



Nanoparçacıkların Ölçme ve İnceleme Teknikleri

Mehmet ATEŞ*

*Munzur Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Aktuluk Yerleşkesi, 62000. Tunceli

*Sorumlu Yazar:

E-posta: atesnrg@gmail.com

Geliş Tarihi : 06 Eylül 2018

Kabul Tarihi: 29 Ekim 2018

Özet

Nanoparçacıkların (NP'lerin) tanımlanması için çok geniş ölçme ve inceleme analiz teknikleri olmasına rağmen, çevresel ve sıvı matrislerde NP'ların miktarını ve özelliklerini ölçmede kullanılan çok az sayıda analitik ve spektroskopik metotlar vardır. Bu analiz tekniklerinde olan Dinamik Işık Saçıcısı (DLS), NP'ların bulunduğu kolloidal (sıvı ortam) çözelti ortamında boyutlandırılması ve süspansiyonlarda kümeleşimlerini belirlemek için kullanılır. Zeta Potansiyeli, parçacık ile parçacığın içinde bulunduğu sıvı arasında oluşur. Zeta Potansiyeli, bir parçacığın dağıldığı yığın sıvısı ve NP yüzeyi ile alakalı zıt yüklü iyonları içeren sıvı tabakası arasındaki potansiyel farkının bir ölçüsüdür. NP'ların görüntülenmesi için Geçirimsiz Elektron Mikroskopu (TEM) ve Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) analiz yöntemleri, parçacıkların boyutunu, yapısını, şeklini, kümeleşimi ve dağılımı belirlemede başarılı bir şekilde uygulanır. Atomik Kuvvet Mikroskopu (AKM) ile de moleküller arası kuvvetler hassas bir şekilde ölçülebilir ve özel bir hazırlama işlemi gerektirmeden malzemeler her ortamda görüntülenebilir. NP'ların yapısal karakterizasyonu için uygun olan X-Işını Kırınım Spektroskopisi yöntemi kristalografik bilgi sağlarken, NP yüzeyleri ve kaplamalarının karakterizasyonu için de kullanılabilir. Bir NP'lün molekül veya bileşik yapısında bulunan bağlar hakkında tanımlayıcı bilgi sağlamak için Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometre (FT-IR) kullanılır. İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS) ile başta metalik elementler olmak üzere periyodik tablodaki elementlerin büyük çoğunluğunun nicel ve yarı-nitel tayinlerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemle iz element derişimlerinin belirlenmesiyle, herhangi bir çözeltideki metal bazlı NP'ların konsantrasyonunun hesaplanması yapılabilir. Ayrıca bir Ultraviyole-Görünür Spektroskopisi (UV-Vis) dedektörü ile birlikte florasan NP'lar ve kolloidlerin karakterizasyonu mümkündür. NP'ların derişimi belirli bir dalga boyundaki absorpsiyonunu UV-Vis spektroskopinde ölçerek bulunur. Tüm bu teknikler ve ölçüm yöntemleri bu çalışmamızda detaylı bir şekilde bilgi verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nanopartikül, Karakterizasyon, DLS, Zeta potansiyeli, TEM, SEM, AKM, XRD, FT-IR, ICP-MS, UV-Vis.

Measuring and Inspection Techniques of Nanoparticles

Abstract

Although there are too many large measuring and examining analysis techniques to define the nanoparticles (NPs), there are only a few analytic and spectroscopic methods used to measure the amounts and the characteristics of NPs in environmental and liquid matrixes. Dynamic Light Scattering (DLS), one of these analysis techniques, is used to size in colloidal (liquid environment) solution that has NPs in, and to define the clustering in suspensions. Zeta potential occurs between particle and liquid that particle in. Zeta potential is a measure of the potential difference between the bulk liquid from which a particle is dispersed and the liquid layer containing the oppositely charged ions associated with the NP surface. For the imaging of NPs, Transmission Electron Microscopy (TEM) and Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis methods are applied successfully to determine the size, structure, shape, clustering and distribution of particles. Also, intermolecular forces can be accurately measured and the materials can be displayed in any environment without requiring a special preparation process with Atomic Force Microscope (AFM). The X-Ray Diffraction (XRD) Spectroscopy method which is suitable for the structural characterization of NPs can be used for the characterization of NP surfaces and coatings while providing crystallographic information. Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) is used to provide descriptive information about the bonds in a molecule or compound structure of an NP. Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) is widely used in quantitative and semi-qualitative determination of the majority of the elements in the periodic table, especially in metallic elements. By determining the trace element concentrations thanks to this method, the concentration of metal-based NPs in any solution can be calculated. Moreover, the characterization of fluorescent NPs and colloids is possible with an Ultraviolet-Visible Spectroscopy (UV-Vis) detector. The concentration of NPs is determined by measuring specific wavelength absorption at UV-Vis spectroscopy. All of these techniques and measurement methods were given in detail in this study.

Keywords: nanoparticle, characterization, DLS, Zeta potential, TEM, SEM, AKM, XRD, FT-IR, ICP-MS, UV-Vis.

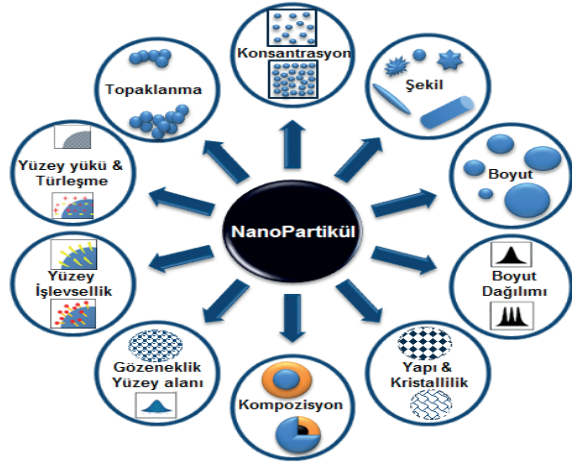
GİRİŞ

Nanobilim ve nanoteknoloji doğası gereği disiplinler arası bir çalışma alanıdır. Öyle ki nano ölçekteki bir yapıyı tam anlamıyla kavramak için fizik, kimya ve biyoloji temel bilimlerini hakkında derin bir anlayışın yanı sıra malzeme, elektronik, makine, kimya mühendisliği ile biyomühendisliği uygulama bilgisi de gerekmektedir. Nanoteknolojinin uygulanması, geleneksel malzemelerin temel fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değiştirilmesine izin verir. Malzemenin boyutlarını nano ölçeğe dönüştürdüğü için değişiklikler yapılmasına olanak tanır ve benzersiz elektriksel, optiksel ve mekanik özelliklere sahip yeni malzemeler sunar. En az bir boyutu 100 nm veya daha az olan nano materyaller dolgu malzemesi, katalizörler,

yarı-iletkenler, kozmetik, mikroelektronik, eczacılık, ilaç taşıyıcıları, enerji depolama ve sürtünmesiz kaplama malzemeleri gibi ticari amaçlar için gittikçe artan ölçüde kullanılmaktadırlar [1]. Nano yapı malzemelerin veya diğer adlandırılması ile nanoparçacıkların (NP'lerin) nanotoksikite etkilerinin belirlenmesi; kullanılan malzemenin parçacık numarası, yükleri, boyutları ve boyut dağılımları, yüzey alanları, yapıları ve şekilleri [2,3], kümeleşim durumları ve element yapıları [4], kompozisyon ve konsantrasyon oranı gibi birçok faktörlerden etkilenmektedir. *İn-vivo* (canlı ortamda ya da yaşayan koşullarda) veya *in-vitro* (laboratuvar ortamında veya yapay koşullarda) tüm nanotoksikolojik araştırmalarda bu faktörleri belirlemek veya göz önünde bulundurmamak gerekir. Malzemelerin karakteristik

özellikleri, yapısına ve kullanıldığı prosese göre değişkenlik göstermektedir.

