

Beata MIKSA, Marek J. POTRZEBOWSKI

Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi,
miksa@cbmm.lodz.pl

Analiza syntetycznych polimerów biodegradowalnych metodą spektrometrii mas z udziałem matrycy (MALDI-TOF) *kontra* pomiary za pomocą wzmocnienia laserowej desorpcji/ionizacji (ELDI-TOF) z wykorzystaniem parylenu

Streszczenie. Metody spektrometrii mas w tym MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) umożliwiają analizę mas cząsteczkowych polimerów syntetycznych (w tym biodegradowalnych) przez dobranie matrycy ułatwiającej ich jonizację lub jak w przypadku ELDI (enhanced laser desorption/ionization) w wyniku zastosowania modyfikowanej powierzchni ułatwiającej jonizację próbek. Ciecze jonowe będące solami N,N-diizopropylaminy (DEA) oraz kwasów: 2,5-dihydroksybenzoesowego (DHB), 3-indoloakrylowego (IAA) oraz 2-(4-hydroksyfenylazo)benzoesowego (HABA) znalazły zastosowanie jako matryce jonowe do wyznaczania ciężarów cząsteczkowych polilaktydów o $M_w \geq 4000$ metodą MALDI-TOF. Polimery o niskich masach molowych ≤ 2000 mogą być łatwo analizowane bez udziału matrycy na powierzchni płytki pokrytej parylenem-N (poli(p-ksylylenem), PPX), który ułatwia proces laserowej desorpcji/ionizacji próbki (LDI) eliminując sygnały pochodzące od matrycy, zakłócające analizę widma masowego związków o niskich – zbliżonych do matrycy ciężarach cząsteczkowych. Zastosowanie parylenu-N do pokrywania powierzchni płytek poddanych silnej energii lasera wywołującego jonizację analizowanej próbki, nie powoduje pojawienia się dodatkowych sygnałów wynikających z obecności parylenu w widmie masowym, zakłócających interpretację otrzymanych ciężarów cząsteczkowych polilaktydu.

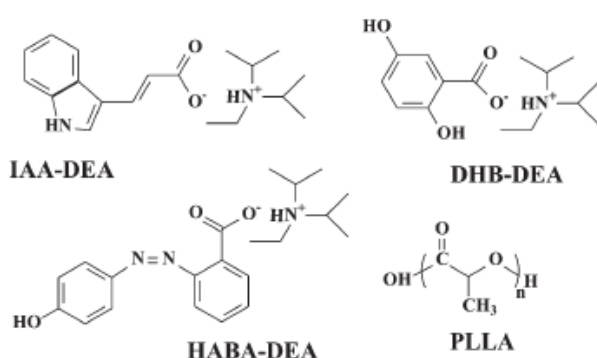
ANALYSES OF SYNTHETIC BIODEGRADABLE POLYMERS BY MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION TIME-OF-FLIGHT (MALDI-TOF) VERSUS ENHANCED LASER DESORPTION/IONIZATION (ELDI-TOF) MASS SPECTROMETRY USING THE PARYLENE SURFACE

Summary. Mass spectrometry MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) enables spectral analysis of synthetic biodegradable polymers with the addition of ammonium salts using ionic matrices from N,N-diisopropylethylamine (DEA) and DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid), IAA (3-indoleacrylic acid), and HABA (2-(4-hydroxyphenylazo) benzoic acid). However, the MALDI mass spectra of polymers of molecular mass up to 1000 Da are often heavily populated with peaks originating from the matrix and matrix secondary reaction products that introduce noise, making it difficult to interpret peaks in this region of the mass spectrum. Thus, polymers of molecular masses up to a few kDa can be analyzed, without the use of a matrix, by direct laser desorption/ionization (LDI). We used ELDI-TOF (enhanced laser desorption/ionization time-of-flight) for the rapid characterization of molecules directly from the support covered with a thin layer of parylen-N (poly(p-ksylylenes)). Hydrophobic parylen used as a support on the target plate influenced on decreasing the area size of the droplets, thus concentrating the spot including a sample of the polymer.

1. BADANIA

1) Analiza poli(L-laktydu) (PLLA) metodą MALDI-TOF z zastosowaniem matrycy jonowych^[1]

Wybrane przez Autorów sole amoniowe są ciałami stałymi o różnym stopniu krystaliczności, spełniającymi wymagania cieczy jonowych o temperaturze topnienia ~100 °C (IAA-DEA 127 °C, DHB-DEA 126 °C, HABA-DEA 166 °C).

