

JASNA VUKOVIĆ¹
SLOBODAN JOVANOVIĆ²
MANFRED D. LECHNER¹

¹Institute for Chemistry,
University of Osnabrueck,
Osnabrueck, Germany

²Tehnološko–metalurški fakultet,
Univerzitet u Beogradu,
Beograd, Srbija

NAUČNI RAD

678.674:543.51

KARAKTERIZACIJA ALIFATSKIH HIPERRAZGRANATIH POLIESTARA MALDI–TOF MASENOM SPEKTROMETRIJOM

U okviru ovog rada prikazani su rezultati ispitivanja opsega sporednih proizvoda (ciklika) kod hidroksi–funkcionalnih alifatskih hiperrazgranatih poliestara primenom MALDI–TOF masene spektrometrije. Istovremeno su opisani i osnovni principi MALDI–TOF masene spektrometrije i dat je kratak literaturni pregled.

Ispitivanje veze između svojstava polimera, njihove morfologije i hemijske strukture omogućava prikupljanje informacija neophodnih za bolje kontrolisanje reakcija polimerizacije, čime se olakšava sintetisanje polimera sa dobro definisanom molekulskom strukturom i željenim svojstvima. Najčešće korišćene metode za karakterizaciju polimera su rasipanje svetlosti, viskozimetrija, GPC, osmometrija napona pare i membranska osmometrija, NMR, FTIR, itd. Pored navedenih metoda, za ispitivanje polimera koristi se i masena spektrometrija (MS). Primena masene spektrometrije se značajno proširila pojavom MALDI–TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization–Time Of Flight) MS. U početku je ova metoda primenjivana samo na male biomolekule, kao što su npr. amino kiseline. Pri tome je otparavanje (desorpcija) uzorka bez hemijske degradacije izvedeno korišćenjem lasera kao izvora energije. Značajan doprinos u razvijanju tehnike desorpcije velikih molekula pomoću lasera i njihove jonizacije odigrao se 1987. godine, kada su Tanaka (Shimadzu korporacija) i njegovi saradnici primenili specifičnu metodu pripreme uzorka, koja se zasnivala na mešanju ispitivanog polimera sa ultrafinim metalnim prahom (čestice kobalta veličine oko 30 nm) i glicerinom [1,2]. Korišćenjem ovog načina pripreme uzorka i lasera odgovarajuće talasne dužine, Tanaka je uspeo da bez fragmentacije desorbuje i jonizuje biomolekule molarne mase od oko 35 000 g/mol. Za taj doprinos, kao i za konstrukciju odgovarajućeg instrumenta za izvođenje MALDI–TOF MS on je 2002. godine dobio Nobelovu nagradu za hemiju. Međutim, zbog velike cene i komplikovane primene metalni prah, koji je nazvan "Japanski prah" se sve manje koristi za pripremu uzorka, a umesto njega danas se u te svrhe

uglavnom koriste organska jedinjenja male molarne mase koja mogu dobro da absorbuju svetlost lasera odgovarajuće talasne dužine. Primenu takvih organskih molekula za pripremu uzorka za ispitivanje MALDI–TOF MS prvi su opisali Hillenkamp i Karas [3].

MALDI–TOF masena spektrometrija je u početku korišćena prevashodno samo za analizu biopolimera [4,5]. S obzirom da metode koje su korišćene za pripremu biopolimernih uzorka za MALDI–TOF eksperimente nisu bile primenljive kod većine sintetskih polimera, MALDI–TOF MS je prvi put uspešno primenjena za ispitivanje polimera velikih molarnih masa tek 1992. godine [6–9]. Od tada je usavršavanjem ove blago jonizujuće (soft ionization) metode za izučavanje polimera omogućeno prevođenje polimera u gasnu fazu bez degradacije njegovih molekula. Pikovi u MALDI–TOF masenom spektru potiču od jona nedegradiranog polimernog lanca, što omogućava strukturnu identifikaciju pojedinih molekula. Primenom ove metode ispitani su različiti polimeri, kao što su polistiren i njegovi derivati [10,11], akrilni i metakrilni polimeri [12,13], poliestri [9,14–16], polietri [17], poliamidi i poliimidi [18,19], polisiloksani i polisilani [20,21], polikarbonati [22] i kopolimeri [23,24].

U ovom radu su korišćenjem MALDI–TOF masene spektrometrije ispitani hidroksi–funkcionalni alifatski hiperrazgranati poliestri, sintetisani polazeći od 2,2–bis(hidroksimetil)propionske kiseline (bis-MPA) i di–trimetilolpropana (DiTMP). Pri tome je kvalitativno ispitivan opseg sporednih reakcija (ciklizacije), upoređivanjem dobijenih masenih spektara uzorka različitih pseudo generacija.

OSNOVNI PRINCIPI MALDI–TOF MS

Karakterisanje polimera metodom MALDI–TOF MS sastoji se iz tri stupnja. Prvi stupanj predstavlja prevođenje molekula polimera u gasnu fazu i njihovu jonizaciju. Drugi stupanj predstavlja razdva-

Adresa autora: J. Vuković, Institute for Chemistry, University of Osnabrueck, Osnabrueck, Germany

E-mail: jasnav2002@googlemail.com

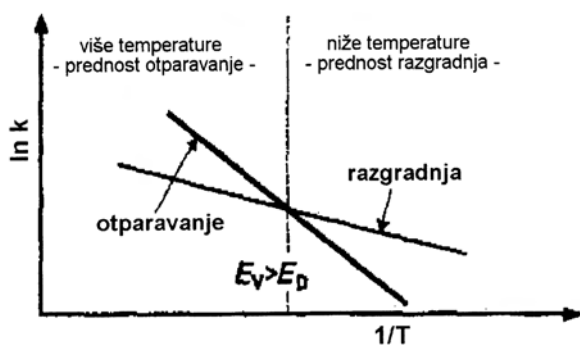
Rad primljen: Septembar 02, 2007.

Rad prihvaćen: Septembar 20, 2007.

janje jonizovanih molekula polimera na osnovu odnosa mase i naelektrisanja (m/z). I na kraju, treći stupanj predstavlja detekciju jona.

