

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 541.64:543(544+51)

© 1991 г. Б. Г. Беленький, П. В. Бондаренко, Э. С. Ганкина,
Р. А. Зубарев, А. Н. Кныш, О. А. Кольцова

**ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ
С ИОНИЗАЦИЕЙ ОСКОЛКАМИ ДЕЛЕНИЯ КАЛИФОРНИЯ-252
В ИССЛЕДОВАНИИ ММР ОЛИГОСТИРОЛОВ**

Исследованы возможности времяпролетного масс-спектрометра с ионизацией осколками деления калифорния-252 для идентификации олигомеромолов ПС по масс-спектрам их положительных молекулярных ионов M^+ . Оптимальная методика подготовки пробы к масс-спектрометрии заключается в выпаривании ПС на подложку, приготовленную электрораспылением раствора нитроцеллюлозы. Чувствительность метода зависит от ММ олигомеромолов и массы пробы, однако она достаточна для исследования ТСХ-фракций, содержащих ПС с M до $2 \cdot 10^3$ без предварительного концентрирования. Методика позволяет идентифицировать извлеченные из ТСХ-пластиинки олигомеромолов и по разнице масс M^+ ионов соседних олигомеромолов определять массы мономерного звена и концевых групп. Эти результаты в сочетании с количественной ТСХ (а также хроматограммами, полученными другими хроматографическими методами) содержат всю необходимую информацию для определения ММР олигомеров, т. е. представляют абсолютный метод анализа ММР олигомеров.

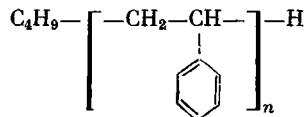
ТСХ является простым, надежным и вместе с тем достаточно эффективным методом исследования олигомеров с ММ порядка сотен – нескольких тысяч. Разработаны хроматографические методики, позволяющие получить при соответствующей калибровке ММР олигомеров [1, 2].

Поскольку ТСХ олигомеров представляет непрерывную последовательность пятен олигомеромолов, различающихся на одно мономерное звено, то, как показано в работах [3, 4], для определения ММР олигомеров помимо денситограммы необходимо определить числа полимеризации n нескольких олигомеромолов, образующих пятна на хроматограмме (например, идентифицировать димер и тример путем установления их ММ или химической структуры). Ранее использованный для этих целей [5] метод ЯМР требует для исследования значительных количеств вещества (~ 1 мг), что превышает возможности ТСХ-фракционирования.

Использование для идентификации олигомеромолов высокочувствительного метода масс-спектрометрии (МС) сдерживалось отсутствием приборов с пределом измерения масс до нескольких тысяч атомных единиц.

Разработанный недавно коммерческий времяпролетный масс-спектрометр МС ВХ с ионизацией осколками деления калифорния-252 (ПО «Электрон», Сумы) предназначена для исследования недетучих термически нестабильных молекул с M до $2 \cdot 10^4$ [6]. Цель настоящей работы – изучение возможности использования этого прибора совместно с ТСХ для исследования олигомеров, в частности, ПС с ММ порядка 500–2000. Отметим, что сочетание МС с другими источниками ионизации и ТСХ описано в литературе [7].

Объектами исследования служили ПС-стандарты фирмы «Polymer Laboratories» (Англия) со структурной формулой



и параметрами, приведенными в табл. 1. Если предположить, что концевая группа в ПС бутильная, то ММ олигомеромолов ПС таковы: 162,3 (1); 266,4 (2); 370,6 (3);

Таблица 1

**Паспортные характеристики использованных образцов ПС фирмы
«Polymer Laboratories» (Англия)**

Серия	M_n	M_w	M_p	M_w/M_n
20122-6	526	591	577	1,12
20123-4	887	1006	943	1,13
20124-3	1162	1256	1236	1,08

474,7 (4); 578,9 (5); 683,0 (6); 787,2 (7); 891,3 (8); 995,5 (9); 1099,6 (10); 1203,8 (11); 1307,9 (12); 1412,1 (13) и 1516,3 (14). В скобках указана степень полимеризации n .

