

**UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IASI,
FACULTATEA DE INGINERIE CHIMICĂ ȘI PROTECȚIA MEDIULUI**



Sinteza de copolimeri model biodegradabili și caracterizarea acestora la nivel molecular prin spectrometrie de masă

Rezumatul tezei de doctorat

Doctorand: Cristian Peptu

Coordonator științific:

Acad. Bogdan C. Simionescu

2011

**UNIVERSITATEA TEHNICĂ „GHEORGHE ASACHI” din IAȘI
RECTORATUL**

Domnului/Doamnei

.....
Va facem cunoscut ca in ziua de 31.01.2011, la ora 12, in
Biblioteca Institutului de Chimie Macromoleculara "Petru Poni" din Iasi
....., va avea loc
sustinerea publica a tezei de doctorat intitulata:

**„SINTEZA DE COPOLIMERI MODEL BIODEGRADABILI SI CARACTERIZAREA ACESTORA
LA NIVEL MOLECULAR PRIN SPECTROMETRIE DE MASA”**

elaborată de domnul biong. **CRISTIAN PEPTU**, în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

1. Prof. dr. ing. **NICOLAE HURDUC** - presedinte
Universitatea Tehnica “Gheorghe Asachi” din Iasi
2. Acad. dr. ing. **BOGDAN C. SIMIONESCU** - conducator stiintific
Universitatea Tehnica “Gheorghe Asachi” din Iasi
3. Prof. dr. **MAREK KOWALCZUK** - membru
„Jan Dlugosz” University of Czestochowa, Polonia
4. Dr. C.St. I. **VALERIA HARABAGIU** - membru
Intitulul de Chimie Marcromoleculara „Petru Poni” din Iasi
5. Prof. dr. **PIOTR DOBRZYNSKI** - membru
Centre of Polymer and Carbon Materials, Polish Academy
of Sciences, Zabrze, Polonia

Vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica, în scris, aprecierile dumneavoastră.

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

RECTOR,
Prof. univ. dr. ing. ION GIURMA



Secretar universitate,
Ing. Cristina Nagiț

Lista de abrevieri

BL – β -butirolactona

CA – activare colizionala

CAD – disociere activată colizional

CID – disociere indusă colizional

CL – ϵ caprolactonă

CL-PDL – copolimeri (ϵ -caprolactona co ω -pentadecalactona)

CD – ciclodextrina

DAD – diode array detector (detector UV-VIS)

DC – oligocaprolactona functionalizata cu DR19

DDBL – copolimeri (acid 12OH-dodecanoic co β -butirolactona)

DR 1,19 – Disperse Red 1,19

DR1CL – oligocaprolactona functionalizata cu DR1

DR1LA – oligolactida functionalizata cu DR1

ESI – ionizare prin electrospray

ESI ID – ionizare prin electrospray cu injectie directa

GPEC – gradient polymer elution chromatography - cromatografia lichidă cu eluție în gradient a polimerilor

IT – capcana de ioni

LA – D,L lactida

LC – cromatografie lichidă

LCCC – liquid chromatography at the critical poin of adsorption - cromatografie lichidă la punctul critic de adsorbție

MALDI – matrix assisted laser desorption ionization – ionizare prin desorbție indusă de iradierea laser a unei matrici fotosensibile

MSⁿ – fragmentare multistagiu

MS/MS – spectrometrie de masa in tandem (MS²)

m/z – raportul masa/sarcina

PLA – polilactida

PCL – policaprolactona

PHB – polihidroxiubutirat

PHB-CD – ciclodextrine peresterificate cu oligoesteri PHB

PSD – post source decay – fragmentare post-sursa (MALDI)

Q – quadrupol

ROP – polimerizare prin deschidere de ciclu

RP HPLC – reversed phase high performance liquid chromatography - cromatografia lichidă de înaltă performanță cu faza inversă

RF – radiofrecvență

q – quadrupol controlat doar în modul RF – celulă de coliziune

Q-TOF – detector hibrid quadrupol - timp de zbor

TOF – tub timp de zbor

SEC – cromatografia de excluziune sterică

Cuprins

Introducere	1
Capitolul I. Date de literatura.....	4
I1. Spectrometria de masa. Notiuni generale.....	4
I.1.1. ESI – ionizarea prin electrospray.....	5
I.1.2. Ionizarea MALDI.....	8
I.1.3. Analizoare de masa.....	10
I.1.3.1. Analizorul de masa IT.....	11
I.1.3.2. Fragmentarea in IT (MSⁿ).....	13
I.1.3.3. Analizorul de masa tip timp de zbor ToF.....	13
I.1.3.4. Analizorul de masa Q/TOF.....	16
I.1.4. Parametri care afecteaza calitatea si acuratetea datelor obtinute prin spectrometria de masa MALDI si ESI.....	20
I.1.5. Caracterizarea polimerilor sintetici prin spectrometria de masa.....	23
I.1.5.1. Consideratii generale.....	23
I.1.5.2. Determinarea masei moleculare prin spectrometria de masa.....	26
I.1.5.2. Determinarea structurii si capetelor de lant.....	28
I.1.6. Cuplarea spectrometriei de masa cu tehnici de separare cromatografica.....	31
I.1.7. Concluzii.....	36
I.2. Sinteza poliesterilor alifatici – generalitati.....	37
I.2.1. Polimerizarea prin deschidere de ciclu (ROP) a esterilor ciclici.....	37
I.2.2. ROP prin mecanism cationic.....	38
I.2.3. ROP prin mecanism anionic.....	38
I.2.4. Cataliza ROP.....	39
I.2.4.1. Catalizatori organometalici.....	39
I.2.4.2. ROP in prezenta catalizatorilor nemetalici.....	40
I.2.5. Reactii secundare: transesterificarea intra- si intermoleculara.....	41
I.2.6. Poli(ε-caprolactona) PCL.....	42
I.2.7. Polilactida PLA.....	43

I.2.8. Polihidroxi-butiratii PHB.....	44
I.2.9. Concluzii.....	45
Capitolul II. Analiza structurala a homopoliesterilor la nivel molecular.....	46
II.1. Introducere.....	46
II.2. Materiale si metode.....	47
II.3. Cracterizarea PCL si PLA prin spectrometria de masa.....	48
II.3.1. Caracterizarea oligomerilor PCL.....	49
II.3.2. Caracterizarea oligomerilor PLA.....	53
II.4. Caracterizarea oligomerilor PHB.....	57
II.4.1. Caracterizarea PHB obtinuti prin ROP anionica in prezenta sarurilor de Na a acizilor carboxilici.....	58
II.4.2. Caracterizarea PHB obtinuti prin ROP anionica in prezenta sarurilor de Ca a acizilor carboxilici.....	61
II.4.3. Caracterizarea PHB rezultati din purificarea reziduurilor de distilare a β -BL.....	66
II.4.4. Studiul fragmentarii oligomerilor PHB.....	69
II.4.4.1. Caracterizarea PHB-A.....	69
II.4.4.2. Caracterizarea PHB-B.....	75
II.4.4.3. Caracterizarea PHB-C.....	78
II.5. Concluzii.....	82
Capitolul III. Sinteza si caracterizarea poliesterilor azofunctionali.....	83
III.1. Introducere.....	83
III.2. Materiale si metode.....	84
III.3. Sinteza si caracterizarea oligoesterilor cu functiuni azo capat de lant.....	87
III.3.1. Cinetica reactiei de deschidere de ciclu a CL in prezenta DR1.....	89
III.3.2. Caracterizarea structurala prin spectrometrie de masa a DR1LA si DR1CL.....	93
III.3.2.1. MALDI MS.....	93
III.3.2.2. ESI MS, SEC MS si MS/MS.....	96

III.3.3. Concluzii.....	104
III.4. Sinteza si caracterizarea oligoesterilor cu functiuni azo intercalate in catena de baza.....	106
III.4.1. Caracterizarea oligomerilor de caprolactona functionalizati cu DR19.....	107
III.4.2. Caracterizarea prin LC DAD MS.....	110
III.4.3.2. Caracterizarea prin LC MS/MS.....	112
III.4.3.3. Caracterizarea prin infuzie directa ESI MS/MS.....	117
III.4.4. Concluzii.....	120
Capitolul IV. Sinteza si caracterizarea derivatilor de ciclodextrina.....	122
IV.1. Introducere.....	122
IV.2. Caracterizarea ciclodextrinelor esterificate cu acid succinic prin MALDI MS.....	124
IV.3. Cracterizarea prin spectrometrie de masa a derivatilor de ciclodextrina obtinuti prin ROP a esterilor ciclici.....	126
IV.3.1. Materiale si metode.....	128
IV.3.2. Sinteza si caracterizarea conjugatelor PHB- β -CD - polimerizare in masa.....	130
IV.3.2.1. Caracterizarea fractiei F1 prin LC MS.....	132
IV.3.2.2. Caracterizarea fractiei F2 prin LC MS.....	134
IV.3.2.3. Caracterizarea fractiei F2 prin RMN.....	138
IV.3.3. Sinteza si caracterizarea PHB-CD in prezenta α - si γ -CD.....	141
IV.3.4. Sinteza conjugatelor de tip PHB- β -CD - polimerizare in solutie.....	144
IV.3.5. Caracterizarea derivatilor de CD prin tandem MS.....	148
IV.4. Concluzii.....	153
Capitolul V. Aplicatii ale ESI – MS cuplata cu tehnici de separare cromatografica in analiza copoliesterilor.....	155
V.1. Introducere.....	155
V.2. Materiale si metode.....	156

V.3. Analiza copolimerilor pe baza de β -butirolactona si acid 12-OH dodecanoic (DDBL).....	158
V.3.1. Caracterizarea copolimerilor DDBL prin LC MS.....	158
V.3.2. Caracterizarea copolimerilor DDBL prin SEC MS.....	163
V.3.3. Caracterizarea copolimerilor DDBL prin MS/MS.....	166
V.4. Analiza copolimerilor pe baza de ϵ -caprolactona si ω -pentadecalactona CL-PDL.....	172
V.4.1. Caracterizarea copolimerilor CL-PDL prin LC MS.....	173
V.4.2. Caracterizarea copolimerilor CL-PDL prin SEC MS.....	176
V.4.3. Caracterizarea copolimerilor CL-PDL prin MS/MS.....	179
V.4. Concluzii.....	183
Concluzii generale.....	185
Bibliografie.....	190

Introducere

Poliesterii alifatici preparati prin reactia de deschidere de ciclu a esterilor ciclici precum lactonele si lactidele sunt polimeri cu aplicatii variate datorita unor proprietati specifice cum ar fi biodegradabilitatea si biocompatibilitatea. Aceste atribute contribuie la utilizarea poliesterilor in domenii precum industria farmaceutica sau biomedicina ca materiale bioresorbabile pentru implanturi sau sisteme de transport (“*carrier*”) pentru eliberarea controlata a medicamentelor. In consecinta, optimizarea tehnicilor ROP a fost intens studiata in sensul obtinerii de polimeri cu arhitecturi controlate si bine definite. In ciuda dezvoltarii permanente a metodelor de sinteza, polimerii sintetici sunt caracterizati de o anumita eterogenitate structurala legata de aspecte topologice (catena lineara, ciclica sau ramificata), compozitie, grupari functionale, etc.

Astfel, analiza structurala a polimerilor la nivel molecular devine complexa necesitand tehnici analitice optimizate in acest sens. In ultimii ani, tehnici precum MALDI MS si ESI MS au capatat o importanta deosebita devenind metode analitice utilizate frecvent. Principalul avantaj oferit de spectrometria de masa este evidentierea individuala a macromoleculelor polimerice la concentratii extrem de mici ale probei analizate. Mai mult, moleculele de polimer pot fi observate in detaliu cu ajutorul tehnicilor de fragmentare in conditii energetice riguros controlate.

