



KATIONIZÁCIÓ VIZSGÁLATA MALDI KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT

Investigation of cationization under MALDI conditions

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Szilágyi László

Témavezető:

Dr. Zsuga Miklós

Debreceni Egyetem,
Alkalmazott Kémiai Tanszék
Debrecen, 2004.

Bevezetés

A tömegspektrometriás módszereket 100 éve széles körben használják. Segítségével jelentős, eddig szinte elképzelhetetlennek tartott tudományos felfedezésekre kerülhetett sor. Ezek közé az eredmények közé tartoznak például a következők: izotópok felfedezése, atomtömegek pontos meghatározása, új elemek felfedezése, kvantitatív gáz analízis, nyomokban jelenlévő szennyezők, illetve gyógyhatású készítmények gyors kimutatása, a kémiai szerkezet gyors és pontos meghatározása.

A tömegspektrometria területén e közel száz év alatt olyan nagymértékű fejlődés zajlott le, hogy a módszer ma már az egyik leghatékonyabb technikának számít az anyagok összetételének és szerkezetének meghatározásában.

Napjainkban is egyre intenzívebb kutatások folynak minél kisebb, kompaktabb tömegspektrométerek kifejlesztése érdekében. Legalább ekkora erőfeszítéseket tesznek, hogy a számos ionizációs technika mellé újabb ionizációs módszereket sorakoztathassanak fel. A közel egy évtizede kifejlesztett MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) és ESI (ElectroSpray Ionization) ionizációs technika segítségével lehetőség nyílt nagy molekulatömegű, nem illékony biopolimerek, valamint szintetikus rendszerek szerkezetének komplex tanulmányozására.

A Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémiai Tanszékén 2000-ben egy, a Bruker cég által gyártott igen korszerű MALDI-TOF tömegspektrométer került beüzemelésre, amely kiszélesítette a tanszéken folyó kutatások spektrumát. A kutatások intenzitását fokozta, hogy a 2002-es évben egy szintén Bruker gyártmányú ESI-TOF MS került installálásra. Azóta számos, elsősorban polimer rendszereket érintő kémiai problémát, valamint eddig tisztázatlan reakciómechanizmust derítettek fel.

Ez adta a lehetőséget, hogy különböző kémiai rendszereket vizsgálhassunk meg MALDI-TOF MS és a „post-source decay” (PSD) MALDI-TOF MS/MS módszerek alkalmazásával. Az így kapott információk felhasználásával képet kaphatunk a MALDI körülmények között lejátszódó kationizáció folyamatáról, valamint annak mechanizmusáról.

A kationizáció vizsgálatának analitikai szempontból kitüntetett jelentősége van, hiszen MALDI MS műszerrel csak akkor kapunk értékelhető spektrumot, ha a vizsgálandó anyag valamelyik kationnal addukt ion ($[M+Cat]^+$) alakít ki. Ez a kation a leggyakoribb esetben proton (H^+), vagy alkálifém ion, pl. nátriumion vagy káliumion. A MALDI spektrum minőségére nagy hatással van a képződött addukt ion stabilitása (kation + minta kölcsönhatása), valamint az ion fragmentációja is, amely folyamatot az addukt ion kialakításában részt vevő kation minősége befolyásol.

Értekezésemben a MALDI-TOF MS és a PSD MALDI-TOF MS/MS módszerek alkalmazását mutatom be különböző kémiai rendszereken és az e módszerek által nyert információk felhasználását a vizsgált rendszer kémiai szerkezetére, a lejátszódó fragmentációs reakció mechanizmusára és termodinamikájára vonatkozóan. Az értekezés három fő részre tagolható. Az első rész az ezüstionokkal kationizált polisztirol vizsgálata során tapasztalt megfigyeléseket tartalmazza. Ennek kapcsán megmutatjuk a különböző poláris szerves mátrixok jelenlétében képződött ezüst-klaszter ionokat. Ezen tapasztalatok segítségével lehetőségünk van a vizsgálat paramétereit vagy az ezüst-klaszterionok képződésére, vagy az apoláris polimerek tanulmányozására optimalni. A második részben kis molekulatömegű vegyületek fragmentációjának vizsgálatát mutatjuk be. A kísérleti eredmények lehetőséget nyújtanak a protonnal, vagy nátriumionnal képzett addukt ionok kationizációs mechanizmusának megadására. Az utolsó rész a különböző alkálifém ionok különböző polimerizációfokú poli(etilén-glikol) polimerek kationizációjára gyakorolt hatásával foglalkozik. Eredményeink felhasználásával lehetőségünk van egy új szelektivitási tényező definiálására, amely segítségével megbízhatóbb információk nyerhetők a szelektivitásról.