Nano yapıdaki malzemeler, yığın (makro) halinde gösterdikleri özelliklerden çok farklı etkin özellikler gösterebilmektedirler. Özellikle 100 nm'den küçük boyuttaki malzemelerle toksikolojik biyodeneji veya biyomühendislik alanında herhangi bir çalışma yapılırken, malzemenin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin iyi belirlenip çalışmanın amacına uygun olup olmadığı belirtilmelidir. Çalışmalarda kullanılacak olan karbon nanotüpleri, kuantum noktacıkları veya metal bazlı NP'ların şekil, boyut, boyut dağılımı, yapı ve kristallilik, kompozisyon, gözeneklilik ve yüzey alanı, yüzey işlevsellik, yüzey yükü ve türleşme, topaklanma ve konsantrasyon gibi analizler yapılarak malzemenin karakterizasyon özellikleri belirlenmektedir (Şekil 1). NP'ların tanımlanması için çok geniş analiz yöntemleri olmasına rağmen, çevresel ve sıvı matrislerde (ortamın genel dokusu) NP'ların miktarını ve özelliklerini ölçmede kullanılan çok az sayıda analitik ve spektroskopik metotlar vardır. Nano malzemelerin kolloid fazları ve kümeleşimleri oluşturma yeteneği, farklı yüzeye tutunma ve emilim karakteristikleri ile şekil ve boyutlarındaki çeşitlilik onların miktarının ölçülmesini zor kılar [1].



Şekil 1. Nanoparçacıkların karakterizasyon analizlerini gösteren şematik model

Mühendislik ürünü sonucunda tasarlanmış olan metal veya karbon bazlı nano yapıları malzemelerin parçacık boyutu, şekli, yüzey alanı, yüzey reaktivitesi ve çözünürlüğünün belirlenmesi gibi araştırma konuları karakterizasyon çalışmaları için çok önemli başlıklardır. Bu doğrultuda biyodeneji çalışmalarında sıklıkla kullanılan ve NP'ların karakterizasyonu için yapılması elzem olan mikroskopi, kromatografi, spektroskopi, santrifüjleme, filtreleme ve diğerleri gibi bazı teknik türleri vardır [1]. Nanoölçekte ölçme ve görüntüleme özel yöntemler gerektirir, mikroskobik büyüklükler için geliştirilen ve kullanılan yöntemler nanoölçekte kullanılamazlar. Bu makalede, nanoölçekteki büyüklükler için geliştirilmiş ve kullanılan başlıca ölçme ve görüntüleme yöntemlerinden kısaca bilgi verilmektedir. Özellikle nanotoksikolojik biyodeneysel çalışmalarında kullanılan NP'ların karakterizasyonu için yapılan analiz yöntemlerinden; Parçacık boyutu ve zeta potansiyel ölçüm teknikleri, mikroskobik ve spektroskopik teknikleri hakkında genel bilgiler sunulmaktadır. Ayrıca karakterizasyon için hangi cihazlar ne amaçla kullanılacağı ve her analiz yöntemin çalışma sistemi hakkında bilgiler verilmiştir.

Koloidal Boyut Ve Yüzey Ölçüm Teknikleri Dinamik Işık Saçılması

Dinamik Işık Saçılması (DLS) NP'ları ve diğer koloidal çözeltileri karakterize etmek için önemli bir araçtır. DLS, koloidal çözeltiden geçirilen bir lazerden saçılan ışığı ölçer. Saçılmış ışık yoğunluğunun modülasyonunu zamanın bir fonksiyonu olarak analiz ederek, çözeltideki parçacığın büyüklüğü hakkında bilgi edinilebilir. DLS, seyreltik çözelti içerisindeki NP'lardan saçılan ışığın şiddetinin ve değişiminin ölçülmesi temeline dayanır. Saçılan ışığın şiddetindeki değişim, parçacığın hareketine, büyüklüğüne, ortamın viskozitesine, sıcaklığa ve tuzluluk gibi faktörlere bağlıdır. Sıvı ortamdaki NP'ların karakteristik özellikleri açısından DLS analizlerin yapılması önemlidir [5]. Bu açıdan her bir NP'nın sulu ortamdaki (solüsyon/medium) gerçek boyut dağılımı DLS ölçümleri için nanosizer cihazları ile belirlenir. Parçacık boyut ölçümü, akışkan bir sıvı içerisinde yüzen veya asılı kalan parçacıklar, içinde bulunduğu çözücü moleküllerin bombardmanı ile rastgele hareketi sonucu brown hareketi yaparlar. DLS tekniği kullanılarak brown hareketinin hızı ölçülür ve parçacık boyutu ile ilişkilendirilir. Brown hareketinin ölçülebilmesi için akışkanın viskozitesi ve sıcaklığının bilinmesi gerekir. Numune sıcaklığı ile analiz sıcaklığının aynı olması gerekmektedir. Aksi takdirde örnek içinde oluşacak konveksiyon akımı taneciklerin düzensiz olmayan hareketine yol açar. Buda boyut algısını bozar [6, 7, 8].

