

LDI-MS ANALİZLERİ İÇİN ETKİN VE SEÇİCİ YENİ HEDEF YÜZEYLERİN GELİŞTİRİLMESİ

DEVELOPMENT OF NOVEL TARGET SURFACES FOR EFFECTIVE AND SELECTIVE ANALYSIS IN LDI-MS APPLICATIONS

GÜLGÜN AYLAZ

Doç. Dr. MEMED DUMAN

Tez Danışmanı

Doç. Dr. ÖMÜR ÇELİKBIÇAK

Eş Danışman

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2016

Canum Aileme

ÖZET

LDI-MS ANALİZLERİ İÇİN ETKİN VE SEÇİCİ YENİ HEDEF YÜZEYLERİN GELİŞTİRİLMESİ

GÜLGÜN AYLAZ

Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp ABD

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Memed DUMAN

Eş Danışman: Doç. Dr. Ömür ÇELİKBIÇAK

Aralık 2016, 101 sayfa

Kütle spektrometrisi (Mass Spectrometry, MS), analiz edilen numune içerisinde yer alan bileşenleri iyonlaştırarak pozitif veya negatif yüklü atom ya da moleküller haline getirdikten sonra bu bileşenlerin kütle/yük oranlarına göre tayin edilmelerini sağlayan oldukça güçlü bir tekniktir. Yapısı belli olmayan ya da miktarı az olan örneklerin Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırılmalı-Kütle Spektrometrisi (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, MALDI-MS) ile analizlerinden önce zenginleştirme çalışmaları kütle spektrometresi için en önemli ve hassas işlem olan numune hazırlama basamağının temelini oluşturmaktadır. Bu doğrultuda tez kapsamında analit molekülünü zenginleştirilerek MALDI-MS analizlerini kolaylaştıracak bir numune platformu geliştirmek amaçlanmıştır. Zenginleştirme materyali olarak miniemülsiyon polimerleşme yöntemiyle hazırlanmış hedef molekül olan siprofloksasin (Ciprofloxacin, CPX) baskılanmış polimerik nanopartiküller sentezlenmiştir. Sentezlenen baskılanmış polimerik nanopartiküller Taramalı Elektron Mikroskopu (Scanning Electron Microscopy, SEM) ile karakterize edilerek boyutlarının yaklaşık 160 nm olduğu görülmüştür. Ayrıca bu nanopartiküller kimyasal yapılarının anlaşılabilmesi için Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) ile karakterize edilmişlerdir. MALDI-MS uygulamalarında numune platformu olarak kullanılmak üzere Poli-L-Laktik Asit (PLLA) bazlı elektroçekim yöntemi ile nanolifler ve çözücü uzaklaştırma yöntemi ile film yüzeyler hazırlanmıştır. Tez çalışmasında kullanılan analit molekülünün MALDI-MS uygulamalarında geliştirilen çeşitli özelliklerdeki örnek tutucu platformlar üzerinde analizleri yapılmıştır. Örnek tutucunun yüzey özellikleri, yapısında MALDI matriksi

olan 2,5 Dihidroksibenzoik asidin (DHB) bulunup bulunmaması ve analit molekülünü zenginleştirmek için Moleküler Baskılanmış Polimerler (MBP'ler) kullanılıp kullanılmaması durumuna göre siprofloksasine ait bağıl kütleli şiddetin miktarının değişimi gösterilmiştir. PLLA filmler üzerinde CPX analiz edildiği zaman S/N değeri 1289.6 olarak hesaplanmıştır. Aynı film yüzey MBP'ler ile modifiye edilince bu değer 3926.1 olmaktadır. Yapısında DHB matriks bulunan PLLA film yüzeyinde siprofloksasin analizi yapıldığında ise S/N değerinin 2847 olduğu görülmüştür. Yani PLLA film yapısında DHB kullanımı ile kütleli şiddet değerini 2 katına çıkarmak mümkünken PLLA film yüzey üzerinde MBP kullanılarak siprofloksasinin bağıl kütleli şiddetini 3 katından fazlasına çıkarmak mümkündür. Bu sonuç bize MALDI-MS'de zenginleştirme ve seçici biçimde ayırma yapan MBP'ler kullanıldığı zaman analitin bağıl kütleli şiddet değerinin geleneksel matriks uygulamalarına göre yüksek olduğunu göstermiştir. Tez çalışması kapsamında kütle spektrometresi analizlerinde ilk kez kullanılan PLLA bazlı nanolif ve film örnek platformlarının geliştirilmesi ileride bu alanda yapılacak olan birçok çalışmaya ışık tutacak niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Elektroçekim, MALDI-MS, Moleküler Baskılanmış Polimer, Nanolif, PLLA, Polimerik Film, Siprofloksasin.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF NOVEL TARGET SURFACES FOR EFFECTIVE AND SELECTIVE ANALYSIS IN LDI-MS APPLICATIONS

GÜLGÜN AYLAZ

Master, Nanotechnology and Nanomedicine Division

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Dr. Memed DUMAN

Co-Advisor: Assoc. Prof. Dr. Ömür ÇELİKBIÇAK

December 2016, 101 pages

Mass spectrometry (MS) is a very important technique that allows components in the sample to be analysed. When the sample is ionized to form positive or negative charged atoms or molecules, their mass/charge ratio can be determined. Prior to analysis of samples with unspecified or under-defined structures by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS), enrichment studies have been the most important and sensitive process for the sample preparation step of mass spectrometry. In this thesis, it was aimed to develop a sample platform which will facilitate the MALDI-MS analyses by enriching the analyte molecule. Ciprofloxacin (CPX) imprinted polymeric nanoparticles (MIP) were prepared with the miniemulsion polymerization method and used as the enrichment material. The synthesized polymeric nanoparticles were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM) and their sizes were found to be about 160 nm. In addition, these nanoparticles were characterized with Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) to understand their chemical structures. Film surfaces were prepared using Poly-L-Lactic Acid (PLLA) based electrospinning method and solvent removal method and served as sample platforms in MALDI-MS applications. Analytical molecules used in this thesis study were analysed on several specimen-holding platforms developed in MALDI-MS applications. The surface properties of the sample holder showed that the presence of 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) and the MIPs enriched the analyte molecule. When CPX is analysed on PLLA films, the S/N value was calculated as 1289.6. When the same film surface was modified with MIPs, this value was increased to 3926.1.

When ciprofloxacin was analysed on the surface of PLLA film with the DHB matrix in the structure, the S/N value was found to be 2847. Therefore, conclusion was made that it is possible to increase the mass intensity value 2 times by using DHB in the PLLA film structure. Moreover, it is possible to increase the relative mass intensity of ciprofloxacin more than 3 times by using MIP on PLLA film surface. This result showed us that the relative massive value of analytes is higher than the conventional matrix applications when MIPs were employed. The development of the PLLA based nanofiber and film sample platforms were used in the mass spectrometry analyses for the first time within the scope of the thesis work will shed light on many studies to be made in this area in the future.

Keywords: Ciprofloxacin, Electrospinning, MALDI-MS, Molecularly Imprinted Polymer, Nanofiber, PLLA, Polymeric Film.

TEŞEKKÜR

Akademik donanımı, bilgi birikimi ve ahlaki yönüyle yüksek lisans eğitimim boyunca bana ışık tutan, sabrını ve hoşgörüsünü benden ve diğer tüm öğrencilerinden esirgemeyen sadece bilimsel alanda değil her alanda görüş ve tecrübelerine başvurduğum yanında çalışmaktan gurur ve onur duyduğum değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Memed DUMAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve tecrübeleri ile ihtiyaç duyduğum her an yanımda olup benden yardım ve desteğini esirgemeyen ahlaki ve insani yönüyle yol gösterici olan daima motive edici şekilde yardımcı olan kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Ömür Çelikkıçak'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımda kullandığım materyallerden bir kısmını laboratuvarında hazırlama imkânı veren her zaman hem bilimsel anlamda hem de manevi anlamda benden desteklerini esirgemeyen kıymetli hocam sayın Doç. Dr. Halil Murat AYDIN'a, hazırladığım materyallerin SEM görüntülerini alırken yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Evren Çubukçu'ya çok teşekkür ederim. Tezimde kullandığım Moleküler Baskılanmış Polimerlerin hazırlanmasında bana yol gösterici olan sayın hocam Doç. Dr. Müge Andaç Özdil'e çok teşekkür ederim.

Tanıştığım günden itibaren her konuda benden desteğini esirgemeyen hem özel hayatımda hem de okul hayatımda çok önemli bir yere sahip olan kıymetli çalışma arkadaşım Meltem Okan'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında bana hem deneysel açıdan büyük yardımları olan hem de çok iyi bir arkadaş olarak manevi desteğini hissettiğim Atakan Tevlek'e teşekkür ederim.

Tezimde kullandığım moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanması konusunda destek olan Esmâ Sari'ye teşekkür ederim. Aynı laboratuvarı paylaştığım birlikte çalışmaktan keyif aldığım kıymetli arkadaşlarım İpek Akyılmaz, Selim Sülek, Uğur Aydın, Soheil Malekghasemi, Pelin Tan'a ve benden yardımlarını esirgemeyen Abdurraheem Alya ve Muhannad Almemar'a çok teşekkür ederim.

Hayatta attığım her adımda bana destek olan ve inanıp güvenen, daima bana yol gösterici olan eğitimim ve mutluluğum için her türlü fedakârlıkta bulunan ailem olmalarından dolayı daima çok büyük onur ve gurur duyduğum, hayatta her şeyden çok değer verdiğim canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

Tez konumu yenilikçi ve güncel bulan TÜBİTAK'a 2210-C Yüksek Lisans Öncelikli Alanlar Bursu verdiği için teşekkür ederim.

Tez çalışmasında kullanılan MBP'lerin sentezinde kullanılan malzemeler için 113Z222 kodlu TÜBİTAK Projesi tarafından maddi destek sağlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

1.	GİRİŞ.....	1
2.	LİTERATÜR ÖZETİ VE UYGULAMALAR	3
2.1.	Kütle Spektrometrisi ve Uygulama Alanları.....	3
2.1.1.	Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaşmalı Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) ve Uygulama Alanları	10
2.2.	Moleküler Baskılanmış Polimerler (MBP) ve Kullanım Alanları	17
2.3.	MBP'lerin MALDI-MS Uygulamalarında Kullanımları.....	23
2.4.	Elektroçekim Yöntemi ile Lif Üretimi ve Liflerin Kullanım Alanları	26
2.5.	Çözücü Uzaklaştırma (Solvent Casting) Yöntemi ile Polimerik Film Üretimi ve Kullanım Alanları	29
2.6.	MALDI-MS'de Numune Platformu Olarak Polimerik Film ve Nanolif Kullanımı	31
3.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR	35
3.1.	Kullanılan Malzemeler.....	35
3.2.	CPX'e Özgü Baskılanmış Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	35
3.3.	PLLA Kullanarak Elektroçekim Yöntemi ile Nanoliflerin Üretimi ve Karakterizasyonları	37
3.4.	Çözücü Uzaklaştırma Yöntemi ile PLLA Polimerik Filmlerin Üretimi ve Karakterizasyonları	40
3.4.1.	Çözücü Uzaklaştırma Yöntemi ile PLLA Filmlerin Sentezi.....	40
3.4.2.	Çözücü Uzaklaştırma Yöntemi ile Yapısında DHB Bulunan PLLA Filmlerin Sentezi.....	41
3.5.1.	MALDI-MS Numunelerin Hazırlanması.....	41
4.	BULGULAR VE TARTIŞMALAR.....	45
4.1.	Cpx'e Özgü Baskılanmış Polimerik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	45
4.2.	Elektroçekim Yöntemi ile Üretilen PLLA Nanoliflerin Karakterizasyonu	47
4.2.1.	PLLA Kullanılarak Elektroçekim Yöntemi ile Üretilen Nanoliflerin Karakterizasyonu.....	47
4.2.2.	Yapısında DHB bulunan Elektroçekim Yöntemi ile Üretilmiş PLLA Nanolifler	49

4.2.3. Yapısında CPX'e Özgü MBP'ler Bulunan PLLA Elektroçekim Nanoliflerin Karakterizasyonu.....	50
4.3. Çözücü Uzaklaştırma Yöntemi ile Elde Edilen PLLA Filmlerin Karakterizasyonu	56
4.4. PLLA Kullanılarak Üretilen Film ve Fiberlerin MALDI-MS Analizlerinde CPX Tespitinde Kullanımları	62
4.4.1. PLLA Nanoliflerin Üzerindeki CPX moleküllerinin MALDI-MS ile Analizi.....	62
4.4.2. PLLA Filmler Üzerindeki CPX Moleküllerinin MALDI-MS ile Analizleri	66
5. SONUÇLAR.....	71
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	92

ŞEKİLLER TABLOSU

Şekil 1. Kütle Spektrometresinin temel bileşenleri ve çeşitleri.....	4
Şekil 2. MALDI Plakası Üzerinde Numunenin İyonlaşmasına Ait Gösterim ..	7
Şekil 3. TOF Sisteminin Gösterimi	9
Şekil 4. MALDI-MS cihazının şematik gösterimi.....	11
Şekil 5. MALDI’de iyonlaşma işleminin şematik gösterimi	12
Şekil 6. MBP’lerin şematik gösterimi.....	19
Şekil 7. Elektroçekim Yönteminin Şematik Gösterimi	27
Şekil 8. Çözücü uzaklaştırma yöntemi ile film üretimi şematik gösterimi .	29
Şekil 9. CPX molekülünün MBP’lere bağlanması ve koparılmasının şematik gösterimi	37
Şekil 10. Nanoliflerin Üretildiği Elektroçekim Sistemi	38
Şekil 11. CPX baskılanmış Polimerik Nanopartiküllerin SEM görüntüsü	45
Şekil 12. CPX baskılanmış polimerik Nanopartiküllerin FTIR Spektrumu .	46
Şekil 13. Toplayıcı Plaka Üzerine Kaplanmış Olan Alüminyum Folyo Üzerine Tam Toplanamamış PLLA Nanolifler.....	47
Şekil 14. PLLA Polimerinin Elektroçekim İşleminde Toplayıcı Plaka Üzerinde Homojen Olarak Dağılmamış Olan Nanolif.....	48
Şekil 15. Optimum Elektroçekim Parametreleri ile Üretilmiş PLLA Nanolif	49
Şekil 16. Yapısında DHB Bulunan Elektroçekim Yöntemi ile Üretilmiş PLLA Nanolifler.....	50
Şekil 17. PLLA Nanoliflerin SEM Görüntüsü (a), Üzerine CPX’e Özgü MBP İlave Edilmiş PLLA Nanoliflerin SEM Görüntüsü (b).....	52
Şekil 18. Yapısında DHB Bulunan PLLA Nanoliflere (a) ait SEM Görüntüsü, Üzerine CPX’e Özgü MBP Nanopartikül İlave Edilmiş Yapısında DHB Bulunan PLLA Nanoliflerin (b) SEM Görüntüsü.	53
Şekil 19. PLLA ile Üretilen Nanoliflerin (a) FTIR Spekturumu, Yapısında DHB Bulunan PLLA Nanoliflere (b) ait FTIR spektrumu.....	54
Şekil 20. Yapısında DHB Bulunmayan (a) ve Bulunan (b) PLLA Filmler	56
Şekil 21. PLLA Kullanılarak Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Elde Edilmiş Filmin SEM Görüntüsü	57
Şekil 22. PLLA Film Üzerindeki CPX’e Özgü MBP’lerin SEM Görüntüleri	58
Şekil 23. Yapısında DHB Bulunan PLLA Filme ait SEM Görüntüsü	58
Şekil 24. DHB’li PLLA film üzerindeki CPX’e özgü baskılanmış polimerik nanopartiküllerin SEM görüntüsü	59
Şekil 25. Çözücü Uzaklaştırma Yöntemi ile Üretilen PLLA Film (a) ve DHB Katkılı PLLA Film (b) FTIR Spektrumları	61
Şekil 26. PLLA Nanolifler Üzerindeki MBP bulunmadığı durumda (a) ve bulunduğu durumdaki (b) Kütle Spektrumları	64

Şekil 27. Yapısında DHB Bulunan PLLA Nanolifler Üzerinde MBP İlavesiz (a) ve İlaveli (b) Hazırlanan Numunelerdeki CPX Kütle Spektrumları	66
Şekil 28. (a) PLLA film üzerinde bulunan CPX'e ait kütle spektrumu ve (b) PLLA film üzerindeki MBP'ler ile zenginleştirilmiş CPX'in kütle spektrumu.	67
Şekil 29. Yapısında DHB Bulunan PLLA Film Yüzeyindeki yalnız CPX analizine ait (a) LDI-MS Spektrumu, Aynı Yüzey Üzerindeki MBP'lere Tutunmuş CPX'e ait (b) LDI-MS Spektrumu.	69

ÇİZELGELER TABLOSU

Çizelge 1. MALDI Matrikslerinin Kullanımları	13
Çizelge 2. MALDI-MS analizleri için hazırlanan numuneler	42

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

Simgeler

Da: Dalton

ppm: Konsantrasyon birimi (parts per million, milyarda bir) (mg/L)

μ : Mikro

S/N: Sinyal/Gürültü oranı (Signal/Noise)

Kısaltmalar

MALDI-MS: Matriks-yardımlı lazer desorpsiyon/iyonlaştırmalı-kütle spektrometrisi

DHB: 2,5 Dihidroksibenzoik asit

PLLA: Poli-L-Laktik Asit

CPX: Siprofloksasin

MBP: Moleküler Baskılanmış Polimer

SEM: Yüzey Elektron Mikroskopu

FTIR: Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre

MAA: Metakrilik Asit

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)

GC: Gaz Kromatografisi (Gas chromatography)

FAB: Hızlı Atom Bombardmanı (Fast Atom Bombardment)

TOF: Uçuş Zamanlı (Time of Flight)

CI: Kimyasal İyonlaştırma

EI: Elektron İyonlaştırma

1. GİRİŞ

Kütle spektrometrisi (Mass Spectrometry, MS), analiz edilen numuneyi iyonlaştırarak pozitif veya negatif yüklü atom ya da moleküller haline getirip numune bileşimindeki maddeleri kütle/yük miktarına göre tayin edilmelerini sağlayan güçlü bir tekniktir. Matriks-yardımlı lazer desorpsiyon/iyonlaştırılmalı-kütle spektrometrisi (Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization, MALDI-MS) biyomoleküllerin (protein, peptit, oligonükleotitler gibi) ve diğer büyük moleküllerin (sentetik polimerler, dendrimerler ve büyük organik kompleksler gibi) tayinlerinde kullanılan kütle spektrometrik tekniklerden birisidir. MALDI-MS'de başarılı bir analiz için numunedeki analitin birim hacimdeki miktarı yeterli olmalıdır. Bu yüzden tayin edilecek molekülün ya zenginleştirilip analizi yapılmalı ya da analite uygun bir MALDI matriksi kullanılmalıdır. Matriks ve analit karıştırma oranının tam olarak belirlenmesi zaman alıcı olmasının ve beceri gerektirmesinin yanı sıra istenmeyen birçok olumsuz duruma sebep olabilmektedir. MALDI-MS'de örnek hazırlama aşamasının mümkün olduğu kadar kısa, kolay ve etkili olabilmesi için yeni platformlar geliştirilmesi tez kapsamında amaçlanmıştır. Ayrıca başka maddelerin varlığında zor gözlenen ya da hiç gözlenemeyen türler için zenginleştirme çalışmaları yapılarak sadece ilgili moleküllerin MALDI-MS'de gözlenmesini sağlamak tezin diğer bir amacıdır. Son yıllarda analit moleküllerine yüksek bağlanma eğiliminde olmaları, yüksek seçicilikle ayırma sağlamaları, uzun raf ömürleri sayesinde zenginleştirme, ayırma, saflaştırma çalışmalarında sıklıkla Moleküler Baskılanmış Polimerler (MBP) kullanılmaktadır. MBP'ler sahip oldukları analit molekülüne özgü kaviteler sayesinde kalıp molekülü seçici olarak ayırma özelliğine sahiptirler. Tez çalışmasında siprofloksasin antibiyotiği kalıp molekül olarak seçilmiş ve buna özgü baskılanmış polimerik nanopartiküller mini emülsiyon polimerizasyon yöntemi ile

sentezlenmiştir. MALDI analizleri için üzerine MBP'lerin tutturulacağı farklı özelliklerde polimerik lif ve film örnek platformları hazırlanmıştır. Bu doğrultuda, elektroçekim yöntemi ile kolay, ucuz ve hızlı üretilebilen Poli-L-Laktik Asit (PLLA) bazlı nanometre boyutlarında çapa sahip lifler ve çözücü uzaklaştırma yöntemiyle de film yüzeyler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu nanolif ve filmlerden bir kısmı sadece PLLA kullanılarak hazırlanırken diğerlerinin yapısında PLLA ve MALDI matriksi olan 2,5 Dihidroksibenzoik asit (DHB) kullanılmıştır. Örnek platformlarının yapısına DHB ilave edilmesi ile kütle spektrometrisi analiz sonuçlarının değişimi incelenmiştir.

Yapısında DHB bulunan ve bulunmayan PLLA lif ve film yüzeyler üzerine MBP'ler tutturularak siprofloksasin molekülleri zenginleştirilmiş ve MALDI-MS'de analiz edilmişlerdir. Elde edilen kütle spektrometrisi sonuçları birbirleri ile karşılaştırılmışlardır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ VE UYGULAMALAR

2.1. Kütle Spektrometrisi ve Uygulama Alanları

Geleneksel spektroskopik analizlerde numunede bulunan atom ya da moleküller üzerine elektromanyetik ışın düştüğü zaman atom ya da moleküllerin bu ışını absorplaması veya saçması ölçülmektedir. Kütle spektrometresinde ise analiz edilecek numune cihaz içerisinde yüklü gaz hale dönüştürülür ve iyonlaşma ile gaz haline geçmiş olan iyonlar kütle/yük (Mass Number/Charge, m/z) oranlarına göre ayrılmaktadır. Kütle spektrometrisinde hem kalitatif hem de kantitatif analiz yapılabilmektedir. Elde edilen kütle/yük oranındaki değerlerden m , yüklü taneciğin kütlesini z ise iyonun yükünü ifade etmektedir. Kütle spektrumu gaz halindeki m/z oranlarının sıralanması ile elde edilmektedir.

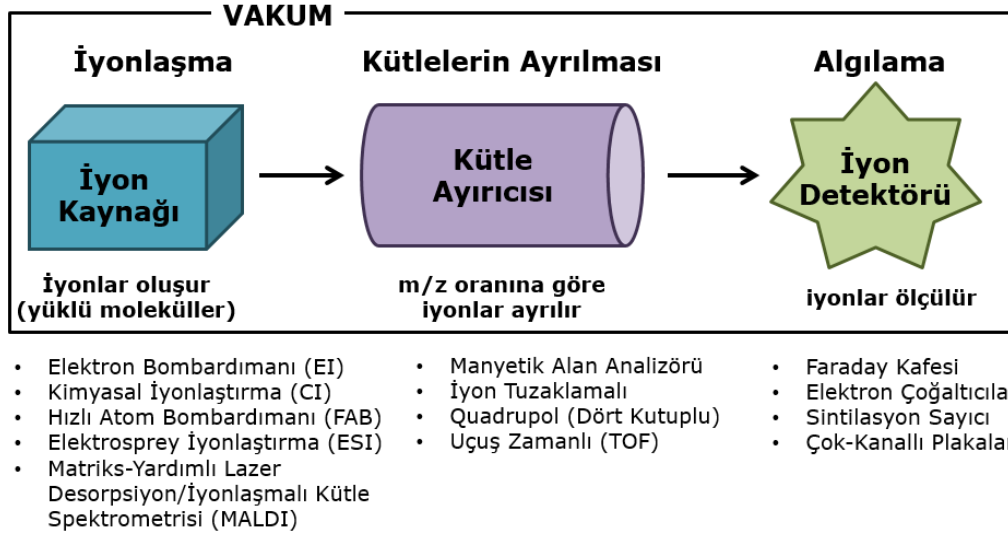
Kütle spektrometresinin genel kullanım alanları;

- Elementel bileşim tespiti
- Biyolojik, organik ve inorganik materyallerde yapıların belirlenmesi
- Çoklu bileşen içeren numunelerde kalitatif ve kantitatif analiz yapma
- Bilinmeyen katı maddede yüzey yapı ve bileşenlerin tespiti
- Proteomik ve diğer yaşam bilimleri çalışmaları
- Çevre ve jeolojik çalışmalar
- İlaç araştırmaları ve klinik testler

şeklinde sıralanmaktadır [1].

Tüm kütle spektrometreler iyon kaynağı, kütle analizörü ve detektör kısımlarından oluşmaktadır (Şekil 1). Bu kısımlar kütle spektrometresinin türüne, elde edilecek verilerin niteliğine ve numunenin fiziksel özelliklerine bağlı olarak değişebilmektedir. Örnek sıvı, gaz ya da kurutulmuş (katı) halde kütle spektrometresine verildikten sonra iyon kaynağı sayesinde gaz fazında iyonlar haline getirilir. Bu iyonlar sahip oldukları yük sayesinde elektriksel alan yardımıyla sistem boyunca hızlandırılarak ilerlerler. Kütle

analizöründe bir elektrik ya da manyetik alan ile karşılaşan iyonlar kendi m/z oranlarına göre yön değiştirirler. Kütle ayırıcısı olarak genellikle uçuş zamanlı (Time of Flight, TOF), orbitrap, kuadrupol ve iyon kapanı gibi sistemler kullanılmaktadır. Kütle analizöründen geçen iyonlar detektöre çarpana kadar hareket etmektedir. Detektörler genellikle tekli ya da mikrokanallı elektron çoğaltıcı ya da tabakalardan oluşmaktadır. Her bir iyon detektöre çarptığı zaman detektörde oluşan elektronlar sayesinde sinyaller elde edilmekte ve bilgisayar yardımıyla spektrum şeklinde kaydedilmektedir. Bütün bu süreç yüksek vakum altında (10^{-6} - 10^{-8} torr) gerçekleşmektedir [2]. Yüksek vakumun etkisi ile ortamdaki örnek dışı kirlilikler, boştaki elektronlar, gaz molekülleri uzaklaştırılabilmektedir. Örnek iyon kaynağından çıktıktan sonra detektöre ulaşana kadar gaz fazda olduğu için örnek iyonlarının birbirleri ile ve hava molekülleri ile meydana gelebilecek çarpışmaları engellemek amacıyla sistemin yüksek vakum altında çalışması gerekmektedir [3].



Şekil 1. Kütle Spektrometresinin temel bileşenleri ve çeşitleri

MS sistemlerinde örnek girişi doğrudan olabileceği gibi Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), Gaz

Kromatografisi (Gas chromatography, GC), katı prop ile sağlandığı gibi doğrudan da numune girişi yapılmaktadır. Bu durumda bu tür ayırma yöntemlerinin avantajlarından da yararlanılabilmektedir.

İyon kaynağı, kütle ayırıcısı ve detektör isteğe göre seçilip istenilen özellikte kütle spektrometresi tasarlanabilmektedir.

İyonlaştırma yöntemlerinden biri kullanılarak numune pozitif ya da negatif olarak yüklenmektedir. Pozitif yükleme elektron bombardımanı ile e^- koparılarak yapılabildiği gibi ortama az miktarda tuz ya da kuvvetli asit ilavesiyle de yapılabilmektedir. Negatif yükleme ise ortama baz eklenerek elektron koparma ya da elektron yükleme ile yapılabilmektedir.

Uçucu bileşiklerde iyonlaştırma yöntemleri, elektron bombardımanı ve kimyasal iyonlaştırmadır. Uçucu olmayan bileşiklerde ise hızlı atom bombardımanı, atmosferik basınç iyonlaştırma (örn. ESI) ve MALDI'dir [4].

Kütle spektrometresinde kullanılan iyon kaynakları sert ve yumuşak olmalarına göre ayrılırlar. Yumuşak iyon (soft) kaynakları analiz edilecek moleküllere zarar vermeden (parçalamadan) bir bütün halinde (intact) iyonlaşmalarına imkân sağlayan yöntemlerdir. Ancak yumuşak olmayan iyonlaştırma yöntemlerinde moleküller yüksek enerji ile uyarılır ve enerjinin büyük kısmı analit moleküllerine aktarılır. Bu nedenle moleküler bağlar kopmakta ve m/z oranı moleküler iyonunkinden daha küçük olan iyonlar açığa çıkmaktadır. Yumuşak iyonlaştırma yöntemi daha çok moleküllerin mol kütlelerini doğru tespit etmede kullanılırken sert iyonlaştırma yöntemi analit moleküllerini meydana getiren fonksiyonel grupların neler olduğunu belirlemede yani yapı aydınlatmada kullanılmaktadır [5].

Elektron Bombardıman'ında (Electron Impact) örnek 70 eV'luk enerjiye sahip elektronlarla bombardımana tutulmaktadır. Öncelikle numune buharlaşabileceği sıcaklığa getirilir ve elektron bombardımanına tabi tutulur. Uygulanan enerji nispeten yüksek olduğu için örnek içerisindeki bileşenlerin fragmentleri elde edilerek örnek yapısı hakkında kesin bilgilere

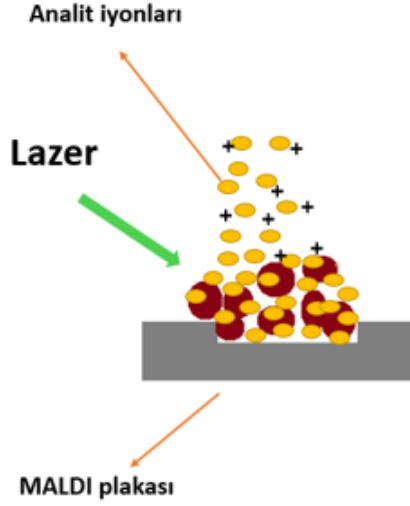
ulaşmaktadır. Bu yöntemle elde edilen karmaşık kütle spektrumları madde teşhisinde önemli yer tutmaktadır. Ancak bu yöntemin olumsuz özelliği sayılabilecek durumlar da vardır. Bunlar, bazen asıl molekülün parçalandığı için tespit edilememesi ve analitin buharlaştırılmasının gerekliliğidir. Buharlaşıma sırasında bazen termal bozulma meydana gelmekte ve yapısal kayıplara sebep olabilmektedir. Bu yöntemle büyük moleküler ağırlıklı numuneler analiz edilirken fragmentasyon çok fazla olacağı için spektrum çok karışık olabilmektedir [5].