Tema abordata

Daca spectrometria de masa s-a impus ca o analiza standard in proteomica, in cazul caracterizarii polimerilor aceasta metoda este inca in faza de pionierat. Utilizarea MS in chimia polimerilor a capatat in general o aura exotica datorita pretului uneori prohibitiv al aparaturii dar si din cauza unor dificultati specifice analizei fiecarui sistem de polimeri in parte. In literatura de specialitate caracterizarea polimerilor este prezentata disparat, lucrarile stiintifice abordand fie subiecte specifice metodei, tratate cu o inalta rigurozitate, fie subiecte legate de utilizarea tehnicii doar ca simpla metoda de caracterizare, caz in care apar adesea inexactitati in interpretarea spectrelor. Furnizarea unor informatii riguroase care sa trateze caracterizarea polimerilor prin MS devine in consecinta imperios necesara. Desi nevoia de a impune anumite standarde a fost evidenta inca de la inceputurile utilizarii acestei tehnici analitice, caracterizarea fiecarui sistem de polimeri reprezinta un caz aparte prezentand elemente specifice proprii fapt care face dificila abordarea unitara. Astfel, apare necesitatea de a aborda fiecare sistem de polimeri in parte pentru a crea standarde analitice specifice.

Aceasta teza isi propune investigarea posibilitatilor de utilizare a spectrometriei de masa cu ionizare MALDI sau ESI in caracterizarea macromoleculelor poliesterice biodegradabile. Rezumatul de

fata contine cele mai importante rezultate originale din teza de doctorat prezentate intr-un mod succint. Sectiunile de cuprins si bibliografie precum si numerotarea figurilor si tabelelor respecta intocmai manuscrisul original al tezei.

Structura tezei de doctorat

In *primul capitol* sunt trecute in revista cateva notiuni de baza privind metoda de caracterizare prin spectrometrie de masa precum si informatii generale privind sinteza poliesterilor alifatici care vor face subiectul acestui studiu.

Partea de rezultate originale este structurata in patru capitole si trateaza sinteza de polimeri model dar si de noi compusi macromoleculari prin ROP a esterilor ciclici si caracterizarea acestora prin spectrometrie de masa si prin metode clasice precum RMN sau GPC.

In *capitolul II* sunt prezentate particularitati privind caracterizarea prin spectrometrie de masa a compusilor model sintetizati (policaprolactona, polilactida si polihidroxitirati) dupa care este abordat in detaliu modul de fragmentare a PHB cu diferite functiuni capat de lant in vederea stabilirii profilelor de fragmentare caracteristice.

Capitolul III trateaza sinteza de noi compusi de tip oligoester purtatori de grupari functionale cu proprietati specifice opticii nonlineare. Astfel, oligomerii pe baza de ϵ -caprolactona si D,L-lactida sunt preparati prin ROP initiata de gruparile hidroxilice ale DR1 si DR19. Structura produsilor este obtinuta in urma analizelor RMN si MS. Modul de fragmentare al compusilor prezinta un interes deosebit din punctul de vedere al studiului fenomenelor de activare colizionala care au loc in faza de gaz, permitand identificarea structurilor oligomerice ramificate.

Sinteza compusilor conjugatelor pe baza de ciclodextrina si oligo-hidroxitirati este tratata pe parcursul *capitolului IV*. Studiul efectuat propune noi strategii de sinteza a ciclodextrinelor purtatoare de lanturi oligoesterice abordand intr-un mod riguros posibilitatile de caracterizare a acestor compusi. Spectrometria de masa impreuna cu spectroscopia RMN ofera o imagine clara asupra fenomenelor care au loc in etapa de sinteza.

Ultimul capitol este axat pe diverse modalitati de caracterizare a doua tipuri de copoliesteri model sintetizati prin reactii de transesterificare si deschidere a esterilor ciclici in conditiile catalizei enzimatice. Sunt analizate posibilitatile de cuplare separarii cromatografice de tip SEC sau HPLC cu diverse metode de detectie prin spectrometrie de masa. Studiile efectuate sunt completate de experimente de fragmentare care sa evidentieze structura copolimerilor sintetizati la nivel molecular. Scopul acestor experimente este de a furniza o imagine generala asupra modalitatilor diverse de caracterizare a compusilor de acest tip prin spectrometrie de masa si de evidentia natura si utilitatea informatiilor furnizate prin aceasta metoda.

Capitolul II. Analiza structurală a homopoliesterilor la nivel molecular

II.4.3. Caracterizarea PHB rezultati din purificarea reziduurilor de distilare a β -BL – PHB-3

Polimerizarea prin deschidere de ciclu a esterilor ciclici este un procedeu de sinteza a poliesterilor utilizat atunci cand se doreste un control strict asupra masei moleculare si indicelui de polidispersitate a polimerilor rezultati. Dezavantajele acestei metode constau in procedurile migaloase de purificare a reactantilor. In ceea ce priveste monomerul utilizat in obtinerea PHB prin ROP, β -butirolactona (BL) este necesara uscarea si distilarea. In mod practic procedura de uscare consta in adaugarea unui agent de uscare in masa monomerului, cel mai adesea fiind utilizata hidrura de Ca, CaH_2 . In continuare, monomerul este colectat prin distilare la 30 – 35 °C, la vid inalt (~ 2 Torr). Reziduu ramas in urma distilarii contine o cantitate importanta din monomerul initial, aproximativ 15 – 25%, sub forma de monomer sau polimer, precum si CaH_2 nereactionata, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, apa si alte reziduuri (de cele mai multe ori se utilizeaza CaH_2 de puritate 60%). In **figura II.20.** este reprezentata schematic reactia prin care are loc formarea PHB in conditiile mai sus mentionate.

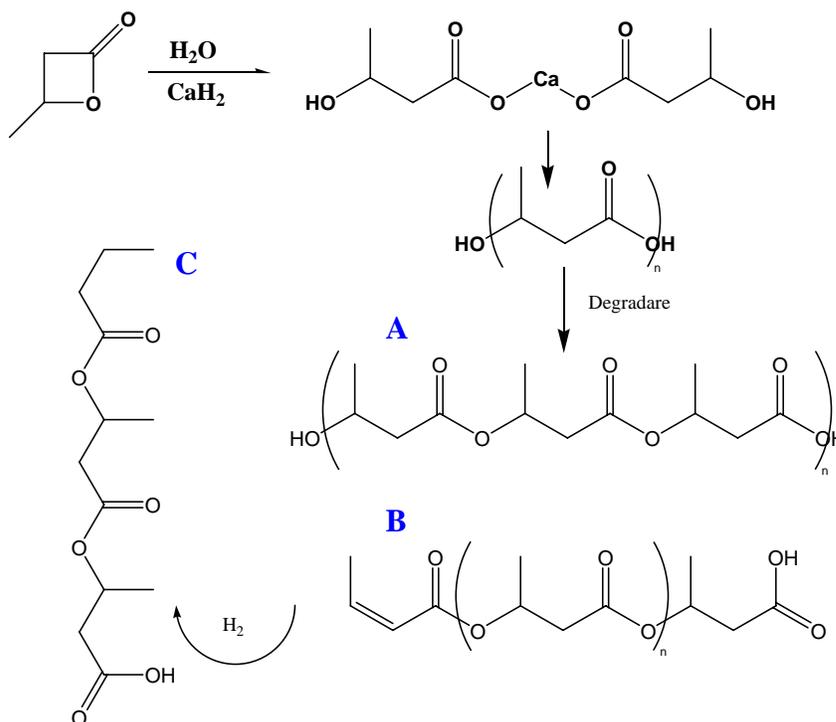


Figura II.20. Formarea oligomerilor de PHB in prezenta CaH_2

ROP in prezenta CaH_2 conduce la formarea de oligomeri PHB avand drept capete de lant acidul 3-OH buriric si grupari carboxilice (PHB-A) si/sau acidul crotonic si grupari COOH (PHB-B).

Totodata, datorita prezentei H_2 eliminat de CaH_2 in reactia cu apa, se pot forma si lanturi de PHB avand drept capat de lant acidul butiric si grupari COOH (PHB-C).

Analiza ESI TOF MS evidentiaza trei tipuri de oligomeri PHB:

- A – PHB cu grupari acid 3-OH butiric si COOH capat de lant
- B - PHB cu grupari acid crotonic si COOH capat de lant
- C - PHB cu grupari acid butiric si COOH capat de lant

II.4.4. Studiul fragmentarii oligomerilor PHB

II.4.4.1. Caracterizarea PHB-A

Ionul parinte selectat pentru studiul de fragmentare este un nonamer sodiat de PHB-A cu masa de 815 Th ($m/z = 9 \cdot 86 + 18 + 23$). In **figura II.23.(a)** se pot observa doua serii de ioni fiica a caror mase pot fi descrise cu ajutorul ecuatiilor urmatoare:

- $m/z = 104 + n \cdot 86 + 23$
- $m/z = 86 + n \cdot 86 + 23$

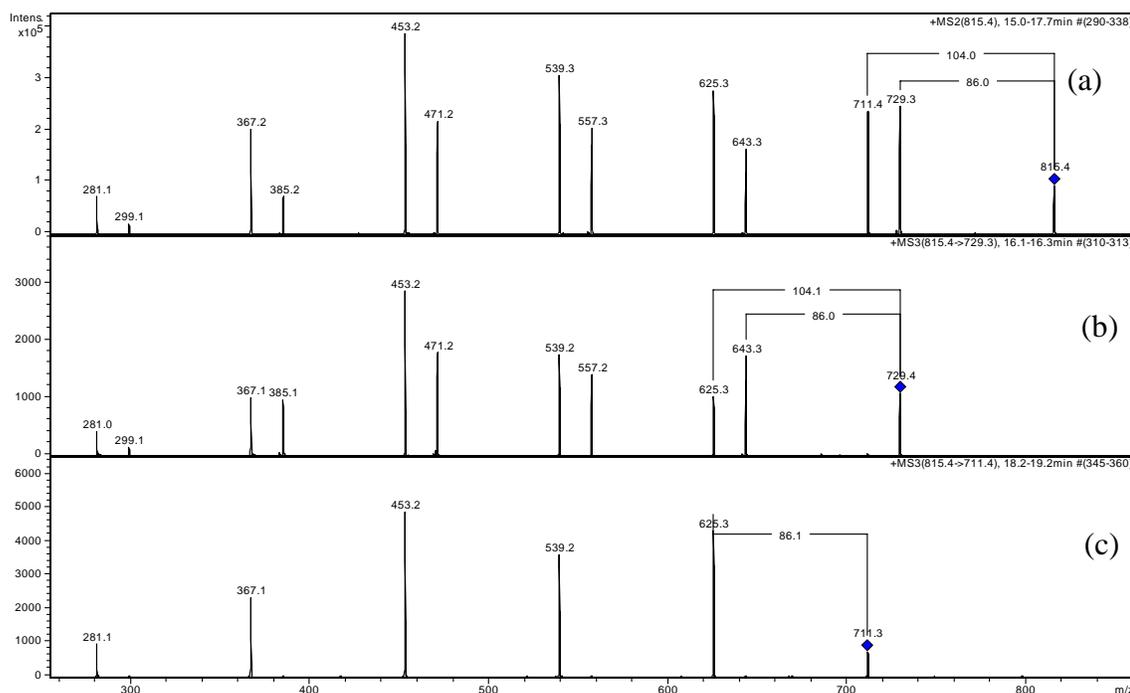


Figura II.23. Spectrele ESI MSⁿ ale $[PHB-A_9+Na]^+$: (a) ESI MS²; (b), (c) ESI MS³

Primii membri ai seriilor de ioni fiica sunt produsii prin pierderea neutra a acidului 3-OH butiric (104 Da) sau a acidului crotonic (86 Da) (**figura II.24**). Urmatorii membri care se succed la intervale regulate de 86 Da sunt produsii printr-un proces similar care are loc la nivelul altor legaturi intre unitatile monomere.