Prevođenje molekula polimera u gasnu fazu

Prevođenje molekula polimera u gasnu fazu izvodi se delovanjem impulsnog lasera vrlo kratkim impulsima na pripremljeni uzorak. Pri tome su molekuli polimera homogeno raspoređeni u velikom višku matrice, sastavljene od malih organskih molekula. Matrica služi da absorbuje veći deo energije lasera, čime se molekuli polimera štite od velike količine energije laserske svetlosti. Usled dejstva lasera dolazi do otparavanja i prevođenja u gasnu fazu molekula matrice i polimera. Desorpcija makromolekula i prevođenje u gasnu fazu se može objasniti na sledeći način [25,26]. Prilikom zagrevanja, odnosno dovođenja energije nekoj supstanci AB može doći do otparavanja i prelaza celih molekula AB u gasnu fazu ili do njihove razgradnje i prelaza nastalih produkata u gasnu fazu. Na slici 1 prikazani su rezultati ispitivanja uticaja temperature (T) na otparavanje i razgradnju supstance AB u obliku zavisnosti logaritma konstante brzine ($\ln k$) od $1/T$ (Arenijusova jednačina). Rezultati prikazani na slici 1 pokazuju da je za supstancu AB energija aktivacije otparavanja (E_V), predstavljena nagibom odgovarajuće prave, veća od energije aktivacije razgradnje (E_D), pri čemu se prave linije $\ln k = f(1/T)$ seku u nekoj kritičnoj vrednosti $1/T$. Pri nižim temperaturama je konstanta brzine razgradnje (k_D) veća od konstante brzine otparavanja (k_V), što dovodi do razgradnje supstance AB. Iznad neke kritične temperature, k_V postaje veća od k_D pa dolazi prevashodno do otparavanja celih molekula AB [25,26]. Poslednji slučaj se dešava ukoliko se supstanci AB dovede velika količina toplote u vrlo kratkom vremenskom intervalu delovanjem impulsnog lasera. Optimalna dužina impulsa kod MALDI-TOF MS je obično 3 ns.



Slika 1. Zavisnost $\ln k$ od $1/T$ za otparavanje i razgradnju supstance AB [25]

Figure 1. Dependence of $\ln k$ vs. $1/T$ for the desorption and degradation of the substance AB [25]

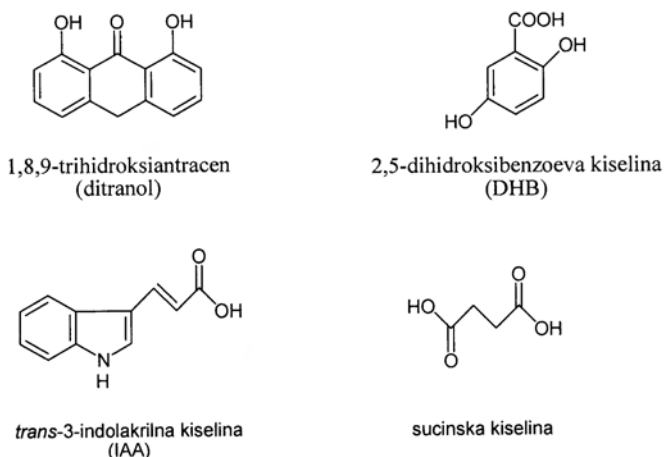
Kao što je već napomenuto, pri primeni MALDI-TOF metode laserom se deluje na pripremljeni uzorak, koji inače predstavlja smešu polimera matrice i odgovarajućeg pomoćnog agensa za jonizaciju. Molekuli polimera treba da su homogeno raspoređeni u matrici. Pripremljeni uzorak se nanosi na specijalan metalni držač uzorka (target plate). Pri dejstvu lasera na uzorak, matrica absorbuje najveći deo svetlosne energije, koju zatim prenosi u određenoj količini na molekule polimera i na taj način učestvuje u njihovoj desorpciji i jonizaciji, a istovremeno ih štiteći od viška energije lasera koja bi mogla da izazove značajnu fragmentaciju molekula polimera. Na osnovu prethodnog može se zaključiti da je osnovna svrha korišćenja matrice, ravnomerna raspodela polimera u ispitivanom uzorku, absorpcija energije lasera, transfer molekula polimera u gasnu fazu i aktivna uloga u njegovoj jonizaciji [27,28]. Izbor odgovarajuće matrice za određeni polimer je izuzetno važan za uspešan MALDI-TOF eksperiment. Matrica mora da ima sledeća svojstva:

1. malu molarnu masu, kako bi lakše i brže otparila,
2. visoku absorpciju energije na talasnoj dužini lasera,
3. dobru stabilnost u vakuumu,
4. nizak napon pare, kako ne bi otparila u toku pripreme uzorka ili stajanjem u spektrometru,
5. dobru rastvorljivost u rastvaračima koji su istovremeno rastvarači i za polimer i
6. dobru mešljivost sa uzorkom u čvrstom stanju.

Međutim, tačna uloga matrice još uvek nije u potpunosti istražena tako da se izbor matrice još uvek svodi na metodu probe i greške. Zbog činjenice da polarnost polimera može biti različita, postoji čitav niz različitih matrica koje se mogu koristiti. Nielen je u svom preglednom radu dao opširne tabele sa prikazanim isprobanim kombinacijama različitih polimera i matrica [29]. Na slici 2 prikazane su formule nekoliko organskih jedinjenja koja se najčešće koriste u svojstvu matrice.

Kako bi se pospešila jonizacija ispitivanog uzorka, smeši matrice i polimera se obično dodaje agens za jonizaciju. Polarni polimeri se mogu uspešno jonizovati dodavanjem rastvora soli koje sadrže Na^+ ili K^+ . Napolarnim polimerima dodaju se organske soli koje sadrže Ag^+ ili Cu^{2+} . U toku MALDI procesa uglavnom nastaju jednom naelektrisani joni polimera, mada je moguće i prisustvo višestruko naelektrisanih jona, čija pojava zavisi od korišćene matrice, intenziteta lasera i primenjenog napona.

Jedan od glavnih faktora koji ima veliki uticaj na kvalitet MALDI-TOF masenog spektra je način pripreme uzorka i homogenost mešanja matrice i polimera. Prilikom pripreme uzorka u rastvoru potrebno je prvo izabrati odgovarajući rastvarač za



Slika 2. Strukture pojedinih matrica
Figure 2. Structures of some selected matrixes

matricu, polimer i so i odgovarajući maseni odnos između matrice i polimera (obično od 10:1 do 100:1).

Najstarija i najčešće korišćena metoda pripreme uzorka za MALDI eksperiment je tzv. metoda osušene kapi (dried-droplet) [3,8,30,31]. Kod ove metode se mešaju rastvori matrice, polimera i soli u odgovarajućem odnosu, a zatim se iz ove smeše uzima 0.3 – 1 μL rastvora, koji se nanosi na određeni položaj na držaču za uzorak i suši vazduhom na sobnoj temperaturi kako bi se uklonio rastvarač. U idealnom slučaju nastaje homogena čvrsta smeša. Eventualna nehomogenost nanete smeše prouzrokuje veliko variranje rezultata (intenzitet i rezolucija pikova, tačnost izračunatih masa) kada se laser uperi u različita mesta na nanetom uzorku.

Brže uklanjanje rastvarača se može dobiti stavljanjem držača uzorka u vakuumsku komoru [32] čime se omogućava stvaranje manjih kristala matrice sa manje izraženom segregacijom komponenata smeše. Primenom ovog načina pripreme uzorka povećava se reproduktivnost rezultata, rezolucija i intenzitet signala.

Homogenije mešanje matrice i polimera, odnosno stvaranje malih kristala jednakih veličina ravnomerno raspoređenih na držaču, može se dobiti nanošenjem uzorka pomoću elektrospreja [33,34]. Kod ovog načina pripreme uzorka se rastvori nanose sprejom pod uticajem električnog polja visokog napona.