Bunun önüne geçmek için Kimyasal İyonlaşma (Chemical Ionization, CI) yöntemi geliştirilmiştir. CI-MS'de ortama NH_4 ve CH_4 gibi gazlar gönderilerek yapıların çok bozulması engellenmektedir. Elektron bombardımanı ile iyonlaştırılmış moleküller reaktif gaz iyonları ile karşılaştırılmaktadır.

Hızlı Atom Bombardımanı (Fast Atom Bombardment, FAB) burada uyarılma Xe ve Cs iyonları ile yapılmaktadır. FAB'da iyonlaştırmanın temelinde elektron koparma işlemi vardır [6]. Bu yöntemde örnek probunun ucunda bulunan katı haldeki analit ve matriks karışımı Xe, Ar ve Cs gibi iyonlarla bombardıman edilmektedir. Buradaki matriks tri-nitro benzyl alkol veya gliserin gibi küçük bir organik molekül olmaktadır. Matriksin kullanım amacı örnek yüzeyini homojen tutmaktır. Örnek yüzeyine yüklenen enerji ile yüzeyden ikincil iyonlar çıkmaktadır. Toplanan ikincil iyonlar odaklanarak kütle analizörüne iletilmektedir. Bu yöntemle yüksek moleküler ağırlıklı polar bileşikler analiz edilmektedir [7] [8] .

Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaşmalı Kütle Spektrometrisi'nde (MALDI-TOF MS) iyonlaşma lazer etkisi ile gerçekleştirilmektedir (Şekil 2). Aslında bir lazer Desorpsiyon/iyonlaştırma (LDI) yöntemi olan bu teknikte, normalde yüksek enerjili lazerden kaynaklanabilecek parçalanmalar matriks ile ortadan kaldırılmaktadır. Matriks kullanımı elde edilen kristallendirilmiş numune içerisinde analit moleküllerinin birbirlerinden ayrı

durmalarını (disperse) sağlarken yeniden birleşmelerini de engellemektedir. Bu yöntemle büyük molekül ağırlıklı maddelerin tayininde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Numune, ayarlanabilen şiddete sahip pulslu lazer ışınlarından gelen enerjiyi daha çok kendi bünyesinde toplayan matriks ile karıştırılarak analiz edilmektedir. Bu yöntemde genellikle uçuş zamanlı kütle analizörleri ile kullanılmaktadırlar. Günümüzde MALDI ile MDa (megadalton) seviyesindeki çok yüksek moleküler ağırlığındaki numuneler analiz edilebilmektedir. MALDI ile $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ ve $[M-H]^-$ gibi hem pozitif hem de negatif iyonlar üretilebildiği gibi çok yüklü iyonlarda (dimer, trimer...vb.) oluşabilmektedir. Ancak kütle spektrumunda numune içerisindeki türlerin molekül ağırlığını gösteren sinyalleri genellikle tekli yük taşımaktadır ($[M+H]^+$ gibi) [9].



Şekil 2. MALDI Plakası Üzerinde Numunenin İyonlaşmasına Ait Gösterim

Elektron Sprey İyonlaştırma (Electron Sprey Ionization, ESI) tekniğinde ise yine MALDI yöntemindeki gibi yumuşak iyonlaşma gerçekleşmekte ancak genellikle çoklu yük oluşumları (örn. $[M+10H]^{10+}$ gözlenmektedir. Bu yöntem MALDI'de olduğu gibi proteinler, peptitler, oligonükleotitler gibi biyopolimerlerin, sentetik polimerlerin ve büyük anorganik molekül yapılarının analizlerinde başarıyla kullanılmaktadır. ESI'da iyonlaştırma

MALDI'den farklı olarak atmosfer basıncı altında ve çözelti ortamında gerçekleştirilmektedir. İyonlaştırma işleminde numune paslanmaz çelik bir kapiler iğne içinden püskürtülmekte (nebulizasyon) ve iğnenin ucunda bulunan silindirik elektrottaki düşük elektriksel potansiyel etkisiyle elektrik yüklü küçük damlacıklar (sprey) elde edilmektedir. Bu damlacıklar yüksek sıcaklıktaki inert gaz (örn. N₂) yardımıyla hızla kurutulmuş çözücüsü uzaklaştırılır ve böylece elektriksel yük yoğunluğu artan iyonlar damlacıklar içerisinde ortama desorbe olurlar ve kütle spektrometresi içerisinde tayin edilirler. Bu yöntemle büyük moleküler ağırlıklı ve termal dirençleri düşük moleküller parçalanmadan analiz edilebilmektedir [10].

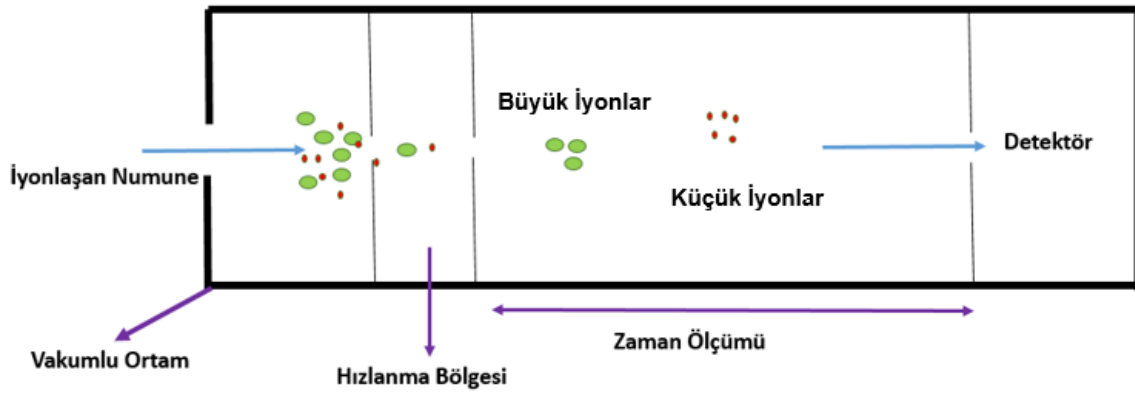
Kütle spektrometre sistemlerinde iyonlaştırıcı kısmın ardından kütle analizörü olarak kullanılacak farklı yöntemler bulunmaktadır. Bunlardan bazıları Manyetik Sektör Analizörü, İyon Kapanı ve Kuadrupol ve uçuş zamanlı gibi sistemlerdir.

Manyetik Alan Analizöründe küçük molekül ağırlıklı moleküller analiz edilmektedir ($m_w < 3000$ Da). Manyetik sektörlü sistemlerde genellikle elektromıknatıslar kullanılmaktadır. Bu mıknatıslar iyon kaynağından gelen elektronlara 60, 90 ve 180 derece gibi açılarla yerleştirilmiş olup elektronların dairesel olarak hareket etmelerini sağlarlar.

Kuadrupol sistemi ise 3000-5000 Da kütleli moleküller için uygun olup iyon kaybı çok az olmaktadır. Bu nedenle özellikle miktar tayini yapılacaksa kuadrupol analizörlü sistemler tercih edilmelidir. Kuadrupol sistemler manyetik alan analizörlere göre daha ucuz, basit ve etkin sistemlerdir. Bununla birlikte kuadrupol kütle analizörlerinin tarama süresi çok kısa olup ayırma işlemlerinde hızlı sonuç verdiği için de tercih edilmektedir. Bir Kuadrupol sistemi ise 3000-5000 Da kütleli moleküller için uygun olup iyon kaybı çok az olmaktadır. Bu nedenle özellikle miktar tayini yapılacaksa kuadrupol analizörlü sistemler tercih edilmelidir. [11] [12].

Uçuş Zamanlı (Time of Flight, TOF) kütle ayırıcılarda ise iyonlar içi boş bir tüp içerisinde molekül hareket etmektedir (Şekil 3). Bu yöntemde

manyetik alan etkisi bulunmamaktadır. İyonlaşmayı sağlayan lazer ile aynı frekanstaki elektrik alan sayesinde iyonlar bu tüp içerisine doğru hızlandırılmaktadır. Hızlanan iyonlar elektrik alan bulunmayan bir ayırma tüpüne girip detektöre doğru ilerlemektedirler. Ayırma tüpüne yönlendirilen her bir iyonun etki eden hızlandırma kinetik enerjisi aynı olmasına karşın iyonların tüp içerisindeki uçuş süreleri kütlelerine bağlı olarak değişmektedir. Her iyon kütlesi ile ters orantılı olan bir süre içerisinde detektöre ulaşmaktadır. TOF sistemlerinin en sonunda bulunan detektörün levhası sinyallerin elde edildiği bir osiloskop sistemine bağlıdır. Bu sayede detektöre varan iyonunun kütle spektrumu anında görüntülenmektedir. Bu sistemler kolay kullanımları sayesinde, uçucu olmayan ve ısıya dirençli olan örnekler için idealdir. Ayrıca çabuk bozulan örneklerde hızlı analiz sonucu verdiği için sıklıkla tercih edilmektedirler. [13] [14] [15].



Şekil 3. TOF Sisteminin Gösterimi

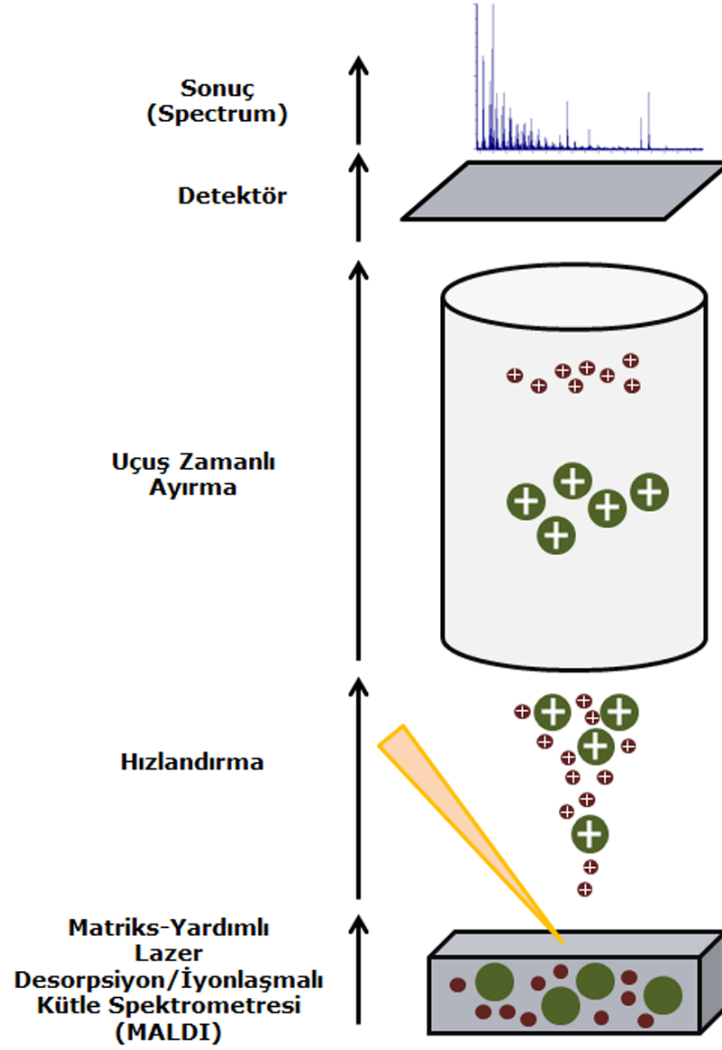
TOF'un uzunluğu arttıkça çözünürlük düşmektedir. TOF maliyeti kısmen yüksek bir yöntemdir. Kullanımında yüksek vakum gerektirir ve daha çok büyük molekül ağırlığına sahip moleküllerde kullanılmaktadır. TOF sistemlerinde analiz edilecek moleküllere ait kütle aralığı oldukça geniştir ancak tüp boyunca genişleme ya da çevre ısı etkileşimi olduğu için sık kalibrasyon gerektirmektedir [2] [3] [6] [15].

2.1.1. Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaşmalı Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) ve Uygulama Alanları

MALDI yöntemi ilk kez 1985 yılında Karas ve Hillenkamp tarafından alanin ve triptofan aminoasitleri ile yaptıkları bir çalışmada kullanılmıştır. Bu çalışmada bu iki aminoasitin farklı iyonlaşma enerjilerine sahip olduklarını görmüşlerdir. Daha sonra 1988 yılında Tanaka ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda büyük moleküler ağırlığa sahip moleküller MALDI ile analiz edilmiştir.

MALDI-TOF-MS kullanılarak düşük konsantrasyondaki numuneler analiz edilebilmektedir. Ayrıca MALDI-MS duyarlılığı çok yüksek olan analizlerin güvenilir şekilde yapılmasına imkân tanımaktadır. Günümüzde 10^{-18} mol derişime sahip numuneler rahatlıkla analiz edilebilmektedir [16]. MALDI-MS ile her bileşene ait moleköl ağırlığı tespiti yapılabildiği için tür analizlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. MALDI-MS'de numune yumuşak şekilde iyonlaştırılırken numune içerisindeki kararsız bileşikler, narin ve kompleks yapılar zarar görmeden analiz edilebilmektedir [17] [7].

Şekil 4.'de şematik olarak ifade edilen MALDI-TOF MS sisteminde de görüldüğü gibi örnek kendisine uygun olan bir matriks molekölü ile karıştırılıp analiz edilmektedir. Uygun matriksin seçiminde örnek molekülleri ile kimyasal reaksiyona girmemesi, buharlaşma hızının yüksek olması, örnek için yeterli olan lazerin dalga boyundaki ışını güçlü absorplama yeteneğinde olması gerekmektedir. Örnek ve matriks karışımı analizden önce genellikle oda şartlarında kurutularak örnek içerisindeki sıvı ve çözücüler uzaklaştırılmaktadır. Geriye tayin edilmesi istenen moleköl ile kristal hale gelmiş matriks molekölü kalmaktadır. Analiz için hazırlanmış olan numune MALDI-MS içinde yüksek vakum şartlarında kesikli lazer vuruşları ile iyonlaştırılmaktadır.

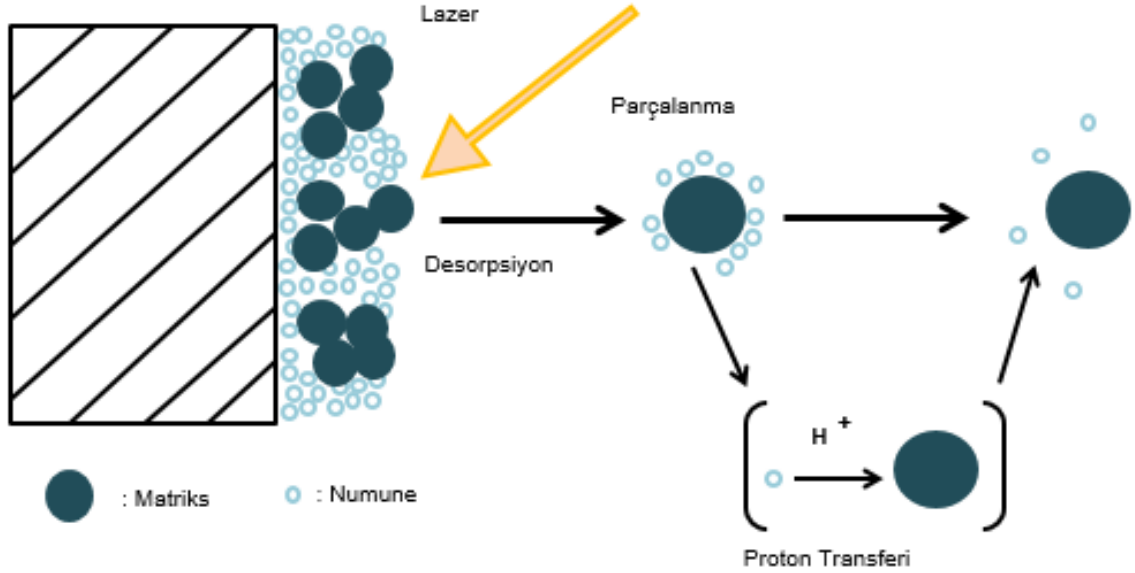


Şekil 4. MALDI-MS cihazının şematik gösterimi

Lazer atışları sırasında matriks moleküllerinin yoğun şekilde enerji absorpladığı için ortamda enerji birikmesi fazla olmakta ve ısı artışına sebep olmaktadır. İyonlaştırma sürecinde eğer lazer absorplama işlemi çok fazla olursa hızla ısınan matriks kristalleri yeteri kadar süblimleşemez ve gaz forma geçen matriks molekülünü sınırlar. Uyarılan matriks molekülü enerjisini çevresine aktarmadan örnek ile birlikte gaz fazına geçerler. Gaz fazındayken matriks molekülleri ile analit molekülleri arasında proton transferi olmakta ve $[M-H]^-$, $[M+H]^+$ veya $[M+Na/K]^+$ molekül iyonları oluşmaktadır (Şekil 5). Bunların yanında nadiren çok yüklü molekül iyonları

da oluşabilmektedir. Dolayısıyla doğru matriks seçimi önemli olmaktadır Çizelge 1’de farklı numunelerle kullanımı uygun olan matriksler listelenmiştir. Eğer analizde matriks kullanılmıyorsa yüksek enerji etkisiyle analit sadece desorbe olur ve parçalanır.

MALDI, diğer iyonlaştırma tekniklerine göre daha hassastır. Sistemde kullanılan matriks molekülleri sayesinde analit molekülleri birbirinden ayrı tutularak kümeleşmeleri önlenmekte ve çoklu yüklü moleküler iyonların görünmesi engellenmektedir. Yine matriks molekülleri ile lazer enerjisi fazlaca absorbe edilmekte olup moleküllerin çok düşük derişimlerde parçalanmadan ölçülebilmesi için analizin duyarlılığını arttırmaktadır.



Şekil 5. MALDI’de iyonlaşma işleminin şematik gösterimi

Çizelge 1. MALDI Matrikslerinin Kullanımları

Tayin edilen molekül	Matriks kısaltması	Matriks
Peptit/protein		
Kütle < 10 kDa	CHCA	α - siyano-hidroksisinnamik asit
Kütle > 10 kDa	SA	sinapik asit
	HABA	2-(4-hidroksifenilazo)benzoik asit
IR-Lazer		Süksinik asit
UV-Lazer		2,6-dihidroksiasetofenon
Sıvı matriks		4-Nitroalinin
Sentetik Polimer		
Apolar	IAA	Trans-3-indokakrilik asit
	DIT	Ditranol
Polar	DHB	2,5-dihidroksibenzoik asit
IR-Lazer		Süksinik asit
Organik moleküller		
	DHB	2,5-dihidroksibenzoik asit
		İzovanilin
Karbonhidratlar		
	DBH	2,5-dihidroksibenzoik asit
	CHCA	α - siyano-hidroksisinnamik asit
		3-aminoquinolin
Lipidler	DIT	Ditranol
Dentrimerler		
	SA	Sinapik asit
	DIT	Ditranol
İnorganik moleküller	DCTB	T-2-(3-(4-Bütil-fenil)-2-metil-2-propilidin)melononitril

MALDI büyük molekül ağırlıklı MDa mertebesinde moleküller için eşsiz bir iyonlaştırma yöntemidir. Çünkü diğer iyonlaştırma tekniklerinden farklı olarak iyonlaştırmayı sürekli değil kesikli (pulsar) şekilde yapmaktadır. Bu şekilde iyonlaştırma yapan MALDI için en uygun kütle ayırıcı sistem ise TOF

kütle analizördür. TOF yardımı ile geniş kütle aralığında yer alan farklı moleküller analiz edilebildiği için MALDI'nin TOF ile kullanımı büyük molekül ağırlıklı moleküllerin analizinde kolaylık sağlamaktadır [9]. Uçuşun olduğu tüpün sonunda detektör bulunmakta ve kinetik enerjileri eşit olan iyonların hızları kütleleri ile ters orantılı olarak değişmektedir. Bu yüzden hafif molekül detektöre daha erken ulaşmaktadır.

$$KE = z \cdot e \cdot V = \frac{1}{2} m v^2 \quad (1)$$

Eşitlik 1.'deki kinetik enerji kütle eşitliğinde; KE, kinetik enerjiyi ifade ederken z yükü, m iyonun kütlesini, v iyonun iyonlaştırma bölgesindeki hızını, V uygulanan elektriksel alan gerilimini, e elektronun yükünü ifade etmektedir [3].

Molekül ağırlığı büyük olan moleküllerin özellikle sentetik ve biyopolimerlerin kütle spektrometresi ile analizlerinde uçuculuklarının çok az olmaları nedeniyle kararlı bir şekilde gaz fazında iyonlar haline getirilmeleri oldukça zordur. 1990'lı yıllardan sonra geliştirilen ESI ve MALDI gibi yumuşak iyonlaştırma teknikleri sayesinde büyük molekül ağırlığına sahip doğal ve sentetik polimerler, proteinler ve daha birçok biyolojik kökenli materyal yapısı zarar görmeden analiz edilmeye başlamıştır [18].

MALDI ile birlikte TOF sistemleri kullanıldığı zaman uçuş zamanlı kütle ayırıcısının sahip olduğu avantajlar sayesinde geniş kütle aralığında bileşen içeren moleküllerin analizi rahatlıkla yapılabilmektedir. Çünkü TOF sistemlerde kütle sınırlaması yoktur, detektöre ulaşan iyonlara ait veriler yüksek doğrulukta ve hızlı şekilde işlenmekte ve yüksek duyarlılıkta analiz yapılmaktadır. Tüm bu avantajlar sayesinde biyomoleküllerin ve biyolojik temelli yapıların MALDI-TOF ile tayini kolayca yapılabilmektedir [19].

Örnek hazırlarken ilk adım analiz edilecek olan molekülü matriks adı verilen organik çözücü içerisinde çözmektir. Elde edilen karışım metal

MALDI örnek plakasına damlatılmaktadır. Analize başlamadan önce numunenin kendi çözeltilisindeki sıvının buharlaştırılması ve geriye sadece matriks ve analit moleküllerinden oluşan kristal bir katının kalması amaçlanmaktadır. MALDI analizlerinde en zor aşama örnek hazırlamadır. Örnek hazırlarken birçok durum göz önünde bulundurulmalıdır. Bunlar; uygun matriksin seçimi, örnek matriks karışım oranının belirlenmesi, numunenin hangi yöntemle hazırlanacağını belirlemesi, numunenin yeteri kadar saf olması (içerdiği tuz konsantrasyonunun mümkün olduğu kadar az olması) dır [20].

Analit ve matriks molekülleri ne kadar iyi karışırsa matriks molekülleri analit moleküllerinin etrafını o kadar iyi çevrelemekte, analit moleküllerinin birbirinden ayrılarak kümelenmeyi engellemekte ve lazer ışınlarının analit molekülleri arasında etkin bir şekilde dağılmasını sağlamaktadır [21].

1980'li yılların başına kadar sentetik ve biyolojik polimerlere ait molekül ağırlığı tayini yapmak için utrasantrifüj ve kromatografik yöntemler kullanılmaktaydı. Zamanla bu yöntemlerin yetersiz kalması, hatalı sonuç vermesi gibi sebeplerle kütle spektrometresi yardımı ile kimyasal iyonlaştırma (CI) ya da elektron iyonlaştırma (EI) yöntemleri kullanılmaya başlamıştır [22]. Ancak bu yöntemlerde tespit edilecek moleküllerin gaz fazında bulunması gerektiğinden numunenin uçucu hale dönüştürülmesi gerekmektedir [8]. Molekül ağırlığı 5 kDa'a kadar olan ve uçucu olmayan moleküllerin tespitini sağlayan Alan Desorpsiyonlu İyonlaşma tekniği (Field Desorption, FD) kullanımı zahmetli olduğu için ve profesyonel eleman kullanımı gerektirdiği için çok tercih edilmemiştir [23].

Bu yöntemlerden sonra geliştirilen Hızlı Atom Bombardmanı (Fast Atom Bombardment, FAB), Plazma Desorpsiyonu (PD) ve Lazer Desorpsiyonunda (LD) ise katı ya da sıvı örnek yüzeyinden iyonların salımı ile iyonlaşma sağlanmaktadır. Ancak fazla miktardaki tek yüklü iyonlar bu yöntemlerle

çok verimli şekilde yani yüksek hassasiyet ve çözünürlükte analiz edilememiştir [24].

1980'lerin sonlarında yüksek molekül ağırlıklı moleküllerin analizinde kullanma imkânı sağlayan Elektron Sprey İyonlaştırma (ESI) ve MALDI teknikleri sayesinde doğruluğu ve hassasiyeti yüksek analizler yapılmaya başlanmıştır. Bu iki analitik yöntem günümüzde yüksek molekül ağırlığına sahip biyolojik kökenli materyallerin analizinde sıklıkla kullanılmaktadırlar [25] [26]. Her iki iyonlaştırma yönteminde de analiz etkinliği numunenin saflığı, hazırlanma yöntemi, analizi yapan kişiye bağlıdır. Peptit, protein, polimerler gibi kompleks yapıdaki numunelerde analizler biraz daha dikkatle yapılmalıdır [27]. Protein ve peptitlerin molekül ağırlıkları yüksek olmalarına rağmen ESI ve MALDI ile tespit sınırları genellikle femtomol-pikomol düzeyinde olup Worm ve arkadaşları ile Martin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda attomol sınırına kadar inilmiştir [28] [29]. Hem ESI hem de MALDI'de iyonlaşma sırasında birbiri ile yarışan iyonlardan bazıları az miktardakileri baskılayabilmekte ve bazı bileşenlere ait pikler ya düşük oranda görülmekte ya da hiç görülmemektedir [27]. Analiz edilmesi istenilen molekül ne kadar saf halde numunede olursa o kadar yüksek verimde sonuçlar elde edilmektedir. Diğer yandan analit molekülünün numunedeki derişimi ve bulaşmış ya da yapısında var olabilecek tuz, yüzey aktif maddeler gibi kirleticilerin varlığı gibi durumlarda analiz sonucu üzerinde büyük etkiye sahiptir. ESI'da bu istenmeyen maddelerin meydana getirdiği sinyaller verilerin yorumlanmasında MALDI'a göre daha fazla olumsuz etki yapabilmektedir. Çünkü MALDI'de kullanılan matriks sayesinde numune içerisinde yer alan safsızlıklar ve istenmeyen bileşenler kristal yapı dışında kalmaktadır [30].

EI ve FAB gibi sert iyonlaştırma tekniklerinde molekül daha fazla alt birimlere parçalanmaktadır. Parçalanmalar adeta her bir moleküle ait parmak izi gibi moleküle özgü olmaktadır. Sert iyonlaştırma yöntemleri

büyük, karmaşık yapılı molekülleri tanımlanamaz/anlamsız şekilde parçaladığı için analizi zorlaştırmaktadır. FAB en fazla 4 kDa mol kütleli bileşiklerin iyonlaştırmasına imkan verirken MALDI ve ESI gibi yumuşak iyonlaştırma yöntemlerinde birkaç MDa (1000000 Da) mol kütleli moleküller analiz edilebilmektedir [6].

Özellikle MALDI lazer Desorpsiyon/iyonlaştırma (LDI) yöntemleri içerisinde en hassas olan tekniktir. Diğer lazer iyonlaştırma tekniklerinden daha hassastır. MALDI ile mol kütlesi 300 kDa dan büyük olan proteinlerin femtomol düzeydeki miktarlarının bile tayinine imkân sağlar [31] [32].

İyonlaştırma yönteminin etkinliğini arttıran en önemli unsur numunenin kirleticilerden mümkün olduğu kadar arındırılmış olmasıdır. İkinci önemli parametre ise analit molekülünün derişimidir [33]. Ancak biyolojik moleküller genellikle protein, peptit gibi fazlaca kirliliğe sahip yapılardan saflaştırılarak elde edilmektedirler. Geleneksel olarak kullanılan birçok saflaştırma yöntemi mevcuttur. Bunlar, jel elektroforez, SDS page, kromatografik yöntemler olarak sayılabilir. Bunların dışında son yıllarda sıklıkla kullanılan Moleküler Baskılanmış Polimerler (MBP'ler) de ayırma, zenginleştirme saflaştırma çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadırlar [34].

2.2. Moleküler Baskılanmış Polimerler (MBP) ve Kullanım Alanları

Moleküler baskılamanın temel amacı tıpkı enzim-substrat veya antijen-antikor biyolojik tanıma mekanizmalarında olduğu gibi belli bir moleküle yönelik polimerik tanıma bölgeleri geliştirmektir. Moleküler baskılama yaklaşımı 1970'lerin başlarında tanımlama amaçlı kullanılmaya başlansa da günümüzde katalizleme yöntemlerinde, ayırma ve saflaştırma işlemlerinde kullanılmaktadırlar [34].

Polimere molekül baskılama işleminde, hedef molekül varlığında polimerleşme gerçekleştirip sadece hedef molekülü tanıma bölgelerine

sahip polimer yapılar elde edilmektedir. Baskılama işleminde ilk olarak monomer ve polimerleşme için gerekli maddeler hedef (kalıp) molekül varlığında polimerleşme başlatılmaktadır. Polimerleşme işlemi bitince kalıp molekül polimerden uzaklaştırılmaktadır. Geriye kalan polimer artık hem fiziksel (büyüklük, şekil) hem de kimyasal (fonksiyonel grup) bakımdan kalıp moleküle özel boşluklara sahip hale gelmektedir [35].

Biyobelirteçler sahip oldukları düşük kararlılık özellikleri ile bozulmadan kullanılabilmeleri için özel çalışma şartlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun aksine MBP'ler kolay hazırlanabilmeleri, birçok koşulda yüksek adaptasyona sahip olmaları, yüksek mekanik dirençlerinin olması, ısıya, basınca karşı dayanıklı olmaları, asidik ve bazik koşullarda stabiliteilerinin yüksek olması, raf ömürlerinin uzun olması sayesinde tanıma işlemlerinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. MBP'lerin performansları değişmeden birkaç yıl kullanılabilme özellikleri vardır [34] [36] [37].

MBP'ler ilaç araştırmalarında, çevre teknolojilerinde, sağlık endüstrisinde, tanımlayıcı biyosensör işlemlerinde, biyomoleküllerin saflaştırma ve zenginleştirme çalışmalarında kullanılmaktadırlar [38] [39].

