

GRAŻYNA ADAMUS, MAREK KOWALCZUK^{*)}

Centrum Chemii Polimerów PAN
ul. M. Curie-Skłodowskiej 34, 41-819 Zabrze
e-mail: cchpmk@zeus.polsl.gliwice.pl

Wielostopniowa spektrometria mas w badaniach struktury makrocząsteczek poliestrów alifatycznych^{**)}

MULTISTAGE MASS SPECTROMETRY STUDIES ON THE CHEMICAL STRUCTURE OF ALIPHATIC POLYESTER MACROMOLECULES

Summary — Multistage mass spectrometry used in combination with electrospray ionization method (ESI-MS) was used to investigate the chemical structure of synthetic models of aliphatic polyesters, *viz.*, poly[(R, S)-*beta*-butyrolactone] and poly(*alpha*-methyl-*beta*-pentyl-*beta*-propiolactone), prepared by anionic polymerization of suitable lactones (Scheme A) and natural aliphatic copolymers (PHA). The study comprised: (i) analysis of end groups and verification of their chemical homogeneity (Figs. 1, 2); (ii) determination of *M* and *MWD* (Fig. 3); (iii) determination of sequence distribution in, and chemical structure of, selected aliphatic copolymers (Figs. 4—6). The ESI-MS technique affords the information essential for establishing the mechanisms of polymerization and the yield of chain termination reactions. For PHA, this technique enabled the distribution of monomer sequence to be established over a broader range of *M* as compared with that reported for PHA studied by „soft” ionization MS techniques other than ESI, as well as by fragmentation analysis of chemical structure of individual copolyester molecular ions. It enabled — for the first time — the statistical distribution of the mers incorporated into the chains of selected PHA to be verified.

Key words: ESI-MS technique, aliphatic polyesters, analysis of end groups, molecular weight and distribution of molecular weights, determination of copolymer sequence in copolymers.

Spektrometria mas nabiera ostatnio szczególnego znaczenia wśród technik analitycznych stosowanych obecnie do charakterystyki polimerów. Technika ta dostarcza cennych informacji o strukturze molekularnej makrocząsteczek i stanowi idealne uzupełnienie klasycznych metod spektroskopowych, takich jak magnetyczny rezonans jądrowy (NMR) oraz spektrometria furierowska w podczerwieni (FT-IR).

Notowany ostatnio duży postęp instrumentalny w zakresie technik spektrometrii mas (MS), zwłaszcza zaś odkrycie nowych metod „miękkiej” jonizacji, takich jak bombardowanie szybkimi atomami (ang. *Fast Atom Bombardment*, FAB), jonizacja promieniem laserowym z matrycy (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*, *Time of Flow*, MALDI TOF) oraz elektrorozpylanie (ang. *Electrospray Ionization*, ESI), wywarły doniosły wpływ

na zmianę długiej i skomplikowanej procedury analitycznej badania struktury polimerów [1]. Zastosowanie „miękkich” metod jonizacji umożliwiających bezpośrednie tworzenie jonów molekularnych makrocząsteczek badanych polimerów bez lub tylko z niewielkim udziałem procesu fragmentacji, pozwala na określenie mas indywidualnych makrocząsteczek wchodzących w skład badanego polimeru i ich rozdział ze względu na stopień polimeryzacji [2]. Zaletą ta stała się podstawą wykorzystania spektrometrii mas do badania struktury, w tym budowy chemicznej grup końcowych polimerów. Znajomość tej ostatniej odgrywa z kolei niezwykle istotną rolę w określaniu mechanizmów procesów polimeryzacji.

Sukces związany z zastosowaniem technik FAB-MS, MALDI TOF-MS, zwłaszcza zaś ESI-MS w ustaleniu sekwencji aminokwasów wyodrębnionych z materiału biologicznego białek oraz kolejności zasad nukleinowych w DNA jest ogólnie znany, natomiast obecnie coraz częściej adaptuje się te techniki do badania struktury polimerów syntetycznych. Zakres zadań realizowa-

^{*)} Autor, do którego należy kierować ewentualną korespondencję.

^{**)} Artykuł został opracowany na podstawie referatu wygłoszonego na Zjeździe Naukowym PTChem i SITPChem w Łodzi, 10—15 września 2000 r.

nych nowoczesnymi technikami spektrometrii mas jest w tym przypadku o wiele szerszy i obejmuje [3]:

— weryfikację chemicznej homogeniczności polimerów oraz określenie struktury chemicznej grup końcowych,

— bezpośrednie określenie ciężaru cząsteczkowego oraz zależnego od przebiegu procesu syntezy rozkładu ciężaru cząsteczkowego,

— bezpośrednie określenie składu chemicznego i dystrybucji sekwencji merów w odniesieniu do indywidualnych makrocząsteczek kopolimerów.

Pomimo skomplikowanych i niejednorodnych struktur polimerów syntetycznych, nowoczesne techniki spektrometrii mas w istotny sposób przyczyniają się do ich pełnej i szczegółowej charakterystyki. Zastosowanie wielostopniowej spektrometrii mas (MS^n) z wykorzystaniem „miękkich” metod jonizacji, zwłaszcza ESI- MS^n , znacznie polepsza skuteczność analizy badanych polimerów dostarczając dokładnych informacji o strukturze ich indywidualnych łańcuchów, w tym również — jak już wspominaliśmy — o budowie chemicznej grup końcowych.

W niniejszej pracy przedstawiamy przykłady zastosowań nowoczesnych technik MS do badania budowy poliestrów alifatycznych. Szczególny nacisk został przy tym położony na zastosowanie wielostopniowej spektrometrii mas z jonizacją metodą elektrorozpylania (ESI- MS^n) do badania struktury molekularnej syntetycznych modeli alifatycznych poliestrów (otrzymanych na drodze anionowej polimeryzacji wybranych β -laktónów) oraz naturalnych kopoliestrów alifatycznych.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Wszystkie doświadczenia przeprowadzono za pomocą pułapkowego spektrometru masowego „Finnigan LCQ” z zastosowaniem jonizacji metodą ESI. Jako gaz kolizyjny stosowano hel o bardzo wysokiej czystości, natomiast do nubilizacji próbek stosowano azot. Próbkę polimerów rozpuszczano w metanolu lub w mieszaninie chloroform:metanol (90:10) i wprowadzano je do źródła jonów pompą strzykawkową z szybkością przepływu 3 μ l/min. Napięcie w źródle jonów wynosiło 4,25—4,5 kV a temperatura kapilary 200°C. W celu uzyskania widm MS^n jony macierzyste izolowano monoizotopowo, a energia kolizji wynosiła 30—40% maksymalnej amplitudy RF. Analizę prowadzono rejestrując jony dodatnie lub ujemne.