Karakterizacija nerastvornih polimera MALDI-TOF masenom spektrometrijom moguća je ukoliko se za pripremu uzorka koristi metoda bez prisustva rastvarača. Kod ove metode se smeša sprasene matrice, soli i polimera (prethodno ubačenog u tečni azot) fino usitni u odgovarajućem mlinu. Pri tome je neophodno fiksirati prah matrice, soli i polimera za držač uzorka [35]. Pomoću ove metode pripreme uzorka uspešno su ispitani polietarimidi [36,37], aromatski poliamidi [38] i policiklični aromatski ugljovodonici [39].

Razdvajanje jonizovanih molekula polimera

Kao što je već napomenuto, drugi stupanj MALDI-TOF masene spektrometrije predstavlja razdvajanje jonizovanih molekula polimera na osnovu odnosa m/z , što se postiže merenjem vremena leta jona (time-of-flight = TOF). Nakon formiranja, jonizovani molekuli polimera se ubrzavaju primenom električnog potencijala (15–35 kV). Posle ubrzavanja, joni ulaze u specijalnu vakuum cev (field-free flight tube ili drift tube) dužine 1–2 m. U zavisnosti od odnosa m/z , joni se kreću različitim brzinama kada napuste zonu ubrzavanja i uđu u vakuum cev, i to tako da joni manje mase imaju veću brzinu kretanja. Zatim se za svaki jon meri vreme leta pomoću razlike između početnog signala nastalog dejstvom lasera i krajnjeg signala prouzrokovanim dolaskom jona na detektor.

Razvijena brzina jona se često izračunava korišćenjem jednačine:

$$ze\Delta V = \frac{mv^2}{2} \quad (1)$$

gde je ΔV razlika električnog potencijala primenjena za ubrzavanje jona, čije je naelektrisanje ze , m je masa naelektrisanih molekula polimera i v je brzina. Korišćenjem vrednosti dužine vakuum cevi, vremena dejstva lasera, t_0 i ukupnog vremena leta, t , jednačina (1) se može transformisati u jednačinu (2):

$$\frac{m}{z} = C(t - t_0)^2 \quad (2)$$

gde je C konstanta. Zbog teškoća pri određivanju pravog vremena leta jona, u praksi je pokazano da se tačniji rezultati dobijaju korišćenjem empirijske jednačine (3):

$$\frac{m}{z} = at^2 + b \quad (3)$$

gde su a i b konstante. Netačnosti u merenju vremena leta jona nastaju usled kratkog kašnjenja formiranja jona nakon dejstva lasera, tako da pravo početno vreme nije identično trenutku dejstva lasera, koje predstavlja početni signal za merenje vremena leta. Konstante a i b se određuju merenjem vremena leta jona poznatih masa. Najčešće se prvo odredi kalibracioni spektar koji sadrži poznate jone kako bi se odredili a i b . Nakon toga se snima željeni spektar pod pretpostavkom da se a i b ne menjaju.

Rezolucija masenih spektara se danas poboljšava primenom metode odložene ekstrakcije [40,41]. Nasuprot običnom MALDI-TOF merenju gde su joni direktno desorbovani u ubrzavajuće polje, kod odložene ekstrakcije ubrzavajuće polje deluje nakon određenog vremena (50–600 ns) od trenutka dejstva lasera. Na taj način vreme neophodno za formiranje jona ne doprinosi širenju pika u masenom spektru.

Primenom metode odložene ekstrakcije takođe je moguće optimizovati razliku potencijala između odgovarajućih elektroda kako bi se pronašla vrednost pri kojoj joni koji imaju isti odnos m/z a različito vreme nastajanja jona stižu na detektor istovremeno.

Detekcija jona kod MALDI-TOF procesa

Detekcija ubrzanih jona (treći stupanj MALDI-TOF masene spektrometrije) se može izvršiti korišćenjem dve različite metode: linearne i refleksione. Na kraju cevi za letenje jona je kod većine MALDI-TOF instrumenata smešten uređaj za povećanje rezolucije, tzv. reflektor. Ovaj uređaj se sastoji od serije elektroda, koje imaju nešto veći potencijal i isti polaritet kao napon ubrzavanja. Reflektor je povezan sa dodatnim detektorom, postavljenim nasuprot običnog detektora. Kada su elektrode isključene spektar se snima linearnom metodom, a kada su uključene – refleksionom metodom. Joni koji imaju određeni odnos m/z i brzinu leta prodiru u polje reflektora u različitom opsegu. Brži joni prodiru dublje u polje, pa je samim tim za njih potrebno duže vreme za refleksiju [42]. Istovremeno, duže vreme leta povećava rezoluciju. Sa druge strane, kod linearne metode detekcije fragmenti molekula koji se raspadaju nakon zone ubrzavanja i dalje se kreću približno istom brzinom kao i početni (neraspadnuti) joni i dovode do nastajanja signala definisanih istim vremenom leta, ali istovremeno prouzrokuju i blago širenje pika [43]. Ovo svojstvo linearne metode je naročito važno za detekciju molekula velikih molarnih masa.

Obe metode detekcije imaju svojih prednosti i nedostataka, pa ih treba koristiti u zavisnosti od željenih informacija. Linearna metoda detekcije pokazuje veću osetljivost na veće molekule, dok je kod refleksione metode rezolucija veća. Zato se linearna metoda koristi prilikom određivanja raspodele molarnih masa polimera, naročito kada je $M > 10\ 000$ g/mol [44,45]. Sa druge strane, refleksiona metoda se uglavnom koristi prilikom određivanja tačne molarne mase individualnih lanaca polimera, što je neophodno prilikom identifikacije krajnjih grupa i detekcije sporednih proizvoda.

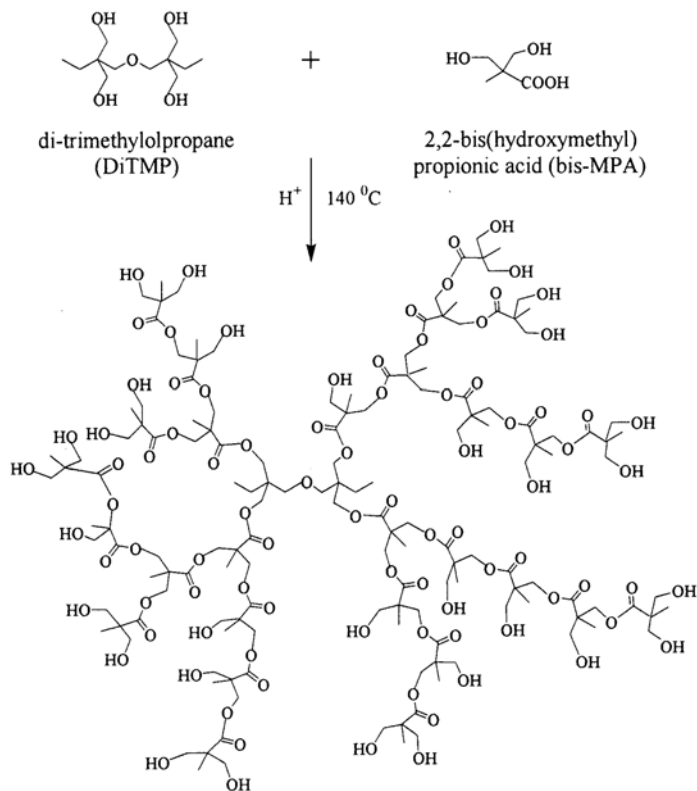
Kvalitet MALDI-TOF masenih spektara polimera, odnosno merljiva oblast masa i oblik krive raspodele, značajno zavisi od nekoliko faktora: način pripreme uzorka, vrsta matrice i soli, vrsta detektora, intenzitet lasera i napon ubrzavanja. Većina ovih faktora je diskutovana u prethodnom tekstu. Pored toga, u literaturi je moguće naći veliki broj radova u kojima su prikazani rezultati koji mogu biti od velike pomoći pri izboru odgovarajućih parametara i metoda za izvođenje željenog MALDI-TOF eksperimenta. Tako na primer, Lloyd i saradnici [46] proučili su uticaj različitih katjona dodatih rastvoru matrice na spektar različitih linearnih polimera. Uticaj različitih matrica, različite jačine lasera i različitih krajnjih grupa na for-