DLS analizi, daha büyük parçacıkların daha yavaş hareket ettiği ve küçük parçacıklardan daha fazla ışık saçtığı çözelti (Brown çözeltisi) içindeki parçacıkların difüzyon hareketine dayanmaktadır. Parçacık boyutu büyüdükçe Brown hareketi yavaşlarken, sıcaklık yükseldikçe Brown hareketi hızlanır. Brown hareketin hızı "difüzyon katsayısı" ile tanımlanır. DLS ile ölçülen çap değeri bir parçacığın sıvı içerisinde nasıl hareket ettiğini gösterir. Buna hidrodinamik çap denir. Hidromatik¹ çap (karakterize edilen parçacıklarla aynı hızda yayılan varsayımsal geçirgen olmayan bir kürenin çapı), saçılma yoğunluğu ölçümlerinin zamana bağlılığından ölçülebilir. Elde edilen çap değeri parçacıkla aynı difüzyon katsayısına sahip kürenin çapıdır. Bu difüzyon katsayısı sadece parçacıkların esas boyutuna bağlı değildir, aynı zamanda ortamdaki iyonların tipine ve konsantrasyonuna da bağlıdır [8, 9, 10]

DLS Ölçüm Yöntemi: NP'ların gerçek boyut dağılımları, deiyonize su, ultra saf su veya uygun çözdürücü içinde hazırlanan stok süspansiyonlarında numuneler alınarak incelenir. Eğer hazırlanan konsantrasyonun çok yüksek olması durumunda, numunenin seyreltilip cihazın saniyede sayım elde edebileceği düşük konsantrasyonlara (<10 ppm) ayarlanmalıdır. Bu analiz için gerekli numune miktarı minimum 1mL'dir. Ancak doğru sonuçların elde edilmesi için hazırlanan nihai konsantrasyondan en az üçer kez örnek alınarak analizler yapılmalıdır [9, 10].

Zeta Potansiyeli

Zeta Potansiyeli, parçacık ile parçacığın içinde bulunduğu sıvı arasında oluşur. Parçacıklar arasında itme ve çekme kuvvetleri oluşmasına neden olur. Bir sıvı içerisindeki aynı yükteki parçacıklar birbirlerini iter, farklı yükteki parçacıklar ise çeker. Bu çekme ve itme kuvveti parçacığın zeta potansiyel değerine bağlıdır [11]. Zeta potansiyel ölçümü dağılıma mekanizmaları ile ilgili ayrıntılı bilgi verir ve elektrostatik dağılıma kontrolünün anahtarıdır. Belli bir yükteki parçacık, süspansiyon

¹Basinç oluşturan, sıvı ile çalışan sistem

içerisindeki karşı yükteki iyonları çeker, bunun sonucunda yüklü parçacık yüzeyinde güçlü bir bağ yüzeyi oluşur ve daha sonra da yüklü parçacığın yüzeyinden dışa doğru yayılmış bir yüzey oluşur. Yayılmış bu yüzey içerisinde “kayma yüzeyi” diye adlandırılan bir sınır bulunur. Yüklü parçacık ve onun etrafında bulunan iyonların kayma yüzey sınırına kadar olan kısım tek bir parça olarak hareket eder. Bu kayma yüzeyindeki potansiyel zeta potansiyeli olarak isimlendirilir ve hem parçacığın yüzey yapısından hem de içinde bulunduğu sıvının içeriğinden etkilenir. Parçacıkların polar sıvılar içerisindeki davranışlarını yüzeylerindeki elektrik yükü ile değil, zeta potansiyel değerleri (+/- ζ mV) belirlenir [7, 8, 12]. Elektrokinetik potansiyeli olarak da bilinen zeta potansiyeli, NP yüzeyindeki “etkili” elektrik yükünün ölçüsüdür ve koloidal NP’ların yük kararlılığının miktarını belirtir. Bir NP net bir yüzey yüküne sahipken, yük NP yüzeyine yakın bulunan zıt yüklü artan bir iyon konsantrasyonu tarafından kamufle edilir. Bu zıt yüklü iyon tabakası NP ile hareket eder ve yüzey yük tabakası ve zıt yüklü iyonlar beraber elektrik çift tabaka olarak adlandırılır.

Zeta potansiyeli yüzey yük yoğunluğu ve çift tabaka kalınlığı ile ilgilidir. Yüzey yük yoğunluğu ise potansiyel belirleyici iyonların konsantrasyonuna bağlıdır. NP yüzeyindeki yükün büyüklüğünün çözelti pH’sına bağlı olduğu gözönünde bulundurulmalıdır. Aslında, yüzey yükü izoelektrik noktası denen belli bir pH’da sıfıra indirgenebilir. Bir çok sistemde H^+ iyonu potansiyel belirleyici iyon olduğu için zeta potansiyeli pH’a bağlıdır. Zeta potansiyel parçacığın içinde bulunduğu sıvının pH değeri ile değişir. Değişimin sıfır eksenini kestiği pH değeri “izoelektrik nokta” olarak adlandırılır [13]. Zeta potansiyeli düşük pH değerleri için pozitif ve yüksek pH değerleri için negatiftir. Zeta Potansiyelinin büyüklüğü parçacık kararlılığı hakkında bilgi sağlar, daha yüksek büyüklükteki potansiyeller artan elektrostatik itme ve dolayısıyla artan kararlılığı göstermektedir (Tablo 1).

Tablo 1. Nanoparçacıkların zeta potansiyel değeri ile kararlılığı arasındaki ilişki.

Zeta değeri	Nanoparçacıkların kararlılığı
0-5 mV	Parçacıklar kümeleşme veya bir araya gelme eğilimi sergilerler,
5-20 mV	Parçacıklar minimal düzeyde kararlıdır,
20-40 mV	Parçacıklar orta düzeyde kararlıdır,
40+ mV	Parçacıklar son derece kararlıdır.

Zeta Potansiyeli Ölçüm Yöntemi: Zeta potansiyeli iki altın elektrot içeren bir hücreye bir çözelti eklenerek ölçülür. Elektrota bir voltaj uygulandığında, parçacıklar zıt yüklü elektrota doğru hareket ederler. Voltajın bir fonksiyonu olarak parçacık hızını ölçmek için bir Doppler tekniği kullanılır. Hücre içinden lazer geçer ve parçacıklar lazer demeti içinden hareket ederken, saçılmış ışığın yoğunluğu parçacığın hızıyla orantılı bir frekansta dalgaları. Çoklu voltajlardaki parçacık hızı ölçülür ve bu veri zeta potansiyelini ölçmek için kullanılır. Zeta potansiyeli için standart analiz yöntemi esas alınarak DLS analizleri için hazırlanan solüsyonlarda (<10 ppm çözelti) zeta potansiyel analizleri yapılabilir. Zeta potansiyel ölçümleri için şırınga ile çözeltiden 1 mL numune alınarak, temiz elektrotlu Zeta potansiyel kuvetine konularak nanosize cihazında analizler yapılır [13].

Mikroskopik Teknikle

Geçirilmiş Elektron Mikroskobu

Geçirilmiş Elektron Mikroskobu (TEM), görüntüleme ve kırınım tekniklerini birlikte kullanarak malzemelerin mikro yapısal incelemesini ve kristal yapılarının belirlenmesini birlikte sağlayabilen çok özel bir malzeme karakterizasyon cihazıdır. Bir başka deyişle, nanometre mertebesinde çok küçük ve ince alanlardan, milyon katı büyütme malzemenin kristalografik ve morfolojik bilgilerine aynı anda ulaşılmasını olanaklı kılan bir tekniktir. TEM, bir elektron demetinin numuneden geçişini görüntüleyen yüksek büyütme ölçüm tekniğidir [13].