Şematik gösterimi Şekil 6'daki gibi olan molekül baskılanmış polimerleri elde edebilmek için aşağıdaki adımlar takip edilmektedir.

– Ön-Kompleksleşme İşlemi

Bu adım için en önemli unsur fonksiyonel monomer seçimidir. Fonksiyonel monomer seçiminde hem kalıp molekül ile kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanıp ön polimerizasyon kompleksi oluşturabilecek hem de polimerleşmeyi sağlayabilecek yapıda olmasına dikkat edilmesi gerekmektedir.

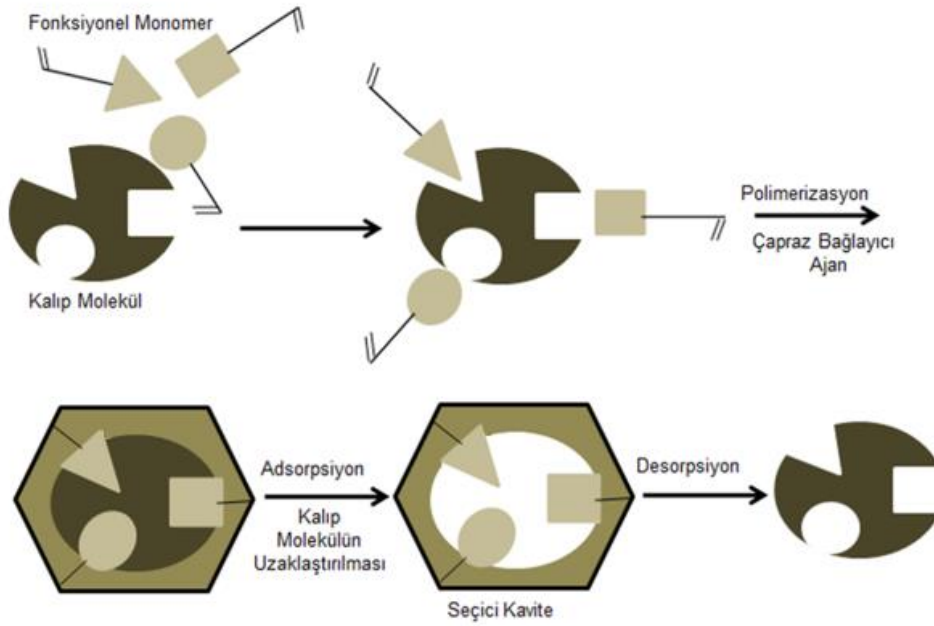
– Polimerizasyon

Olusturulan ön polimerizasyon kompleksine ilave edilen uygun bir çapraz bağlayıcı sayesinde fonksiyonel monomer polimerleştirilmektedir.

- Kalıp (hedef) molekülün uzaklaştırılması

Polimerleşme reaksiyonundan sonra polimer üzerinde kalıp molekülü tanıyan boşlukların oluşturulabilmesi amacıyla kalıp molekül uygun bir çözücü yardımıyla polimerden uzaklaştırılmaktadır. Elde edilen boşluklar (kaviteler) kalıp molekülü hem fiziksel hem de kimyasal açıdan tanıır halde olacaktır [40]

Moleküler baskılamanın etkinliği polimerleşme sırasında kullanılan bileşenlerin birbiri ile olan uyumuna ve kullanılan polimerleşme yöntemine bağlı olmaktadır [41].



Şekil 6. MBP'lerin şematik gösterimi

Kalıp molekül olarak kullanılacak molekül genellikle biyolojik moleküller (aminoasitler, peptitler, hormonlar, enzimler, nükleik asit bazları,

karbonhidratlar, proteinler) olabildiği gibi ilaç, pestisit gibi sentetik maddeler de olabilmektedir [42].

Kalıp molekül seçiminde en önemli unsur seçilmiş olan polimerleşme işlemi sırasında yapısal ya da fiziksel hiçbir değişikliğin olmamasıdır. Ayrıca kalıp molekül olarak kullanılacak molekül ön polimer kompleksini oluşturabilecek fonksiyonel gruplara sahip olması gerekmektedir [43].

Fonksiyonel monomerin seçiminde polimerleşme ortamının özellikleri önemli yer tutmaktadır. Fonksiyonel monomerlerin kalıp moleküllerle kurduğu elektrostatik ve kimyasal bağlar sayesinde baskılanmanın etkinliği artmaktadır. Her monomer her koşulda aktive olamamaktadır. Asidik yapıya sahip olan monomerler metakrilik asit (MAA), p-vinilbenzoik asit, akrilik asit (AA), 2-(triflorometil)-akrilik asit (TFMAA) iken bazik yapıdaki monomerlere vinilimidazol, 1-vinil imidazol, allilamin, N,N'-dietil aminoetil metakrilamit (DEAEM) örnek olarak verilebilmektedir. akrilamit, metakrilamit, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), akrilonitril (AN), metilmetakrilat (MMA), stiren, etilstiren ise nötral özelliğe sahip monomerlerdir [41].

Polimerleşme reaksiyonunda kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında kuvvetli bir yapı oluşturmak ve baskılanmış bölgelerin kararlılığını sağlamak amacıyla çapraz bağlayıcılar kullanılmaktadır [41].

Seçilen fonksiyonel monomer ile kullanılacak olan çapraz bağlayıcı oranlarının uygun olması gerekmektedir [44]. Eğer gereğinden fazla çapraz bağlayıcı kullanılmışsa baskılanmış polimerlerde farklı sayıda bağlanma bölgelerine sebep olmakta ve seçiciliği olumsuz yönde etkilemektedir [45].

Bu durumun aksine kullanılan çapraz bağlayıcı fonksiyonel monomer oranı çok düşükse kalıp molekül bağlanma bölgeleri birbirlerine yaklaşır hatta bazı bağlanma bölgeleri çevre bağlanma bölgelerini kapatırlar. Böyle hallerde baskılanmanın etkinliği azalmakta ve başarılı sonuçlar elde

edilememektedir [42]. Etilen glikol dimetakrilat (EDMA) ve divinilbenzen (DVB) en çok kullanılan çapraz bağlayıcılar arasında bulunmaktadır.

Polimerleşme reaksiyonunun gerçekleşeceği ortamı hazırlayan tüm bileşenlerin bir arada kalmasını sağlayan ve polimerlerde gözenek oluşumunu sağlayan bileşen çözücüdür. Çözücü polimer çözeltisi içinde reaksiyon için gerekli olan ısıyı homojen olarak dağıttığı için herhangi bir bileşenin ısıdan zarar görmesini ve istenmeyen yan reaksiyonları engellemektedir. Çözücünün sağladığı gözenekli yapı sayesinde kalıp molekül polimerden daha kolay uzaklaştırılabilmekte ve geriye kalan boşlukların kalitesi artmaktadır [42].

Polimerleşme reaksiyonunun başlayabilmesi için başlatıcıya ihtiyaç duyulmaktadır. Radikal polimerizasyonunda başlatıcı, ısı bozunma ile reaksiyonu başlatmaktadır. Genellikle 2,2'-azobis (izobütironitril) (AIBN), 2,2'-azobis(2,4-dimetil valeronitril) (ADVN) ve benzoil peroksit (BPO) Isıl bozunma ile çalışan başlatıcılar olarak kullanılmaktadırlar. Sıcaklık artışına karşı yüksek hassasiyetin olduğu durumlarda UV bozunma kullanılmaktadır [46] [47].

MBP'lerin sentezinde kullanılan en yaygın metot 2 fazlı mini emülsiyon polimerleşme tekniğidir. Bu yöntemde 2 su fazı ve 1 yağ fazı bulunmaktadır. Yağ fazı için kalıp molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı ve ko-monomer belli oranlarda karıştırılmaktadır. Karışım Poli Vinil Analin (PVA), Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve Sodyum bikarbonatın deiyonize suda çözünmesi ile oluşan birinci su fazı ile karıştırılır ve homojenizatör yardımı ile homojen hale getirilmektedir. Homojen karışım elde edildikten sonra PVA, SDS ve deiyonize sudan oluşan ikinci su fazı ile manyetik karıştırıcıda karıştırılarak polimerleşme için çözelti hazırlanmış olmaktadır. Elde edilen polimer çözeltisine başlatıcı ilavesi ile belli sıcaklık

değerinde 24 saat sürecekle olan polimerleşme reaksiyonu başlatılmaktadır [48].

MBP'ler zenginleştirme, saflaştırma, ayırma işlemleri gibi farklı uygulama alanlarında kullanılmaktadırlar.

Birçok hastalığın erken teşhisinde ya da hastalık sebebi molekülün miktarının kontrol edilmesinde genellikle MBP temelli Yüzey Plazmon Resonans (Surface Plasmon Resonance, SPR) sensörler kullanılmaktadır. SPR sensörlerinde yüzeyde meydana gelen kırılma indisindeki değişim rezonans da kaymaya sebep olmaktadır. Gerçek zamanlı olarak bu bağlanma ve kopma sinyalleri kaydedilip en az bağlanma miktarı, bağlı kalınan süre gibi parametreler kolaylıkla yapılabilmektedir [49].

Cenci ve arkadaşları Hepcidin-25 hormonunu baskıladıkları polimer bazlı SPR biyosensöründe tespit sınırını 5 pM olarak bulmuşlardır [50].

Pernites ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada elektropolimerizasyon yöntemi ile sentezlenmiş olan MBP'ler astım tedavisinde kullanılan teofilin etken maddesine karşı seçicidir. MBP ile ürettikleri ultra ince sensör filmi SPR de kullanarak tespit sınırını $3.36 \mu\text{M}^{-1}$ olarak bulmuşlardır [51].

Prostat kanserinin antijeni olan PSA (Prostat Spesifik Antijen)'nin idrardaki miktar kontrolünü yapabilmek amacıyla Jolly ve arkadaşları PSA'ya spesifik sentezlenen MBP'leri kullandıkları SPR sensör sisteminde tespit sınırını 1 pg/ml olarak bulmuşlardır [52].

Liu ve ark. hemoglobin baskıladıkları polimerler ile manyetik nanopartikülleri kaplayarak yaptıkları bağlanma deneylerinde 281.94 mg/g bağlanma kapasitesi değerini elde etmişlerdir [53]. Yine Gao ve ark. hemoglobin baskıladıkları nanopartiküller ile Fe_3O_4 manyetik partikülleri kaplayarak 176 mg/g bağlanma kapasitesi ile analit molekülünü zenginleştirmeyi başarmışlardır [54].

Kyzas ve ark. malahit yeşili baskıladıkları polimerler ile yaptıkları deneylerde mavi ve sarı renkteki boya molekülleri kullanıp boyaların polimerlere bağlanma eğilimlerini hesaplamışlardır. Sonuçta mavi renk

pigmentine göre malahit yeşilinin baskılanmış polimerlere bağlanma miktarı 63 kat fazla olmuştur. Bu değer sarı renk pigmentleri hesaplandığında malahit yeşilinin sarıya göre baskılanmış polimerlere 40 kat fazla miktarda bağlanması olmuştur [55].

MBP'lerin karakterize edilebildiği birçok cihaz bulunmaktadır. Örneğin, kimyasal bağlantı noktalarını tespit edebilmek için Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR), partiküllerin ortalama boyutlarını ölçmek ve sahip oldukları yükü belirleyebilmek için Zetasizer, tam boyut analizi yapabilmek ve morfolojilerini görüntüleyebilmek için Geçirimli Elektron Mikroskopu (Transmission Electron Microscopy, TEM) ve Taramalı Elektron Mikroskopu (Scanning Electron Microscopy, SEM) kullanılmaktadır [56].

2.3. MBP'lerin MALDI-MS Uygulamalarında Kullanımları

Moleküler düzeyde biyobelirteçler (özellikle proteinler, peptitler) genellikle indikatör olarak kullanılmaktadırlar. Biyobelirteçler patofizyolojik risk durumlarında, hastalığın tedavi edilip edilemeyeceği seviyede olduğuna karar vermede veya hastalıklara ait tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde büyük öneme sahiplerdir [57]. Ancak biyolojik moleküllerin karmaşık yapıda olmalarından ötürü biyobelirteç olabilecek molekülün tanımlanması zor olmaktadır. Çünkü bol miktarda bulunan ve yapıca büyük olan moleküller -örneğin proteinler- miktarca az olan ya da küçük yapıli molekülleri baskılayarak tespit edilmelerini engellemektedirler. Daha somut şekilde ifade etmek gerekirse içerisinde bir milyondan fazla proteinin bulunduğu insan kanı plazmasının %99'unu 22 bol bulunan protein çeşidi oluşturmakta iken biyobelirteç olabilecek olan moleküller nanomol-zeptomol düzeylerinde bulunmaktadır [58]. Dahası, bol miktarda bulunan biyobelirteçlerin miktarları da bu büyük moleküllerin yanında sürekli dalgalanmaktadır [59].

Bu yüzden az miktarda bulunan biyobelirteçlerin tespiti büyük zorluklarla, pahalı yöntemlerle ve zaman gerektiren işlemlerle yapılabilmektedir. Bütün bu olumsuzluklar biyobelirteçler konusunda yapılan çalışmaların sınırlı olmasına, yeni belirteçlerin keşfine ve klinik çalışmaların ilerlemesine engel olmaktadır.

Biyobelirteçlerin kullanımı için güvenilir ve yeni bir metot geliştirilmesi kütle spektrometresi gibi analitik bir yöntem ile mümkün olabilmektedir. Ancak kütle spektrometresinde biyobelirteç analizi yapabilmek için ön zenginleştirme çalışması yapılması şartı ile hızlı, basit ve seçici bir analiz yapılabilmektedir [60] [61].

MALDI'deki yumuşak iyonlaştırma sayesinde protein ve peptit gibi biyobelirteçlerin tespiti kütle spektrometresi ile kolaylıkla yapılabilmektedir. MALDI ile birlikte TOF kullanılıyor olması yöntemin etkinliğini arttırmaktadır. MALDI-TOF kütle spektrometresi analizlerinde detektörden bilgisayar sistemine verilerin hızlı ve net şekilde aktarılması sayesinde düşük molekül ağırlıklı protein ve peptitlerin tespitinde tercih edilen bir yöntem olmuştur [62] [63].

MALDI-TOF uygulamaları ile genellikle pikomol-femtomol seviyelerinde tespit yapılabilmektedir. Ancak Spärbier ve ark. yapmış oldukları proteomik çalışmalardan sonra hassasiyeti attomol seviyesinde bulmuşlardır [64].

MALDI uygulamasında hazırlanan numune hedef örnek plakası üzerine yerleştirilmekte/damlatılmakta arkasından matrix ilave edilmekte ve cihaz içerisinde iyonlaştırılmaktadır. Bu yöntem alternatif olarak numune ile matriks karıştırılıp numune plakası üzerine bu karışım damlatılarak da analiz yapılabilmektedir. Bu şekilde numune hazırlama işlemi birkaç saat sürebilmektedir. Uzun süreli numune hazırlama işlemleri hassas, yapısı kolay zarar gören numuneler için çok büyük bir dezavantajdır. Ayrıca uzun süren numune hazırlama işlemi sırasında çok fazla bulaşan numuneyi kirletmekte ve sinyal oranını düşürebilmektedir. Plaka üzerindeki numunenin hedef molekölce yeterince zengin olması MALDI uygulamaları

için amaçlanmaktadır [65]. Hatta böyle zenginleştirilmiş olarak kullanılan numuneler için literatürde "seçici olarak zenginleştirilmiş hedef molekül entegre edilmiş teknoloji" olarak bahsedilmektedir [66] [67].

Zenginleştirme işlemlerinde çeşitli materyaller kullanılmaktadır. Bunlar, iyon değiştirmeli ve ters faz kromatografileri [66] [65], poliamino fenil boronik asit ya da C8 ile türevlendirilmiş manyetik partiküller [66] [68], altın nanopartiküller [69], selülozik partiküller [70], nanoporoz silika yüzeyler [71], çekirdek kabuk mikro/nanopartiküller [72], karbon nanotüpler [73] antibadi ile modifiye edilmiş yüzeyler [64]dir.

MALDI'de tespit edilmeye çalışılan biyolojik kökenli moleküllerin çoğu fosfopeptitler [72] [74] [75] [76] ,glikopeptitler [77] [78] [79] [80], sistein içeren peptitler [81] ve düşük molekül ağırlıklı komponentler [82] [83] [84] olmuştur. MALDI'de analiz edilecek hedef molekül bağışıklık sistemi analiti ise MALDI yerine iMALDI (immuno-MALDI) ismi kullanılmış ve seçicilik antibadiler ile sağlanmıştir [85] [86] [87] [88]. Diğer klinik çalışmalar için ise MALDI-MS yerine Yüzeyle Güçlendirilmiş Lazer Desorpsiyon/ İyonlaştırmalı Kütle Spektrometresi (Surface Enhanced Laser Desorption/ Ionization-Mass Spectrometry, SELDI-MS) ismi kullanılmıştir [89] [90].

SELDI için kullanılan yüzeyleri tercih ederken seçicilik özelliklerinin yüksek olması, kullanımının kolay olması ve uzun süre bozulmadan aktivitelerini devam ettirebilmeleri gerekmektedir. Bu bakımdan sağladığı avantajlar sayesinde MS uygulamalarında MBP'lerin kullanımı tercih edilmektedir [91] [92] [93] [94].

Hem küçük moleküllerin baskılandığı polimerlerde [56] hem de protein gibi büyük molekülü tanıyabilecek peptit epitoplari baskılanmış polimerlerde seçiciliğin yüksek olduğu görölmektedir [95] [96] [97].

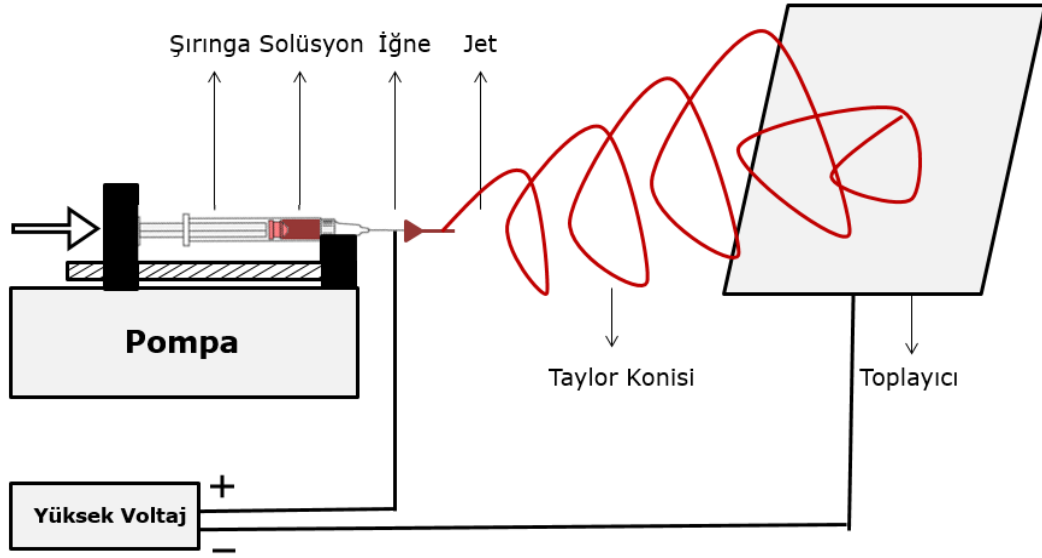
Cenci ve arkadaşları 209 aminoasitten oluşan 23kDa moleküler ağırlığı olan cTnI proteini baskılanmış polimer kullanarak zenginleştirdikleri numuneyi MALDI-MS ile analiz ettiklerinde 300 femtomol seviyesinde tespit

yapabilmişlerdir. Yine Cenci ve ark. yaptıkları bir başka çalışma da serum albümin baskılanmış polimer kullanarak MALDI-MS de serum içerisinde albümini seçici olarak ayırmış, iki defa bağlanmayan/istenmeyen molekülleri uzaklaştırmak için yıkamış ve hala albuminin MALDI'de tespitini S/N oranını 27.8'den büyük olacak şekilde tespit etmişlerdir [50].

2.4. Elektroçekim Yöntemi ile Lif Üretimi ve Liflerin Kullanım Alanları

Mikro ve nano boyutlarda lif elde etmek için kullanılan electrospinning yönteminin Türkçedeki karşılığı elektroçekim, elektroğirme [98] ya da elektro lif çekim [99] yöntemidir.

Elektroçekim yöntemi kolay olması, neredeyse istenilen tüm polimerlere uygulanabilir olması, hızlı üretim yapılabilmesi, nano/mikrometre boyutlarda çapa sahip lifler üretilebilmesi ile yüzey alanı arttırılmış ve küçük gözenek boyutuna sahip olan yapıların hazırlanabilmesi ve maliyetinin düşük olması sebebiyle ilaç taşıma, kontrollü ilaç salımı, tekstil gibi alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır [100]. Şekil 7.'de şematik olarak gösterilen elektroçekim tekniği ile lif üretilirken pipet ya da şırıngaya hazırlanan polimer çözeltisi doldurulmaktadır. Elektrik kaynağına bağlı iki elektrottan biri şırıngaya bağlı iken diğer elektrot ise toplayıcı plakaya bağlanmaktadır. Değiştirilebilen besleme hızı ile yüksek potansiyel gerilimin olduğu alana salınan polimer çözeltisi elektriksel olarak yüklenmektedir. Elektroçekim sisteminde enerji kaynağı ve toplayıcı plaka topraklandırıldığı için sistem kapalı devre şeklindedir. Şekil 7'de de görüldüğü gibi şırıngadan belli bir uzaklığa yerleştirilmiş olan toplayıcı plaka üzerinde doğru hareket etmektedir. Polimer çözeltisinin bu hareketi elektrik alan etkisi ile konik şekilde olmaktadır. Literatürde bu şekle "Taylor Konisi" denilmektedir [101] [102].



Şekil 7. Elektroçekim Yönteminin Şematik Gösterimi

Polimer çözeltilisinin elektrik alanına salınabilmesi için ortamdaki elektrik geriliminin çözeltinin sahip olduğu yüzey gerilimi ve viskozite direncinden fazla olması gerekmektedir. Şırıngadan ortama salınmış haldeki polimer çözeltilisinin ivmesi viskozite direncine bağlı olarak azalmakta ve belli bir mesafeden sonra sıfıra ulaşmaktadır. İvmenin sıfır olduğu anda stabil olmayan uçuş meydana gelmekte (sarkaç hareketine benzer bir hareket meydana gelmekte) ve lif hatalı olmaktadır [103] [104] [105] [106].

Polimer çözeltilisinin uçuş mesafesi arttıkça liflerin çapı küçülerek yükü artmaktadır [107].

Elektroçekim yöntemi ile üretilen nanoliflerin yapısal özellikleri üzerinde kullanılan polimerin molekül ağırlığının [108] çözelti pH'ının [109] elektriksel gerilim miktarı, polimer besleme miktarı, şırınga ve toplayıcı plaka arasındaki mesafe, çözeltinin hazırlanma sıcaklığı ve konsantrasyonu [110] [111] gibi faktörler etkili olmaktadır.

Li ve ark. yaptıkları çalışma ile lif çapının şırınga ve toplayıcı plaka arasındaki mesafe azaldıkça arttığını göstermişlerdir. Ayrıca sistem gerilimini arttırınca lif çapının azaldığını kanıtlamaktadırlar. Elektroçekim

yöntemi sürekli devam eden bir işlem olduğu için elde edilen lifler kilometrelerce uzunlukta olabilmektedir.

Li ve ark. Poliamid 6 ile ürettikleri nano lifin, lif çapına bağlı olarak yüzey alanının 9-15 m²/g, gözenekliliğin % 25-80 ve gözenek boyutunun 2,737-0,167 µm arasında değiştiğini tespit etmişlerdir [112]. Elektroçekim liflerin çapı liflerin elektriksel özellikleri üzerinde etkili olmaktadır. İletken özellikte olan bir lif çapı lifin elektriksel uyarıcıya verdiği tepkinin süresini ve şiddetini etkilemektedir. Gogotsi ve ark. üretmiş oldukları Polyethylene terephthalate (PET) nanolifin çapı azaldıkça elektriksel uyarıcıya tepki süresinin azaldığını göstermişlerdir [113].

Elektroçekim ile lif üretilirken çözücü çözelti içerisinde çok hızlı şekilde buharlaştığı için polimer zincirleri yüksek kayma geriliminin etkisinde olmaktadır. Bu durum zincirlerin gerilmemiş halde ki durumlarına geri dönmelerine engel olmaktadır. Bu şekilde katı hale gelen polimer zincirleri geleneksel yöntemlerden farklı kristalleşme özelliklerine sahip olup kullanım alanlarını değiştirmiş olmaktadır [105] .

Üretimleri sırasında kullanılan polimerin özelliklerine bağlı olarak nanoliflerin birçok biyomedikal uygulaması bulunmaktadır. Zhang ve ark. yaptıkları çalışmada kolajen örümcek ipeği ile ve yüksek sıcaklık ile doğal yapısı bozulan kolajen kullanarak ürettikleri nanolifleri gerçek dokular gelişene kadar geçici doku destekleri olarak kullanmışlar ve olumlu sonuçlar almışlardır [114].

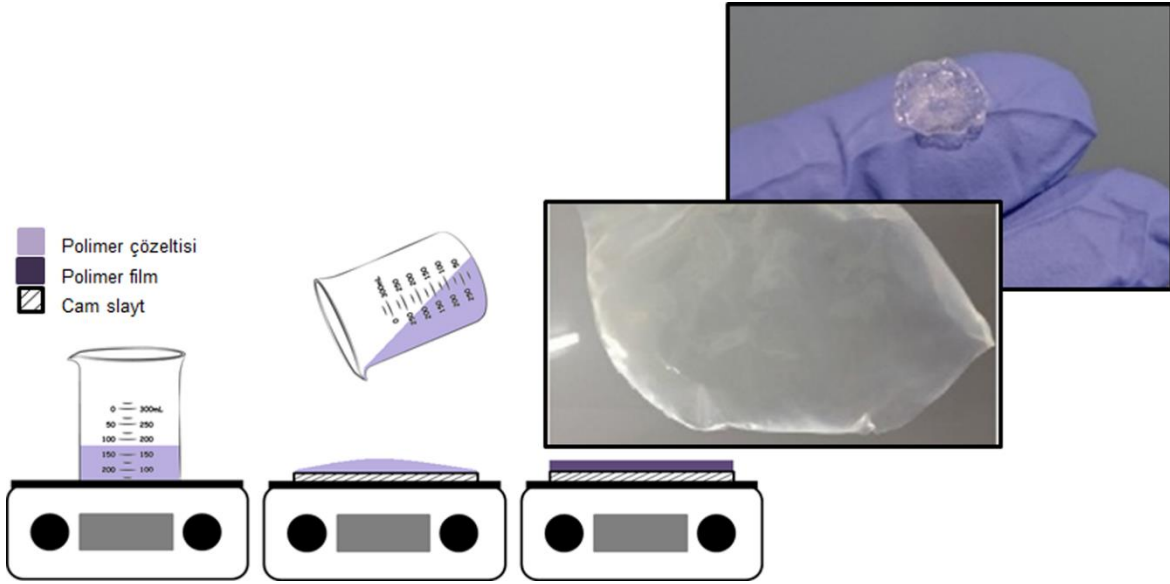
Yüksek yüzey alanına sahip nanolifler üzerindeki gözeneklerin boyut ve sayısı istenilen şekilde düzenlenebilmekte olup ilaç salım sistemlerinde bu özelliklerinden dolayı sıklıkla kullanılmaktadırlar [115].

İlaç veya metabolik bileşenlerin nanolifler ile taşınması biyobozunur polimer ile üretilen nanolif üzerine bağlanması ile olabileceği gibi polimer çözeltisi içine ilave edilen ek maddenin polimer ile birlikte life dönüştürülmesi şeklinde de olmaktadır. Bu amaçla kullanılan başlıca

biyobozunur polimer olarak PGA(poliglikolik asit), ϵ -CPL(poli- ϵ -kaprolaktam), PLGA ve PLA sayılmaktadır [116].

2.5. Çözücü Uzaklaştırma (Solvent Casting) Yöntemi ile Polimerik Film Üretimi ve Kullanım Alanları

Şekil 8.'de şematik olarak gösterilen çözücü uzaklaştırma yöntemi ile polimerik film üretimi genel olarak polimer malzemenin organik çözücünde çözülmesi ve çözücüsünün buharlaştırılmasına dayanmaktadır. Çözücü uzaklaştırma yöntemi ile film üretiminde filmin ham maddesini oluşturan polimerin seçimi en önemli adımdır. Bunun için polimer mutlaka su veya organik bir çözücü içerisinde tamamen çözünebilir özellikte olmalıdır. Homojen karışım elde edilmesi filmde minimum düzeyde katı polimer kalıntısı olması ve viskozitenin ayarlanabilir olması açısından önemlidir. Hazırlanan karışımdan çözücünün uzaklaşabilme yeteneği filmin özelliklerini doğrudan etkilemektedir [117].



Şekil 8. Çözücü uzaklaştırma yöntemi ile film üretimi şematik gösterimi

Polimer çözeltisi içerisine ilave edilecek olan anti-bloklayıcılar, anti-statik bileşikler, şelatlama ajanları, elektrik iletici maddeler, renk pigmentleri gibi bileşenler sayesinde filme istenilen özellikler kazandırılmaktadır.

Çözücü uzaklaştırma yöntemi ile film üretiminin tüm aşamalarında polimer çözeltisi/ polimerik film kısmen düşük termal ya da mekanik baskılara maruz kalmaktadır. Bu işlemler sonucunda bazen bozulma ya da yan reaksiyonlar meydana gelebilmektedir.