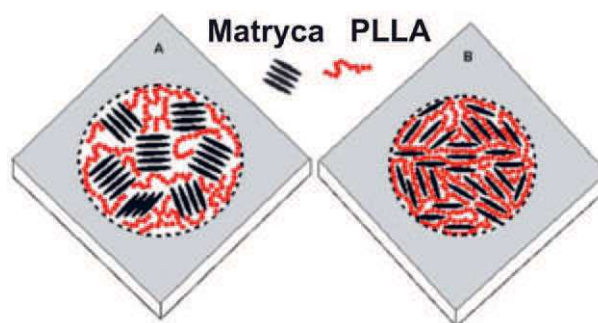


Rys. 1. Sole amoniowe wykorzystane jako matryce jonowe do analizy PLLA

Doświadczenia oznaczania masy molowej PLLA techniką MALDI-TOF były wykonane dwoma sposobami: a) metodą klasyczną polegającą na rozpuszczeniu próbki PLLA wraz z matrycą i dodatkiem środka jonizującego (jodku sodu) w dobranym rozpuszczalniku np.: tetrachlorofuranie (*dried-droplet*, DD) oraz b) metodą, w której nie stosuje się rozpuszczalnika, a związki wymieszane fizycznie poddane zostają analizie w stałym stanie skupienia (*solvent-free*, SF). Zastosowanie obu wymienionych metod miało na celu pokazanie wpływu oddziaływań matrycy na próbkę PLLA, które powodują różnice w otrzymanych masach molowych analizowanego polimeru.

Dla każdej matrycy została wyznaczona optymalna energia lasera, która wyrażana jest we względnych jednostkach intensywności charakterystycznych dla danego lasera, zależnych od indywidualnych cech aparatu oraz

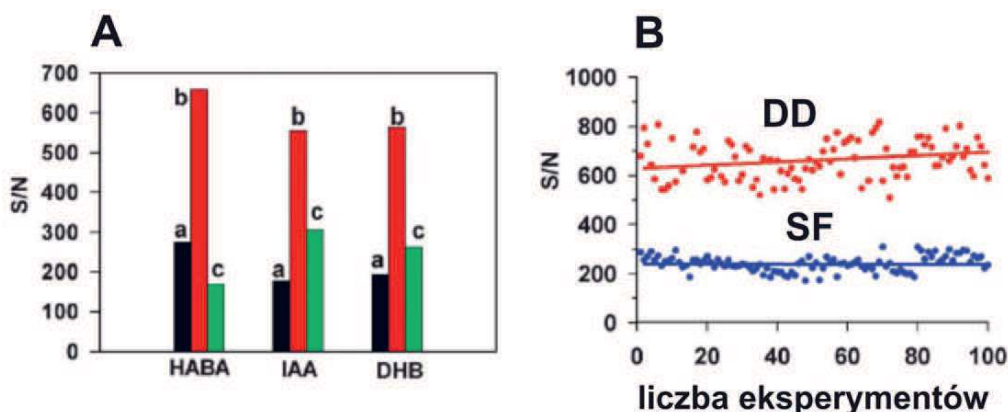
warunków przeprowadzanych pomiarów (*arbitrary unit*; a.u) potrzebna do wzbudzenia próbki polilaktydu wynosząca dla: HABA-DEA (1700 a.u.), IAA-DEA (1900 a.u.), DHB-DEA (2300 a.u.). Ze względu na obecność wiązania azowego (-N=N-) w cząsteczce HABA, utworzony kompleks HABA-DEA ulega wzbudzeniu przy najniższej energii lasera.



Rys. 2. Schemat ilustrujący oddziaływanie w kontaktach między PLLA i matrycą w metodzie SF (A) i DD (B)

Podobny wpływ wywiera grupa akrylowa w kompleksie IAA-DEA. Wielkość zastosowanej energii lasera decyduje o wzbudzeniu próbki (jej desorpcji z podłoża) oraz jej jonizacji. W analizach MALDI-TOF użycie wysokiej energii lasera powoduje niepożądaną fragmentację łańcucha polimeru PLLA, która obniża i fałszuje wartość wyznaczanej masy molowej polimeru. Dlatego też, prowadzone badania miały na celu znalezienie matrycy łatwo ulegającej wzbudzeniu, przy zastosowaniu minimalnej energii lasera. Z przeprowadzonych badań wynika, że matryca HABA-DEA najlepiej spełniła swoją rolę, gdyż przy najniższej wartości energii lasera otrzymaliśmy najwyższe sygnały wyznaczające proporcje: masy do ładunku (m/z) na widmie masowym. Wyniki analiz widm masowych PLLA przeprowadzone techniką MALDI-TOF ilustrujące pomiary wykonane metodą SF i DD przedstawione są na rysunku 3.