Cele doua cai de fragmentare evidentiate in **figura II.24.** au loc pornind de la cele doua capete ale oligomerilor PHB-A si sunt complementare. Structura ionilor produși in urma fragmentării a fost verificata prin ESI-MS³ (**figura II.23.(b),(c)**). Astfel, ionii rezultati in urma pierderii acidului 3-OH butiric (104 Da), avand drept capat acidul crotonic, pierd prin fragmentare doar resturi crotonate, cu masa de 86 Da. Pe de alta parte, ionii care in MS² pierd acidul crotonic, manifesta in MS³ acelasi profil de fragmentare ca si in MS², pierderea fie a acidului crotonic (86 Da) fie a acidului 3-OH butiric (104 Da). Profilul de fragmentare observat in urma experimentelor de tip MS² si MS³ confirma structura oligomerilor de PHB-A propusa in urma experimentelor de tip MS.

Experimentele de tip MS² si MS³ au confirmat si in cazul utilizării cationilor de Li⁺ (7 Da) in locul cationilor de Na⁺ (23 Da) structura oligomerilor PHB-A. Masa ionilor aduct ai [PHB-A+Li]⁺ poate fi calculata cu ajutorul ecuatiei $m/z = 104 + n \cdot 86 + 7$.

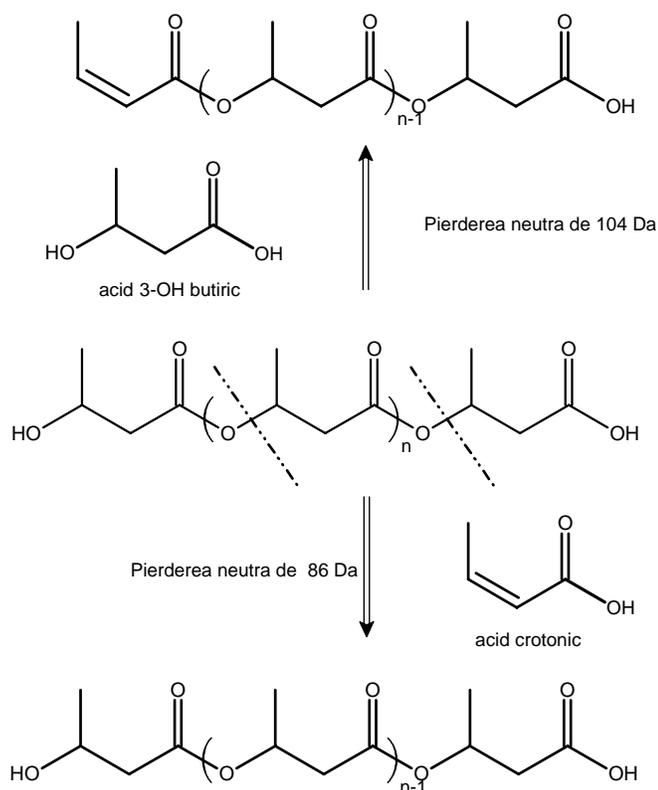


Figura II.24. Reprezentarea cailor de fragmentare a PHB-A

In general fragmentarea speciilor ionice ale aceleiasi substante cu cationi diferiti prezinta elemente specifice cationului utilizat. In cazul utilizării cationilor de Li⁺ in locul celor de Na⁺, oligomerii de PHB-A nu prezinta modificari majore ale profilului de fragmentare. Singura diferenta este cauzata de micșorarea masei ionilor observati cu o diferenta de 16 Da corespunzatoare diferentiei dintre masa Na⁺ si cea a Li⁺.

Utilizarea cationilor de amoniu, NH_4^+ conduce în schimb la observarea unui profil de fragmentare specific. Ionul parinte supus fragmentării, 810 Th, reprezintă un aduct al nonamerului PHB-A cu amoniu ($m/z = 9 \cdot 86 + 18 + 18$). Din analiza spectrului MS^2 se poate observa pierderea amoniacului (-17 Da) și formarea $[\text{PHB-A}_9+\text{H}]^+$ la 793 Th. Acest fenomen este specific ionilor aduct de amoniu, aceștia fiind adesea utilizați în experimentele de spectrometrie de masă în scopul producerii speciilor protonate. Ioni rezultati în urma pierderii amoniacului suferă la rândul lor fragmentări consecutive fie prin pierderea a una sau două molecule de apă, fie prin ruperea legăturilor între unitățile monomere.

Modul de fragmentare observat în cazul ionizării cu NH_4^+ și H^+ este diferit față de cel observat pentru speciile aduct de Na și Li. Diferențele constau în apariția fragmentelor rezultate din pierderile consecutive de H_2O (-18 și -36 Da). Mecanismul de fragmentare este reprezentat în **figura II.29**. Pierderea unei singure molecule de apă poate fi pusă pe seama grupărilor capăt de lanț, fie cea carboxilică fie cea hidroxilică aparținând acidului 3-OH butiric. Pierderile de -36 Da pot fi puse pe seama eliminării simultane a două molecule de apă. Totuși, dacă este acceptat faptul că procesul de fragmentare este indus de către sarcina atunci, din punct de vedere steric, pierderea de -36 Da este imposibilă. Probabil că cea de a doua serie de ioni rezultată din pierderea a două molecule de apă are la origine un proces de fragmentare consecutivă în care are loc într-o primă fază pierderea unei singure molecule de apă, după care ionii fragment rezultati suferă la rândul lor pierderea unei a doua molecule de apă.

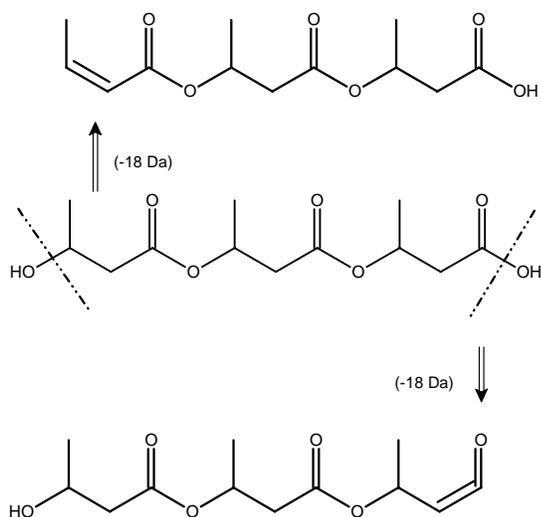


Figura II.29. Pierderea moleculelor de apă în fragmentarea speciilor protonate de PHB-A

II.4.4.2. Caracterizarea PHB-B

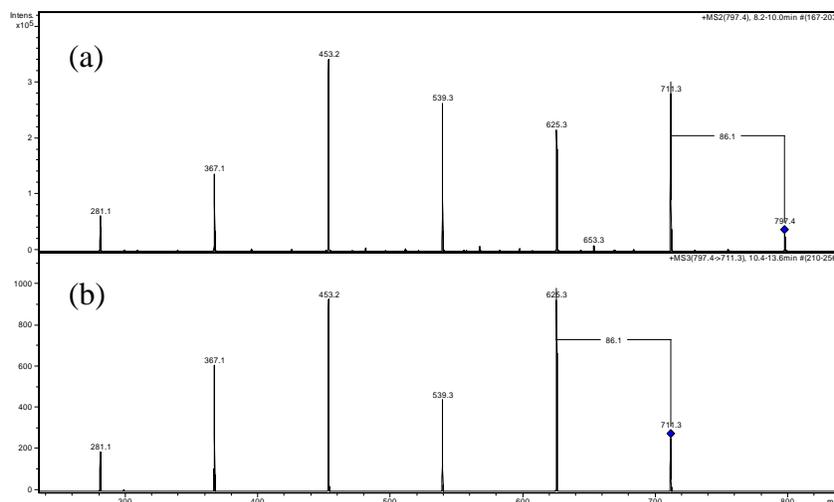


Figura II.30. Spectrele ESI MSⁿ ale [PHB-B₉+Na]⁺: (a) ESI MS²; (b) ESI MS³

Studiul fragmentării oligomerilor de **PHB-B** a fost efectuat asupra nonamerului aduct cu Na⁺ având raportul caracteristic $m/z = 9 \cdot 86 + 23$ (797). Spectrul MS² prezentat în **figura II.30.(a)** conține o singură serie de ioni fragment cu o succesiune de 86 Da. Pierderea de 86 Da corespunde fragmentării PHB-B pornind de la ambele capete ale moleculei. Dacă în cazul PHB-A masa funcțiunilor capăt era diferită (86/104 Da) în cazul PHB-B masa capetelor este aceeași și anume 86 Da. Astfel, nu se poate observa o diferență între cele două cai de fragmentare, cele două serii de fragmente suprapunându-se. Experimentul MS³ (**figura II.30.(b)**) prezintă la fel, o singură serie de picuri corespunzătoare celor două mecanisme de fragmentare.

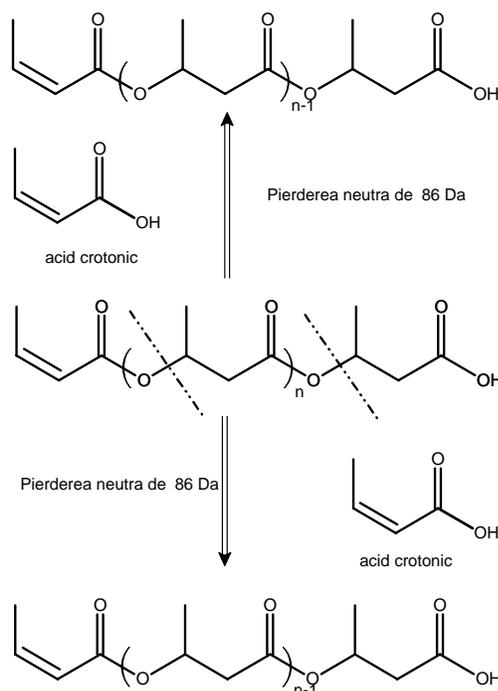


Figura II.31. Reprezentarea mecanismului de fragmentare a [PHB-B+Na]⁺

Acest comportament a fost observat și în cazul fragmentării ionilor aduct cu Li^+ . Speciile de fragmente în cazul ambelor tipuri de ionizare sunt descrise de ecuația $m/z = n \cdot 86 + 23/7$. Mecanismul de fragmentare este reprezentat în **figura II.31.** $[\text{PHB-B}_9 + \text{Na}]^+$ suferă procese de rearanjări de H 1-4 cu eliminarea de specii neutre de acid crotonic pornind din ambele capete ale lanțului.

Fragmentarea PHB-B a ionilor aduct cu NH_4^+ prezintă aceleași caracteristici ca și în cazul speciilor PHB-A. Astfel, se remarcă o pierdere inițială de -17 Da urmată de o fragmentare specifică speciilor protonate. De această dată fragmentarea speciilor protonate evidențiază apariția a două serii de ioni fragment decalate cu 18 Da, diferența corespunzând pierderii unei singure molecule de apă din capatul carboxilic al lanțului de PHB-B.

Ionul fragmentat corespunzător nonamerului de $[\text{PHB-B} + \text{H}]^+$ cu raportul $m/z = 775$ prezintă două serii de fragmente rezultate în urma unor procese simultane sau consecutive. O primă serie de fragmente apărută la diferențe succesive de 86 Da este similară seriei observate în cazul speciilor aduct de Na^+ sau Li^+ . Cea de a doua serie este rezultată în urma pierderii unei molecule de apă (-18 Da) urmată de pierderi succesive de 86 Da. Cele două serii sunt descrise de următoarele ecuații:

- $m/z = n \cdot 86 + 1$
- $m/z = 68 + n \cdot 86 + 1$

Membrii celei de a doua serii pot rezulta și în mod direct prin clivajul legăturii esterice C-O acil, totuși pierderea inițială a unei molecule de apă pledează pentru o fragmentare consecutivă.