В некоторых экспериментах исследовали также ПС с $M_p=480$ («Altex», США), использованный ранее в работе [5].

Принцип работы МС с ионизацией осколками деления калифорния-252 сводится к следующему (подробнее – в работе [6]). Осколки спонтанного радиоактивного деления ядра калифорния бомбардируют поверхность мишени, на которую нанесено исследуемое вещество в виде пятна площадью $\sim 1 \text{ см}^2$. Под воздействием этого облучения молекулы пробы ионизируются, причем, как правило, значительная часть молекул образует не осколочные, а молекулярные ионы. Ионы разных масс ускоряются до одинаковой энергии порядка 20–25 КэВ, после чего попадают в трубу дрейфа, где происходит их разделение по скоростям, а следовательно, по времени пролета. Спектр времен пролета ионов, регистрируемый быстрой электроникой, накапливается в компьютере и в дальнейшем пересчитывается в массовый спектр.

Мишень в приборе МС БХ представляет собой металлический диск диаметром 60 мм (алюминиевый или позолоченный), по окружности которого размещаются 10–12 проб диаметром 12 мм. Диск загружается в прибор посредством вакуумного шлюзового устройства и, таким образом, пробы, нанесенные на диск, находятся в одинаковых условиях, что позволяет производить относительные измерения.

Спектры снимали при ускоряющем напряжении +20 и +25 КВ. Типичный спектр содержал 500 000 зарегистрированных актов распада ядер калифорния («стартов»), что соответствует времени накопления ~ 35 мин.

Наиболее распространенными в МС с ионизацией осколками деления калифорния-252 являются три методики пробоподготовки: выпаривание пробы на подложку, электрораспыление из раствора в легколетучем органическом растворителе и осаждение на нитроцеллюлозную матрицу [8, 9].

При ТСХ-исследованиях применялись коммерческие пластины, полученные по технологии ИВС АН ССР и ИКБ «Пластмаш», содержащие слой тонкодисперсного узкофракционированного силикагеля КСК (средний размер частиц сорбента 7–10 мкм), нанесенный на лавсановую подложку и закрепленный силиказолем [10, 11].

В качестве элюента использовали смесь тетрахлорида углерода, гептана и МЭК в пропорции 10 : 9,5 : 0,1. Хроматограммы проявляли 0,1%-ным раствором бромтимолового синего, к которому добавлялось небольшое количество 0,1 н. раствора NaOH до получения синего цвета. После проявления хроматограммы высушивали при 80–120°.

Масса наносимого олигомера составляла 30 мкг. Одновременно хроматографировали несколько проб, причем одну хроматограмму проявляли, а остальные использовали для МС-анализа.

С целью определения оптимальной методики подготовки проб на МС исследовали четыре пробы, приготовленные из одного раствора в хлороформе и содержащие одинаковые количества (по 30 мкг) ПС-580, путем 1) выпаривания капли на золотой поверхности подложки; 2) электрораспыления на золотую поверхность подложки; 3) выпаривания на нитроцеллюлозной матрице; 4) электрораспыления на нитроцеллюлозную матрицу.

Таблица 2

**Зависимость интенсивности * МС пиков олигомергомологов ПС-580
от количества пробы**

Масса пробы, мкг	Значения интенсивности при n							
	3	4	5	6	7	8	9	10
5	500	430	380	240	140	120	60	–
10	560	600	640	480	420	320	140	50
25	510	650	750	770	680	580	350	110
50	380	620	740	920	870	800	470	210
100	380	450	720	860	820	760	600	230

* Интенсивность — число зарегистрированных ионов каждого олигомергомолога.

