, deprotone iyonların oluşumu matriksin iyonlaşma enerjisi (IE) ve proton ilgisi (PA) değerlerine bağlıdır. Şekil 2.10'da eksiton ortaklama ve atlama mekanizmalarının şeması verilmiştir.



Şekil 2.10. Eksiton ortaklama ve atlama [45].

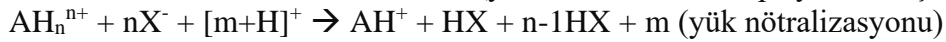
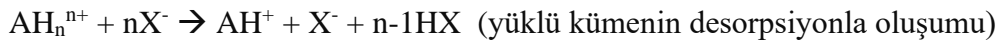
2.3.2. Önceden Katı Halde Var Olan İyonların Desorpsiyonu

İyonik kristaller halihazırda yüklere ayrılmış halde bulduklarından bu yapıların karşıt iyonlarıyla arasındaki kulombik etkileşimleri matriks izolasyonunun da (dielektrik perdeleme) yardımıyla yenmek, enerjik olarak bir kovalent bağın heterolitik kırılarak yük oluşturmasına nazaran çok daha olasıdır. Bu nedenle bu yapıların MALDI'de

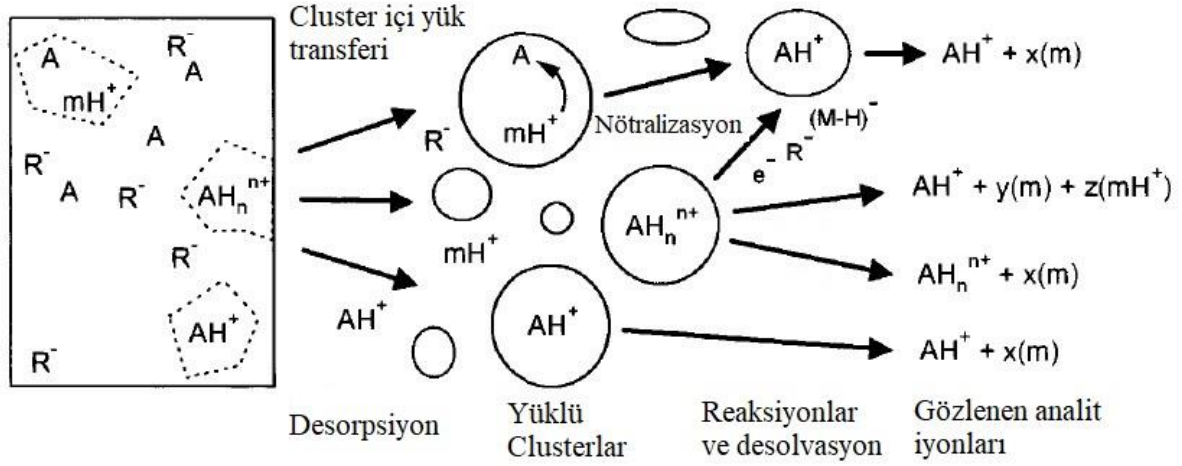
gözlenmesinde sadece desorpsiyon işleminin yeterli olacağı düşünülmektedir. Desorpsiyon işlemlerinde sisteme aktarılan enerji kulombik etkileşimleri yenmeye harcanır. Bazı nötral moleküller de çözücü hazırlamada kullanılan asitler, tuzlar ve geçiş metali bileşiklerinin varlığında çözeltide yüklü hale gelebilirler [78-80]. Kristallenme işlemi sonucu bu türlerin bir kısmı iyonik halde kalabilir. Organik ph belirteçleriyle yapılan deneylerle bu tarz yapıların kristallenme sonrası katı halde de var olabildiği gösterilmiştir [81]. Bu bilgilere dayanarak küme iyonlaşma modeli (*lucky survivor model*) geliştirilmiştir [82-84].

2.3.2.1 Küme İyonlaşma Modeli

Matriks kristalleri içinde örneğin bir kısmının iyonik bir şekilde karşıt iyonlarıyla beraber katı halde bulunduğu düşünülür. MALDI’de çalışılan lazer enerji yoğunlukları genellikle molekül kümelerinin oluşabileceği lazer ile tozlaşma/desorpsiyon rejimlerini mümkün kılar. Bu rejimlerde bir matriks/analit kümesinin oluşumu sırasında kristalin yüzeyden kopması istatistiksel olarak bazen bir karşıt iyonun küme dışında kalmasına neden olabilir. Bu durum kümelerin yüklü olmasına yol açar. Bu yapılar MALDI’de gözlenmiştir [85]. Yüklü kümelerde yük matriks veya analit üzerinde olabilir. Yapıdaki nötral türlerin plume koşullarında “desolvasyonu” ile gözlenen iyonlar oluşur. Küme içi yük transferleri ile farklı iyonların oluşması mümkündür. Yüksüz kümeler de plumeda bulunan yüklerin kümede bulunan karşıt iyonları nötralize etmesi sonucu yüklü hale gelebilir. Pozitif modda iyonların bu şekilde oluşumuna dair bazı tepkimeler aşağıda verilmiştir.



Burada A analit, X herhangi bir karşıt anyon, m matrikstir. Metal katyonları için de benzer reaksiyonlar geçerlidir. Şekil 2.11’de küme iyonlaşmasının bir özeti verilmiştir.



Şekil 2.11. Küme iyonlaşmasında gerçekleşen olaylar [45].

2.3.3. İyonlaşmaya Katkıda Bulunan Diğer Mekanizmalar

IR-MALDI'de kullanılan lazerlerle örneğin elektronik enerji seviyeleri uyarılamayacağı için iyonlaşmanın büyük ölçüde termal olduğu düşünülmektedir. Bir diğer gözlem UV ve IR MALDI spektrumlarının büyük oranda birbirine benzemesidir. Bu nedenle UV-MALDI'deki iyonların oluşumunun da termal olabileceği üzerinde durulmuştur. Termal iyonlaşma mekanizmalarının en bilineni Polar Akışkan Modeli'dir (*Polar Fluid Model*, PFM) [86, 87]. Bu modele göre matrisin lazer absorpsiyonunu takiben enerjinin çoğunluğu ısıya dönüşür. Bu ısı ile matrisin plumedaya çözücüye benzer polar bir akışkan faz oluşturur. Çözelti fazında olduğu gibi polar moleküllerin yük ayrımları ve iyon oluşumu bu akışkan içinde gerçekleşebilir. Bu model polar matris ve analit gerektirdiği için kapsamı sınırlıdır. Buna rağmen günümüzde geliştirilmiş varyasyonları tartışılmaya devam etmektedir [88, 89].

Bazı türlerin pKa değerlerinin UV dalgaboyu ile uyarılmasını takiben ciddi miktarda düştüğü bildirilmiştir. Bu şekilde asidik hale gelen matrislerin temel haldeki diğer matrislere ya da örneğe proton aktarabileceğini düşünerek uyarılmış hal proton transferi (*excited state proton transfer*, ESPT) mekanizması önerilmiştir. Ancak birçok matris molekülünün ESPT aktifliği üzerine yapılan çalışmalar olumsuz sonuçlanmıştır. Yine de iyonlaşmaya ESPT ile gerçekleşen proton transferlerinin bir miktar katkıda bulunduğu düşünülür [90].

Pnömatik Yardım (*pneumatic assistance*) [45] modeli küme iyonlaşma modeline benzer. Matrisin UV absorbansını takiben hızlı bir şekilde bozunarak dağılması (*disintegration*)

ile oluşan gaz fazı küçük parçalanma ürünlerinin yardımıyla örneğin yüzeyden desorpsiyonuna dayanır . İyonlaşma küme modeliyle aynıdır.

2.3.4. Gaz Fazı İkincil İyonlaşma Reaksiyonları

Plume yoğunluğunun yüksek olduğu süreçte ilk oluşan iyonların nötral moleküllerle reaksiyonları sonucu nihai iyonlar oluşur. MALDI'de proton, elektron ve katyon transferine dayalı ikincil reaksiyonlar sık gözlenir. Bölgesel termal dengeye ulaşıldığı düşünüldüğünden bu ikincil reaksiyonların sonuçları termodinamik değişkenler kullanılarak öngörülebilir. Günümüzde matrikslerin gaz fazı bazlık (*gas phase basicity*, GB), PA ve IE değerlerinin ölçümleri hız kazanmıştır. Yerel termal dengeye ulaşım plume yoğunluğu ve moleküllerin hızı ile alakalıdır. Plume konsantrasyonu düşük olduğunda ikincil reaksiyonlar gerçekleşmeden hızlı bir şekilde genişler ve nihai ürünler kinetik kontrollü olur [91]. Birçok analit MALDI'de protonlanmış şekilde gözlenir. Bölgesel termal denge varlığında oluşan iyonların bağıl oranlarını büyük oranda matriks ve örneğin proton ilgisi değeri belirler. Bazı peptitler, aminoasitler ve matriksler için GB, PA değerleri ve spektrumla ilişkisi bildirilmiştir [92-94]. PA'sı düşük olan örnekler için metal katyonlanma şeklinde iyonlaşma uygun bir mekanizma olabilir. Bu durumda matriksin metal katyon ilgisi değerlerinin örnekten düşük olmasına dikkat edilmelidir. Birçok örnekte en sık karşılaşılan metal katyonları sodyum ve potasyumdur. Matrikslerin sodyum ilgisi değerleri 140-170 kJ/mol arasında değişirken, peptitler ve aminoasitler 150-160 kJ/mol civarlarındadır [95, 96]. Bu değerler birbirine çok yakın olduğundan gaz fazında sodyumlanma, matriks ve örnek arasında yarışmaya tabidir. Hem matrikslerin hem de örnek moleküllerinin radikalik katyon şeklinde iyonlaşması MALDI'de gözlemlenir. Protonlama ve katyonlamanın enerjik olarak uygun olmadığı örnekler için elektron transferiyle (ET) iyonlaşma uygun bir yöntem olabilir. Pozitif modda çalışırken örneğin ve matriksin iyonlaşma enerjisi değerleri [97], negatif modda ise elektron ilgisi değerleri termodinamik olarak önem taşır [65]. İyonlaşma enerjisi matriksten düşük olan örneklere matriksten elektron aktarımı uygun bir mekanizmadır. Gaz fazı proton aktarımı ve metal katyonlanma reaksiyonları gözlemlenmiştir [98-100]. Gaz fazı iyon molekül reaksiyonlarının bir sonucu matriks ve analit baskılanmasıdır (*matrix suppression effect* (MSE), *analyte suppression effect* (ASE)). Baskılanma her türlü örnekte gözlemlenebilir. Matriks iyonlarının baskılanması genellikle bütün matriksle alakalı iyon şiddetlerinde düşüş yaşanmasına neden olur [101, 102].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Trifloroasetik asit (TFA), metanol, 3-HPA, CHCA, dimethyl sulfoxide (DMSO) Sigma-Aldrich (ABD), asetonitril (ACN) ve tetrahidrofuran (THF) Merck (Almanya), SA Acros (ABD), PNA, DHB, trans-2-[3-(4-tert-bütilfenil)-2-metil-2-propenildien]malononitril (DCTB) Fluka (İsviçre) firmalarından alınmıştır.

Kloro-2,6-bis(N-metil-benzimidazol-2-il)piridinplatin(II)klorür (B-19), nitrato-2,6-bis(-benzimidazol-2-il)piridinplatin(II)nitrat (B-17_R), 5,6,12,13-tetrakloro-2,9-bis(2-(piridin-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-il)antra[2,1,9-*def*:6,5,10-*d'e'f'*]diizokinolin-1,3,8,10(2*H*,9*H*)-tetraon (FP-49), 5,6,12,13-tetrakis(4-metoksifenoksi)-2,9-bis(2-(piridin-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-il)antra[2,1,9-*def*:6,5,10-*d'e'f'*]diizokinolin-1,3,8,10(2*H*,9*H*)-tetraon (FP-50), 5,6,12,13-tetrakis(4-(tert-bütil)fenoksi)-2,9-bis(2-(piridin-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-il)antra[2,1,9-*def*:6,5,10-*d'e'f'*]diizokinolin-1,3,8,10(2*H*,9*H*)-tetraon (FP-53), Mangan (II) 2,2',2'',2'''-(ftalosiyenin-2,9,16,23-tetrailtetrakis(oksi))tetrakis (N,N-dibenziletanamin) (MnPc), Nikel (II) 2,2',2'',2'''-(ftalosiyenin-2,9,16,23-tetrailtetrakis(oksi))tetrakis(N,N-dibenziletanamin) (NiPc), Kobalt (II) 2,2',2'',2'''-(ftalosiyenin-2,9,16,23-tetrailtetrakis(oksi))tetrakis (N,N-dibenziletanamin) (CoPc) ve üç merkezli çinko ftalosiyenin kompleksi (ZnPc) Prof. Dr. Abdurrahman Şengül tarafından sentezlenip bize sağlanmıştır.

3.2. Araç Gereçler

MALDI çalışmalarında Bruker Daltonik'in (Bremen, Almanya) RapifleX MALDI Tissue typer™ cihazı kullanılmıştır. Örnekler MTP-384 ground steel plate'e spotlanarak MALDI cihazına yüklenmiştir. Örnek çözeltilerinin karıştırılmasında Heidolph-Reax Cotrol Vortex (Heidolph, Almanya) cihazı kullanılmıştır. Spektrumların eldesi için flexControl v4.0, veri analizi için flexAnalysis v4.0 bilgisayar programları kullanılmıştır. Şekillerin düzenlenmesi Adobe Illustrator 2019 programı vasıtasıyla yapılmıştır.

3.3. MALDI Cihaz Parametreleri

Kullanılan MALDI cihazında BRUKER scanning smartbeam™ 3D 355 nm dalgaboyunda lazer kullanılmaktadır. Bu lazer atım başına 100 µJ ve üstü enerji aktarabilmektedir. Tekrarlanma hızı (repetition rate) 1-10 kHz arasındadır. İyonlar pozitif

ve negatif modda sırasıyla +20/-20 kV'a ulaşan elektriksel potansiyellerle ivmelendirilebilmektedir. Sistem vakumu biri turbomoleküler diğeri mekanik olmak üzere iki pompa vasıtasıyla sağlamaktadır.

3.3.1. Pozitif ve Negatif Mod MALDI Yöntemleri

Pozitif ve negatif mod için kullanılan metodlar da diğeri bütün parametreler aynı olup iyon kaynağı potansiyeli pozitif mod için 20 kV iken negatif mod için -20 kV'tur.

- Reflektron: Açık
- Lazer Odaklaması: MS Thin Layer
- Lazer Atış Sayısı: 1000
- Lazer Atış Frekansı: 10000 Hz
- Kütle Aralığı: 1-3000 m/z
- İyon Kaynağı Potansiyeli: 20 kV
- Pik Belirleme Algoritması: Centroid
- Sinyal/Gürültü Eşiği: 20

3.4. Matriks ve Örnek Çözeltilerinin Hazırlanışı

Bütün deneylerde matriks konsantrasyonu örnekten en az 100 kat fazla olacak şekilde çalışılmıştır. MALDI deneylerinde ince tabaka (thin layer) örnek hazırlama yöntemi kullanılmıştır. Buna göre önce matriks çözeltisinden 1 µL alınarak plate'e uygulanmış olup, çözücünün buharlaşmasını takiben aynı bölge üzerine örnek çözeltisinden 1 µL damlatılarak, tekrar çözücü buharlaşması beklenip MALDI kütle spektrometresine yüklenmiştir. LDI deneylerinde ise ilgili çözeltinin (matriks ya da örnek çözeltisi) 1 µL'si alınarak doğrudan uygulanıp, çözelti buharlaşmasını takiben MALDI ile analiz edilmiştir.

Asit İlaveli ve İlavesiz 3-HPA Matriksinin Hazırlanışı: 10 mg 3-HPA'nın, su/ACN (50:50; v/v) karışımında çözülerek 1 mL'ye tamamlanmasıyla 10 mg/mL asit ilavesiz 3-HPA çözeltisi hazırlanmıştır. Yine 10 mg 3-HPA'nın, su/ACN/TFA (50:50:1; v/v) karışımında çözülerek 1 mL'ye tamamlanmasıyla 10 mg/mL 3-HPA asit ilaveli çözeltisi hazırlanmıştır.

Asit İlaveli ve İlavesiz DHB Matriksinin Hazırlanışı: 10 mg DHB'nin, su/ACN (70:30; v/v) karışımında çözülerek 1 mL'ye tamamlanmasıyla 10 mg/mL asit ilavesiz DHB

çözeltisi hazırlanmıştır. Yine 10 mg DHB'nin, su/ACN/TFA (70:30:1; v/v) karışımında çözülerek 1 mL'ye tamamlanmasıyla 10 mg/mL DHB asit ilaveli çözeltisi hazırlanmıştır.

Asit İlaveli ve İlavesiz DCTB Matriksinin Hazırlanışı: 10 mg DCTB 1 mL THF'de çözülerek 10 mg/mL asit ilavesiz DCTB çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiliye 10 µL TFA ilavesiyle DCTB asit ilaveli çözeltisi oluşturulmuştur.

Asit İlaveli ve İlavesiz PNA Matriksinin Hazırlanışı: 10 mg PNA'nın metanol/su (85:15; v/v) karışımında çözülerek 1 mL'ye tamamlanmasıyla 10 mg/mL asit ilavesiz PNA çözeltisi hazırlanmıştır. Yine 10 mg PNA'nın, metanol/su/TFA (85:15:1; v/v) karışımında çözülerek 1 mL'ye tamamlanmasıyla 10 mg/mL PNA asit ilaveli çözeltisi hazırlanmıştır.

Asit İlaveli ve İlavesiz CHCA Matriksinin Hazırlanışı: 10 mg CHCA'nın su/ACN (70:30; v/v) karışımında çözülerek 1 mL'ye tamamlanmasıyla 10 mg/mL asit ilavesiz CHCA çözeltisi hazırlanmıştır. Yine 10 mg CHCA'nın, su/ACN/TFA (70:30:1; v/v) karışımında çözülerek 1 mL'ye tamamlanmasıyla 10 mg/mL CHCA asit ilaveli çözeltisi elde edilmiştir.

Asit İlaveli ve İlavesiz SA Matriksinin Hazırlanışı: 10 mg SA'nın su/ACN (70:30; v/v) karışımında çözülerek 1 mL'ye tamamlanmasıyla 10 mg/mL asit ilavesiz SA çözeltisi hazırlanmıştır. Yine 10 mg SA'nın, su/ACN/TFA (70:30:1; v/v) karışımında çözülerek 1 mL'ye tamamlanmasıyla 10 mg/mL SA asit ilaveli çözeltisi elde edilmiştir.

Asit İlaveli ve İlavesiz B-19 Örnek Çözeltisinin Hazırlanışı: 0,1 mg B-19 metanolde çözülerek 1 mL'ye tamamlanarak 0,1 mg/mL B-19 asit ilavesiz çözeltisi hazırlanmıştır. Aynı çözeltiliye 10 µL TFA ilavesiyle B-19 asit ilaveli çözeltisi oluşturulmuştur.

Asit İlaveli ve İlavesiz B-17_R Örnek Çözeltisinin Hazırlanışı: 0,1 mg B-17_R DMSO/metanol (10/90; v/v) içinde çözülerek 1 mL'ye tamamlanarak 0,1 mg/mL B-17_R asit ilavesiz çözeltisi hazırlanmıştır. Aynı çözeltiliye 10 µL TFA ilavesiyle B-17_R asit ilaveli çözeltisi oluşturulmuştur.

Asit İlaveli ve İlavesiz FP-49 Örnek Çözeltisinin Hazırlanışı: 0,1 mg FP-49 1mL THF içinde çözülerek 0,1 mg/mL FP-49 asit ilavesiz çözeltisi hazırlanmıştır. Aynı çözeltiliye 10 µL TFA ilavesiyle FP-49 asit ilaveli çözeltisi oluşturulmuştur.

Asit İlaveli ve İlavesiz FP-50 Örnek Çözeltilisinin Hazırlanışı: 0,1 mg FP-50 1mL THF içinde çözülerek 0,1 mg/mL FP-50 asit ilavesiz çözeltisi hazırlanmıştır. Aynı çözeltiliye 10 µL TFA ilavesiyle FP-50 asit ilaveli çözeltisi oluşturulmuştur.

Asit İlaveli ve İlavesiz FP-53 Örnek Çözeltilisinin Hazırlanışı: 0,1 mg FP-53 1mL THF içinde çözülerek 0,1 mg/mL FP-53 asit ilavesiz çözeltisi hazırlanmıştır. Aynı çözeltiliye 10 µL TFA ilavesiyle FP-53 asit ilaveli çözeltisi oluşturulmuştur.

MnPc, CoPc, NiPc ve ZnPc Örnek Çözeltilerinin Hazırlanışı: İlgili kompleksin 0,1 mg'ı 1 mL ACN içinde çözülerek 0,1 mg/mL çözeltileri hazırlanmıştır. Bu örnekler asit ilavesiz çalışılmıştır.

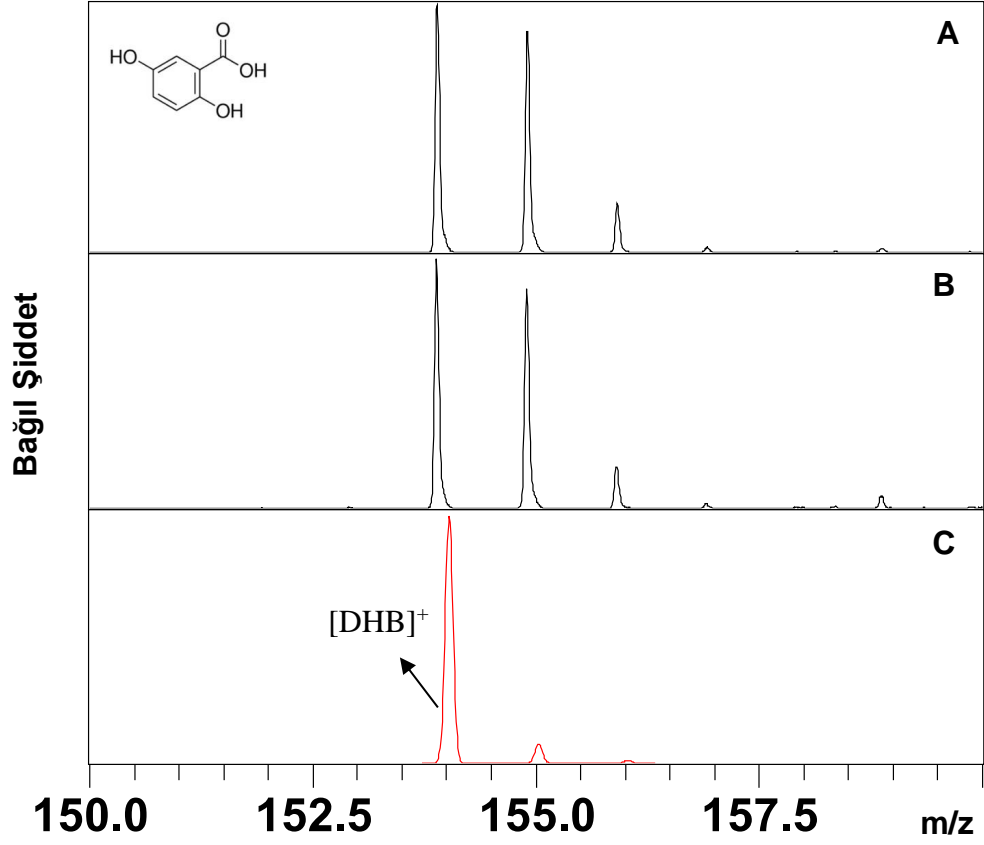
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Deneylede Kullanılan MALDI Matrikslerinin LDI Spektrumları

Örneklerin MALDI spektrumlarındaki yük dağılımlarını incelerken matriks-örnek etkileşimlerinin daha iyi anlaşılabilmesi için bazı örneklerde matrikse ait kütle bölgeleri izlenmiştir. Bu bölgelerdeki dağılımlar matriks LDI spektrumları ile karşılaştırılarak olası yük transferleri tartışılmıştır. Bu bölümde bahsedilen karşılaştırılmaların yapılabilmesi için matrikslerin pozitif ve negatif modda LDI spektrumları elde edilmiştir. Kullanılan lazer şiddeti matriksin desorpsiyon/iyonlaşma eşiğinin üzerinde optimum iyon verimlerinin gözlemlendiği değerlere ayarlanmıştır.

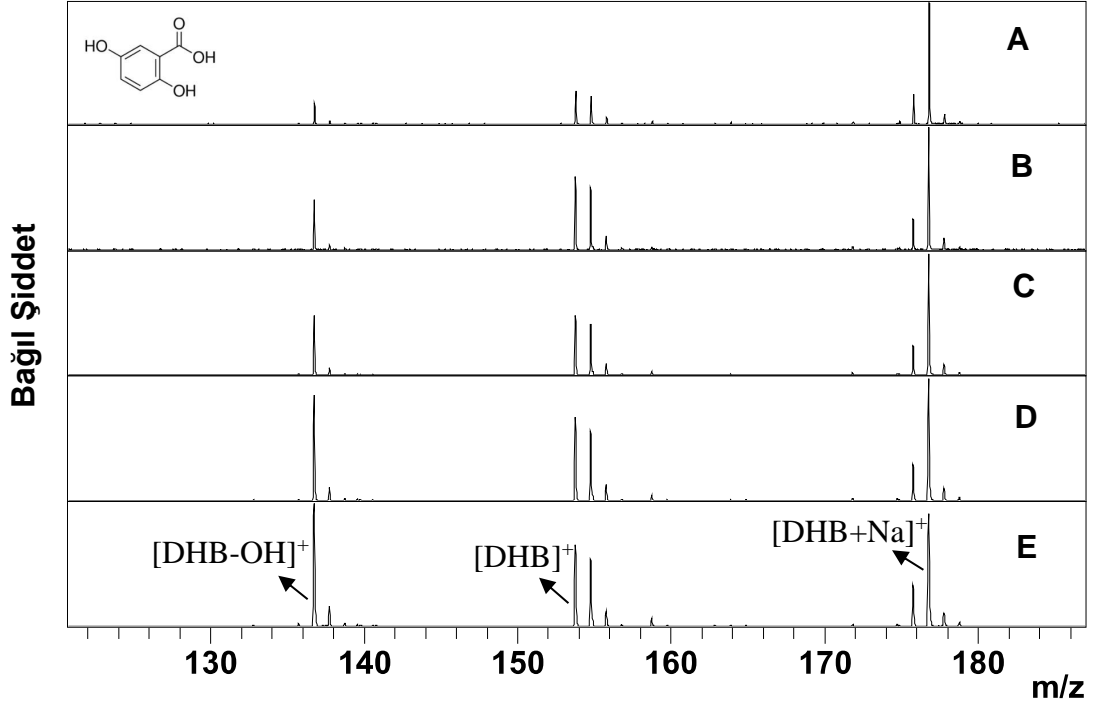
4.1.1. DHB LDI Spektrumu

DHB matriksinin LDI spektrumu asit ilaveli ve ilavesiz ortamlarda hazırlanarak incelenmiştir. DHB'nin molekül kütlesi (monoizotopik kütle, $M_{\text{mono}}=154,02$ Da) bölgesine denk gelen 150-160 m/z kütle aralığı (şekil 4.1.1) ve $[\text{DHB-OH}]^+$, $[\text{DHB}]^+$ ve $[\text{DHB-Na}]^+$ iyonlarını kapsayan 120-185 m/z aralığı (şekil 4.1.2) pozitif modda ayrı incelenmiştir. Dışarıdan ilave edilen asit varlığının DHB izotopik dağılımı üzerine bir etkisi olmadığı şekil 4.1.1'de görülmektedir. Şekil 4.1.1'de $[\text{DHB}]^+$ pik şiddetinin $[\text{DHB+H}]^+$ 'ya oranı asit ilaveli ve ilavesiz örneklerde teorik pikten farklılık göstermiştir. Deneysel spektrumlarda $[\text{DHB+H}]^+$ şiddetindeki bağıl artış MALDI ortamına özgü iyonlaşma ürünlerine işaret etmektedir. Zayıf organik asit olan DHB'nin hem çözücü ortamında hem de kristal yapıda halihazırda protonlanması beklenmez. Bu nedenle bu iyonun oluşumunun C_{13} 'ten gelen doğal izotop katkıları dışında uyarılmış matriksin disproporsiyonasyonu veya halihazırda oluşmuş radikal katyonun çevreden bir hidrojen atomu alması ile olduğu düşünülmüştür. Plume'da hidrojen radikallerinin varlığı bilinmektedir [103]. Şekil 4.1.3'te DHB'nin negatif modda molekül bölgesindeki spektrumu verilmiştir. Bu modda oluşan türler $[\text{DHB-H}]^-$ ve $[\text{DHB-2H}]^-$ olmuştur.