Katı haldeki polimer pul, granül, ince levha veya toz gibi farklı geometrik şekillerde olabilmektedir. Temel olarak polimer ve çözücü bir karıştırıcı yardımı ile homojen şekilde karıştırılabilmektedir. Ancak çözücülerin viskozitelerine göre karıştırıcı geometrisi iyi seçilmelidir. Ayrıca tam çözünme sağlamak için ısıtma ya da soğutma işlemi gerekebilmektedir. Sıcaklığın ve çözelti konsantrasyonunun çözünme işlemi üzerindeki etkisi büyüktür. Bunun yanında çözücü buharlaşma oranı, film yüzey morfolojisi etkili olup polimer zincirinde bozukluklar meydana getirebilmektedir. Çözünme sıcaklığı oda sıcaklığı ile çözücünün kaynama noktası arasındaki değerlerde olduğu zaman ve katı konsantrasyonu %5-40 iken genellikle polimer çözeltilerinin viskozitesi 1500 mPas değeri ile 80000 mPas aralığında olmaktadır. Tetrahydrofuran (THF) içinde kolay çözünmeyen Polivinil klorür (PVC) gibi polimerlerde çözünme miktarını arttırmak için vakum altında karıştırma yapılmaktadır. Karıştırmanın etkisi ile homojen haldeki polimer çözeltisinin içinde hava kabarcıkları meydana gelmektedir. Bu baloncuklar filmin yüzey yapısını olumsuz etkileyeceği, çözücünün buharlaşmasını engelleyeceği ve film kalınlığının stabilitesini bozacağı için çözeltilerden uzaklaştırılmaktadır. Bunun için polimer çözeltisi kısa bir süre dinlenmeye bırakılır ve arkasından hafif çalkalama işlemleri ile yok edilmektedir [118] [119].

Çözücü uzaklaştırma yöntemi için önemli bir adım olan polimer çözeltisinin hazırlanması tamamlandıktan sonra cam petri kaplarının içerisine çözeltilerden dökülür. İlk olarak oda şartlarında çözücünün filmden uzaklaşması sağlanmaktadır. Daha sonra film vakum fırınında ya da etüv içerisinde kontrollü şekilde ısıtılarak kurumaya bırakılmaktadır. Tamamen kurutulan film cımbız yardımıyla cam yüzeyden kaldırılmakta ve nemden

korunarak muhafaza edilmektedir. Ghorpade ve ark. Yaptıkları bir çalışmada kloroform ile hazırlanmış olan PLLA (Poli L Laktik Asit) çözeltisinden 150 µl kadar alınıp çapı 22.1 mm olan cam petri kaplarında PLLA filmler hazırlamışlardır. 150 µl'den fazla çözelti kullandıklarında kloroformun uzaklaşmadığını ve kurumuş bir film elde edemediklerini göstermişlerdir [120].

Bu yöntemle elde edilen filmler çeşitli alanlarda kullanılabilirler. Bunlar; selüloz triasetat filmler fotoğraf teknolojisinde, polivinil alkol filmler yüksek uzayabilme yetenekleri sayesinde ve üzerlerine organik boyaların yüklenebilmesi sayesinde polize olma eğilimleri arttığı için LCD ekranlarda, selüloz diasetat filmler gözlük camı kaplamalarında, şeffaf gıda ambalajlarında, grafik sanatında, güneşliklerde sıklıkla kullanılmaktadırlar [121] [122].

2.6. MALDI-MS'de Numune Platformu Olarak Polimerik Film ve Nanolif Kullanımı

MALDI tekniği uçucu olmayan ve termal olarak hassas olan biyomolekül ve sentetik polimerler gibi büyük moleküller için yumuşak iyonlaştırma sağlamaktadır [123] [124].

MALDI'de lazerin enerjisini analit üzerine tam aktarabilmek için organik matriks molekülleri kullanılmaktadır. Ancak matriks kullanımı daha çok örnek hazırlama işleminden kaynaklı olarak analit moleküllerinin homojen olmayan şekilde dağılmasına da sebep olmaktadır. MALDI örnek plakası üzerinde analit moleküllerinin yoğunlaştığı bölgelere en etkili nokta ("sweet spot" ya da "hot spot") denilmektedir. Bu kısımlarda S/N oranı en yüksek değerlere ulaşmaktadır. S/N oranı tespit edilmeye çalışılan moleküle ait sinyalin geride kalan gürültü piklerine oranını ifade etmektedir. S/N için hassasiyetin rakamsal değeridir denilebilir. S ve N arasındaki farkın daima fazla olması istenmektedir. Fark ne kadar fazla ise ölçüm o kadar

hassastır. S/N oranı analit molekülüne ait MALDI-MS pikinin yoğunluk ölçümünün belirsizliğini tanımlamaktadır. Kütle spektrometresi spektrumlarını yorumlarken S/N oranının hesaplanıp kullanılmasının sebebi iyonlaşan analit molekülü ile birlikte birçok iyonun da detektöre ulaşması ve bunların sinyal şiddetini yorumlarken hatalara sebep olmasıdır. Analite ait sinyal değerindeki hatalara iyon kaynağının etkinliği, yeterli miktarda iyonlaşma yapıp yapamadığı, iyonların detektöre iletimindeki aksaklıklar sebep olmaktadır. Spektrumlarda çıkan gürültüler ise elektriksel aksamdan kaynaklanan olumsuzluklar, kimyasal kontaminasyon, cihazdaki kirli gaz kalıntılarında kaynaklanmaktadır. Eğer bu hataların olmadığı durumlarda analiz yapılırsa hassasiyeti çok yüksek sonuçlar elde edilebilmektedir. Yüksek hassasiyet S/N oranının yüksekliği ile gösterilmektedir. Gürültü genellikle elektronik düzeneden kaynaklanmakta ve sadece sinyaller arasında değil bazen de analit sinyali üzerinde çıkmaktadır. Bu etkin noktaları tespit edebilmek çok zaman alıcı bir işlem olduğu gibi yöntemin standartlaştırılması açısından da sıkıntı olmaktadır. Matriks içeren MALDI analizlerinde örnek hazırlamak hassas ve kişiye bağımlılığı yüksek olduğu için homojenliği arttıran ve kullanımı kolay örnek yüzeyleri geliştirilmiştir [125] [126] [127] [128].

Sunner ve ark. 1995 de ilk olarak geliştirmiş oldukları Yüzey Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaşmalı Kütle Spektrometresi'nde (SALDI-MS) matriks kullanılmadan yüzeyin UV absorplama yeteneğinden yararlanarak analiz yapılmaktadır [129]. SALDI 'de yüzey olarak genellikle mikro ve nano mertebeli karbon [129] [130], silikon [131] [132], metaller [133] [134] [135] ve polimerler kullanılmaktadır. Polimerin desorpsiyon işlemini üstelendiği literatürdeki çalışmalarda analiz yöntemine Polimer Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaşmalı Kütle Spektrometresi (PALDI) ismi verilmektedir. Polimer kullanımı hem sentezi kolay olduğu için hem de UV absorplama yetenekleri yüksek olan polimerler kullanılabilirdiği için

avantajlıdır [136] [137]. PALDI'de tıpkı SALDI'de olduğu gibi matriks kullanılmadan analiz yapılabilir. Matriks kullanılmadan yapılan SALDI ve PALDI kütle spektrometre analizlerinde küçük moleküller [130], peptitler [138] başarılı şekilde analiz edilirken protein gibi büyük moleküllerin bu yüzeyler üzerinde iyonlaşması sınırlı olduğu için büyük moleküllerin analizi için tercih edilmemektedirler. Bir yüzey üzerindeki yüksek molekül ağırlıklı moleküllerin yüksek vakum şartlarında fragmentlerine ayrılabilmesi için lazer şiddetinin artırılması gerekmektedir. Bu durum özellikle biyolojik kökenli moleküller için dezavantajlı olmaktadır çünkü yüksek lazer etkisiyle moleküllerin yapıları bozulmakta ve analiz edilememektedirler [139] [140] [135].

SALDI'ye alternatif olarak geliştirilen ME-SALDI (Matriks Yardımlı SALDI)de kullanılan organik matriks sayesinde poroz yüzeyler üzerinde foton absorpsiyonu artırılarak S/N oranı artırılmaktadır [141]. Lu ve ark. 2013 yılında yapmış oldukları çalışmada ilk kez elektroçekim polimerik ve karbon nanolifler SALDI ve ME-SALDI örnek yüzeyi olarak kullanılmıştır. Nanolif üretimi için seçtikleri polimerler PAN (poliakrilonitril), PVA (polivinil alkol) olmuştur. %20'lik (w/v) PAN nanolif üzerine 25-50 mg/ml aralığındaki konsantrasyonda hazırlanmış olan polistiren çözeltisi Sinapik asit (ya da Sinapik asit, $C_{11}H_{12}O_5$) MALDI matriksi varlığında kütle spektrometresinde analiz edilmiş ve standart sapma MALDI çelik plakasında %60 iken nanolif üzerinde %20 hesaplanmıştır. Bu sonuç elektroçekim yöntemi ile hazırlanan nanolifin LDI kütle spektrometre analizlerinde etkin bir yüzey olarak çalıştığını kanıtlamaktadır [142].

Hutchens ve Yip LDI kütle spektrometrik analizlerde kullanım kolaylığı sağlayan polimerik film örnek platformları geliştirmişlerdir. Film yüzeylerin kimyasal olarak seçici hale getirilebileceğini ve analit moleküle ait yüksek S/N oranlı analizler yapılabildiğini göstermişlerdir. Süt numunesi içerisindeki *E. coli* (Escherichia coli) lizatlarının MALDI yardımıyla tespitini

yapabilmek için DHB (2,5 Dihidrobenzoik Asit) matriks varlığında çelik MALDI plakası kullanıldığında lizatlara ait S/N oranı düşük sinyallerin bulunduğu kütle spektrumları elde edilmiştir. Ancak örnek tutucu olarak Nafion film kullandıklarında yine DHB matriks varlığında S/N oranının 100 kat arttığını görmüşlerdir [143].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Malzemeler

Siprofloksasine (CPX, Sigma (St. Louis, MO, USA)) özgül MBP sentezleyebilmek için gerekli olan malzemeler; fonksiyonel monomer olarak Metakrilik Asit (MAA), komonomer olarak 2-Hidroksietil Metakrilat (HEMA), çapraz bağlayıcı olarak Etilen Glikol Dimetakrilat (EGDMA) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)'den ve Asetik Asit (HAc) Fluka (St. Gallen, Switzerland)'dan satın alınmıştır. Kalıp molekül CPX stok çözeltisi olarak pH 4.7'deki 50 mL asetat tamponunda 0.005 g CPX çözülerek konsantrasyonu 100 ppm (300 µM) olan CPX çözeltisi hazırlanmıştır. Bütün çözeltilerde kullanılan ultra saf su elektriksel direnci 18.2 MΩ cm olan Milli-Q su saflaştırma sisteminden (Millipore Corp., Bedford, MA) alınmıştır.

MBP'ler için yıkama çözeltisi olarak Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)'den satın alınmış olan Metanol (MeOH) ve HAc hacimce 9:1 (MeOH:HAc) oranlarında karıştırılarak hazırlanmıştır [144].

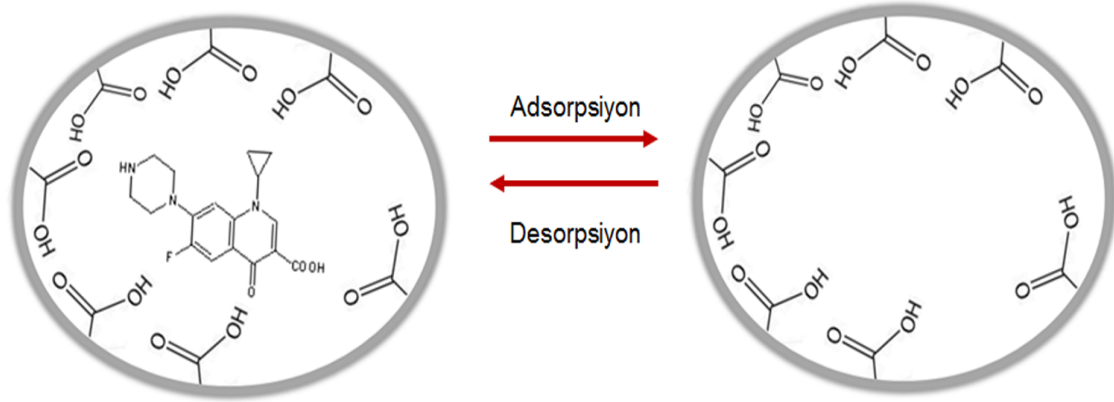
Molekül ağırlığı 339 kDa olan PLLA Purac Biomaterials (Netherlands) 'dan satın alınmıştır. Kloroform Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)'den satın alınmış ve PLLA için çözücü olarak kullanılmıştır.

MALDI analizlerinin bir kısmında kullanılan molekül ağırlığı 154.12 Da olan 2,5-dihidroksi benzoik acid (DHB) Sigma (Steinheim, Almanya)'dan satın alınmıştır.

3.2. CPX'e Özgül Baskılanmış Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

CPX'e özgül baskılanan polimerler de iki fazlı mini emülsiyon polimerizasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Bunun için 2 su fazı bir de yağ fazı hazırlanmıştır. Birinci su fazı için 93.75 mg PVA, 14.425 mg SDS ve 11.725 mg sodyum bikarbonat 5 mL deiyonize su içerisinde

çözölmüştür. İkinci su fazı için 50 mg PVA ve 50 mg SDS 100 ml deiyonize su içerisinde çözülmüştür. Yağ faz hazırlanırken ise 100 µmol CPX ve 254.1 µL MAA monomeri molar oranları 1:16 olacak şekilde karıştırılmışlardır. Karışıma 1.05 mL EGDMA ve 225 µL HEMA ilave edilmiştir. Mini emülsiyonu başlatmak için yağ fazı ile birinci su fazı karıştırılmış ve 25000 rpm'de 30 dakika homojenize (Homojenizatör, T10, Ika, (Labortechnik, Germany) edilmiştir. Homojen karışım elde edildikten ikinci su faz ilave edilmiş ve tüm karışıma başlatıcı olarak 125 mg sodyum bisülfat ve 125 mg amonyum persülfat ilave edilerek manyetik karıştırıcılı reaktörde 600 rpm, 40°C'de 24 saat polimerleşme için bırakılmıştır. Polimerleşme bittikten sonra nanopartiküller 26500 rpm'de 1 saat santrifüj (Allegra- 64 R Beckman Coulter, USA) edilerek yıkanmıştır. Monomer, başlatıcı ve yüzey aktif maddeleri polimerlerden uzaklaştırmak için ilk olarak hacimce 1:1 oranında karıştırılmış su etanol karışımı ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra deiyonize su kullanarak yıkanan nanopartiküller su içerisinde +4°C'de muhafaza edilmişlerdir. Şekil 9'da da görüldüğü gibi sentezlenen MBP'lerin kavitelerinde karboksilik asit grubu bulunmaktadır. Bu gruplar monomer MAA'dan ileri gelmektedir. CPX sahip olduğu izotiazol halkası sayesinde aromatik yapıdadır. CPX üzerindeki N atomları protonlanmış halde bulunmaktadır bu da MBP'ler üzerindeki karboksik asit grubuna karşı olan ilgiyi arttırmaktadır. Ayrıca CPX üzerindeki karboksilik asitler ile MBP'ler üzerindeki karboksilik asitler arasında biyoizoster kaynaşması meydana gelmektedir. Bu olayda bir grup atom kendine yapıcı benzeyen başka bir grup atom ile yer değiştirerek başka bir meydana getirmesidir. Yani CPX yapısındaki karboksilik asit grubu ile MBP üzerindeki karboksilik asit grubu yer değiştirerek kompleks oluşturmaktadır [145].



Şekil 9. CPX molekülünün MBP'lere bağlanması ve koparılmasının şematik gösterimi

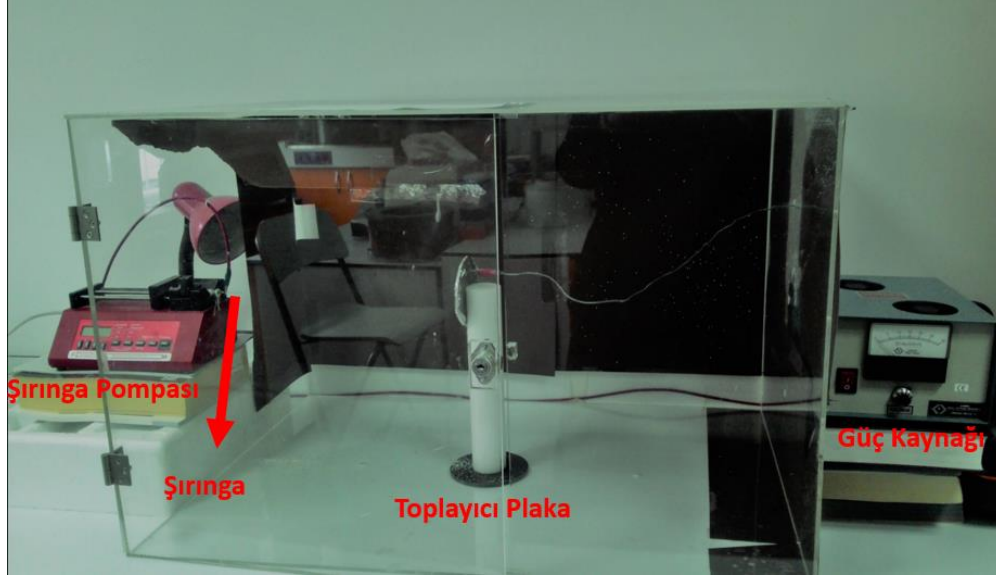
CPX baskılanmış polimerik nanopatiküllerin fonksiyonel gruplarını belirleyebilmek için FTIR (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, USA) analizi yapılmıştır. Analiz için 2 mg MBP, 98 mg KBr (IR Grade, Merck, Almanya) ile homojen olarak karıştırılmış ve tablet haline getirilmiş ve $4000-650\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında FTIR spektrumu çekilmiştir.

CPX baskılanmış polimerik nanopatiküllerin SEM'de boyut ve şekil tespitini yapabilmek için yüzeyi temiz bakır levha üzerine damlatılmış önce normal şartlarda 3 saat kurutulmuş arkasından 24 saat vakum altında oda sıcaklığında kurutulmuşlardır.

3.3. PLLA Kullanarak Elektroçekim Yöntemi ile Nanoliflerin Üretimi ve Karakterizasyonları

MALDI-MS uygulamalarında örnek tutucu olarak kullanılan PLLA polimeri ile farklı içeriklerde nanolifler üretilmiştir. Elektroçekim sistemi bir DC 0-30 kV kadarlık voltaj sağlayıcı (GAMMA High Voltage Research Inc., USA (Model: ES30P)) ve şırınga pompasından (New Era Pump Systems Inc., USA (Model: NE-300)) oluşmaktadır. Metal toplayıcı plaka alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Çalışanların güvenliğini sağlamak amacıyla elektroçekim işlemi sırasında sistem fleksi cam kabin içerisinde bulunmaktadır (Şekil

10.). Tüm çalışmalar atmosferik şartlarda ve oda sıcaklığında yapılmıştır. Pozitif elektrot şiringanın metal kısmına tutturulurken negatif elektrot metal toplayıcı plakaya tutturularak ortalama 15-240 dakika sürecek olan lif üretimi başlatılmıştır.



Şekil 10. Nanoliflerin Üretildiği Elektroçekim Sistemi

Farklı özelliklerdeki PLLA nanolifler de MALDI uygulamalarında örnek tutucu materyal olarak kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Bunun için yapısına DHB matriks ilave edilmiş, yapısına MBP ilave edilmiş ve sadece PLLA kullanılarak elde edilmiş 3 farklı nanolif üretilmiştir. Daha sonra bu nanoliflerin boyut ve şekil açısından karakterizasyonu SEM ile yapılmıştır. Kimyasal yapılarının aydınlatılması için FTIR analizleri yapılmıştır. PLLA yüzeylerde bulunan hidroksil (-OH), karboksil (-COOH) ve amit (-CONH₂) gruplarına ait pikleri görebilmek için 2600-3650 nm⁻¹ dalga boyundaki FTIR pikleri taranmıştır [146].

3.3.1. PLLA Kullanarak Elektroçekim Nanolif Üretimi

İlk olarak %4 (ağırlık/hacim, weight/volume, w/v) konsantrasyonunda polimer çözeltisini elde etmek için 0.25 g PLLA 5 mL kloroform içerisinde

çözölmüştür. Çözme işlemi 60°C'de manyetik karıştırıcıda 6 saat karıştırılarak yapılmıştır. Hazırlanan homojen çözelti şırıngaya doldurularak nanolif üretimi başlamıştır. Elektroçekim sisteminin optimum parametrelerini belirleyebilmek için farklı değerlerde işlem yapılmış en sonunda uygun şartlar belirlenmiştir. Bunun için ilk olarak en büyük etkiye sahip olan elektriksel alan şiddetini ayarlayabilmek için 10 ve 20 kV'luk elektriksel alanda denemeler yapılmıştır. Daha sonra şırınga ile toplayıcı plaka arasındaki mesafe 10 ve 12.5 cm değerlerinde çalışılmış ve son olarak da çözeltinin sisteme verilmiş hızını 0.9 mL/sa ve 1.8 mL/sa olarak ayarlayıp nanolifler elde edilmiştir [147] [148].

3.3.2. Yapısında DHB Bulunan PLLA Elektroçekim Nanolif Üretimi

Hazırlanan %4 (w/v) konsantrasyonunda PLLA polimer çözeltisini elde etmek için 0.25 g PLLA 4.5 mL kloroform içerisinde çözölürken 0.125 g DHB 500 µL DMF içerisinde çözölüp birbirlerine karıştırılmışlardır. Çözme işlemi 60°C'de manyetik karıştırıcıda 6 saat karıştırılarak yapılmıştır. Hazırlanan polimer çözeltisi elektroçekim işleminde kullanılmıştır. Sadece PLLA kullanılarak hazırlanan nanoliflerin üretiminde kullanılan parametreler dikkate alınarak gerekli ayarlamalar yapılmıştır. Nanolif üretimi için 3 mL/sa hızda sisteme polimer çözeltisi verilmiştir. Toplayıcı plaka ve şırınga arası mesafe 30 cm olarak ayarlanmış ve 20 kV'luk bir elektriksel alan altında lif üretimi yapılmıştır. Yaklaşık 3.5 saat sonunda nanoliflerin üretimi sona ermiştir.

3.3.3. Yapısında CPX'e Özgü MBP'ler Bulunan PLLA Elektroçekim Nanolif Üretimi

Elektroçekim için hazırlanan %4'lük PLLA çözeltisi içerisine 0.25 g CPX'e özgü baskılanmış polimerik nanopartiküller ilave edilmiştir. Yine manyetik karıştırıcı yardımıyla hem ısıtılmış (70°C) hem de karıştırılmıştır.

Elektroçekim yöntemi ile nanolif üretmek için şırınga ile toplayıcı plaka arası mesafe 21 cm, çözeltinin sisteme verilmiş hızı 3 mL/sa ve elektriksel alan şiddeti 16 kV olarak ayarlanmıştır.

3.4. Çözücü Uzaklaştırma Yöntemi ile PLLA Polimerik Filmlerin Üretimi ve Karakterizasyonları

Çözücü uzaklaştırma yöntemi ile sentezlenen PLLA filmler MALDI-MS uygulamalarında örnek tutucu platformlar olarak kullanılmak üzere hazırlanmışlardır. Çözücü uzaklaştırma yöntemi ile üretilen PLLA filmlerin yüzey yapılarını görüntülemek ve yapılarına ilave edilen DHB moleküllerinin filmler üzerindeki fiziksel değişikliklerini görüntülemek için SEM kullanılmıştır. Kimyasal yapılarının aydınlatılması için ise FTIR analizleri yapılmıştır.

3.4.1. Çözücü Uzaklaştırma Yöntemi ile PLLA Filmlerin Sentezi

Poroz PLLA film üretirken tıpkı lif üretiminde olduğu gibi 0.25 g toz PLLA 5 mL kloroform içerisinde son konsantrasyonu %4 (w/v) olacak şekilde çözülmüştür. Çözme işlemi 60°C'de manyetik karıştırıcı ile yaklaşık 6 saat yapılmıştır. Homojen karışım elde edildikten sonra çözelti bir süre hareketsiz tutularak içerisindeki gaz kabarcıklarının gitmesi sağlanmıştır. Daha sonra çözültiden alınan 360 µL çapı 2.4 cm olan cam petri kabına aktarılmıştır. Sonuç olarak 150 µm kalınlığında çözelti aktarılmıştır. Önce oda sıcaklığında ön buharlaşması sağlanan çözeltiler vakum altında 1 gece kurumaya bırakılmışlardır. Süre sonunda kurumuş haldeki filmler cam petri yüzeyinden cımbız ve bistüri yardımıyla ayrılmışlardır. Üretilen filmler cam petri kaplarda saklanmışlardır.

3.4.2. Çözücü Uzaklaştırma Yöntemi ile Yapısında DHB Bulunan PLLA Filmlerin Sentezi

Yapısında DHB bulunan PLLA film elde etmek için 0.25 g PLLA 4.5 mL kloroformda çözülürken 0.125 g DHB 500 µL DMF içinde çözülerek PLLA çözeltilisine ilave edilmiştir. Çözeltiler hazırlandıktan sonra DHB'li PLLA çözeltisi oda şartlarında dinlendirilmiş kalınlıkları 150 µm'yi geçmeyecek şekilde 270 µL kadar çözelti çapı 2.4 cm olan cam petri kabına dökülmüş ve önce oda şartlarında daha sonra vakum altında 1 gece kurutulmuştur. Süre sonunda petri kaplarından filmler bistüri ve cımbız yardımıyla çıkarılmış ve cam petri kaplarında muhafaza edilmişlerdir.

3.5. Hazırlanan PLLA Nanolif ve Filmlerin MALDI-MS Uygulamaları

Tüm kütle spektrum analizleri Voyager-DETM PRO MALDI-TOF-MS (Applied Biosystems, Amerika) ile yapılmıştır. Kütle spektrometresinde lazer olarak 337 nm dalga boyunda çalışan azot lazeri (Spectra Physics, USA) kullanılmıştır. Lazerin enerjisi numuneye göre gerektiğinde değiştirilmiştir. Analizler süresince iyonların hızlandırılması için uygulanan potansiyel yaklaşık 20 kV, vakum ise ortalama 10^{-8} torr'da tutulmuştur. Kütle spektrumları yaklaşık 200 lazer vuruşu sonucu toplanarak elde edilmiştir.

3.5.1. MALDI-MS Numunelerin Hazırlanması

Öncelikle MALDI analizlerinde tespit edilmeye çalışılan CPX çözeltisi hazırlanmıştır. CPX çözeltisi pH'ı 4.7 olan 5 mL asetat tamponunda 5 mg CPX'in çözülmesi ile son konsantrasyonu 100 ppm olacak şekilde hazırlanmıştır [149] (Sari ve ark.). Çizelge 2'de listelenen şekilde hazırlanan numunelerde, MALDI-MS ile yapılan CPX analizlerinden elde edilen kütle spektrumlarında CPX'in moleküler ağırlığı olan 331.4 Da için 330-335 Da aralığındaki spektrumlar takip edilmiştir. Bu aralığın seçilme sebebi örnek platformları üzerinde moleküllerin kütle değerlerinde birkaç

Da'lık sapmaların olabilme ihtimalidir. Bu durum lazerin etki mesafesinin değişmesi ile alakalıdır. CPX'e ait spektrumun taban çizgisindeki gürültüler dikkate alınarak sinyal şiddetinin doğrudan ifadesi sayılan S/N değeri hesaplanmaktadır. Bu değer CPX moleküllerinin diğer moleküllere göre şiddetinin yoğunluğunu ifade etmektedir.

Çizelge 2. MALDI-MS analizleri için hazırlanan numuneler

	CPX	MBP ve CPX
PLLA Nanolif	5 µL, 300 nmol /µL	5 µL MBP 5 µL, 300 nmol /µL CPX
DHB'li PLLA Nanolif	5 µL, 300 nmol /µL	5 µL MBP 5 µL, 300 nmol /µL CPX
PLLA Film	5 µL, 300 nmol /µL	5 µL MBP 5 µL, 300 nmol /µL CPX
DHB'li PLLA Film	5 µL, 300 nmol /µL	5 µL MBP 5 µL, 300 nmol /µL CPX

3.5.1.1. Elektroçekim PLLA Nanolif Numunelerin MALDI-MS Analizi için Hazırlanması

Öncelikle üretilen PLLA nanolifler üzerinde bulunabilecek kirliliklerden kurtulmak için deiyonize su ile lifler yıkanmış ve normal şartlar altında kurutulmuşlardır. Tüm numuneler için kullanılan lifler 0.5 x 0.5 cm boyutlarında kesilmiş ve tüm kurutma işlemleri oda şartlarında yapılarak aşağıdaki gibi hazırlanmışlardır.

- Sadece PLLA kullanılarak elektroçekim yöntemi ile üretilen nanolif üzerine 5 μ L 100ppm konsantrasyonunda CPX çözeltisi damlatılmış kurutulmuş ve arkasından yıkanarak tekrar kurutulmuştur.
- Sadece PLLA kullanılarak hazırlanan nanolifin üzerine 5 μ L CPX'e özgü MBP damlatılmış kurutulmuş yıkanmış ve daha sonra tekrar kurutulmuştur. Kuruduktan sonra lif üzerine 5 μ L 100ppm konsantrasyonunda CPX çözeltisi damlatılarak kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lif deiyonize su ile yıkanmış ve tekrar normal şartlar altında kurutulmuştur.
- Yapısında DHB bulunan PLLA nanolifler üzerine doğrudan 5 μ L 100ppm konsantrasyonunda CPX çözeltisi damlatılmış kurutulmuş ve deiyonize su yıkanarak fazla CPX'lerden arındırılmıştır. Yıkamadan sonra normal şartlar altında kurutulan nanolif analize hazır hale getirilmiştir.
- Yapısında DHB bulunan PLLA nanolif üzerine 5 μ L CPX baskılanmış nanopartiküller damlatılmış kurutulmuş ve deiyonize su ile yıkanarak normal şartlar altında tekrar kurutulmuştur. Kuruyan nanolif üzerine 5 μ L 100ppm konsantrasyonunda CPX çözeltisi damlatılarak kurutma ve yıkama işlemleri yapılmıştır.

3.5.1.2. Çözelti Uzaklaştırma Yöntemi ile Üretilen PLLA Filmlerin MALDI-MS Analizleri için Hazırlanması

CPX ile modifiye edilen PLLA filmler aşağıda listelendiği şekilde hazırlanmıştır.