TEM, oldukça ince numuneden elektron demetinin geçirilmesi sonucu numune ve elektronlar arasında meydana gelen çeşitli etkileşimin işlenmesiyle görüntünün elde edildiği bir mikroskop tekniğidir. Geçirilen ışın demetindeki genişlik (amplitude) ve faz değişimleri numune kalınlığının (elektron demetinin geçmesi gereken malzeme miktarı) ve numune malzemenin bir fonksiyonu olan görüntüleme kontrastı sağlar. Bu teknik numuneyi aydınlatmak için ışık değil de elektronları kullandığı için, TEM görüntülemesi ışık-bazlı görüntüleme tekniklerinden kayda değer ölçüde daha yüksek çözünürlüğe sahiptir. Hızlandırılmış elektronlar düşük de Broglie² dalga boyundan dolayı oldukça yüksek çözünürlüklü görüntüler elde edilmesini sağlar. Numuneden geçen elektronlar doğrudan görüntü elde edilmede kullanılabilirken çeşitli düzlemlerden meydana gelen ve Laue³ şartlarını sağlayan kırınım da görüntü elde etmede kullanılmaktadır. Kırınım desenlerinde meydana gelen aydınlık alan ve karanlık alanlar kullanılmasıyla aydınlık/karanlık alan yöntemleri görüntülemeye ayrı ayrı kullanılmaktadır [14, 15, 16].

TEM Ölçüm Yöntemi: TEM kullanan NP’ların başarılı bir şekilde görüntülenmesi numunenin arka plana göre nisbi kontrastına bağlıdır. Numuneler, görüntüleme için ince bir karbon tabakası ile kaplı bir bakır ızgara üzerinde NP’ları kurutularak hazırlanır. Elektron yoğunlukları biçimsiz karbondan önemli ölçüde yüksek olan malzemeler kolaylıkla görüntülenir. Bu malzemeler bir çok metali (ör; gümüş, altın, bakır, alimünyum), birçok oksiti (ör; silika, alimünyum oksit, titanyum oksit) ve polimer NP’lar, karbon nanotüpler, quantum noktaları, ve manyetik NP’ları içerirler. TEM görüntüleme, parçacık büyüklüğü, tane büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve NP’ların morfolojisini doğrudan ölçmeye tercih edilen bir metottur. Ölçme doğruluğu genelde gerçek değerinin % 3’lük sınırları içindedir. NP’ların TEM görüntülerini elde etmek için, sıvı ortamın çözeltisinin bir damlası (8-10 μ L) 50 Å kalınlığında ve 3 mm çapındaki karbon-kaplanmış bakır ızgaralar üzerine damlatılıp ve kurutulduktan sonra, parçacığın morfolojik yapısı, çapı ve boyut dağılımını gösteren resimler TEM cihazından elde edilir. Ayrıca imageJ gibi ilgili yazılım programları kullanılarak NP’ların boyut dağılımları oransal olarak da belirlenebilir [15, 16].

Taramalı Elektron Mikroskobu

2-De broglie dalga boyu, momentumu olan bir hareketliye eşlik eden dalganın dalga boyu anlamına gelir. De Broglie tarafından keşfedildiği için bu adı almıştır. De Broglie hareketlere eşlik eden dalgaların hepsine «Madde dalgaları» adını vermiştir

3-Laue yönteminde sabit kristal den yansıyan radyasyon ölçülerek büyük tek kristallerin yönelimini ve simetrisini belirlemek temel amaçtır

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), çok küçük bir alana odaklanan yüksek enerjili elektronlarla parçacık yüzeyin taranması prensibiyle çalışır. SEM yüksek çözünürlüklü resim oluşturmak için vakum ortamında oluşturulan ve aynı ortamda elektromanyetik lenslerle incelenen elektron demeti ile incelenecek malzemeyi analiz etme imkanı sağlar. SEM analizinde görüntü alınması, yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların numune üzerine odaklanması, bu elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ve sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla yüzey görüntüsü elde edilir [17, 18].

Yüksek vakumda hızlandırılmış elektronlar manyetik lensler kullanılarak incelenecek numune üzerine düşürülür. Elektronlar ile numune arasında çeşitli etkileşimler sonucu geri saçılmış elektronlar, ikincil elektronlar, Auger elektronları ve X-ışınları oluşabilir. Bu sonuçların uygun algılayıcılar yardımıyla toplanması ve tekrar ekrana verilmesi ile görüntü elde edilir. SEM'de genelde ikincil elektronlar görüntü oluşturulmasında kullanılır. Elde edilen görüntülerden tanecik boyutu, taneciklerin yerleşimi hakkında hem mikro hem de nano ölçekte iki boyutlu detaylı bilgiler elde edilebilmektedir [16].

SEM Analiz Yöntemi: Sıvı olmayan ve sıvı özellik taşımayan her türlü iletken olan olmayan numune incelenebilir. İletken olmayan numuneler çok ince (yaklaşık 3 Å/saniye) iletken malzemeyle kaplanarak incelenebilir hale getirilir. Biyolojik numuneler sıvı ihtiva edebilir bu tür malzemeleri inceleyebilmek için critical point drier (kritik nokta kurutucu) sayesinde numunenin yapısı ve şekli bozulmadan kurutularak mikroskopta incelemeye elverişli hale getirilir. Hazırlık basamaklarından geçtikten sonra numune Elektron Mikroskobunda incelenmeye hazır hale gelir. Numunenin yapısına göre değişmekte olan vakum süresi beklenir; bu süre ortalama 30dk.'dir. Vakum süresi tamamlandıktan sonra numunenin yüzey şeklinin resmi alınabilir. Numunenin elementel analizini yapmak 3dk. sürer. Ancak süre tamamen incelenecek numunenin yapısına bağlıdır [16, 18].

Atomik Kuvvet Mikroskobu

Atomik Kuvvet Mikroskobu (AKM), yüzey topografisini angstrom (Å) (10-10 m) mertebesinde 100 mikrona (µ) kadar görüntüleyebilme kabiliyetine sahip bir mikroskoptur. Bu cihaz ile moleküller arası kuvvetler hassas bir şekilde ölçülebilir ve özel bir hazırlama işlemi gerektirmeden malzemeler her ortamda görüntülenebilir. AKM'de, incelenecek malzemenin fotoğrafını oluşturmak için çapı 100 nm'den daha küçük olan çok ince silikon bir uç kullanılır. Silikon uç malzeme yüzeyinde hareket ederken malzeme üzerindeki atomlar silikon uçtaki atomları itmekte, silikon ucun yüksekliği ayarlanarak malzeme yüzeyine uygulanan kuvvetin sabit kalması sağlanmaktadır. Ölçümleme mekanizması, ucun yukarı aşağı hareketlerini kaydederek bu bilgileri örnek malzemenin yüzeyinin üç boyutlu resmini oluşturacak olan bilgisayara aktarmaktadır. Böylece tam yüzey topografyası kesin yükseklik bilgisiyle birlikte kaydedilebilmekte ve yüzeydeki her bir atom görülebilmektedir. AKM'de, görüntü elde edilmesinin yanında nanoyapıların oluşturulmasında da kullanılmaktadır [8, 16].