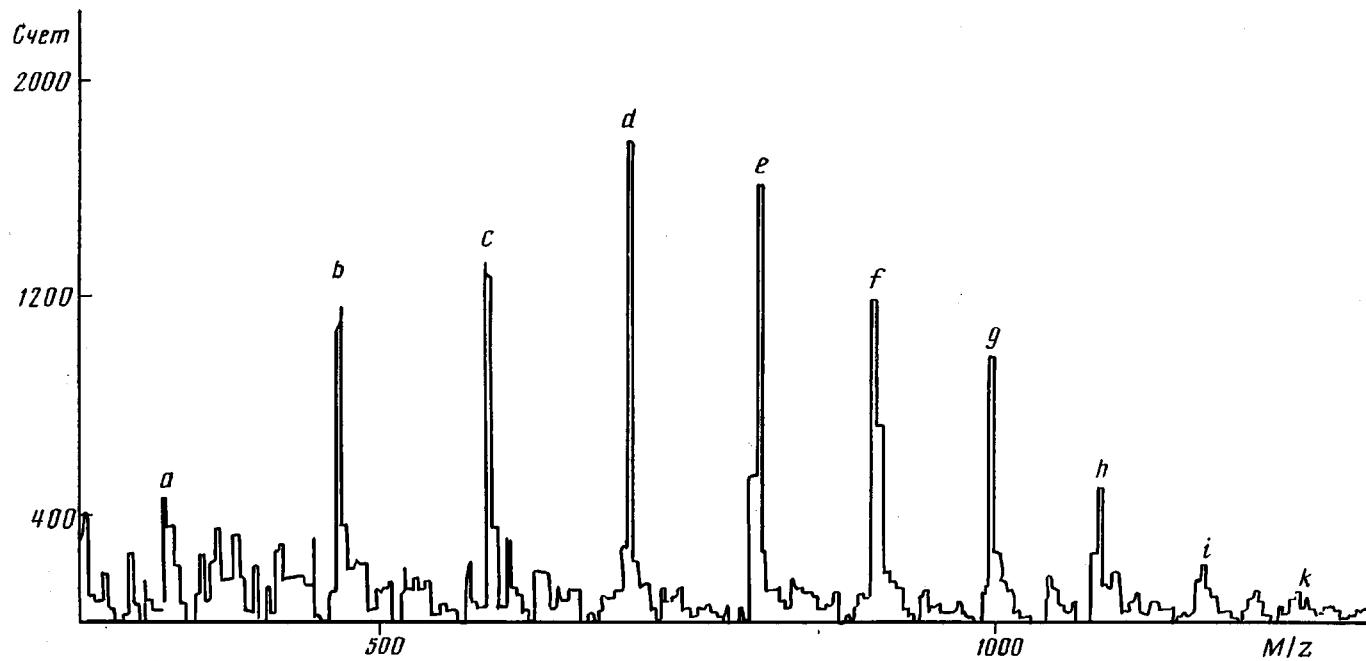


Рис. 1. Спектр положительных ионов ПС-580. $M/z=370,3$ (a); 474,5 (b); 578,8 (c); 683,5 (d); 787,7 (e); 892,3 (f); 996,3 (g); 110,4 (h); 1206,5 (i) и 1307,0 (k)

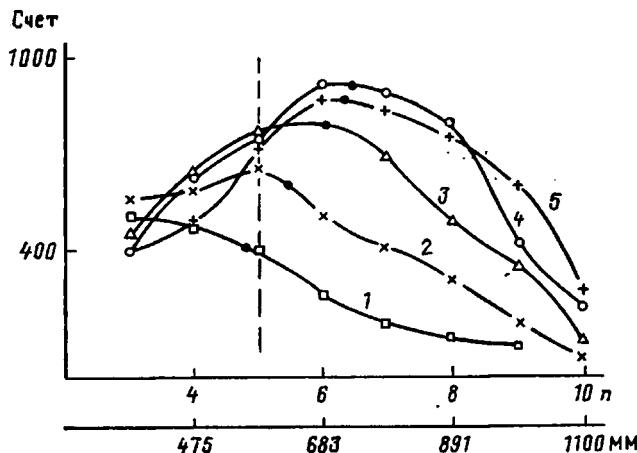


Рис. 2. ММР образца ПС-580 из масс-спектров образцов массой 5 (1); 10 (2); 25 (3); 50 (4); 100 мкг (5). Ускоряющее напряжение 25 кВ.
I – интенсивность пиков отдельных олигомеромологов