WYNIKI I DYSKUSJA

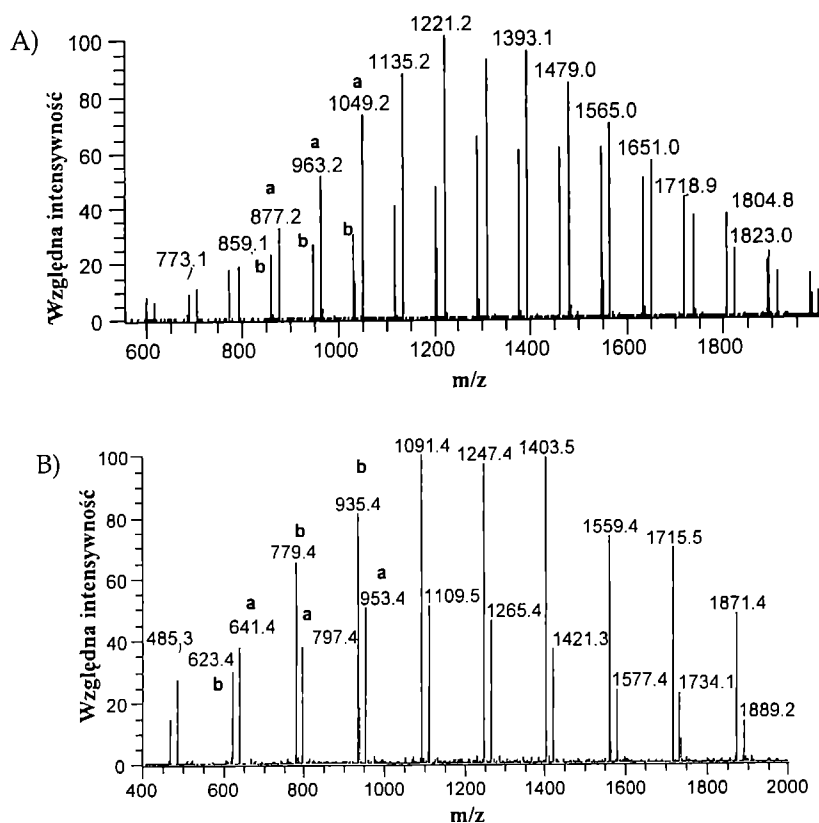
Wiele uwagi poświęca się ostatnio badaniom struktury naturalnych poliestrów alifatycznych (ang. *polyhydroxyalkanoates*, PHA), które stanowią najbardziej reprezentatywną grupę biodegradowalnych i biokompatybilnych materiałów polimerowych [4—6]. Poliestry te mo-

żna otrzymać zarówno na drodze kontrolowanej biofermentacji, jak i alternatywnymi metodami chemicznymi w wyniku polimeryzacji odpowiednich estrów cyklicznych czyli laktonów [7]. β -Butyrolakton, którego polimeryzacja może prowadzić do poli(3-hydroksymasłanu) (PHB) o różnej taktyczności, ciężarze cząsteczkowym, polidispersyjności oraz o rozmaitej budowie chemicznej grup końcowych w zależności od rodzaju zastosowanego inicjatora, jest spośród β -laktonów szczególnie interesującym monomerem [8, 9]. Biomimetyczny poli([R]-3-hydroksymasłan) o budowie grup końcowych identycznej jak naturalny PHB otrzymano ostatnio na drodze anionowej polimeryzacji (S)- β -butyrolaktónu wobec supramolekularnego kompleksu soli sodowej kwasu (R)-3-hydroksymasłowego, w wyniku inwersji konfiguracji zachodzącej podczas polimeryzacji optycznie czynnego monomeru [10]. Z drugiej strony, spośród izomerów strukturalnych naturalnego PHB, ataktyczny i w pełni amorficzny poli([R, S]-3-hydroksymasłan) (*n*-PHB), otrzymany w wyniku anionowej polimeryzacji racemicznego β -butyrolaktónu, może korzystnie zmieniać właściwości biopoliestrów oraz innych polimerów syntetycznych [9]. Ostatnio do analizy grup końcowych oraz badania mechanizmu fragmentacji wyselekcjonowanych jonów molekularnych poszczególnych makrocząsteczek *n*-PHB (uzyskanych metodą ESI) zastosowano nową technikę wielostopniowej spektrometrii mas [11, 12]. W widmach ESI- MS jony molekularne *n*-PHB rejestrowano w postaci zarówno dodatnio naładowanych adduktów z kationami metali (np. $[M+K]^+$), jak i jonów ujemnych $[M-H]^-$ [11, 13]. Zastosowanie wielostopniowej spektrometrii mas z jonizacją metodą elektrorozpylania pozwoliło na szybką i szczegółową analizę indywidualnych makrocząsteczek syntetycznych alifatycznych poliestrów otrzymanych wobec różnych aktywowanych eterem 18-korona-6 inicjatorów anionowych [11—16].

Analiza grup końcowych oraz weryfikacja chemicznej jednorodności syntetycznych poliestrów alifatycznych metodą ESI- MS^n

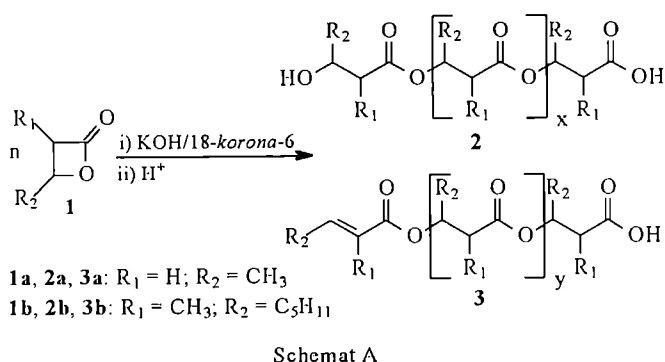
Rysunek 1 przedstawia widma ESI- MS poli-[(R,S)- β -butyrolaktónu] (rys. 1A) oraz poli(α -metylo- β -pentylo- β -propiolaktónu) (rys. 1B) otrzymanych w wyniku polimeryzacji odpowiednich β -laktonów wobec kompleksu wodorotlenku potasu z eterem 18-korona-6 [Schemat A] [11, 16].

Wyniki tych badań wskazują, że budowa chemiczna polimeru, zawierającego makrocząsteczki z końcowymi grupami hydroksylowymi oraz nienasyconymi nie jest jednorodna. Widoczne w przypadku obu widm masowych dwie serie pików (a oraz b) powtarzające się regularnie co 86 Da (rys. 1A) lub co 156 Da (rys. 1B) świadczą o tym, że polimery te są mieszaninami dwóch rodzajów makrocząstek o takim samym stopniu polimeryzacji ale zawierających różne grupy końcowe, odpowiednio: 3-hydroksymasłowe (rys. 1Aa) i krotonianowe



Rys. 1. Widma ESI-MS (jony ujemne) (A) poli[(*R,S*)- β -butyrolaktonu] i (B) poli(α -metylo- β -pentyl- β -propiolaktonu) otrzymanych w wyniku polimeryzacji odpowiednich laktonów **1a** i **1b** (schemat A) inicjowanych kompleksem wodorotlenku potasu z eterem 18-korona-6; interpretacja w tekście

Fig. 1. The ESI-MS spectra (negative ion mode) of (A) poly[(*R,S*)-beta-butyrolactone] and (B) poly(alpha-methyl-beta-pentyl-beta-propiolactone) prepared by polymerization of lactones **1a** and **1b** (Scheme A) initiated by an 18-crown-6 ether—potassium hydroxide complex (for interpretation see main text)



(rys. 1Ab) oraz 2-metylo-3-hydroksyoktanowe (rys. 1Ba) i 2-metylo-2-oktenowe (rys. 1Bb). Różnica mas pomiędzy dwoma sąsiednimi jonami a oraz b na każdym z widm wynosi 18 Da i jest równa różnicy pomiędzy ciężarami cząstkowymi hydroksylowych i nienasyconych grup końcowych.

