

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

VYUŽITÍ MALDI-TOF MS PŘI ANALÝZE SMĚSÍ POLYMERŮ

KAREL MAZANEC^{a,b} a JOSEF CHMELÍK^{a,*}

^aÚstav analytické chemie AV ČR, Veveří 97, 611 42 Brno,

^bChemická fakulta Vysokého učení technického, Purkyňova 118, 612 00 Brno

mazanec@iach.cz, chmelik@iach.cz

Došlo 26.7.04, přijato 14.10.04.

Klíčová slova: MALDI, polystyren, distribuce, molekulová hmotnost, polydisperzita

Úvod

Cílem tohoto článku je na modelových vzorcích směsí polystyrenů ukázat možnosti praktického využití MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight Mass Spectrometry) pro analýzu směsí polymerních látek. MALDI-TOF MS je relativně nová, perspektivní metoda, objevená a zavedená koncem osmdesátých let původně pro analýzu biopolymerů. O metodě MALDI-TOF MS syntetických polymerů bylo v posledních patnácti letech napsáno mnoho původních článků a několik souhrnných referátů^{1,2}.

Polystyren je polymer, který je využíván v široké škále aplikací. Vyrábí se radikálovou polymerací styrenu probíhající velmi snadno i za normálního tlaku. Protože homopolymer má nízkou houževnatost, v praxi se uplatňují především modifikované typy. Dá se předpokládat, že množství různých modifikací poroste a je dobré pro ně najít i patřičné analytické metody.

MALDI využívá skutečnosti, že přidáním určité nízkomolekulární látky (matrice) k analytu a jejich společnou krystalizací vznikne systém, ze kterého se ostřelováním laserovými pulsy celkem snadno uvolňují ionty i relativně velkých molekul. Výhodou této metody je, že jen zřídka dochází k fragmentaci molekul analyzované látky a vzniklé ionty jsou převážně jednonásobně nabitě. To znamená, že lze určit hmotnosti celých molekul, v případě polymerů i distribuce jejich relativních molekulových hmotností.

Pro měření daného analytu je důležité nalézt vhodnou matici. Velmi zjednodušeně platí, že pro hydrofilní polymery jsou vhodné hydrofilní matrice, a opačně – pro hydrofobní polymery hydrofobní matrice. Částečně to vyplývá z nutnosti nalézt vhodné rozpouštědlo, ale existují i další faktory, které nejsou dosud obecně vysvětleny. Výběr

vhodné matrice je tedy poměrně složitý a ve většině případech je nutné optimální podmínky hledat, přičemž je třeba věnovat pozornost možným interferencím (matricové klastry, interakce matrice s polymerem). Např. při měření PS se s velkým úspěchem používá dithranol (1,8,9-anthracenol) se stříbrnými solemi, ale složení roztoku této směsi je stabilní jen několik minut¹. Využití různých matric pro měření syntetických polymerů popisuje mnoho původních článků a velmi dobrý přehled je v již zmíněném referátu¹. Jako matrice jsou nejčastěji využívány slabé aromatické kyseliny s chromoforem, které vykazují silnou absorpci při vlnové délce použitého laseru (N_2 – 337 nm). Pro hydrofilní polymery to jsou kyseliny 2,5-dihydroxybenzoová, α -kyano-4-hydroxyskořicová a chlorosalicylová, pro hydrofobní polymery kyselina retinová a dithranol.

Mechanismus tvorby iontů v MALDI je komplikovaný. Dochází ke třem základním typům ionizace: (i) přenos protonu, (ii) interakce s ionty (např. kationizace kovovými ionty) a (iii) vytvoření iontu odtržením elektronu. Všechny uvedené typy ionizací byly pozorovány i u syntetických polymerů. Přetrvává ovšem otázka, jestli k ionizaci dochází v oblaku vytvořeném laserem nad povrchem vzorku, nebo jestli dochází k ablaci předem vytvořených iontů².