AFM, biyomalzemelerin görüntülenmesinde doğal yüzeye belirgin zarar vermediğinden önem kazanmaktadır.

AFM'nin temel gücü, çeşitli biyomalzemeleri sulu sıvılar altında alt nanometre ölçeğinde görüntüleme yeteneğidir. Bununla birlikte, önemli dezavantajı, konsol ucu boyutunun genel olarak incelenen nanomalzemelerin boyutlarından daha büyük olması ve bununla numunelerin yanal boyutlarını olumsuz şekilde aşırı tahmin edilmesine neden olmasıdır. Floresan tekniklerinden farklı olarak, AFM spesifik molekülleri tespit etme veya konumlandırma yeteneğinden yoksundur; bununla birlikte, bu dezavantaj, hücre yüzeylerinde tek fonksiyonel molekülleri araştıran veya saptayabilen bir ligand, hücre adezyon molekülü veya kimyasal grup taşıyan AFM konsol ucu ile tek moleküllü kuvvet spektroskopisindeki son gelişmelerle giderilmiştir [19].

AFM Analiz Yöntemi: AFM, taramalı tünelleme mikroskobundan farklı olarak, ölçüm için oksitsiz, elektrik iletken yüzeyler gerektirmez ve bir ucunda keskin uca sahip mikro işlemeli bir konsol (genellikle silikondan veya silisyum nitrürden yapılmış) içeren bir Taramalı Prop Mikroskobu (SPM) görüntüleme aracıdır. Elektrostatik ve van der Waals iticiliğinin neden olduğu konsol ucunun sapmasını ve uçtaki atomlar ile ölçülen yüzeydeki cazibe noktalarını algılamak için ucunda keskin bir uca sahiptir. Titreşimli konsol, daha sonra, yaklaşık 0.5 nm'lik bir dikey çözünürlüğe sahip bir görüntü elde etmek için numunenin yüzeyini tarar. SEM ve TEM teknikleri gibi AFM, nanomalzemelerin boyut, şekil, yapı, emilim, dağılım ve toplanmasını araştırmak için de kullanılabilir, AFM çalışmalarında kullanılan farklı tarama modları, kontaklı mod (statik mod olarak da adlandırılır), kontak modu ve aralıklı numune temas modunu içerir (dinamik mod ve dokunma modu olarak da adlandırılır). Fizyolojik koşullar altında nanomalzemelerin boyut ve şekillerinin araştırılmasına ek olarak AFM, nanomalzemelerin desteklenen lipid çift tabakaları ile gerçek zamanlı etkileşiminin gözlemlenmesi gibi biyolojik durumlarda; mevcut mikroskobik teknikleriyle elde edilemeyen nanomalzemeler arasındaki dinamikleri karakterize etme yeteneğine sahiptir [19].

Spektroskopik Teknikler

X-ışını Kırınım (Difraksiyon) Spektroskopisi

X-ışını Kırınım Spektroskopisi veya X-ışını Difraksiyon (XRD) spektroskopisi olarak bilinen, isminden anlaşılacağı üzere X-ışını denilen ve Ultraviyole ışından daha kuvvetli fakat Gamma ışınından daha zayıf enerjili ışın kullanılarak yapılan analizi temel almaktadır. X-ışınları yöntemi ile madde analizi, bir maddenin karakteristiği olan kırınım desenine dayanır. Kırınım, üzerine düşen elektromanyetik radyasyonun dalga boyuyla uyumlu farklı geometrik varyasyonlar içeren periyodik yapılara çarpması sonucu gözlenen bir etkidir. Aynı şekilde XRD, her bir kristal fazın kendine özgü atomik dizilimlerine bağlı olarak, aynı mertebedeki dalga boyuna sahip X-ışını dalgalarını karakteristik bir düzen içerisinde kırması esasına dayanır. Her bir kristal faz, X ışınları ile etkileştiğinde kendi yapısına özgü bir X-ışını kırınım deseni oluşur ve bu kırınım desenleri bir nevi parmak izi gibi o kristali tanımlar. X-ışını Kırınımı için 3-8 keV arası foton enerjisine sahip X-ışınlarıyla uyumlu olan moleküller ve kristaldeki atomlar arası mesafe 0.15-0.40 nm civarında olmalıdır. XRD analiz metodu, analiz sırasında numuneyi tahrip etmez ve çok az miktardaki numunelerin dahi analizlerinin yapılmasını sağlar. Periyodik cetvelde atom numaraları düşük elementler hariç birçok elementin analizleri yapılabilir. X ışınlarının dalgaboyu (0.1-10 Å) kristali oluşturan atomlar arasında

mesafe mertebesinde olduğundan kristal yapısını, örgü parametrelerini, kusurlar, tanecik büyüklüğü, faz geçişleri gibi birçok yapısal parametreleri incelemede yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [8, 20].

XRD Ölçüm Yöntemi: NP'ların kristal yapıları, XRD cihazı ile karakterize edilebilir. Bunun için numuneler seramik X-ışını tüpü ile 1.54 Å dalga boyunda üretilen 2.2 kW bakır anodu radyasyonu ile taranır. Analizi yapılacak her bir NP için yaklaşık 250 mg numune 3-90 theta (θ) aralığında tarama için numune tutucu üzerine ayrı ayrı konulur. Kristal oluşumu difraksiyon deseninden belirlendikten sonra kristalit boyutu Scherrer⁴ formülü ile hesaplanır. Diğer kimyasal yöntemlere göre, bazı üstünlükleri vardır. Bunlardan en önemlisi bir cismi, kendisini oluşturan elementler cinsinden değil, örnek içinde gerçekte bulunduğu şekilde açıklamasıdır [20].

Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi

Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometre (FT-IR) cihazı; Kızılötesi ışığın bir dipol momente sahip madde ile etkileşmesi sonucu yapısı içerisindeki bağların titreşim hareketi prensibine dayanır. FT-IR spektroskopisi incelenmek istenen örnek makro moleküllerin fonksiyonel gruplarının titreşimlerinden kaynaklanan yapısal, kompozisyonel ve fonksiyonel bilgilerinin elde edilmesini sağlayan bir tekniktir. Kızılötesi Spektroskopisi bir molekül veya bileşik yapısında bulunan bağlar hakkında tanımlayıcı bilgiler verir. Kızılötesi Spektroskopisi temel olarak kızılötesi ışığın incelenen madde tarafından soğurulmasına dayanır. Her bir titreşim hareketi belli bir enerjide soğurulmaktadır. Bu enerji zamanın bir fonksiyonu olarak ele alınarak işlenir. Elde edilen veriler dalga boyuna karşı grafik edilerek spektrumlar oluşturulur. Bu yöntem ile bir molekül veya bileşik yapısında bulunan bağlar ve fonksiyonel gruplar karakterize edilebilir. Organik bileşiklerin aynı olup olmadığı, saflığını, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri ve organik yapı (aromatik veya alifatik) hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca katı ve sıvı numuneler için kalitatif analiz yapılabilir [21, 22].