miranje jona su ispitali Belu i saradnici [47]. Za detekciju jona molekula većih molarnih masa, potrebno je primeniti veću snagu lasera [48], ali je pritom rezolucija smanjena. Međutim, velika snaga lasera može da dovede do neželjene fragmentacije polimera [49,50], a samim tim i do pomeranja maksimuma raspodele ka nižim vrednostima molarnih masa [51].

EKSPERIMENTALNI DEO

Alifatski hiperrazgranati poliestri (AHBP) čiji su MALDI-TOF maseni spektri prikazani u ovom radu su sintetisani pomoću kiselo katalizovane poliesterifikacije polazeći od 2,2-bis(hidroksimetil)propionske kiseline (bis-MPA), kao AB_2 monomera i di-trimetilolpropana (DiTMP), kao tetrafunkcionalnog jezgra (slika 3) i korišćenjem "pseudo-one-step" procedure [52]. Pri tome su sintetisani uzorci druge (AHBP-2I), treće (AHBP-3I), četvrte (AHBP-4I), pete (AHBP-5I), šeste (AHBP-6I), osme (AHBP-8I) i desete (AHBP-10I) pseudo generacije.

MALDI-TOF masena spektrometrija uzoraka AHBP je izvedena na instrumentu BIFLEX III (Bruker Saxonian Analytik GmbH, Leipzig, Germany). Pri tome je korišćena refleksiona metoda detekcije, koja omogućava određivanje tačne vrednosti molarnih masa pojedinačnih molekula, što je neophodno poznavati za identifikaciju sporednih produkata. Srednja snaga N_2 lasera (337.1 nm) pri 20 Hz bila je 3–4



Slika 3. Šematski prikaz sinteze AHBP

Figure 3. Schematic representation of the synthesis of AHBP

mW (150–200 $\mu\text{J/puls}$) sa vremenom kašnjenja od 200 ns. Uzorci su pripremani metodom osušene kapi, korišćenjem DHB matrice i tetrahidrofurana kao rastvarača na Scout MTP MALDI držaču za uzorak (Bruker). Radi lakše katjonizacije dodavane su soli natrijuma ili kalijuma. Pripremljeni uzorak je osušen vazduhom pre ubacivanja u vakuumsku komoru instrumenta.

REZULTATI I DISKUSIJA

Tumačenje MALDI–TOF masenih spektara alifatskih hiperrazgranatih poliestara

Pomoću MALDI–TOF masene spektrometrije mogu se odrediti molarne mase pojedinačnih lanaca polimera, raspodela molarnih masa, masa jedinice koja se ponavlja i mase krajnjih grupa. Svaki pik u masenom spektru polimera odnosi se na molekule različitog stepena polimerizacije, dok rastojanje između pikova predstavlja masu jedinice koja se ponavlja. Na slici 4 su ilustracije radi prikazani maseni spektri uzoraka AHBP–2I i AHBP–4I, koji se sastoje od serije pikova međusobno podjednako razdvojenih rastojanjem od 116 masenih jedinica, što odgovara molarnoj masi monomerne jedinice. Pored toga, korišćenjem vrednosti masa svakog pojedinačnog pika u raspodeli i poznavanjem procesa katjonizacije mogu se izračunati mase krajnjih grupa. Za ovaj proračun potrebno je odabrati jedan pik, a zatim od mase koja odgovara tom signalu oduzeti masu katjona i masu jedinice ko-

ja se ponavlja dok se ne dobije masa koja predstavlja sumu masa krajnjih grupa.

Srednje vrednosti molarnih masa M_n i M_w i vrednost indeksa polidisperznosti Q se izračunavaju korišćenjem sledećih jednačina:

$$M_n = \frac{\sum M_i N_i}{\sum N_i} \quad (4)$$

$$M_w = \frac{\sum M_i^2 N_i}{\sum M_i N_i} \quad (5)$$

$$Q = \frac{M_w}{M_n} \quad (6)$$

gde je N_i – intenzitet i -tog pika i M_i je masa i -tog pika. Vrednosti N_i se mogu izračunati numeričkim integriranjem pikova. Korišćenjem jednačina (4)–(6) izračunate su srednje vrednosti molarnih masa i vrednosti indeksa polidisperznosti uzoraka AHBP. Ove vrednosti su zajedno sa vrednostima Q određenih primenom GPC (Q_{GPC}) [53] prikazane u tabeli 1.

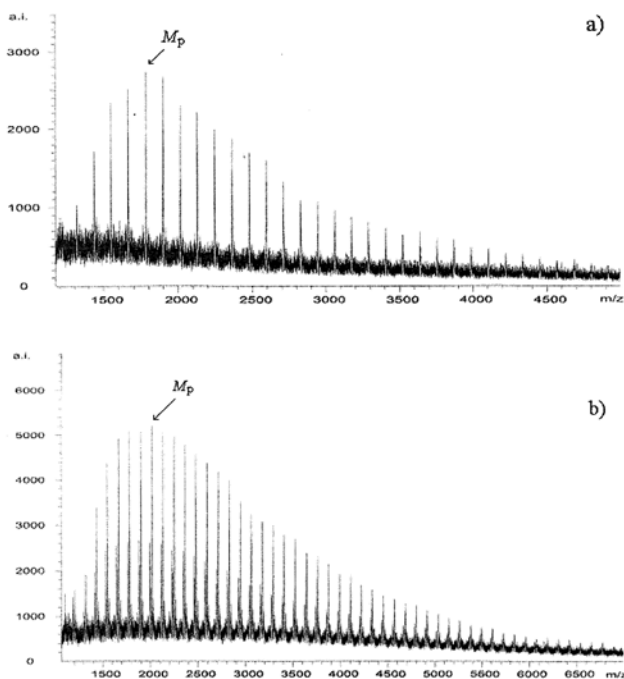
Tabela 1. Vrednosti M_w , M_n i Q_{MALDI} izračunatih iz MALDI–TOF masenih spektara i Q_{GPC} određenog korišćenjem GPC metode ispitanih AHBP