W otrzymanych widmach masowych PLLA z zastosowaniem matrycy HABA-DEA występują typowe regularne odstępstwa $m/z = 72.1$ cha-

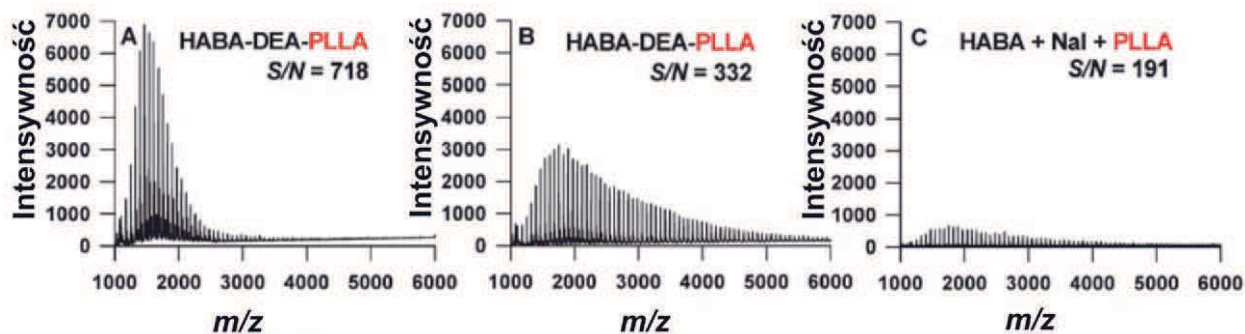


Rys. 3. A) Porównanie wartości S/N (signal to noise) odczytane z widm masowych PLLA wykonanych techniką MALDI-TOF z użyciem matryc jonowych HABA-DEA, IAA-DEA, DHB-DEA metodami: SF (a), DD (b) oraz z typowymi matrycami HABA, IAA, DHB z dodatkiem czynnika kationizującego NaI metodą SF (c). B) Ilustracja średnich wartości (S/N) otrzymanych z pomiarów PLLA z udziałem matrycy HABA-DEA wykonanych metodą SF i DD

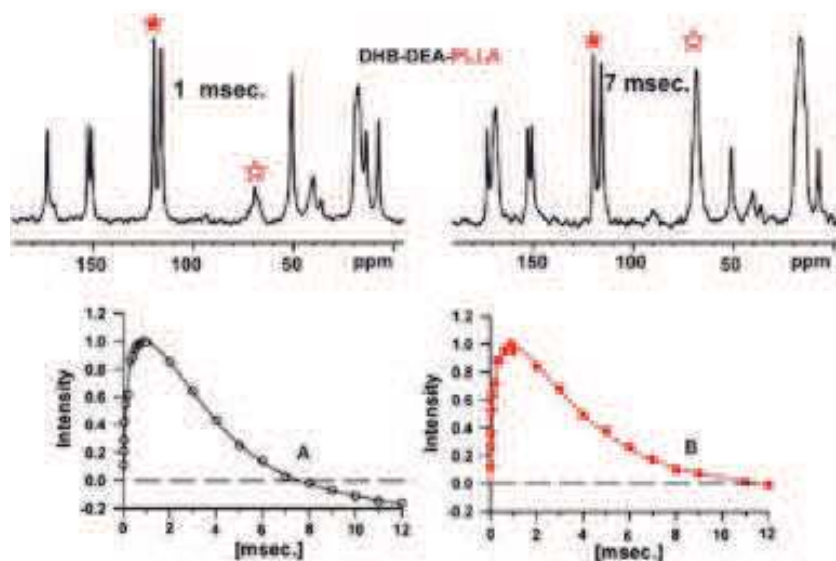
rakteryzujące jednostki monomeryczne $[-C(O)CH(CH_3)O-]$ polilaktydu. Przykładowe widma masowe PLLA przedstawione są na rysunku 4.

Z przedstawionych na Rys. 4 oznaczeń masy molowej PLLA wykonanych z udziałem matrycy HABA-DEA wynika, że sposób przygotowania próbki metodą DD lub SF wpływa na oszacowanie średniego ciężaru cząsteczkowego polilaktydu w pomiarach MALDI-TOF. Stosując metodę DD otrzymaliśmy dwa razy wyższe sygnały S/N w porównaniu z metodą SF, przy jednoczesnym dwukrotnym zmniejszeniu zakresu oznaczanej masy molowej m/z polilaktydu. W metodzie DD mierzony PLLA był widoczny w wąskim zakresie m/z : 1000 ÷