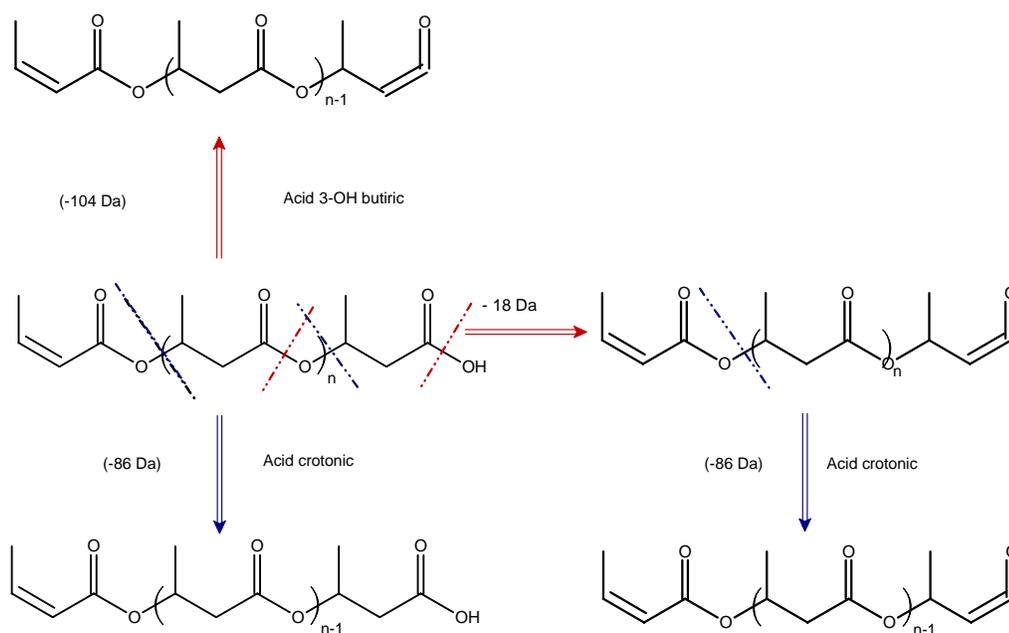


Figura II.33. Reprezentarea mecanismului de fragmentare a $[\text{PHB-B} + \text{H}]^+$

În **figura II.33.** este reprezentată fragmentarea speciilor ionice $[\text{PHB-B} + \text{H}]^+$. Dacă în cazul ionilor aduct cu Na sau cu Li nu se poate face o diferențiere clară între cele două mecanisme de

fragmentare care contribuie la formarea ionilor fiica, in cazul speciilor protonate, aparitia pierderilor de -18 Da permite diferentierea mecanismelor de fragmentare pornind de la cele doua capete. In concluzie, fragmentarea $[\text{PHB-B+H}]^+$ permite evidentierea fragmentarii pornind de la capatul carboxilic al lantului.

II.4.4.3. Caracterizarea PHB-C

Spectrul MS^2 al ionilor de tip PHB-C este prezentat in **figura II.34**. Ionul selectat pentru fragmentare este aduct de Na al nonamerului PHB-C cu $m/z = 799$. Fragmente rezultate sunt grupate in doua serii conform ecuatiilor:

- $m/z = n \cdot 86 + 2 + 23$
- $m/z = n \cdot 86 + 23$

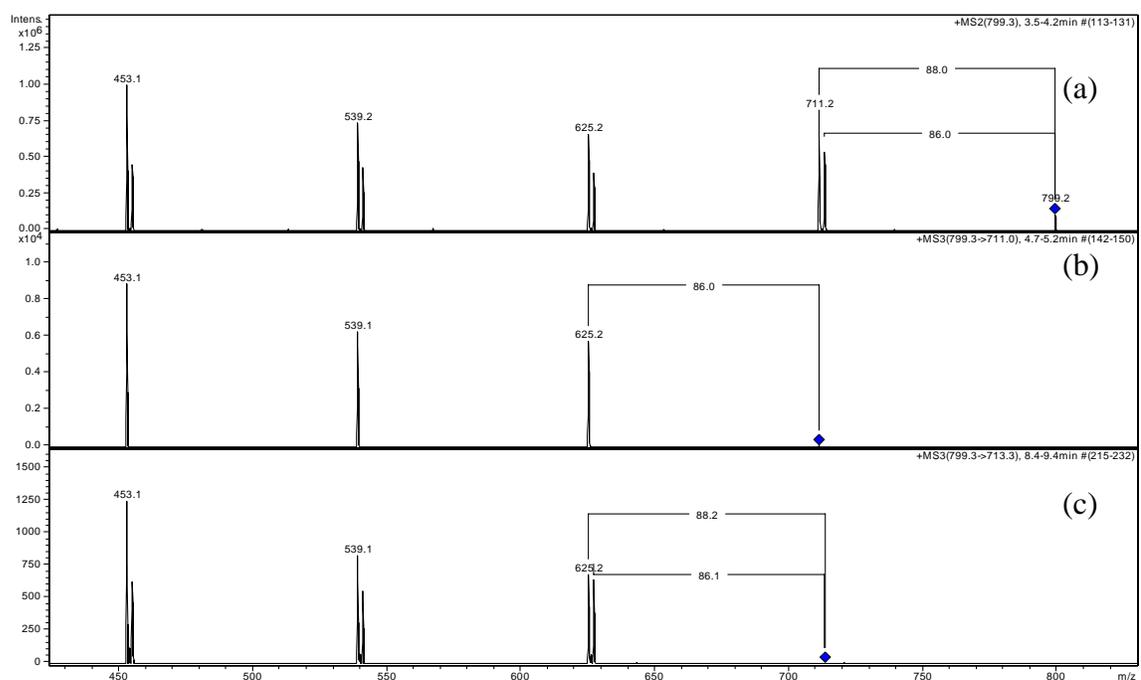


Figura II.34. Spectrele ESI MS^n ale $[\text{PHB-C}_9+\text{Na}]^+$: (a) ESI MS^2 ; (b), (c) ESI MS^3

Procesele de fragmentare MS^2 (**figura II.34.(a)**) sunt similare celor observate in cazul speciilor de PHB de tip A si B in sensul ca lanturile de PHB sufera pierderi repetate de 86 Da corespunzatoare unitatii monomere BL. Prima serie sufera clivaje ale legaturilor esterice C-O alchil incepand din capatul carboxylic al lantului de PHB-C (pierderea de acid crotonic – 86 Da) in timp ce a doua serie corespunde fragmentarilor incepand din capatul corespunzator acidului butyric (pierderea de acid butyric – 88 Da).

Fragmentarea MS^3 (**figura II.34.(b)**) efectuata asupra ionului fragment cu $m/z = 711$ rezultat in urma pierderii de acid butyric (88 Da) corespunde unui profil de fragmentare similar cu cel al lanturilor

de PHB-B. Pe de alta parte spectrul MS³ (**figura II.34.(c)**), in care ionul supus fragmentarii ($m/z = 713$) este rezultat in urma pierderii de acid crotonic (86 Da), are un profil similar cu spectrul MS² al lanturilor de PHB-C. Astfel, expeimentele de tip MS³ confirma structurile prezentate in **figura II.35.**

Spectrul MS² caracteristic speciilor [PHB-C+H]⁺ avand $m/z = 777$ evidentiaza trei serii de picuri descrise de urmatoarele ecuatii:

- $m/z = 68 + n \cdot 86 + 1$
- $m/z = 88 + n \cdot 86 + 1$
- $m/z = n \cdot 86 + 1$

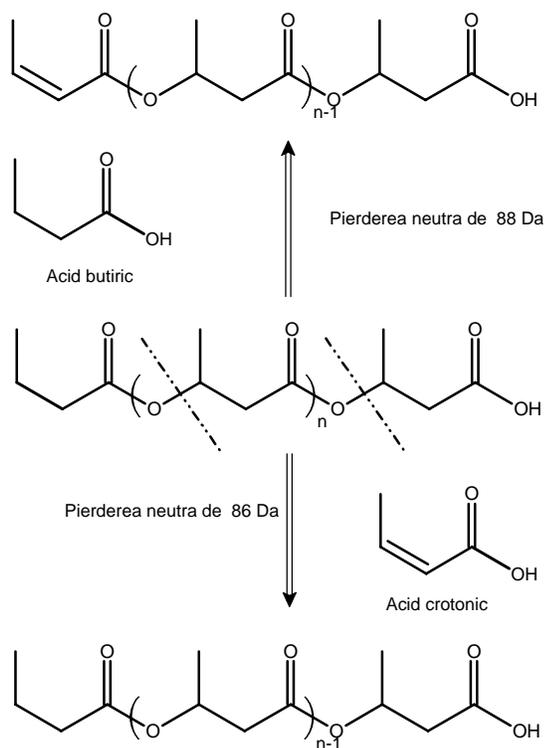


Figura II.35. Reprezentarea mecanismului de fragmentare a [PHB-C+Na]⁺

Prima serie de picuri este rezultat in urma pierderii unei molecule de apa (18 Da) din capatul carboxilic al catenei PHB-C si/sau clivarea legaturii esterice C-O acil. Cea de a doua serie rezulta in urma ruperii legaturii esterice C-O alchil incepand din capatul carboxilic al catenei cu o pierdere de 86 Da. Ruperea aceluiasi tip de legatura incepand din capatul opus (acid butiric) conduce la formarea celei de a treia serii care debuteaza cu o pierdere de 88 Da(**figura II.37.**).

Analiza ESI MSⁿ a polimerilor PHB permite identificarea structurilor cu capete diferite de lant. Din **tabelul II.2.** se poate remarca asocierea unei anumite valori Δm caracterisitice pierderilor neutre cu un anumit tip de cation utilizat la obtinerea speciilor aduct supuse fragmentarii.

Capitolul II. Analiza structurală a homopoliesterilor la nivel molecular

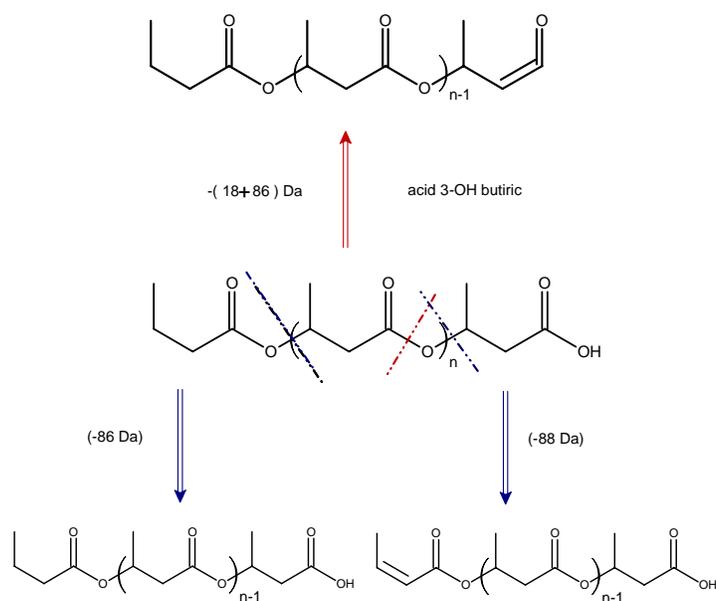


Figura II.37. Reprezentarea mecanismului de fragmentare a $[\text{PHB-C+H}]^+$

Fragment \ Ion	104	86	88	18	36	17
A PHB + Na						
A PHB + Li						
A PHB + NH ₄						
A PHB + H						
B PHB + Na						
B PHB + Li						
B PHB + NH ₄						
B PHB + H						
C PHB + Na						
C PHB + Li						
C PHB + NH ₄						
C PHB + H						

Tabel II.2. Fragmentele PHB specifice fiecarui tip de cationizare

Pierderea de 86 Da este caracteristica generală a lanțurilor de PHB indiferent de tipul de cation utilizat. În schimb celelalte pierderi neutre sunt caracteristice doar catenelor cu anumite capete de lanț permitând astfel identificarea structurală a probelor analizate. Spre exemplu pierderea de 88 Da corespunde doar PHB-C în timp ce pierderea de 36 Da corespunde doar speciilor de PHB-A. În plus, pe baza analizelor de tip MS^n se pot identifica anumite tipuri de funcțiuni cum ar fi grupările carboxilice sau cele hidroxilice a căror pierdere caracteristică este de 18 Da. Informațiile obținute în urma analizelor efectuate constituie o bază de pornire utilă în identificarea unor structuri variate pe baza de polihidroxibutirati.