Результаты экспериментов показали, что оптимальным является метод 3 (выпаривание на нитроцеллюлозной матрице), который и использовали во всех видах дальнейших экспериментов. Спектр положительных ионов ПС (рис. 1) показал наличие пиков с массами, близкими к ММ, соответствующим олигомеромологам ПС-580. Полученные ионы отнесены к классу M^+ ионов. Спектр отрицательных ионов молекулярных ионов не содержал. Все представленные на рисунках масс-спектры олигостиролов получены при нанесении пробы по методу 3 и ускоряющем напряжении 20 и 25 кВ.

Поскольку масс-спектры ПС, полученные бомбардировкой осколками деления калифорния-252, содержат молекулярные ионы M^+ олигомеромологов, возможна их однозначная идентификация с помощью масс-спектрометрии.

Были проанализированы при одинаковых условиях пробы, содержащие 5, 10, 25, 50 и 100 мкг ПС-580. Как видно из табл. 2, чувствительность прибора к легким массам значительно выше чувствительности к тяжелым. Чувствительность к определенной массе с ростом количества вещества в пробе не достигает, как ожидалось, насыщения, а пройдя максимум, начинает уменьшаться не только относительно, но и абсолютно. Это наглядно видно на примере самого легкого пика с массой 370. Таким образом, при определенной массе K пробы максимум масс-спектра приходится на M .

Эту зависимость удалось выразить эмпирической формулой

$$M = A \sqrt{K} \text{ (мкг)}, \quad (1)$$

где A – эмпирический коэффициент, оцененный для ПС-580 и использованной методики пробоподготовки как 170 ± 20 .

По результатам экспериментов были построены ММР ПС-580 (рис. 2) на основе масс-спектров с разным количеством вещества в пробе (рис. 1). Центр тяжести ММР смещается в сторону больших масс при повышении количества вещества в пробе, причем уже при 10 мкг вычисленный центр тяжести превышает его истинное значение. Сопоставляя экспериментальные точки зависимости центра тяжести ММР от количества вещества в пробе с M_p , получим, что определенное с помощью МС БХ значение центра тяжести ММР должно совпадать с истинным при массе пробы 6–7 мкг.

Из сказанного следует, что непосредственное использование МС для определения ММР олигомеров неэффективно. Другое дело комбинация хроматографии, в том числе ТСХ с МС для идентификации и точного определения ММ олигомеромологов.

Изменение относительной интенсивности пиков различных олигомеромологов при изменении массы ПС в пробе объясняется, по-видимому, взаимным влиянием олигомеромологов разной массы в процессе ионизации. С целью выяснить, существует ли тот же эффект при МС пробы, содержащей только один олигомеромолог, был проведен следующий эксперимент. Выделили фракцию тетрамера ПС-480 из 300 мкг исходного полимера и исследовали зависимость интенсивности выхода молекулярных ионов этой фракции от ее массы. В диапазоне по крайней мере двух порядков изменения массы пробы зависимость имела линейный характер. Это позволяет сделать вывод о том, что при наличии калибровочной кривой параметры ММР могут быть определены по масс-спектру различных фракций ПС, разделенных методом ТСХ.

Методом ТСХ ПС-580 был разделен на фракции (хроматографические пятна), после чего пластину разрезали на полоски, содержащие одну фракцию. С помощью МС БХ исследовали наиболее низкомолекулярные фракции. Для этого вещества смыкали с полосок хроматограммы 20–30 микролитрами хлороформа прямо на нитроцеллюлозную матрицу.