Při ionizaci syntetických polymerů hraje hlavní roli kationizace kovovými ionty, zatímco u biopolymerů se více uplatňuje mechanismus přenosu protonu. Ve spektech relativně polárních polymerů jsou často pozorovány sodné a draselné adukty, přestože ani sodné ani draselné soli nebyly dodatečně přidány. Tyto kationty jsou přítomny jako nečistoty ze skla, rozpouštědel, reagentů apod., a polymery s relativně vysokou iontovou afinitou nutně nevyžadují jejich vyšší koncentraci ve vzorku pro MALDI. Naproti tomu nepolární syntetické polymery bez heteroatomů, jako právě polystyren, ale i polybutadien a polyisopren, mohou být úspěšně ionizovány teprve po přidání stříbrných či měděných solí, jejichž kationty interagují s dvojnými vazbami těchto polymerů¹. Pro měření nepolárních polymerů bez heteroatomů a dvojných vazeb, jako je polyetylen a ostatní polyolefiny, nejsou konvenční metody ionizace dostatečné a polymery musí být před měřením pomocí MALDI-TOF MS modifikovány³.

Porovnání výsledků MALDI-TOF MS a jiných analytických metod (např. gelové permeační chromatografie) ukazuje, že u MALDI-TOF MS dochází k určitému posunu distribuce relativních molekulových hmotností ať už k vyšším, či (většinou) nižším hodnotám¹. Usuzuje se, že k těmto odchylkám přispívá jak příprava vzorku, tak i instrumentální faktory.

Při přípravě vzorku je potřeba nalézt vhodnou matici, sůl a rozpouštědlo, a směs správně nanést na destičku s cílem dosáhnout co nejvíce homogenní společné krystalizace všech látek. Různé polymery, případně polymery s různými koncovými skupinami, se různě ochotně ionizují

a tedy mají různé iontové efektivity. Rozdílné iontové efektivity mají ovšem i jednotlivé oligomery téhož polymeru s různým počtem strukturních jednotek v řetězci. Obdobně tomu je i s desorpcí různých polymerů z matrice po aplikaci laserového pulsu.

Při měření polymerů s širšími distribucemi relativních molekulových hmotností zpravidla dochází k určitému posunu průměru relativní molekulové hmotnosti. Tyto hmotnostní posuny mohou být minimalizovány srovnáním s měřením polymerů s úzkou distribucí, případně měřením separovaných frakcí polymerů s širší distribucí⁴⁻⁶. Jiný přístup ukazuje práce amerického NIST (Národní úřad pro standardizaci a technologii), kde jsou srovnány výsledky průměrných relativních molekulových hmotností totožných polymerních vzorků změřených za stejných podmínek přípravy mnoha laboratořemi po celém světě a následně statisticky vyhodnoceny⁷. Součástí podobného projektu je i tato práce, která je zaměřena na charakterizaci různých směsí dvou polystyrenů připravených v NIST. Cílem projektu je srovnat a statisticky vyhodnotit jednotlivými laboratořemi naměřené hodnoty průměru relativních molekulových hmotností a poměrů složek. Poměry, v jakých byly složky smíchány, nebyly jednotlivým laboratořím oznámeny.

Experimentální část

Všechna měření metodou MALDI-TOF MS byla provedena na přístroji Kompact MALDI SEQ tDE (Kratos Analytical, Shimadzu) TOF vybaveném dusíkovým laserem (337 nm) v lineárním módu s pulsní extrakcí. Směsi polystyrenů (PS) byly získány z NIST (Gaithersburg, USA). Každý z pěti vzorků (označených písmeny A až E) byl směsí obsahující v různém poměru polystyren zakončený hydroxylovou skupinou (PSOH) a polystyren zakončený vodíkem (PSH). Pro zajištění homogenního promíchání obou složek byly připraveny roztoky těchto dvou polymerů v toluenu a přeneseny do vialek. Toluén byl poté odpařen. Každá vialka obsahovala přibližně 7 mg PS. Jako matrice byla používána kyselina retinová (Fluka, Buchs, Švýcarsko). Trifluorooctan stříbrný (AgTFA) byl získán od firmy Aldrich (Milwaukee, USA). Všechny látky byly použity bez dalšího přečištění.