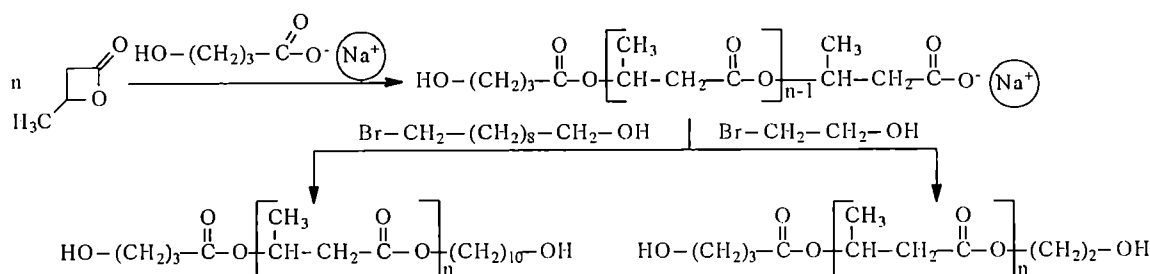
Określona na podstawie wyników analizy metodą ESI-MS budowa chemiczna grup końcowych poli[(*R,S*)- β -butyrolaktonu] oraz poli(α -metylo- β -pentyl- β -propiolaktonu) wskazuje, że mechanizm wzrostu łańcucha w anionowej polimeryzacji racemicznego α -podstawionego- β -propiolaktonu inicjowanej wodorotlenkiem potasu aktywowanym eterem 18-korona-6 jest

podobny do zaproponowanego uprzednio mechanizmu propagacji α -niepodstawionych β -laktonów wobec aktywowanych eterem koronowym alkoholani metali alkalicznych [17–19].

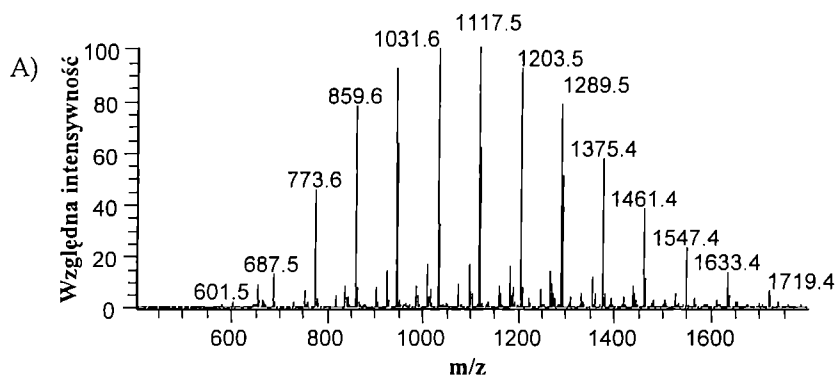
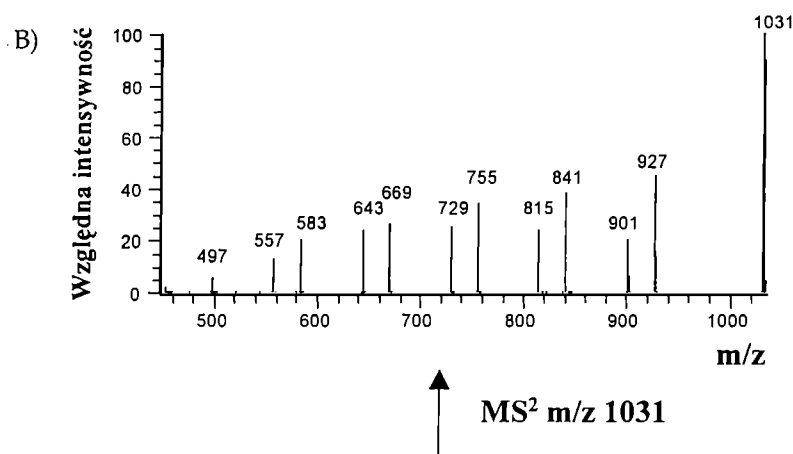
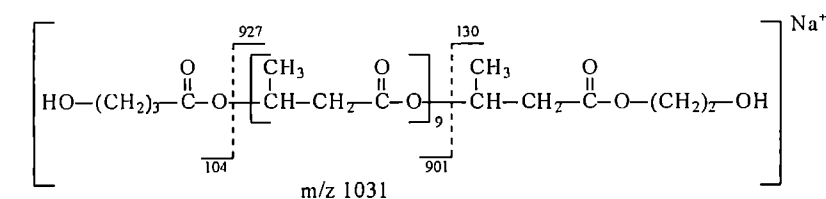
Kolejny przykład użyteczności techniki ESI-MSⁿ dotyczy badań terminacji łańcucha w syntezie telechelicznego *n*-PHB zawierającego pierwszorzędowe hydroksylowe końcowe grupy funkcyjne. Telecheliczny *n*-PHB otrzymano w wyniku zakańczania odpowiednim bromoalkoholem anionowej polimeryzacji (*R,S*)- β -butyrolaktonu inicjowanej supramolekularnym kompleksem soli sodowej kwasu 4-hydroksymasłowego (Schemat B) [14].

Szczegółowe badania budowy chemicznej otrzymanego na tej drodze polimeru przeprowadzone techniką ESI-MSⁿ wykazały, że zawiera on na obu końcach pierwszorzędowe hydroksylowe grupy funkcyjne (rys. 2A).

Widmo ESI-MS telechelicznego *n*-PHB zawiera jedną główną serię pików powtarzających się regularnie co 86 jednostek *m/z*, która pochodzi od dodatnio naładowanych adduktów z jonem sodowym indywidualnych łańcuchów tego polimeru o różnym stopniu polimeryzacji zawierających 4-hydroksymasłowe i hydroksyetylowe estrowe grupy końcowe. Jon o największej inten-



Schemat B



Rys. 2. Widmo ESI-MS (jony dodatnie) (A) telechelicznego poli[(*R,S*)- β -butyrolaktonu] otrzymanego w wyniku zakończonej bromoetanolem polimeryzacji (*R,S*)- β -butyrolaktonu inicjowanej kompleksem soli sodowej kwasu 4-hydroksymastowego oraz (B) widmo fragmentacyjne (MS²) jonu molekularnego *m/z* 1031; interpretacja w tekście

Fig. 2. The ESI-MS spectra (positive ion mode) of (A) telechelic poly[(*R,S*)- β -butyrolactone] prepared by polymerization of (*R,S*)- β -butyrolactone initiated by an 18-crown-6 ether—sodium 4-hydroxybutanoate complex and terminated with bromoethanol and (B) sequential fragmentation spectrum (MS²) of molecular ion *m/z* 1031

sywności występuje w punkcie o wartości *m/z* 1031,6 i odpowiada dekamerowi o budowie przedstawionej na rys. 2B.