FT-IR Ölçüm Yöntemi: FT-IR analizi ile elde edilmiş NP'ların moleküler karakterizasyonu yapılarak, bu NP'ların sentezlenmesi/üretiminde yer alan maddelerinin yapısında bulunan moleküller, bu moleküllerin yapısında bulunan işlevsel gruplar (-NH₂, -OH, -COOH, gibi) ve moleküller bağlar hakkında bilgiler elde edilmektedir. FT-IR spektrumu kullanılarak yapılan spektroskopik analiz tekniği kısa şu şekildedir; FT-IR spektrumunda 4000–400 cm⁻¹ aralığında kaydedilen örnekler, potasyum bromür peletleri içinde hazırlanır. Spektrumlar 4 cm⁻¹ çözünürlükte 32 taramalı tek ışın modunda toplanır. Enstrüman detektörü döterlenmiş triglisin sülfat üzerine, kızılötesi dedektör materyali ve ışın demeti ayırıcısında (Splitter) KBr üzerinde kurulur. Detektörün sinyalini amplifiye etmek için kullanılan kazanım parametresi Autogain moduna ayarlanır. Aynanın hızı 0.6329 olarak ve diyafram değeri 60 KBr (150 mg) olarak belirlenir. Ortalama 2-4 mg numune bir havan içinde KBr ile birlikte öğütülür ve iyi bir saydamlığa sahip peletler hazırlanır. İlk olarak, background (zemin değer) spektrumu kaydedilir ve ardından örneklerin spektrumları aynı koşullarda elde edilmesi sağlanır. Background otomatik olarak numune

spektrumundan çıkarılır ve nihai spektrumlar, transmisyon modunda kaydedilir. Bunun sonucunda spektrumların yönetimi enstrümanın yazılımı ile gerçekleştirilir [22].

İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma - Kütle Spektrometresi

ICP-MS Sistemi, indüktif eşleşmiş plazma (ICP) ve kütle spektrometresi (MS) ünitelerinden oluşan bir cihazdır. ICP-MS, katı ve sıvı örneklerde çok sayıda elementin hızlı, hassas ve doğru biçimde, niteliksel, niceliksel ya da yarı-niceliksel olarak ölçülmesine olanak sağlayan ileri teknoloji ürünü bir analiz tekniğidir [16]. Bu tekniğin çalışma prensibi ise yüksek sıcaklıktaki bir plazmaya, genellikle argon gönderilerek moleküler bağların kırıldığı ve atomların iyonlaştırıldığı bir analitik analiz yöntemi şeklindedir. ICP-MS cihazı 8000-10000 kelvin sıcaklığa ulaşan argon plazma tarafından örneğin iyonize edilmesi, iyonize elementlerin kütle spektroskopisi tarafından ayrıştırılarak element derişimlerin elektron çoklayıcı bir dedektör tarafından ölçülmesi aşamalarını içerir. Analiz edilmek istenen örnekteki elementler ICP'de, sıvı numuneler bir püskürteç (nebulizer) içinde aerosolleştirilir ve tek tek atomların elektronlarını hareketlendirerek elementleri iyonize etmek için yüksek sıcaklıktaki bir ısı kaynağının (ör; argondan plazma) içinden geçirilir. İyonize atomlar daha sonra bir vakum haznesinde bir kılavuz iyon vasıtasıyla nötr parçacıklardan ayrılırlar ve MS ile saptanırlar. İyonların kütle/yük (m/z) oranı elementleri ayırmak için kullanılır ve her bir elementin yoğunluğu bir iç standardına göre iyon sinyal oranına dayalı olarak belirlenir. ICP-MS'teki plazma optik emisyon spektrometresinde kullanılan Argon plazması ile aynıdır. Periyodik tablodaki birçok elementin birinci iyonlaşma enerjileri Argonun iyonlaşma enerjisinden (15.76 eV) küçük olduğu için elementler plazma içerisinde pozitif iyonlara dönüşürler [8].

ICP-MS atom kütleleri 7-250 arasında olan metaller ve seçilmiş ametaller de dahil, numunelerin element kompozisyonunu teşhis etmek veya miktarını belirlemek için hassas analitik bir tekniktir. ICP-MS sistemiyle direk olarak çözeltide iz element derişimlerinin belirlenmesinde uygundur. Birçok element için gözlenebilir sınırların $\mu\text{g/L}$ 'nin (ppt ve daha düşük derişimler) altındadır. Çok sayıda element aynı anda analiz edilebilir özelliği sayesinde nitel analizlerde ve izotop oranlarının belirlenmesinde olduğu gibi, başta metalik elementler olmak üzere periyodik tablodaki elementlerin büyük çoğunluğunun nicel ve yarı-nitel tayinlerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. H, He, C, N, O, F, Pu elementleri ile asal gaz (He, Ne, Ar, Xe, Kr ve Rn) elementlerinin dışındaki tüm elementlerin derişimleri ultra iz element düzeyinde ölçülebilir. ICP-MS'in çalışma aralığı diğer yöntemlere oranla oldukça geniştir. Birçok element için $\mu\text{g-mg/L}$ arasında kalibrasyon grafikleri çizilebilmektedir ve bu farklı derişime sahip birçok elementin aynı anda analizine olanak sağlamaktadır [23, 24].

ICP-MS Ölçüm Yöntemleri: ICP-MS analiz tekniğinin en önemli aşamalarından biri örnek hazırlama aşamasıdır. Bunun için ICP-MS numuneleri, iyonizasyonu kolaylaştırmak için sıvı halde olmak zorunda olduğu için, numunenin parçalanması gerekebilir. Numune hacim gereklilikleri, numune içinde ilgilendiğimiz elementin yoğunluğuna, mevcut herhangi bir müdahaleye, ve ilgilendiğimiz element sayısına bağlı olarak değişir. 100 uL'e kadar düşük numune hacimleri ölçülebilir. Katı örneklerin çözelti haline getirilmesi için katı çözme tekniklerinden mikrodalga veya yaş yakma sistemleri kullanılarak yapılabilir. Bunun için katı

⁴X-ışını kırınımı ve kristalografisindeki Scherrer denklemi, alt-mikrometre parçacıklarının veya kristalitlerin büyüklüğünü, bir kırınım modelindeki bir tepenin genişlemesine bir katı olarak bağlayan bir formüldür. Paul Scherrer'den adını almıştır. Toz halindeki kristal parçacıklarının büyüklüğünün belirlenmesinde kullanılır