Table 1. Values of the M_w , M_n and Q_{MALDI} determined from the MALDI–TOF mass spectra and Q_{GPC} determined using GPC method of the investigated AHBP

Sample	M_w , g/mol	M_n , g/mol	Q_{MALDI}	Q_{GPC}^a
AHBP-2I	2345	2213	1,06	1,39
AHBP-3I	2976	2617	1,14	1,64
AHBP-4I	3352	2909	1,15	1,91
AHBP-5I	3276	2765	1,18	2,22
AHBP-6I	3310	2824	1,17	2,33
AHBP-8I	3738	3155	1,18	2,22
AHBP-10I	2989	2565	1,16	1,83

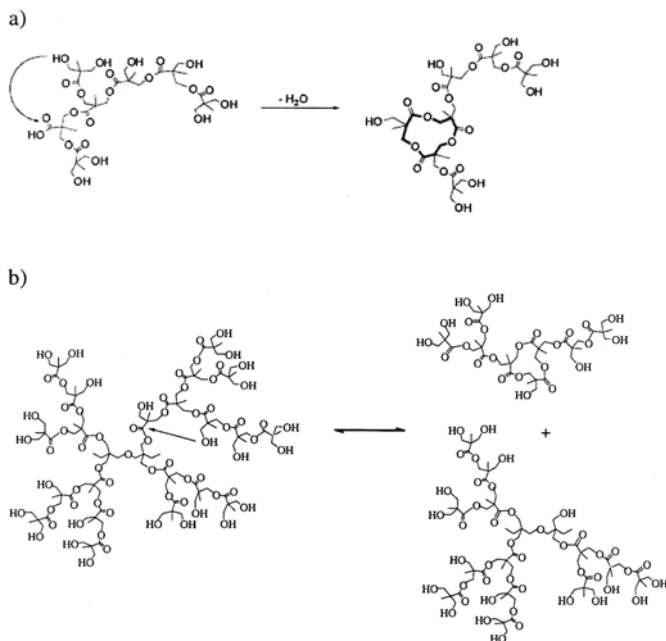
^aRezultati iz reference [53]

Rezultati prikazani u tabeli 1 pokazuju da su izračunate vrednosti Q_{MALDI} dosta manje od Q_{GPC} i da rastu samo do pete pseudo generacije. Istovremeno su izračunate srednje vrednosti molarnih masa (tabela 1) značajno manje od vrednosti dobijenih primenom drugih metoda karakterizacije (NMR, osometrija napona pare) [52,53], što je naročito izraženo za uzorke AHBP viših pseudo generacija. Pored toga, poređenjem MALDI–TOF masenih spektara za uzorke različitih pseudo generacija može se uočiti da se položaj najvećeg signala (najverovatniji pik (M_p)), pomera ka oblasti većih molarnih masa (slika 4). Međutim, pomeranje ovog pika je slabo izraženo i uočeno je samo za uzorke od druge do četvrtre pseudo generacije. Razlog za ovakvo ponašanje je relativno široka raspodela molarnih masa uzoraka AHBP (Q_{GPC}), tako da u masenim spektrima uzoraka viših pseudo generacija signali koji se odnose na molekule



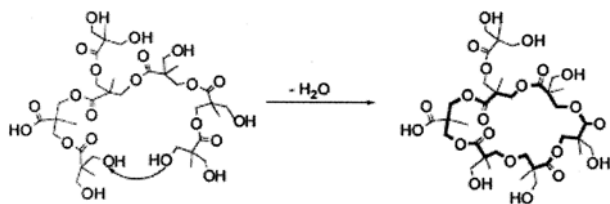
Slika 4. MALDI–TOF maseni spektar uzoraka (a) AHBP–2I i (b) AHBP–4I

Figure 4. MALDI–TOF mass spectrum of the samples (a) AHBP–2 and (b) AHBP–4I



Slika 5. Šematski prikaz (a) intramolekulske esterifikacije i (b) hidroksi-estarske razmene

Figure 5. Schematic representation of the (a) intramolecular esterification and (b) hydroxy-ester interchange



Slika 6. Šematski prikaz intramolekulske eterifikacije
Figure 6. Schematic representation of the intramolecular etherification

većih molarnih masa imaju vrlo slab intenzitet, čime je otežana njihova analiza. Veliki broj autora je pokazao da se MALDI-TOF MS može smatrati absolutnom metodom za ispitivanje polimera uske raspodele molarnih masa ($Q < 1.2$) [47,50,54]. Sa druge strane, kod uzoraka sa $Q > 1.2$ dobijaju se spektri samo sa signalima opadajućeg intenziteta, manje vrednosti indeksa polidisperznosti i pogrešne srednje vrednosti molarnih masa. Razlog za ovakvo ponašanje je pojava diskriminacije mase, odnosno pojava podcenjivanja frakcija velikih molarnih masa [45]. Ova pojava je ispitana upoređivanjem rezultata dobijenih za različite polimere korišćenjem MALDI-TOF MS i GPC tehnike [45,51]. Pokazano je da se u toku MALDI procesa stvaraju joni iz čitave raspodele molarnih masa, međutim ako joni male molarne mase prvi stignu do detektora onda se deo raspodele koji se odnosi na velike molarne mase ne može detektovati, najverovatnije usled zasićenja detektora komponentama niske molarne mase [45]. Zasićenje detektora dovodi do neravnomernog pojačavanja si-

gnala, tako da se intenzitet pikova koji se odnose na jone velikih molarnih masa značajno smanjuje. Pojava diskriminacije mase se može u određenoj meri izbeći biranjem odgovarajuće matrice, soli za katjonizaciju i metode pripreme uzorka. Jedna od mogućnosti izbegavanja diskriminacije mase je primena elektrostatičkog uređaja – deflektora, koji odbija jedinjenja male molarne mase i nedozvoljava im da stignu do detektora. Druga mogućnost je da se detektor uključi tek kada joni veće molarne mase stignu do njega. Međutim, obe metode zanemaruju prisustvo jona male molarne mase, što takođe dovodi do pogrešnih rezultata.