I. A vizsgálatokhoz felhasznált anyagok, alkalmazott készülékek és mintakészítés

I.1. Felhasznált anyagok

A vizsgálatokhoz felhasznált kis molekulatömegű referencia anyagot kísérleteink során a lágyítók képviselték, ezek között volt számos igen elterjedt adipát

és ftalát-észter típusú lágyító, pl.: di-oktil-adipát, vagy di-izononil-ftalát. A kutatásaink során különböző molekulatömegű poláris és apoláris polimereken [poli(etilén-glikol) és polisztirol] is végrehajtottunk tömegspektrometriás vizsgálatokat.

A MALDI-TOF MS és PSD MALDI-TOF MS/MS kísérletek kivitelezéséhez több mint tíz különféle mátrix anyagot használtunk fel, számos közülük rutinszerűen alkalmazott, mint például az 1,8,9-trihidroxi-antracén (ditranol, DIT), vagy a 2,5-dihidroxi-benzoészav (2,5-DHB). Ionizáló ágensként az alkálifémek kloridionnal képzett sóit, valamint ezüst-trifluor-acetátot választottunk.

I.2. Alkalmazott műszeres módszerek és szoftverek

A MALDI MS és PSD MALDI MS/MS méréseket Bruker gyártmányú BIFLEX IIITM típusú, repülési idő (TOF) tömeganalizátorral felszerelt, valamint reflektronnal ellátott tömegspektrométeren végeztük. A kapott spektrumokat a Bruker által szállított XMASS 5.0 elnevezésű szoftver segítségével értékeltük ki. A PSD spektrumokat Adrenokortikotróp hormon (ACTH) segítségével kalibráltuk. Az infravörös mérésekhez Perkin Elmer gyártmányú Paragon 1000 PC típusú Fourier-transzformációs infravörös spektrométert alkalmaztunk. A gázkromatográfiás méréseket HP 5890 II készüléken végeztük.

A különböző eloszlások paramétereinek illesztésére a FITTER 5v elnevezésű program Gauss-Newton-Marquard eljárását használtuk fel.

I.3. Mintakészítés

A mintakészítés minden esetben úgy történt, hogy a mátrix anyagot, a vizsgálandó anyagot és szükség esetén az ionizáló ágenszt külön-külön feloldottuk, majd az oldatok meghatározott mennyiségeit összekevertük. Ebből az elegyből juttattunk a mintatartóra adott mennyiséget, mely atmoszférikus nyomáson történt szárítás után került a készülékbe.

II. Új tudományos eredmények

II.1. Ezüst-klaszter ionok képződése MALDI körülmények között

Különböző poláris szerves mátrixok jelenlétében vizsgáltuk az AgTFA-ból képződött ezüst-klaszter ionok képződését MALDI körülmények között. Közel kétszáz tagból álló negatív és pozitív klaszterionokat sikerült előállítanunk.

Megállapítottuk, hogy a mátrix erősen befolyásolja a képződött klaszterionok mennyiségét. Ezért megvizsgáltuk számos különböző kémiai szerkezettel bíró mátrix hatását a klaszterképződésre. Intenzív klaszterion jeleket kaptunk karboxil-csoportot is tartalmazó mátrixok esetén, de ezek közül is a HABA [2-(4-hidroxifenilazo)benzoesav] felhasználásával képződött a legnagyobb mennyiségű klaszterion.

Az ionintenzitásokban páros-páratlan váltakozásokat figyeltünk meg, valamint a „jellium” elmélet alapján megjósolt mágikus számok is minden esetben jól elkülöníthetők voltak. A legnagyobb általunk megfigyelt mágikus szám az Ag_n^+ esetén 139, míg az Ag_n^- esetén 137 volt.