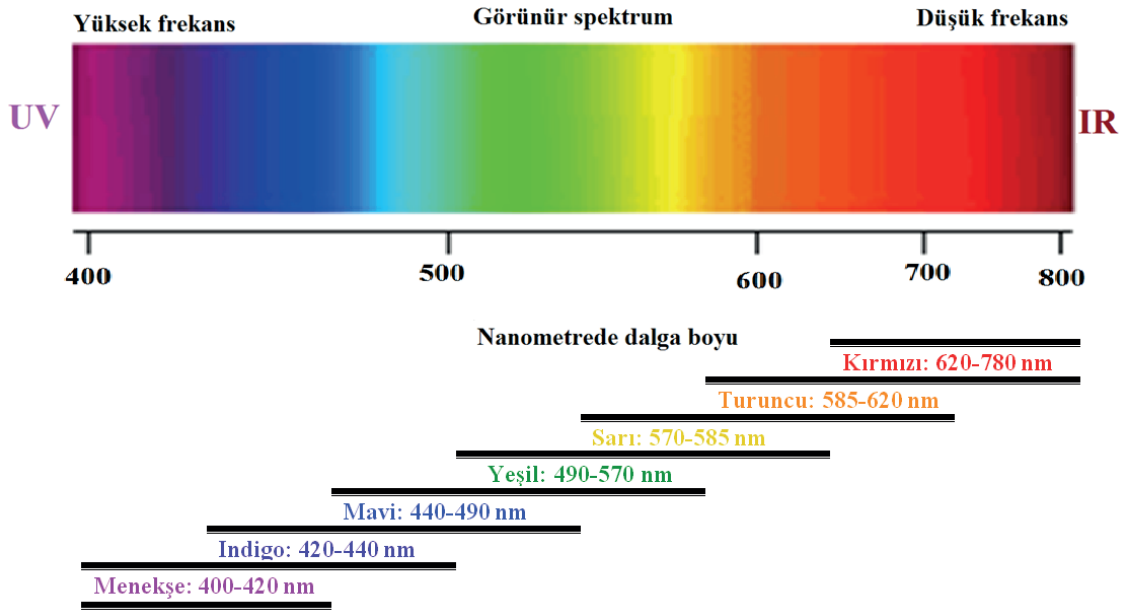
örnekler yüksek basınca dayanıklı teflon kaplar içinde ve yeterli saf güçlü asit (HNO_3 , HCl , HF , vb.) miktarı (2-5 mL asit) kullanılarak katının tamamının çözünmesini sağlar. Analiz edilecek sıvı örneklerdeki toplam çözünmüş katı madde miktarı % 0.1 in, organik madde içeriği de %2'nin altında olmalıdır. Eğer mümkünse örnekler mutlaka 0.45 mikronluk filtreden geçirilmelidir. Matris etkisini ortadan kaldırmak için örnekler ile standartların aynı asit çözeltisi (tipik olarak %2-5 HNO_3) içerisinde hazırlanması önemlidir. ICP-MS ölçüm aralığı ppb-ppt aralığında olduğundan, daha konsantr analitlerin bu ölçüm aralığına getirilmesi için seyreltme yapmak gerekmektedir [16, 24].

Ultraviyole-Görünür Spektroskopisi

Ultraviyole-Görünür (UV-vis) spektroskopisi, bir numune (sönümlenme olarak bilinen ve emilen ve yayılan ışığın toplamı olarak tanımlanan bir miktar) tarafından emilen ve yayılan ışığı ölçmek için kullanılan bir tekniktir. En basit biçimiyle, bir numune bir ışık kaynağı ve fotodedektör arasına konur ve UV-vis ışık demetinin yoğunluğu numuneden geçmeden önce ve geçtikten sonra ölçülür. Başka bir açıklaması, UV-vis absorpsiyon spektroskopisi bir ışın demetinin bir örnekten geçtikten veya bir örnek yüzeyinden yansıtıldıktan sonraki azalmasının ölçülmesidir. Işığın şiddetinin azalması absorplamanın

arttığını gösterir. Örneğinin derişimi belirli bir dalga boyundaki absorpsiyonunu ölçerek bulunur. Numunenin dalga boyuna bağlı sönümlenme spektrumunu ölçmek için bu ölçümler, her dalga boyunda karşılaştırılır. Bu veriler genelde sönümlenmenin dalga boyunun bir fonksiyonu olarak işaretlenir. İşlenmemiş bir tampon kullanılarak, tamponun spektral özelliklerinin numune sönümlenme spektrumunda bulunmamasını garantilemek için her bir spektrumun arka planı düzeltilir [25, 26].

UV-vis spektroskopisi genellikle çözültideki moleküller veya inorganik iyon ve komplekslerin ölçümünde kullanılır. Normalde UV taraması 200 - 400 nm dalgaboyu aralığına denk gelirken görünür ışık taraması 400 - 800 nm aralığına karşılık gelir (Şekil 2). Kolay, kullanışlı, hızlı, doğru ve ucuz olması bu tekniği vazgeçilmez kılmıştır [16]. Metal bazlı plazmonik NP'lar büyüklüğe, biçime, yoğunluğa, kümeleşme durumuna ve yüzeyine yakın kırılma indeksine karşı hassas optik özelliklere sahiptir, bu sebepten dolayı UV-Vis spektroskopisi ile NP'ların teşhis edilmesi, karakterize edilmesi ve incelenmesi oldukça önemlidir. Ölçülmüş spektrum, nümerik modellere dayanarak tahmin edilen spektrumla karşılaştırılır. Plazmonik olmayan NP'lar büyüklük ve yoğunluğa bağlı optik özelliklere sahiptirler, fakat spektrumları plazmonik NP'ları kadar saçılım özelliklerine karşı hassas değildir.



Şekil 2. UV-görünür nanometre dalga boyu skalası

UV-vis Ölçüm Yöntemi: UV-vis analizi 1 nm ile 1100 nm'ye kadar genişliğindeki bir yarı kullanarak spektra toplayan UV-vis tek ışınli diyot dizisi spektrometresi ile yapılmaktadır. UV, görünür ve infrarede yakın elektromanyetik spektrumu aydınlatmak için deuterium ve tungsten lambalar kullanılmaktadır. İncelenecek örnek spektrometre ile fotometre arasına ve kuvvet olarak adlandırılan, genellikle sert plastikten ya da quartz'dan yapılan özel dikdörtgen tüp (minimum 1 mL hacimli) içine yerleştirilir. Kullanılacak bu tüplerin UV-ışını olumsuz etkilemeyecek şekilde temiz ve yan yüzeylerinde çiziklerin olmaması gerekir. Farklı bazlı (ör: yarı-iletken veya metal) nano örnekler farklı dalga boylarını absorbladıkları için öncelikle bu aralığın bulunması gerekir. UV-görünür bölge cihazları 200-900 nm arasında çalışır. 60-100 µL kadar

küçük numunelerden mesafe uzunluğu 1 cm olan bir mikropil kullanarak spektra toplanabilir [26].