W celu dokładnego potwierdzenia struktury łańcucha określonej na podstawie prostego widma ESI-MS prze-

prowadziliśmy analizę fragmentacyjną (MS²) wyselekcjonowanego monoizotopowo jonu macierzystego *m/z* 1031 (rys. 2B). Eksperyment MS² wykazał, że fragmentacja zachodzi z obu stron makrocząsteczki: jon fragmentacyjny *m/z* 927 tworzy się z jonu macierzystego po-

przez utratę kwasu 4-hydroksymasłowego (104 Da), natomiast jon fragmentacyjny m/z 901 powstaje w wyniku utraty hydroksyetylowego estru kwasu krotonowego (130 Da).

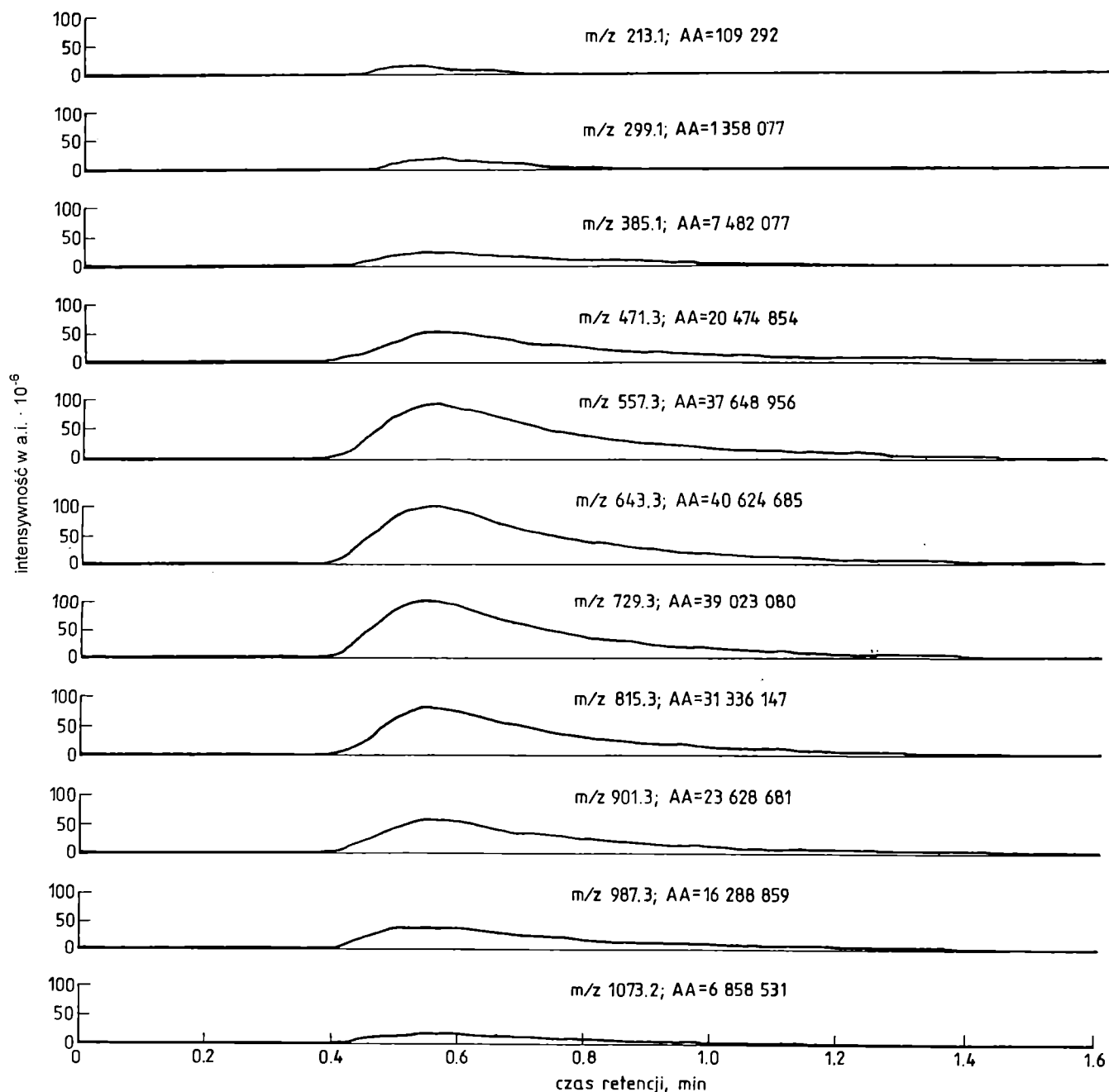
Widoczny w widmie niewielki udział serii jonów pochodzących od niezakończonego bromoetanolem α -PHB wskazuje, że reakcja terminacji przebiega z dużą wydajnością.

Na podstawie omówionych przykładów wykazano więc, że technika ESI-MSⁿ jest bardzo wygodnym i użytecznym narzędziem do określania struktury polime-

rów, w tym budowy chemicznej grup końcowych, jak również do badania reakcji terminacji łańcucha oraz dostarcza cennych informacji niezbędnych w badaniu mechanizmu procesu polimeryzacji.

Zastosowanie techniki ESI-MS do określania ciężaru cząsteczkowego oraz polidispersyjności małych cząsteczkowych poliesterów alifatycznych

Proces jonizacji próbek polimerów „miękkimi” metodami jonizacji zachodzi poprzez przyłączenie protonu



Rys. 3. Krzywe SID dotyczące poszczególnych oligomerów α -PHB od dimeru (m/z 213,1) do dodekameru (m/z 1073,2); AA — powierzchnia pików w jednostkach umownych

Fig. 3. SID traces for individual α -PHB oligomers, from dimer (m/z 213.1) to dodecamer (m/z 1073.2); AA — peak area, arbitrary units

lub jonu metalu (najczęściej litu, sodu lub potasu) do pojedynczych makrocząstek z utworzeniem odpowiedniego adduktu obdarzonego ładunkiem dodatnim. W analizie ilościowej liczba adduktów widoczna w widmie masowym powinna odzwierciedlać liczbę indywidualnych łańcuchów wchodzących w skład badanego polimeru, czyli wydajność jonizacji tych łańcuchów oraz odpowiadające im wskazania detektora masowego powinny mieć stałe wartości w badanym zakresie ciężarów cząsteczkowych [2, 3].

Opierając się na powyższych założeniach, na podstawie analizy ilościowej przeprowadzonej techniką ESI-MS, określono ciężar cząsteczkowy i polidispersyjność syntetycznych modeli produktów degradacji wielocząsteczkowego *n*-PHB [15]. Odpowiedni małowymiarowy *n*-PHB otrzymano w wyniku oligomeryzacji (*R,S*)-β-butyrolaktanu wobec aktywowanej eterem 18-korona-6 soli sodowej kwasu 3-hydroksymasłowego [15].

Udział ilościowy indywidualnych oligomerów wyznaczono na podstawie metody selektywnej analizy jonów (SID). Rysunek 3 przedstawia chromatogramy SID adduktów sodowych molekularnych jonów odpowiednich oligomerów zawierających hydroksylowe i karboksylowe grupy końcowe — od dimeru *m/z* 213 do dodekameru *m/z* 1073.