- PLLA film üzerine 5 μ L 100ppm konsantrasyonunda CPX çözeltisi damlatılarak kurutulmuş ve deiyonize su ile yıkanıp film tekrar normal şartlar altında kurutulmuştur.
- PLLA film üzerine 5 μ L CPX'e özgü baskılanmış polimerik nanopartiküller damlatılıp kurutulduktan sonra yıkanmış ve ardından

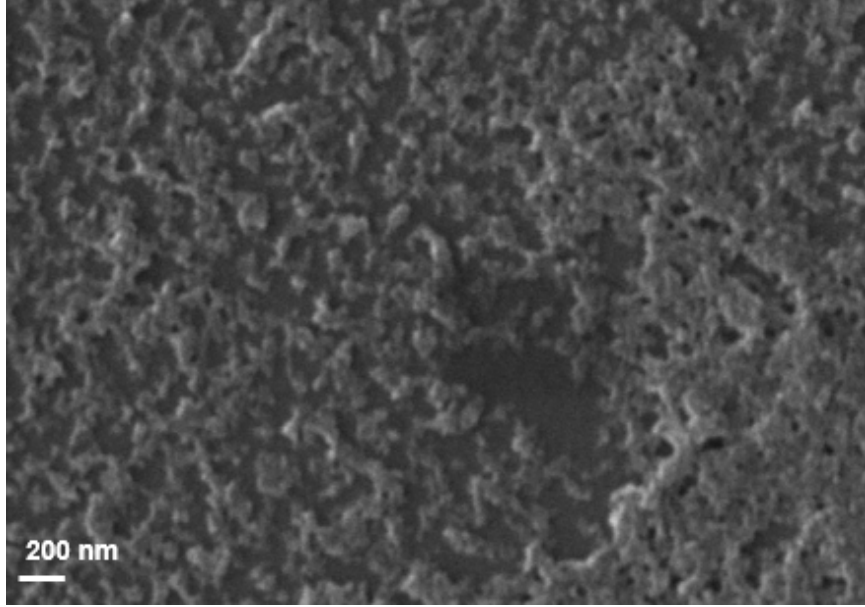
CPX çözeltisi damlatılarak kurutulmuştur. Son olarak film kullanılmadan önce deiyonize su ile yıkanarak kurutulmuştur.

- Yapısında DHB bulunan PLLA film üzerine CPX çözeltisinden 5 µL damlatılmış kurutulup fazla moleküllerin uzaklaştırılması için deiyonize su ile yıkanmış olan film normal şartlar altında kurutulmuştur.
- Yapısında DHB bulunan PLLA film üzerine önce 5 µL CPX'e özgü baskılanmış nanopartiküller damlatılıp yıkanıp kurutulmuş ardından 5 µL CPX çözeltisi damlatılmış ve yıkama kurutma işlemleri tekrar yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMALAR

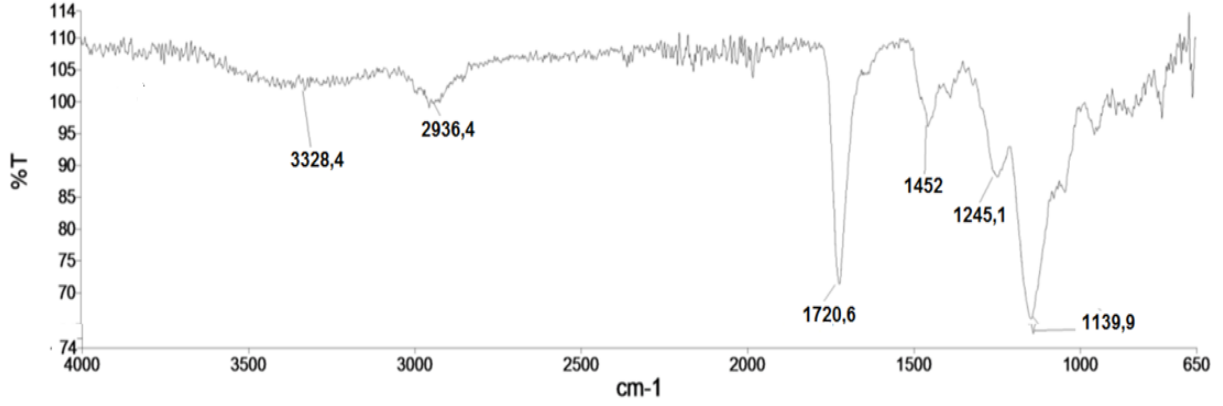
4.1. Cpx'e Özgü Baskılanmış Polimerik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Yüzey Elektron Mikroskopu kullanılarak CPX baskılanmış polimerik partiküllerin SEM görüntüleri incelendiğinde küresel şekilde olduğu ve boyutlarının yaklaşık 160 nm olduğu görülmüştür (Şekil 11).



Şekil 11. CPX baskılanmış Polimerik Nanopartiküllerin SEM görüntüsü

Sari ve ark. (basılmamış data) CPX baskılanmış polimerik nanopartiküllerin FTIR spektroskopisi ile kimyasal karakterizasyonları yapılmıştır. Şekil 12.'deki spektrumda göze çarpan bantlar $3200-3300\text{ cm}^{-1}$ civarındaki O-H gerilimleridir. Bu O-H gerilimleri MAA monomerinin hidroksil gruplarıdır. MAA ve EGDMA'daki metil gruplarında bulunan alifatik C-H gerilmeleri ve eğilme bantları sırasıyla $2900-3000\text{ cm}^{-1}$ 'de ve $1150-1250\text{ cm}^{-1}$ 'de görülmektedir. $1700-1750\text{ cm}^{-1}$ C=O gerilme bantları ve $1150-1250\text{ cm}^{-1}$ civarındaki C-O gerilme bantları MAA ve EGDMA'dan gelen karbonil ve karboksil gruplarından kaynaklanmaktadır [150].



Şekil 12. CPX baskılanmış polimerik Nanopartiküllerin FTIR Spektrumu

CPX'e özgü baskılanmış polimerik nanopartiküllerine CPX moleküllerinin detaylı bağlanma analizlerini Sari ve ark. (basılmamış data) yapmışlardır. YüzeY Plazmon Rezonans (Surface Plasmon Resonance, SPR) çipleri kullanılarak nanopartiküllerin seçicilik ve hassasiyetlerini belirlenmiştir. CPX için moleküler baskılanmış polimerik nanopartiküller üzerinde CPX bağlanma kapasitesi 3.75 mg/g olarak hesaplanmışlardır. Bu nanopartiküllerin CPX özgü olduğunu kanıtlamak amacıyla yaptıkları seçicilik çalışmalarında tetrasiklin ve enroflaksazin antibiyotikleri kullanmışlardır. Sonuçta nanopartiküllerin CPX'e olan ilgileri tetrasikline göre 4.6, enroflaksazine göre 4.4 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durum sentezlenen nanopartiküllerin CPX'e özgü olduğunu kanıtlamaktadır. Aynı SPR çipleri ile yapılan CPX'in minimum tespit limiti çalışmaları, ortamda bulunan 0.32 ppm kadarlık konsantrasyondaki CPX'in bu çipler ile tespitinin mümkün olduğunu göstermektedir.

4.2. Elektroçekim Yöntemi ile Üretilen PLLA Nanoliflerin Karakterizasyonu

4.2.1. PLLA Kullanılarak Elektroçekim Yöntemi ile Üretilen Nanoliflerin Karakterizasyonu

%4 (w/v) konsantrasyonda kloroform içinde hazırlanan PLLA çözeltisi elektroçekim yöntemiyle ilk olarak elektriksel alanın 10 kV, polimerin sisteme verilmiş hızının 0.9 mL/sa ve şırınga ile toplayıcı plaka arasındaki mesafenin 10 cm olduğu şartlarda nanolife dönüştürülmeye çalışılmıştır. Ancak elektriksel alanın şiddeti az olup PLLA polimeri Şekil 13.'de de görüldüğü gibi tam olarak plaka üzerine ulaşamamış ve lifler yığılamamıştır.



Şekil 13. Toplayıcı Plaka Üzerine Kaplanmış Olan Alüminyum Folyo Üzerine Tam Toplanamamış PLLA Nanolifler

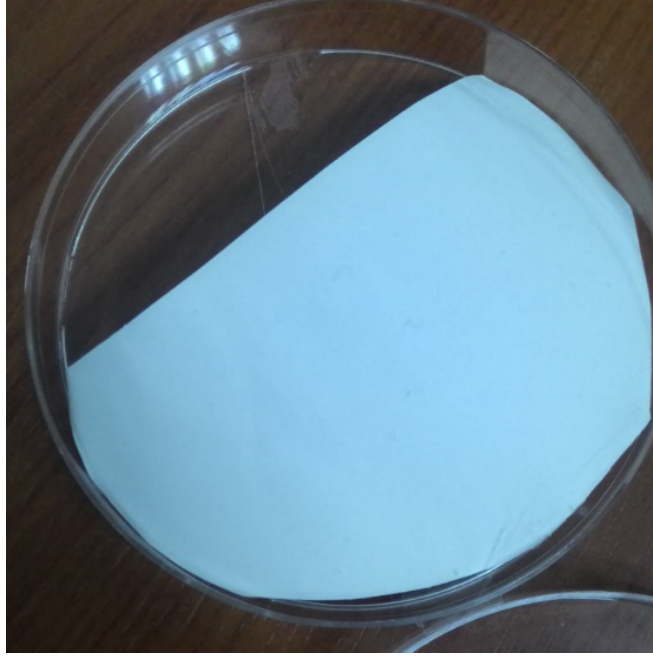
Bu durum parametrelerin yeniden düzenlemesi gerektiğini ifade etmektedir. Bu yüzden elektriksel alan şiddeti arttırılarak iki katına çıkarılmıştır. Polimer çözeltisinin sisteme verilmiş hızı (0.9 mL/sa) ve şırınga ile toplayıcı plaka arası mesafe (10 cm) sabit tutularak yapılan

elektroçekim sonucunda liflerin kısmen daha fazla plaka yüzeyinde biriktiği görülmüştür. 1 saatlik bir işlemin sonunda plaka yüzeyinde liflerin dağılımının eşit olmadığı bir süre sonra fark edilmiş (Şekil 14.) ve plaka ile şırınga arasındaki mesafe biraz daha arttırılarak 12.5 cm'e çıkarılmıştır. Yaklaşık 3 saat süren elektroçekim işlemi sonunda nanolifler elde edilmiştir. Nanolifler için ideal toplanma süresi liflerin toplayıcı plaka yüzeyinden yığılmadan, eğilmeden düzgün şekilde durabildikleri süredir. Toplayıcı plaka üzeri alüminyum folyo ile kaplanmış olup matriksiz liflerin doğrudan plakadan sökülmesi zor olduğu için etil alkol yardımıyla lifler yüzeyden kolayca ayrılmıştır.



Şekil 14. PLLA Polimerinin Elektroçekim İşleminde Toplayıcı Plaka Üzerinde Homojen Olarak Dağılmamış Olan Nanolif

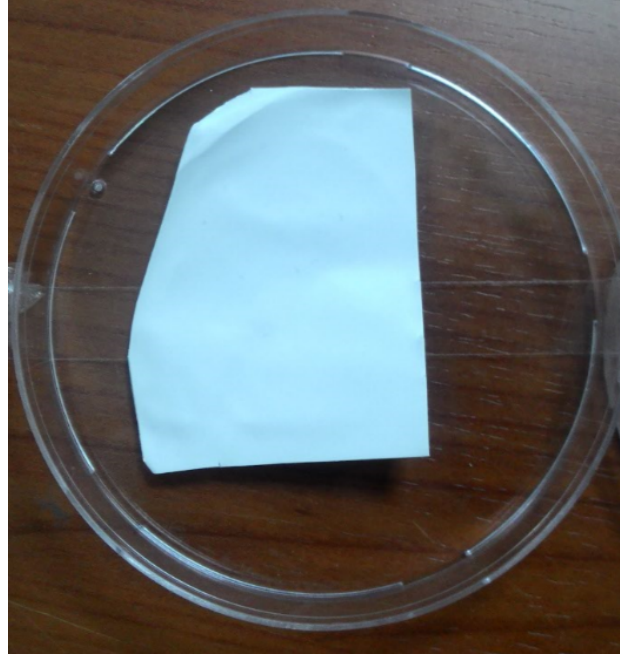
Bu şartlar altında yapılan elektroçekim işlemi ile Şekil 15.'de görülen istenildiği gibi yüzeye homojen yayılmış nanolifler elde edilmiştir.



Şekil 15. Optimum Elektroçekim Parametreleri ile Üretilmiş PLLA Nanolif

4.2.2. Yapısında DHB bulunan Elektroçekim Yöntemi ile Üretilmiş PLLA Nanolifler

0.25 g PLLA 4.5 mL kloroform içerisinde çözülürken 0.125 g DHB 500 μ L DMF içerisinde çözülüp birbirleri ile karıştırılmışlardır. Çözme işlemi 60°C'de manyetik karıştırıcıda 6 saat karıştırılarak yapılmıştır. Hazırlanan polimer çözeltisi elektroçekim işleminde kullanılmıştır. Nanolif üretimi için 3 mL/sa hızda sisteme polimer çözeltisi verilmiştir. Toplayıcı plaka ve şırınga arası mesafe 30 cm olarak ayarlanmış ve 20 kV'luk bir elektriksel alan altında lif üretimi yapılmıştır. Yaklaşık 3.5 saat sonunda nanoliflerin üretimi sona ermiştir. Bu parametrelerle üretilen nanolifler Şekil 16.'de görüldüğü gibi toplayıcı plakanın kaplandığı alüminyum folyo üzerinde homojen olarak toplanmıştır. Toplayıcı plaka yüzeyinde homojen şekilde toplanan nanolifler uygulanan elektroçekim şartlarının optimum olduğunu göstermektedir. Homojen lif birikmesi MALDI-MS örnek platformu için standart özellikte materyal elde edilmiş olması bakımından önemli olmaktadır.



Şekil 16. Yapısında DHB Bulunan Elektroçekim Yöntemi ile Üretilmiş PLLA Nanolifler

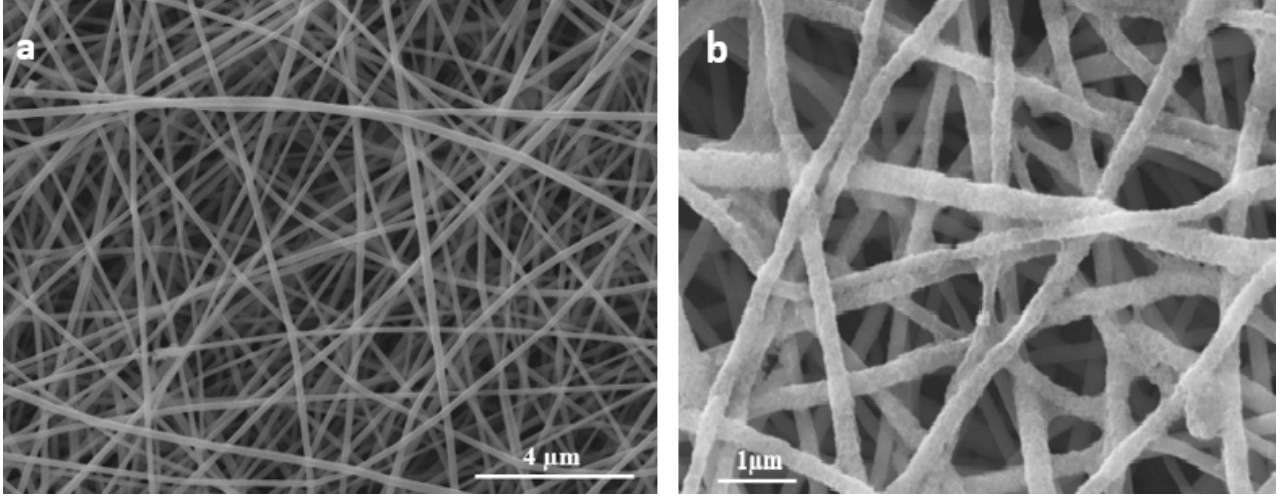
4.2.3. Yapısında CPX'e Özgü MBP'ler Bulunan PLLA Elektroçekim Nanoliflerin Karakterizasyonu

%4 (w/v)'luk PLLA çözeltisi klorofom içerisinde hazırlanırken çözeltiliye 0.25 g CPX'e özgü baskılanmış polimerik nanopartiküller ilave edilmiştir. Homojen karışım elde edildikten yapısında DHB bulunan ve bulunmayan PLLA nanoliflerin üretim parametreleri dikkate alınarak şırınga ile toplama plakası arasındaki mesafe 21 cm, polimer karışımının şırıngadan çıkma hızı 3 mL/sa ve elektriksel alan şiddeti 16 kV olacak şekilde şartlar ayarlanmıştır. Elektroçekim işlemi yapmaya başladıktan kısa bir süre sonra şırınga ucu tıkanmış ve polimer sisteme iletilemez olmuştur. Bu sorun düzeltildikten sonra plakaya doğru hareket edip toplanması gereken nanolifler taylor konisi şekline uymayıp elektriksel alan dışına savrulmaya başlamışlardır. Elektriksel alanının şiddeti arttırılıp azaltılarak işlem normalleştirilmeye çalışılsa da optimizasyon sağlanamamıştır. Dolayısıyla plaka üzerinde hiç nanolif birikmesi sağlanamamıştır ve bu türdeki nanolif üretim gerçekleşmemiştir. Bu olumsuz durumun yaşanması polimerik

yapıdaki nanopartiküllerin kloroform içinde parçalanarak yapısındaki kimyasalları açığa çıkarmasına dayanmaktadır. Serbest hale gelen MAA monomeri heksan, toluen, aseton, metilasetat, etilasetat gibi organik çözücülerde çözünebilmektedir. MBP'lerin yapıtaşı olan MAA monomerleri kloroform içerisinde düzensiz halde ve küresel şekilde durdukları için şırıngayı tıkayarak akışı engellemektedirler [151].

Elektroçekim şartları belirlenen ve üretilen DHB'li ve DHB'siz PLLA nanoliflerin daha detaylı yüzey görüntülemeleri SEM ile yapılmıştır. Ayrıca 3.5.1.1. başlığında detaylıca anlatılmış olan MALDI-TOF-MS analizleri için hazırlanmış olan üzerine MBP'ler ilave edilmiş PLLA nanolifler de SEM ile görüntülenmiştir.

Şekil 17.a.'daki SEM görüntüsü sadece PLLA kullanılarak üretilmiş nanoliflere aittir. Liflerin çapları yaklaşık olarak 200-300 nm civarında hesaplanmıştır. SEM görüntülerinde yüzeyin oldukça büyük gözeneklere sahip ve girintili çıkıntılı yapıda olduğu anlaşılmıştır. Arttırılmış olan yüzey alanı sayesinde nanolifin moleküler bazda yüklenme kapasitesi de artmaktadır. Şekil 17.b.'deki SEM görüntüsünde PLLA nanolifler üzerinde CPX'e özgü baskılanmış polimerik nanopartiküller bulunmaktadır. Nanoliflerin çaplarının yaklaşık 300-600 nm olarak hesaplanmıştır. MBP'ler PLLA liflerin çevrelerini sararak yüzeyi kaplamışlardır.



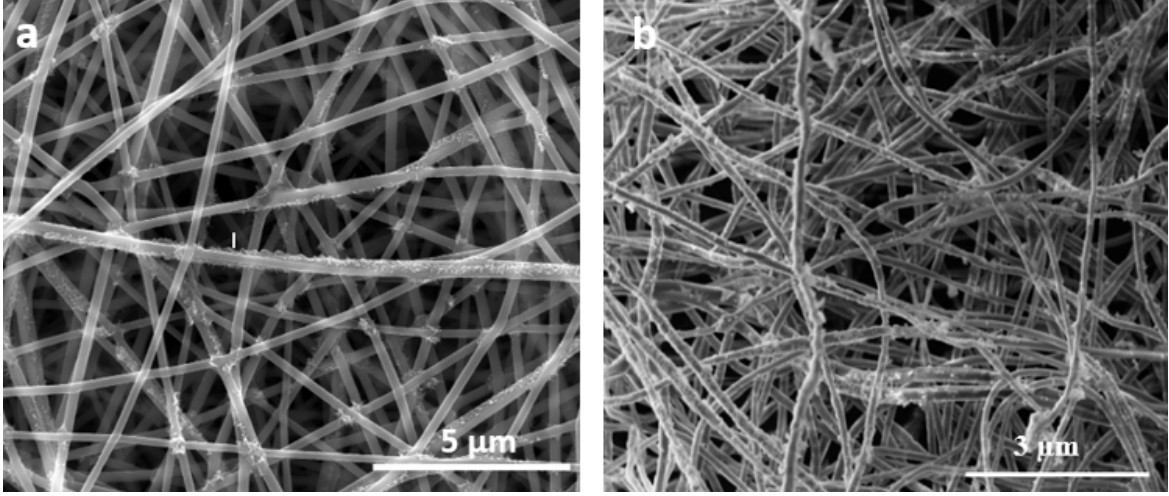
Şekil 17. PLLA Nanoliflerin SEM Görüntüsü (a), Üzerine CPX'e Özgü MBP İlave Edilmiş PLLA Nanoliflerin SEM Görüntüsü (b).

Hidrofilik özellikteki MAA monomerinden oluşan poli-MAA polimeri hidrofobik PLLA üzerinde bulunan hidroksil, karboksil ve amid gruplarına bağlanmaya oldukça ilgilidir. Poli-MAA ile modifiye edilmiş PLLA polimerlerinin hidrofobik özellikleri azalmaktadır. Özellikle polimer yüzeyindeki hidroksil ve karboksil grupları ıslanabilirlik üzerinde olumlu etkiye sahiptirler [152] [146].

Şekil 18.a.'da yapısında DHB molekülleri bulunan PLLA nanoliflerin SEM fotoğrafları bulunmaktadır. Sadece PLLA ile üretilen nanoliflerde olduğu gibi yüzey alanı oldukça geniş DHB'li nanolifler elde edildiği görülmektedir.

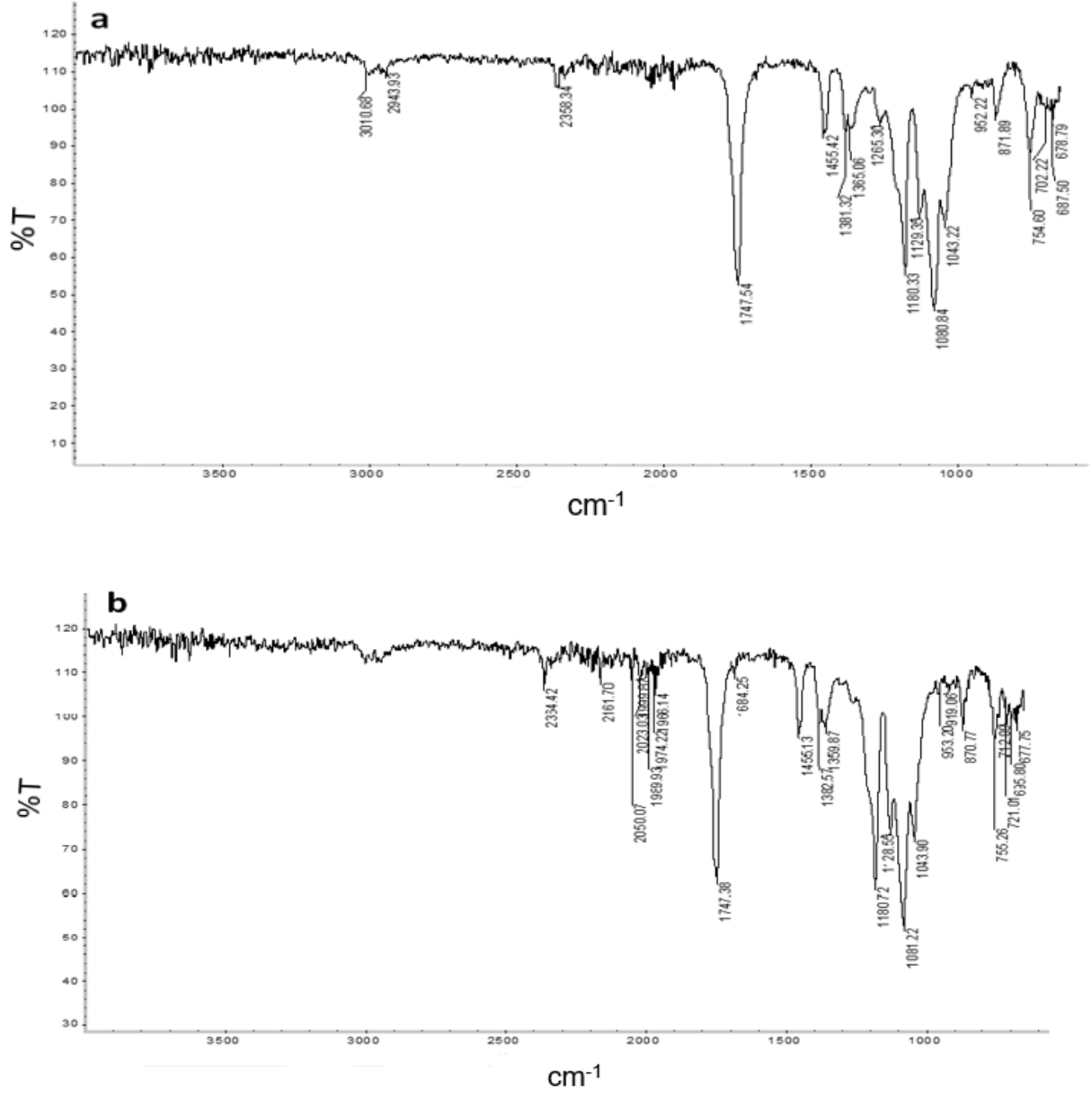
Nanolifler üzerindeki tortular kloroform içerisinde tam çözünmeden kalan DHB molekülleri. DHB DMF içerisinde çözünürken kloroformda çözünmeyip kristaller halinde kalmaktadır [153]. Şekil 18.b. yapısında DHB bulunan PLLA nanolif üzerine ilave edilmiş MBP'lere ait SEM görüntüsü bulunmaktadır. Yapısında DHB bulunan nanolifin çapı yaklaşık olarak 250-300 nm olarak hesaplanırken üzerine MBP ilave edilmiş nanoliflerin çapı yaklaşık 500 nm olarak hesaplanmıştır. Burada PLLA üzerine bağlanma isteği olan MAA monomeri kimyasal olarak tutunurken nanolifler üzerinde

kristal halde duran DHB moleküllerinin yarattığı pürüzlü yapı sayesinde MAA molekülleri fiziksel olarak da lifler üzerine tutunmaya istekli hale gelmişlerdir.



Şekil 18. Yapısında DHB Bulunan PLLA Nanoliflere (a) ait SEM Görüntüsü, Üzerine CPX'e Özgü MBP Nanopartikül İlave Edilmiş Yapısında DHB Bulunan PLLA Nanoliflerin (b) SEM Görüntüsü.

Üretilen farklı özelliklerdeki PLLA nanoliflerin kimyasal yapılarını aydınlatmak için FTIR analizleri yapılmıştır. Şekil 19.a ve b.'de verilen FTIR spektrumları sadece PLLA kullanılarak üretilen ve yapısında DHB bulunan PLLA nanoliflere aittir.



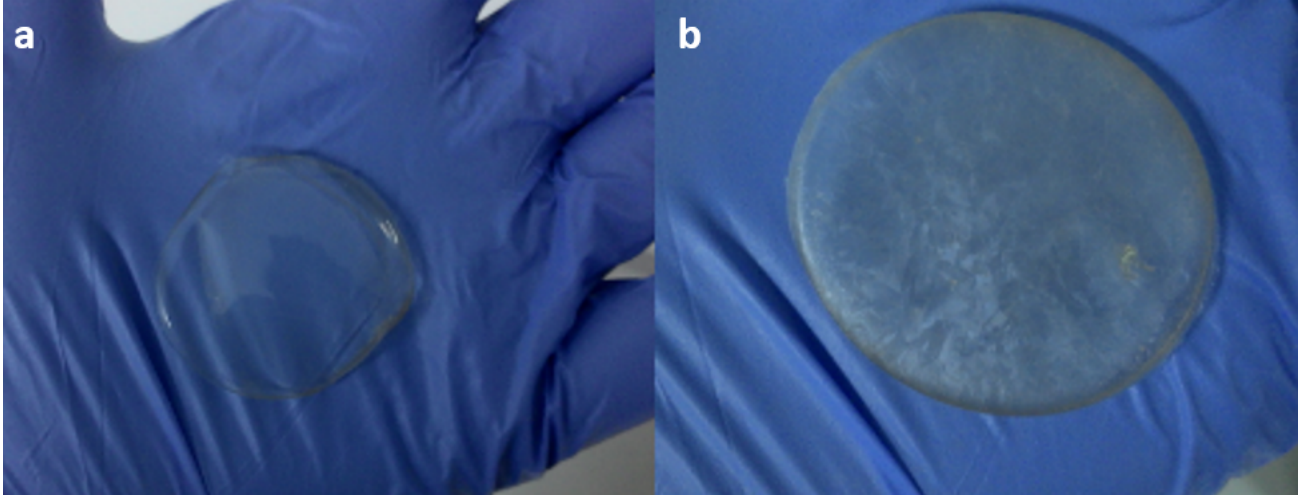
Şekil 19. PLLA ile Üretilen Nanoliflerin (a) FTIR Spekturumu, Yapısında DHB Bulunan PLLA Nanoliflere (b) ait FTIR spektrumu.

Şekil 19.a. ve b.'de görüldüğü gibi 1700-1750 cm⁻¹ aralığında çıkan pikler C=O gerilme bandlarını ifade etmektedir. 2200-2500 cm⁻¹ aralığındaki pikler analiz şartlarından kaynaklanan CO₂'den kaynaklanmaktadır. Ayrıca yapısında DHB bulunan ve bulunmayan nanoliflere ait spektrumlar karşılaştırıldığında DHB'li lifdeki 2050.07 cm⁻¹ piki karboksil grubundan

gelmektedir. Bu durum yapısında DHB bulunan PLLA nanoliflerin yüzeylerinde karboksil gruplarının var olduğunu ve CPX moleküllerinin karboksik asit grupları ile biyoizoster yer değiştirme reaksiyonuna girerek CPX moleküllerinin lif yüzeylerine tutunmalarını arttırdığının göstergesidir.