3000, natomiast w SF w szerszym zakresie m/z : 1000 ÷ 6000. Wyniki pomiarów MALDI-TOF sugerują więc, że sole amoniowe stosowane jako matryce jonowe w metodzie DD powodują aminolizę polilaktydu, a więc jego częściową fragmentację. Grupy aminowe będące silnymi nukleofilami oddziałują na grupy karbonylowe polilaktydu powodując rozrywanie łańcucha polimeru. W wyniku tego procesu otrzymany rozkład ciężarów cząsteczkowych PLLA jest zaniżony i wynosi $M_w = 1500$, podczas gdy pomiary przeprowadzone metodą SF wskazują średnią masę molową polilaktydu $M_w = 2500$. Hipotezę tę potwierdziły dodatkowe badania przeprowadzone metodą spektroskopową za pomocą NMR w ciele stałym. W meto-



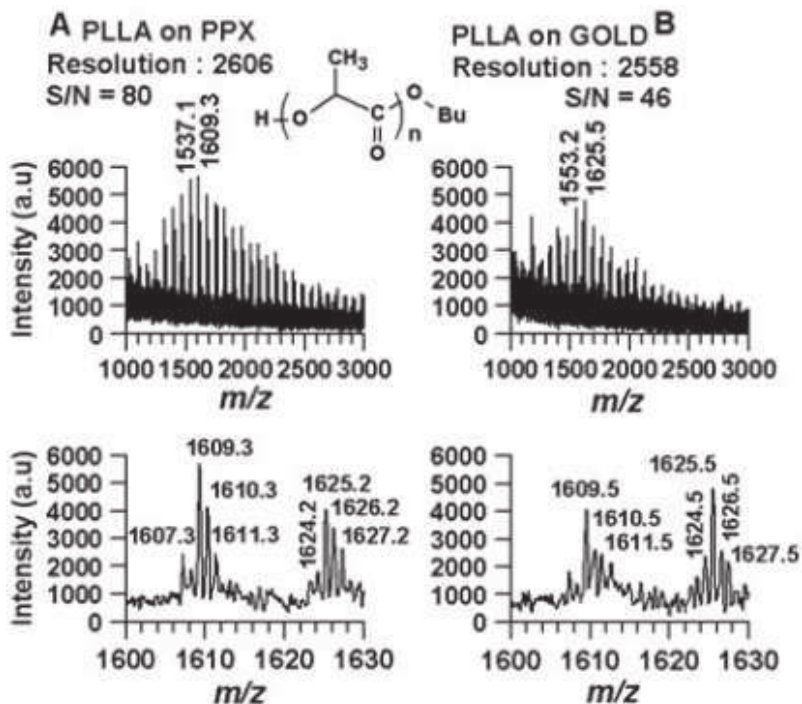
Rys. 4. Widma masowe PLLA wykonane techniką MALDI-TOF z udziałem matrycy HABA-DEA wykonane metodą DD (A), SF (B), oraz z typową matrycą HABA z dodatkiem czynnika kationizującego (NaI) wykonane metodą SF



Rys. 5. Czas kontaktu między cząsteczkami PLLA i matrycą DHB-DEA oznaczony za pomocą ¹³C CP/MAS NMR. Górne wykresy dotyczą metody DD i przedstawiają widma PLLA z udziałem matrycy DHB-DEA różniące się czasami kontaktów obu próbek: dla 1 ms oraz 7 ms. Pełną gwiazdką zaznaczony jest atom węgla PLLA, natomiast obwódką sygnał referencyjny DHB. Poniżej umieszczone są wykresy CP dla próbek mierzonych metoda DD (A) i SF (B)

dzie SF oddziaływania cząsteczek PLLA z matrycą jonową są słabsze, ze względu na separację domen PLLA w stanie stałym i matrycy w

postaci krystalicznej. Wzajemne oddziaływania i kontakt międzyfazowy domen PLLA z matrycami jonowymi został udowodniony za

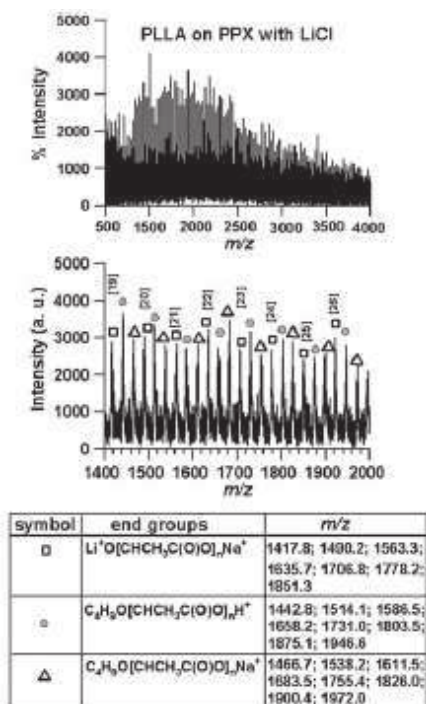


Rys. 6. Widma masowe PLLA przeprowadzone techniką LDI-TOF z zastosowaniem metody DD wykonane na płytce pokrytej PPX (A) oraz warstwą złota (B)

pomocą badań ^{13}C CP/MAS NMR (*cross polarization magic angle spinning nuclear magnetic resonance*). Wyniki pomiarów dla PLLA z matrycą DHB-DEA przedstawione są na Rys. 5.