Ennek megfelelően a HABA és AgTFA keveréke bizonyult a legalkalmasabbnak a klaszterionok, illetve a klaszterion-molekula kölcsönhatások tanulmányozására, valamint nanoklaszterek előállítására. Ugyanakkor, ha a célunk az apoláris polimerek ezüstionok segítette analízise, különösen a HABA, de egyéb karboxil-csoportot is tartalmazó mátrixok alkalmazása kifejezetten előnytelen a nagy mennyiségben képződő ezüstklaszter zavaró hatása miatt. Kísérleti tapasztalatainkra alapozva azt állíthatjuk, hogy a gerjesztett mátrix molekulák legnagyobb valószínűséggel az addukt ionokon keresztül redukálják az ezüstionokat. Feltételezhetjük azt is, hogy a mátrix „vivőgáz”-ként viselkedhet a gőzfázis expanziójának első szakaszában, ezáltal elősegítheti a klaszterek növekedését.

PSD MALDI TOF MS/MS módszerrel vizsgáltuk a különböző klaszterionok fragmentációját, amely tökéletes egyezést mutat az egyéb módszerekkel végrehajtott fragmentációs vizsgálatok során kapott eredményekkel.

II.2. A kationizáció hatása a kis molekulatömegű vegyületek fragmentációjára

Megvizsgáltuk kis molekulatömegű vegyületek fragmentációs viselkedését is. Az alkalmazott kis molekulatömegű vegyületeknek a gyakorlati szempontból is fontos PVC lágyítókat választottuk. Különböző típusú PVC lágyítók kimutatását és szerkezetük meghatározását végeztük el MALDI-TOF MS és PSD MALDI-TOF MS/MS módszerek segítségével.

Azt tapasztaltuk, hogy mind a MALDI-TOF MS, mind a PSD MALDI-TOF MS/MS alkalmasak a viszonylag alacsony molekulatömeggel rendelkező lágyítók kimutatására.

Összehasonlítottuk a nátriumionnal és protonnal kationizált lágyítók különböző PSD MALDI-TOF MS/MS módszerrel felvett spektrumait. A kísérleti eredmények alapján javaslatot tettünk a protonnal és a nátriumionnal kationizált ftalát-észterek kationizációs mechanizmusára.

Kiderült továbbá, hogy a nátriummal kationizált addukt ionok a protonáltakhoz képest kevésbé fragmentálódnak, azaz a protonnal képzett addukt ionok fragmentációjának tanulmányozása szolgáltatja a legtöbb információt a kémiai szerkezetre nézve.

Módszert dolgoztunk ki továbbá, a lágyítók szerkezetének közvetlenül, előzetes extrakció nélkül, PVC mintákból történő meghatározására.

II.3. Kationizáció hatása a polimerek molekulatömeg-eloszlására

Azért, hogy megértsük az ionpárok ionizációs folyamatra gyakorolt hatását megvizsgáltuk számos alkálifém ion és ezek keverékének hatását különböző polimer rendszerekre. A kationizáció és a kationizáció szelektivitásának vizsgálatához tanulmányoztuk mind az öt alkálifém ion (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+) hatását a PEG4000 ($M = 4000 \text{ g/mol}$) és a PEG6000 ($M = 6000 \text{ g/mol}$) referencia polimer rendszer MALDI-TOF MS és PSD MALDI-TOF MS/MS spektrumaira.

A jelintenzitás hányados ($\Sigma I_{\text{Pn,Na}^+}/\Sigma I_{\text{Pn,C}^+}$) és a koncentráció arány ($[\text{Na}^+]_0/[\text{C}^+]_0$) között lineáris kapcsolatot találtunk.

Bevezettünk egy új szelektivitási paramétert, melyet α -val jelöltünk, és ami a különböző típusú alkálifém ionok nátriumionhoz viszonyított szelektivitását jellemzi. Az új szelektivitási paraméter előnye, hogy széles alkálifém ion koncentrációk esetében megbízhatóan jellemzi a fémion és a polimer molekula között fennálló kölcsönhatásokat.

Megállapítottuk továbbá, hogy a különböző típusú alkálifém ionokkal kationizált poli(etilén-glikolok) MALDI-TOF MS spektrumban jelentkező jelintenzitásának a PEG polimerizációfoktól való függése Poisson-típusú eloszlást mutat.

A vizsgálataink során meghatározott számátlag molekulatömeg értékek a kationizáló ágenstől függetlenül nem mutattak jelentős eltérést.