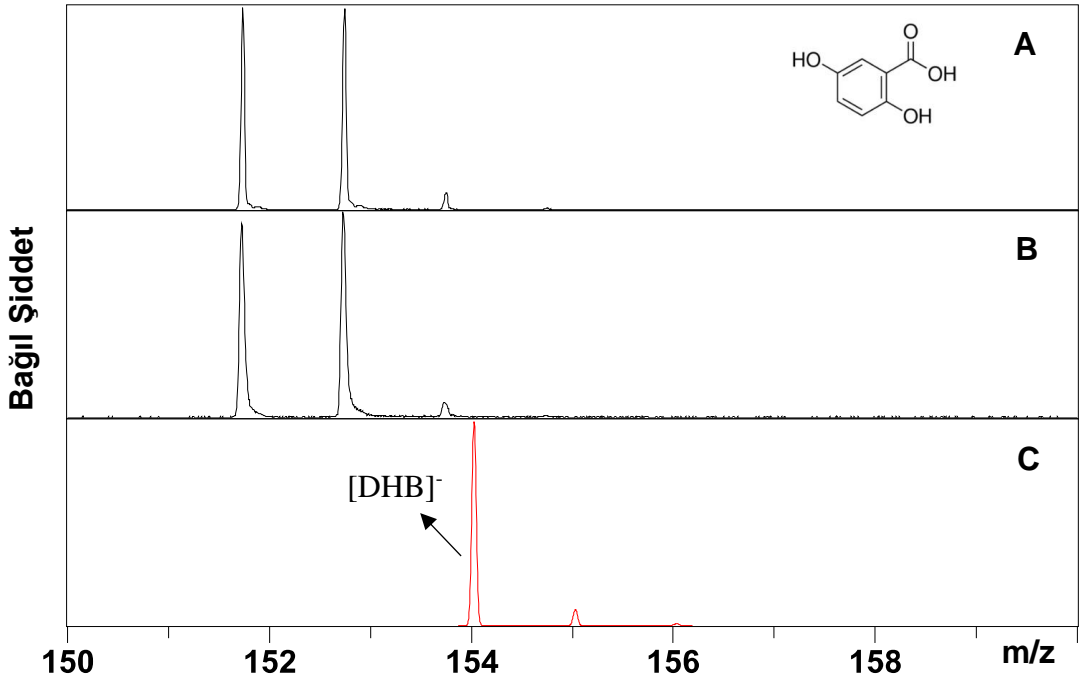


Şekil 4.1.1. DHB'nin 150-160 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=154,02$ Da) (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) TFA ilavesiz çözeltisinin, (C) teorik pozitif mod LDI spektrumları. Teorik spektrum DHB molekülünün hesaplanmış doğal izotopik dağılımını göstermektedir.

Şekil 4.1.2'de farklı lazer şiddetlerinde asit ilavesiz DHB çözeltisinin LDI pozitif spektrumu incelenmiştir. Lazer şiddetinin artmasıyla daha çok $[\text{DHB}]^+$ bozunarak $[\text{DHB-OH}]^+$ 'ya dönüşmüş olup, bu parçalanma ürününün bağıl şiddeti $[\text{DHB+Na}]^+$ 'ya yaklaşmıştır.



Şekil 4.1.2. DHB'nin 120-185 m/z bölgesindeki asit ilavesiz çözeltisinin ($M_{\text{mono}}=154,02$ Da) (A) 40%, (B) 50%, (C) 60%, (D) 70%, (E) 80% lazer şiddetinde pozitif mod LDI spektrumları.



Şekil 4.1.3. DHB'nin 150-160 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=154,02$ Da) (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) asit ilavesiz çözeltisinin, (C) teorik negatif mod

LDI spektrumları. Teorik spektrum DHB molekülünün hesaplanmış doğal izotopik dağılımını göstermektedir.

Negatif spektrumlarda iyonlaşma için gerekli eşik lazer şiddetinin pozitif moda göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. 250 m/z altında kayda değer iyon şiddetindeki tek pik molekül bölgesindeki pikler olmuştur. Lazer şiddetinin artırılması ile bağlı pik şiddetlerinde değişiklik olmadığı tespit edilmiştir.

4.1.2. 3-HPA LDI Spektrumu

3-HPA'da matriksin tamamen protonlanmış hali gözlemlenmiştir. Bu durum DHB ve 3-HPA matrikslerinin çizelge 4.1'deki ortalama proton ilgisi değerleriyle uyumludur. 3-HPA'nın ortalama proton ilgisi değeri DHB'den büyük olduğundan (sırasıyla 897 kJ/mol ve 854 kJ/mol) protonlanmış kütlenin oluşumuna ait tepkimeler ağır basmaktadır. Literatürdeki proton ilgisi değerleri farklılık göstermekte olup karşılaştırmalarda bildirilmiş değerlerin ortalaması kullanılmıştır. Şekil 4.1.4'te 3-HPA'nın molekül kütlesi bölgesine ($M_{\text{mono}}=139,02$ Da) denk gelen 135-145 m/z aralığına ait asit ilaveli ve ilavesiz çözeltilisinin LDI spektrumları teorik izotopik dağılım ile birlikte verilmiştir.

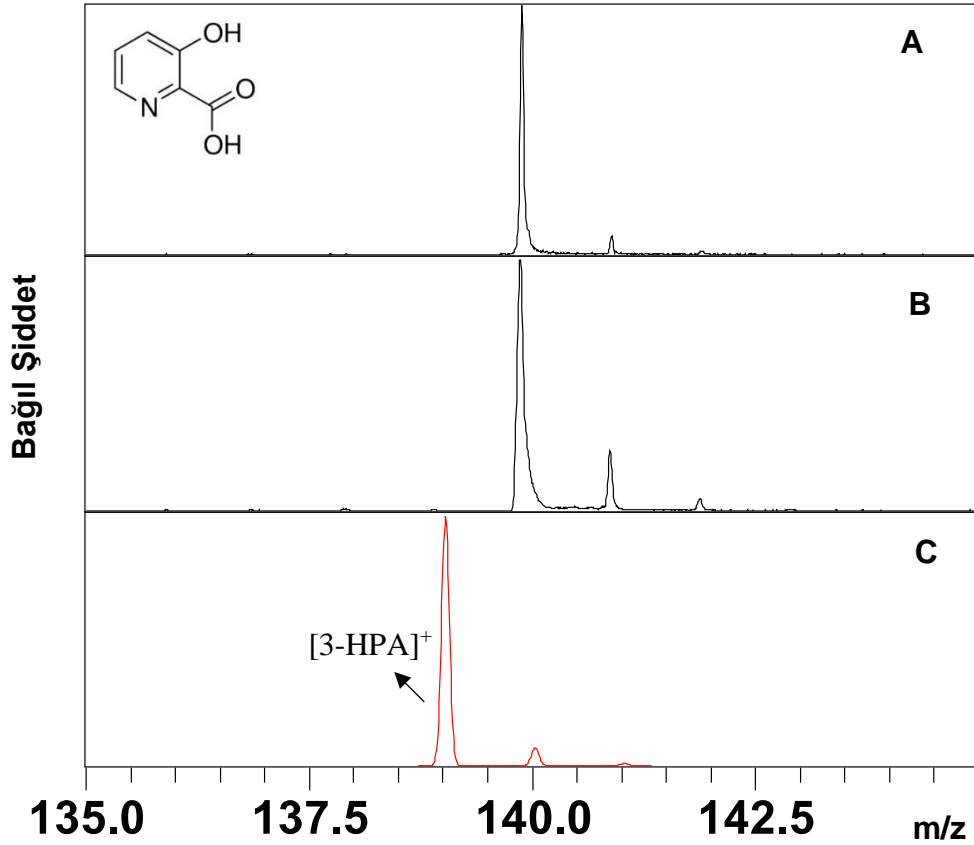
Çizelge 4.1. Deneylede kullanılan matriksler için literatürde bildirilen bazı proton ilgisi değerleri.

Matriks	Proton İlgisi (kJ/mol)
3-HPA	897(ort*)
	$898 \pm 1,4$ [104]
	896 [94]
CHCA	848 (ort*)
	$765,71^1 \pm 8,4$ [92]
	$933^2 \pm 9$ [105]
	$841 \pm 1,1$ [104]
	858,9 [106]
DCTB	-
DHB	854(ort*)
	855 ± 8 [107]

	853,5 ± 16,7 [92]
	854 ± 14 [105]
	855,2 ± 0,7 [104]
	850,4 [108]
PNA	866,1 ± 8 [109]
SA	878(ort*)
	853,5 ± 16,7 [92]
	894,5 ± 13,5 [105]
	875,3 ± 1,6 [104]
	887 [94]

*: Farklı literatür değerlerinin ortalaması.

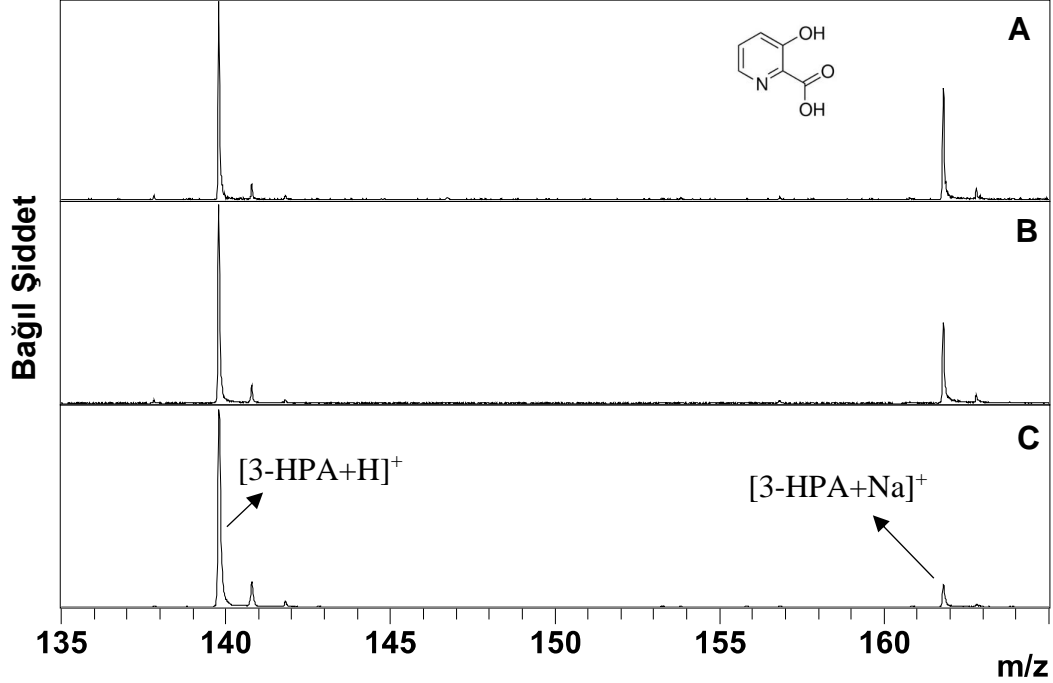
^{1, 2}: Bu değerler CHCA'nın ortalaması alınırken ihmal edilmiştir.



Şekil 4.1.4. 3-HPA'nin 135-145 m/z ($M_{\text{mono}}=139,02$ Da) bölgesindeki (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) asit ilavesiz çözeltisinin, (C) teorik pozitif mod LDI

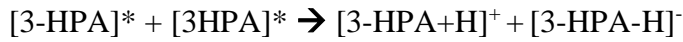
spektrumları. Teorik spektrum 3-HPA nötral molekülüne ait doğal izotopik dağılımını göstermektedir.

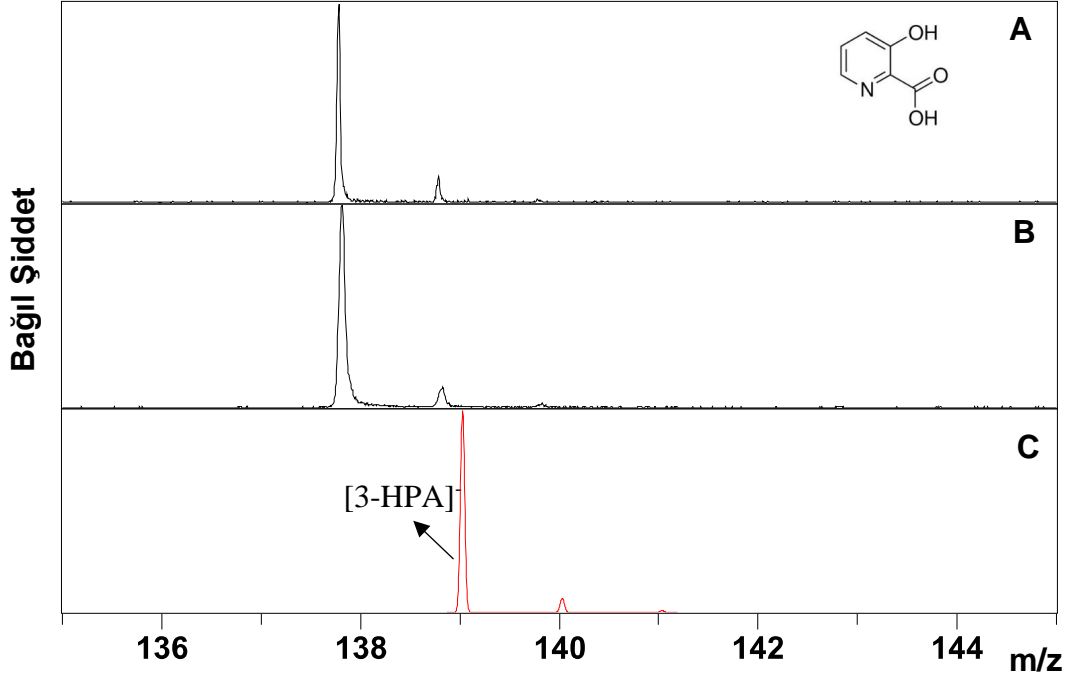
Şekil 4.1.5'te lazer şiddetiyle 3-HPA molekül bölgesi ve sodyum bağlı iyonunun bölgesinin bağıl şiddetlerindeki değişim incelenmiştir. Lazeri şiddet arttıkça [3-HPA+Na]⁺ bağıl şiddeti azalmıştır.



Şekil 4.1.5. 3-HPA'nin 135-165 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=139,02$ Da) (A) 60%, (B) 70%, (C) 80% lazer şiddetinde asit ilavesiz çözeltisinin pozitif mod LDI spektrumları.

Şekil 4.1.6 molekülün negatif mod LDI spektrumu olup baskın tür [3-HPA-H]⁻'dir. Uyarılmış nötral molekülün disproporsiyonasyon reaksiyonuyla hem pozitif hem negatif iyonlar oluşabilir.



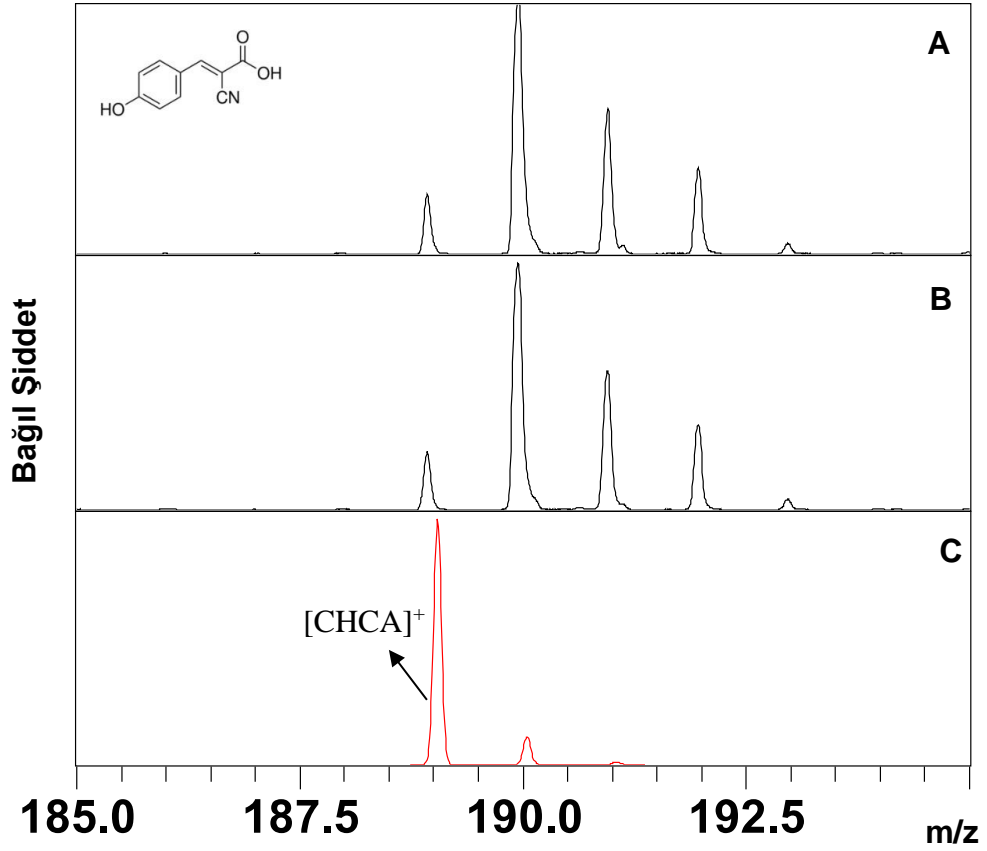


Şekil 4.1.6. 3-HPA'nin 135-145 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=139,02$ Da) (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) asit ilavesiz çözeltisinin, (C) teorik negatif mod LDI spektrumları. Teorik spektrum nötral moleküle ait doğal izotopik dağılımı göstermektedir.

4.1.3. CHCA LDI Spektrumu

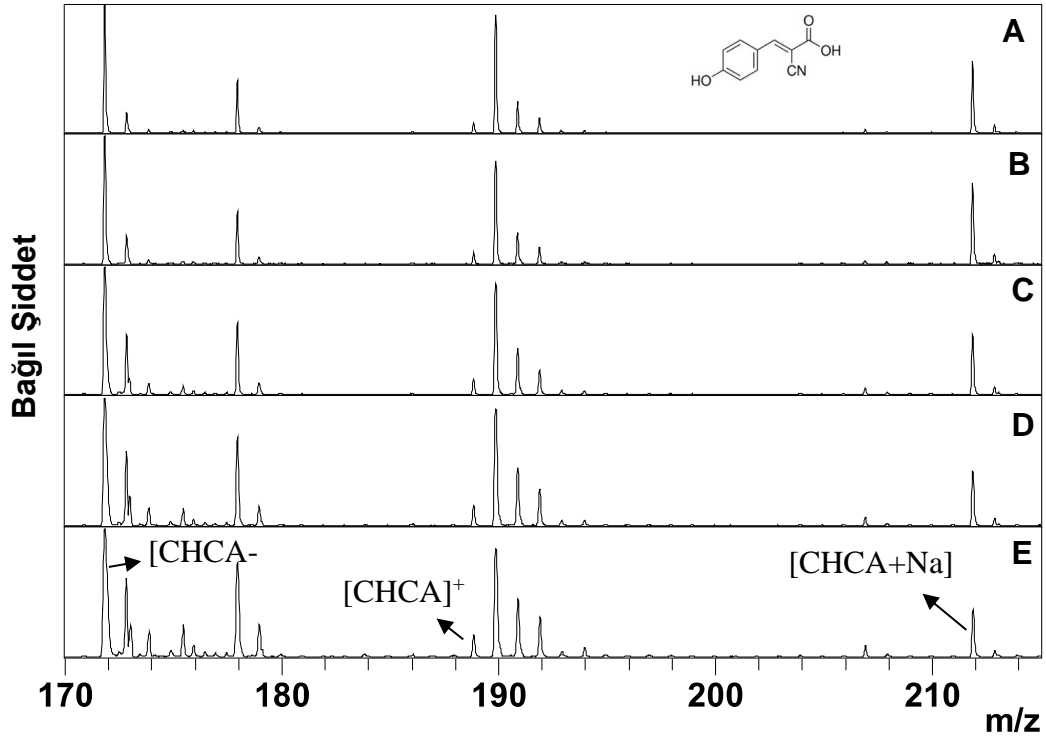
CHCA ortalama proton ilgisi değeri (848 kJ/mol), hem 3-HPA'dan (897 kJ/mol) hem de DHB'den düşük olup (854 kJ/mol) şekil 4.1.7'deki $[\text{CHCA}]^+$ ($M_{\text{mono}}=189,04$ Da) pik şiddetinin $[\text{CHCA}+\text{H}]^+$ 'ya oranı bu verilerle uyum göstermemiştir. CHCA için literatürde bildirilen en düşük proton ilgisi değeri ile en yüksek proton ilgisi değerleri sırasıyla $765,7 \pm 8,4$ ve 933 ± 9 kJ/mol olup geniş aralık değerlendirmeyi zorlaştırmıştır. Ortalama değer bu iki değer yoksayılarak hesaplanmış olup daha kesin proton ilgisi değerlerine ihtiyaç duyulduğu aşıkardır. Ayrıca lazer şiddetleri matrikse göre optimum değerlerde seçildiği için örneklere aktarılan enerji değerleri farklılık göstermektedir. Radikalik katyon şeklinde iyonlaşma ve protonlanarak iyonlaşma reaksiyonlarının enerji gereksinimleri farklıdır. Dengeye ulaşan reaksiyonlarda matrikslerin elektron yakalama ve proton ilgisi değerlerine göre bu reaksiyonların miktarları değişebilir. Ancak MALDI'de tam bir denge durumundan söz edilemez. Bunun dışında $[\text{CHCA}+\text{H}]^+$ bağıl oranı yine de fazladır ve protonlanmaya neden olan reaksiyonların baskın olduğu gözlenmiştir. Teorik pikte öngörülmeyen $[\text{CHCA}+2\text{H}]^+$ ve $[\text{CHCA}+3\text{H}]^+$ pikleri MALDI'ye özgü iyonlardır.

Matriksin ekstra hidrojen atomu aldığı bu durumlar aynı DHB’de olduğu gibi plumedaki hidrojen atomu varlığına işaret etmektedir.

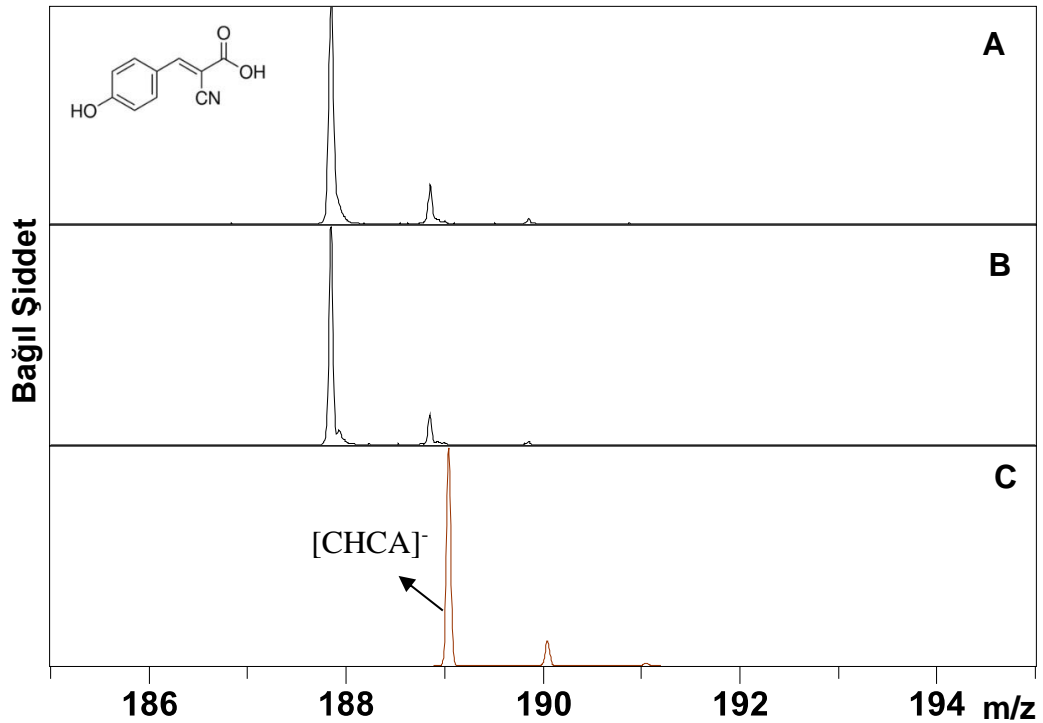


Şekil 4.1.7. CHCA'nın 185-195 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=189,04$ Da) (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) asit ilavesiz çözeltisinin, (C) teorik pozitif mod LDI spektrumları. Teorik spektrum CHCA nötral molekülüne ait doğal izotopik dağılımı göstermektedir.

Şekil 4.1.8’de lazer şiddetindeki değişimle CHCA molekül, sodyum ve OH çıkışına denk gelen parçalanma ürünü kütle bölgelerindeki bağıl şiddet değişimleri incelenmiştir. Burada da lazer şiddetinin artışıyla sodyum bağlanma iyonlarının bağıl iyon şiddeti düşüşü dikkat çekmiştir. Şekil 4.1.9’da verilen negatif mod molekül bölgesi spektrumunda sadece [CHCA-H]⁻ iyonlarının oluşması dikkat çekmiştir. Pozitif mod pikleriyle karşılaştırılınca iki moddaki molekül bölgesi iyonlarının oluşumunun birbirinden bağımsız gerçekleştiği düşünülmüştür.



Şekil 4.1.8. CHCA'nın 170-215 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=189,04$ Da) (A) 30%, (B) 40%, (C) 50%, (D) 60%, (E) 70% lazer şiddetinde asit ilavesiz çözeltisinin pozitif mod LDI spektrumları.



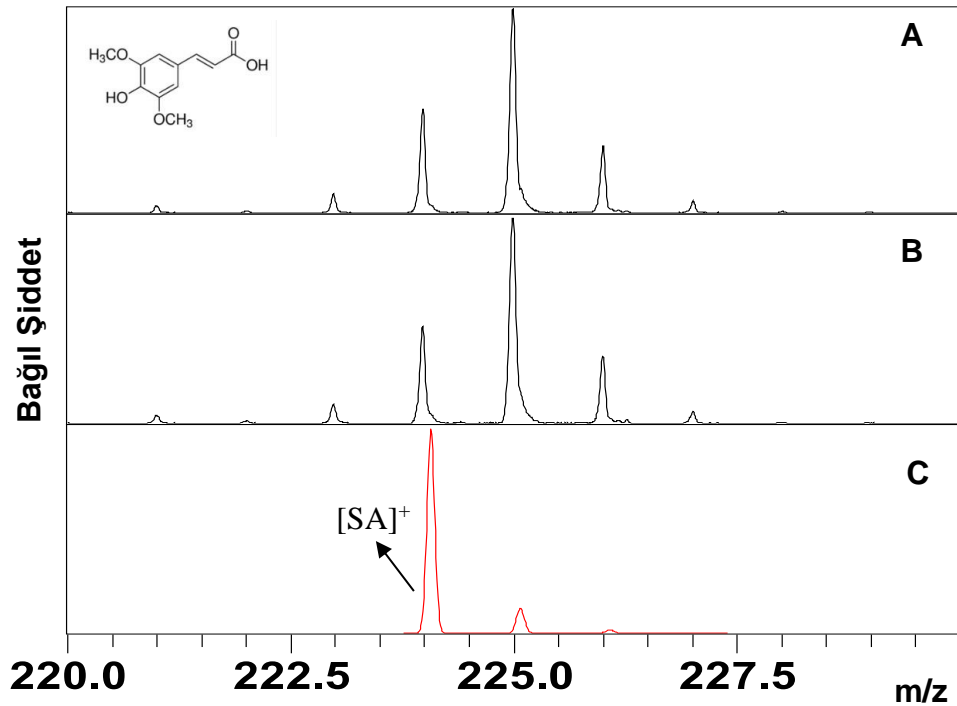
Şekil 4.1.9. CHCA'nın 185-195 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=189,04$ Da) (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) asit ilave edilmemiş çözeltisinin, (C) teorik negatif

mod LDI spektrumları. Teorik spektrum CHCA molekülüne ait doğal izotopik dağılımı göstermektedir.

CHCA negatif mod molekül bölgesi iyon verimleri pozitif modda göre daha yüksek çıkmış olup, eşik iyonlaşma enerjisi pozitif moddan düşük gözlenmiştir. Aynı zamanda parçalanma ürünleri ve iyon molekül kümesi oluşumları negatif modda çok daha az gözlemlenmiştir. Bu deneysel sonuçlardan görüldüğü üzere proton ilgisine göre protonlanmış moleküller iyon sinyallerinin büyüklükleri değişmektedir.