SONUÇ

Nanoteknoloji gelecekte yapılması düşünülen malzeme ve aygıt üretim yöntemlerinin değişmesini; nanoölçekte işlevi olan malzeme ve aygıtların makroskobik boyutlardaki malzeme içine yerleştirilmesini ve bunların çok miktarda hatasız üretilmesi için yeni yöntemlerin geliştirilmesi gerekli kılmaktadır. Nano ölçekteki malzemelerin daha hafif, daha sağlam, programlanabilir malzemeler olması, daha az malzeme kullanımı, üretim safhasında daha az enerji gereksinimi, artık malzeme üretmemesi gibi avantajlar göz önünde bulundurulduğunda NP'ların üretilmesi ve özelliklerin belirlenmesi önemli hususlardır. Nanometre

büyüklik aralığındaki parçacıklar hem doğada bulunurlar hem de mevcut endüstriyel süreçlerin bir sonucu olarak ortaya çıkarlar. Fakat yeni üretilen NP'lar farklıdır çünkü "sıfırdan" üretiliyorlar. NP'ların özellikleri ana bileşiklerin özelliklerine göre farklılık gösterirler çünkü NP'lardaki atomların yaklaşık %40-50'si yüzyededir ve bu da kitle (makro) materyallerden daha büyük reaktiviteye sahip olmalarını netice verir. Kabul edilen genel görüş; "makro yapı malzemeler nano yapı malzemeler ile aynı etkiyi göstermezler". Üstün özelliklerinden dolayı hemen her alanda giderek kullanımı artan nano boyuttaki malzemelerin faydalarının bilinmesi yanında, doğrudan veya dolaylı zararlı etkilerini belirlemek ancak nanotoksikolojik biyo-deneySEL çalışmaların sonuçları ile varılabilir. Bu sebeplerden dolayı hangi amaç ile üretilmiş olursa olsun mutlaka NP'ları kullanmadan önce gerekli karakterizasyon analizlerinden elzem olanları deney öncesi süreçte yapması gerekmektedir. Bu malzemeler tüm mühendislik alanında olmak üzere, gıda ve ziraat sektöründe ve insan yaşamı etkileyen her alanda kullanılmaktadır. Bilinen veya bilinmesi gereken bir gerçek; mühendislik ürünü sonucunda elde edilen her nano yapı malzeme, kullanılsın veya kullanılsın, biyolojik yaşamı, çevreyi ve sonuçta insan sağlığı doğrudan veya dolaylı olarak etkilemektedir. Söz konusu canlı yaşamın sağlığı ise nano yapı malzemelerin karakterizasyon yöntemlerinin bilinmesinin önemi açıkça ön plana çıkarmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Farré M, Gajda-Schranz K, Kantiani L, Barceló G (2009). Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Anal Bioanal Chem* 393:81–95
- [2] Madden AS, Hochella J (2005). A test of geochemical reactivity as a function of mineral size: Manganese oxidation by hematite nanoparticles promoted. *Geochim Cosmochim Acta*, 69:389–398
- [3] Pal S, Tak YK, Song JM (2007). Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 73:1712–1720
- [4] Chau CF, Wu SH, Yen GC (2007). The development of regulations for food nanotechnology. *Trends Food Sci Technol* 18:269–280
- [5] Ledin A, Karlsson S, Duiker A, Allard B (1994). Measurements *in situ* of concentration and size distribution of colloidal matter in deep ground waters by photon correlation spectroscopy. *Water Res* 28:1539–154
- [6] Patri A, Dobrovolskaia M, Stern S, McNeil S. (2006). Preclinical characterization of engineered nanoparticles intended for cancer therapeutics. In MM Amiji, ed., *Nanotechnology for Cancer Therapy*, Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis; Sh; 105–138.
- [7] Sapsford KE, Tyner KM, Dair BJ, Deschamps JR, Medintz IL. (2011). Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques. *Anal Chem*. 83:4453–4488
- [8] <http://daytam.atauni.edu.tr/cihaz>. Erişim tarihi Mayıs 2018.
- [9] <http://www.malvern.com/en/default.aspx>, Erişim tarihi Mayıs 2018.
- [10]. <http://nanocomposix.com/pages/characterization-techniques>
- [11] Baalousha M, Lead JR (2007). Characterization of natural aquatic colloids (<5nm) by flow-field flow fractionation and atomic force microscopy. *Environ Sci*

Technol 41:1111–1117

- [12] Clogston JD, Patri AK. (2011). Zeta potential measurement. *Methods Mol Biol*. 697:63-70
- [13] <http://merlab.metu.edu.tr/> Erişim tarihi Mayıs 2018.
- [14] Hall JB, Dobrovolskaia MA, Patri AK, McNeil SE. (2007). Characterization of nanoparticles for therapeutics. *Nanomedicine*; 2:789–803.
- [15] Williams DB, Carter CB. (2009). *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*, Second Edition. *Springer*; Sh; 3–22.
- [16] <http://mlab.bayburt.edu.tr/en/Sayfa/Cihazlar>, Erişim tarihi Mayıs 2018.
- [17] Suzuki E. (2002). High-resolution scanning electron microscopy of immunogold-labelled cells by the use of thin plasma coating of osmium. *J. Microsc.* 208, 153–157
- [18] Johal MS. (2011). *Understanding nanomaterials*. Boca Raton: CRC Press. FL
- [19] https://en.wikipedia.org/wiki/Atomic_force_microscopy, Erişim tarihi Mayıs 2018.
- [20] Zanchet D, Hall BD, Ugarte D (2011). *Characterization of nanophase materials*. Wiley-VCH Verlag: GmbH. Sh; 13–36.
- [21] Cantor CR, Schimmel PR. (1980). *Techniques for the study of biological structure and function*. San Francisco: W.H. Freeman. 584 sh.
- [22]. https://en.wikipedia.org/wiki/Fourier_transform_infrared_spectroscopy, Erişim tarihi Mayıs 2018.
- [23] Gmshinski IV, Khotimchenko SA, Popov VO, Dzantiev BB, Zherdev AV, Demin VF (2013). Nanomaterials and nanotechnologies: methods of analysis and control. *Russ Chem Rev.* 82:48.
- [24] Endres PJ, Paunesku T, Vogt S, Meade TJ, Woloschak GE (2007). DNA-TiO₂ nanoconjugates labeled with magnetic resonance contrast agents. *J Am Chem Soc.* 129:15760–61.
- [25] Jiang X, Jiang J, Jin Y, Wang E, Dong S (2005). Effect of colloidal gold size on the conformational changes of adsorbed cytochrome c: probing by circular dichroism, UV-visible, and infrared spectroscopy. *Biomacromolecules.* 6:46–53.
- [26] Biju V, Itoh T, Ishikawa M (2010). Delivering quantum dots to cells: bioconjugated quantum dots for targeted and nonspecific extracellular and intracellular imaging. *Chem Soc Rev.* 39:3031–56