Capitolul III. Sinteza si caracterizarea poliesterilor azofunctionali

Experimentele prezentate in acest capitol au drept scop investigarea posibilitatilor de sinteza a oligomerilor pe baza de ϵ -CL si D,L-LA azo-functionalizati cu DR1 si DR19 urmarind totodata obtinerea acestora intr-o singura etapa de sinteza. De asemenea, procesul de sinteza vizeaza obtinerea unor produse de inalta puritate. Rezultatele prezentate includ caracterizarea produsilor obtinuti prin spectroscopie RMN si spectrometrie de masa.

III.3. Sinteza si caracterizarea oligoesterilor cu functiuni azo capat de lant DR1CL si DR1LA

Scopul acestui studiu este sinteza de poliesteri α -functionalizati cu DR1 si caracterizarea structurala la nivel molecular a oligomerilor obtinuti, DR1CL si DR1LA (**figura III.1.**).

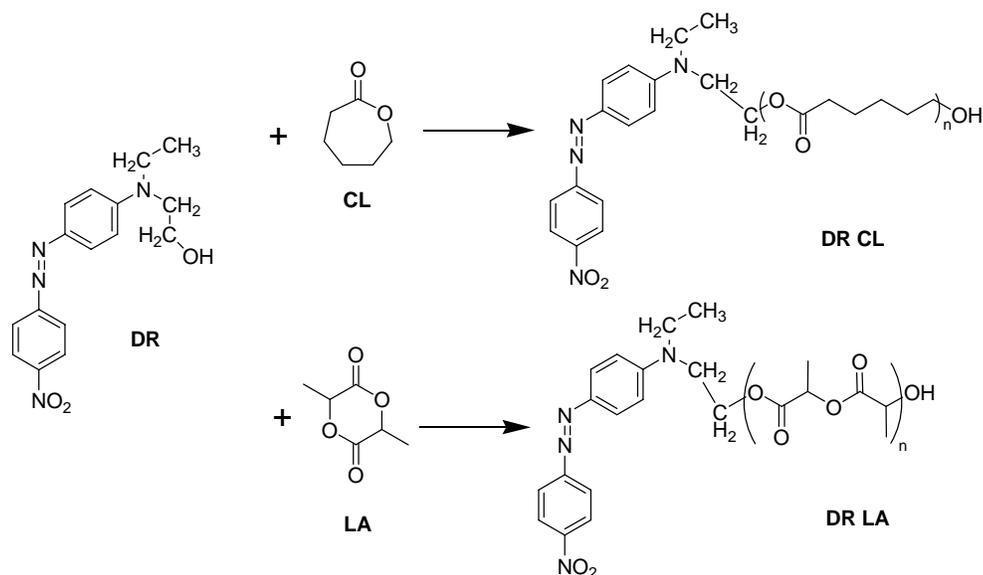


Figura III.1. Structura produsilor tinta

Formarea produsului tinta a fost estimata intr-o prima faza prin spectroscopie ¹H RMN. In **figura III.2.A** este prezentat spectrul policaprolactonei α -functionalizate cu DR1.

Pe baza spectrului a fost determinata formarea legaturii esterice dintre DR-OH si lantul polimeric. Acest fapt a fost estimat prin deplasamentul semnalului caracteristic hidrogenului metilenic, notat cu *h* in figura, din pozitia 3,984 ppm in spectrul DR1 in pozitia 4,305 ppm in spectrul DRCL (**figura III.2.A**). Gradul de polimerizare a fost calculat pe baza raportului dintre valoarea integralei semnalului notat cu *m* in figura, corespunzator hidrogenului metilenic din unitatea monomera, si valoarea integralei semnalului notat cu *h*. In urma calculelor s-a obtinut valoarea 7 pentru gradul de polimerizare a ϵ -caprolactonei.

In cazul D,L-LA s-a procedat in mod similar. Spectrul produsului este prezentat in **figura III.2.B**. Formarea legaturii esterice dintre DR si LA a fost estimata prin aparitia peakului *h* si disparitia peakului caracteristic DR. Gradul de polimerizare cu valoarea 7 a fost estimat considerandu-se valoarea integralei peakurilor *h*, *p* si *i*, *k*, *m*.



Figura III.2. Spectrul ^1H RMN al A) DRCL si B) DRLA

III.3.2. Caracterizarea structurala prin spectrometrie de masa a DR1LA si DR1CL

III.3.2.1. MALDI MS

Pentru a obtine detalii clare asupra structurii polimerilor obtinuti s-au realizat studii de spectrometrie de masa. Prin aceste studii s-a urmarit si obtinerea de informatii care pot fi utilizate in elucidarea mecanismului de reactie.

Intr-o prima faza produsii au fost analizati prin MALDI ToF MS. Spectrul obtinut in cazul DRCL este prezentat in **figura III.5**. In urma analizei acestuia se pot observa o serie de peakuri de mare intensitate care corespund lanturilor de polimer. Diferenta dintre doua peacuri succesive este de 114 Da valoare care corespunde exact unei unitati monomere de CL.

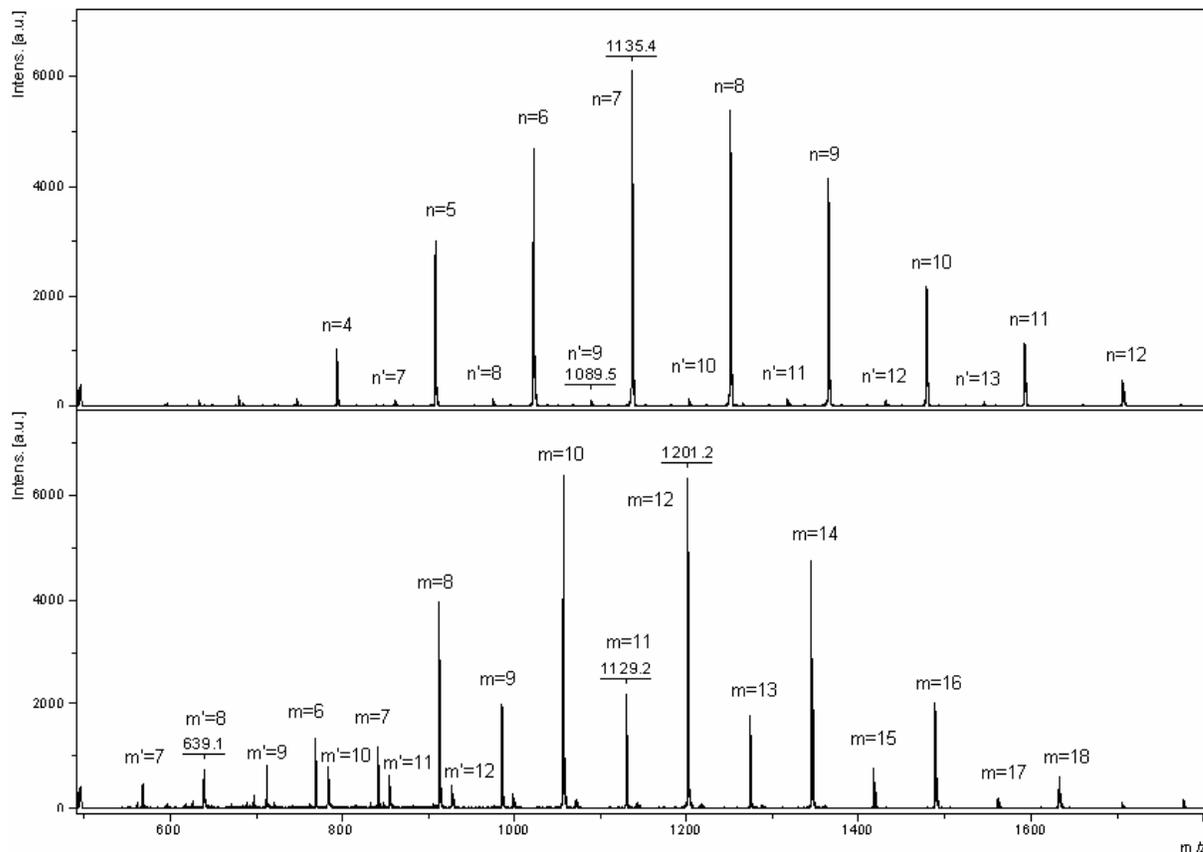


Figura III.5. Spectrele MALDI MS ale DRCL si DRLA

Daca se ia in considerare picul cu $m/z = 1135,4$ numarul de unitati monomere de CL care compun lantul este $n = 7$. Luandu-se in considerare oricare alt peak, dupa acelasi rationament, valorile obtinute pentru n ar trebui sa capete valori numere naturale ceea ce confirma o structura conform celei prezentate in **figura III.1**.

Acest fapt nu se verifica in cazul picurilor de intensitate joasa, notate cu n' . Aceste picuri caracterizate de aceeasi succesiune de 114 Da, corespund lanturilor macromoleculare initiate de apa reziduala din sistemul de reactie.

Spectrul obtinut in cazul DRLA prezentat in **figura III.5**. evidentiaza prezenta a doua serii de picuri notate cu m si m' . Seria dominanta, notata cu m , corespunde lanturilor azofunctionale de oligolactida (structura este reprezentata in **figura III.1**.) iar raportul m/z caracteristic poate fi calculat cu ajutorul formulei $m/z = 72 \times m + 314.34 + 22.99$, unde 72 reprezinta masa unitatii monomere de lactat.

Picul de baza aflat la $m/z = 1201,2$ corespunde unui grad de polimerizare $m = 12$. Spectrul MALDI MS evidentiaza totusi ca seria m prezinta de fapt doua tipuri de picuri alternante si de intensitati variabile. O prima subserie avand picurile cele mai intense corespunde lanturilor avand un numar par de unitati monomere lactat in timp ce a doua subserie avand picuri de intensitate mai joasa corespunde lanturilor cu numar impar de unitati lactat. Avand in vedere faptul ca monomerii utilizati in polimerizare sunt de fapt lactide formate din condensarea a doua molecule de acid lactic se poate considera ca seria de picuri cu numar impar de unitati lactat a rezultat in urma proceselor de transesterificare intermoleculara. Diferentele dintre intensitatile relative ale picurilor cae compun cele doua serii sunt evidente si dovedesc faptul ca procesele care au condus la formarea oligomerilor cu numar impar de unitati lactat sunt consecutive formarii de specii cu numar par de unitati lactat. Observarea celor doua serii de picuri prin MALDI MS afirma utilitatea tehnicii in decelarea produsilor secundari de transesterificare intermoleculara in ROP a polilactidei.

Cea de a doua serie de picuri notata cu m' corespunde lanturilor de polilactida rezultate in urma initierii ROP efectuate de moleculele de apa reziduale prezente in amestecul initial de reactie. Raportul m/z caracteristic poate fi calculat cu ajutorul relatiei:

$m/z = 72 \times m' + 18 + 22,9$ unde m' reprezinta gradul de polimerizare si 18 masa apei. In cazul picului cu valoarea $m/z = 609,1$ valoarea $m' = 6$.

Reactiile de transesterificare au loc si in cazul oligomerilor azofunctionali DRCL, dar datorita faptului ca produsii de transesterificare au o masa egala cu a produsilor rezultati din reactia ROP initiata de DR1 decelarea acestora este imposibila. Aceste reactii secundare impiedica cresterea masei moleculare a oligomerilor azofunctionali si conduc la cresterea polidispersitatii probelor.