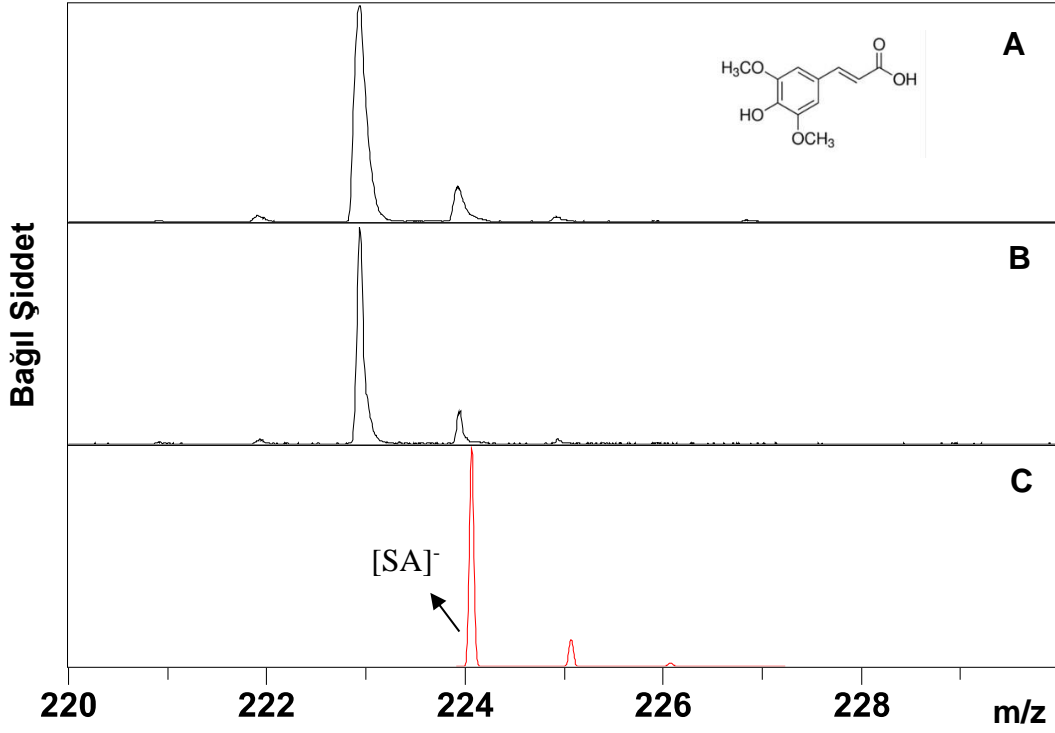
4.1.4. SA LDI Spektrumu

SA'da da pozitif mod molekül bölgesinde (şekil 4.1.10) hem radikal katyon ($M_{\text{mono}}=224,06$ Da) hem de protonlanmış iyon görüldü. Protonlanmış kütle CHCA'daki gibi bağlı olarak radikal katyonlara göre daha fazla çıktı. İlave asit izotopik dağılımlar üzerinde etki oluşturmadı. Aynı CHCA'da olduğu gibi negatif modda (şekil 4.1.11) molekül bölgesinde sadece $[SA-H]^-$ türleri gözlemlendi. Şekil 4.1.12'de değişik lazer şiddetlerinde hem sodyum bağlı iyonun hem de molekül kütesini kapsayan kütle bölgesindeki spektrumlarda sodyum bağlı iyonların bağlı şiddetlerindeki azalış ile lazer enerjisi arasında doğrusal bir ilişki gözlenmemiştir.

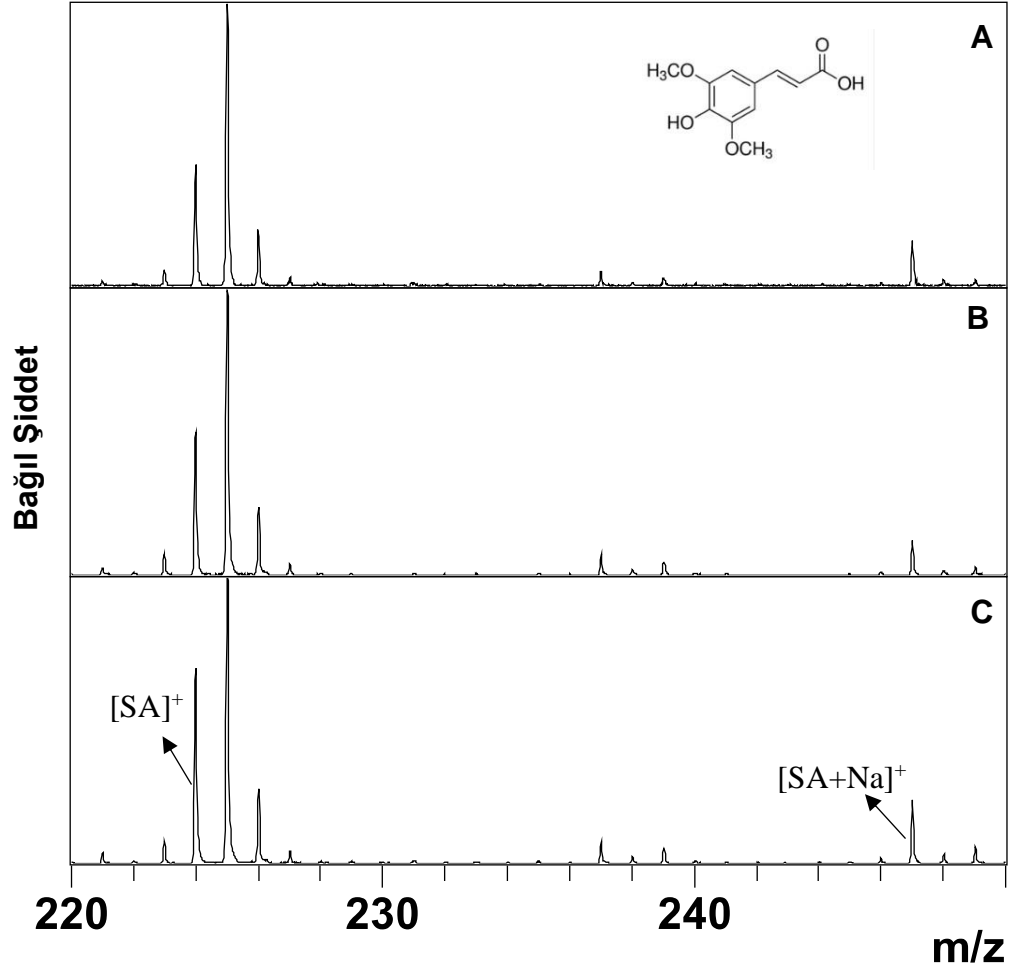


Şekil 4.1.10. SA'nın 220-230 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=224,06$ Da) (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) asit ilavesiz çözeltisinin, (C) teorik pozitif mod LDI

spektrumları. Teorik spektrum SA molekülüne ait doğal izotopik dağılımı göstermektedir.



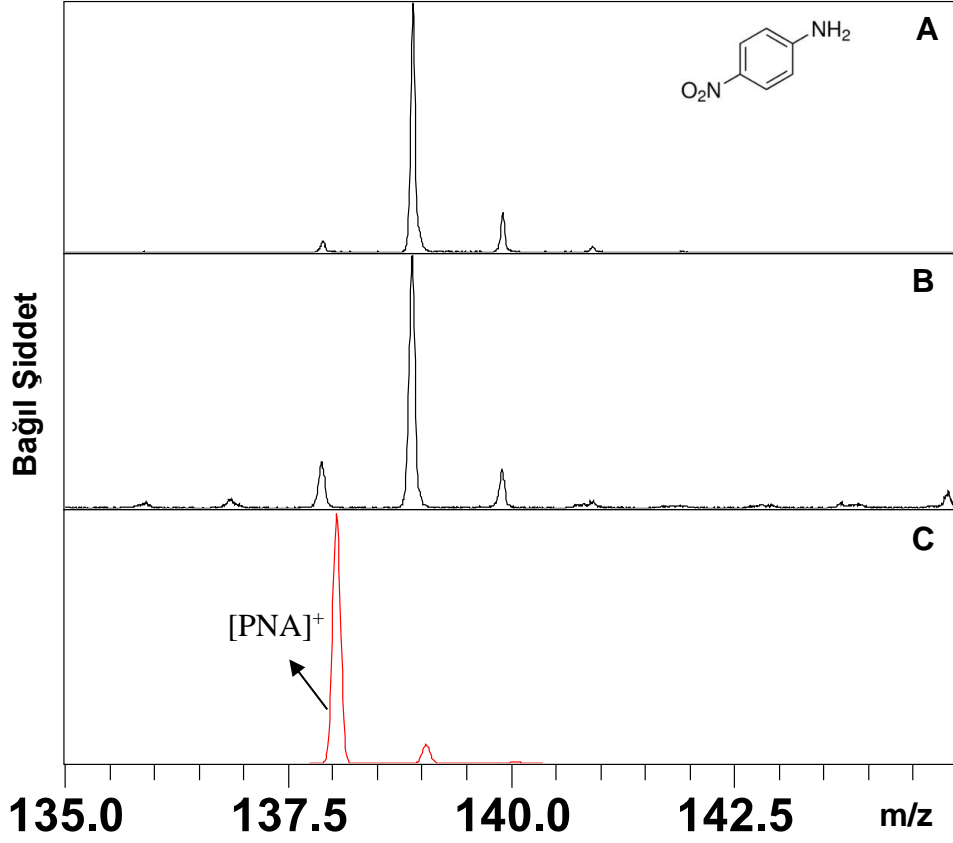
Şekil 4.1.11. SA'nın 220-230 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=224,06$ Da) (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) asit ilavesiz çözeltisinin, (C) teorik negatif mod LDI spektrumları. Teorik spektrum SA molekülüne ait doğal izotopik dağılımı göstermektedir.



Şekil 4.1.12. SA'nın 220-250 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=224,06$ Da) asit ilavesiz çözeltilisinin (A) 60%, (B) 70%, (C) 80% lazer şiddetindeki pozitif mod LDI spektrumları.

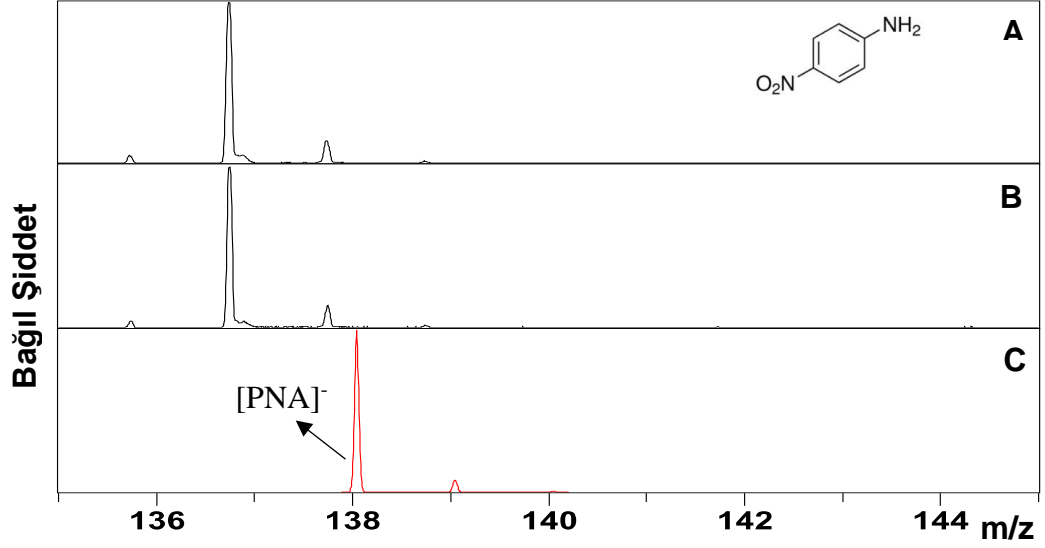
4.1.5. PNA LDI Spektrumu

Şekil 4.1.13'te PNA'nın molekül bölgesine ($M_{\text{mono}}=138,04$ Da) denk gelen 135-145 m/z kütle aralığında temel pik [PNA+H]⁺ olarak gözlemlenmiştir.

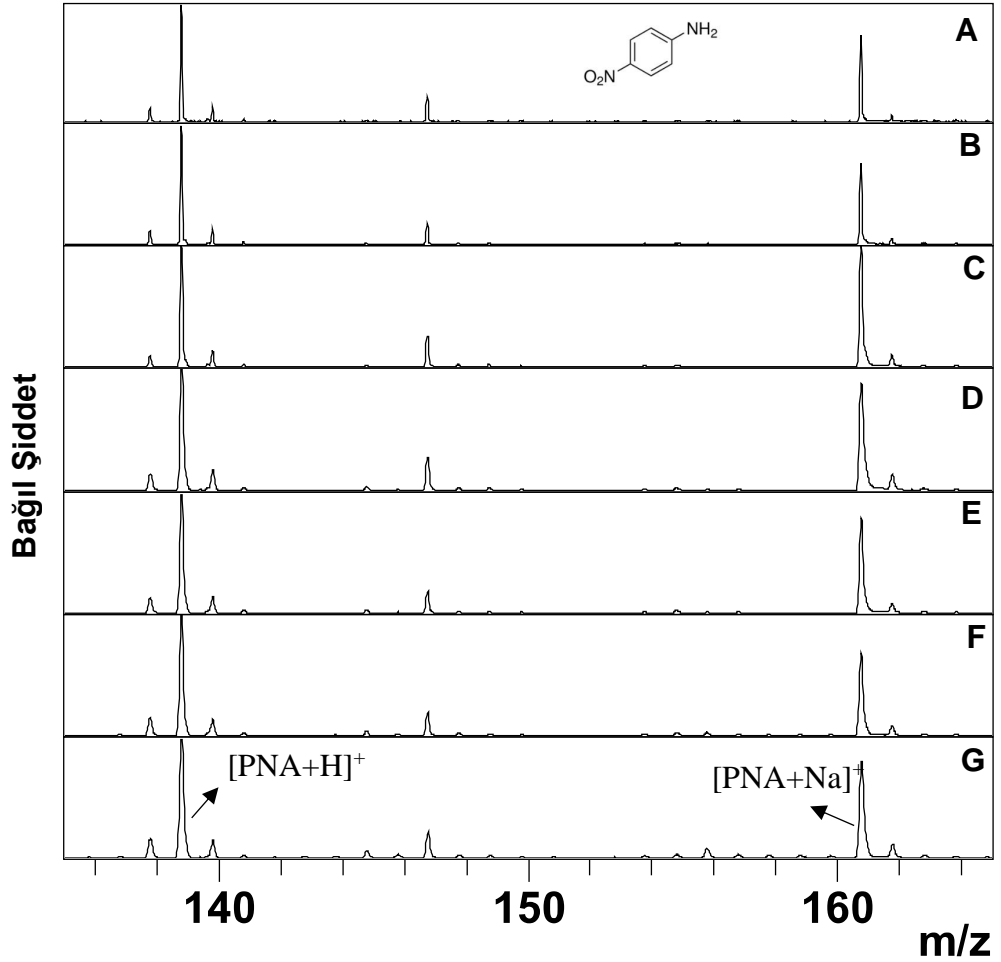


Şekil 4.1.13. PNA'nın 135-145 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=138,04$ Da) (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) asit ilavesiz çözeltisinin, (C) teorik pozitif mod LDI spektrumları. Teorik spektrum PNA molekülüne ait doğal izotopik dağılımı göstermektedir.

Şekil 4.1.14'teki molekül kütlesi bölgesi negatif mod LDI spektrumunda temel pik olarak [PNA-H]⁻ gözlenmiştir. 3-HPA'ya benzer şekilde pozitif ve negatif mod molekül iyonları disproporsiyonasyon reaksiyonlarıyla oluşmuş olabileceği düşünülmüştür. Şekil 4.1.15'te 135-165 m/z aralığında pozitif modda hem molekül hem de sodyum bağlı iyon pikleri görülmektedir. Lazer şiddeti arttırıldığında bağıl şiddetlerde farklılık gözlenmemiştir.



Şekil 4.1.14. PNA'nın 135-145 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=138,04$ Da) (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) asit ilavesiz çözeltisinin, (C) teorik negatif mod LDI spektrumları. Teorik spektrum PNA molekülüne ait doğal izotopik dağılımı göstermektedir.



Şekil 4.1.15. PNA'nın 135-165 m/z bölgesindeki ($M_{\text{mono}}=138,04$ Da) molekül ve sodyum kütle bölgelerine ait (A) 40%, (B) 50%, (C) 60%, (D) 70%, (E) 80%, (F) 90%, (G) 100% lazer şiddetindeki asit ilavesiz çözeltisinin pozitif mod LDI spektrumları.

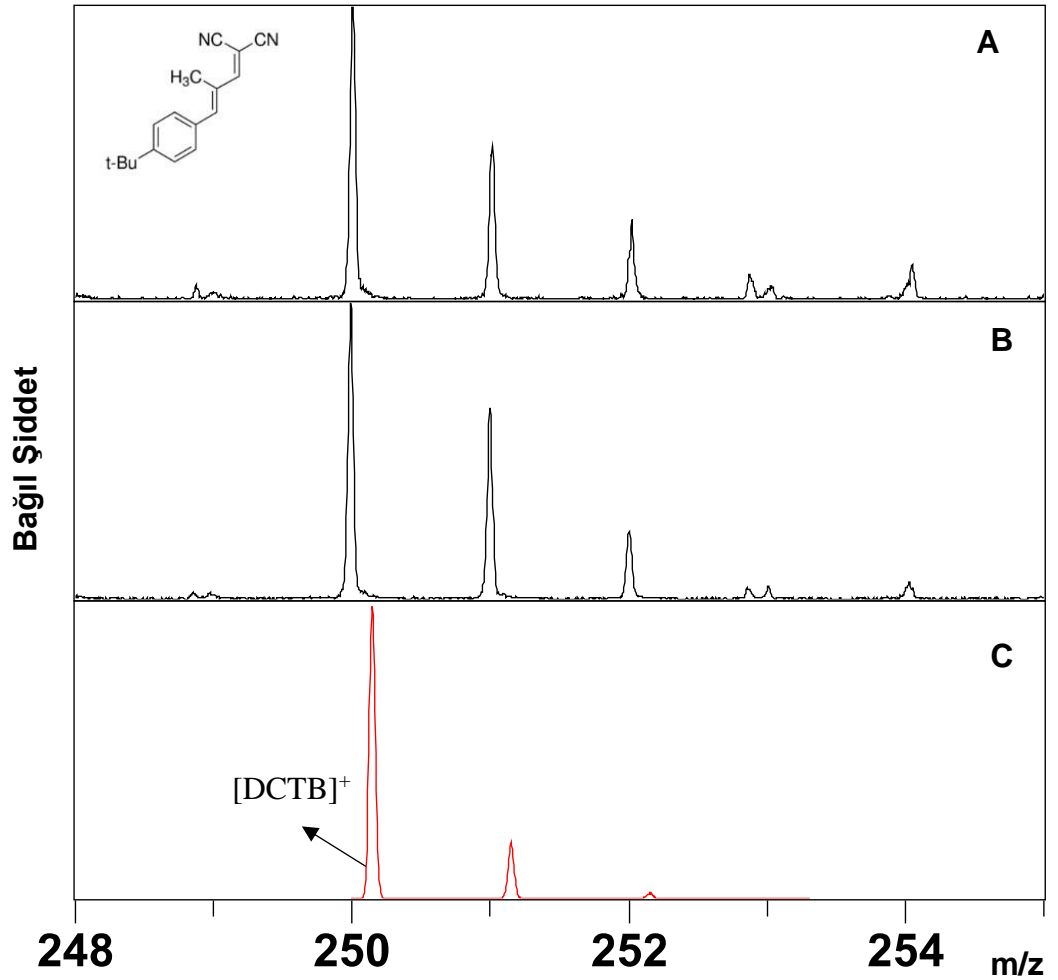
Bu çalışmaya temel teşkil edecek MALDI matrikslerinin hem pozitif hem de negatif kütle spektrometrisi ile elde edilen spektrumlarından dışarıdan eklenen asitin MALDI matrikslerin iyonlaşma mekanizmasında rol almadığı ancak matrikslerin birbirlerine göre iyonlaşma davranışlarının proton afinitelerine (pozitif modda) ve elektron afinitelerine (negatif modda) göre değiştiği görülmüş olup buna göre hangisinin negatif ve hangisinin pozitif modda kullanılacağı açıkça belirlenebildiği düşünülmüştür. Bu durum doğal olarak çalışmalar için uygun MALDI matriksi seçiminin iyonlaştıracağı örnek türüne bağlı olduğunu göstermiştir.

4.1.6. DCTB LDI Spektrumu

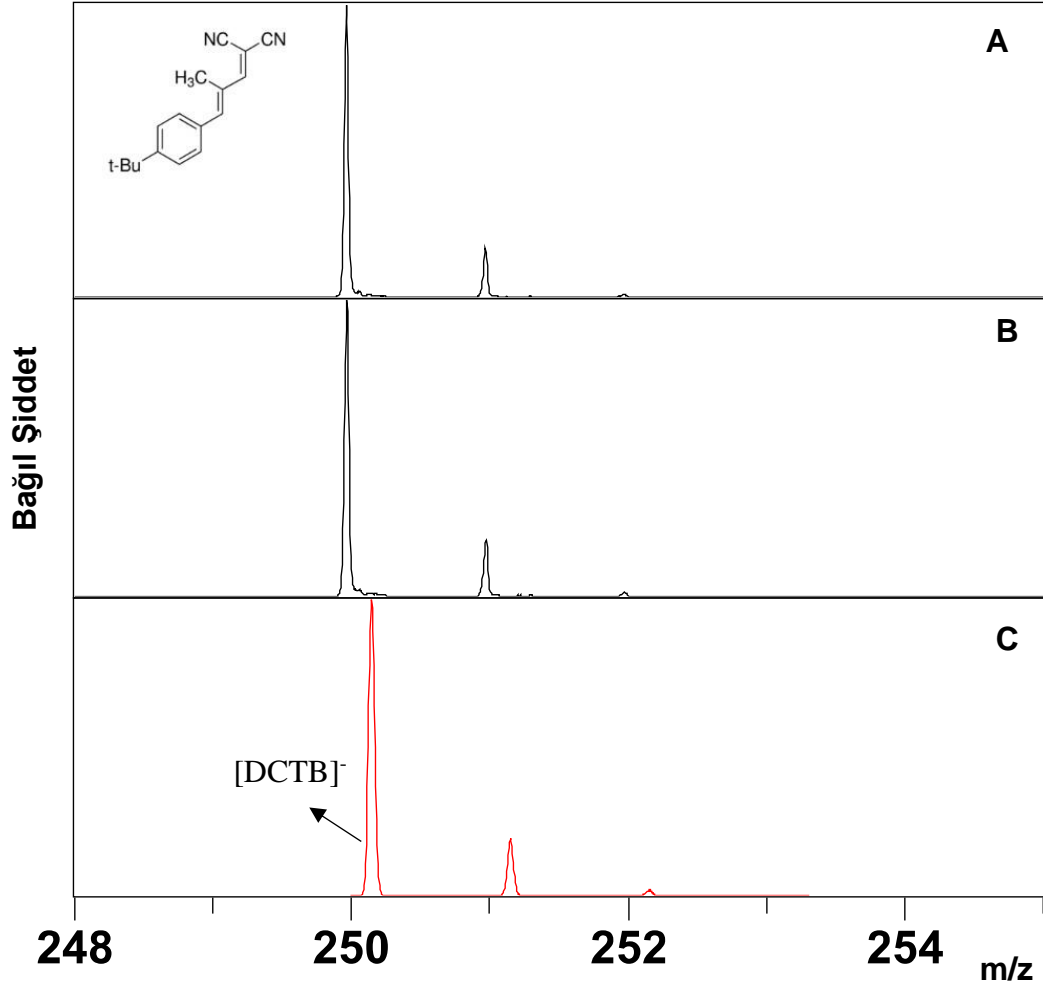
DCTB matriksi diğer matrikslere göre çok düşük lazer şiddetlerinde desorpsiyon/iyonlaşma özelliği göstermiştir. Benzer şekilde MALDI çalışmalarında da örnekler çok düşük lazer şiddetlerinde gözlenmiştir. Lazer şiddetinin artması ile örnekler hızlıca dedektör doygunluğuna ulaştığından DCTB'nin farklı lazer şiddetlerindeki iyon profilleri incelenmemiştir. Pozitif mod LDI spektrumunda (şekil 4.1.16) molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=250,14$ Da) $[\text{DCTB}]^+$, $[\text{DCTB}+\text{H}]^+$ ve $[\text{DCTB}+2\text{H}]^+$ iyonları gözlenirken birçok spektrumda sodyum bağlanma iyonu temel pik olarak görülmüştür (bu şekillere yer verilmedi). Radikal katyonun kararlılığının yapıdaki pi bağı konjugasyonundan ileri geldiği düşünülmüştür. Negatif mod LDI spektrumunda (şekil 4.1.17) molekül kütle bölgesinde temel pik olarak $[\text{DCTB}]^-$ iyonu oluşmuştur. Bu özelliğiyle DCTB diğer matrikslerden ayrılmıştır. Kararsız hidrojen atomu olmayan DCTB'de diğer matrikslerden farklı olarak $[\text{DCTB}-\text{H}]^-$ iyonu görülmemiştir.

Matrikslerle yapılan çalışmalarda radikal katyon oluşumu gösteren matrikslerde hidrojen atom aktarımları da izlenmiştir. Bununla birlikte bu eğilim yapısında çoklu bağ içeren CHCA, SA ve DCTB gibi moleküllerde artış göstermiştir. Buna karşın radikal katyonların görülmediği amin grubu içeren PNA ve 3-HPA'da iyonlaşmanın disproporsiyonasyon şeklinde gerçekleştiği ve hidrojen aktarımlarının olmadığı görülmüştür. PNA'nın iyonlaşma enerjisi radikal katyon oluşturan diğer matrikslerden düşük olmasına rağmen benzer şekilde bu iyonu oluşturmadığı saptanmıştır. Termal

iyonlaşma modellerinde disproporsiyonasyon yoğun fazın ısınarak termal dengeye gelmesiyle başlar ve termodinamik kontrollüdür. PNA ve 3-HPA’da bu reaksiyonların çok çabuk termal dengeye ulaştığı düşünülmüştür. Bu durum diğer matrikslerde bundan ziyade fotokimyasal süreçlerin ağır bastığına işaret ediyebilir. DCTB’de radikal anyon oluşmasına rağmen negatif iyon modunda hidrojen aktarımına dair iyonlar gözlenmemiştir. Nitekim bu iyonun sadece DCTB’de oluşması yapının kararlılığını da göstermektedir. [DHB-2H]⁻ iyonu sadece bu matrikste gözlenmiş olup bu iyonun oluşumuna dair bilgi edinmek adına DHB gibi yapısında birden fazla aromatik hidroksil fonksiyonel grubu içeren molekülleri incelemek uygun olabilir.



Şekil 4.1.16. DCTB molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=250,14$ Da) (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) asit ilavesiz çözeltisinin, (C) teorik pozitif mod LDI spektrumları. Teorik pikler DCTB molekülünün doğal izotopik dağılımını gösterir.



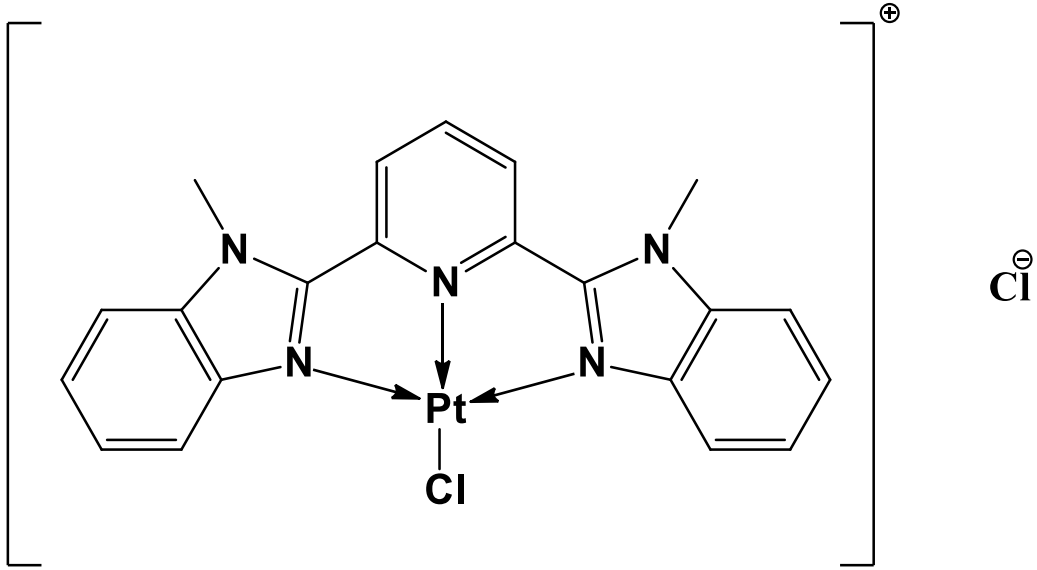
Şekil 4.1.17. DCTB molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=250,14$ Da) (A) 1% TFA ilave edilmiş çözeltisinin, (B) asiti ilavesiz çözeltisinin, (C) teorik negatif mod LDI spektrumları. Teorik pikler DCTB nötral molekülünün doğal izotopik dağılımını göstermektedir.

4.2. İyonik Organometalik Bileşiklerin MALDI İncelemesi

Bu bölümde ligandları ve karşıt iyonu değişen iki platin kompleksi incelenmiştir.