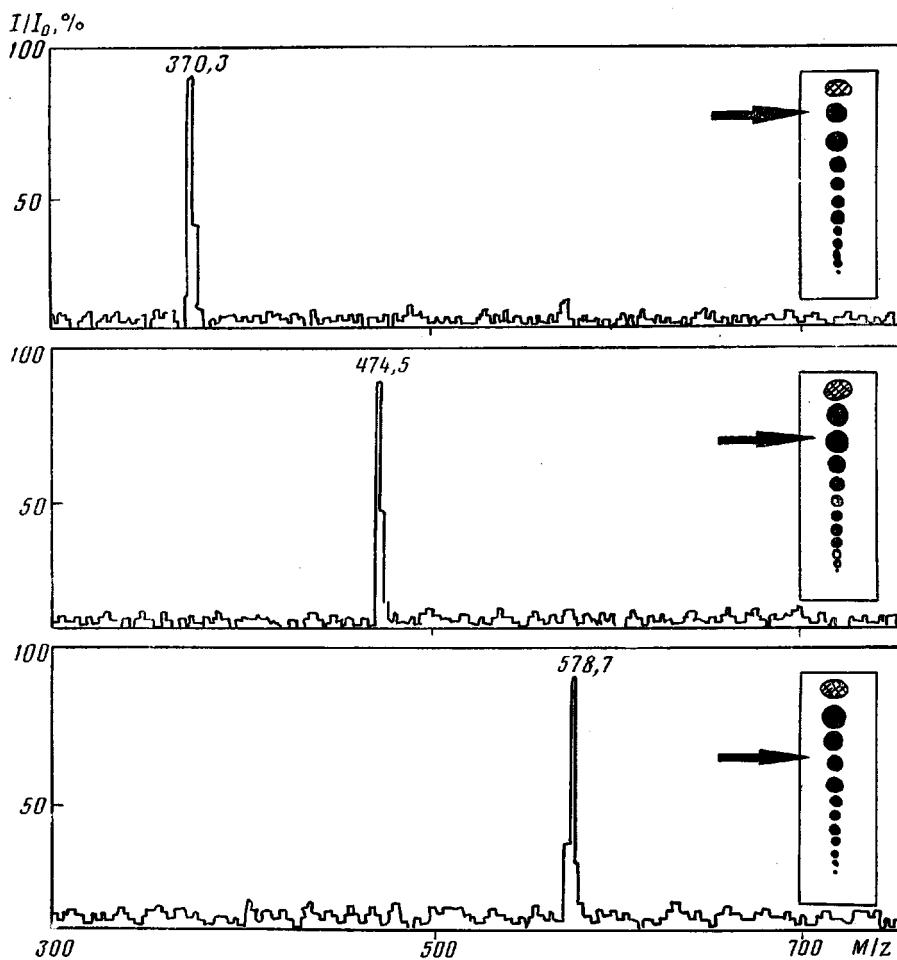


Рис. 3. Масс-спектры олигомергомологов, полученных из отдельных пятен ПС-580 на тонкослойной хроматограмме. Ускоряющее напряжение 25 кВ

Как следует из рис. 3, масс-спектры трех фракций позволяют однозначно идентифицировать наличие в них тримера, тетрамера и пентамера стирола. Самую легкую фракцию, соответствующую, по предположению, димеру, идентифицировать с ним не удалось. Следует отметить, что представленные спектры получены при хроматографии одной пробы ПС, содержащей 30 мкг вещества.

Аналогичный эксперимент был проведен для ПС-480 с теми же результатами. В работе [5] определили с помощью ЯМР структуру димера и тримера из ПС-480 как содержащую пентильную группу.

Масс-спектр 30 мкг ПС-480 (рис. 4) не подтверждает результат ЯМР-анализа димера и тримера стирола [5], но показывает ту же структуру, что и у ПС-580, т. е. устанавливает, что олигостиролы из ПС-480 содержат на конце не пентильную, а бутильную группу. Полученные МС данные ПС включают ММ четырех-пяти олигомергомологов с точностью до 0,3 а. е., т. е. они более информативны и надежны, чем данные ЯМР. Это обязывает пересмотреть ранее опубликованные данные по структуре ПС-480. Так, данные табл. 2 работы [5] для M_w , M_n и M_p ПС-480 нужно уменьшить на 14 а. е. массы, что, кстати, приближает их к данным производителя (опубликованы в той же таблице).