III.3.2.2. MS/MS

Spectrul de fragmentare MS/MS al DR1CL este prezentat in **figura III.11**. Lantul polimeric ales pentru fragmentare reprezinta picul cu cea mai mare intensitate ($m/z = 1135.5$) identificat in spectrul ESI MS obtinut pentru DR1CL. Acest pic corespunde lanturilor DR1CL cu 7 unitati monomere si ionizat cu Na. Analizand spectrul se pot observa trei profile distincte de fragmentare. Pentru a usura observarea acestora in **figura III.11**, sunt prezentate asocierile dintre valorile maselor fragmentelor si structura acestora. Astfel, cele trei profile sunt notate C1-3_n, unde n reprezinta numarul de unitati monomere continute de fragmentul respectiv.

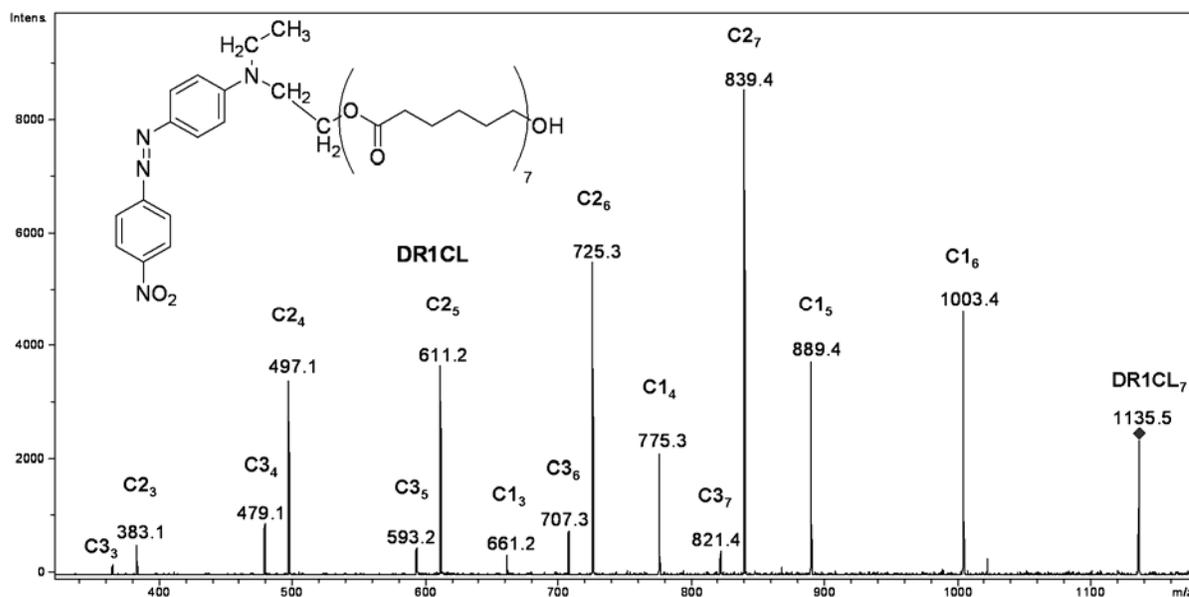


Figura III.11. ESI MS/MS DRCL

Profilul de fragmentare C1 incepe prin ruperea capatului de lant hidroxilic (**figura III.12.**). Se remarca pierderea unei unitati monomere hidratate cu o molecula de apa. Urmatoarele fragmente din aceatsta serie sunt formate prin pierderea neutra de oligomeri de ϵ -caprolactona. Astfel, are loc clivajul legaturii esterice C-O alchil prin rearanjari de H 1-4.

Calea de fragmentare C2 debuteaza prin ruperea capatului de lant functionalizat cu DR1 eliminandu-se un compus cu masa de 296 Da. Fragmentarea are loc prin ruperea legaturii dintre O esterice si C metilenic conform schemei prezentate in **figura III.12.**. Aceasta cale de fragmentare este de fapt complementara cu C1, diferenta constand in faptul ca ruperea ionului fragment are loc la celalalt capat al lantului de DR1CL.

Calea de fragmentare C3 debuteaza la fel ca si C2 incepand cu capatul azofunctional, de aceasta data legatura clivata fiind C-O acil prin rearanjari de H 1,3. Fragmentul neutru eliminat este DR1 ($\Delta m = 314$ Da). Acest tip de fragmentare este mai putin intalnit in cazul poliesterilor. Studiile MS/MS in cazul DRCL valideaza ipoteza initiala (**figura III.6.**) privind structura produsilor sintetizati.

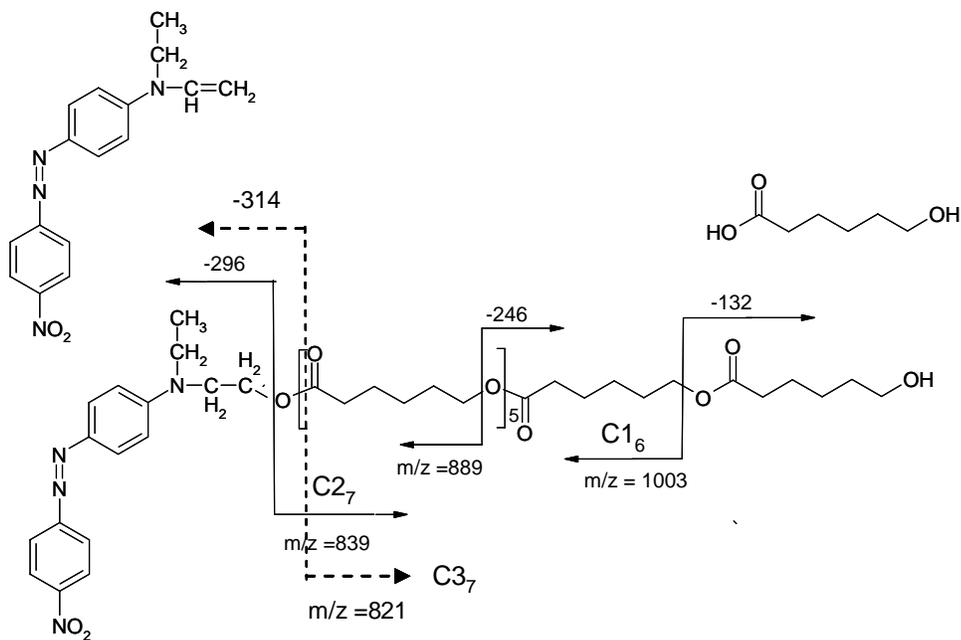


Figura III.12. Reprezentarea modului de fragmentare a oligomerilor DRCL

In vederea fragmentarii MS/MS a oligomerilor DRLA au fost selectati ionii cu $m/z = 1345$ Da avand 12 unitati monomere lactat. Ca si in cazul DRCL se pot observa doua cai distincte de fragmentare evidentiata in **figura III.16**.

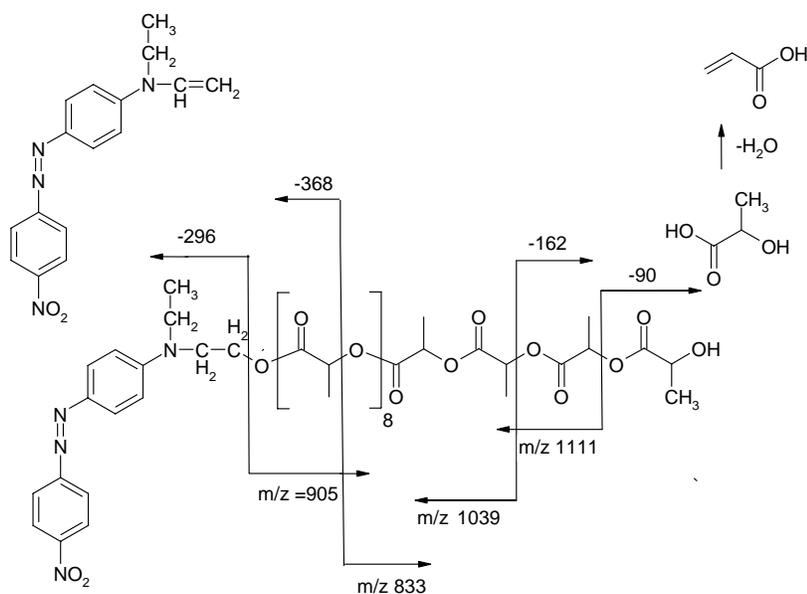


Figura III.16. Reprezentarea modului de fragmentare a oligomerilor DRLA

Prima, marcata de o pierdere neutra de 296 Da, confirma existenta functiunii azobenzenice la unul din capetele lantului, DR1 fiind originea fragmentului cu $\Delta m/z = 296$. Cealalta cale de fragmentare, marcata de o pierdere neutra de 90, evidentiaza ruperea unitatii capat de lant de acid lactic. In continuare se observa fragmente rezultate din scindarea moleculelor avand un numar variabil

de unitati monomere lactat ($n \times 72$). Si in cazul DRLA spectrul de fragmentare confirma structura lanturilor de oligomeri presupusa initial.

In plus, in spectrul MS/MS al DRLA se observa un pic unic la 1273 Th avand un $\Delta m = 72$ Da fata de ionul parinte (1345 Th). Date recente de literatura evidentiaza faptul ca oligomerii de PLA prezinta o a treia cale de fragmentare implicand procese de eliminare a unitatii monomere lactat din interiorul lantului, marcate de pierderea de 72 Da [73]. In cazul PLA, aceasta cale de fragmentare nu poate fi diferentiata deoarece picurile fragment au o masa care coincide cu cea a fragmentelor rezultate in urma clivajelor la capatul carboxilic.

III.4. Sinteza si caracterizarea oligoesterilor DC cu functiuni azo intercalate in catena de baza

O trasatura particulara a fragmentarii poliesterilor a fost mentionata de cateva studii [105-107]. Aceasta consta in observarea unor reactii de schimb de sarcina (CER – “charge exchange reactions”). Aceste reactii constau in producerea de ioni fragment in conditiile CID cu o sarcina diferita fata de cea a ionului supus fragmentarii. Este necesara precizarea ca aceste reactii sunt esential diferite de reactiile clasice in care un ion incarcat cu un numar multiplu de sarcini conduce prin fragmentarea CID la formarea de ioni fiica cu un numar mai mic de sarcini. CER implica formarea de fragmente aduct cu o anumita sarcina (de ex. H^+) pornind de la ioni parinte aduct cu o alta sarcina (de ex. Na^+). Desi conditiile care conduc la aparitia CER nu sunt inca elucidate, aparitia lor poate constitui un profil de fragmentare util in analiza structurala a polimerilor si copolimerilor. Pornind de la aceasta ipoteza, studiul prezentat in continuare este dedicat stabilirii conditiilor in care aceste reactii sunt declansate precum si asocierea acestor fenomene cu anumite tipologii structurale. Astfel, pe langa detaliile legate de sinteza oligocaprolactonelor functionalizate cu DR19, sunt prezentate cateva abordari distincte in caracterizarea oligomerilor obtinuti precum 1H RMN, LC UV-VIS, LC MS, LC MS/MS precum si ESI MS/MS. Tehnicile de caracterizare utilizate converg intr-o caracterizare detaliata a probei DR19CL.