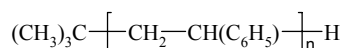
PS směsi, matrice a soli byly rozpuštěny v tetrahydrofuranu (Lachema, Neratovice, Česká republika) na koncentraci 5 mg.ml⁻¹ PS, 75 mg.ml⁻¹ kyseliny retinové a 5 mg.ml⁻¹ AgTFA. Připravené roztoky pak byly v tomto pořadí smíchány v objemovém poměru 1:10:1, vzniklé směsi byly poté naneseny na terčík a nechány volně vyschnout na vzduchu. Jednotlivá spektra byla výsledkem 100 laserových pulsů. Vzorky byly měřeny vícekrát, přičemž bylo dbáno, aby se v průběhu měření neměnilo nastavení přístroje a z každé plošky na terčíku bylo sejmuto jen jedno spektrum.

Výsledky a diskuse

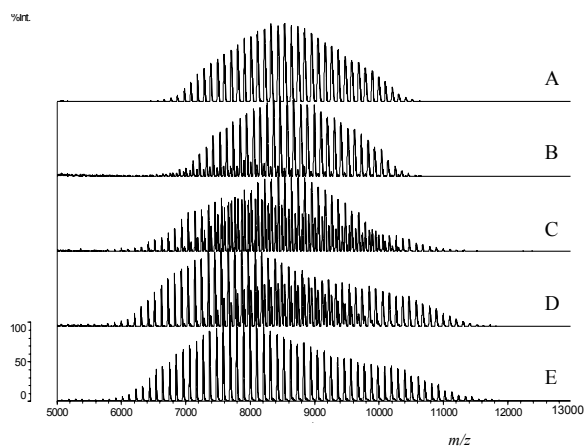
Obr. 1 ukazuje souhrnně spektra všech polystyrenových vzorků, obr. 2 pak výřez hmotnostního spektra vzorku C, kde jsou vidět primární i sekundární série píků posunutých od sebe o 44 jednotek relativní molekulové hmotnosti. Na obr. 1 jsou velmi dobře vidět rozdílné tvary distribučních křivek vzorků A (pouze PSOH) a E (pouze PSH). Ve směsných vzorcích B až D si jednotlivé série píků tento tvar zachovávají.

Hmotnostní spektrum je závislost intenzity signálu detektoru (která je přímo úměrná množství částic na něj dopadlých) na poměru hmotnosti a náboje m/z . Z takového vyjádření se může zdát, že už je relativně snadné vypočítat jak číselné, tak hmotnostní průměry relativních molekulových hmotností (M_n , M_w). Nicméně, právě z důvodů hmotnostní diskriminace, je potřeba být velmi opatrný při vyhodnocování výsledků.

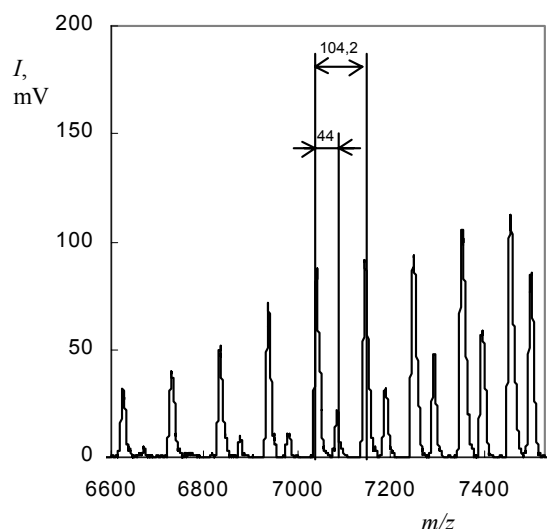
Pro správný výpočet průměrů relativních molekulových hmotností je důležitá správná kalibrace naměřených spekter. Oba polymery byly připraveny aniontovou polymerizací styrenu, přičemž jeden z konců řetězce nese *tert*-butylovou skupinu jako zabudovaný zbytek iniciátoru. PSH má tedy vzorec:



PSOH je místo -H zakončen koncovou skupinou $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, a má tedy o 44 jednotek větší relativní molekulovou hmotnost než oligomery PSH obsahující v řetězci stejný počet strukturních jednotek. Z toho lze snadno spočítat přesné relativní molekulové hmotnosti jednotlivých oligomerů PSH, PSOH a jejich kvazimolekulárních iontů. Tyto přesně vypočítané hodnoty se přiřadí k jednotlivým píkům a hmotnostní spektra se překalibrují.