Таким образом, комбинация ТСХ и МС является удобным и эффективным методом анализа ММР олигомеров при отсутствии калиброванных (решерных) олигомергомологов. При этом МС БХ представляет удобный и эффективный прибор для МС. Идентификации олигомергомологов в ТСХ-фракциях, согласованный по чувствительности с ТСХ-анализом. Параллельное определение ММ и ММР методами МС и ВЭЖХ (ВЭТСХ), обеспечивающее разделение олигомеров на отдельные пики олигомергомологов, создает новые возможности анализа полимеров. Это, как показано выше, абсолютное (без калибровки) определение ММР олигомеров. Возможна также идентификация структурных аналогов олигомеров с равными n : линейных, разветвленных, циклических, если сопоставить их ММ (одинаковые у разветвленных и линейных и меньшие у циклических молекул) с объемами удерживания, пропорциональными в.

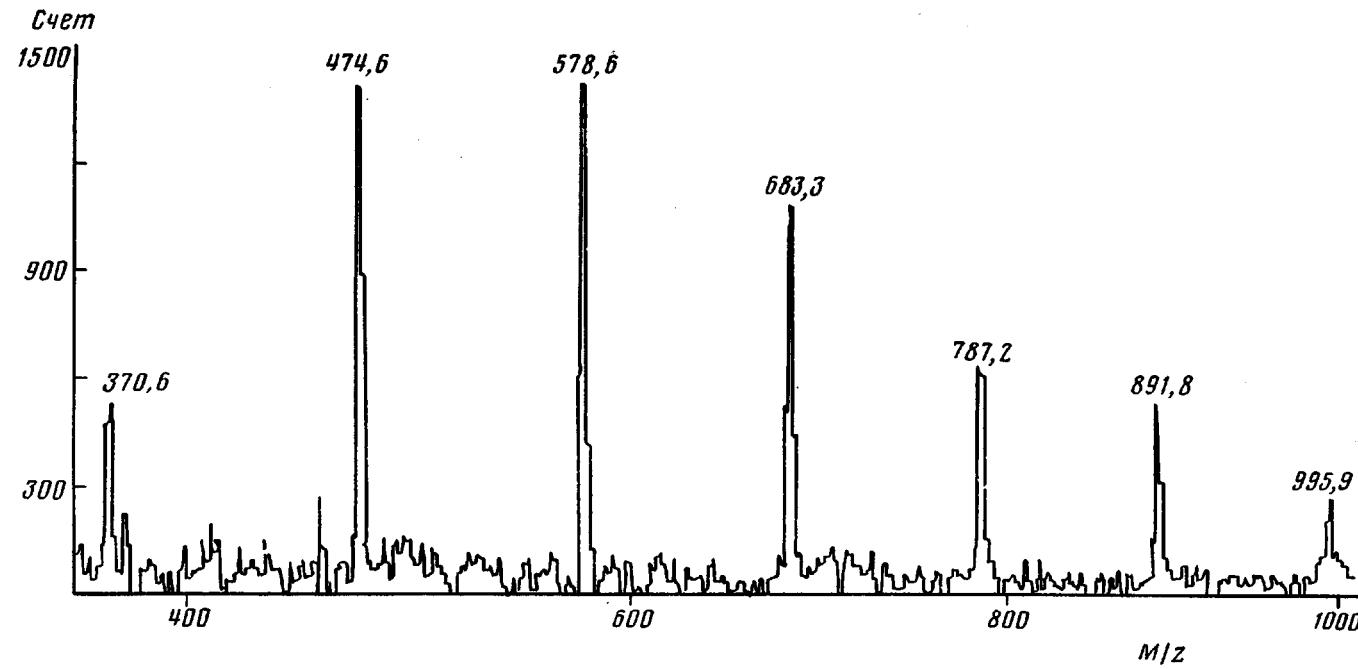


Рис. 4. Спектр положительных ионов ПС-480 при ускоряющем напряжении 20 кВ

эксклюзионной хроматографии молекулярным объемам. Последние имеют наибольшую величину у линейных олигомеров. И, наконец, комбинация МС и ТСХ безусловно окажется полезной при анализе сложных олигомерных смесей, включающих олигомеромологи различной ММ и функциональности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ганкина Э. С., Вальчихина М. Д., Беленький Б. Г. // Высокомолек. соед. А. 1976. Т. 18. № 5. С. 1170.
2. Mooley T. N., Smith G. A., Snyder L. // Analyt. Chem. 1984. V. 56. № 11. P. 1773.
3. Нефедов П. П., Куренбин О. И., Жмакина Т. Н., Лазарева М. А., Беленький Б. Г. // Высокомолек. соед. А. 1982. Т. 24. № 8. С. 1771.
4. Gankina E. S., Belen'kii B. G. // Handbook of Thin-layer Chromatography/Ed. by Sherma J., Fried B. N. Y., 1991. P. 807.
5. Gankina E., Kurenbin O., Kever J., Malakhova I., Belen'kii B., Lippmaa E., Pekh T. // J. Planar Chromatogr. 1990. V. 3. № 1. P. 68.
6. Knysh A. N., Savin O. R., Loschinin M. B., Kirianov G. Y., Bondarenko P. V., Zubarev P. H. 5th Intern. Conf. on Chemistry and Biotechnol. Active Natural Products. Sofia, 1989.