III.4.3. Caracterizarea oligomerilor de caprolactona functionalizati cu DR19

Conditiiile de polimerizare a ϵ -caprolactonei prin ROP initiata de functiunile OH ale DR19 sunt similare cu cele raportate anterior in cazul polimerizarii initiate de DR1 [103]. Astfel, reactia are loc in masa prin activare termica la 100 °C. Diferenta intre DR1 si DR19 ca specii initiatore consta in prezenta celei de a doua functiuni hidroxilice in cazul DR19. Din punct de vedere al mecanismului reactiei de polimerizare este necesara elucidarea modului de initiere a ROP si in special daca cea de a doua functiune OH participa la reactie. Aceasta dilema isi are originea in faptul ca odata ce DR19 a

inițiat formarea unui lant de oligoester reactivitatea celei de a doua grupari OH poate fi diminuată de eventualele împiedicari sterice. Astfel, se poate considera formarea a doi produse de reacție după cum este reprezentat în **figura III.18.**:

- α -DC – oligocaprolactona azofunctionala în care DR19 este așezat pe capatul catenei
- β -DC – oligocaprolactona azofunctionala în care DR19 este intercalat în catena de baza

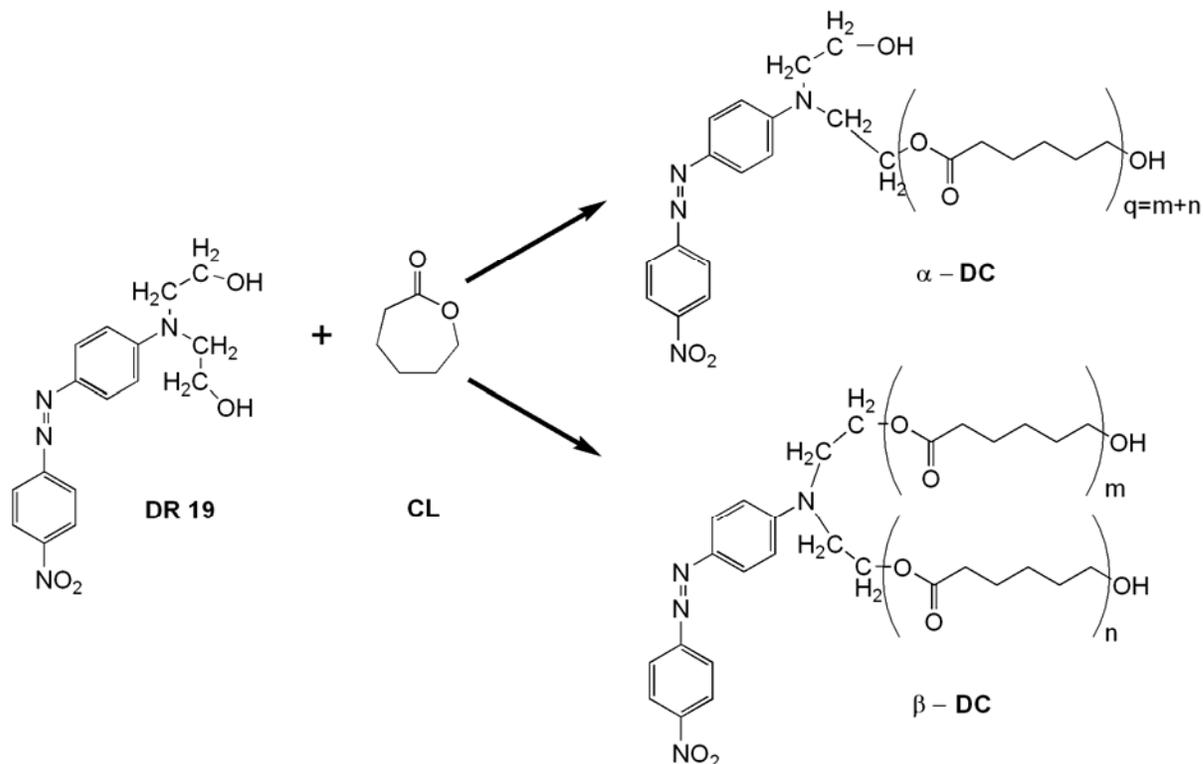


Figura III.18. Reacția de polimerizare a CL în prezența DR19 cu formarea de structuri izomere

Caracterizarea prin spectroscopie RMN releva faptul că proba DC constă într-un amestec de DR19 nereacționat și/sau oligocaprolactona funcționalizată pe capăt cu DR19 (α -DC) pe de o parte și oligocaprolactona cu funcțiunea DR19 intercalată în lant (β -DC). Astfel, RMN a confirmat formarea produsilor țintă dar nu poate discrimina într-un mod clar cele două produse izomere, respectiv α - și β -DC. Descrierea β -DC este de altfel problematică datorită faptului că lungimea celor două brațe constituite din oligomeri de caprolactona este variabilă crescând astfel numărul structurilor izomere posibil formate. Caracterizarea structurală completă a produsilor de reacție necesită în consecință discriminarea celor doi izomeri α - și β -DC. În continuare proba DC a fost examinată prin ESI MS (ID – injecție directă) în modul pozitiv, utilizând sărurile de Na și Li ca agenți de cationizare. Spectrul de masă obținut în cazul cationizării cu Na prezintă o serie de picuri succesive cu o creștere a masei de la un pic la celălalt de 114 Da corespunzând oligomerilor azofuncționali de caprolactona. Distribuția lanțurilor porneste de la un grad de polimerizare $n = 3$ (DC₃ – 696 Th) până la gradul de polimerizare n

= 10 (DC_{10} – 1493 Th). Picul de baza, DC_7 , corespunde unui aduct cu Na al heptamerului de CL continand o functiune de DR19 esterificata.

Spectrul ESI MS confirma formarea produsilor conform schemei de reactie din **figura III.18**. Trebuie mentionat faptul ca nu s-a observat prezenta DR19 liber in amestecul analizat. In consecinta, picurile de DR19 observat in RMN corespund unor structuri de tip α -DC. Cu toate acestea, analiza probei prin injectie directa nu aduce o imagine clara asupra amestecului de reactie. Astfel, proba a fost analizata prin cromatografie lichida.

III.4.3.1. Caracterizarea prin LC MS

Detectia speciilor separate a fost realizata in paralel cu ajutorul unui detector DAD – UV-VIS si ESI IT MS. Cromatogramele de elutie obtinute de la cele doua detectoare sunt prezentate in **figura III.21**. Detectia DAD a fost realizata la o lungime de unda de 460 nm corespunzatoare lungimii de unda caracteristice probei DC. Se poate observa ca picurile cromatografice detectate prin UV-VIS se suprapun exact peste cele detectate prin MS confirmand faptul ca amestecul de reactie contine doar oligocaprolactona azofunctionala (**figura III.21**). Totodata, picurile cromatografice detectate sunt grupate in serii de dublete cu acelasi raport m/z, iar odata cu cresterea timpului de elutie creste si masa moleculara a speciilor eluate. Comparatia datelor obtinute prin ESI MS ID si LC DAD MS releva faptul ca distributia lanturilor DC este subestimata in cazul analizei prin simpla injectie directa. Astfel, prin LC este evidentiata prezenta oligomerilor DC_1 si DC_2 confirmandu-se faptul ca ESI MS ID nu furnizeaza date exacte in ceea ce priveste polidispersitatea probelor polimerice.

Pe de alta parte analiza prin detectie UV-VIS confirma faptul ca toata cantitatea de DR19 liber, determinata prin RMN, apartine structurilor de tip α -DC. In consecinta, proba DC este un amestec constituit din lanturi de CL avand functiunea DR19 atasata la un capat (α -DC) sau intercalata (β -DC). Moleculele indentificate in spectrul LC MS la aceleasi rapoarte m/z dar eluate la timpi diferiti de retentie sunt structuri izomerice de tip α - si β -DC. Lanturile de oligomeri DC_2 , avand doar doua unitati monomere legate de gruparea functionala DR19, pot avea din punct de vedere teoretic doar doua structuri, corespunzatoare α -DC si β -DC. Cromatograma extrasa din TIC (EIC – „*Extracted Ion Chromatogram*”), corespunzatoare DC_2 cu raportul caracteristic m/z = 581, a evidenciat existenta a doua picuri la 7,9 si respectiv 8,3 min. Atribuirea structurilor corespunzatoare celor doua picuri cromatografice extrase a fost realizata considerand profilul de fragmentare MS/MS (detalii in sectiunea MS/MS).

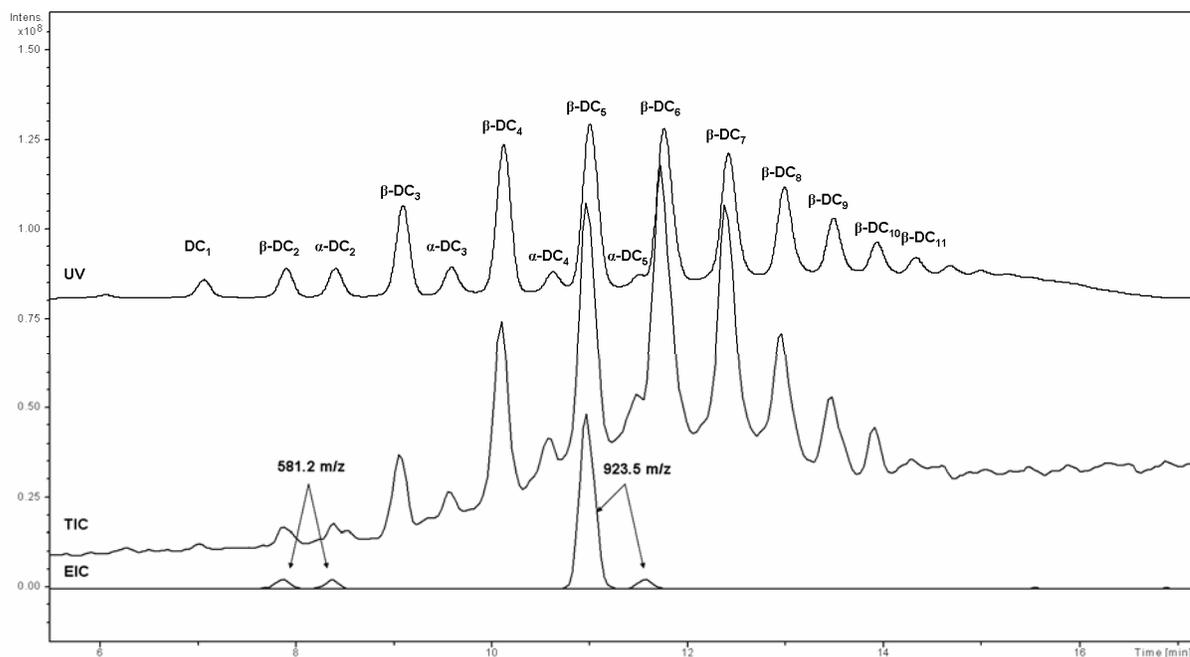


Figura III.21. Cromatogramele obtinute in urma separarii HPCL a probei DC cu detectie UV si ESI MS (TIC – cromatograma totala, EIC – cromatograma extrasa pentru un anumit m/z)

Astfel, picul de la 7,9 min. este atribuit speciilor β -DC in timp ce picul de la 8,3 corespunde speciilor α -DC. Urmatoarea pereche de picuri corespunzatoare DC₃ (m/z=695), cu timpii de retentie 9,1 si 9,7 min. corespund β - si α -DC₃, si asa mai departe. Separarea picurilor este mai putin evidenta odata cu cresterea masei moleculare a speciilor eluate, observandu-se faptul ca speciile α -DC_n se suprapun cu speciile β -DC_{n+1}, incepand cu un grad de polimerizare n=6. Mai mult, abundenta relativa a α -DC descreste odata cu cresterea gradului de polimerizare.

Numarul de izomeri de pozitie creste odata cu cresterea gradului de polimerizare, spre exemplu in cazul tetramerului DC₄ pot exista o structura de tip α -DC si doua structuri de tip β -DC avand lungimi diferite ale bratelor de oligocaprolactona. De fapt, procedura de separare cromatografica nu reuseste decelarea tuturor izomerilor pozitionali posibili ai speciilor DC; doar α -DC (doar o singura specie per grad de polimerizare) sunt separate din amestecul de izomeri β -DC. Astfel, cromatograma EIC extrasa pentru ionul DC₅ (m/z=923) evidentiaza detectia a doar doua picuri.