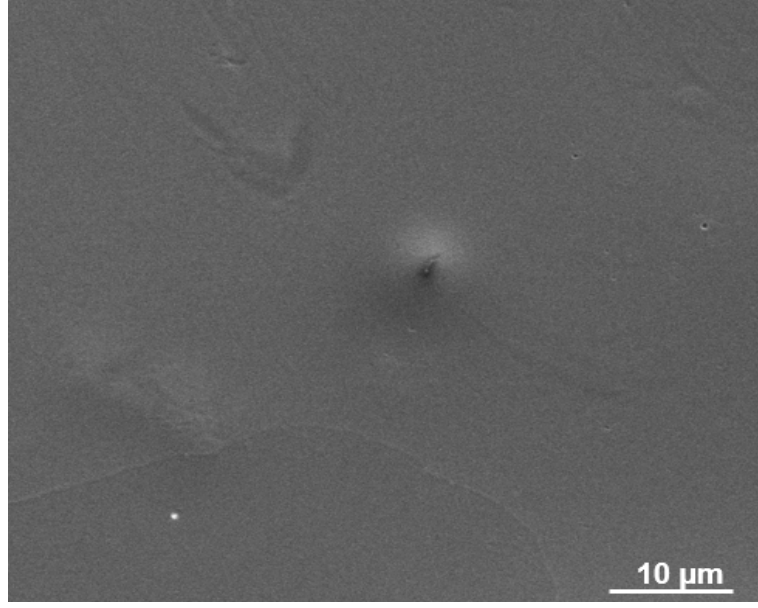
4.3. Çözücü Uzaklaştırma Yöntemi ile Elde Edilen PLLA Filmlerin Karakterizasyonu

3.4.2. başlığının altında çözücü uzaklaştırma yöntemi ile PLLA filmlerinin hazırlanması anlatılmıştır. Sadece PLLA kullanılarak hazırlanan film yüzeyi oldukça pürüzsüz, şeffaf ve parlak görülmekte iken yapısında DHB bulunan filmler daha mat, donuk renkli ve kısmen daha pürüzlü olmuştur (Şekil 20).



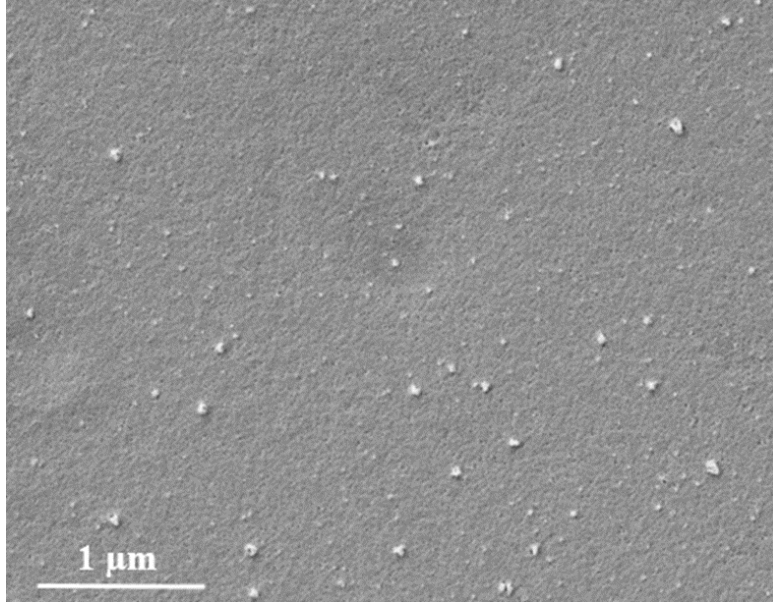
Şekil 20. Yapısında DHB Bulunmayan (a) ve Bulunan (b) PLLA Filmler

PLLA filmleri yüzeylerinin daha detaylı şekilde incelemek için SEM görüntüleri çekilmiştir. Şekil 21.'da sadece PLLA kullanılarak hazırlanmış olan PLLA filmin SEM görüntüsü bulunmaktadır. Yüzey oldukça pürüzsüz görünmektedir.

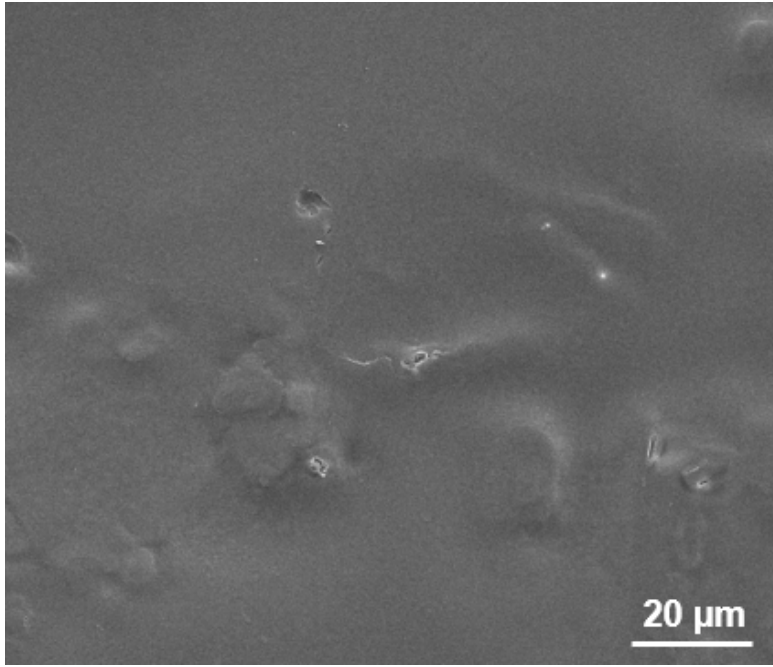


Şekil 21. PLLA Kullanılarak Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Elde Edilmiş Filmin SEM Görüntüsü

PLLA ile üretilmiş film üzerine CPX'e özgü moleküler baskılanmış polimerik nanopartiküller damlatıldığında tüm film yüzeyinin üzerini kapladığı görülmüştür. Bu durumun sebepleri PLLA film yüzeyinde bulunan hidroksil ve karboksil grupları ile MAA'nın biyoizostik yer değiştirme reaksiyonları sayesinde birbirlerine ilgi duyması ve hidrofobik özellikteki PLLA filme damlatılan MBP çözeltisinin adezyon kuvvetlerinin etkisi ile yüzeye yayılması olayları ile açıklanmaktadır [154] (Şekil 22.).



Şekil 22. PLLA Film Üzerindeki CPX'e Özgü MBP'lerin SEM Görüntüleri

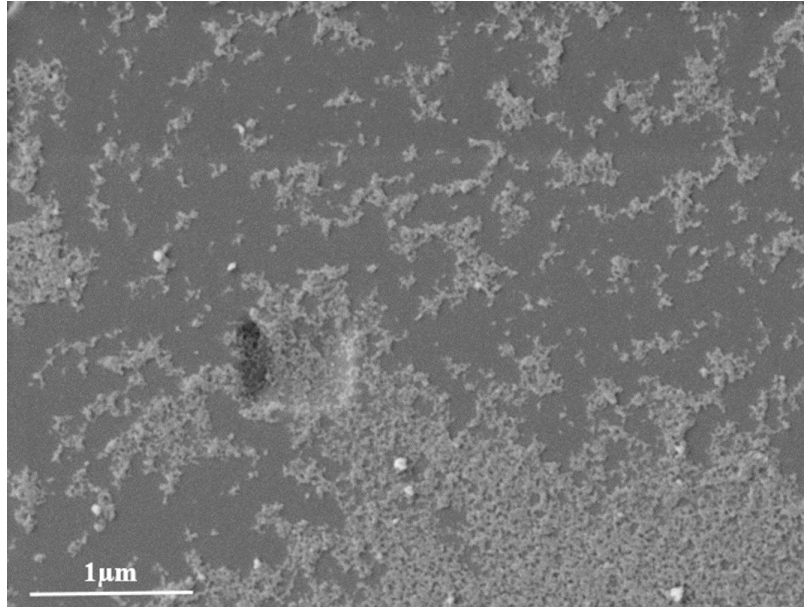


Şekil 23. Yapısında DHB Bulunan PLLA Filme ait SEM Görüntüsü

Yapısında DHB bulunan PLLA filme ait SEM görüntüsü Şekil 23.'deki gibidir. DHB kullanılmadan hazırlanan PLLA film ile karşılaştırıldığı zaman DHB kullanımının görsel açıdan herhangi bir etkisinin olmadığı yüzey

pürüzsüzlüğünün korunduğu görülmüştür. Bu yüzden MALDI-MS uygulamalarında fiziksel açıdan bir avantaj sağlamadığı görülmüştür.

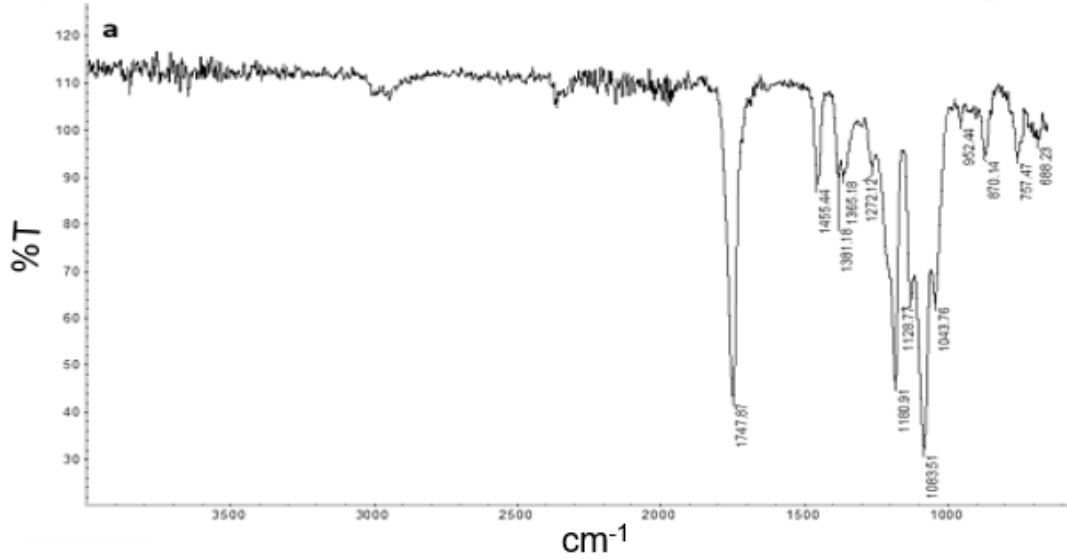
DHB kullanılarak hazırlanan PLLA film yüzeyler üzerine CPX'e özgü moleküler baskılanmış polimerler damlatıldığında tıpkı DHB'siz filmlerde olduğu gibi MBP'ler film yüzeyine yayılmışlardır. Şekil 24.'de görüldüğü gibi DHB'li film yüzeyi daha seyrek halde MBP'ler ile kaplanmıştır. Buna yüzey üzerinde kristallenmiş DHB moleküllerinin sebep olduğu düşünülmektedir.

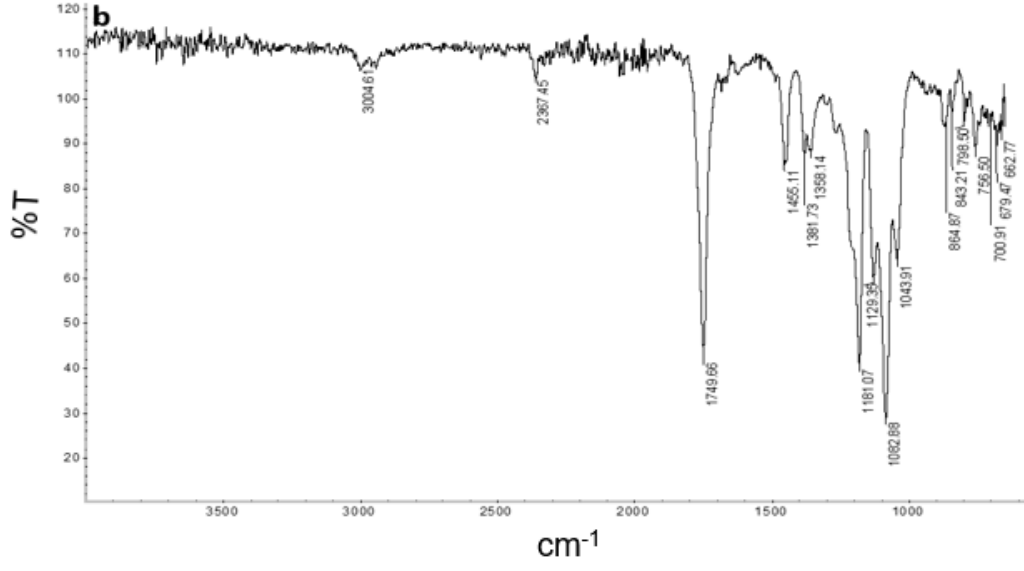


Şekil 24. DHB'li PLLA film üzerindeki CPX'e özgü baskılanmış polimerik nanopartiküllerin SEM görüntüsü

Fiziksel olarak detaylı incelemesi yapılan PLLA filmlerin kimyasal yapıları FTIR kullanılarak analiz edilmiştir. Şekil 25.a ve 25.b'deki spektrumlar detaylı incelendiğinde C=O gerilme bantlarının varlığını ifade eden 1700-1750 cm^{-1} aralığında çıkan pikler her iki spektrumda da bulunmaktadır. Yine her iki spektrumda görünen C-H gerilme bantları 2900-3200 cm^{-1} dalga boyunda görülmektedir. Yapısında DHB bulunan ve bulunmayan PLLA film yüzeyler arasında kimyasal bağ gerilimleri bakımından fark bulunamamıştır. bunun sebebi kullanılan DHB miktarının PLLA miktarına

göre çok az olması ve DHB'ye ait sinyallerin PLLA sinyalleri tarafından baskılanmasıdır. Ancak aynı karşılaştırma nanoliflere ait FTIR spektrumlarında yapıldığı zaman DHB'li lifin spektrumunda DHB'ye ait pikler görülmüştür (Şekil 19). Bu durum nanolif üretiminde kullanılan yüksek elektrik alanında DHB moleküllerinin buharlaşma eğiliminden kaynaklanmaktadır. Liflerin yüzeyinden buharlaşmak isteyen DHB'lerin bir kısmının buharlaştığı düşünülürken bir kısmının lifler yüzeyinde kristal şeklinde kaldığını söyleyebiliriz. Film üretiminde ise çözücü sadece normal şartlar altında buharlaştırıldığı için film çözeltisinin yapısındaki DHB'ler polimer yapısına tamamen karışmıştır. Dolayısıyla lif üzerindeki kristal şeklinde duran DHB'lere ait FTIR spektrumları gözlenirken aynı durum film yüzeylerde gerçekleşmemiştir.





Şekil 25. Çözücü Uzaklaştırma Yöntemi ile Üretilen PLLA Film (a) ve DHB Katkılı PLLA Film (b) FTIR Spektrumları

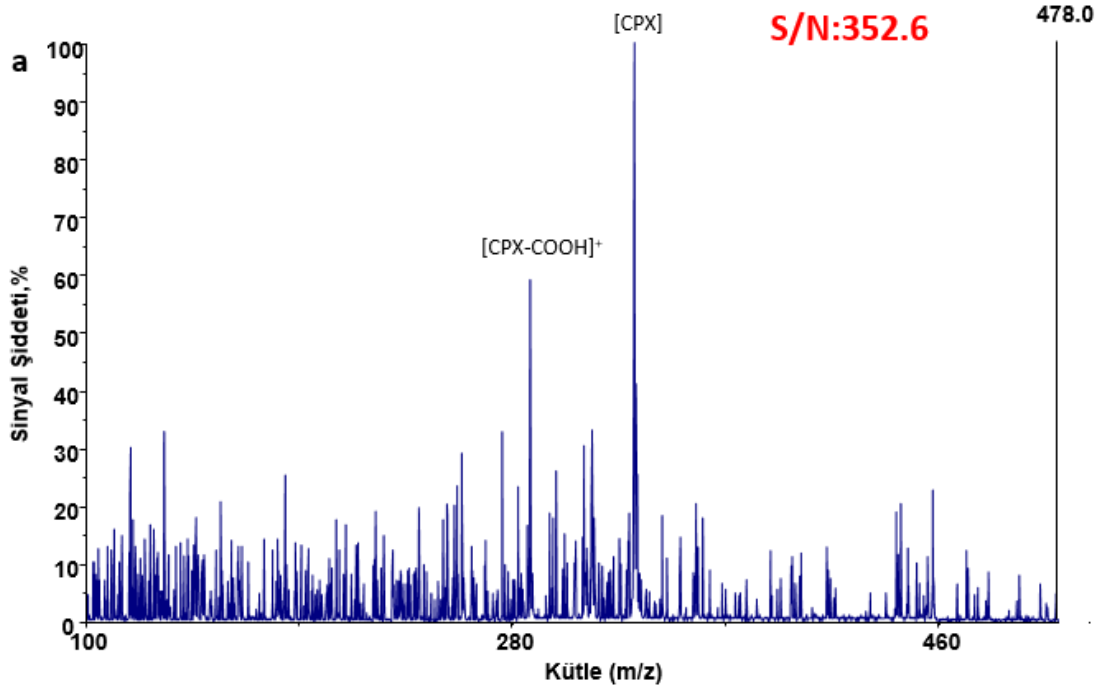
4.4. PLLA Kullanılarak Üretilen Film ve Fiberlerin MALDI-MS Analizlerinde CPX Tespitinde Kullanımları

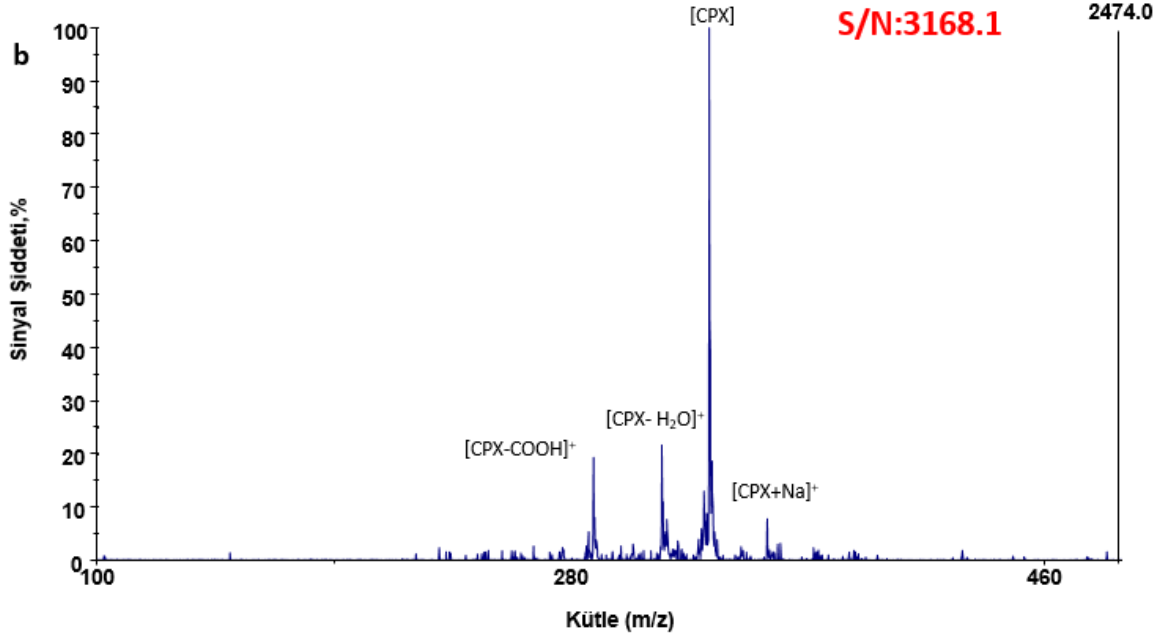
4.4.1. PLLA Nanoliflerin Üzerindeki CPX moleküllerinin MALDI-MS ile Analizi

Elektroçekim yöntemi ile üretilmiş PLLA nanoliflerin MALDI-MS uygulamalarında ilk olarak PLLA ile üretilmiş nanolifler üzerinde CPX analizi yapılmış ardından PLLA nanolifler üzerine MBP'ler eklendikten sonra CPX ilave edilerek MALDI-MS ile CPX molekülleri analiz edilmiştir. Moleküler ağırlığı 331.346 Da olan CPX molekülüne ait kütle spektrumu 330-334 m/z aralığında gözlenmiştir. Analitin m/z değerindeki spektrumun S/N oranı hesaplanmıştır. Kütle spektrumlarından S/N oranının hesaplanması S/N oranının hassasiyeti ifade etmesine dayanmaktadır. S/N analit molekülünün sinyal şiddetinin analit dışında kalan gürültülerin şiddetine oranıdır. S ve N arasındaki fark ne kadar az ise hassasiyet o kadar fazla demektir. Şekil 26.a. ve b.'de görüldüğü gibi MBP kullanılmayan ve kullanılan nanolifler üzerindeki CPX S/N oranları sırasıyla 352.6 ve 3168.1 olarak bulunmuştur. Numuneler arasındaki 9 katlık sinyal şiddeti farkı CPX'e özgü MBP'lerden ileri gelmektedir. Şekil 26.a.'da MBP ilave edilmemiş PLLA nanolif üzerinde CPX analizine ait kütle spektrumu görülmektedir. Spektrumlardan 331 m/z değeri CPX'e aitken, 287 m/z değerinde çıkan spektrum CPX çözeltisinden ayrılan muhtemelen sudan geldiği düşünülen 2 tane Na⁺ iyonunun kopması ile açığa çıkan [CPX-COOH]⁺ iyonununur. Kütle spektrumunda taban çizgisi üzerinde bol miktarda gürültü sinyallerinin olduğu görülmektedir. Bu da S/N oranının düşük olmasına sebep olmuştur.

MALDI-MS genel itibariyle yüzeyde veya yüzeye yakın yerde bulunan maddelerin iyonlaşmasına imkân sağlamaktadır. PLLA nanolifler arasındaki gözenekler MBP'ler ile kısmen doldurulmuş ve üzerine ilave edilen CPX molekülleri gözenekler arasından aşağıya süzülmeyip lifler üzerinde

kalmışlardır. Lifler üzerinde MBP'ler üzerine konumlanan CPX molekülleri lazerle kolayca iyonlaşmışlardır (Şekil 27.). CPX'e ait spektrum 331.4 m/z değerinde görülürken 313.4 m/z değerinde CPX çözeltisinden ayrılmış olan 1 mol suyun oluşturduğu $[CPX-H_2O]^+$ iyonunun spektrumu görülmüştür. Ayrıca CPX çözeltisinden ayrılan 2 adet COOH iyonunun ve CPX'e bağlanan 1 Na^+ iyonunun spektrumları sırasıyla 287.4 ve 353.4 m/z değerlerinde görülmüştür. PLLA yüzey üzerinde MBP'lerin varlığında CPX molekülleri zenginleştirilmiş ve fazla miktarda yüzeyde toplanmış olan CPX'lere ait sinyal şiddeti daha fazla olmuştur. MALDI lazer kaynağından nanoliflere aktarılan enerji aynı zamanda MBP'ler üzerinde yer alan CPX moleküllerinin iyonlaşması için de uygun bir platform oluşturmaktadır. Bu sayede konvansiyonel MALDI analizlerinde numune ile karıştırılması gereken matriks maddesi numune içerisine eklenmeden başarılı bir şekilde LDI-MS analizi yapılabilmekte ve aynı zamanda matriks sinyallerinin CPX sinyallerinin yer aldığı bölgede oluşturduğu karmaşık girişimleri de ortadan kaldırmıştır.

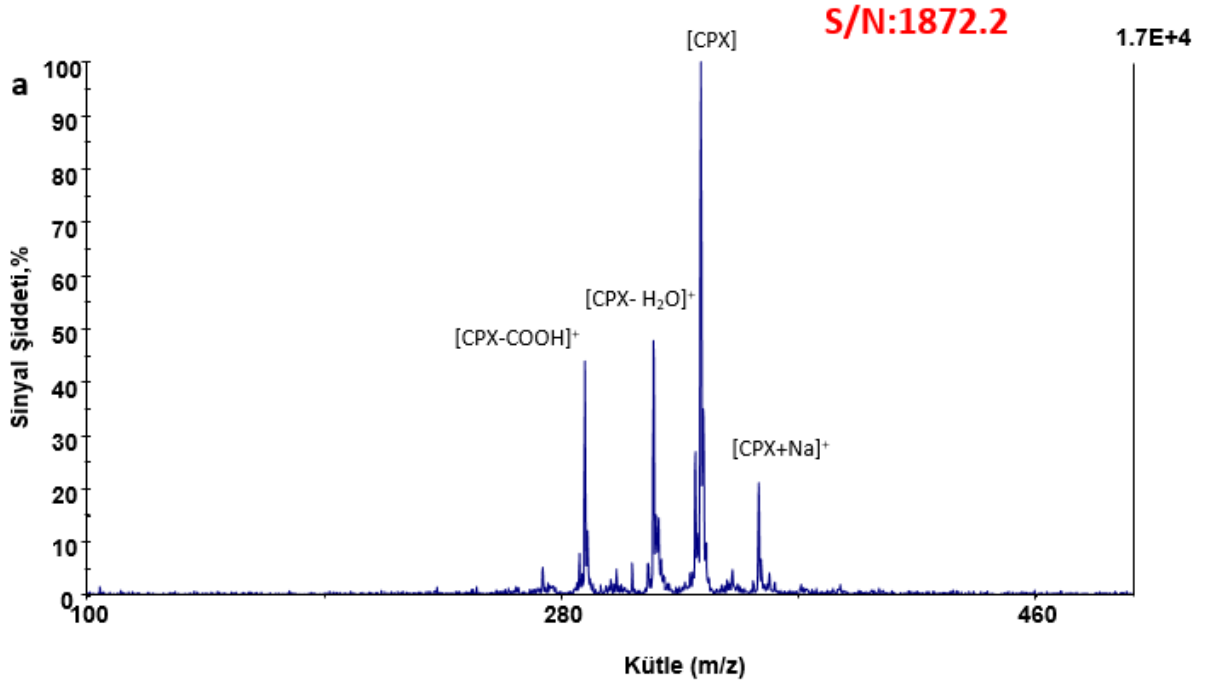


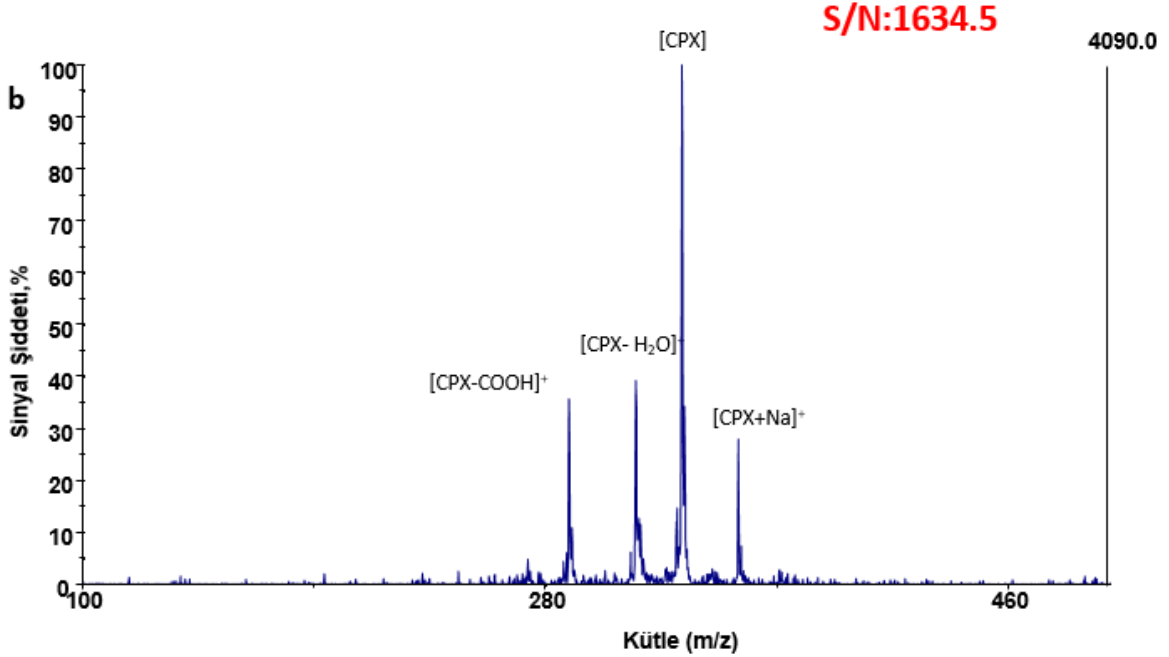


Şekil 26. PLLA Nanolifler Üzerindeki MBP bulunmadığı durumda (a) ve bulunduğu durumdaki (b) Kütle Spektrumları

Yapısına DHB ilave edilen PLLA nanolifler elektroçekim yöntemi ile üretilip üzerlerinde MBP'ler varken ve yokken CPX ile muamele edilip LDI-MS analizleri için hazırlanmışlardır. DHB'li PLLA nanolif üzerinde MBP olmadan doğrudan CPX ilavesi ile hazırlanan numunedeki S/N oranı 1872.2 olarak hesaplanmıştır. Aynı nanolifler üzerine MBP'ler eklenip CPX ile etkileştirilen numunelerde ise bu oran 1634.5 olarak hesaplanmıştır. DHB molekülleri PLLA çözeltisi içinde tam olarak çözünmeyerek yapıya katılmayıp lifler üzerinde kristal şeklinde kalmışlardır. Şekil 27.a.'da görülen kütle spektrumu ile yapısında DHB bulunmayan Şekil.26.a'da ki kütle spektrumu karşılaştırıldığında S/N oranının yaklaşık 6 kat kadar arttığı görülmektedir. Bu durum tam olarak çözünmeden lifler üzerinde kristal halde kalan DHB moleküllerinin iyonlaşma üzerindeki olumlu etkisinden kaynaklanmaktadır. Ancak bu materyale MBP'ler ilave edildiği zaman Şekil.27.b'deki spektrum elde edilmekte ve nanoliflerin yüzeyi MBP'ler ile kaplandığı için DHB, etkisini kısmen yitirmektedir. Nanolifler arasındaki gözenekler MBP'ler ile

dolduğu için CPX taşıyacak kısımlar azalmıştır. Diğer yandan MBP'ler sayesinde zenginleştirilen CPX liflerin karmaşık yüzeyinden sökülüp etkin bir şekilde iyonlaşarak detektöre ulaşmamaktadır. Liflerin yüzeyinden iyonlaşarak ayrılan CPX molekülleri birbirleri ile çarpışıp birbirlerini sönmülebilmektedirler. Hatta çarpışan iyonlar bir araya gelip daha büyük molekülümüş gibi sinyal vermektedirler. Ayrıca bu çalışmada sinyal kaybının en önemli nedeni DHB moleküllerinin PLLA çözeltisi içinde tam olarak çözünmeyerek nanolif yüzeyinde kristallenmesi ve oluşan bu kristal yapıların CPX ilavesi sırasında kısmen çözünerek MBP yüzeyinde CPX'lerin bulunduğu gözenekleri kapatarak CPX moleküllerinin düzensiz iyonlaşmalarına sebep olmasından kaynaklanmaktadır.