4.2.1. B-19 Yapısı

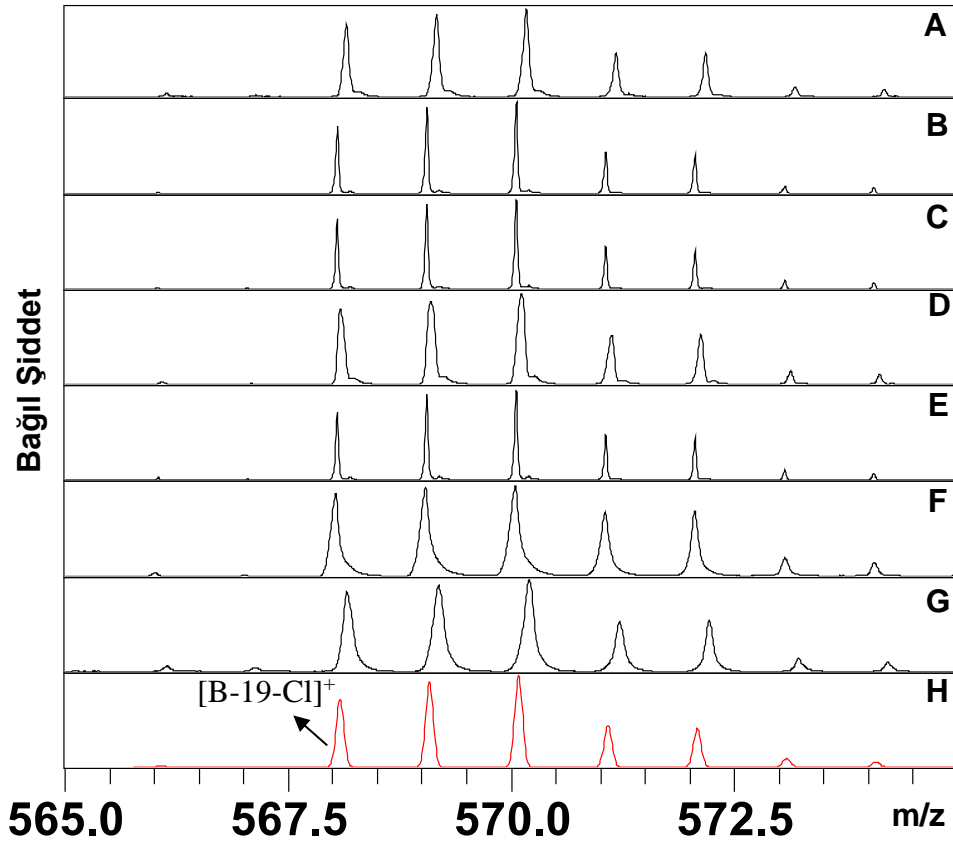
Şekil 4.2.1'de B-19 molekülünün ($M_{\text{mono}}=604,05$ Da) yapısı verilmiştir. Klor atomu ve organik ligand platine koordine olmuş, bir diğer klor iyonu ise elektrostatik etkileşim ile komplekse bağlanmıştır.



Şekil 4.2.1. B-19 molekülünün yapısı.

4.2.2. B-19 MALDI Deneyleri

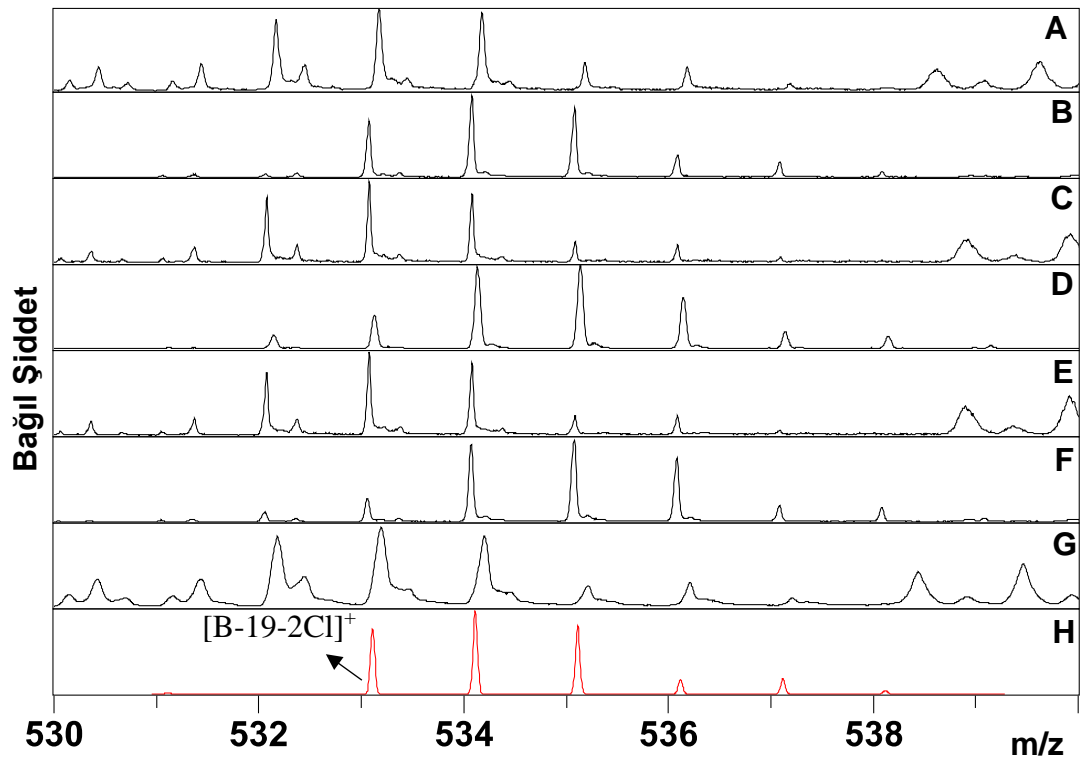
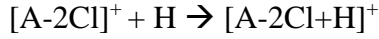
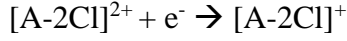
Farklı matrikslerle B-19'un MALDI spektrumları, matrikslere TFA ilavesi yapılmadan ve yapılarak incelenmiştir. Bu veriler kompleksin LDI spektrumları ile karşılaştırılmıştır. Şekil 4.2.2'de B-19'un bir klor iyonu ayrılmış kütle bölgesindeki TFA ilave edilmiş farklı matriksler ile alınmış MALDI ve TFA ilave edilmiş LDI spektrumlarına ait izotopik dağılımları verilmiştir. Moleküler iyon piki gözlemlenmemiş olup, iyonik bağlı klor iyonunun pozitif kompleksten ayrılması için gerekli elektrostatik enerjinin düşük olduğu, buna bağlı olarak MALDI koşullarında kolaylıkla yapıdan ayrıldığı gözlemlenmiştir. Teorik izotopik pikle farklı matrikslerle alınmış MALDI iyon dağılımları aynı olup, bunun matriks-örnek yük aktarım etkileşimlerinin yokluğuna işaret ettiği düşünülmüştür. Örneğin halihazırda iyonik şekilde bulunması ve matrikslerle iyon dağılımının değişmemesi iyonlaşma modelinin "lucky survivor" mekanizmasına uygun olduğunu düşündürmüştür. Cl⁻, matriks iyonları ile nötralleşir ve geriye [B-19-Cl]⁺ yapısı kalır. Matriks pikleri, matrikslerin aynı lazer enerjisinde alınan LDI spektrumlarına göre ciddi miktarda düşmüş hatta bazı matrikslerde ortadan kalkmıştır (matriks baskılanma etkisi). LDI spektrumundaki yüksek iyon verimi ve oluşan pik genişlemeleri, kompleksin yüksek UV absorpsiyonuna işaret etmektedir. Ortamdaki enerji yoğunluğu yüksektir ve iyonların kinetik enerji dağılımı geniş bir aralıkta seyretmiştir. Benzer bir durum SA matriksiyle de gözlenmiştir. Bu durum SA'nın diğer matrikslere göre daha yüksek enerjili olduğuna (*hot matrix*) dair ipucu olarak görülmüştür. Ancak örneklerle matrikslerin yüzeydeki dağılımları bilinmediğinden bu çıkarım test edilememiştir.



Şekil 4.2.2. B-19'un 565-575 m/z bölgesindeki yapıdan 1 klor iyonu ayrılmış halinin 1% TFA ilave edilmiş farklı matrislerde MALDI ve TFA ilave edilmiş LDI pozitif mod spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.

Yapıdan ikinci bir klor iyonunun ayrıldığı 530-540 m/z kütle bölgesinde iyonlaşma karakterleri matrise göre farklılık göstermiştir. Yapıdan ikinci bir Cl^- 'nin ayrılması, +2 yüklü iyon oluşumuna neden olur. MALDI iyonlaşma mekanizması özellikle küçük moleküller için sadece +1 yüklü iyonların oluşumuna olanak tanımaktadır. Klor ayrılmasıyla oluşan yapı $[\text{B-19-2Cl}]^{2+}$, +1 yüklü yapıya bir elektron alarak veya bir proton vererek geçebilir. MALDI plume'da elektronların varlığı bilinmektedir [110]. Proton aktarımının olasılığı çevredeki türlerin yapısına bağlıdır. Bu nedenle bu iki yük transfer yöntemi iyonun +1 haline geçişinde yarışmıştır. Şekil 4.2.3'te asit ilave edilmiş CHCA, DHB ve SA matrisleriyle alınan spektrumlarda elektron aktarımının baskın olduğu düşünülmüştür. Diğer matrislere göre proton ilgilerinin düşük olması (SA dışında) proton almalarını zorlaştırmıştır. Bu durum verilerle uyumlu bulunmuştur. Elektron yakalama sonucu oluşan türler radikal olup bu reaktif türler ortamda bulunan hidrojen atomlarını tutmak için elverişlidir. Bu nedenle elektron alımını takiben [B-19-

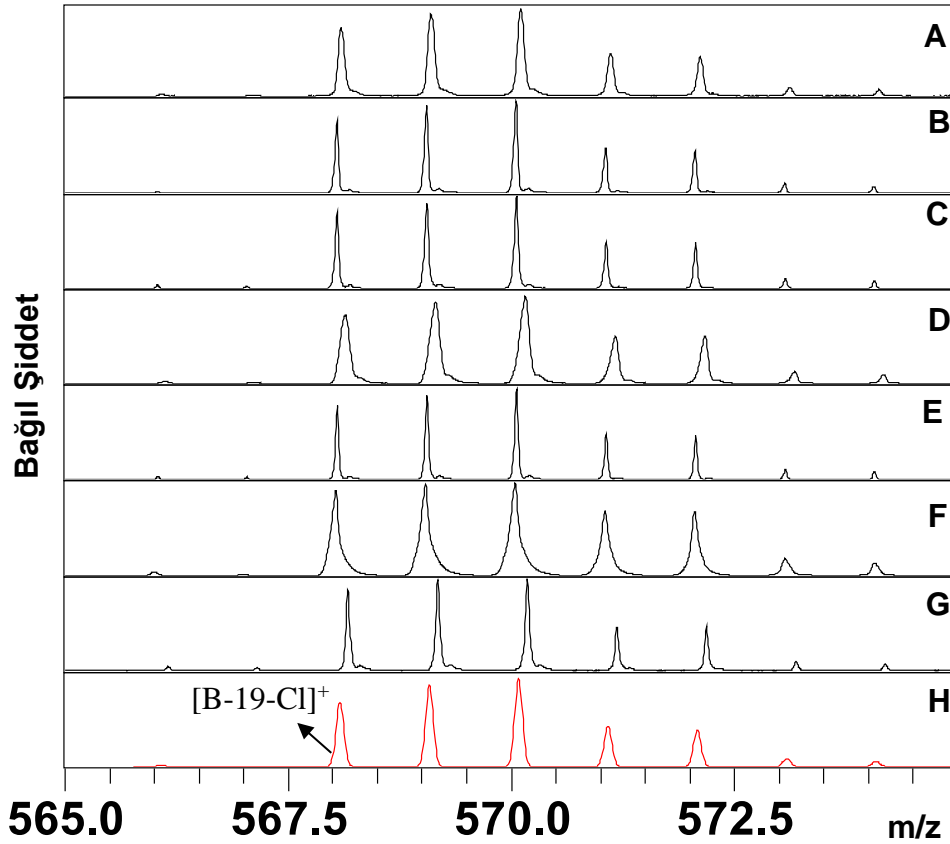
$2\text{Cl}+\text{H}^+$ da oluşması matriks iyonlarından hidrojen atomu aktarımına da işaret etmektedir. Matrikslerin LDI spektrumlarında da değinildiği gibi hidrojen atomu transferleri MALDI süreçlerinde gözlenmektedir. Bu olaylara ilişkin olası denklemler aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.2.3. B-19 530-540 m/z bölgesindeki yapıdan ikinci bir klor iyonu ayrılmış halinin 1% TFA ilave edilmiş farklı matrikslerde MALDI ve TFA ilave edilmiş LDI pozitif mod spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.

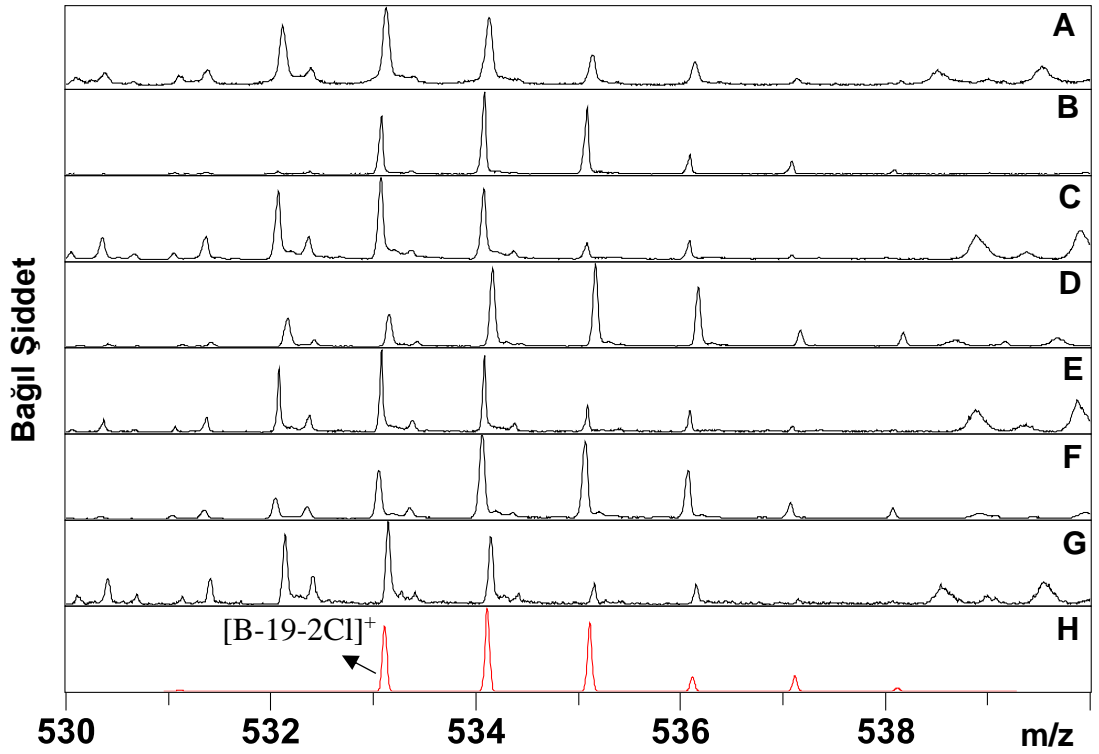
Asit ilavesiz örneklerde bir klor iyonu ayrılmış kütle bölgesinde (şekil 4.2.4) spektrumlar asit ilaveli örneklerle aynı olup matriksin protonlama kapasitesinin hazır iyonlaşmış moleküllere etki etmediği gözlemlenmiştir. SA'daki pik genişleme durumu tekrar etmiş olup LDI örneğinde pik genişlemesi asit ilaveli örneklere göre (şekil 4.2.2) azalmıştır. İlave asit varlığının kristallenme dinamiklerini etkileyerek örneğin yoğunluğunu

arttırarak lazer ışık spotunda UV enerjisiyle uyarılan ve desorbe olan örnek sayısını arttırdığı düşünülmüştür.



Şekil 4.2.4. B-19 565-575 m/z bölgesindeki yapıdan bir klor iyonu ayrılmış halinin asit ilavesiz farklı matrislerde MALDI ve asit ilavesiz LDI pozitif mod spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.

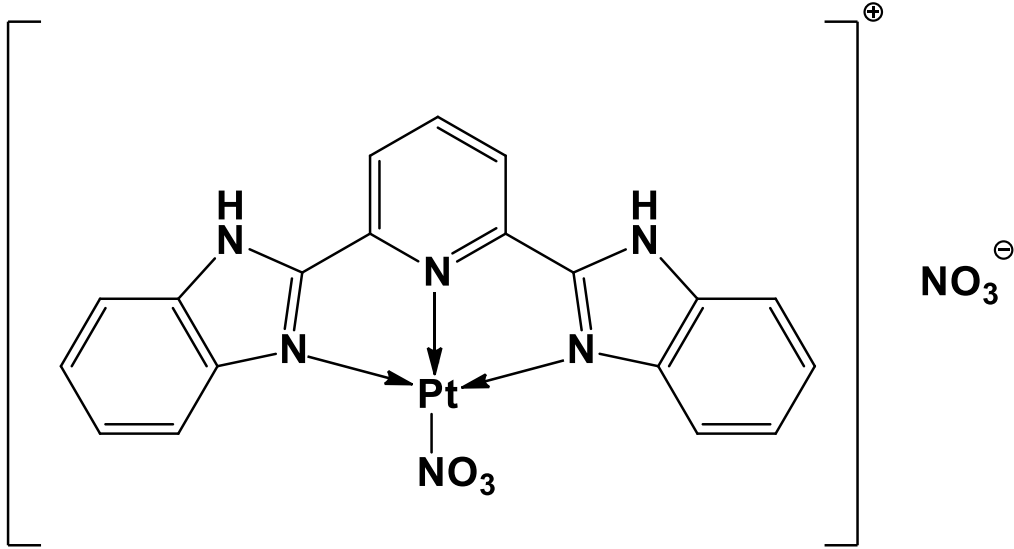
Asit ilavesiz örneklerin iki klor iyonu ayırımına ilişkin 340-350 m/z bölgesindeki spektrumu asit ilaveli halleriyle aynı özellikleri göstermiştir. Gerek asit ilaveli, gerek asit ilavesiz matrislerle alınan spektrumlarda iki klor ayırımına ait kütle bölgesinde spektrumlarda yüksek gürültü ve çözünürlük düşüşleri gözlenmiştir (Piklerde kuyruklanma). Bu durum bu iyonların yarı kararlı iyonlar olduğunu göstermektedir. Bu gözlem MALDI'de tek yüklü iyonların baskın gelmesinin nedenlerinden biridir. Çözücü yokluğunda çok yüklü iyonlarda kulombik itişmeler sistemin enerjisini yükseltir ve halihazırda yüksek enerji yoğun plume ortamındaki şiddetli çarpışmalarla birleşince (veyahut yoğun fazda lazerin en çok enerji aktardığı bölgelerde) yük ayrışma reaksiyonlarına neden olur. Arta kalan enerji oluşan iyonlarda kinetik enerji fazlası olarak birikir bu da TOF analizöründe geniş kütle aralıklarına neden olur.



Şekil 4.2.5. B-19 530-540 m/z bölgesindeki yapıdan iki klor iyonu ayrılmış halinin asit ilavesiz farklı matrislerde MALDI ve asit ilavesiz LDI pozitif mod spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.

4.2.3. Nitrato-2,6-bis(-benzimidazol-2-il)piridinplatin(II)nitrat (B-17_R) Yapısı

B-17_R'de organik liganddaki 2 azot B-19'daki metil grupları yerine hidrojen ile yer değiştirmiş olup, platine bir NO₃ ligandı koordine olmuş, bir NO₃⁻ de iyonik olarak bağlıdır.

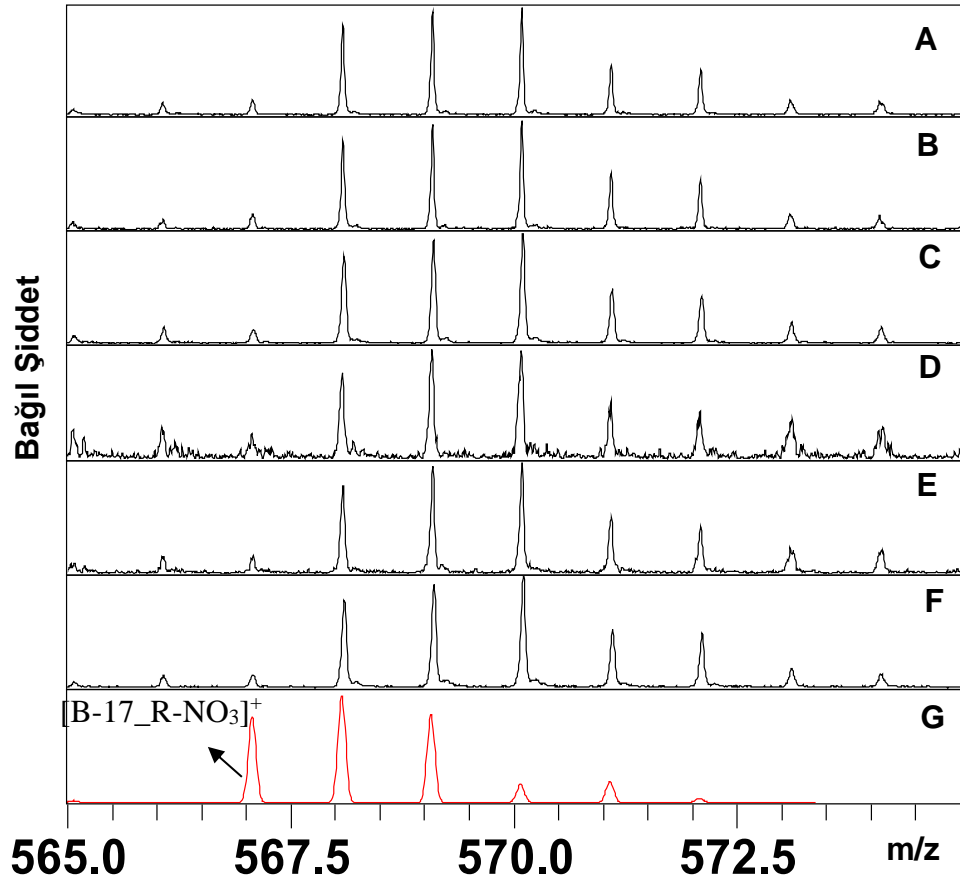


Şekil 4.2.6. B-17_R molekül yapısı.

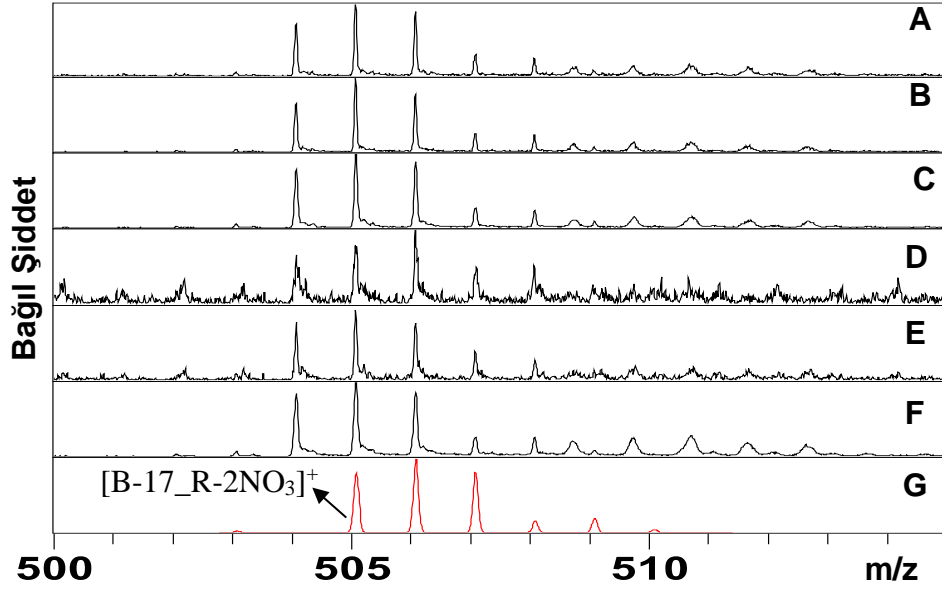
4.2.4. B-17_R MALDI Deneyleri

B-19 için yapılan çalışmalar B-17_R için tekrarlanmıştır. B-17_R kullanılan 1:9 (v/v) DMSO:MeOH çözücüsünde iyi çözünmediğinden spektrumlarda genel olarak iyon şiddetleri düşük gözlenmiştir. Aynı B-19 gibi molekül kütlelerinde ($M_{\text{mono}}=630,05$ Da) iyon gözlemlenmemiştir. Yapıdan NO_3^- ayrılması ile oluşan piklerde hem asit ilaveli (şekil 4.2.7), hem de asit ilavesiz (şekil 4.2.9) spektrumlarda kullanılan matrikslerle iyon dağılımında değişiklik saptanmamıştır. Bu durum yine lucky survivor mekanizmasını çağrıştırmaktadır ancak bir NO_3^- ayrılmasıyla oluşan piklerde halihazırda pozitif olan $[\text{B17}_R\text{-NO}_3]^+$ yerine sadece $[\text{B17}_R\text{-NO}_3+\text{H}]^+$ yapısı oluşmaktadır. Yapının hidrojen alımını istemli kılan etkinin ne olduğu bilinmemekle birlikte, öncül radikalik tepkimelerin oluşumunun bu mekanizmayı güçlendireceği düşünülmüştür. UV ışığı altında NO_3^- yapısının NO_2^- yapısına bozunduğu bilinmektedir [111]. Ortaya çıkan O \cdot radikalinin bir dizi tepkime sonucu hidrojen aktarımlarına neden olabileceği düşünülmüştür. Bütün örneklerde bir miktar matriks baskılanması gözlemlenmiştir. İyon şiddetlerinin çok az olduğu göz önünde bulundurulduğunda bu durum anlamlı bulunmamıştır. Örnek polar çözücülerde iyi çözünmediğinden, polar olan matriks yapılarından kristallenme esnasında uzaklaşmış olabilir. Örneğin bulunduğu bölgelerde matriksin görece az miktarda olmasının yüzeyden kalkıp iyonlaşan matriks miktarındaki azalmaya işaret ettiği düşünülmüştür. İki nitrat çıkmasına ait örneklerde B-19'da görülen matriks etkileşimleri hem asit ilaveli (şekil 4.2.8) hem de asit ilavesiz (şekil 4.2.10) spektrumlarda ortadan kalkmıştır. Oluşan +2 yüklü yapı sadece bir proton verilmesiyle +1 yüklü hale gelmiştir.

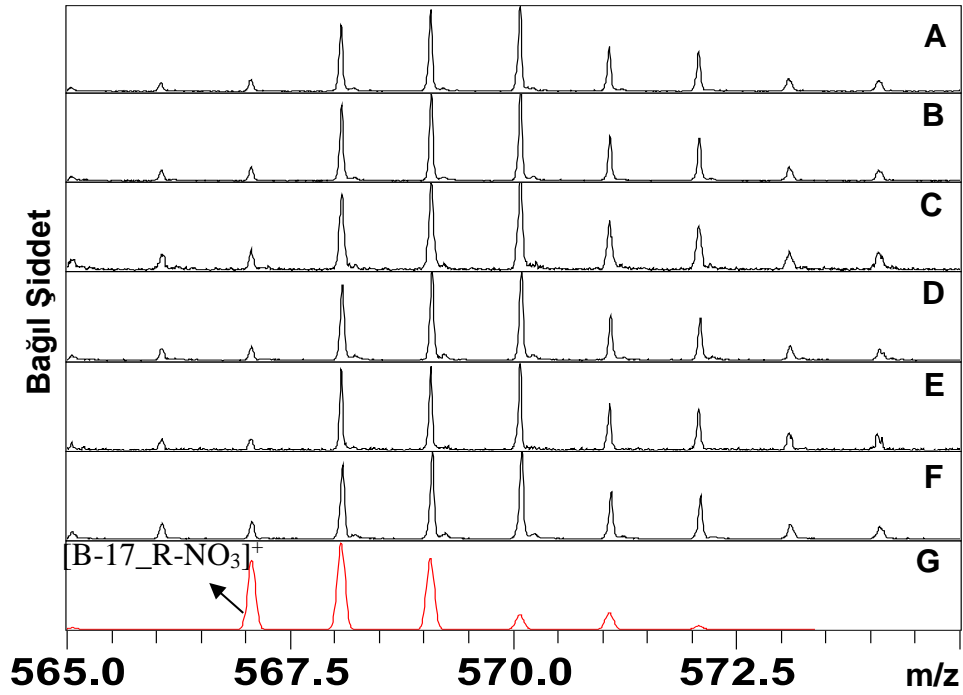
Elektron yakalama üzerinden oluşan tek yüklü pikler mevcut değildir. Bu durum bahsi geçen reaksiyonların lazer atımını takip eden plume yoğunluğunun çok yüksek olduğu ilk anlarda gerçekleşiyor olduğuna işaret etmektedir. Kristal yoğunluğu azaldıkça plume'ın ilk yoğunluğu görece daha az olur ve bu reaksiyonlar gerçekleşemez. Bununla beraber bir diğer olasılık bu reaksiyonların örnekle matriksin katı fazda yakın temas halinde olduğu yüksek yoğunluklu ilk plume anlarında gerçekleşmesidir. Matriks ve örnek moleküllerinin örnek hazırlama sonucu birbirinden uzaklaşması bu reaksiyonların gerçekleşme olasılığını ortadan kaldırmıştır. Yine matriks moleküllerinin miktarındaki azalma fotoiyonlaşma mekanizmaları sonucu ortaya çıkan elektron miktarını azalttığından elektron yakalama olasılığını da düşürmüş olabilir. Bu durumu açığa kavuşturma adına gaz fazı reaksiyonların yoğun faz reaksiyonlardan ayrıldığı deneylerin yapılması önem teşkil etmektedir.