Prednost MALDI-TOF masene spektrometrije u poređenju sa drugim metodama karakterizacije polimera leži u činjenici da se ovom metodom meri odnos mase i naelektrisanja jona, čime je olakšano ispitivanje pojedinačnih molekula. Iz tog razloga su rezultati dobijeni karakterizacijom uzoraka AHBP pomoću MALDI-TOF MS iskorišćeni za kvalitativno određivanje opsega ciklizacije (sporedne reakcije) na svakom stepenu polimerizacije. Sporedne reakcije koje se mogu odigrati u toku sinteze ovih hiperrazgranatih polimera su [52]:

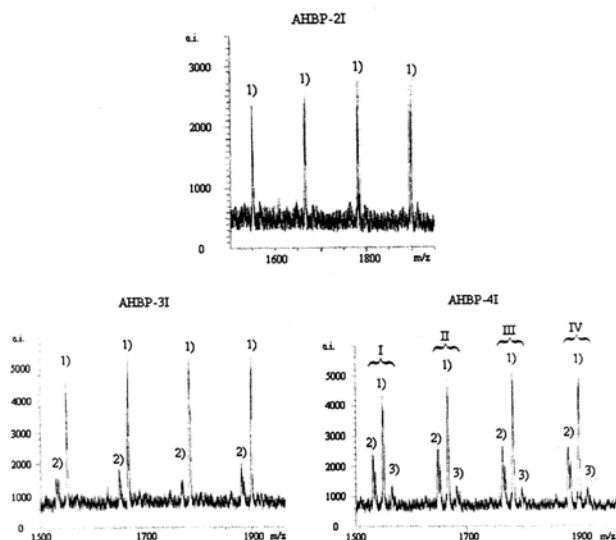
1) Samo-kondezacija monomera bis-MPA, pri čemu nastaje hiperrazgranati makromolekul poli(bis-MPA), sa dvofunkcionalnim B₂ jezgrom (bis-MPA). Ova sporedna reakcija se odigrava usled zaklonjenosti -COOH grupa ostatkom molekula i/ili zato što su -COOH grupe zarobljene vodoničnim vezama i na taj način deaktivirane za dalju reakciju.

2) Intramolekulska esterifikacija (ciklizacija) koja nastaje usled reakcije između fokalne -COOH grupe iz poli(bis-MPA) i -OH grupe iz istog molekula (slika 5a) ili usled reakcije hidroksi-estarske razmene (slika 5b).

3) Intramolekulaska eterifikacija između dve -OH grupe (slika 6).

Na slici 7 prikazani su maseni spektri uzoraka AHBP nižih pseudo generacija. Pri tome je izabrana ista oblast masa, radi lakšeg poređenja dobijenih rezultata. Kao što je već napomenuto, glavna serija podjednako razdvojenih signala, serija 1), odnosi se na molekule čija se masa razlikuje međusobno za 116 masenih jedinica, koja predstavlja tačno molarnu masu jedinice koja se ponavlja (bis-MPA). U masenim spektrima uzoraka AHBP-3I i AHBP-4I može se uočiti serija signala nižeg intenziteta, serija 2). Položaj druge serije signala je 18 masenih jedinica pre glavne serije pikova. Konačno, u masenom spektru uzorka AHBP-4I detektovana je dodatna serija signala nižeg intenziteta, serija 3), 18 masenih jedinica posle glavne serije.

Molarna masa pojedinačnog molekula se može izračunati uzimajući u obzir proces polimerizacije i koristeći jednačine koje su razvili Frey i saradnici [55]. Ove jednačine se takođe mogu koristiti i za AHBP prikazane u ovom radu, pošto imaju sličnu strukturu kao poliestri koje je sintetisao Frey. Za



Slika 7. MALDI-TOF maseni spektri uzoraka AHBP-2I, AHBP-3I i AHBP-4I

Figure 7. MALDI-TOF mass spectra of AHBP-2I, AHBP-3I and AHBP-4I

AHBP prikazane u ovom radu ove jednačine se mogu napisati na sledeći način:

Polimerizacija sa DiTMP jezgrom i bez ciklizacije:

$$M = M_{\text{DiTMP}} + P_n (M_{\text{bis-MPA}} - M_{\text{voda}}) \quad (7)$$

Ciklizacija bez molekula jezgra DiTMP:

$$M = P_n (M_{\text{bis-MPA}} - M_{\text{voda}}) \quad (8)$$

Polimerizacija bez jezgra DiTMP i bez ciklizacije:

$$M = P_n M_{\text{bis-MPA}} - (P_n - 1) M_{\text{voda}} \quad (9)$$

M se odnosi na seriju pikova u masenom spektru, P_n je stepen polimerizacije srednji po broju zastupljenosti, $M_{\text{bis-MPA}}$, M_{DiTMP} i M_{voda} su molarne mase monomera, jezgra i vode, respektivno. Razlika $M_{\text{bis-MPA}} - M_{\text{voda}}$ predstavlja molarnu masu jedinice koja se ponavlja.

U tabeli 2 prikazane su vrednosti m/z očitane iz masenog spektra uzorka AHBP-4I. Vrednosti m/z koje se odnose na glavnu seriju signala 1) su iste za sva tri uzorka prikazana na slici 7, dok pikovi serije 2) imaju iste vrednosti za uzorke AHBP-3I i AHBP-4I.

Korišćenjem rezultata dobijenih MALDI-TOF masenom spektrometrijom i jednačina (7)–(9), kao i vrednosti izračunatih NMR spektroskopijom [52] moguće je identifikovati svaki signal iz masenih spektara uzoraka AHBP. Pri tome, prisustvo jona natrijuma ili kalijuma takođe treba uzeti u obzir prilikom proračuna. Glavna serija signala 1) u masenim spektrima uzoraka AHBP predstavlja molekule formirane u željenoj reakciji kondenzacije, tj. aciklične hiperrazgranate molekule koji sadrže tetrafunkcionalno jezgro i čija se masa može izračunati korišćenjem jednačine (7). Serija signala 2) pripisana je molekuli-

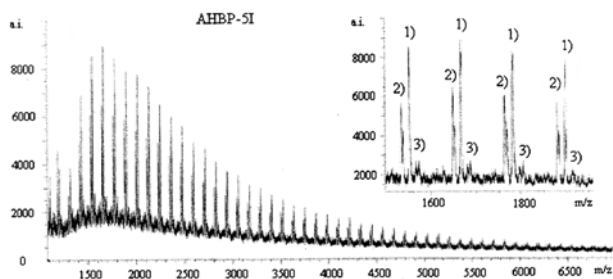
Tabela 2. Vrednosti m/z očitanih iz MALDI-TOF masenog spektra uzorka AHBP-4I

Table 2. MALDI-TOF m/z data of the sample AHBP-4I

Grupa pikova	m/z vrednosti pikova		
	Pik 1)	Pik 2)	Pik 3)
I	1550	1532	1568
II	1666	1648	1684
III	1782	1764	1800
IV	1898	1880	1916

ma kod kojih je došlo do gubitka molekula vode prilikom formiranja ciklika, najverovatnije usled intramolekulske esterifikacije. Molekuli prikazani drugom serijom signala predstavljaju makrociklične bis-MPA makromolekule bez DiTMP jezgra, čija se molarna masa može izračunati korišćenjem jednačine (8), tj. kao suma jedinica koje se ponavljaju. Sa druge strane, signali serije 2) takođe se mogu pripisati i ciklična formiranim reakcijom intramolekulske esterifikacije, čija se molarna masa može jednostavno izračunati razlikom mase signala iz serije 1) i mase vode. Međutim, korišćenjem MALDI-TOF MS nije moguće napraviti razliku između ciklika formiranih intramolekulskom esterifikacijom i esterifikacijom. Takođe se može isključiti da se gubitak molekula vode odigrao u toku procesa jonizacije, pošto je prisustvo ciklika potvrđeno pomoću NMR i eksperimenata osmometrije napona pare [52]. Pošto u masenom spektru uzorka AHBP-2I druga serija signala nije detektovana, može se zaključiti da je opseg ciklizacije kod ovog uzorka dosta manji nego kod uzoraka viših pseudo generacija. Upoređivanjem masenih spektara uzoraka različitih generacije uočava se porast intenziteta druge serije signala sa brojem pseudo generacije, što ukazuje da opseg ciklizacije ima isti trend (slika 7). U masenom spektru uzorka AHBP-4I uočena je još jedna serija signala, serija 3). Ova serija pikova je pripisana acikličnim molekulima koji sadrže nepropreagovale -COOH grupe, tj. hiperrazgranate molekule sa B_2 , a bez DiTMP jezgra. Njihova molarna masa se može izračunati korišćenjem jednačine (9).