Obr. 1. Hmotnostní spektra MALDI-TOF vzorků A až E (složení viz. tab.I); vzorky připraveny krystalizací roztoku směsi polystyrenů (5 mg.ml⁻¹), kyseliny retinové (75 mg.ml⁻¹) a trifluorooctanu stříbrného (5 mg.ml⁻¹) v tetrahydrofuranu v objemovém poměru 1:10:1



Obr. 2. Výřez hmotnostního spektra MALDI-TOF vzorku C ukazující primární, resp. sekundární sérii píků (polystyren končený vodíkem, resp. polystyren končený skupinou $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, přičemž sekundární série je o 44 jednotek relativní molekulové hmotnosti posunuta)

Další možností kalibrace je využití interního standardu, tzn. přidání látky se známou relativní molekulovou hmotností, která je měřitelná při podmínkách analýzy. Jinou možností je využití metody „multi-peak calibration“ známé také jako metoda „self-calibration“⁸, která je založena na výpočtu relativních molekulových hmotností polymerních materiálů s využitím znalostí přesných diferencí mezi jednotlivými oligomery. Výhodné je využít tyto druhé dvě metody pro zpřesnění kalibrace a po úspěšné identifikaci iniciátoru (pokud nebyl předem znám) a přiřazení konkrétních píků kalibrovat na přesně spočítané relativní molekulové hmotnosti jednotlivých iontů.

Tabulka I
Přehled výsledků výpočtů

Vzorek	Série píků	Průměr relat.molekulových hmotností		Koeficient polydisperzity v	Hmotnostní poměr $m(\text{PSOH})/m(\text{PSH})$
		číselný M_n	hmotnostní M_w		
A	PSOH	8569,73	8632,06	1,0072	—
	PSH	—	—	—	—
B	PSOH	8567,41	8616,81	1,0058	25,80
	PSH	8126,83	8173,71	1,0058	—
C	PSOH	8549,64	8599,18	1,0058	1,40
	PSH	8227,56	8340,05	1,0138	—
D	PSOH	8525,68	8564,62	1,0046	0,26
	PSH	8279,66	8416,72	1,0166	—
E	PSOH	—	—	—	—
	PSH	8440,67	8605,50	1,0195	—

Integrovaním jednotlivých píků se dostane jejich plocha $A_i(\text{PSH})$ nebo $A_i(\text{PSOH})$. Dosazením do rovnic:

$$M_n = \left(\frac{\sum ((M_i - M_{\text{Ag}}) \cdot A_i)}{\sum A_i} \right)$$

$$M_w = \left(\frac{\sum ((M_i - M_{\text{Ag}})^2 \cdot A_i)}{\sum ((M_i - M_{\text{Ag}}) \cdot A_i)} \right)$$

se dostanou příslušné průměry relativních molekulových hmotností. M_i je relativní molekulová hmotnost jednotlivých oligomerů, A_i je jejich plocha, M_{Ag} je relativní atomová hmotnost Ag^+ iontů vázaných na jednotlivých molekulách polymeru. Tímto způsobem se spočítají M_n a M_w pro série píků jak PSH, tak PSOH. Je zřejmé, že čím budou distribuční křivky relativních molekulových hmotností širší a méně symetrické, tím bude podíl hmotnostního a číselného průměru relativních molekulových hmotností větší. Tento poměr (M_w/M_n) je označován jako koeficient polydisperzity v a je další charakteristickou veličinou popisující polymery.

Protože MALDI-TOF MS měří principiálně počet iontů dopadajících na detektor, odpovídá podíl $A(\text{PSOH})/A(\text{PSH})$, kde $A(\text{PSOH})$ je suma $A_i(\text{PSOH})$ a $A(\text{PSH})$ suma $A_i(\text{PSH})$, molárnímu poměru těchto složek. Podle rovnice:

$$\frac{m(\text{PSOH})}{m(\text{PSH})} = \left(\frac{M_n(\text{PSOH}) \cdot A(\text{PSOH})}{M_n(\text{PSH}) \cdot A(\text{PSH})} \right)$$

se vypočítá hmotnostní poměr.