Şekil 4.2.7. B-17_R 565-575 m/z bölgesindeki yapıdan bir nitrat ayrılmış halinin 1% TFA ilave edilmiş farklı matrikslerde MALDI ve TFA ilave edilmiş LDI pozitif mod spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DHB, (D) PNA, (E) SA, (F) LDI, (G) Teorik izotopik dağılım

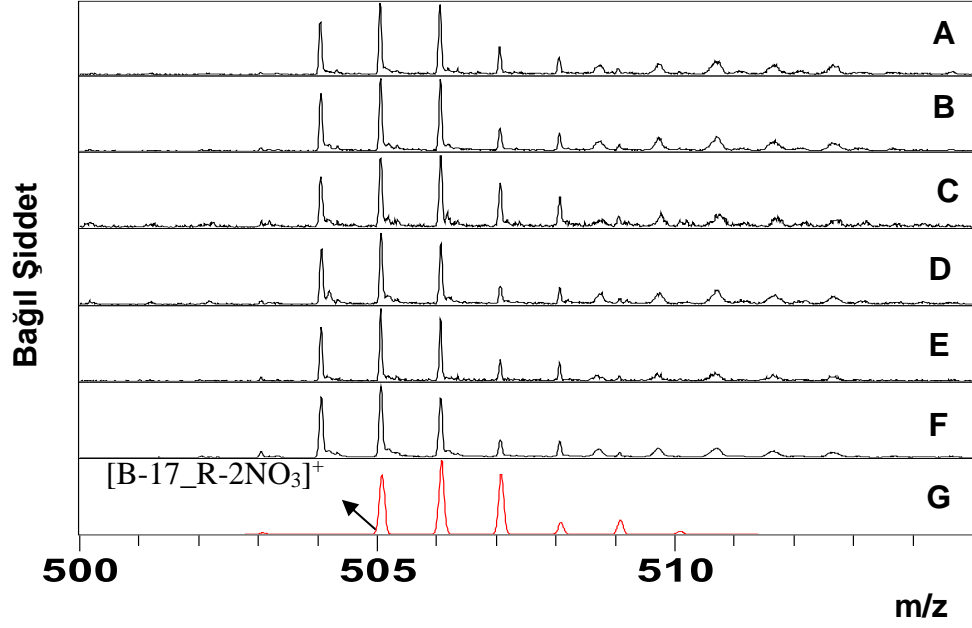


Şekil 4.2.8. B-17_R 500-515 m/z bölgesindeki yapıdan iki nitrat ayrılmış halinin asit ilavesiz farklı matrislerde MALDI ve asit ilavesiz LDI pozitif mod spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DHB, (D) PNA, (E) SA, (F) LDI ve (G) Teorik izotopik dağılım.



Şekil 4.2.9. B-17_R 565-575 m/z bölgesindeki yapıdan bir nitrat ayrılmış halinin asit ilavesiz farklı matrislerde MALDI ve asit ilavesiz LDI pozitif mod

spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DHB, (D) PNA, (E) SA, (F) LDI, (G) Teorik izotopik dağılım.

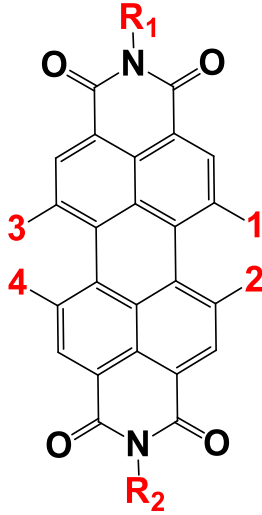


Şekil 4.2.10. B-17_R 500-515 m/z bölgesindeki yapıdan iki nitrat ayrılmış halinin asit ilavesiz farklı matrislerde MALDI ve asit ilavesiz LDI pozitif mod spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DHB, (D) PNA, (E) SA, (F) LDI, (G) Teorik izotopik dağılım.

Doğal yük taşıyan metal-organik moleküllerde MALDI matris dışında ilave asitin iyon üzerinde herhangi bir etkisi olmazken oluşabilecek çift yüklü iyonlarda proton ayrılması ya da elektron yakalama sonucu tek yüklü iyonlara dönüşüm izlenmiştir (Şekil 4.2.5). Ancak bu iki mekanizmanın oluşması ligand üzerindeki kolay ayrılabilir proton kaynağının varlığına bağlıdır. Eğer kolay ayrılabilir proton varsa çift yüklü iyonlar yalnızca proton ayrılması ile tek yüklü türe dönüşmektedir. Aksi takdirde her iki mekanizma da gerçekleşebilmektedir. Bu durum ise kullanılan matrisin proton afinitesine bağlıdır. 3-HPA, PNA ve DCTB proton alıp çift yüklü iyonun tek yüklü hale getirirken DHB, SA ve kısmen CHCA elektron transferi yaparak çift yüklü iyonu tek yüklü hale çevirmektedir. Ayrıca bu tür yapılarda eşleme iyonunun yapısı da bu reaksiyonlara yön verebilmektedir. Eşlenik iyon klor gibi halojen olduğunda tek yüklü iyonlar var olduğu halde gözlenirken (Şekil 4.2.2), bu eşleme iyonu NO₃⁻ gibi bir grup olduğundan yapıya hidrojen radikali aktararak bir kütle fazla kütlede iyon pikleri gözlenmektedir (Şekil 4.2.7). Bu ise aktif NO₃⁻ iyonunun plumedaki karmaşık reaksiyonlardan etkilendiğini göstermektedir.

4.3. Yan Gruplarının Polaritesi Farklı Olan Organik Bileşiklerin MALDI İncelemesi

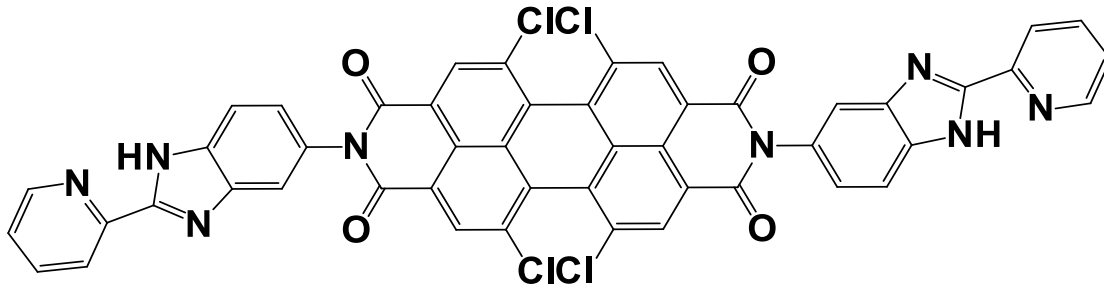
Bu bölümde farklı süstitüentler içeren perilen diimid türevlerinin MALDI iyonlaşma profilleri incelenmiştir. Perilen diimidler aşağıda R1 ve R2 ile gösterilen diimid pozisyonları ve 1, 2, 3, 4 ile gösterilen yan pozisyonlarına farklı süstitüentler bağlanarak oluşturulurlar. Bu çalışmada bazik amin grupları içeren diimid süstitüentleri aynı, yan süstitüentleri farklı polaritede olan perilen diimidler karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.3.1. Perilen diimid yapısı ve süstitüent bölgeleri.

4.3.1. FP-49 Yapısı

FP-49 yapısında yan bölgelerine Cl atomları bağlanmıştır.

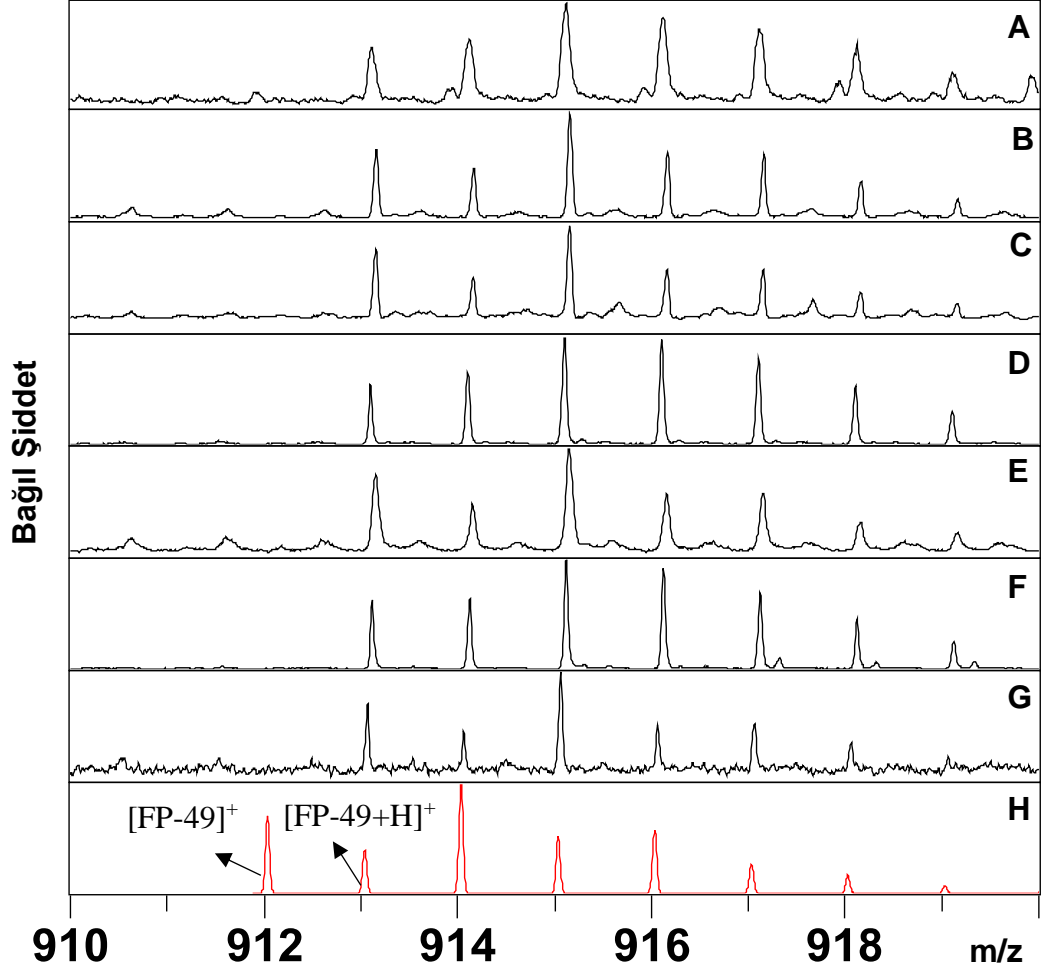


Şekil 4.3.2. FP-49 yapısı.

4.3.2. FP-49 MALDI Deneyleri

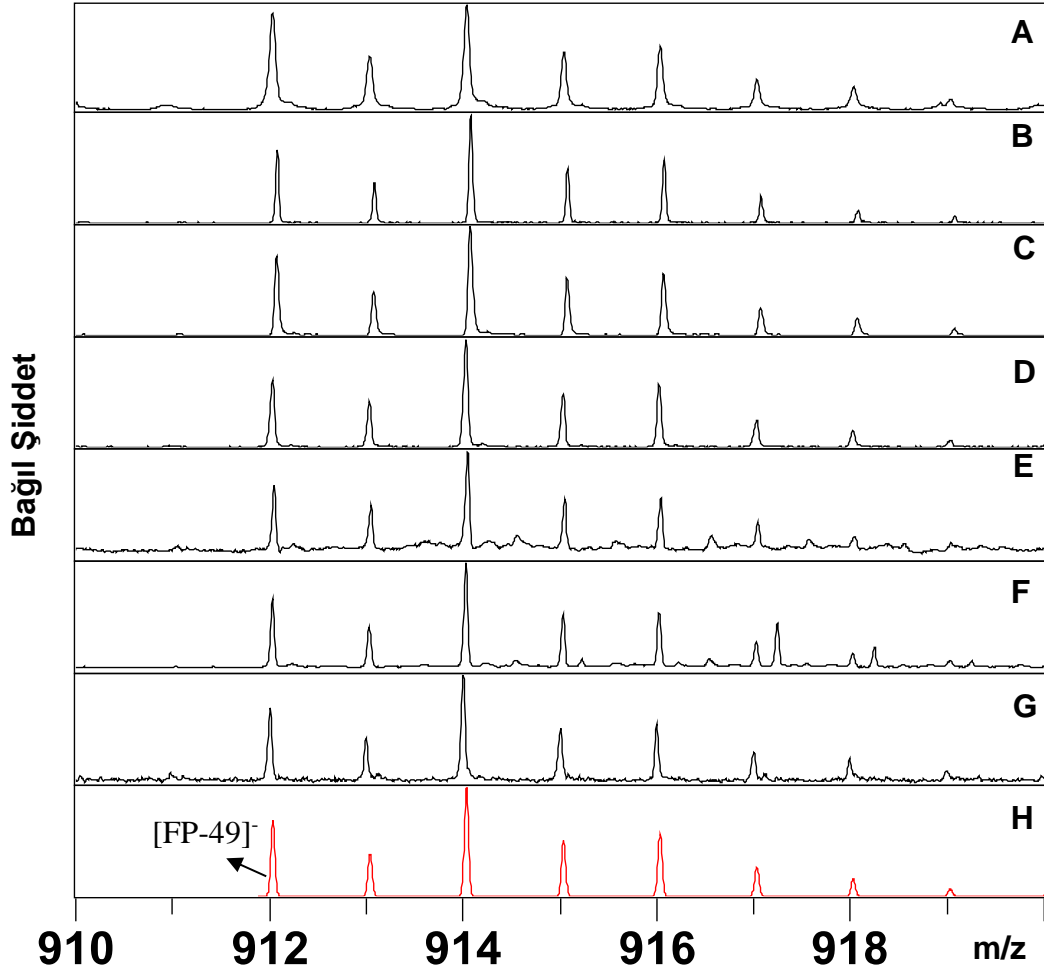
Şekil 4.3.3'te örneğin tüm matrikslerle asit ilavesiz pozitif mod MALDI spektrumlarına yer verilmiştir. Örnek molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=912,03$ Da) tamamen protonlanmış halde, $[\text{FP-49}+\text{H}]^+$ şeklinde oluşmuştur. $[\text{FP-49}]^+$ iyonları gözlenmemiştir. Bu nedenle örneğin iyonlaşma enerjisinin yüksek olduğu düşünülmüştür. Diğer

bölümlerde incelenecek olan Cl yerine perilen diimid molekülünün yan bölgesine farklı sübstitüentler bağlanmasıyla oluşturulan moleküllerde bu duruma rastlanmamıştır. Bir elektron transfer matrisi olan DCTB'nin de örneğin radikal katyon şeklinde oluşumuna katkıda bulunmaması dikkat çekmiştir.



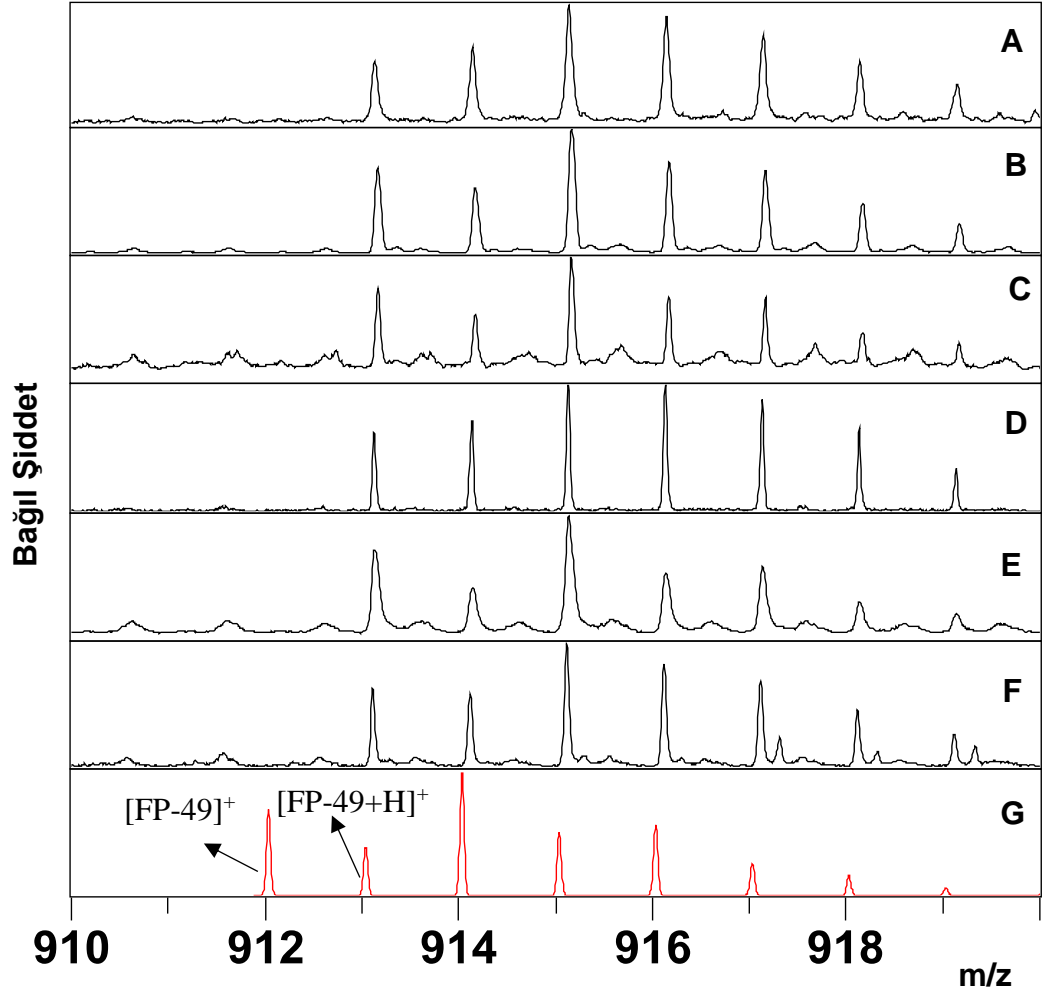
Şekil 4.3.3. FP-49, 910-920 m/z aralığındaki molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=912,03$ Da) asit ilavesiz farklı matrislerde pozitif mod MALDI spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.

Şekil 4.3.4'teki örneğin negatif mod asit ilavesiz spektrumunda tamamen $[\text{FP-49}]^-$ şeklinde iyonlaştığı görülmüştür. Bu durumun örneğin elektron ilgisinin yüksekliğine işaret ettiğine kanaat getirilmiştir. Bu piklerde teorik izotopik dağılımdan sapmalar gözlenmemiştir. $[\text{FP-49}+\text{Na}]^+$ şeklinde sodyum katılım iyonları hiçbir matrisde gözlenmemiştir. Bu durum örneğin sodyum ilgisinin protona olan ilgisinden daha düşük olduğunu göstermektedir.



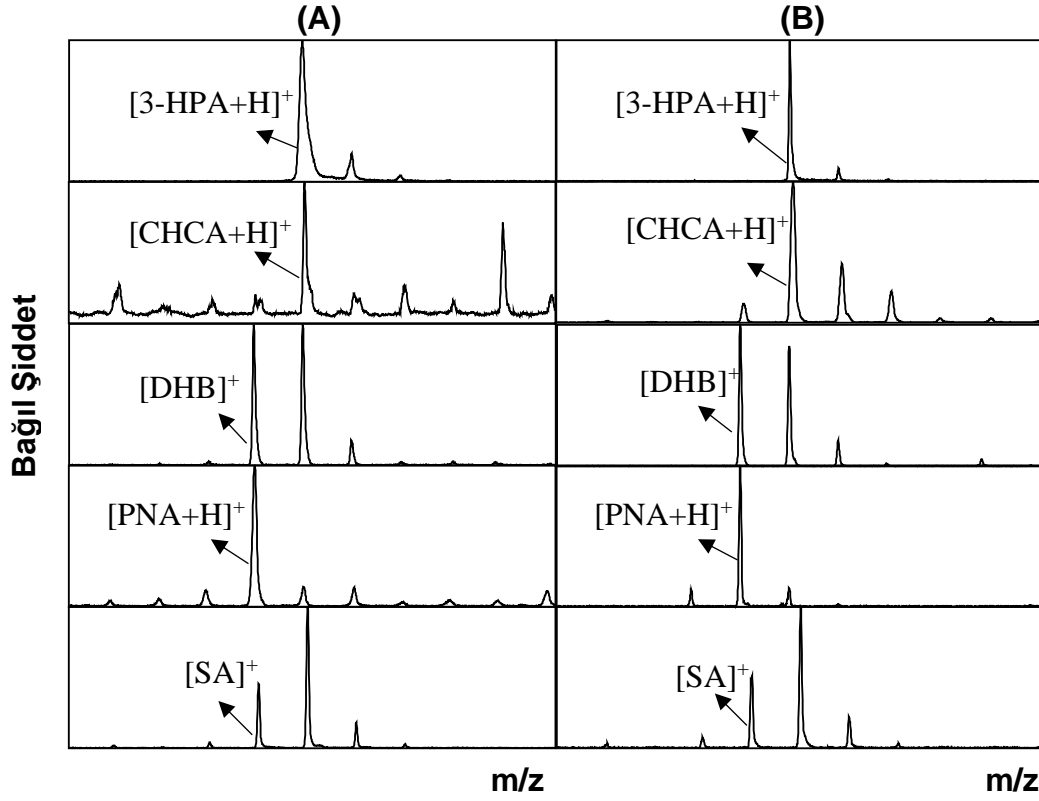
Şekil 4.3.4. FP-49, 910-920 m/z aralığındaki molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=912,03$ Da) asit ilavesiz farklı matrikslerde negatif mod MALDI spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.

Şekil 4.3.5'te verilen 1% TFA ilave edilmiş pozitif mod spektrumda asit ilavesiz spektrumlara göre iyonlaşma karakterinde farklılık gözlenmemiştir. Örneğe asit ilavesiyle analiz yapmak için elverişli kristaller oluşturulamadığından şekil 4.3.5'te örneğin TFA ilave edilmiş LDI spektrumuna yer verilmedi.



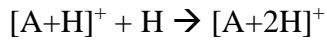
Şekil 4.3.5. FP-49 910-920 m/z aralığındaki molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=912,03$ Da) 1% TFA ilave edilmiş farklı matrislerde pozitif mod MALDI spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) Teorik izotopik dağılım.

Örneklerin matris kütle bölgelerindeki izotopik dağılımları incelendi (Şekil 4.3.6). Matrislerin LDI spektrumlarındaki izotopik dağılımlarıyla karşılaştırıldığında CHCA dışında farklılık gözlenmedi. CHCA’da bir miktar matris baskılanması gözlemlendi. LDI piklerinde temel pik olan $[\text{CHCA}+\text{H}]^+$ dışındaki piklerin baskılandığı gözlemlendi. Bu durum matrisin yaptığı iyon transfer reaksiyonlarında farklı iyon türlerinin rol aldığını gösterir.

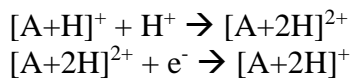


Şekil 4.3.6. Asit ilavesiz FP-49 MALDI deneylerinin matriks kütle bölgelerindeki izotopik dağılımlar. A sütununun altında kalan pikler örneğin MALDI spektrumlarının (şekil 4.3.3) matriks bölgesine ait iken B sütununun altındaki pikler matrikslerin asit ilavesiz LDI spektrumlarına aittir.

Şekil 4.3.7’de FP-49 molekülünün farklı matrikslerle asit ilavesiz pozitif mod MALDI ve LDI spektrumları tamamen protonlanmış şekilde iyonlaşmaya ait teorik piklerle karşılaştırılıp bu piklerden farklılıklar gözlenmiştir. $[FP-49+H]^+$ pikinin sağ tarafındaki piklerde teorik piklere göre yükseklik oranlarına aktarılan ekstra hidrojen atomlarının kütle katkısına işaret eder. Bu reaksiyonlar iki şekilde gerçekleşebilir.

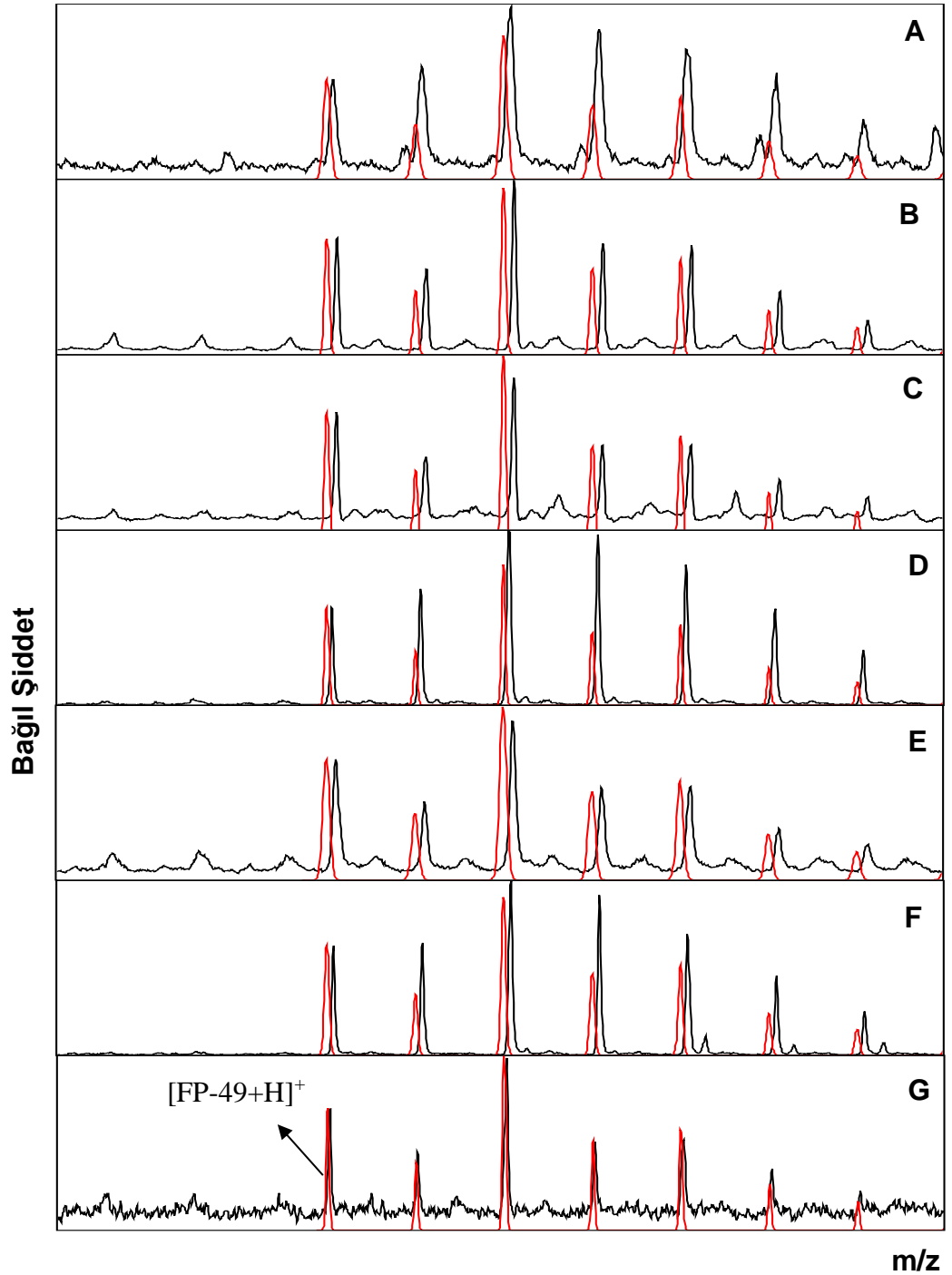


Ya da;



Ortamda en yaygın bulunan türler nötral matriks molekülleri olduğundan bu reaksiyonları gösterme eğilimi matrikslerin proton ilgisi ya da hidrojen aktarım eğilimi değerleriyle ilişkilendirilebilir. Örneklerdeki $[FP-49+2H]^+/[FP-49+H]^+$ oranını bu eğilimle

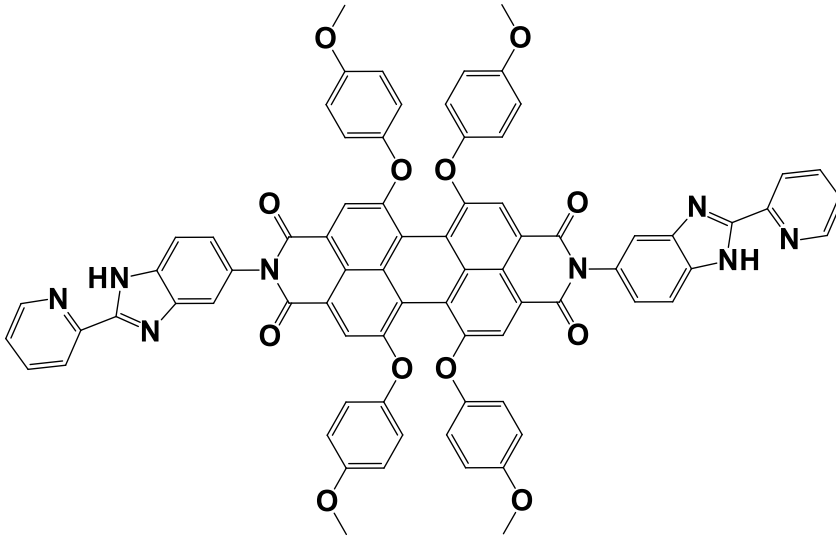
ilişkilendirirsek asit özelliği gösteren matrikslerin hidrojen atomu aktarma kuvvetleri DHB > 3-HPA = SA > CHCA olarak bulunmuştur.