Analiza masenih spektara uzoraka AHBP viših pseudo generacija se malo razlikuje od načina korišćenog kod uzoraka nižih pseudo generacija. NMR karakterizacija ovih uzoraka je pokazala da struktura AHBP od pete do desete pseudo generacije sadrži veći udeo novog jezgra B_2 nego jezgra B_4 [52]. Pored toga, i jednačina (7) i jednačina (9) se mogu koristiti za proračun molarnih masa pojedinačnih molekula iz prve i treće serije signala MALDI-TOF masenih spektara. Zato je zaključeno da za uzorke AHBP viših pseudo generacija treća serija signala predstavlja aciklične hiperrazgranate molekule koji sadrže DiTMP jezgro, dok se prva serija pikova može pripisati acikličnim molekulima sa nepropreagovanim -COOH grupama (slika 8). Druga serija signala se odnosi na makrociklične bis-MPA makromolekule, bez



Slika 8. MALDI-TOF maseni spektar uzorka AHBP-5I
Figure 8. MALDI-TOF mass spectra of the sample AHBP-5I

DiTMP jezgra. Pikovi koji se odnose na ciklične strukture nastale gubitkom molekula vode iz molekula predstavljenih trećom serijom signala se poklapaju sa prvom serijom pikova.

Upoređivanjem masenih spektara uzoraka AHBP uočeno je da se relativna količina ciklika povećava sa brojem pseudo generacije, odnosno od druge do pete pseudo generacije. Kod uzoraka AHBP-6I, AHBP-8I i AHBP-10I intenziteti signala koji se odnose na ciklike se ne menjaju značajno [52]. Takođe je uočeno da relativni udeo signala koji je pripisan ciklicima raste sa povećanjem stepena polimerizacije.

ZAKLJUČAK

Rezultati prikazani u ovom radu pokazuju da se MALDI-TOF masena spektrometrija može uspešno koristiti za kvalitativno određivanje opsega ciklizacije (sporedne reakcije) na svakom stepenu polimerizacije alifatskih hiperrazgranatih poliestara. Razlog za to leži u činjenici da se ovom metodom meri odnos mase i naelektrisanja jona, čime je olakšano ispitivanje pojedinačnih molekula.

Korišćenjem odgovarajućih jednačina i pikova iz dobijenih masenih spektara uzoraka AHBP identifikovani su sporedni produkti nastali u toku sinteze ovih polimera. Pri tome je uočeno da kod uzoraka od druge do četvrte pseudo generacije serija signala 1) predstavlja aciklične hiperrazgranate molekule formirane u željenoj reakciji kondenzacije. Serija signala 2) je pripisana molekulima nastalim usled intramolekulske esterifikacije i/ili intramolekulske eterifikacije, dok signali iz serije 3) predstavljaju aciklične hiperrazgranate molekule poli(bis-MPA).

Sa druge strane, za uzorke od pete do desete pseudo generacije treća serija signala predstavlja aciklične hiperrazgranate molekule koji sadrže DiTMP jezgro, dok se prva serija pikova može pripisati acikličnim molekulima sa neporeagovalim -COOH grupama. Serija signala 2) je pripisana makrocikličnim bis-MPA makromolekulima. Takođe je uočeno da se od druge do pete pseudo generacije relativna količina ciklika povećava sa brojem pseudo generacije i da relativni udeo signala koji je pripisan ciklicima raste sa povećanjem stepena polimerizacije.

LITERATURA

- [1] K. Tanaka, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, presented at the 2nd Japan-China Joint Symposium on Mass spectrometry, Osaka, Japan, Sept. 15-18, (1987).
- [2] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **2** (20) (1988) 151-153.
- [3] M. Karas and F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **60** (1988) 2299-2301.
- [4] F. Hillenkamp, M. Karas, R.C. Beavis, B.T. Chait, *Anal. Chem.* **63** (1991) 1193A-1203A.
- [5] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **78** (1987) 53-68.
- [6] P.O. Danis, D.E. Karr, F. Mayer, A. Holle, C.H. Watson, *Org. Mass Spectrom.* **27** (1992) 843-846.
- [7] M. Karas, U. Bahr, A. Deppe, B. Stahl, F. Hillenkamp, *Macromol. Chem., Macromol. Symp.* **61** (1992) 397-404.
- [8] U. Bahr, A. Deppe, M. Karas, F. Hillenkamp, U. Giesmann, *Anal. Chem.* **64** (1992) 2866-2869.
- [9] P.O. Danis, D.E. Karr, *Org. Mass Spectrom.* **28** (1993) 923-925.
- [10] S.R. Tatro, G.R. Baker, R. Fleming, J.P. Harmon, *Polymer* **43** (2002) 2329-2335.
- [11] A.J. Hoteling, W.J. Erb, R. Tyson, K.G. Owens, *Anal. Chem.* **76** (2004) 5157-5164.
- [12] M. Malkoch, A. Carlmark, A. Woldegiorgis, A. Hult, E. Malmström, *Macromolecules* **37** (2004) 322-329.
- [13] D. Cho, S. Park, T. Chang, K. Ute, I. Fukuda, T. Kitayama, *Anal. Chem.* **74** (2002) 1928-1931.
- [14] T. H. Mize, W.J. Simonsick, I.J. Amster, *Eur. J. Mass Spectrom.* **9** (2003) 473-486.
- [15] H.R. Kricheldorf, M. Rabenstein, M. Maskos, M. Schmidt, *Macromolecules* **34** (2001) 713-722.
- [16] D. Parker, W.J. Feast, *Macromolecules* **34** (2001) 5792-5798.
- [17] P. Terrier, W. Buchmann, G. Cheguillaume, B. Desmazière, J. Tortajada, *Anal. Chem.* **77** (2005) 3292-3300.
- [18] R. Murgasova, D.M. Hercules, *J. Mass Spectrom.* **36** (2001) 1098-1107.
- [19] D.M. Johnson, S.E. Reybuck, R.G. Lawton, P. G. Rasmussen, *Macromolecules* **38** (2005) 3615-3621.
- [20] M.S. Montaudo, C. Puglisi, F. Samperi, G. Montaudo, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **12** (1998) 519-528.
- [21] P.R. Dvornic, C. Hartmann-Thompson, S.E. Keinat, E.J. Hill, *Macromolecules* **37** (2004) 7818-7831.
- [22] C. Puglisi, F. Samperi, S. Carroccio, G. Montaudo, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **13** (1999) 2260-2267.
- [23] R.X.E. Willemse, B.B.P. Staal, E.H.D. Donkers, A.M. van Herk, *Macromolecules* **37** (2004) 5717-5723.
- [24] J.B. Baek, F.W. Harris, *Macromolecules* **38** (2005) 1131-1140.
- [25] K. Tanaka (Nobel-Vortrag), *Angew. Chem.* **115** (2003) 3989-3998.
- [26] S. Jovanović, K. Jeremić, Karakterisanje polimera, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2007, s.167-172.
- [27] J. Zhang, R. Zenobi, *J. Mass Spectrom.* **39** (2004) 808-816.
- [28] B.J. Bauer, C.M. Guttman, D.W. Liu, W.R. Blair, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16** (2002) 1192-1198.
- [29] M.W.F. Nielen, *Mass Spectrom. Rev.* **18** (1999) 309-344.
- [30] D.C. Schriemer, L. Li, *Anal. Chem.* **68** (1996) 2721-2725.
- [31] G. Montaudo, M.S. Montaudo, F. Samperi, *Mass spectrometry of polymers*. In: G. Montaudo and R. P. Lattimer, eds., Boca Raton: CRC Press; (2002) [chapters 2 and 10].
- [32] A.J. Nicola, A.I. Gusev, A. Proctor, E.K. Jackson, D.M. Hercules, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **9** (1995) 1164-1171.
- [33] J. Axelsson, A.-M. Hoberg, C. Waterson, P. Myatt, G.L. Shield, J. Varney, D.M. Haddleton, P.J. Derrick, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11** (1997) 209-213.