Opierając się na wartościach powierzchni pików (*AA*, rys. 3) odpowiadających poszczególnym zidentyfikowanym oligomerom oraz znając całkowite stężenie badanej próbki obliczono stężenie indywidualnych oligomerów (*c_i*, *c₂*–*c₁₂*). Wielkość *c_i* jest związana z liczbą moli indywidualnych oligomerów *n_i* równaniem

$$n_i M_i = c_i V_i \quad (1)$$

gdzie: *M_i* — ciężar cząsteczkowy indywidualnych oligomerów w objętości *V_i*.

Z danych analizy ESI-MS można na tej podstawie wyznaczyć liczbowo średni ciężar cząsteczkowy, wagowo średni ciężar cząsteczkowy oraz polidispersyjność badanej próbki *n*-PHB korzystając z następujących zależności:

$$\bar{M}_{n(ESI-MS)} = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} = \frac{\sum c_i}{\sum c_i M_i^{-1}} = 636 \quad (2)$$

$$\bar{M}_{w(ESI-MS)} = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} = \frac{\sum c_i M_i}{\sum c_i} = 683 \quad (3)$$

$$\frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n} = 1,07 \quad (4)$$

Otrzymane wartości średniego ciężaru cząsteczkowego oraz polidispersyjności są porównywalne z wartościami otrzymanymi na podstawie wyników analizy badanej próbki oligomerów metodą chromatografii żelowej (przy użyciu kalibracji dotyczącej wąskich standardów polistyrenowych): $\bar{M}_{n(GPC)} = 580$; $\bar{M}_w / \bar{M}_n = 1,16$. Różnica pomiędzy uzyskanymi tymi dwiema metodami wartościami \bar{M}_n jest mniejsza niż ciężar cząsteczkowy powtarzającego się meru (86 Da).

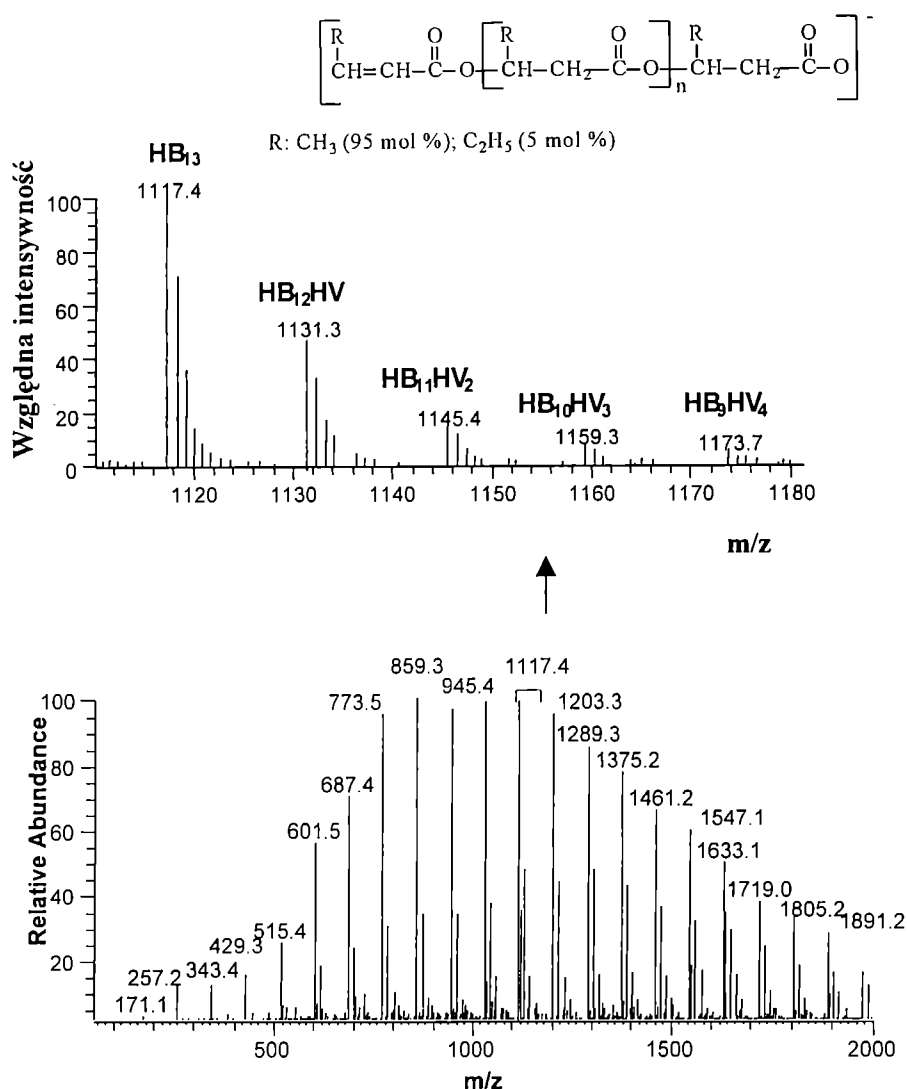
Powyższy przykład dowodzi zatem, że korzystając z metod spektrometrii mas w odniesieniu do próbek o wąskim rozkładzie ciężarów cząsteczkowych można określić średni ciężar cząsteczkowy bez konieczności użycia (czasami trudno dostępnych) standardów do kalibracji, jak to jest wymagane w metodzie GPC. Jednak w przypadku próbek o większej polidispersyjności ($\bar{M}_w / \bar{M}_n > 1,2$) różnice pomiędzy średnimi ciężarami cząsteczkowymi wyznaczonymi metodami GPC i spektrometrii mas są dosyć duże, przekraczają bowiem 20%. Zachodzi wtedy konieczność łączenia różnych technik spektrometrii mas z chromatografią żelową. Najlepsze wyniki uzyskano dotychczas wykorzystując połączenie GPC z MALDI TOF-MS [3].

Zastosowanie metody ESI-MSⁿ do badania struktury wybranych naturalnych poliesterów alifatycznych

Znajomość mikrostruktury kopolimerów ma istotne znaczenie w określeniu zależności pomiędzy ich budową a właściwościami [3]. Naturalne kopoliestry alifatyczne (PHA) zalicza się, ogólnie biorąc, do grupy kopolimerów statystycznych, gdyż na podstawie analizy rozkładu sekwencji przeprowadzonej metodą NMR stwierdzono, że rozmieszczenie wchodzących w ich skład odpowiednich komonomerów stosuje się do statystyki Bernoulliego. Mikrostrukturę wielocząsteczkowego PHBV (kopolimeru kwasu 3-hydroksymasłowego i kwasu 3-hydroksywalerianowego) określono metodami ¹H-NMR i ¹³C-NMR, opierając się na analizie diad i triad [20]. Istotnych informacji dotyczących mikrostruktury indywidualnych łańcuchów tego naturalnego kopolimeru dostarczyły badania przeprowadzone metodą spektrometrii mas. Względna intensywność pików odpowiadająca pojedynczym oligomerom o zdefiniowanej długości łańcucha odzwierciedla skład kopolimeru oraz rozkład sekwencji komonomerów. Analiza sekwencji metodą spektrometrii mas opiera się na porównaniu doświadczalnych widm masowych badanych kopolimerów z widmami masowymi kopolimerów o różnych składach generowanymi teoretycznie z zastosowaniem statystyk Bernoulliego lub Markowa [21].