Şekil 4.3.7. Kırmızı renkli pikler FP-49'un tamamen $[FP-49+H]^+$ şeklinde iyonlaştığında beklenen teorik izotopik dağılım olup bunlar örneğin farklı matrikslerde MALDI ve LDI spektrumundaki $[FP-49+H]^+$ piki ile üst üste gelecek şekilde çakıştırılmıştır. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, asit ilavesiz pozitif mod.

4.3.3. FP-50 Yapısı

FP-50 yapısında yan bölgelerine 4-metoksifenoksi grupları bağlanmıştır.



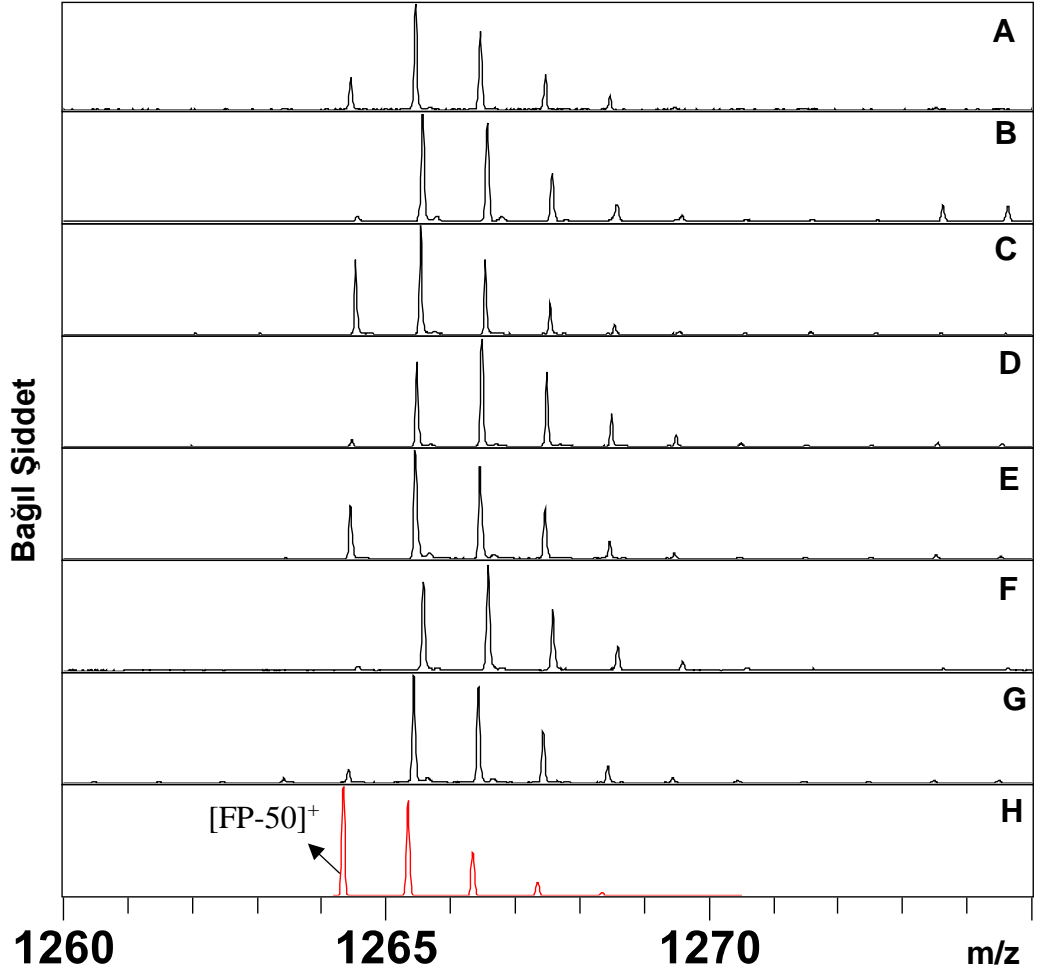
Şekil 4.3.8. FP-50 molekülü.

4.3.4. FP-50 Deneyleri

Şekil 4.3.9’de FP-50’nin farklı matrislerle molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=1264,33$ Da) asit ilavesiz pozitif mod MALDI spektrumları görülmektedir. FP-50’nin aksine radikal katyon şeklinde iyon oluşumları mevcuttur. Bir elektron transfer matrisi olan DCTB’de $[\text{FP-50}]^+$ iyonunun bağıl şiddeti en yüksek gözlenmiştir. Bunu sırasıyla PNA ve 3-HPA takip etmektedir. Matrisle örnek arasında bu iyonun oluşumunu içeren elektron transfer tepkimesi aşağıdaki şekilde gerçekleşir.



Entropinin fazla değişmediği durumlar için bu tepkimenin entalpi değişimindeki azalma reaksiyonun ürünler yönünde gelişme eğilimini artırır. Bu durumda matrisin iyonlaşma enerjisi ne kadar büyükse bu mekanizmayla o kadar fazla örnek radikal katyon şeklinde iyonlaşabilir. Çizelge 4.2’ye göre Bu değerler DCTB, PNA ve 3-HPA için $\dot{I}E_{3\text{-HPA}} > \dot{I}E_{\text{DCTB}} > \dot{I}E_{\text{PNA}}$ şeklindedir. Bu sıralama, bağıl şiddetlere göre yapılandan ($\dot{I}E_{\text{DCTB}} > \dot{I}E_{\text{PNA}} > \dot{I}E_{3\text{-HPA}}$) farklıdır. Bunun bir nedeni entalpi farkının fazla yüksek olması olabilir. Açığa çıkan enerjinin fazlası, oluşan ürünlerin üzerinde fazla enerji birikmesine ve parçalanma reaksiyonlarına girerek $[\text{M}]^+$ iyon şiddetinde düşümlere neden olabilir. Diğer bir olasılık plume’da bu tepkimelerin dengeye ulaşmamasıdır. Ancak elektron transfer reaksiyonları hızlı tepkimelerdir ve bu olasılık düşüktür.



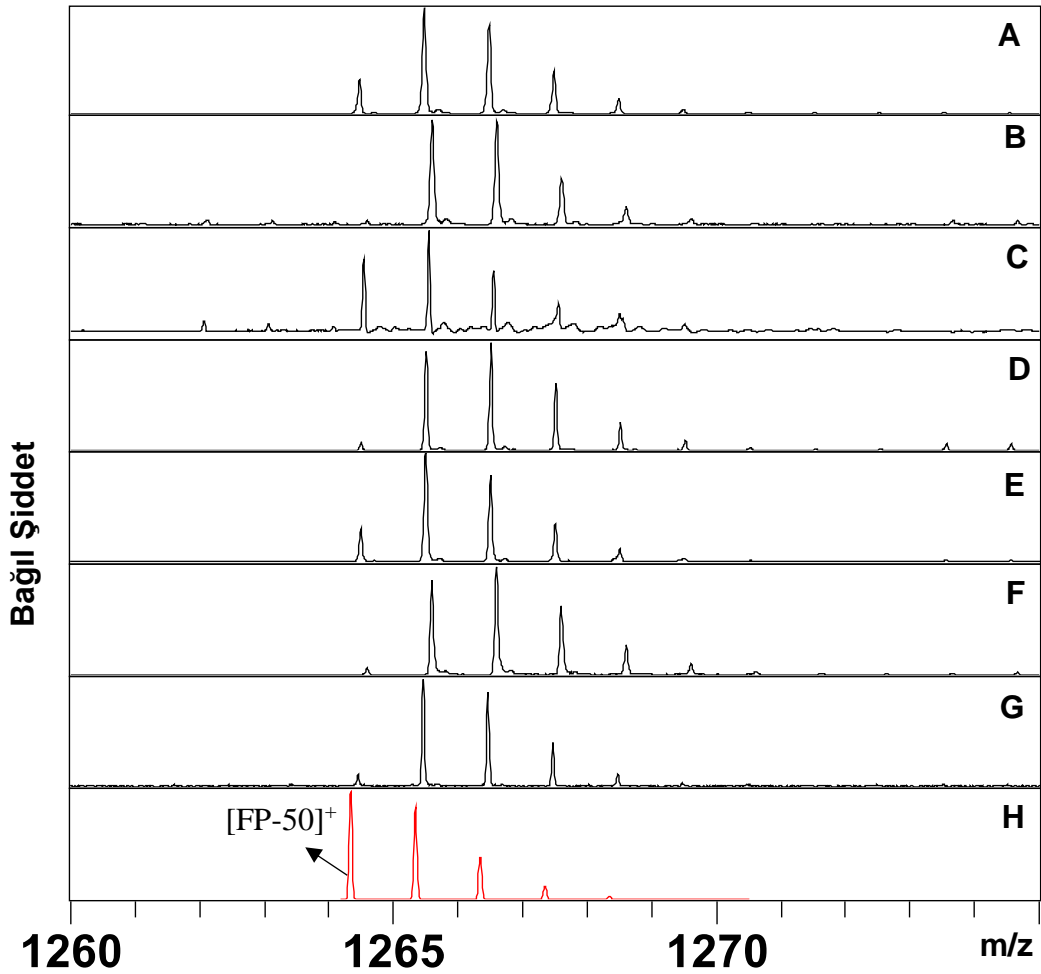
Şekil 4.3.9. FP-50'nin 1260-1275 m/z aralığındaki molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=1264,33$ Da) asit ilavesiz farklı matrislerde pozitif mod MALDI spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.

Çizelge 4.2. Deneyselerde kullanılan matrislerin iyonlaşma enerjisi verileri. Birden çok veri farklı teorik hesaplama (calc) veya deneysel (exp) ölçüme aittir. Değerlendirmelerde ortalamaları esas alınmıştır.

Matrix	IP (eV)
DHB	8,14 [108]
	8,05 [67]
	8,19 [112]
	7,86 [113]
	8,06 (ort)
SA	8,67 [112]
CHCA	8,5 [112]
PNA	8,34 [114]

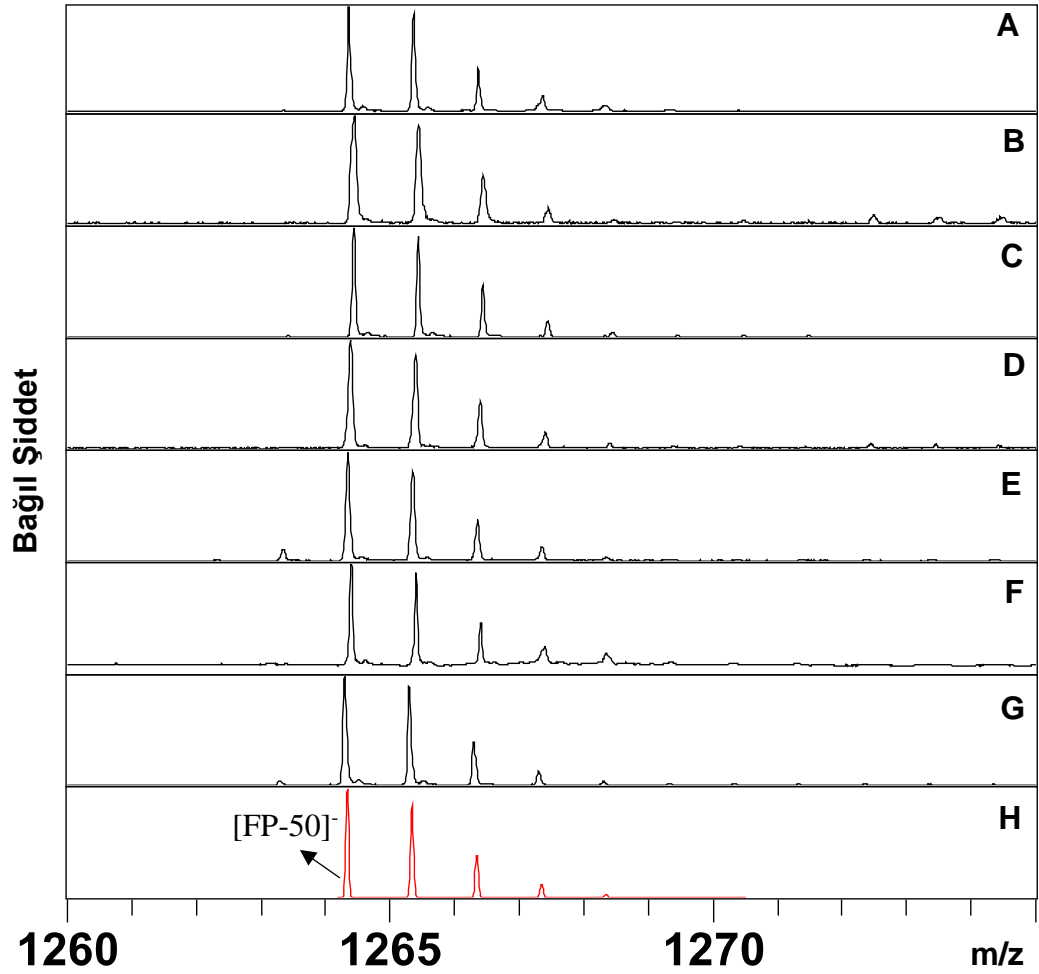
DCTB	8,54 ± 0,07 [66] exp
	8,47 [66] calc
	8,51 (ort)
3HPA	8,95 [113]

1% TFA ilavesi ile tekrarlanan pozitif mod spektrumların (şekil 4.3.10) iyon profillerinde asit ilavesiz örneklere göre farklılık gözlenmemiştir. Asit ilaveli DCTB örneklerinde genel iyon verimleri düşük seyretmiştir. Asit ilaveli DCTB kristallerinin plate'te dağılarak örnekten uzaklaştığı düşünülmüştür.



Şekil 4.3.10. FP-50, 1260-1275 m/z aralığındaki molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=1264,33$ Da) 1% TFA ilave edilmiş farklı matrislerde pozitif mod MALDI spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.

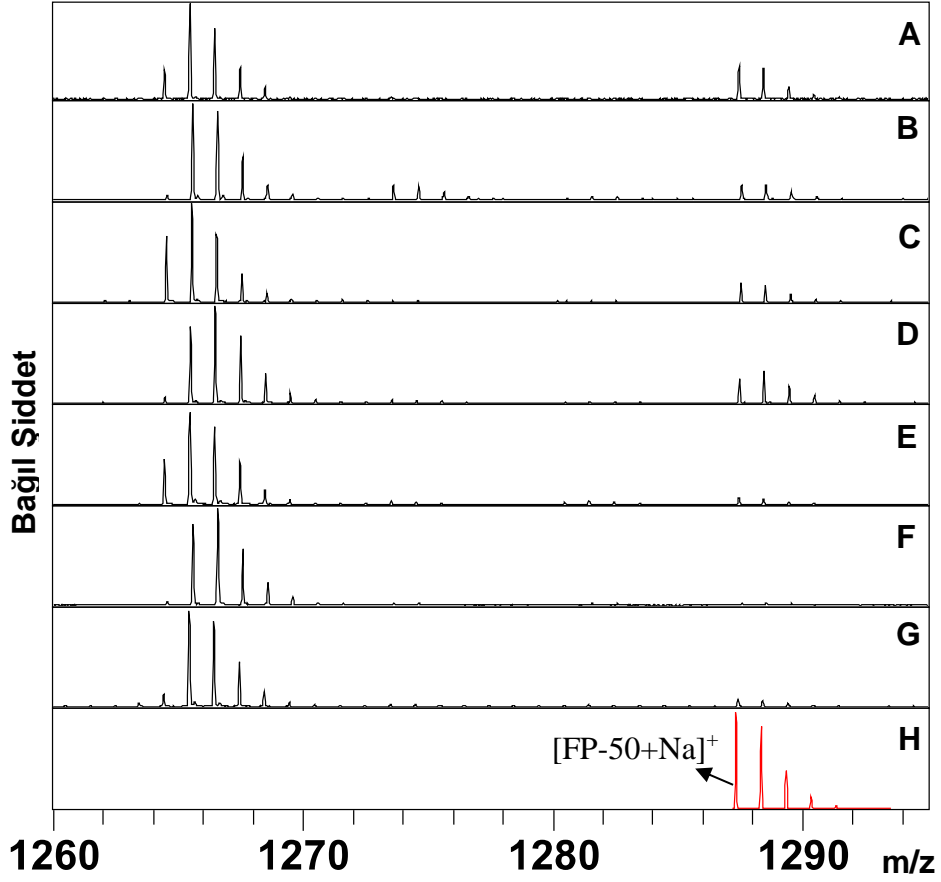
Şekil 4.3.11'deki negatif mod spektrumlarında aynı FP-49'da olduğu gibi matriks etkisi görülmemiştir. İyon profilleri LDI ile aynı olup, hepsi teorik dağılım ile aynıdır.



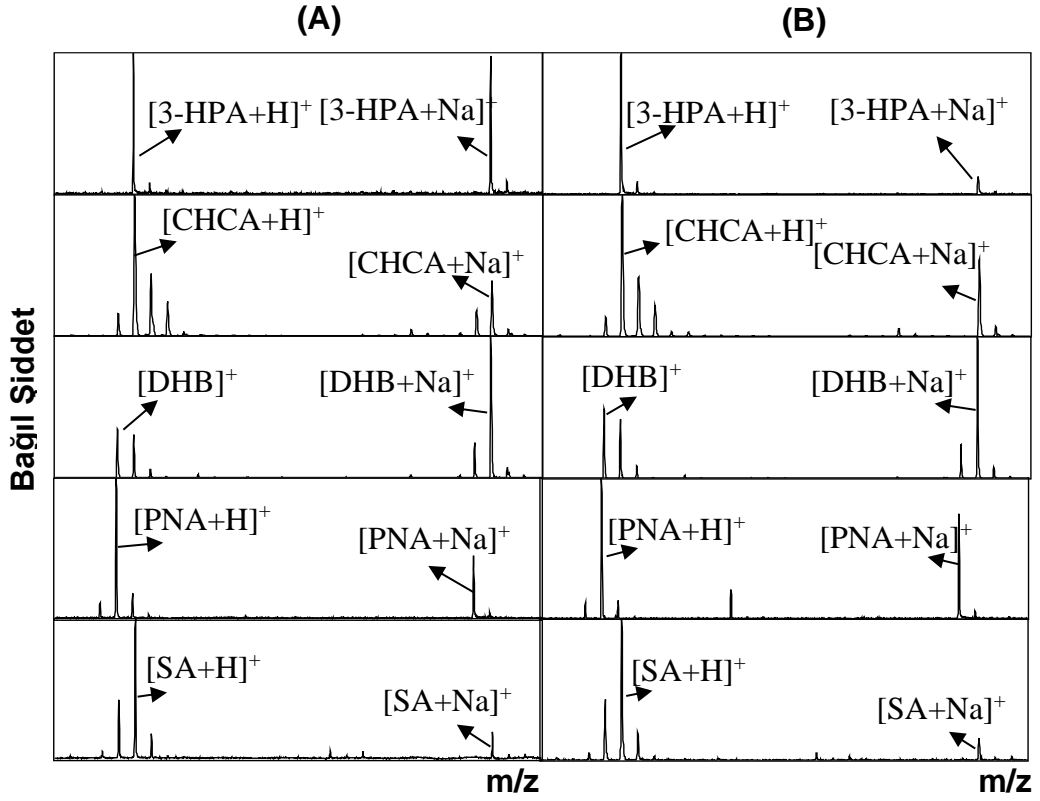
Şekil 4.3.11. FP-50'nin 1260-1275 m/z aralığındaki molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=1264,33$ Da) asit ilavesiz farklı matrikslerde negatif mod MALDI spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.

Örneklerin farklı matrikslerde sodyum katyonlanma profilleri incelenmiştir (Şekil 4.3.12). FP-49'un aksine bu örnekte Na katılım iyonları gözlenmiştir. FP-49'da Cl varlığı hem radikal katyonların hem de Na katılım iyonlarının oluşumuna engel olmuştur. Örneklerin asitsiz spektrumlarının matriks bölgeleri ile matrikslerin LDI spektrumlarının karşılaştırılmasına Şekil 4.3.13'te yer verilmiştir. Bu deneylerde matriks baskılanması olmayıp matriks izotopik dağılımları LDI'dakilerle aynıdır. Şekil 4.3.8'deki veriler üzerinden daha önce FP-49 için yapılan $[M+2H]^+/[M+H]^+$ bağıl şiddet oranı karşılaştırması FP-50 için tekrarlanmış olup, bu değerler üzerinden asidik matrikslerin

hidrojen atom aktarımı eğilimleri DHB > SA > CHCA > 3-HPA olarak izlenmiştir. FP-49'un 3-HPA'lı şekil 4.3.3'teki spektrumunda gürültü ve kuyruklanma göze çarpmaktadır. Bu nedenle 3-HPA'nun FP-49'un desorpsiyonu için uygun bir matriks olmadığı düşünülmüştür. Hidrojen atomu aktarım eğilimi için şekil 4.3.3'teki spektrum üzerinden yorum yapmak yanıltıcı olabilir.



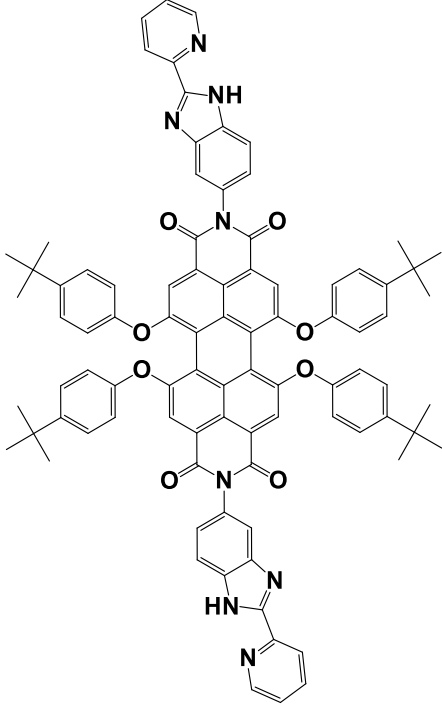
Şekil 4.3.12. FP-50 Na katılım iyonu bölgesi asit ilavesiz farklı matrikslerde pozitif mod MALDI spektrumu. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA (F) SA, (G) LDI, (H) teorik izotopik dağılım.



Şekil 4.3.13. Asit ilavesiz FP-50 MALDI deneylerinin matriks kütle bölgelerindeki izotopik dağılımlar. A sütununun altında kalan pikler örneğin MALDI spektrumlarının (şekil 4.3.9) matriks bölgesine ait iken B sütununun altındaki pikler matrikslerin asit ilavesiz LDI spektrumlarına aittir.

4.3.5. FP-53 Yapısı

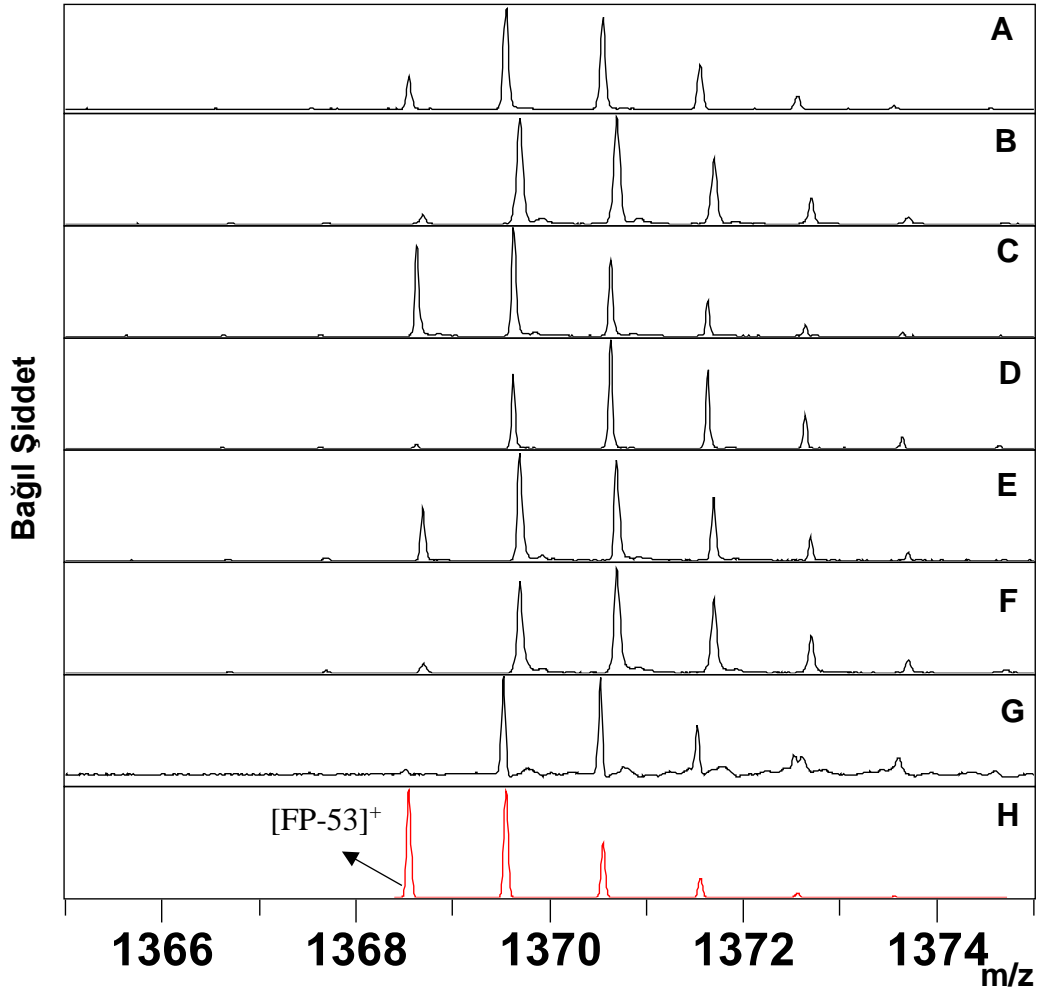
FP-53 yapısında yan bölgelerine 4-tertbutilfenoksi grupları bağlanmıştır.



Şekil 4.3.14. FP-53 molekülü.

4.3.6. FP-53 Deneyleri

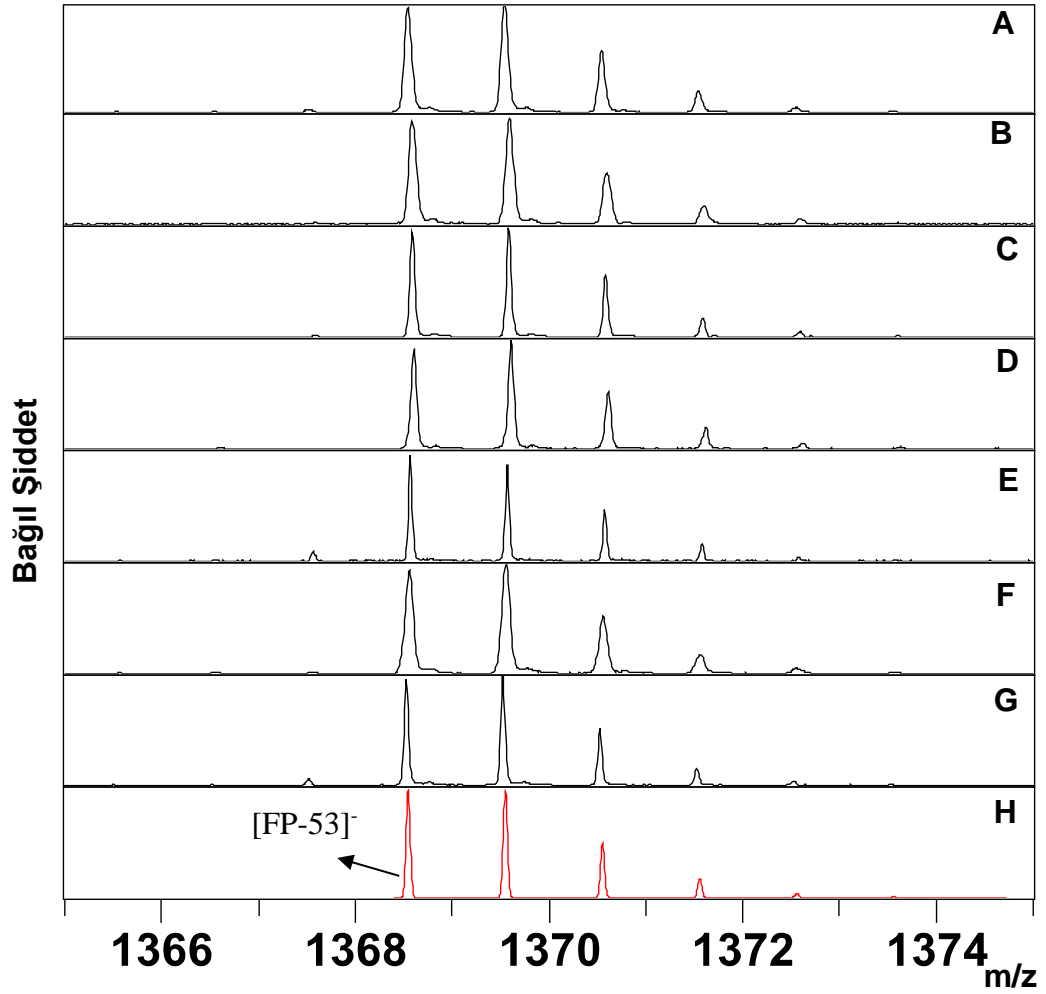
FP-53'ün şekil 4.3.15'teki 1365-1375 m/z kütle aralığındaki molekül bölgesinde ($M_{\text{mono}}=1368,54$ Da) pozitif mod asit ilavesiz MALDI spektrumları FP-50 ile benzer özellik göstermiştir. Radikal katyon bağıl şiddetleri aynı şekilde DCTB, PNA ve 3-HPA matrikslerinde diğerlerine göre artış gösterip, matrikslerin bu pikleri verme eğilimi aynı seyretmiştir. 4-tertbutilfenoksi grubu, 4-metoksifenoksi grubuna kıyasla farklı bir iyonlaşma karakteri yaratmamıştır.