- [34] S.J. Wetzel, C.M. Guttman, K.M. Flynn, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18** (2004) 1139-1146.
- [35] S. Trimpin, A. Rouhanipour, R. Az, J. Räder, K. Müllen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15** (2001) 1364-1373.
- [36] A.P. Gies, W.K. Nonidez, M. Anthamatten, R.C. Cook, J.W. Mays, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16** (2002) 1903-1910.
- [37] K. Yoshimura, L. Przybilla, S. Ito, J.D. Brand, M. Wehmeir, H.J. Räder, *Macromol. Chem. Phys.* **202** (2001) 215-222.
- [38] A.P. Gies, W.K. Nonidez, *Anal. Chem.* **76** (2004) 1991-1997.
- [39] L. Przybilla, J.-D. Brand, K. Yoshimura, J. Räder, K. Müllen, *Anal. Chem.* **72** (2000) 4591-4597.
- [40] W.S. Wiley, I.H. McLaren, *Rev. Sci. Instrum.* **26** (1955) 1150-1157.
- [41] R.S. Brown, J.J. Lennon, *Anal. Chem.* **67** (1995) 1998-2003.
- [42] B.A. Mamyrin, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **131** (1994) 1-19.
- [43] C.J. McNeal, *Mass spectrometry in the analysis of large molecules*, Wiley, New York (1986) p. 13.
- [44] P.O. Danis, A. Holle, D.E. Karr, F.J. Mayer-Posner, C. Koester, *Detection of polymer ions by MALDI-TOF MS*, 41st ASMS (1993).
- [45] C.N. McEwen, C. Jackson, B.S. Larsen, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **160** (1997) 387-394.
- [46] P.M. Lloyd, E. Scrivener, D.R. Maloney, D.M. Haddleton, P.J. Derrick, *Polym. Prep.* **37** (1) (1996) 847-848.
- [47] A.M. Belu, J.M. DeSimone, R.W. Linton, G.W. Lange, R.M. Friedman, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **7** (1996) 11-24.
- [48] P.M. Lloyd, K.G. Suddaby, J.E. Varney, E. Scrivener, P.J. Derrick, D.M. Haddleton, *Eur. Mass Spectrom.* **1** (1995) 293-300.
- [49] R.S. Lehrle, D.S. Sarson, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9** (1995) 91-92.
- [50] R.S. Lehrle, D.S. Sarson, *Polymer Degradation and Stability* **51** (1996) 197-204.
- [51] K. Martin, J. Spickermann, H.J. Räder, K. Müllen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10** (1996) 1471-1474.
- [52] J. Vuković, *Synthesis and characterization of aliphatic hyperbranched polyesters*, Doktorska disertacija, Univerzitet u Osnabrück-u, Nemačka (2006).
- [53] J. Vuković, M.D. Lechner, S. Jovanović, *J. Serb. Chem. Soc.* **72** (2007) 1493-1506.
- [54] X. Tang, P.A. Dreifuss, A. Vertes, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9** (1995) 1141-1147.
- [55] A. Burgath, A. Sunder, H. Frey, *Macromol. Chem. Phys.* **201** (2000) 782-791.

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF ALIPHATIC HYPERBRANCHED POLYESTERS BY MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY

(Scientific paper)

Jasna Vuković¹, Slobodan Jovanović², Manfred D. Lechner¹

¹Institute for Chemistry, University of Osnabrueck, Osnabrueck, Germany

²Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

In this work, MALDI-TOF mass spectrometry was used for the characterization of aliphatic hyperbranched polyesters (AHBP), synthesized from 2,2-bis(hydroxymethyl)propionic acid (bis-MPA) and di-trimethylolpropane. From the obtained results it was concluded that it was not possible to take complete advantages of MALDI-TOF MS in this particular case, since the AHBP used in this work were polydisperse. The intensity of the signals from the high mass tail of these samples (pseudo generation higher than four) was underestimated and insufficient to distinguish it from the baseline and to use it for the analysis of the spectra. As a consequence of that, lower values of the M_n were obtained. At the same time, M_w were also underestimated, which led to very low values of the polydispersity index. On the other hand, it was possible to obtain molar masses of individual molecules from the MALDI-TOF mass spectra of AHBP and to qualitatively determine the extent of cyclization (side reactions) at each degree of polymerization. Using the adequate set of equations and results obtained from MALDI-TOF mass spectra of AHBP, every signal from the spectra was identified. The obtained results show that formation of poly(bis-MPA), intramolecular esterification and intramolecular etherification occurred as side reactions during the synthesis of these polyesters. The relative amount of the cycles increases with the number of pseudo generation (from the second up to the fifth pseudo generation). It was also observed that the relative proportion of the signals which represent cyclic structures increases with the increasing degree of polymerization.

In this work the basic principles of MALDI-TOF MS are also presented, as well as, a review of adequate published articles.

Key words: MALDI-TOF MS • Aliphatic hyperbranched polyesters •

Ključne reči: MALDI-TOF MS • Alifatski hiperrazgranati poliestri •