2) Analiza poli(L-laktydu) (PLLA) metodą LDI z zastosowaniem powłoki z parylenu-N (PPX) ^[2]

Ponieważ właściwości matrycy mogą wpływać na wielkość otrzymanej średniej masy molowej analizowanej próbki w pomiarach MALDI-TOF, dlatego też przeprowadzone zostały oznaczenia PLLA za pomocą metody ELDI-TOF (*enhanced laser desorption/ionization time-of-flight*) wzmacniającej desorpcję próbki w wyniku zastosowania specyficznego podłoża. Pomiarzy zostały przeprowadzone bez udziału matrycy, na płytce stalowej pokrytej powłoką PPX oraz porównawczo na typowej płytce stalowej pokrytej warstwą złota. Widma masowe PLLA dla obu pomiarów przedstawione są na Rys. 6.



Rys. 7. Widmo masowe PLLA otrzymane techniką LDI-TOF metodą DD z dodatkiem soli LiI, wykonane na płytce pokrytej warstwą parylenu

Najwyższe sygnały odczytane z widm masowych PLLA przypisane są wartości $m/z = 1609,3$ odpowiadającej długości łańcucha polimeru złożonego z 21 merów $[\text{C}(\text{O})\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}-]$, z charakterystycznymi grupami końcowymi $\text{C}_4\text{H}_9\text{O}$ i Na^+ . Sygnał przy $m/z = 1625,2$ przypisany jest polimerowi złożonemu z 22 merów, zakończonemu grupą hydroksylową z przyłączonym jonem Na^+ . Masa molowa PLLA oszacowana na obu rodzajach płytek jest podobna i wynosi $M_n = 1977$, lecz wartość S/N wyznaczona na PPX jest dwukrotnie większa niż na płytce typowej pokrytej warstwą złota ($S/N_{\text{PPX}} = 80$, $S/N_{\text{GOLD}} = 46$). Z przedstawionego na rysunku 7 widma masowego PLLA (z dodatkiem LiI) wykonanego na PPX wynika, że możliwe jest przeprowadzenie pełnej charakterystyki grup końcowych polimeru na płytkach pokrytych warstwą parylenu.

2. WNIOSKI

Widma masowe poli(L-laktydu) otrzymane techniką MALDI-TOF z udziałem matryc jonowych będących solami amoniowymi, pokazują silny wpływ zastosowanej matrycy na uzyskaną wartość ciężaru cząsteczkowego polimeru. Wyniki pomiarów przeprowadzonych metodą DD i SF znacznie się różniły, dlatego wprowadziliśmy innowacyjny sposób oznaczania masy molowej PLLA, eliminując obecność matrycy. Po raz pierwszy w badaniach spektrometrii mas zastosowano powłokę z parylenu-N pokrywając nią typową płytkę używaną w badaniach spektrometrii mas. Pod względem praktycznym, silnie hydrofobowa warstwa PPX umożliwiła koncentrację kropli próbki w skutek zmniejszenia jej rozmiaru. Ponadto, pokrycie metalowej płytki warstwą PPX zapobiega jej trwałemu zanieczyszczeniu, umożliwiając stosowanie silnych kwasów, zasad i rozpuszczalników organicznych.

Udział w konferencji możliwy był dzięki środkom uzyskanym z NCN, numer grantu: N N 209 762440

Literatura

- [1] Miksa B., Sochacki M., Libiszowski J., Duda A., Ciesielski W., Potrzebowski M. J. „*Application of ionic liquid matrices in spectral analysis of poly(lactide) – solid state NMR spectroscopy versus matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry*” *Analytical Methods*, 2012, 4, 377-383.
- [2] Miksa B., Sochacki M., Sroka-Bartnicka A., Uznanski P., Nosal A., Potrzebowski M. J. „*Application of parylene for surface (polymer) enhanced laser desorption/ionization of synthetic polymers*” *Rapid Communication of Mass Spectrometry*, 2013, 27, 767-772.