Na podstawie powyższych założeń Montaudo i współpracownicy określili rozkład sekwencji w próbkach naturalnego PHBV [różniących się zawartością merów kwasu 3-hydroksywalerianowego (HV)] z zastosowaniem spektrometrii mas z „miękkimi” metodami jonizacji: od poziomu heksameru metodą FAB-MS [22], do poziomu nonameru metodą ESI-MS [23] oraz na poziomie od heksameru do heksadekameru metodą MALDI TOF-MS [24]. Powyższe procedury zastosowano również do badania mikrostruktury naturalnych PHA zawierających dłuższe *n*-alkilowe łańcuchy boczne [25].

Ostatnio, wykorzystując wielostopniową spektrometrię mas w połączeniu z jonizacją metodą elektrorozpylania określono rozkład sekwencji oraz chemiczną budowę grup końcowych indywidualnych łańcuchów



Rys. 4. Widmo ESI-MS (jony ujemne) częściowo zdepolimeryzowanego naturalnego PHBV (zawierającego 5% molowych merów HV, $M_n = 1300$) oraz sekwencja oligomerów PHBV o DP = 13; interpretacja w tekście

Fig. 4. The ESI-MS spectrum (negative ion mode) of partially depolymerized natural PHBV (containing 5 mol % of HV units, $M_n = 1300$) and expanded ESI-MS spectrum of the sequence containing PHBV oligomers (DP = 13) (for interpretation see main text)

wchodzących w skład wybranych biopoliestrów [26, 27].

Ponieważ otrzymane w wyniku procesu biofermentacji naturalne biopoliestry charakteryzują się dużymi ciężarami cząsteczkowymi, w celu „dopasowania” tych ciężarów do zakresu mas mierzonych różnymi metodami spektrometrii mas stosuje się wiele metod kontrolowanej częściowej degradacji [3, 28, 29]. Próbkę do badań techniką ESI-MS otrzymano na drodze zasadowej hydrolizy naturalnego biopoliestru (np. PHBV) wobec roztworu wodorotlenku potasu z udziałem eteru 18-korona-6 [9, 26, 27, 30].

Rysunek 4 przedstawia doświadczalne widmo ESI-MS dotyczące ujemnych jonów naturalnego PHBV (zawierającego 5% mol. merów HV).

Na rysunku tym są widoczne sekwencje jonów molekularnych odpowiadające łańcuchom o stopniu oligo-

meryzacji od 2 do 22 zakończonych z jednej strony nienasyconymi, a z drugiej strony karboksylanowymi grupami końcowymi. W obrębie każdej sekwencji występują jony o takim samym stopniu oligomeryzacji odpowiadające oligomerom o różnej zawartości merów HV. Różnica mas pomiędzy kolejnymi jonami należącymi do tej samej sekwencji wynosi 14 Da i odpowiada różnicy pomiędzy ciężarem cząsteczkowym merów HV i HB. Korzystając z przedstawionego widma masowego obliczono względne intensywności poszczególnych pików w obrębie każdej zidentyfikowanej sekwencji (od dimeru do 22-meru), które następnie porównano z wartościami odpowiadających im intensywności na wygenerowanych teoretycznie (z założeniem rozkładu Bernoulliego) widmach masowych odnoszących się do statystycznych kopolimerów PHBV w zakresie składu od 4 do 6% mol. merów HV. Na podstawie różnicy pomię-

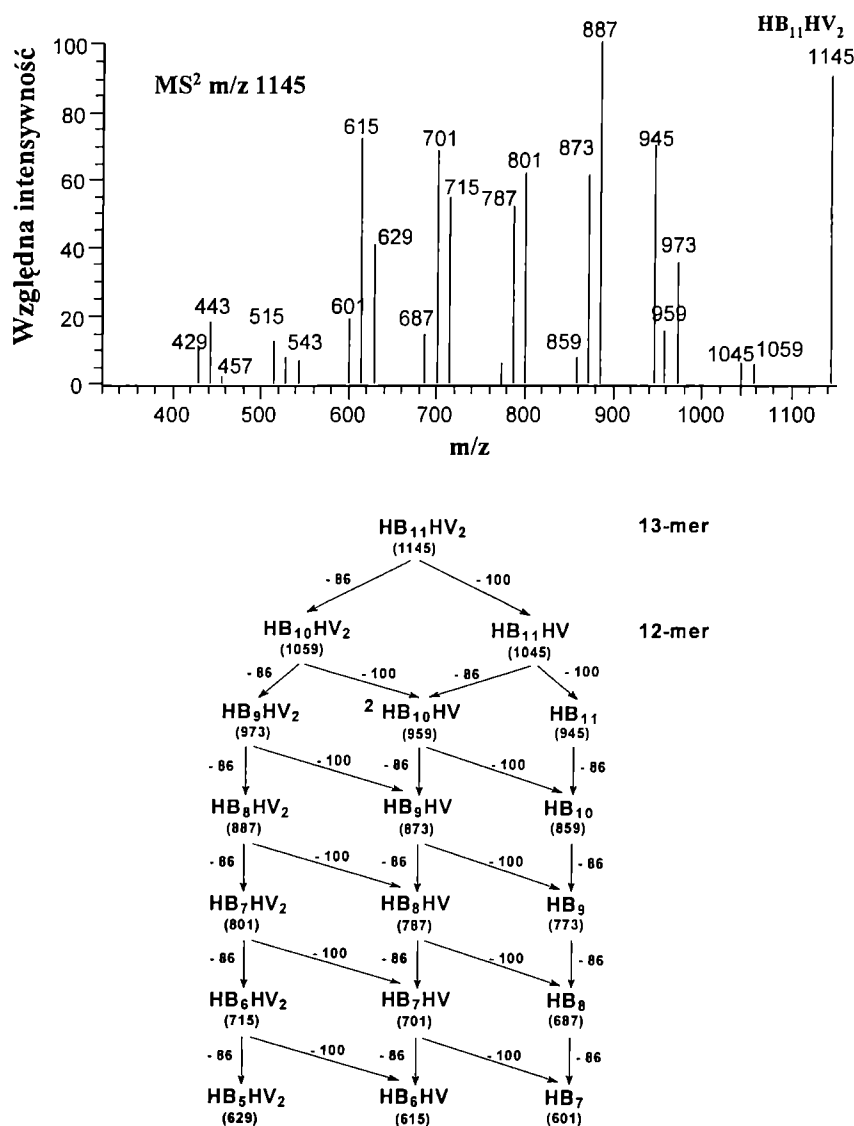
dzy wartościami intensywności doświadczalnych I_{exp} i obliczonych I_{obl} wyrażonej przez współczynnik zgodności AF określono dopasowanie wybranej struktury do rzeczywistości:

$$AF = \left(\frac{\sum_i (I_{i,exp} - I_{i,obl})^2}{\sum_i I_{i,exp}^2} \right)^{1/2} \quad (5)$$

Stwierdzono, że badany biopolimer jest kopolimerem statystycznym zawierającym 5% molowych merów HV [26].