Şekil 4.3.15. FP-53, 1365-1375 m/z aralığındaki molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=1368,54$ Da) asit ilavesiz farklı matrislerde pozitif mod MALDI spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.

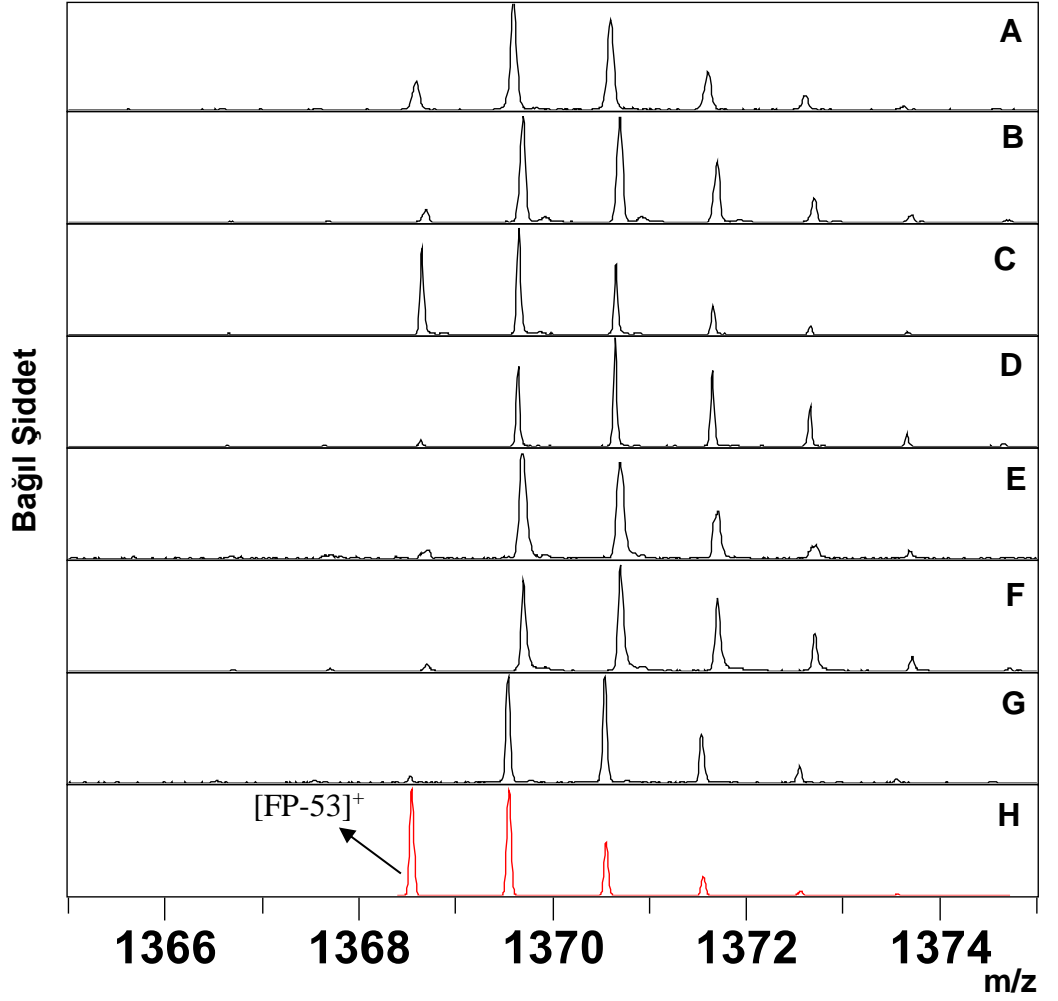
Farklı matrislerle negatif mod asit ilavesiz MALDI spektrumları şekil 4.3.16'da görüldüğü gibi örneğin asit ilavesiz LDI ve teorik spektrumlarıyla eşdeğer gözlemlendi. Gerek matrislerin LDI, gerekse örneklerin MALDI spektrumlarında negatif modda, pozitifte olduğu gibi izotopik dağılımlarda farklılıkların olmayışı, bu polaritede iyon molekül reaksiyonlarının gerçekleşme eğiliminin düşüklüğünü gösterir. Bu durum MALDI iyonlaşma sürecinde aktarılan enerjinin, iki zıt yük arasında asimetrik dağıldığına işaret ediyor olabilir. İvmelenme potansiyelinin etkisiyle kısa bir süreçte plume negatif ve pozitif yüklü iki farklı bileşene ayrılır. Lazer enerjisinin daha çok pozitif modda birikmesi, plume'ın pozitif yüklü bileşenindeki iyon molekül çarpışmalarının daha güçlü olmasını sağlar ve gerek hidrojen atomu aktarımlarının, gerekse parçalanma

ürünlerinin daha çok görülmesine neden olur. Dolayısıyla negatif mod MALDI'nin pozitifte göre daha “yumuşak” gerçekleştiği düşünülebilir.



Şekil 4.3.16. FP-53, 1365-1375 m/z aralığındaki molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=1368,54$ Da) asit ilavesiz farklı matrislerde negatif mod MALDI spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.

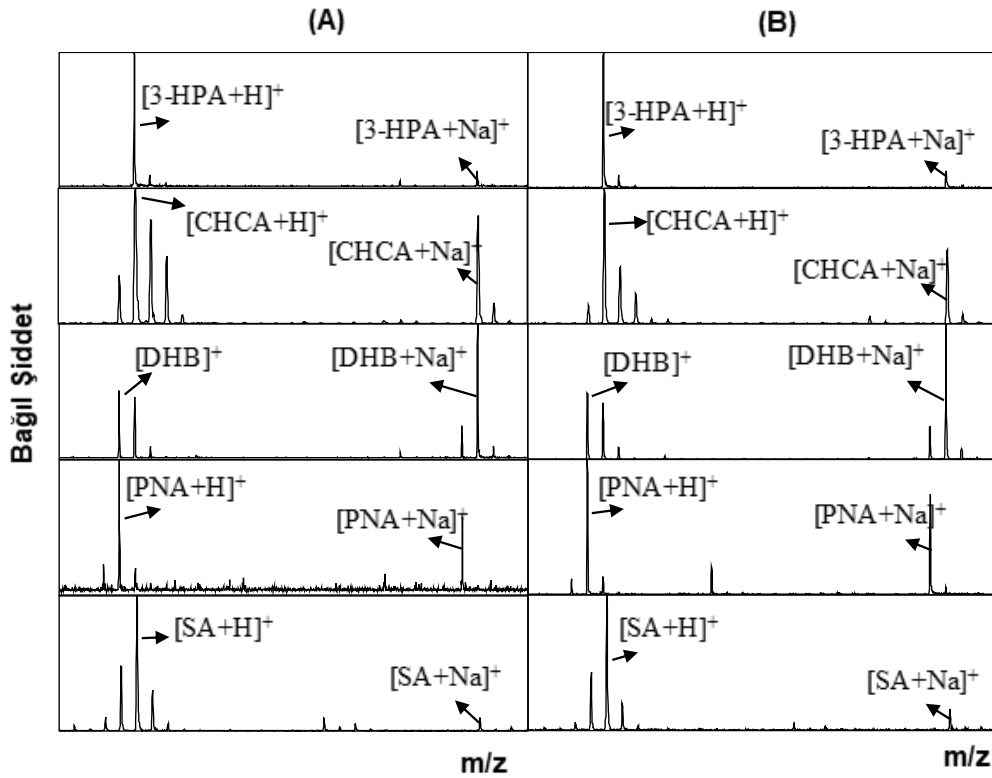
Şekil 4.3.17’de görüldüğü gibi 1% TFA ilave edilmiş matrisler kullanılarak alınan MALDI spektrumları aynı diğer moleküllerde olduğu gibi FP-53’te de iyonlaşmaya katkı yapmamıştır. İlave asit varlığı deneylerde kristallenme karakterini değiştirme dışında bir etkiye neden olmamıştır.



Şekil 4.3.17. FP-53, 1365-1375 m/z aralığındaki molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=1368,54$ Da) 1% TFA ilave edilmiş farklı matrislerde pozitif mod MALDI spektrumları. (A) 3-HPA, (B) CHCA, (C) DCTB, (D) DHB, (E) PNA, (F) SA, (G) LDI, (H) Teorik izotopik dağılım.

Şekil 4.3.18’de pozitif mod asit ilavesiz MALDI spektrumlarının (Şekil 4.3.15) matris bölgeleindeki pikler ile matris LDI pikleri karşılaştırılmıştır. İzotopik pik dağılımlarında diğer örneklerde olduğu gibi farklılık görülmemiş farklı matris etkileşimlerinin varlığı, spektrumda matris iyonlarının molekül bölgesindeki izotopik dağılımlarına etki etmemektedir. Bu durum birkaç farklı şekilde açıklanabilir. MALDI’de düşük kütle bölgelerinde (<500 Da) birçok matris ile ilintili iyon gözlenmektedir. Yük/atom transfer reaksiyonları bunlardan herhangi biriyle gerçekleşiyor olabilir. Bununla birlikte MALDI’de iyon verimleri düşüktür [89, 115] ve ortamda en yaygın bulunan türler nötral matris molekülleridir. Dolayısıyla örneklerin iyonlaşmasına ya da atom transfer reaksiyonlarına en çok katkıda bulunan türler bu türler olabilir. Matris

molekül bölgelerindeki iyonların izotopik dağılımlarından yapılacak çıkarım daha ziyade MALDI iyonlaşma sürecine özgü ($[M+2H]^+$, $[M+3H]^+$ gibi) iyonların varlığıdır. Amin grubu içeren bu üç perilendiimid türevinin de LDI spektrumları birbirine benzemektedir. Radikal katyon şeklinde iyonlaşma olmayıp örnek tamamen protone formda gözükmemektedir. Bununla birlikte negatif modda sadece radikal anyon şeklinde iyonlaşma mevcuttur. PNA ve 3-HPA gibi amin gurubu içeren matrisler disproporsiyonasyon ile iyonlaşmış olup bu moleküllerde benzer bir durum gözlenmemiştir. Bu durum amin gruplarının bu reaksiyon türleri üzerine doğrudan bir etkisi olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.3.18. Asit ilavesiz FP-53 MALDI deneylerinin matris kütle bölgelerindeki izotopik dağılımlar. A sütununun altında kalan pikler örneğin MALDI spektrumlarının (şekil 4.3.15) matris bölgesine ait iken B sütununun altındaki pikler matrislerin asit ilavesiz LDI spektrumlarına aittir.

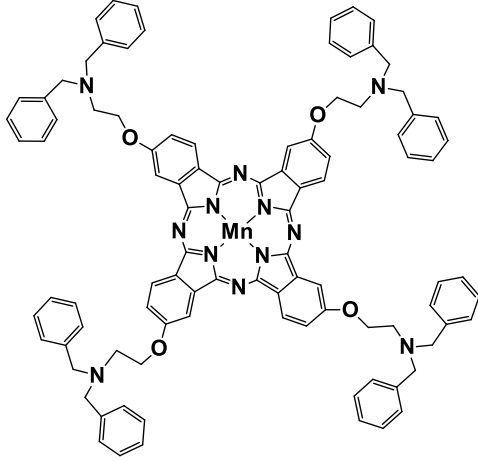
4.4. Nötral Organometalik Bileşiklerin MALDI İncelemesi

Bu bölümde metal merkezi farklı nötral organometalik bileşiklerin MALDI iyonlaşmaları incelenmiştir. Ftalosiyanın türevi ligand tüm yapılarda aynı olup metalin redoks davranışlarının iyonlaşmaya etkisi tartışılmıştır. Bu şekilde mangan, nikel ve kobalt kompleksleri incelenmiştir. Benzer şekilde üç tane çinko metal merkezi bulunan

ftalosiyenin kompleksinde de aynı çalışmalar yürütülmüştür. Verilerin yorumlanması 4.4.5. bölümünde gerçekleştirilmiştir.

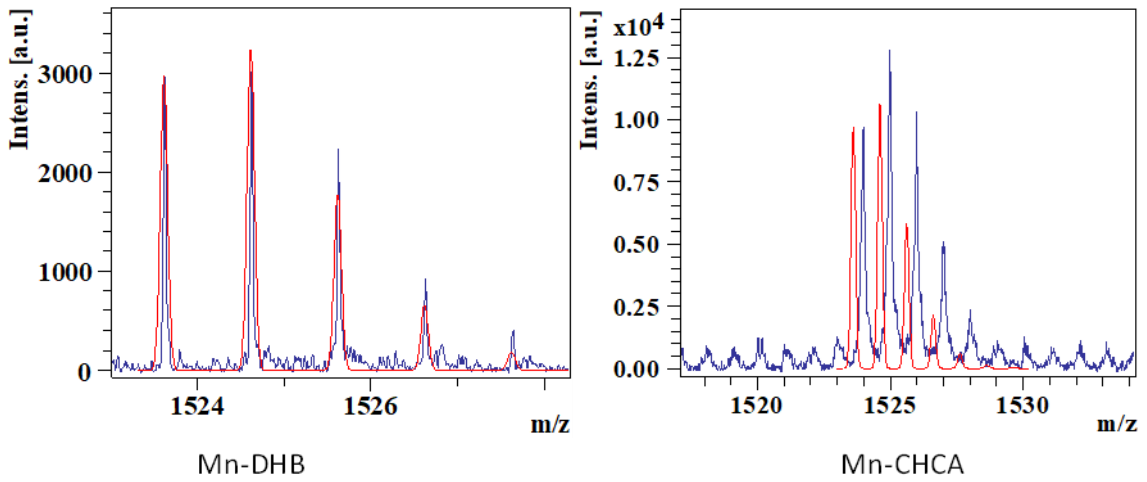
4.4.1. MnPc Kompleksinin MALDI-MS Çalışmaları

Şekil 4.4.1’de Mn-Pc kompleksinin yapısı görülmektedir. Mangan +2 yüklü olup ftalosiyenin türevi ligand -2 yüküdür ve kompleks toplamda yüksüzdür.



Şekil 4.4.1. MnPc Kompleksi.

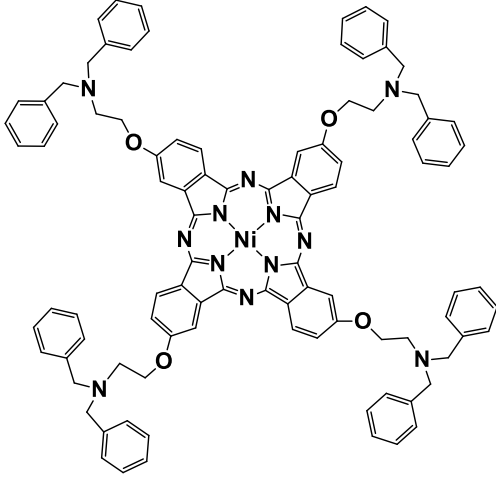
Şekil 4.4.2’de molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=1523,61$ Da) DHB ve CHCA matrisleriyle alınmış asitsiz MALDI spektrumları verilmiştir. Kırmızı renkli pikler kompleksin teorik doğal izotopik dağılımını göstermekte olup radikalik katyon şeklinde iyonlaşmış olan $[\text{MnPc}]^+$ pikinden başlayacak şekilde spektrumla karşılaştırılmıştır. Gerek DHB gerekse CHCA ile iyonlaşma karakterlerinde dikkate değer bir farklılık olmayıp örnek temelde radikalik katyon şeklinde iyonlaşmaktadır.



Şekil 4.4.2. MnPc Kompleksi molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=1523,61$ Da) DHB ve CHCA ile MALDI spektrumları. Kırmızı pikler örneğin doğal izotopik dağılımını gösterir.

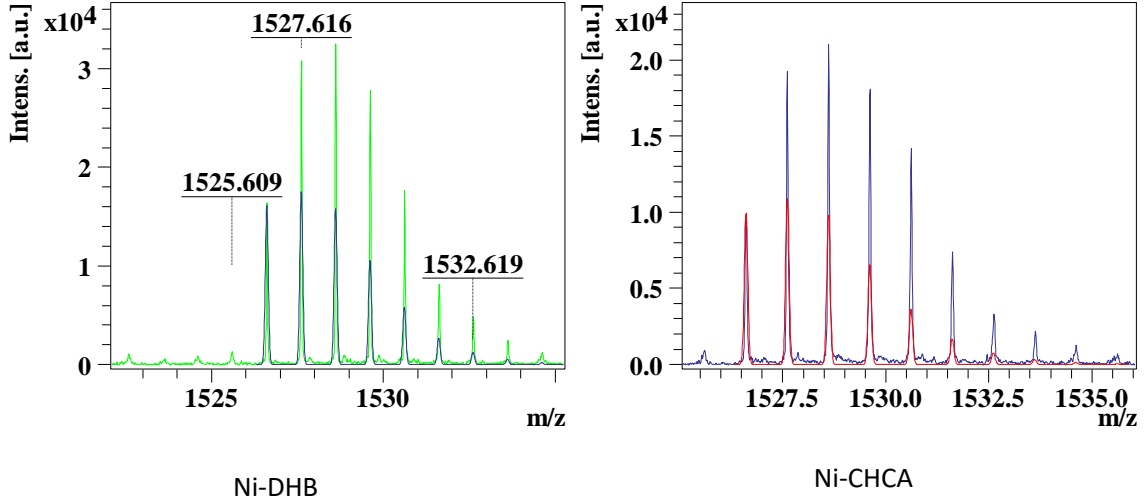
4.4.2. NiPc Kompleksinin MALDI-MS Çalışmaları

MnPc kompleksine benzer şekilde NiPc kompleksinde de Nikel +2 yükseltgenme basamağına sahiptir. Ligand ise -2 yüklüdür.



Şekil 4.4.3 NiPc kompleksi.

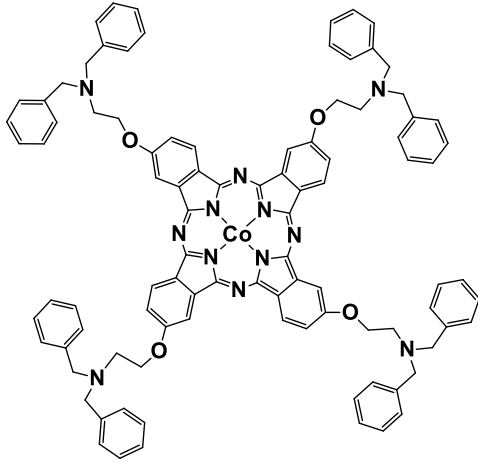
Şekil 4.4.4'te NiPc kompleksinin DHB ve CHCA ile alınan asitsiz pozitif mod molekül bölgesi ($M_{\text{mono}}=1526,60$ Da) MALDI spektrumlarında MnPc kompleksiyle aynı işlemler tekrarlanmış olup soldaki DHB'ye ait spektrumda mavi renkli pikler radikal katyona ait teorik izotopik dağılımı gösterir. Yeşil pikler ise deneysel verilere aittir. Sağda CHCA matriksiyle alınan spektrumda ise mavi renkli pikler deneysel verileri yansıtırken kırmızı renkli pikler teorik izotopik dağılıma aittir. $[\text{NiPc}]^+$ pikinin sağında kalan kütlelerin bağlı şiddeti teorik pike göre fazla çıkmıştır. Bu durum Nikel kompleksinin radikal katyon oluşumu dışında protonlanarak da iyonlaştığını göstermektedir.



Şekil 4.4.4. NiPc kompleksinin molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=1526,60$ Da) DHB ve CHCA matriksleri ile asitsiz pozitif mod MALDI spektrumları. Solda mavi, sağda ise kırmızı renkli pikler doğal izotopik dağılımı göstermektedir.

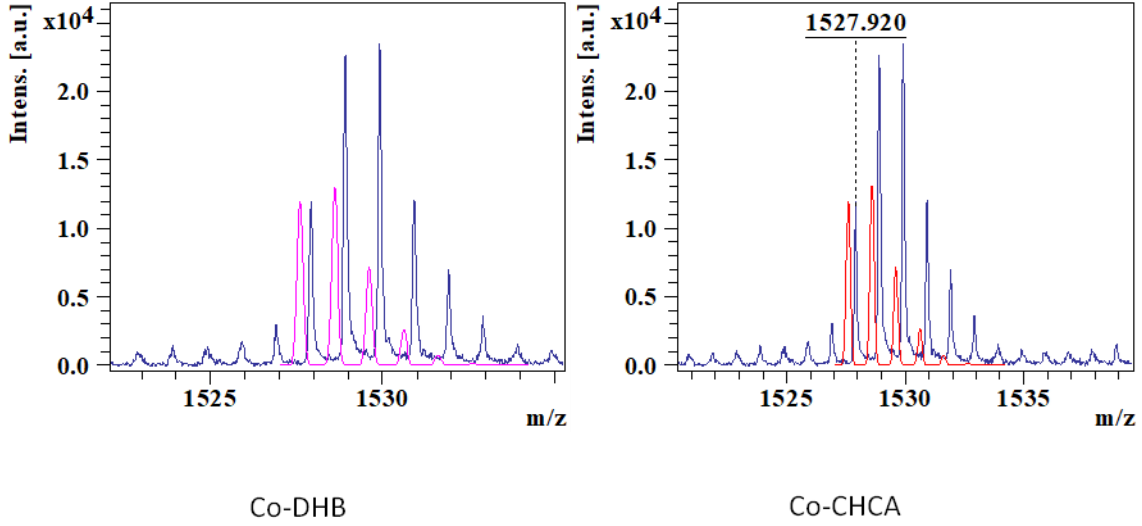
4.4.3. CoPc Kompleksinin MALDI-MS Çalışmaları

Şekil 4.4.5'te CoPc yapısı verilmiştir. Kobalt +2 yükseltgenme basamağına sahiptir. Ftalosiyanın ligandı aynı diğer moleküllerde olduğu gibi -2 yüklüdür.



Şekil 4.4.5. CoPc Kompleksi.

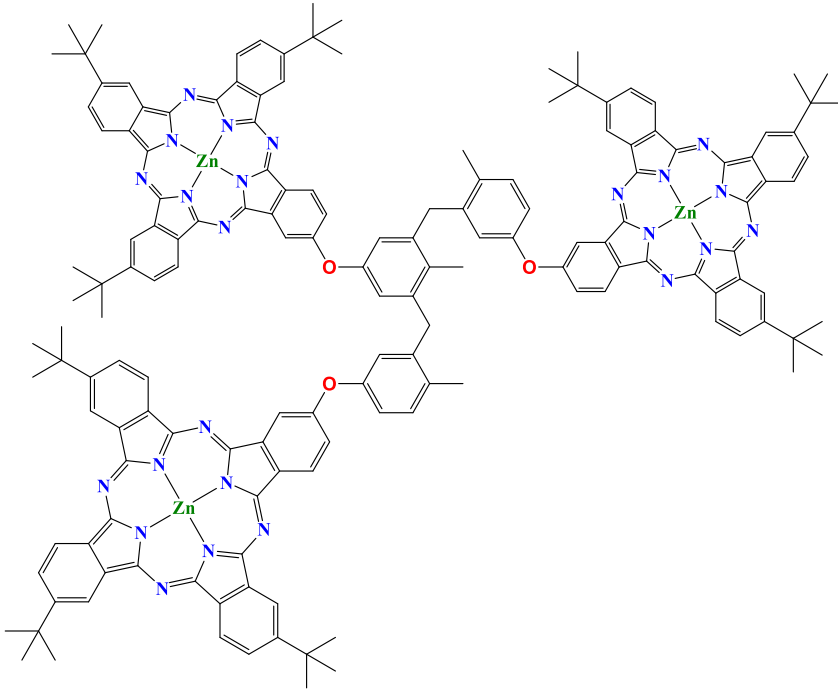
Şekil 4.4.6'da CoPc yapısının molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=1527,60$ Da) DHB ve CHCA matriksleri ile asitsiz pozitif mod MALDI spektrumları verilmiştir. Kırmızı pikler teorik izotopik dağılıma aittir. Nikel kompleksine benzer şekilde örnek hem radikal kation şeklinde hem de protonlanarak iyonlaşmıştır. Matriksler iyonlaşma üzerinde kayda değer bir etki yaratmamıştır.



Şekil 4.4.6. CoPc kompleksinin molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=1527,60$ Da) DHB ve CHCA ile alınmış asitsiz pozitif mod MALDI spektrumları. Kırmızı pikler teorik izotopik dağılımı aittir.

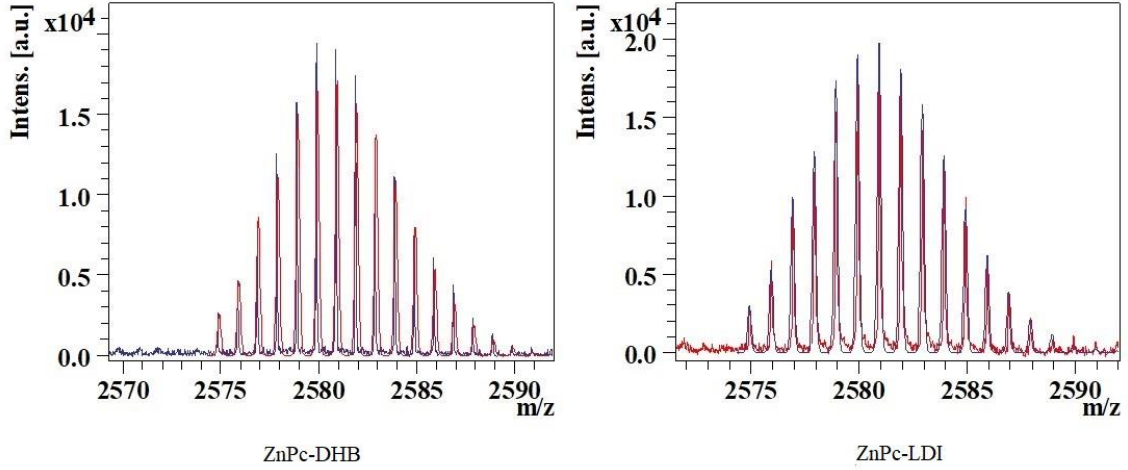
4.4.4. ZnPc Kompleksinin MALDI-MS Çalışmaları

Şekil 4.4.7’de ZnPc yapısı verilmiştir. Bu kompleksin ligandları diğer nötral organometalik moleküllerde bulunanlardan farklı olup, birbirlerine yan grupları üzerinden bağlanmışlardır. Çinko +2, ligand -2 yüklü olup molekülün tamamı nötraldir.



Şekil 4.4.7. ZnPc kompleksi.

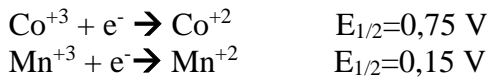
Şekil 4.4.8’de ZnPc yapısının molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=2574,92$ Da) DHB MALDI ve LDI spektrumları verilmiştir. Kırmızı pikler teorik izotopik dağılıma ait olup teorik izotopik dağılıma aittir. Manganda olduğu gibi örnek büyük oranda radikal katyon şeklinde iyonlaşmıştır. DHB matriksi varlığı iyonlaşma profilinde değişim yaratmamıştır.



Şekil 4.4.8. ZnPc kompleksinin molekül kütle bölgesinde ($M_{\text{mono}}=2574,92$ Da) asitsiz pozitif mod DHB ile MALDI ve LDI spektrumları. Kırmızı pikler teorik dağılımı verir.

4.4.5. İndirgenme Potansiyellerinin MALDI İyonlaşmasına Etkisi

Ftalosiyanın-metal komplekslerinde indirgenme veya yükseltgenme hem metal üzerinden hem de ftalosiyanın ligandı üzerinden gerçekleşebilir. Elektrokimyasal çalışmalarla ilgili kompleksler için hangi yolun aktif olduğu belirlenebilir. Bu deneyde çalışıldan farklı bir ftalosiyanın türevinin Co, Fe, Mn, Ni ve Zn ile yaptığı komplekslerin incelendiği bir çalışmada [116] Co ve Mn metalleri için indirgenme potansiyelleri aşağıdaki gibi bulunmuştur.



Co^{+3} 'ün indirgenme potansiyeli Mn^{+3} 'ten daha yüksek olduğu için Mangana'nın ftalosiyanın komplekslerinde +3'e daha kolay yükseltgeneceği görülmüştür. Deneylerde Mangana'nın sadece radikal katyonu şeklinde oluşması, bu eğilimi doğrulamaktadır. Mangana +2'den +3 yükseltgenme basamağına kolayca çıkmakta ve MALDI ortamında yarışma halinde olan radikal katyon şeklinde iyonlaşma ve protonlanarak iyonlaşma mekanizmalarından ilkinin ağır basmasına neden olmaktadır. İndirgenme potansiyellerinin alındığı aynı çalışmada Nikel⁺³'ün +2'ye indirgenmesi gözlenmemiştir.