Z tabulky I je patrné, že jak číselné, tak hmotnostní průměry relativních molekulových hmotností spočítané z jednotlivých spekter daných sérií vzorků si vcelku velmi dobře odpovídají. Bylo zjištěno, že ve směsích s postupně klesajícím obsahem PSH dochází společně se snížením hodnoty koeficientu polydisperzity také k určitému poklesu průměrů relativních molekulových hmotností PSH složky. Na obr. 1 je vidět, že vzorek E má širší distribuci než vzorek A (koeficient polydisperzity 1,0195 proti 1,0072)

a pozvolnější pokles intenzit píků s rostoucím m/z . S klesajícím obsahem PSH ve směsích, tak jak jejich množství klesá pod detekční limit, mizí postupně ze spekter píky s nižší intenzitou. Právě to má u vzorku PSH s nesymetrickou distribuční křivkou za následek pokles průměrů relativních molekulových hmotností. U vzorku PSOH, který má distribuční křivky s daleko symetričtější charakterem, se tento posun průměrů relativních molekulových hmotností se změnou poměru složek ve vzorcích neprojevuje.

Závěr

Tato práce sleduje jedno z možných využití techniky MALDI-TOF MS pro analýzu syntetických polymerů. Tato metoda je vhodná nejen pro studium biopolymerů, ale nachází uplatnění i v chemii syntetických polymerů, protože hmotnostní spektra ukazují převážně jednou nabitě kva-zi-molekulární ionty bez fragmentace, a jsou tedy velmi jednoduchá. Provedené experimenty při analýze směsí polystyrenů ukázaly, že MALDI-TOF MS dokáže účinně a přitom velmi jednoduše identifikovat jednotlivé oligomery polystyrenů s různými koncovými skupinami, určit distribuce molekulových hmotností, koeficient polydisperzity a stanovit molární resp. hmotnostní složení směsí.

LITERATURA

1. Nielen M. W. F.: *Mass Spectrom. Rev.* 18, 309 (1999).
2. Murgasova R., Hercules D. M.: *Int. J. Mass Spectrom.* 226, 151 (2003).
3. Bauer B. J., Wallace W. E., Fanconi B. M., Guttman C. M.: *Polymer* 42 (25), 9949 (2001).
4. Chmelík J., Konečný P., Planeta J., Zdráhal Z., Vejrosta J., Chmelík J., Jr.: *HRC J. High Resolut. Chromatogr.* 23, 502 (2000).
5. Chmelík J., Planeta J., Řehulka P., Chmelík J., Jr.: *J. Mass Spectrom.* 36, 760 (2001).
6. Planeta J., Řehulka P., Chmelík J.: *Anal. Chem.* 74, 3911 (2002).
7. Guttman C. M., Wetzel S. J., Blair W. R., Fanconi B. M., Girard J. E., Goldschmidt R. J., Wallace W. E., VanderHart D. L.: *Anal. Chem.* 73, 1252 (2001).
8. Montaudo G., Montaudo M. S.: *Anal. Chem.* 66, 4366 (1994).

K. Mazanec^{a,b} and J. Chmelík^a (*^aInstitute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, ^bFaculty of Chemistry, Technical University, Brno*):
Utilization of MALDI-TOF MS for Analysis of Polymer Mixtures

Utilization of MALDI-TOF MS in polymer analysis is described. The method is suitable both for biopolymers and synthetic polymers. Various mixtures of OH- and H-terminated polystyrenes were studied. MALDI-TOF MS is able to identify individual oligomers with different end-groups, to determine molecular weight distribution and polydispersity, and to analyze molar or weight composition of polymer mixtures.

Ústav makromolekulární chemie AV ČR v Praze

nabízí

DOKTORSKÉ STUDIUM POLYMERŮ

Studium probíhá ve spolupráci s vysokými školami v ČR. Témata studia se týkají různých oblastí moderní polymerní vědy, např. syntézy polymerů pro využití v medicíně a biologii, samoorganizace polymerů pro využití v technologických aplikacích, funkcionalizace polymerů pro reakce na stimuly prostředí, recyklace odpadních plastů, využití špičkových fyzikálních a fyzikálně-chemických metod při studiu a ovlivňování vlastností polymerů.

Anotace témat a další informace jsou vystaveny na stránce Možnosti studia na www.imc.cas.cz. V případě zájmu o některé z témat prosím kontaktujte školitele uvedeného u tématu nebo tajemníka ÚMCH pro vědeckou výchovu RNDr. Petra Štěpánka, DrSc. (tel. 296 809 111, e-mail: stepanek@imc.cas.cz).