Wykorzystanie techniki wielostopniowej spektrometrii mas ESI-MAⁿ pozwoliło po raz pierwszy przedstawić chemiczną budowę pojedynczych łańcuchów wchodzących w skład badanego kopolimeru, w tym budowę grup końcowych oraz statystyczny rozkład komonomerów wzdłuż poszczególnych łańcuchów.

Przedstawione na rys. 5 widmo otrzymane w wyniku eksperymentu fragmentacyjnego MS² jonu molekularnego m/z 1145 (HB₁₁HV₂) należącego do wybranej sekwencji (trzynastej) wskazuje, że jon ten jest mieszaniną makrocząsteczek zawierających rozmieszczone statystycznie wzdłuż łańcucha dwa mery HV. Rysunek 5 zawiera też schemat fragmentacji tego anionu, przebiegającej od końca karboksylanowego. Na pierwszym etapie powstają dwa jony fragmentacyjne o strukturze HB₁₀HV₂ i HB₁₁HV (m/z 1059 i m/z 1045) tworzące się odpowiednio w wyniku utraty od strony karboksylanowej cząsteczki kwasu krotonowego lub kwasu 2-pentenowego. Na następnych etapach fragmentacji tworzą się serie, w skład których wchodzi trzy jony fragmentacyjne o takim samym stopniu oligomeryzacji, ale o różnej liczbie merów HV. Serie te tworzą się również poprzez utratę kwasów krotonowego lub 2-pentenowego



Rys. 5. Widmo fragmentacyjne MS² (jony ujemne) jonu molekularnego HB₁₁HV₂ (m/z 1145) wybranego z sekwencji oligomerów PHBV o DP = 13 (por. rys. 4); interpretacja w tekście

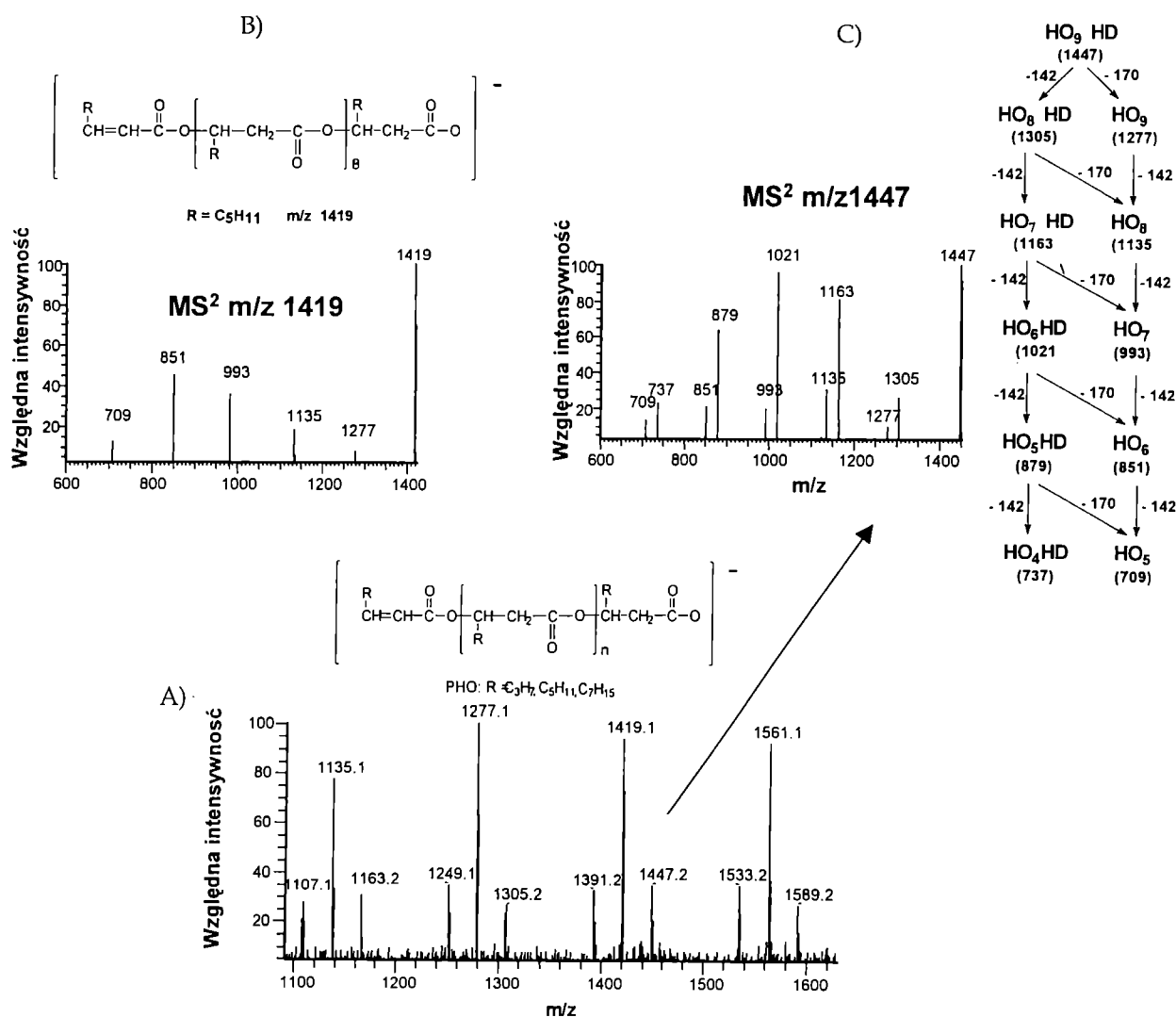
Fig. 5. The MS² fragmentation spectrum (negative ion mode) for molecular parent ion HB₁₁HV₂ (m/z 1145) selected from the PHBV sequence (DP = 13); for interpretation see main text

zawsze od końca karboksylanowego makrocząstek, w sposób jaki przedstawiono na rys. 5.

Technikę ESI-MSⁿ zastosowano również do określenia składu chemicznego oraz rozkładu sekwencji w naturalnym kopolimierze alifatycznym PHO [poli[kwas-(R)-3-hydroksyoktanowy]], którego łańcuchy są zbudowane głównie z merów kwasu 3-hydroksyoktanowego, ale zawierają również niewielką ilość merów kwasów 3-hydroksyheksanowego i 3-hydroksydekanowego (rys. 6).

W widmie ESI-MS (jony ujemne, rys. 6A) każdemu stopniowi oligomeryzacji odpowiadają sekwencje trzech jonów fragmentacyjnych różniących się masą 28 Da rozdzielonych ze względu na skład. Środkowy jon w każdej sekwencji odpowiada łańcuchom czystego PHO, natomiast dwa pozostałe odpowiadają łańcuchom PHO zawierającym odpowiednio jeden mer kwasu 3-hydroksyheksanowego lub 3-hydroksydekanowego. Powyższe przyporządkowanie potwierdzono przeprowa-

dzając dodatkowo doświadczenia fragmentacyjne MS² dotyczące wybranych jonów molekularnych m/z 1419 oraz m/z 1447. W obu przypadkach zaobserwowano, że fragmentacja zachodzi od karboksylanowego końca makrocząstek. W widmie MS² jonu macierzystego m/z 1419 (odpowiadającemu łańcuchowi zawierającemu czysty PHO) występuje seria jonów fragmentacyjnych, która tworzy się w wyniku sukcesywnego odrywania cząsteczki kwasu 2-oktenowego (142 Da) (rys. 6B). W doświadczeniu fragmentacyjnym MS² jonu macierzystego m/z 1447 (odpowiadającego łańcuchowi PHO zawierającemu jeden mer kwasu 3-hydroksydekanowego) tworzą się serie zawierające dwa jony fragmentacyjne różniące się masą 28 Da (rys. 6C); mają one taki sam stopień oligomeryzacji, ale różny skład. Jony te powstają w wyniku utraty cząsteczek kwasów 2-oktenowego (142 Da) lub 2-decenowego (170 Da) w sposób również przedstawiony na rys. 6C.