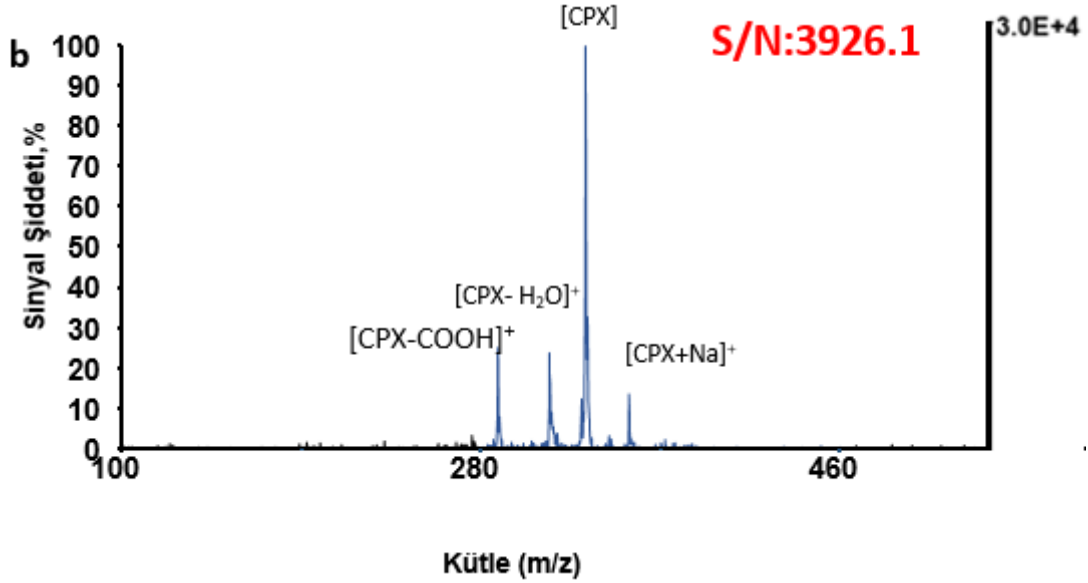
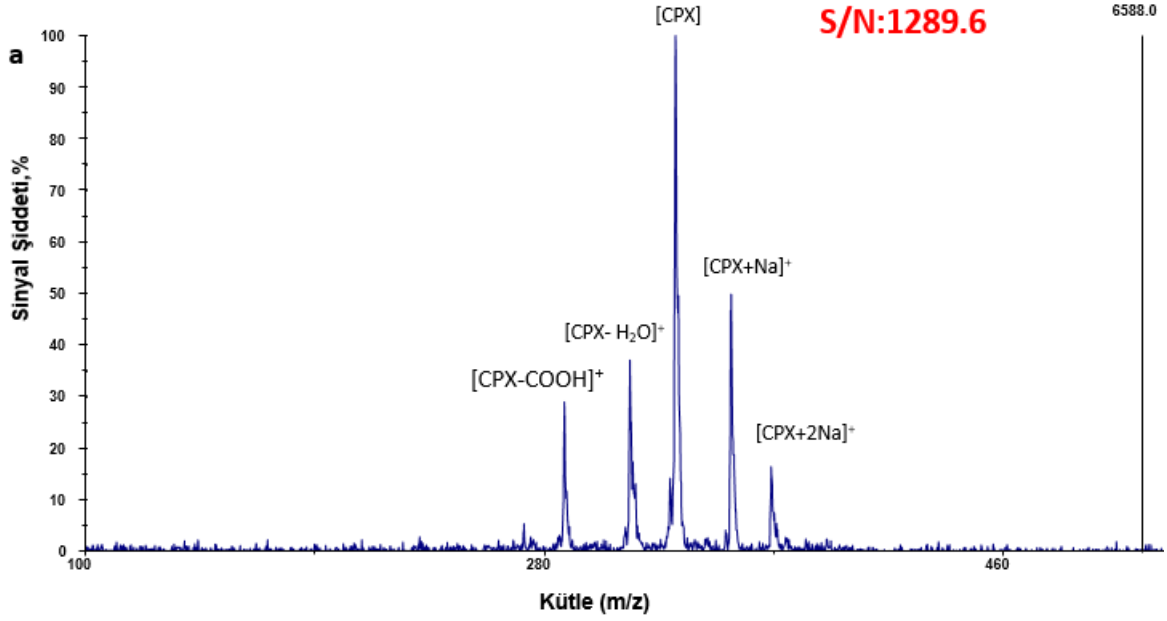


Şekil 27. Yapısında DHB Bulunan PLLA Nanolifler Üzerinde MBP İlavesiz (a) ve İlaveli (b) Hazırlanan Numunelerdeki CPX Kütle Spektrumları

4.4.2. PLLA Filmler Üzerindeki CPX Moleküllerinin MALDI-MS ile Analizleri

Bu bölümde yöntem bölümünde hazırlık aşaması detaylı şekilde açıklanan yalnız PLLA ve DHB katkılanmış PLLA filmler kullanılarak LDI-MS tekniğiyle CPX analizleri yapılmıştır. Yapısında DHB bulunan ve bulunamayan PLLA film yüzeyler üzerinde hem doğrudan CPX analizi yapılmış hem de MBP'ler ilave edilerek CPX analizi yapılmıştır. Sonuçlar birbirleri ile kıyaslanmıştır.

İlk olarak çözücü uzaklaştırma yöntemi ile elde edilen PLLA film yüzeyinde doğrudan CPX molekülleri LDI-MS'de tayin edilmiştir. Şekil 28.a.'da görüldüğü gibi CPX kütle spektrumunun S/N oranı 1289.6 olarak hesaplanmıştır. Aynı film yüzey üzerine önce CPX'e özgü MBP'ler ilave edilip sonra CPX çözeltisi eklendiği zaman S/N oranınının 3926.1' e yükseldiği görülmektedir (Şekil.28.b).

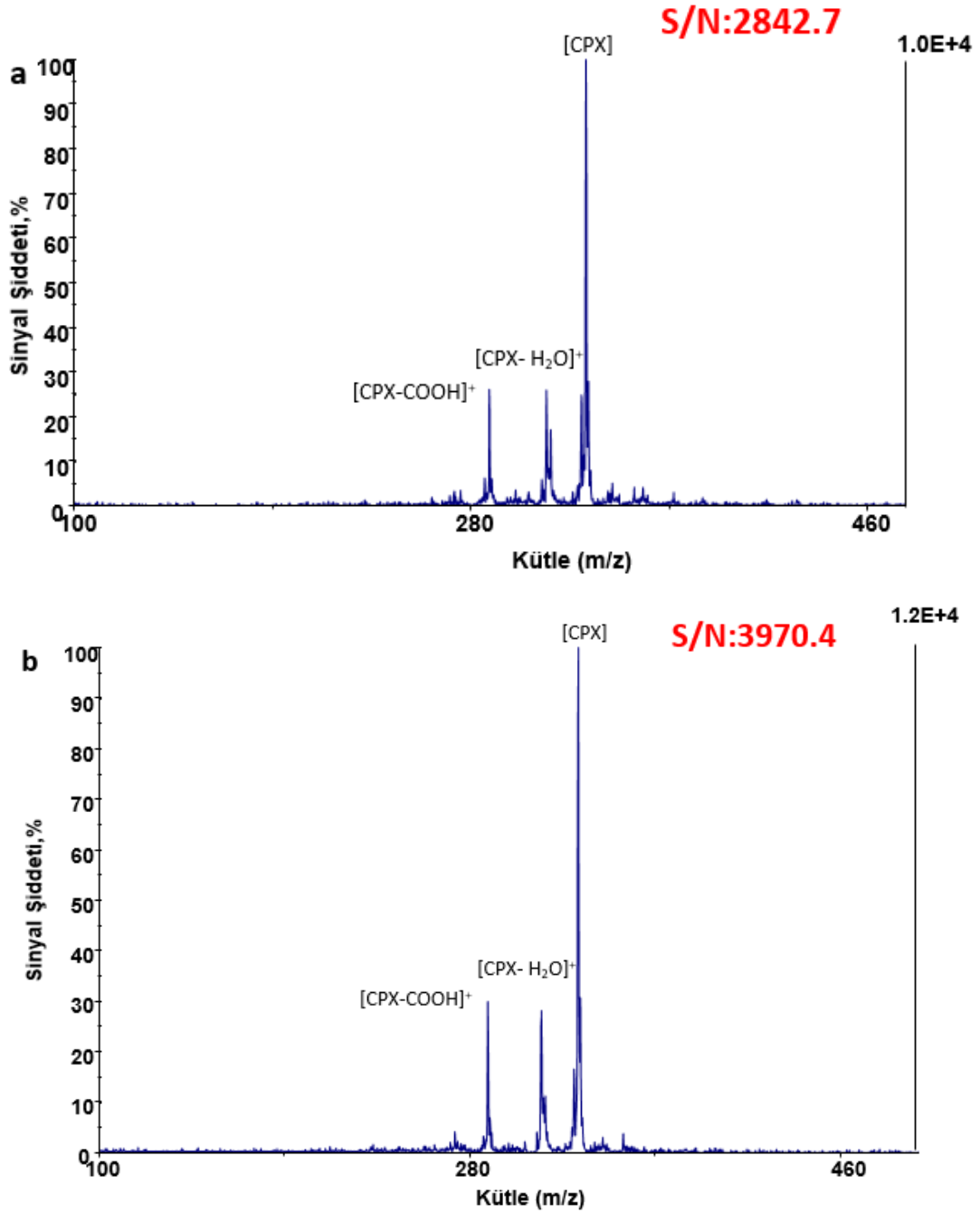


Şekil 28. (a) PLLA film üzerinde bulunan CPX'e ait kütle spektrumu ve (b) PLLA film üzerindeki MBP'ler ile zenginleştirilmiş CPX'in kütle spektrumu.

Bu artış MBP'ler üzerine tutunan CPX moleküllerinin miktarının PLLA yüzeyine tutunandan fazla olduğunu göstermektedir. Bu sonuçla tez çalışmasında öne sürülen MBP ile zenginleştirme teorisi kanıtlanmıştır. Yapıya katılan DHB matriksinin sinyal üzerindeki etkisine bakmak için önce DHB'li PLLA film yüzeyine doğrudan CPX molekülü ilave edilmiş ve film

yüzeyinde LDI-MS analizi gerçekleştirilmiştir. Ardından bu film üzerine MBP'ler eklendikten sonra CPX ilave edilerek yeniden analiz yapılmıştır.

Bu deneyler sonucunda MBP'ler kullanılmadan hazırlanan numunedeki CPX S/N oranı 2842.7 ile MBP kullanılında ise bu oran 3970.4 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar PLLA film yapısında DHB kullanımının sinyal şiddeti üzerinde 2 kat gibi bir artış sağladığını göstermiştir. Ancak yapısında DHB bulunan PLLA film yüzeylerde MBP kullanıldığında CPX sinyal şiddetinde önemli bir artış olmamıştır. Bu da MBP varlığında örnek tutucu film platformda DHB kullanımının her hangi bir etkisi olmadığını göstermiştir (Şekil.29.a ve Şekil.29.b.).



Şekil 29. Yapısında DHB Bulunan PLLA Film Yüzeyindeki yalnız CPX analizine ait (a) LDI-MS Spektrumu, Aynı Yüzey Üzerindeki MBP'lere Tutunmuş CPX'e ait (b) LDI-MS Spektrumu.

Bu durum yapısında DHB olan PLLA yüzeyine MBP ilave edildiği zamanki SEM fotoğrafında da görüldüğü gibi MBP'ler film yüzeyini kapatıp DHB'nin

etkisini örtmektedir (Şekil 24.). Ancak bu pozitif etkiyi ortadan kaldırmış gibi duran MBP'lerin sahip olduğu yüksek seçici özelliği sayesinde sinyalde herhangi bir düşmeye sebep olmamıştır. Bu durumla MBP'lerin CPX moleküllerine özgü bağlanma bölgelerine sahip olduğunu ve belirli moleküllere uygun şekilde hazırlanan MBP'lerin, ilgili moleküllerin LDI-MS analizlerinde seçici olarak başarıyla kullanılabileceklerini kanıtlamaktadır.

5. SONUÇLAR

Tez çalışması kapsamında MALDI-MS uygulamalarında zor bir basamak olan örnek hazırlama adımını kişiye ve duruma bağlı halde bir yöntem olmaktan kurtararak kolay, temiz ve etkinliği yüksek bir numune hazırlama ve analiz tekniğinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Literatürde matris yer almayan LDI-MS uygulamalarında kullanılan çok farklı türde yüzey ve iyonlaştırma platformu bulunsa da bugüne kadar yapılmış tüm çalışmalara alternatif olacak yeni bir LDI-MS analiz platformunun ve yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bunun için hedeflenen analit molekülünü diğer moleküllerden seçici olarak ayırabilen, özgünlüğü yüksek, hazırlaması, kullanımı ve raf ömrü uzun olan MBP'ler kullanılmıştır. Miniemülsiyon polimerizasyon yöntemi ile sentezlenen MBP'ler SEM ile karakterize edilmiş ve boyutlarının yaklaşık 160 nm olduğu görülmüştür. Çalışma kapsamında LDI-MS analizleri için uygun bir platform olduğu bilimsel literatürde daha önceden gösterilen PLLA polimeri kullanılarak film ve nanolif materyaller üretilmiştir. Elektroçekim yöntemi ile üretilen nanoliflerin çaplarının SEM ile yaklaşık 200-300 nm boyutlarında olduğu görülmüştür. Çözücü uzaklaştırma yöntemi ile hazırlanan film yüzeyler de SEM ile karakterize edilmiş ve yüzeylerinin pürüzsüz yapıda olduğu görülmüştür. MALDI analizlerinde sıklıkla kullanılan PLLA polimeri seçilirken elektriksel iletkenlik özelliği dikkate alınmıştır. PLLA polimerler sahip oldukları yüksek UV absorplama yetenekleri sayesinde seçilmiş ve kullanılmıştır. PLLA yüzeylerin kullanılmasıyla lazer etkisinin numuneye daha çok aktarılması sağlanmıştır. Bu malzemeler üzerinde CPX molekülleri analiz edilmiş ve her bir malzemedeki CPX bağıl kütleli sinyal şiddetleri karşılaştırılmıştır. Üzerlerine MBP'ler ilave edilen ve edilmeyen örnek tutucu yapılar sayesinde MALDI-MS analizlerine farklı bir bakış açısı getirilmiştir. Ayrıca nanolif ve film yüzeyler hazırlanırken yapılarına ilave edilen DHB

molekülleri sayesinde CPX'e ait bağıl kütleli şiddette meydana gelen değişiklikler karşılaştırılmıştır. Yapısına DHB ilave edilen nanoliflerin çapları yaklaşık olarak 300-600 nm olarak görülürken film yüzeylerde SEM görüntülerine göre fiziksel bir değişim olmadığı gözlenmiştir.

Tezin amaçları doğrultusunda yapılan analizlerde CPX'e ait elde edilen kütle spektrumlarının S/N oranları karşılaştırıldığı zaman PLLA film ve nanolif platformlardaki CPX'e ait S/N oranı sırasıyla 1289.6 ve 352.6 olarak hesaplanmıştır. PLLA film yüzey üzerinde CPX analizi yapıldığında nanolif platforma göre daha yüksek S/N oranı elde edilmiştir. Bunun sebebi liflerin gözenekli yapısıdır. Gözenekler içerisinden süzülerek derinlere yerleşen CPX molekülleri örnek platformunun yüzeyindeki CPX miktarı az olmaktadır. MALDI içindeki lazer ise numuneye yüzeyden etki etmekte ve alt kısımlarda kalan CPX moleküllerine ulaşamamaktadır. Böylece platformun taşıdığı tüm CPX'e ait sinyal alınamamaktadır. Nitekim elektroçekim yöntemi ile hazırlanan PLLA nanolifler üzerine MBP'ler ilave edilmiş olan örnek platformunda CPX analiz edildiğinde S/N oranını 3168.1 olarak hesaplanmıştır. MBP kullanılmadan yapılan analizde ise bu değer 352.6 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar bize nanolif üzerinde MBP kullanımı ile hem lif gözeneklerinin kısmen daraltılıp alt katmanlara daha az CPX süzüldüğünü hem de lif üzerindeki MBP'ler sayesinde CPX'in zenginleştirildiğini göstermektedir. MBP varlığında CPX'e ait S/N oranı MBP olmayan platforma göre 9 kat kadar artmıştır. Bu da MBP'lerin zenginleştirici özelliklerini destekler nitelikte olmuştur.

MBP'ler kullanılmadan yapılacak analizde nanoliflerdeki mevcut sorunun önüne geçip MALDI gibi numunenin yüzeyinden iyonlaşma sağlayan iyonlaştırma tekniği için uygun olacağı düşünülen filmler üretilmiştir. Filmler çözücü uzaklaştırma tekniği ile sadece PLLA polimeri kullanılarak ve yapısına DHB katılarak farklı özelliklerde üretilmişlerdir. Yüzeyi pürüzsüz olduğu SEM fotoğraflarında görülen filmler üzerine MBP ilave edilerek ya da

edilmeyerek CPX molekülleri MALDI-MS'de tespit edilmiştir. PLLA film yüzeyler üzerinde MBP'ler varlığında CPX'e ait S/N değeri 3926.1 iken MBP kullanılmayan platformlarda bu değer 1289.6 olarak hesaplanmıştır. Burada kullanılan MBP ile CPX'ler zenginleştirilmiş ve düzgün film yüzeyi sayesinde iyonlaşmanın etkinliği arttırılmıştır. MALDI-MS uygulamalarında önemli bir parametre olan numunenin iyonlaşma miktarı spektrum şiddetiyle doğrudan ilişkilidir. MBP'ler kullanılarak hazırlanan örnek taşıyıcı platformların avantajı analit molekülünü seçici olarak ayırıp başka bir işleme gerek kalmadan CPX analizine imkân sağlaması olmuştur. Burada film üzerlerine damlatılan MBP'ler film yüzeyi ile aralarındaki adezyon kuvvetinin MBP'lerin kendi içlerindeki kohezyon kuvvetlerinden büyük olması sonucu yüzeye film şeridi şeklinde yayılmaktadır. Bu sayede tek tabakalı ya da çok katlı da olsa düzgün yüzey formunu koruyan MBP kaplı polimerik filmler elde edilmiştir.

Diğer yandan yapılarında DHB bulunan nanolif ve film yüzeyler üzerinde CPX analizlerinin sonuçları karşılaştırılmışlardır. Yapısında DHB bulunmayan PLLA nanolif yüzeyler üzerinde MBP kullanımı ile yüksek S/N (3168) oranı elde edilmişti. Bu platform ile yapısında DHB bulunan PLLA nanolif üzerinde MBP kullanarak yapılan analizlerin S/N oranı (1634.5) karşılaştırıldığı zaman DHB'nin olumlu bir katkısının olmadığı görülmüştür. Aynı şekilde yapısında DHB bulunan ve bulunmayan PLLA film yüzeyler üzerinde MBP varlığında CPX analizi yapıldığı zaman DHB'li filmdeki S/N oranı 3970.6 iken DHB'siz filmde 3926.1 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak DHB kullanımı MBP varlığında hem film hem de lif yüzeylerde sinyali arttırıcı nitelikte olmamıştır.

Tüm analizler göz önüne alındığı zaman nanolif yüzeyler üzerinde MBP'lerin kullanımı S/N oranını yaklaşık 9 kat arttırırken film yüzeyler üzerinde MBP'lerin kullanımı S/N oranını yaklaşık 3 kat arttırmıştır. Bu durum tez çalışması için amaçlanmış olan MBP'ler ile zenginleştirme işleminin başarılı

şekilde yapıldığını kanıtlamıştır. Aynı şekilde hazırlanan örnek platformlar ile numune hazırlamanın geleneksel MALDI uygulamalarına göre çok daha kolay ve hızlı olduğu görülmüştür. Ayrıca MALDI için numune hazırlama kişinin yeteneklerine bağlı olmayıp standart bir hal almıştır.

Yapılan tüm bu çalışmalar CPX gibi küçük moleküllerin LDI-MS analizlerinin, hazırlanan yeni yüzeyler ve MBP'ler yardımıyla, konvansiyonel MALDI-MS analizlerinden daha etkin ve seçici şekilde, uzun numune hazırlama işlemlerine gerek kalmadan ve MALDI'de karşılaşılan matriks girişimlerini bertaraf ederek yapılabileceğini göstermektedir. Tez çalışmasının MALDI-MS uygulamaları için yol gösterici, MBP'ler için farklı kullanım alanı sağlayıcı, yapısına DHB matriks ilave edilmiş nanolif ve filmlerin kullanımı ile farklı alanlardaki çalışmalara ışık tutucu olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] D. Skoog, F. Holler ve T. Nieman , Enstrümental Analiz Teknikleri, Ankara: Bilim Yayıncılık, **2007**.
- [2] R. Bakhtiar ve . F. L. Tse, Biological mass spectrometry: A primer., *Mutagenesis*, cilt 15, no. 5, pp. 415-430, **2000**.
- [3] E. Hoffmann ve V. Stroobant , Mass spectrometry : Principles and applications, Brussels: Wiley, **2001**.
- [4] D. Skoog , F. Holler ve S. Crouch , Principles of Instrumental Analysis, Stanford : Cengage Learning, **2006**.
- [5] D. Skoog, F. Holler ve T. Nieman, Principles of Instrumental Analysis, Rochester: Saunders College Publishing, **1997**.
- [6] A. Manz, N. Pamme ve D. Lossifidis, Mass Spectrometry, %1 içinde *Bioanalytical Chemistry*, Singapore, World Scientific, **2003**, pp. 85-107.
- [7] T. Watanabe, H. Kawasaki, T. Yoneza ve R. Arakawa, Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (SALDI-MS) of low molecular weight organic compounds and synthetic polymers using zinc oxide (ZnO) nanoparticles, *Journal of Mass Spectrometry*, cilt 43, p. 1063–1071, **2008**.
- [8] M. Munson ve F. Field, Chemical ionization mass spectrometry, *Journal of the American Chemical Society*, cilt 88, no. 12, p. 2621–2630, **1966**.
- [9] K. Richard , A Quantitative Model of Ultraviolet Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Including Analyte Ion Generation, *Analytical Chemistry*, cilt 75, no. 10, pp. 2199-2207, **2003**.
- [10] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr ve F. Hillenkamp, Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption of Non-Volatile Compounds, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, cilt 78, pp. 53-68, **1987**.
- [11] H. Steen, B. Küster ve M. Mann, Quadrupole time-of-flight versus triple-quadrupole mass spectrometry for the determination of phosphopeptides by precursor ion scanning, *Journal of Mass Spectrometry*, cilt 36, no. 7, p. 782–790, **2001**.

- [12] S. Maher , S. Syed , D. Hughes , J. Gibson ve S. Taylor , Mapping the stability diagram of a quadrupole mass spectrometer with a static transverse magnetic field applied, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, cilt 24, no. 8, p. 1307–1314, **2013**.
- [13] A. Dodonov, I. Chernushevich ve V. Laiko, Time-of-Flight Mass Spectrometry, ACS Symposium Series, **1994**.
- [14] M. Vestal ve J. Campbell , Tandem time-of-flight mass spectrometry, *Methods in Enzymology*, cilt 402, p. 79–108, **2005**.
- [15] K. Medzihradzsky, J. Campbell, M. Baldwin, A. Falick, P. Juhasz , M. Vestal ve A. Burlingame , The Characteristics of Peptide Collision-Induced Dissociation Using a High-Performance MALDI-TOF/TOF Tandem Mass Spectrometer, *Analytical Chemistry*, cilt 72, no. 3, p. 552–558, **2000**.
- [16] F. Hillenkamp ve J. Katalinić, MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications, Darmstadt: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2007**.
- [17] B. Salih, Poliamin Kanser İlaçlarının CKII Enzimi ve MYC Onkoproteinler ile Etkileşim Mekanizmalarının Kapiler Elektroferez ve MALDI-MS ile İncelenmesi, DPT Projesi Sonuç Raporu, Ankara, **2005**.
- [18] C. Savran, S. Knudsen, A. Ellington ve S. Manalis , Micromechanical detection of proteins using aptamer-based receptor molecules., *Analytical Chemistry*, cilt 76, no. 11, p. 3194–3198, **2004**.
- [19] P. Wurz ve L. Gubler, Fast microchannel plate detector for particles, *Rev. Sci. Instrum*, cilt 67, no. 5, pp. 1790-1793, **1996**.
- [20] E. De Carolis, A. Vella, L. Vaccar, R. Torelli, T. Spanu, B. Fiori, B. Posteraro ve M. Sanguinett, Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology, *The Journal of Infection in Developing Countries*, cilt 8, no. 9, pp. 1081-1088, **2014**.
- [21] H. Pasch ve W. Schrepp, MALDI-TOF Mass Spectrometry of Synthetic Polymers, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2003**.
- [22] W. Bleakney, A new method of positive ray analysis and its application to the measurement of ionization potentials in mercury vapor, Minnesota: American Physical Society, **1929**.

- [23] J. Gross, Mass spectrometric analysis with a new source for the production of ion fields at thin wires or metal edges, New York: Springer Science & Business Media, **2006**.
- [24] R. Cole , Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications, New Orleans: Wiley, **2011**.
- [25] A. Burlingame, in Enzymology, Biological Mass Spectrometry, New York: Academic Press, **2005**.
- [26] G. Siuzdak, The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology, San Diego: MCC Press, **2003**.
- [27] S. Cohen ve B. Chait , Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins, *Analytical Chemistry*, cilt 68, no. 1, pp. 31-37, **1996**.
- [28] O. Vorm, P. Roepstorff ve M. Mann, Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation, *Analytical Chemistry*, cilt 66, no. 19, p. 3281-3287, **1994**.
- [29] S. Martin , J. Shabanowitz, D. Hunt ve J. Marto, Subfemtomole MS and MS/MS peptide sequence analysis using nano-HPLC micro-ESI fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, cilt 72, no. 18, pp. 4266-4274, **2000**.
- [30] R. Beavis ve B. Chait, High-accuracy molecular mass determination of proteins using matrix-assisted laser desorption mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, cilt 62, no. 1, pp. 1836-1840, **1990**.
- [31] M. Karas ve F. Hillenkamp, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons, *Analytical Chemistry*, cilt 60, no. 20, p. 2299-2301, **1988**.
- [32] B. Spengler ve R. Cotter, Ultraviolet laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins above 100,000 daltons by pulsed ion extraction time-of-flight analysis, *Analytical Chemistry*, cilt 62, no. 8, pp. 793-796, **1990**.
- [33] M. Wilm, A. Shevchenko , T. Houthaeve, S. Breit , L. Schweigerer, T. Fotsis ve M. Mann, Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry, *Nature*, cilt 379, no. 6564, pp. 466-469, **1996**.

- [34] S. Piletsky, S. Alcock ve A. Turner, Molecular imprinting: at the edge of the third millennium, *Trends Biotechnology*, cilt 19, no. 1, pp. 9-12, **2001**.
- [35] V. Pichon ve F. Chapuis-Hugon, Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants, *Analytica Chimica Acta*, cilt 622, no. 11, pp. 48-61, **2008**.
- [36] N. Otero , C. Valiño, J. Romani, E. Vázquez, A. Piñeiro ve P. Bermejo-Barrera, On-line ionic imprinted polymer selective solid-phase extraction of nickel and lead from seawater and their determination by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, cilt 395, no. 4, pp. 1107-1115, **2009**.
- [37] K. Haupt ve L. Ye, Molecularly imprinted polymers as antibody and receptor mimics for assays, sensors and drug discovery, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, cilt 378, no. 4, pp. 1887-1897, **2004**.
- [38] D. Spivak, Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, cilt 57, no. 12, pp. 1779-1794, **2005**.
- [39] O. Ramström , L. Ye ve K. Mosbach, Artificial antibodies to corticosteroids prepared by molecular imprinting, *Chemistry & Biology* , cilt 3, no. 6, pp. 471-477, **1996**.
- [40] M. Lasakova ve P. Jandera, Molecularly imprinted polymers and their application in solid phase extraction, *Journal of Separation Science*, cilt 32, no. 13, p. 799 – 812, **2009**.
- [41] M. Komiyama, T. Takeuchi, T. Mukawa ve H. Asanuma, Molecular Imprinting (From Fundamentals To Applications), Weinheim: Wiley-VCH Verlag, **2003**.
- [42] P. Cormack ve A. Elorza, Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation, *Journal of Chromatography B*, cilt 804, no. 1, p. 173–182, **2004**.
- [43] M. Davies, V. De Biasi ve D. Perrett, Approaches to the rational design of molecularly imprinted polymers, *Analytical Chemical Acta*, cilt 504, no. 2, pp. 7-14, **2004**.
- [44] T. Nicolescu, W. Meouche ve C. Brange, Tailor-made polymer beads for gallic acid recognition and separation, *Journal of Polymer Research*, cilt 19, no. 2, pp. 1-12, **2012**.