7. Busch Kenneth L. Handbook of Thin-layer Chromatography/Ed. by Sherma J., Fried B. N. Y., 1991. P. 183.
8. Jonsson G. P., Hedin A. B., Hakansson P. L., Sundqvist B. U. R., Save B. G. S., Nielson P. F., Roepstorff P., Johansson K. E., Kamensky I., Lindberd M. S. L. // Analyt. Chem. 1986. V. 58. № 6. P. 1084.
9. Roepstorff P. European Spectroscopy News. 1967. P. 73.
10. Материалы для хроматографии // ЖВХО им. Д. И. Менделеева. 1987. Т. 32. № 5. С. 599.
11. Беленький Б. Г., Ганкина Э. С., Литвинова Л. С., Ефимова И. И., Васильковский В. Е., Хотимченко С. В., Дикарев В. П. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 2. С. 244.

Институт аналитического приборостроения
АН СССР

Поступила в редакцию
09.01.94

Всесоюзный научно-исследовательский институт
технической физики и автоматизации

Институт высокомолекулярных соединений
АН СССР

Производственное объединение «Электрон»

B. G. Belen'kii, P. V. Bondarenko, E. S. Gankina,
R. A. Zubarev, A. N. Knysh, O. A. Kol'tsova

THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY AND MASS-SPECTROMETRY WITH IONIZATION BY THE DECAY PRODUCTS OF CALIFORNIUM-252 TO STUDY MMD OF OLIGOSTYRENES

Summary

Possibilities of the fly-time mass-spectrometer with ionization by the products of decay of californium-252 to identify the PS oligomer homologues from the mass spectra of their positive molecular M^+ ions have been studied. PS is evaporated onto a carrier prepared by the electrodispersion of the cellulose nitrate solution. Sensitivity of this method depends on MM of oligomers and on the probe mass, but it is sufficient to study the PS fractions having MM up to $2 \cdot 10^3$ without preliminary concentration. The proposed technique permits to identify oligomer homologues and from the difference of M^+ ions masses for adjacent homologues to find the masses of the repeating units and of the end groups. These results in the combination with quantitative thin-layer chromatography and other chromatographic methods permit to derive MMD of oligomers and proposed technique can be considered as an absolute method of analysis of MMD of oligomers.