Rys. 6. A) Fragment widma ESI-MS (jony ujemne) naturalnego PHO. B) Widmo fragmentacyjne MS² jonu molekularnego (HO)₁₀, m/z 1419. C) Widmo fragmentacyjne MS² jonu molekularnego (HO)₉HD, m/z 1447; interpretacja w tekście
Fig. 6. (A) Expanded ESI-MS spectrum (negative ion mode) of natural PHO; (B) MS² fragmentation spectrum of molecular parent ion (HO)₁₀ (m/z 1419); (C) MS² fragmentation spectrum of molecular parent ion (HO)₉HD (m/z 1447); for interpretation see main text

PODSUMOWANIE

Wyniki omówionych badań wykazały, że wielostopniowa spektrometria mas z jonizacją metodą elektrorozpylania (ESI-MS) jest użyteczną i wygodną techniką do badania struktury zarówno naturalnych, jak i syntetycznych poliestrów alifatycznych.

Zastosowanie elektrorozpylania jako metody jonizacji pozwoliło na precyzyjne wyznaczenie masy indywidualnych makrocząsteczek wchodzących w skład badanych próbek polimerów, co umożliwiło weryfikację ich homogeniczności chemicznej. Zastosowanie wielostopniowej spektrometrii mas MSⁿ znacznie polepszyło skuteczność analizy i dostarczyło dokładnych informacji o budowie chemicznej grup końcowych poliestrów alifatycznych. Informacje te z kolei odegrały istotną rolę w określeniu mechanizmów procesów polimeryzacji oraz wydajności reakcji zakańczania łańcuchów polimerowych.

W przypadku naturalnych kopoliestrów alifatycznych zastosowanie techniki ESI-MS pozwoliło na określenie składu chemicznego indywidualnych makrocząsteczek. Ponadto technika ta umożliwiła określenie rozkładu sekwencji komonomerów w szerszym zakresie ciężarów cząsteczkowych (w przypadku PHBV od dimeru do 22-meru) w porównaniu z opisanymi w literaturze badaniami tych kopoliestrów z zastosowaniem innych „miękkich” metod jonizacji. Przeprowadzona techniką MSⁿ fragmentacja wybranych indywidualnych makrocząsteczek PHBV i PHO umożliwiła dokładną identyfikację grup końcowych oraz pozwoliła po raz pierwszy zweryfikować statystyczny rozkład merów wchodzących w skład ich łańcuchów.

Praca częściowo finansowana w ramach projektu badawczego EUREKA E! 2004 „MICROPOL”.

LITERATURA

- Nielen M. W. F.: *Mass Spectrometry Rev.* 1999, **18**, 309.
- Saf R., Mirtl C., Hummel K.: *Acta Polymerica* 1997, **48**, 513.
- Montaudo G.: *Trends Polym. Sci.* 1996, **4**, 81.
- Doi Y.: „Microbial Polyesters”, VCH, Nowy Jork 1990.
- Byrom D.: *Trends. Biotechnol.* 1987, **5**, 246.
- Madison L. L., Huisman G. W.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999, **63**, 21.
- Lenz R. W., Jedliński Z.: *Macromol. Symp.* 1996, **107**, 149.
- Jedliński Z.: *Acta Chem. Scand.* 1999, **53**, 157.
- Jedliński Z., Kowalczyk M., Adamus G., Sikorska W., Rydz J.: *Int. J. Biol. Macromol.* 1999, **25**, 247.
- Jedliński Z., Kurcok P., Lenz R. W.: *Macromolecules* 1998, **31**, 6718.
- Jedliński Z., Adamus G., Kowalczyk M., Schubert R., Szewczyk Z., Stefanowicz P.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998, **12**, 357.
- Jedliński Z., Kowalczyk M., Adamus G.: „Działalność naukowa PAN, wybrane zagadnienia” 1998, **6**, 80.
- Adamus G., Kowalczyk M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000, **14**, 195.
- Arslan H., Adamus G., Hazer B., Kowalczyk M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999, **13**, 2433.
- Focarete M. L., Scandola M., Jendrossek D., Adamus G., Sikorska W., Kowalczyk M.: *Macromolecules* 1999, **32**, 4814.
- Jedliński Z., Arkin A. H., Adamus G., Hazer B., Kowalczyk M., Lenz R. W.: w przygotowaniu.
- Kurcok P., Kowalczyk M., Hennek K., Jedliński Z.: *Macromolecules* 1992, **25**, 2017.
- Kurcok P., Jedliński Z., Kowalczyk M.: *J. Org. Chem.* 1993, **58**, 4219.
- Jedliński Z., Kowalczyk M., Kurcok P., Adamus G., Matuszowicz A., Sikorska W., Gross R. A., Xu J., Lenz R. W.: *Macromolecules* 1996, **29**, 3773.
- Kamiya N., Yamamoto Y., Inoue Y., Chujô R., Doi Y.: *Macromolecules* 1989, **22**, 1676.
- Montaudo M. S., Montaudo G.: *Macromolecules* 1992, **25**, 4264.
- Ballistreri A., Garozzo D., Giuffrida M., Montaudo G., Montaudo M. S.: *Macromolecules* 1991, **24**, 1231.
- Abate R., Garozzo D., Rapisardi R., Ballistreri A., Montaudo G.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1992, **6**, 702.
- Abate R., Ballistreri A., Montaudo G., Garozzo D., Impallomeni G., Grichley G., Tanaka K.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1993, **7**, 1033.
- Ballistreri A., Montaudo G., Impallomeni G., Lenz R. W., Kim Y. B., Fuller R. C.: *Macromolecules* 1990, **23**, 5059.
- Adamus G., Sikorska W., Kowalczyk M., Montaudo M., Scandola M.: *Macromolecules* 2000, **33**, 5797.
- Kowalczyk M., Adamus G.: „The Second International Conference on Biopolymer Technology”, Ischia (Włochy) 2000, materiały konferencyjne, str. 2.
- Ballistreri A., Garozzo D., Giuffrida M., Impallomeni G., Montaudo G.: *Macromolecules* 1989, **22**, 2107.
- Montaudo M. S., Puglisi C., Samperi F., Montaudo G.: *Macromolecules* 1998, **31**, 8666.
- Kowalczyk M., Adamus G., Sikorska W., Hazer B., Borcakli M., Arkin A. H.: The Food Biopack Conference, Kopenhaga (Dania) 2000, materiały konferencyjne, str. 39.