Nitekim Nikel ftalosiyenin komplekslerinde metalin redoks tepkimelerinde inaktif olduğu bilinmektedir [117]. Bu nedenle Nikel kompleksleri için radikal şekilde iyonlaşmanın ftalosiyenin üzerinden olduğu düşünülmüştür. Çinkonun teorik olarak mümkün olabileceği düşünülse de [118] +3 yükseltgenme basamağında olan bir kompleksi bulunmamaktadır. Üstteki literatür çalışmasında çinko için de nikel benzer şekilde +3/+2 indirgenmesi gözlenmemiştir. Dolayısıyla elektron aktarımının yine ftalosiyenin üzerinden olması beklenir. ZnPc kompleksinin MALDI deneylerinde aynı manganda olduğu gibi radikalik katyon şeklinde iyonlaşma görülmüştür. İyonlaşmanın ftalosiyenin üzerinden gerçekleştiği düşünülürse Nikel-ftalosiyenin etkileşimine göre Çinko-ftalosiyenin etkileşimi ftalosiyenin grubunun elektron verme eğilimini arttırmış ve bu kompleksin büyük oranda radikalik katyon şeklinde iyonlaşmasına neden olmuştur.

5. SONUÇLAR

- Matrikslerin LDI çalışmaları sonucu 3-HPA ve PNA matrikslerinin disproporsiyonasyon reaksiyonuyla iyonlaştıkları gözlemlendi.
- CHCA, SA, DHB ve DCTB matrikslerinin pozitif modda hem radikal katyonları şeklinde hem de protone iyonları şeklinde iyonlaştıkları görüldü. Radikal katyon oluşturan matrikslerde takip eden hidrojen atom aktarım reaksiyonları ortaya çıktı. π bağı bulunduran matrikslerde bu reaksiyonlar spektrumlarında daha belirgin seyretti.
- Negatif LDI spektrumlarında hidrojen transfer reaksiyonları gözlenmedi. Birçok matrikste $[M-H]^-$ formu gözlenirken DCTB’de $[M]^-$, DHB’de ise $[M-2H]^-$ iyonları göze çarptı.
- Matrikslerin proton ilgisi değerleriyle LDI karakterleri arasında direk bir ilişki gözlenmedi.
- TFA ile asitlendirilerek hazırlanan matriks ve örnek spektrumlarında asitsiz çalışılan deneylere göre bir değişiklik gözlenmedi. Asit varlığı bazı örneklerde kristallenme dinamiklerini etkileyerek örnek homojenitesinde değişikliklere yol açtı. Bu durum bazı örneklerde iyon verimlerini negatif yönde etkiledi.
- İyonik organometalik bileşiklerin MALDI spektrumlarında molekül iyonları gözlenmedi. Metal kompleksine elektrostatik etkileşimle bağlı iyonlardan bir tanesinin ayrılmasına ait iyonlar temel pik olarak saptandı. Bu türlerin katı fazda halihazırda iyonlarına ayrılmış halde bulunmasının iyon oluşumunu kolaylaştırdığı görüldü. Bu şekilde iyonlaşma eğilimi yüksek olan komplekslerin iyon profillerinde matrikslerle değişiklik gözlenmedi.
- İyonik organometalik bileşiklerin bir iyon ayrılmış +1 yüklü hallerinden ikinci bir iyonun (bu sefer ligand) ayrılması durumunda ise matrikslere özgü karakter değişiklikleri gözlemlendi. MALDI ortamında genellikle tek yüklü iyonlar görülür. Yapıdan ikinci bir iyon ayrılmasıyla +2 yüklü konuma gelen kompleksler için +1

yüklü hale geçiş 2 şekilde seyretti: Bir elektron alımı veya bir proton ayrılması. Bu iki durumun gerçekleşmesi hem metal kompleksinin yapısına hem de çevredeki kimyasal türlerin yapısına bağlıdır. Örneğin kolay verebileceği protonu olduğunda ve çevresinde bu protonu almaya meyilli türlerin varlığında proton verme, aksi durumda ise elektron alma yoluyla iyonlaştığı görüldü. Elektron alma sonucu oluşan radikalik iyonlar matriksin eğilimine bağlı olarak hidrojen atomu olarak daha üst kütlelerde gözükte. Bu şekilde elektron transferine uygun olan matriksler CHCA, SA ve DHB olarak belirlendi. LDI spektrumlarında radikal katyon olarak oluşabilen bu türlerin ortama kolay elektron sağladığı düşünüldü.

- Diğer bir iyonik organometalik tür olan B-17_R örneğinde ise yapıdan gerek birinci negatif iyon, gerekse ikinci negatif iyonun ayrılmasına ait spektrumlarda matriks etkisi gözlenmedi. İlk negatif iyon çıkışını takiben bir de hidrojen atomu olarak iyonlaştığı gözlendi. Bu durum yapıdan ayrılan NO₃⁻ iyonunun plume'da yarattığı radikalik türler vasıtasıyla gerçekleştiği düşünüldü. B-19'a nazaran kolay verebileceği protonu bulunan bu komplekste ikinci iyonun çıkışına ait pikler sadece proton aktarımı vasıtasıyla oldu. Bununla birlikte örnek ve matriksin kristallenme esnasında birbirinden uzaklaştığı, bu nedenle matriks/örnek etkileşimlerinin gözükmemesinin bu reaksiyonların yoğun fazda lazer atışının hemen akabinde oluşmasıyla ilişkili olabileceği, gaz fazında bu reaksiyonların etkinliğinin azaldığı düşünüldü.
- Amin grupları içeren farklı yan gruplara sahip perilen moleküllerinde pozitif modda iyonlaşma temelde protonlanarak gerçekleşti. Gerek LDI gerek matriksli spektrumlarda protonlanmış kütleler ağır basarken klor yan grupları içeren FP-49 dışındaki moleküller matrikslerin iyonlaşma enerjilerine bağlı olarak belirli oranlarda radikal katyon şeklinde de oluşabildi. Bu eğilimi en yüksek olan matriksler DCTB, PNA ve 3-HPA olarak belirlendi. FP-49'da ise klor varlığının iyonlaşma enerjisini arttırdığı ve sadece protonlanarak iyonlaşmayı mümkün kıldığı düşünüldü.
- Örneklerin protonlanmanın yanında hidrojen atomları da alarak daha yüksek kütlelere ulaştığı görüldü. Matrikslerin bu şekilde hidrojen atomu aktarma

eğilimleri asidik matriksler arasında büyükten küçüğe DHB>SA>CHCA>3-HPA şeklinde seyretti.

- Aynı ftalosiyanın ligandına sahip olup farklı geçiş metalleri içeren nötral organometalik komplekslerde iyonlaşmada kompleksin yükseltgenme eğilimine bağlı olarak radikalik katyon ve protone iyon arasında yarışma olduğu gözlemlendi.
- Mangan ve Kobalt arasında +3/+2 indirgenme potansiyeli daha yüksek olan Kobalt daha çok protonlanarak iyonlaşırken, bu potansiyeli düşük olan Mangan ise +2'den +3'e yükseltgenerek tamamen radikal katyon şeklinde iyonlaştı. Nikel ftalosiyanın komplekslerinde elektron aktarımında rol almadığı için indirgenme potansiyeli üzerinden yorum yapılamadı. İyonlaşma karakteri Kobaltinkine benzeyen Nikel kompleksinde bu durumun Nikel/Ftalosiyanın ligand etkileşimleri sonucu ftalosiyanın üzerinden gerçekleştiği düşünüldü. Çinko kompleksi mangan gibi radikal katyon şeklinde iyonlaştı. Çinko +3 yükseltgenme basamağında bulunmadığından nikel benzer şekilde ligand etkileşimleriyle ftalosiyanın üzerinden iyonlaştığı ve bu etkileşimlerin kompleksten elektron koparılmasını kolaylaştırdığı anlaşıldı.

6. KAYNAKLAR

- [1] J.J. Thomson, XL. Cathode Rays, The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, (1897).
- [2] M. Smoluch, G. Grasso, P. Suder, J. Silberring, Mass Spectrometry: An Applied Approach, 2nd Edition, 2019.
- [3] A.J. Dempster, LII. The ionization and dissociation of hydrogen molecules and the formation of H₃, The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, (1916).
- [4] A.J. Dempster, A new method of positive ray analysis, Physical Review, (1918).
- [5] M.S.B. Munson, F.H. Field, Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction, Journal of the American Chemical Society, (1966).
- [6] A.J.R. Heck, L.J. de Koning, N.M.M. Nibbering, On the structure of protonated methane, Journal of the American Society for Mass Spectrometry, (1991).
- [7] R.A. Hancock, M.G. Hodges, A simple kinetic method for determining ion-source pressures for ammonia CIMS, International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics, (1983).
- [8] G.W.A. Milne, H.M. Fales, T. Axenrod, G.W.A. Milne, T. Axenrod, Identification of Dangerous Drugs by Isobutane Chemical Ionization Mass Spectrometry, Analytical Chemistry, 43 (1971) 1815-1820.
- [9] D.W. Bassett, Principles of Field Ionisation and Field Desorption Mass Spectrometry, Physics Bulletin, 29 (1978) 572-572.
- [10] E.D. Hoffmann, V. Stroobant, Mass Spectrometry Principles and Applications Third Edition, 2007.
- [11] D.I. Carroll, I. Dzidic, R.N. Stillwell, K.D. Haegele, E.C. Horning, Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry. Corona Discharge Ion Source for use in a Liquid Chromatograph-Mass Spectrometer-Computer Analytical System, Analytical Chemistry, (1975).
- [12] A.L. Gray, The ICP as an ion source-origins, achievements and prospects, Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, (1985).

- [13] H.R. Morris, M. Panico, M. Barber, R.S. Bordoli, R.D. Sedgwick, A. Tyler, Fast atom bombardment: A new mass spectrometric method for peptide sequence analysis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (1981).
- [14] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, (1987).
- [15] M. Karas, F. Hillenkamp, Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons, 1988.
- [16] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, T. Matsuo, Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, (1988).
- [17] M. Yamashita, J.B. Fenn, Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme, *Journal of Physical Chemistry*, (1984).
- [18] V.V. Laiko, M.A. Baldwin, A.L. Burlingame, Atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, (2000).
- [19] D.S. Peterson, Matrix-free methods for laser desorption/ionization mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews*, (2007).
- [20] R.H. Daniels, S. Dikler, E. Li, C. Stacey, Break Free of the Matrix: Sensitive and Rapid Analysis of Small Molecules Using Nanostructured Surfaces and LDI-TOF Mass Spectrometry, *Journal of Laboratory Automation*, (2008).
- [21] N. Tang, P. Tornatore, S.R. Weinberger, Current developments in SELDI affinity technology, 2004.
- [22] P.E. Miller, M.B. Denton, The quadrupole mass filter: Basic operating concepts, *Journal of Chemical Education*, (1986).
- [23] F.W. McLafferty, T.A. Bryce, Metastable-ion characteristics: Characterization of isomeric molecules, *Chemical Communications (London)*, (1967).
- [24] M.B. Comisarow, A.G. Marshall, Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy, *Chemical Physics Letters*, (1974).
- [25] F. Lanucara, S.W. Holman, C.J. Gray, C.E. Eyers, The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics, 2014.

- [26] M. Scigelova, A. Makarov, Orbitrap mass analyzer - Overview and applications in proteomics.
- [27] A. Kiss, D.F. Smith, J.H. Jungmann, R.M.A. Heeren, Cluster secondary ion mass spectrometry microscope mode mass spectrometry imaging, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, (2013).
- [28] R.J. Cotter, *Lasers and Mass Spectrometry*, Analytical Chemistry, (1984).
- [29] M.R. Chevrier, R.J. Cotter, P. Roepstorff, A matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometer based on a 600ps, 1.2 mJ nitrogen laser, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, (1991).
- [30] K. Dreisewerd, M. Schürenberg, M. Karas, F. Hillenkamp, Matrix-assisted laser desorption/ionization with nitrogen lasers of different pulse widths, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, (1996).
- [31] R.E. Johnson, Models for matrix-assisted desorption by a laser-pulse, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, (1994).
- [32] S.P. Liang, I.C. Lu, S.T. Tsai, J.L. Chen, Y.T. Lee, C.K. Ni, Laser Pulse Width Dependence and Ionization Mechanism of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, (2017).
- [33] R. Zenobi, R. Knochenmuss, Ion formation in MALDI mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews*, (1998).
- [34] K. Dreisewerd, M. Schürenberg, M. Karas, F. Hillenkamp, Influence of the laser intensity and spot size on the desorption of molecules and ions in matrix-assisted laser desorption/ionization with a uniform beam profile, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 141 (1995) 127-148.
- [35] M. Niehaus, J. Soltwisch, New insights into mechanisms of material ejection in MALDI mass spectrometry for a wide range of spot sizes /639/638/11/296 /639/766/930/296 article, *Scientific Reports*, 8 (2018) 1-10.
- [36] H. Qiao, V. Spicer, W. Ens, The effect of laser profile, fluence, and spot size on sensitivity in orthogonal-injection matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, (2008).
- [37] M. Wiegelmann, K. Dreisewerd, J. Soltwisch, Influence of the Laser Spot Size, Focal Beam Profile, and Tissue Type on the Lipid Signals Obtained by MALDI-MS Imaging in Oversampling Mode, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 27 (2016) 1952-1964.

- [38] A. Holle, A. Haase, M. Kayser, J. Höhdorf, Optimizing UV laser focus profiles for improved MALDI performance, 2006.
- [39] A. Maimó-Barceló, J. Garate, J. Bestard-Escalas, R. Fernández, L. Berthold, D.H. Lopez, J.A. Fernández, G. Barceló-Coblign, Confirmation of sub-cellular resolution using oversampling imaging mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (2019).
- [40] A. Zavalin, J. Yang, R. Caprioli, Laser beam filtration for high spatial resolution MALDI imaging mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, (2013).
- [41] K. Dreisewerd, *The desorption process in MALDI*, 2003.
- [42] M. Handschuh, S. Nettesheim, R. Zenobi, Laser-induced molecular desorption and particle ejection from organic films, *Applied Surface Science*, (1999).
- [43] L.V. Zhigilei, P.B.S. Kodali, B.J. Garrison, Molecular dynamics model for laser ablation and desorption of organic solids, *Journal of Physical Chemistry B*, (1997).
- [44] L.V. Zhigilei, E. Leveugle, B.J. Garrison, Y.G. Yingling, M.I. Zeifman, *Computer simulations of laser ablation of molecular substrates*, 2003.
- [45] R. Knochenmuss, Ion formation mechanisms in UV-MALDI, *Analyst*, 131 (2006) 966-986.
- [46] M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules, *Analytical Chemistry*, 57 (1985) 2935-2939.
- [47] R.C. Beavis, B.T. Chait, H.M. Fales, Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, (1989).
- [48] K.J. Wu, A. Steding, C.H. Becker, Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry of oligonucleotides using 3-hydroxypicolinic acid as an ultraviolet-sensitive matrix, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 7 (1993) 142-146.
- [49] S. Berkenkamp, F. Kirpekar, F. Hillenkamp, Infrared MALDI mass spectrometry of large nucleic acids, *Science*, 281 (1998) 260-262.
- [50] K. Strupat, M. Karas, F. Hillenkamp, 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 111 (1991) 89-102.

- [51] R.C. Beavis, T. Chaudhary, B.T. Chait, α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry, *Organic Mass Spectrometry*, (1992).
- [52] T.W. Jaskolla, D.G. Papatiriu, M. Karas, Comparison between the matrices α -cyano-4-hydroxycinnamic acid and 4-chloro- α -cyanocinnamic acid for trypsin, chymotrypsin, and pepsin digestions by MALDI-TOF mass spectrometry, *Journal of Proteome Research*, (2009).
- [53] M.C. Fitzgerald, G.R. Parr, L.M. Smith, Basic Matrices for the Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Proteins and Oligonucleotides, *Analytical Chemistry*, 65 (1993) 3204-3211.
- [54] V. Horneffer, K. Dreisewerd, H.C. Lüdemann, F. Hillenkamp, M. Läge, K. Strupat, Is the incorporation of analytes into matrix crystals a prerequisite for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry? A study of five positional isomers of dihydroxybenzoic acid, *International Journal of Mass Spectrometry*, (1999).
- [55] V. Horneffer, A. Forsmann, K. Strupat, F. Hillenkamp, U. Kubitscheck, Localization of analyte molecules in MALDI preparations by confocal laser scanning microscopy, *Analytical Chemistry*, 73 (2001) 1016-1022.
- [56] M. Korsgen, A. Pelster, K. Dreisewerd, H.F. Arlinghaus, 3D ToF-SIMS Analysis of Peptide Incorporation into MALDI Matrix Crystals with Sub-micrometer Resolution, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, (2016).
- [57] K. Strupat, J. Kampmeier, V. Horneffer, Investigations of 2,5-DHB and succinic acid as matrices for UV and IR MALDI. Part II: Crystallographic and mass spectrometric analysis, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, (1997).
- [58] D.W. Armstrong, L.K. Zhang, L. He, M.L. Gross, Ionic liquids as matrixes for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 73 (2001) 3679-3686.
- [59] J.A. Crank, D.W. Armstrong, Towards a Second Generation of Ionic Liquid Matrices (ILMs) for MALDI-MS of Peptides, Proteins, and Carbohydrates, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, (2009).
- [60] Z.Q. Tan, J.F. Liu, L. Pang, Advances in analytical chemistry using the unique properties of ionic liquids, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 39 (2012) 218-227.

- [61] C.Y. Shi, C.H. Deng, Recent advances in inorganic materials for LDI-MS analysis of small molecules, 2016.
- [62] W.E. Wallace, M.A. Arnould, R. Knochenmuss, 2,5-Dihydroxybenzoic acid: Laser desorption/ionisation as a function of elevated temperature, *International Journal of Mass Spectrometry*, 242 (2005) 13-22.
- [63] L.J. Castellanos-García, B.C. Agudelo, H.F. Rosales, M. Cely, C. Ochoa-Puentes, C. Blanco-Tirado, C.A. Sierra, M.Y. Combariza, Oligo p-Phenylenevinylene Derivatives as Electron Transfer Matrices for UV-MALDI, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 28 (2017) 2548-2560.
- [64] M. Nazim Boutaghou, R.B. Cole, 9,10-Diphenylanthracene as a matrix for MALDI-MS electron transfer secondary reactions, *Journal of Mass Spectrometry*, (2012).
- [65] A.V. Streletskii, I.N. Ioffe, S.G. Kotsiris, M.P. Barrow, T. Drewello, S.H. Strauss, O.V. Boltalina, In-Plume Thermodynamics of the MALDI Generation of Fluorofullerene Anions, *The Journal of Physical Chemistry A*, (2005).
- [66] Y.V. Vasil'ev, O.G. Khvostenko, A.V. Streletskii, O.V. Boltalina, S.G. Kotsiris, T. Drewello, Electron transfer reactivity in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI): Ionization energy, electron affinity and performance of the DCTB matrix within the thermochemical framework, *Journal of Physical Chemistry A*, 110 (2006) 5967-5972.
- [67] V. Karbach, R. Knochenmuss, Do single matrix molecules generate primary ions in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 12 (1998) 968-974.
- [68] G.R. Kinsel, R. Knochenmuss, P. Setz, C.M. Land, S.K. Goh, E.F. Archibong, J.H. Hardesty, D.S. Marynick, Ionization energy reductions in small 2,5-dihydroxybenzoic acid-proline clusters, *Journal of Mass Spectrometry*, 37 (2002) 1131-1140.
- [69] D.A. Allwood, P.E. Dyer, R.W. Dreyfus, Ionization modelling of matrix molecules in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11 (1997) 499-503.
- [70] P.C.C. Liao, J. Allison, Ionization processes in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Matrix-dependent formation of $[M + H]^+$ vs $[M + Na]^+$ ions of small peptides and some mechanistic comments, *Journal of Mass Spectrometry*, 30 (1995) 408-423.
- [71] H. Ehring, M. Karas, F. Hillenkamp, Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser

- desorption ionization mass spectrometry, *Organic Mass Spectrometry*, 27 (1992) 472-480.
- [72] R. Knochenmuss, Photoionization pathways and free electrons in UV-MALDI, *Analytical Chemistry*, (2004).
- [73] R. Knochenmuss, A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization, *Journal of Mass Spectrometry*, (2002).
- [74] R. Knochenmuss, A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization including analyte ion generation, *Analytical Chemistry*, (2003).
- [75] R. Knochenmuss, A bipolar rate equation model of MALDI primary and secondary ionization processes, with application to positive/negative analyte ion ratios and suppression effects, *International Journal of Mass Spectrometry*, (2009).
- [76] P.D. Setz, R. Knochenmuss, Exciton mobility and trapping in a MALDI matrix, *Journal of Physical Chemistry A*, (2005).
- [77] H.C. Lüdemann, R.W. Redmond, F. Hillenkamp, Singlet-singlet annihilation in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization studied by fluorescence spectroscopy, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, (2002).
- [78] E. Lehmann, R. Knochenmuss, R. Zenobi, Ionization mechanisms in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Contribution of pre-formed ions, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, (1997).
- [79] P.C.C. Liao, J. Allison, Enhanced detection of peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry through the use of charge-localized derivatives, 1995.
- [80] B. Salih, C. Masselon, R. Zenobi, Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of noncovalent protein-transition metal ion complexes, *Journal of Mass Spectrometry*, 33 (1998) 994-1002.
- [81] R. Krüger, A. Pfenninger, I. Fournier, M. Glückmann, M. Karas, Analyte incorporation and ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization visualized by pH indicator molecular probes, *Analytical Chemistry*, (2001).
- [82] T.W. Jaskolla, M. Karas, Compelling evidence for lucky survivor and gas phase protonation: The unified MALDI analyte protonation mechanism, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 22 (2011) 976-988.

- [83] M. Karas, M. Glückmann, J. Schäfer, Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: Singly charged molecular ions are the lucky survivors, *Journal of Mass Spectrometry*, 35 (2000) 1-12.
- [84] M. Karas, R. Krüger, Ion formation in MALDI: The cluster ionization mechanism, 2003.
- [85] A.N. Krutchinsky, B.T. Chait, On the nature of the chemical noise in MALDI mass spectra, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, (2002).
- [86] X. Chen, J.A. Carroll, R.C. Beavis, Near-ultraviolet-induced matrix-assisted laser desorption/ionization as a function of wavelength, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, (1998).
- [87] S. Niu, W. Zhang, B.T. Chait, Direct comparison of infrared and ultraviolet wavelength matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, (1998).
- [88] Y.J. Bae, M.S. Kim, A Thermal Mechanism of Ion Formation in MALDI, *Annual Review of Analytical Chemistry*, 8 (2015) 41-60.
- [89] I.C. Lu, C. Lee, Y.-T. Lee, C.-K. Ni, Ionization Mechanism of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, *Annual Review of Analytical Chemistry*, (2015).
- [90] J.F. Ireland, P.A.H. Wyatt, Acid-Base Properties of Electronically Excited States of Organic Molecules, *Advances in Physical Organic Chemistry*, (1976).
- [91] K. Breuker, R. Knochenmuss, J. Zhang, A. Stortelder, R. Zenobi, Thermodynamic control of final ion distributions in MALDI: In-plume proton transfer reactions, *International Journal of Mass Spectrometry*, 226 (2003) 211-222.
- [92] R.D. Burton, C.H. Watson, J.R. Eyler, G.L. Lang, D.H. Powell, M.Y. Avery, Proton Affinities of Eight Matrices Used for Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11 (1997) 443-446.
- [93] A.G. Harrison, The gas-phase basicities and proton affinities of amino acids and peptides, *Mass Spectrometry Reviews*, 16 (1997) 201-217.
- [94] T.J.D. Jørgensen, G. Bojesen, H. Rahbek-Nielsen, The proton affinities of seven matrix-assisted laser desorption/ionization matrices correlated with the formation of multiply charged ions, *European Journal of Mass Spectrometry*, 4 (1998) 39-45.
- [95] S. Hoyau, K. Norrman, T.B. McMahon, G. Ohanessian, A quantitative basis for a scale of Na⁺ affinities of organic and small biological molecules in the gas phase, *Journal of the American Chemical Society*, (1999).
- [96] J.S. Klassen, S.G. Anderson, A.T. Blades, P. Kebarle, Reaction enthalpies for M+L = M⁺ + L, where M⁺ = Na⁺ and K⁺ and L = acetamide, N-methylacetamide, N,N-dimethylacetamide, glycine, and glycyglycine, from determinations of the collision-induced dissociation thresholds, *Journal of Physical Chemistry*, 100 (1996) 14218-14227.

- [97] S.F. Macha, T.D. McCarley, P.A. Limbach, Influence of ionization energy on charge-transfer ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, (1999).
- [98] W.J. Erb, S.D. Hanton, K.G. Owens, A study of gas-phase cationization in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, (2006).
- [99] R. Knochenmuss, E. Lehmann, R. Zenobi, Polymer cationization in matrix-assisted laser desorption/ionization, *European Journal of Mass Spectrometry*, 4 (1998) 421-427.
- [100] M.F. Mirabelli, R. Zenobi, Observing Proton Transfer Reactions Inside the MALDI Plume: Experimental and Theoretical Insight into MALDI Gas-Phase Reactions, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, (2017).
- [101] R. Knochenmuss, F. Dubois, M.J. Dale, R. Zenobi, The matrix suppression effect and ionization mechanisms in matrix-assisted laser desorption/ionization, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, (1996).
- [102] R. Knochenmuss, A. Stortelder, K. Breuker, R. Zenobi, Secondary ion-molecule reactions in matrix-assisted laser desorption/ionization, *Journal of Mass Spectrometry*, (2000).
- [103] C.T.J. Scott, C. Kosmidis, W.J. Jia, K.W.D. Ledingham, R.P. Singhal, Formation of atomic hydrogen in matrix-assisted laser desorption ionization, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, (1994).
- [104] S.P. Mirza, N.P. Raju, M. Vairamani, Estimation of the proton affinity values of fifteen matrix-assisted laser desorption/ionization matrices under electrospray ionization conditions using the kinetic method, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15 (2004) 431-435.
- [105] R.J.J.M. Steenvoorden, K. Breuker, R. Zenobi, The gas-phase basicities of matrix-assisted laser desorption/ionization matrices, 1997, pp. 339-346.
- [106] G.R. Kinsel, Y. Daqing, F.H. Yassin, D.S. Marynick, Equilibrium conditions in laser-desorbed plumes: Thermodynamic properties of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid and protonation of amino acids, *European Journal of Mass Spectrometry*, 12 (2006) 359-367.
- [107] M. Mormann, S. Bashir, P.J. Derrick, D. Kuck, Gas-phase basicities of the isomeric dihydroxybenzoic acids and gas-phase acidities of their radical cations, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11 (2000) 544-552.
- [108] F.H. Yassin, D.S. Marynick, Computational estimates of the gas-phase basicities, proton affinities and ionization potentials of the six isomers of dihydroxybenzoic acid, *Molecular Physics*, 103 (2005) 183-189.
- [109] E.P.L. Hunter, S.G. Lias, Evaluate Gas Phase Basicities and Proton Affinity of Molecules.Pdf, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 27 (1998) 413-656.

- [110] V. Frankevich, R. Knochenmuss, R. Zenobi, The origin of electrons in MALDI and their use for sympathetic cooling of negative ions in FTICR, *International Journal of Mass Spectrometry*, (2002).
- [111] S. Motomizu, M. Sanada, Photo-induced reduction of nitrate to nitrite and its application to the sensitive determination of nitrate in natural waters, *Analytica Chimica Acta*, (1995).
- [112] A.J. Hotelling, W.F. Nichols, D.J. Giesen, J.R. Lenhard, R. Knochenmuss, Electron transfer reactions in laser desorption/ionization and matrix-assisted laser desorption/ionization: Factors influencing matrix and analyte ion intensities, *European Journal of Mass Spectrometry*, 12 (2006) 345-358.
- [113] S. Bourcier, Y. Hoppilliard, B3LYP DFT molecular orbital approach, an efficient method to evaluate the thermochemical properties of MALDI matrices, *International Journal of Mass Spectrometry*, 217 (2002) 231-244.
- [114] J.A. Dean, *Lange's Handbook of Chemistry*, Fifteenth Edition, 1999.
- [115] I.C. Lu, K.Y. Chu, C.Y. Lin, S.Y. Wu, Y.A. Dyakov, J.L. Chen, A. Gray-Weale, Y.T. Lee, C.K. Ni, Ion-to-neutral ratios and thermal proton transfer in matrix-assisted laser desorption/ionization, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 26 (2015) 1242-1251.
- [116] J. Obirai, N.P. Rodrigues, F. Bedioui, T. Nyokong, Synthesis, spectral and electrochemical properties of a new family of pyrrole substituted cobalt, iron, manganese, nickel and zinc phthalocyanine complexes, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, (2003).
- [117] A. Yavuz, B. Bezgin Çarbaş, L. Aras, A.M. Önal, Electropolymerization of a new 4-(2,5-Di-2-thiophen-2-yl-pyrrol-1-yl)-tetra substituted nickel phthalocyanine derivative, *Journal of Applied Polymer Science*, (2011).
- [118] T. Schlöder, M. Kaupp, S. Riedel, Can zinc really exist in its oxidation state +III?, *Journal of the American Chemical Society*, (2012).