- [45] F. Dickert ve O. Hayden, Imprinting with sensor development – On the way to synthetic antibodies, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, cilt 364, no. 6, p. 506–511, **1999**.
- [46] C. Alexander, H. Andersson, L. Andersson ve R. Ansell, Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003., *Journal of Molecular Recognition*, cilt 19, no. 2, pp. 106-180, **2006**.
- [47] M. Lasakova ve P. Jandera, Molecularly imprinted polymers and their application in solid phase extraction, *Journal of Separation Science*, cilt 32, no. 7, p. 799 – 812, **2009**.
- [48] E. Sari, R. Üzek, M. Duman ve A. Denizli, Fabrication of Surface Plasmon Resonance Nanosensor for the Selective Determination of Erythromycin via Molecular Imprinted Nanoparticles, *Talanta*, cilt 150, pp. 607-614, **2015**.
- [49] X. Huang, P. Jain, İ. El-Sayed ve M. El-Sayed, Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostic and therapy, *Nanomedicine*, cilt 2, pp. 681-693., **2007**.
- [50] L. Cenci, A. Anesib , M. Busatoa, G. Guella ve A. Bossi, Molecularly imprinted polymers coupled to matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry for femtomoles detection of cardiac troponin I peptides, *Journal of Molecular Recognition*, cilt 29, p. 41–50, **2015**.
- [51] R. Pernites, R. Ponnappati ve R. Advincula, Surface Plasmon Resonance (SPR) Detection of Theophylline via Electropolymerized Molecularly Imprinted Polythiophenes, *Macromolecules Article*, cilt 43, p. 9724–9735, **2010**.
- [52] P. Jolly, V. Tamboli, R. Harniman, P. Estrela, C. Allender ve J. Bowen, Aptamer-MIP hybrid receptor for highly sensitive electrochemical detection of prostate specific antigen, *Biosensors and Bioelectronic*, cilt 75, p. 188–195, **2016**.
- [53] Y. Liu, Y. Gu, M. Lia ve Y. Wei, Protein imprinting over magnetic nanospheres via a surface grafted polymer for specific capture of hemoglobin, *New Journal of Chemistry*, cilt 38, pp. 6064-6072, **2014**.
- [54] R. Gao , X. Cui , Y. Hao , G. He , M. Zhang ve Y. Tang , Preparation of Cu(2+)-mediated magnetic imprinted polymers for the selective sorption of bovine hemoglobin, *Talanta*, cilt 150, pp. 46-53, **2016**.

- [55] G. Kyzas, D. Bikiaris ve N. Lazaridis, Selective separation of basic and reactive dyes by molecularly imprinted polymers (MIPs), *Chemical Engineering Journal*, cilt 149, p. 263–272, **2009**.
- [56] C. Alexander, H. Andersson , L. Andersson, R. Ansell, N. Kirsch, I. Nicholls, J. O’Mahony ve M. Whitcombe, Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003, *Journal of Molecular Recognition*, cilt 19, no. 1, p. 106–180, **2006**.
- [57] A. Drabovich , E. Martínez-Morillo ve E. Diamandis , Toward an integrated pipeline for protein biomarker development, *Biochimica et Biophysica Acta*, cilt 1854, p. 677–686, **2015**.
- [58] L. Anderson , Candidate-based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease, *The Journal of Physiology*, cilt 563, p. 23–60, **2005**.
- [59] D. Nedelkov , U. Kiernan , E. Niederkofler , K. Tubbs ve R. Nelson, Population proteomics: the concept, attributes, and potential for cancer biomarker research, *Molecular & Cellular Proteomics*, cilt 5, no. 1, p. 1811–1818, **2006**.
- [60] W. Jia, X. Chen , H. Lu ve P. Yan , CaCO₃-poly(methyl methacrylate) nanoparticles for fast enrichment of low-abundance peptides followed by CaCO₃-core removal for MALDI-TOF MS analysis, *Angewandte Chemie International* , cilt 45, p. 3345–3349, **2006**.
- [61] F. Hillenkamp , M. Karas , R. Beavis ve B. Chait , Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers, *Analytical Chemistry*, cilt 61, no. 3, p. 1193A–1203A, **1991**.
- [62] M. Vestal , Modern MALDI time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, cilt 44, p. 303–317, **2009**.
- [63] M. Vestal, The future of biological mass spectrometry, *The Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, cilt 22, p. 953–959, **2011**.
- [64] K. Sparbier, T. Wenzel, H. Dihazi, S. Blaschke, G. Müller, A. Deelder, T. Flad ve M. Kostrzewa, Immuno-MALDI-TOF MS: new perspectives for clinical applications of mass spectrometry, *Proteomics*, cilt 9, p. 1442–1450, **2009**.
- [65] M. Stolowitz , On-target and nanoparticle-facilitated selective enrichment of peptides and proteins for analysis by MALDI-MS,

Proteomics, cilt 12, no. 1, p. 3438–3450, **2012**.

- [66] S. Ekström , L. Wallman , D. Hök , G. Marko-Varga ve T. Laurel, Miniaturized solid-phase extraction and sample preparation for MALDI MS using a microfabricated integrated selective enrichment target, *Journal of Proteome Research*, cilt 6, p. 1071–1081., **2006**.
- [67] J. Lee , Y. Kim , M. Ha , E. Lee ve J. Choo , Immobilization of aminophenylboronic acid on magnetic beads for the direct determination of glycoproteins by matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry, *The Journal of the American Society for Mass Spectrometry* , cilt 16, p. 1456–1460, **2005**.
- [68] N. Yao , H. Chen, H. Lin , C. Deng ve X. Zhang , Enrichment of peptides in serum by C(8)-functionalized magnetic nanoparticles for direct matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis, *Journal of Chromatography*, cilt 11, no. 85, p. 93–101, **2008**.
- [69] J. Tang , Y. Liu , D. Qi , G. Yao , C. Deng ve X. Zhang , On-plate-selective enrichment of glycopeptides using boronic acid-modified gold nanoparticles for direct MALDI-QIT-TOF MS analysis, *Proteomics*, cilt 9, p. 5046–5055, **2009**.
- [70] I. Feuerstein , M. Rainer, K. Bernardo , G. Stecher , C. Huck , K. Kofler , A. Pelzer , W. Horninger , H. Klocker , G. Bartsch ve G. Bonn , Derivatized cellulose combined with MALDI-TOF MS: a new tool for serum protein profiling, *Journal of Proteome Research*, cilt 4, no. 2, p. 2320–2326, **2005**.
- [71] R. Terracciano , M. Gaspari , F. Testa , L. Pasqua , P. Tagliaferri , M. Cheng , A. Nijdam , E. Petricoin , L. Liotta , G. Cuda , M. Ferrari ve S. Venuta , Selective binding and enrichment for low-molecular weight biomarker molecules in human plasma after exposure to nanoporous silica particles, *Proteomics*, cilt 6, no. 85, p. 3243–3250, **2006**.
- [72] Y. Li , T. Leng , H. Lin , C. Deng , X. Xu , N. Yao , P. Yang ve X. Zhang, Preparation of Fe₃O₄@ZrO₂ core-shell microspheres as affinity probes for selective enrichment and direct determination of phosphopeptides using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry, *Journal of Proteome Research*, cilt 6, no. 2, p. 4498–4510, **2007**.
- [73] C. Shi , J. Meng ve C. Deng , Facile synthesis of magnetic graphene and carbon nanotube composites as a novel matrix and adsorbent

for enrichment and detection of small molecules by MALDI-TOF MS, *Journal of Materials Chemistry*, cilt 20, no. 85, p. 20778–20785, **2012**.

- [74] Y. Chang , C. Huang , C. Lin , H. Chang ve C. Wu , Mapping protein cysteine sulfonic acid modifications with specific enrichment and mass spectrometry: an integrated approach to explore the cysteine oxidation., *Proteomics*, cilt 10, no. 3, p. 2961–2971, **2010**.
- [75] C. Chang , C. Wu , Y. Wang ve H. Chang , Selective extraction and enrichment of multiphosphorylated peptides using polyargininecoated diamond nanoparticles, *Analytical Chemistry*, cilt 80, no. 3, p. 3791–9797, **2008**.
- [76] P. Jain , G. Baker ve M. Bruening , Applications of polymer brushes in protein analysis and purification, *Annual Reweiev Analytical Chemistry*, cilt 2, p. 387–408, **2009**.
- [77] J. Lee , Y. Kim , M. Ha , E. Lee ve J. Choo , Immobilization of aminophenylboronic acid on magnetic beads for the direct determination of glycoproteins by matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, cilt 16, p. 1456–1460, **2005**.
- [78] J. Tang , Y. Liu , D. Qi , G. Yao , C. Deng ve X. Zhang , On-plate-selective enrichment of glycopeptides using boronic acid-modified gold nanoparticles for direct MALDI-QIT-TOF MS analysis, *Proteomics*, cilt 2009, no. 6, p. 5046–5055, **2009**.
- [79] X. Zou, D. Liu, L. Zhong, B. Yang, Y. Lou, B. Hu ve Y. Yin, Highly specific capture and direct MALDI-MS analysis of phosphorylated peptides using novel multifunctional chitosan-GMA-IDA-Fe (III) nanosphere, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, cilt 401, p. 1251–1261, **2011**.
- [80] A. Monopoli , C. Calvano , A. Nacci ve F. Palmisano , Boronic acid chemistry in MALDI MS: a step forward in designing a reactive matrix with molecular recognition capabilities, *Chemical Commnications*, cilt 50, no. 6, p. 4322–4324, **2014**.
- [81] Y. Chang , C. Huang , C. Lin , H. Chang ve C. Wu , Mapping protein cysteine sulfonic acid modifications with specific enrichment and mass spectrometry: an integrated approach to explore the cysteine oxidation, *Proteomics*, cilt 10, p. 2961–2971, **2010**.

- [82] R. Terracciano , M. Gaspari , F. Testa , L. Pasqua , P. Tagliaferri , M. Cheng , A. Nijdam , E. Petricoin , L. Liotta , G. Cuda , M. Ferrari ve S. Venuta , Selective binding and enrichment for low-molecular weight biomarker molecules in human plasma after exposure to nanoporous silica particles, *Proteomics*, cilt 6, p. 3243–3250, **2006**.
- [83] N. Yao , H. Chen , H. Lin , C. Deng ve X. Zhang, Enrichment of peptides in serum by C(8)-functionalized magnetic nanoparticles for direct matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis, *Journal of Chromatography A*, cilt 1185, p. 93–101, **2008**.
- [84] C. Shi , J. Meng ve C. Deng , Facile synthesis of magnetic graphene and carbon nanotube composites as a novel matrix and adsorbent for enrichment and detection of small molecules by MALDI-TOF MS, *Journal of Material Chemical*, cilt 22, p. 20778–20785, **2012**.
- [85] C. Raska , C. Parker , S. Sunnarborg , R. Pope, D. Lee , G. Glish ve C. Borchers, Rapid and sensitive identification of epitopecontaining peptides by direct matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry of peptides affinity-bound to antibody beads, *The Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, cilt 14, p. 1076–1085, **2003**.
- [86] J. Jiang , C. Parker , K. Hoadley , C. Perou , G. Boysen ve C. Borchers, Development of an immuno tandem mass spectrometry (iMALDI) assay for EGFR diagnosis, *Proteomics Clinical Applications*, cilt 1, p. 1651–1659, **2007**.
- [87] K. Sparbier , T. Wenzel , H. Dihazi , S. Blaschke , G. Müller , A. Deelder , T. Flad ve M. Kostrzewa, Immuno-MALDI-TOF MS: new perspectives for clinical applications of mass spectrometry, *Proteomics*, cilt 9, p. 1442–1450, **2009**.
- [88] J. Reid , D. Holmes , D. Mason , B. Shah ve C. Borchers , Towards the development of an immuno MALDI (iMALDI) mass spectrometry assay for the diagnosis of hypertension, *The Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, cilt 21, p. 1680–1686, **2010**.
- [89] T. Hutchens ve T. Yip, New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, cilt 7, p. 576–580, **1993**.
- [90] T. Poon , Opportunities and limitations of SELDI-TOF-MS in biomedical research: practical advices, *Expert Review of Proteomics*,

- cilt 4, p. 51–65, **2007**.
- [91] Vlatakis G., L. Andersson, R. Müller ve K. Mosbach , Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting, *Nature*, cilt 361, no. 6413, pp. 645-647, **1993**.
- [92] I. Chianella, M. Lotierzo, S. Piletsky, I. Tothill, B. Chen, K. Karim ve A. Turner, Rational design of a polymer specific for microcystin-LR using a computational approach, *Analytical Chemistry*, cilt 74, no. 40, p. 1288–1293, **2002**.
- [93] Y. Hoshino , T. Kodama , Y. Okahata ve K. Shea , Peptide imprinted polymer nanoparticles: a plastic antibody, *Journal of the American Chemical Society*, cilt 130, no. 46, pp. 15242-15243, **2008**.
- [94] I. Chianella, A. Guerreiro, E. Moczko, J. Caygill, E. Piletska, I. De Vargas Sansalvador, M. Whitcombe ve S. Piletsky, Direct replacement of antibodies with molecularly imprinted polymer nanoparticles in ELISA--development of a novel assay for vancomycin, *Analytical Chemistry*, cilt 85, no. 17, pp. 8462-8468, **2013**.
- [95] A. Rachkov ve N. Minoura , Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach, *Biochimica et biophysica acta*, cilt 1544, no. 1-2, pp. 255-266, **2001**.
- [96] B. Sellergren ve C. Allender, Molecularly imprinted polymers: A bridge to advanced drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, cilt 57, no. 12, pp. 1733-1741, **2006**.
- [97] A. Bossi, P. Sharma , L. Montana , G. Zoccatelli , O. LauB ve R. Levi, Fingerprint-imprinted polymer: rational selection of peptide epitope templates for the determination of proteins by molecularly imprinted polymers, *Analytical Chemistry*, cilt 84, no. 9, pp. 4036-4041, **2012**.
- [98] Ş. Düzyer ve A. Hockenberger, Elektro çekim (Elektrospinning) yöntemi ile üretilen polyester nanoliflerin karakterizasyonu, *Tekstil Maraton*, cilt 99, no. 10, pp. 57-66, **2008**.
- [99] F. Cengiz, I. Krucinska, F. Göktepe, E. Gliscinska ve M. Chrzanowski, Elektro lif çekim (electrospinning) yönteminde proses parametrelerinin nano lif özellikleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi, *Tekstil Maraton*, cilt 16 , no. 4, pp. 21-28, **2006**.
- [100] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W. Teo, T. Yong, Z. Ma ve R. Ramaseshan, Electrospun Nanofibers: Solving Global Issue,

Materials Today, cilt 9, no. 3, pp. 40-50, **2006**.

- [101] G. Kim , Y. Cho ve W. Kim, Stability analysis for multi-jets electrospinning process, *European Polymer Journal*, cilt 42, no. 9, pp. 2031-2038, **2006**.
- [102] R. Samatham ve K. Kim , Electric current as a control variable in the electrospinning process, *Polymer Engineering & Science*, cilt 46, no. 7, pp. 954-959, **2006**.
- [103] J. He, Y. Wu ve W. Zuo, Critical length of straight jet in electrospinning, *Polymers*, cilt 46, no. 3, pp. 12640-12647, **2005**.
- [104] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W. Teo, T. Lim ve Z. Ma, Electrospinning and nanofibers, Singapore: WorldScientific Publishing Co. Pte. Ltd., **2005**.
- [105] T. Subbiah, G. Bhat, R. Tock, S. Parameswara ve S. Ramkumar, Electrospinning of nanofibers, *Journal of Applied Polymer Science*, cilt 96, pp. 557-569, **2005**.
- [106] J. He, Y. Wan ve J. Yu, Allometric Scaling and Instability in Electrospinning, *International Journal of Nonlinear Sciences and Numerical Simulations*, cilt 5, no. 3, pp. 243-252, **2004**.
- [107] D. Reneker ve I. Chun, Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning, *Nanotechnology*, cilt 7, pp. 216-223, **1996**.
- [108] K. Koski, K. Yim ve S. Shivkumar, Effect of molecular weight on fibrous pva produced by electrospinning, *Materials Letters*, cilt 58, pp. 493-497, **2004**.
- [109] W. Son, J. Youk, T. Lee ve W. Park, Effect of pH on electrospinning of poly (vinyl alcohol), *Materials Letters*, cilt 59, pp. 1571-1575, **2004**.
- [110] Y. Zhang, X. Huang, B. Duan, L. Wu, S. Li ve X. YuAN, Preparation of electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) membranes, *Colloid Polymer Science*, cilt 285, pp. 855-863, **2007**.
- [111] P. Supaphol ve S. Chuangchote, On the Electrospinning of poly (vinyl alcohol) nanofiber Mats: A Revisit, *Journal of Applied Polymer Science*, cilt 108, no. 33, pp. 969-978, **2008**.
- [112] D. Li ve Y. Xia, Electrospinning of nanofibers: Reinventing the Wheel,

Advanced Materials, cilt 16, no. 14, pp. 1151-1170, **2004**.

- [113] F. Ko, Nanoengineered nanofibrous materials, %1 içinde *Nanofiber technology: Bridging the Gap between Nano and Macro World*, USA, NATO science series. Series 2, Mathematics, physics and chemistry, **2004**, pp. 1-18.
- [114] Y. Zhang, C. Lim, S. Ramakrishna ve Z. Huang, Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, cilt 16, no. 10, p. 933-946, **2005**.
- [115] S. Shanmugasundaram, K. Griswold, C. Prest, T. Arinze ve M. Jaffe, Applications of electrospinning: tissue engineering scaffolds and drug delivery system, %1 içinde *Bioengineering Conference, 2004. Proceedings of the IEEE 30th Annual Northeast*, **2004**.
- [116] R. Dersch, M. Stainhart , U. Boudriot, A. Greiner ve J. Wendorf, Nanoprocessing of polymers: applications in medicine, sensors, catalysis, photonics, %1 içinde *7th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies*, Florida, **2005**.
- [117] S. Kasirajan ve M. Ngouajio, Polyethylene and biodegradable mulches for agricultural applications: a review, *Agronomy for Sustainable Development*, cilt 32, no. 2, p. 501-529, **2012**.
- [118] C.-S. Wu, Polylactide-based renewable composites from natural products residues by encapsulated film bag: Characterization and biodegradability, *Polymers*, cilt 90, pp. 583-591, **2012**.
- [119] C. Topkaya, J. Yura ve E. Williamson, Composite Shear Stud Strength at Early Concrete Ages, *Journal of Structural Engineering*, cilt 130, no. 6, pp. 952-960, **2004**.
- [120] M. Ghorpade, A. Gennadios ve M. Hanna, Laboratory composting of extruded poly (lactic acid) sheets, *Bioresource technology*, cilt 76, no. 5, pp. 57-61, **2001**.
- [121] A. Shah, F. Hasan, A. Hameed ve S. Ahmed, Biological degradation of plastics: a comprehensive review, *Biotechnology advances*, cilt 26, no. 9, pp. 246-265, **2008**.
- [122] R. Narayan, Impact of Governmental Policies, Regulations, and Standards Activities on an Emerging Biodegradable Plastics Industry, In: *Biodegradable Plastics and Polymers*, New York: Elsevier, **1999-4**.

- [123] K. Tanaka , H. Waki , Y. Ido , S. Akita ve Y. Yoshida , Protein and polymer analysis up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, cilt 2, no. 8, p. 151, **1988**.
- [124] M. Karas, D. Bachmann ve F. Hillenkamp, Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules, *Analytical Chemistry*, cilt 57, no. 14, p. 2935–2939, **1985**.
- [125] O. Vorm, P. Roepstorff ve M. Mann, Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation, *Analytical Chemistry*, cilt 66, no. 19, p. 3281–3287, **1994**.
- [126] C. Murphy , J. Hankin ve R. Bark, MALDI Imaging of Lipids after Matrix Sublimation/Deposition, *Biochimica et Biophysica Acta*, cilt 1811, no. 11, p. 970–975, **2011**.
- [127] T. Jaskolla, M. Karas , U. Roth , K. Steinert , C. Menzel ve K. Reihls, Comparison between vacuum sublimed matrices and conventional dried droplet preparation in MALDI-TOF mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, cilt 20, no. 6, pp. 1104-1114, **2009**.
- [128] W. Lu , E. Kimball ve J. Rabinowitz , A high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantitation of nitrogen-containing intracellular metabolites, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, cilt 17, no. 1, pp. 37-50, **2006**.
- [129] M. Dale, R. Knochenmuss ve R. Zenobi, Graphite/Liquid Mixed Matrices for Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, cilt 68, no. 19, p. 3321–3329, **1996**.
- [130] M. Hana ve J. Sunnera, An activated carbon substrate surface for laser desorption mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, cilt 11, no. 7, p. 644–649, **2000**.
- [131] J. Wei , J. Buriak ve G. Siuzdak, Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon, *Nature*, cilt 399, no. 6733, pp. 243-246, **1999**.
- [132] M. Greving, G. Patti ve G. Siuzdak , Nanostructure-initiator mass spectrometry metabolite analysis and imaging, *Analytical Chemistry*, cilt 83, no. 1, pp. 2-7, **2011**.

- [133] R. Nayak ve D. Knapp, Matrix-free LDI mass spectrometry platform using patterned nanostructured gold thin film, *Analytical Chemistry*, cilt 82, no. 18, p. 7772–7778, **2011**.
- [134] G. Xu, S. Liu, J. Peng, W. Lv ve R. Wu, Facile Synthesis of Gold@Graphitized Mesoporous Silica Nanocomposite and Its Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization for Time-of-Flight Mass Spectroscopy, *Applied Materials Interfaces*, cilt 7, no. 3, p. 2032–2038, **2015**.
- [135] C. Chiang, Z. Yang, Y. Lin, W. Chen, H. Lin ve H. Chang, Detection of Proteins and Protein–Ligand Complexes Using HgTe Nanostructure Matrixes in Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, cilt 82, no. 11, p. 4543–4550, **2010**.
- [136] A. Woldegiorgis , P. Löwenhielm , A. Björk ve J. Roeraade , Matrix-assisted and polymer-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of low molecular weight polystyrenes and polyethylene glycols, *Rapid Communication Mass Spectrometry*, cilt 18, no. 23, pp. 2904-2912, **2014**.
- [137] A. Woldegiorgis, F. Kieseritzky, E. Dahlstedt, J. Hellberg , T. Brinck ve J. Roeraade, Polymer-assisted laser desorption/ionization analysis of small molecular weight compounds, *Rapid Communication Mass Spectrometry*, cilt 18, no. 8, pp. 841-852, **2004**.
- [138] R. Kruse , X. Li , P. Bohn ve J. Sweedler , Experimental factors controlling analyte ion generation in laser desorption/ionization mass spectrometry on porous silicon, *Analytical Chemistry*, cilt 73, no. 15, pp. 3639-3645, **2001**.
- [139] M. Wang, Q. Huang, J. Hong, X. Chen ve Z. Xue, Controlled Synthesis and Characterization of Nanostructured EuF₃ with Different Crystalline Phases and Morphologies, *Crystal Growth & Design*, cilt 6, no. 9, p. 2169–2173, **2006**.
- [140] H. Kawasaki, T. Yonezawa, T. Watanabe ve R. Arakaw, Detection of Proteins and Protein–Ligand Complexes Using HgTe Nanostructure Matrixes in Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *The Journal of Physical Chemistry C*, cilt 82, p. 4543–4550, **2010**.
- [141] Q. Liu , Y. Xiao , C. Pagan-Miranda , Y. Chiu ve L. He , Metabolite imaging using matrix-enhanced surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (ME-SALDI-MS), *Journal of*

the American Society for Mass Spectrometry, cilt 20, no. 1, pp. 80-88, **2009**.

- [142] T. Lu ve S. Olesik, Electrospun Nanofibers as Substrates for Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization and Matrix-Enhanced Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, cilt 85, p. 4384–4391, **2013**.
- [143] J. Bai, Y. Liu, T. Cain ve D. Lubman, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Using an Active Perfluorosulfonated Ionomer Film Substrate, *Analytical Chemistry*, cilt 66, pp. 3423-3430, **1994**.
- [144] G. Jungang, L. Zhanli, L. Pengyan ve J. Ning, Preparation of MAA/TRIM molecularly imprinted polymers and binding selectivity for ciprofloxacin, *Molecular Diversity Preservation International and Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, cilt 9, no. 2, **2007**.
- [145] P. Sum, F. Sum ve S. Projan, Recent Development of Tetracyclic Antibiotics, *Current Pharmaceutical Design*, cilt 4, no. 2, pp. 119-133, **1998**.
- [146] Z. Ma, C. Gao, Y. Gon ve J. Shen, Chondrocyte behaviors on poly-l-lactic acid (PLLA) membranes containing hydroxyl, amide or carboxyl groups, *Biomaterials*, cilt 24, p. 3725–3730, **2003**.
- [147] M. Schofer , P. Roessler, J. Schaefer, C. Theisen, S. Schlimme, J. Heverhagen, M. Voelker, R. Dersch, S. Agarwal, S. Fuchs-Winkelmann ve J. Paletta, Electrospun PLLA Nanofiber Scaffolds and Their Use in Combination with BMP-2 for Reconstruction of Bone Defects, *Plosone*, cilt 6, no. 9, p. e25462, **2011**.
- [148] M. Wojasinski, K. Faliszewski ve T. Ciach, Electrospinning Production of PLLA Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering, *Biomedical Engineering*, pp. 9-15, **2014**.
- [149] M. Okan , E. Sari ve M. Duman, Molecularly imprinted polymer based micromechanical cantilever sensor system for the selective determination of ciprofloxacin, *Biosensors and Bioelectronics*, cilt 88, p. 258–264, **2017**.
- [150] E. Sari, R. Üzek, M. Duman ve A. Denizli, Fabrication of Surface Plasmon Resonance Nanosensor for the Selective Determination of Erythromycin via Molecular Imprinted Nanoparticles, *Talanta*, cilt 150, pp. 607-614, **2015**.
- [151] N. Platé ve V. Shibaev, Structure of Comb-Shaped Polymers, %1

içinde *Comb-Shaped Polymers and Liquid Crystals*, Stirling, Springer Science & Business Media, **2012**, pp. 14-104.

- [152] Z. Ma, C. Gao, Y. Gong, J. Ji ve J. Shen, Immobilization of Natural Macromolecules on Poly-L-Lactic Acid Membrane Surface in Order to Improve Its Cytocompatibility, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, cilt 63, p. 838–847, **2002**.
- [153] Y. Wei , Y. Zhang , Y. Lin , L. Li , J. Liu , Z. Wang , S. Xiong ve Z. Zhao, A uniform 2,5-dihydroxybenzoic acid layer as a matrix for MALDI-FTICR MS-based lipidomics, *Analyst - Royal Society of Chemistry*, cilt 140, no. 4, pp. 1298-1305, **2015**.
- [154] K. Ossowska, B. Jachimska ve P. Mulheran, How Negatively Charged Proteins Adsorb to Negatively Charged Surfaces: A Molecular Dynamics Study of BSA Adsorption on Silica, *The Journal of Physical Chemistry B*, cilt 120, p. 10463–10468, **2016**.
- [155] G. Martin, O. Sorokine , M. Moniatte, P. Bulet, C. Hetru ve A. Van Dorsselaer, The structure of a glycosylated protein hormone responsible for sex, *Eur. J. Biochem*, cilt 262, no. 1, pp. 727-736, **1999**.
- [156] C. Poole, New trends in solid-phase extraction, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* , cilt 22, p. 362–373, **2003**.
- [157] C. Pan , S. Xu , H. Zhou , Y. Fu , M. Ye ve H. Zou , Recent developments in methods and technology for analysis of biological samples by MALDI-TOF-MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, cilt 387, no. 1, pp. 193-204, **2007**.
- [158] B. Garipcan ve A. Denizli, A Novel Affinity Support Material for the Separation of Immunoglobulin G from Human Plasma, *Macromolecular Bioscience*, cilt 2, no. 3, p. 135–144, **2002**.
- [159] T. Anirudhan ve P. Suchithra, Equilibrium, kinetic and thermodynamic modeling for the adsorption of heavy metals onto chemically modified hydrotalcite, *Indian Journal of Chemical Technology*, cilt 17, p. 247–259, **2010**.
- [160] F. Dawodu, G. Akpomie ve I. Ogbu, Isotherm Modeling on the Equilibrium Sorption of Cadmium (II) from Solution by Agbani Clay, *International Journal of Multidisciplinary Sciences and Engineering*, cilt 3, no. 9, pp. 9-14, **2012**.
- [161] A. Wagner, V. Poursorkhabi ve A. Moha, Analysis of Porous

Electrospun Fibers from Poly(L-lactic acid)/Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Blends, *American Chemical Society Sustainable Chemistry & Engineering*, cilt 2, p. 1976–1982, **2014**.

- [162] A. Hartwig, M. Mulder ve C. Smolde, Surface Amination of Poly(acrylonitrile), *Advances in Colloid and Interface Science*, cilt 52, pp. 65-78 , **1994**.
- [163] C. Chiang, N. Chiang, Z. Lin, G. Lan, Y. Lin ve H. Chang, Nanomaterial-Based Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Peptides and Proteins, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, cilt 21, no. 7, p. 1204–1207, **2010**.
- [164] N. Aminlashgari ve M. Hakkarainen, Surface Assisted Laser Desorption Ionization-Mass Spectrometry (SALDI-MS) for Analysis of Polyester Degradation Products, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, cilt 23, no. 6, p. 1071–1076, **2012**.
- [165] C. Chiang, N. Chiang, Z. Lin, G. Lan, Y. Lin ve H. Chang, Nanomaterial-Based Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Peptides and Proteins, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, cilt 21, no. 7, p. 1204–1207, **2010**.
- [166] Z. Ma, C. Gao, Y. Gong ve J. Shen, Chondrocyte behaviors on poly-L-lactic acid (PLLA) membranes containing hydroxyl, amide or carboxyl groups, *Biomaterials*, cilt 24, p. 3725–3730, **2003**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Gülgün AYLAZ

Doğum Yeri : Doğanşehir/Malatya

Medeni Hali : Bekar

E-posta : gulgunaylaz@gmail.com

Adresi : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp ABD, 06800, Beytepe Kampüsü, Ankara, Türkiye

Eğitim

Lise : Nazilli Atatürk Lisesi

Lisans : Atatürk Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği
Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği(Çift Anadal)

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Nanoteknoloji ve Nanotıp ABD

Yabancı Dil

İngilizce

İş Tecrübesi

2013-2014 Araştırma Görevlisi, Hakkâri Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü

2014-Halen Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp ABD

Deneyim Alanları

MALDI-MS

Elektroçekim tekniği

Yanal akış kitleri

Taramalı Elektron Mikroskopu

Moleküler Baskılanmış Polimerler

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-“A Novel Fiber based MALDI Probe for Selective Detection of Ciprofloxacin”, 3. Uluslararası Biyosensör Kongresi, Ankara, Türkiye, 2016. (Sözlü Sunum)

-“Molecularly Imprinted Polymeric Nanoparticle Modified Film Based MALDI Sample Probe for Detection of Ciprofloxacin”, 19.Yıllık Linz Kış Çalıştayı, Linz, Avusturya, 2017.(Poster Sunumu)