III.4.3.2. Caracterizarea prin LC MS/MS

Diferentierea dintre perechile de picuri cromatografice corespunzatoare speciilor DC cu acelasi numar de unitati monomere de ϵ -caprolactona poate fi realizata si prin studii de fragmentare de tip CID in detectorul MS de tip capcana de ioni. In **figura III.22.** este prezentat spectrul MS/MS caracteristic

izomerilor α - (jos) si β -DC (sus) eluati la timpii de retentie 11,5 si respectiv 11 min. Spectrul α -DC₅ (m/z=923) poate fi interpretat dupa cum urmeaza: pierderea neutra de acid 6-OH hexanoic conduce la formarea ionului fiica la m/z=791. Urmatorii ioni fragment membri ai acestei serii sunt formati prin pierderea similara a unor specii cu numar crescator de unitati monomere de caprolactona ($\Delta m=114$ Da). Fragmentele incluse in aceasta serie sunt notate cu α -A1_n. Nomenclatura utilizata in descrierea seriilor de ioni fragment, A1, A2, B1 etc. tine seama de mecanismele diferite care duc la aparitia acestora iar coeficientul X_n cunatifica numarul de unitati de caprolactona din structura ionului.

Astfel, in cazul ionilor α -A1 (α -A1₄ – 791 Th si α -A1₃ – 677 Th) mecanismul de fragmentare consta in clivarea legaturii C-O ester alchil pornind dinspre capatul hidroxic al catenei de caprolactona (Schema xx). Primul membru al acestei serii, α -A1₄, rezulta in urma pierderii neutre a acidului 6-OH hexanoic (132 Da). Urmatorul membru are o unitate de CL mai putin si corespunde pierderii neutre de 246 Da (132 +114). Ionii fiica observati sunt aducti de Na avand o dubla legatura drept capat de lant conform mecanismului de fragmentare prin rearanjari de H 1,4 descris anterior in literatura.

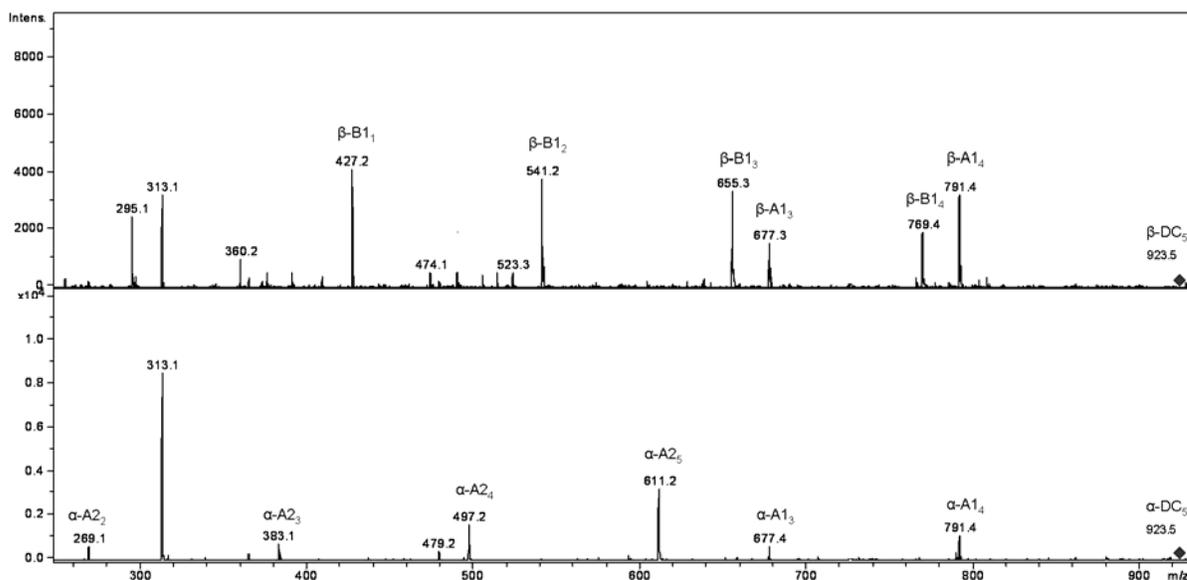


Figura III.22. Fragmentarea MS/MS a speciilor $[DC_5+Na]^+$ la RT = 11 (β -DC) si 11,5 (α -DC)

O alta cale de fragmentare, conducand la formarea ionilor α -A2_n, contine urmatoarele fragmente: α -A2₅ – 611 Th, α -A2₄ – 497 Th, α -A2₃ – 383 Th, α -A2₂ – 269 Th. Aceste fragmente rezulta in urma clivajului legaturii esterice C-O alchil si conrin o grupare carboxilica drept capt de lant (**figura III.23.**). Specia neutra eliminata la formarea fragmentului α -A2₅ are masa $\Delta m=312$ Da si corespunde pierderii unui fragment din capatul azofunctional al ionului parinte. Urmatorii membri ai

acestei serii contin un numar variabil de unitati monmere de CL variind de la 0 (α -A₂₅) pana la 3 (α -A₂). Aceasta serie de fragmente este complementara seriei α -A₂₅ dupa cum se poate observa din schema xx. Spre exemplu fragmentele α -A₁₃ si α -A₂₂ sunt produse de clivajul aceleiasi legaturi esterice, cationul ce Na fiind retinut fie de un fragment fie de celalalt.

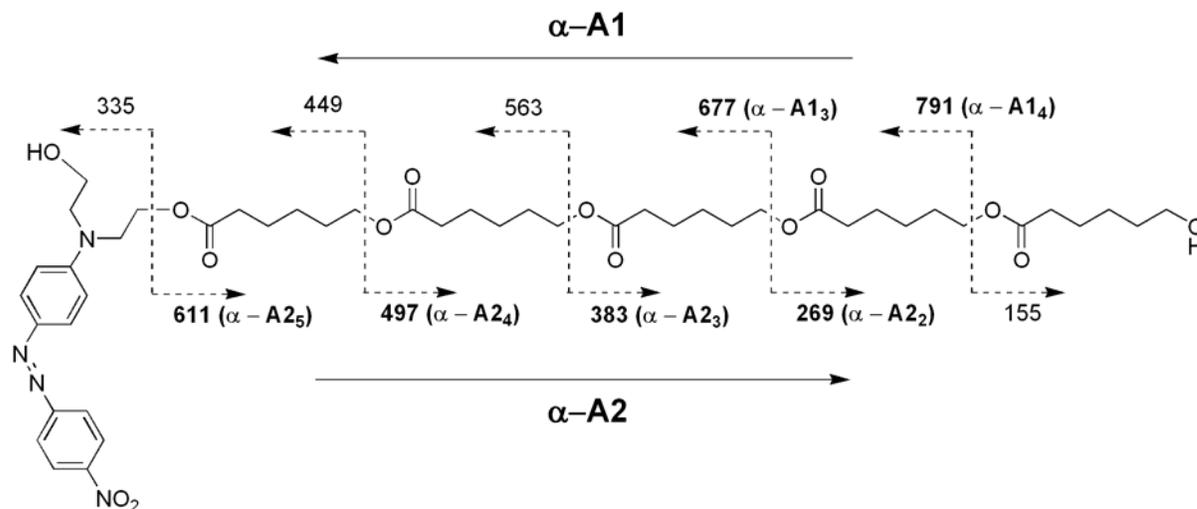


Figura III.23. Caile de fragmentare a speciilor ionice α -DC₅

O a treia cale de fragmentare (α -A₃) avand o abundenta relativa redusa comparativ cu seriile α -A₁ si A₂ se regaseste la o diferenta de - 18 Da fata de seria α -A₂. Membrii acestei serii pot fi observati la 593, 479 si respectiv 365 Th. Mecanismul de fragmentare care conduce la formarea acestor ioni fragment implica clivajul legaturilor esterice C-O acil prin rearanjari de H 1,3. Acest tip de fragmentare a fost observat si in cazul fragmentarii speciilor DR1CL.

Masele corespunzatoare seriilor de ioni fragment observate in cazul speciilor ionice α -DC pot fi rationalizate utilizand urmatoarele relatii:

$$m/z = 312 + n*114 + 23 (\alpha\text{-A1}) \quad (1)$$

$$m/z = n*114 + 18 + 23 (\alpha\text{-A2}) \quad (2)$$

$$m/z = n*114 + 23 (\alpha\text{-A3}) \quad (3)$$

Se poate remarca faptul ca modul de fragmentare al speciilor α -DC este similar cu cel observat in cazul fragmentarii DR1CL prezentat in sectiunea anterioara. De altfel speciile α -DC si DR1CL prezinta o anumita similaritate structurala. Pentru a facilita comparatia sunt prezentate in continuare relatiile de calcul care permit rationalizarea fragmentelor ionice observate in spectrul MS/MS al DR1CL (**Figura III.11.**):

$$m/z = 296 + n*114 + 23 (C1) \quad (4)$$

$$m/z = n*114 + 18 + 23 (C2) \quad (5)$$

$$m/z = n*114 + 23 \text{ (C3)} \quad (6)$$

Similaritatea comportamentului in fragmentare a celor doua structuri considerate devine evidenta in urma unei simple comparatii intre ecuatiile 1-3 si 4-6.

Fragmentarea MS/MS a speciilor ionice $[\beta\text{-DC}_5\text{+Na}]^+$ eluate la timpul de retentie 11 min. prezinta doua serii mai importante de fragmente (**figura III.22.** sus). Prima serie notata cu $\beta\text{-A1}$ este similara cu seria $\alpha\text{-A1}$. Cea de a doua serie debuteaza cu fragmentul $\beta\text{-B1}_4 - 883$ Th si continua cu un decrement repetat de masa $\Delta m = 114$ Da ajungand pana la fragmentul $\beta\text{-B1}_1 - 427$ Th. Aceasta serie reprezinta cea mai importanta cale de fragmentare din punctul de vedere a abundenței relative a ionilor fragment. Membrii acestei serii sunt atribuiti unei cai de fragmentare care implica in proces de schimbare de sarcina (CER), ionii fragment fiind specii protonate in timp ce ionii parinte sunt specii sodiate. Acesta afirmatie este justificata de pierderea neutra observata de $\Delta m = 154$ Da corespunzand sarii de Na a acidului 6-OH hexanoic in cazul fragmentului $\beta\text{-B1}_4$. Urmatorii membri ai acestei serii sunt formati prin pierderea neutra a sarii de Na ai acizilor carboxilici care au in componenta lor un numar crescator de unitati monomere de caprolactona ($131 + n*114 + 23$). Pe langa aceste doua serii majore de fragmente se mai pot remarca cateva fragmente de joasa intensitate a caror provenienta va fi discutata ulterior.

Fenomenul de fragmentare cu producerea CER reprezinta o trasatura putin intalnita in literatura aferenta fragmentarii poliesterilor si in consecinta merita o atentie speciala. In acest sens si totodata pentru a verifica faptul ca pierderea sarurilor de Na nu este doar un artefact, fragmentarea speciilor $\beta\text{-DC}$ a fost analizata si in conditiile utilizarii speciilor ionice aduct ai Li. Fragmentarea speciilor ionice litiatate $[\beta\text{-DC}_6\text{+Li}]^+$ (**figura III.24.**) releva un comportament similar cu cel observat in cazul speciilor sodiate. Astfel, au fost observate caile de fragmentare specifice speciilor $\alpha\text{-DC}$ (notate cu $\alpha\text{-A3}$ si $\alpha\text{-A4}$) precum si fragmentarile de tip CER (seria $\beta\text{-B2}$). Valorile m/z caracteristice membrilor ambelor serii $\beta\text{-B1}$ si $\beta\text{-B2}$ pot fi calculate utilizand urmatoarea relatie:

$$m/z = 294 + n*114 + 18 + 1 \text{ (}\beta\text{-B1\&2)} \quad (7)$$

Seriile de fragmente observate rezultate in urma proceselor CID corespund datelor de literatura in ceea ce priveste mecanismele intime responsabile:

- Rearanjari de H 1,4 si 1,3 in cazul speciilor DR1CL si $\alpha\text{-DC}$
- CER si rearanjari de H 1,4 in cazul speciilor $\beta\text{-DC}$

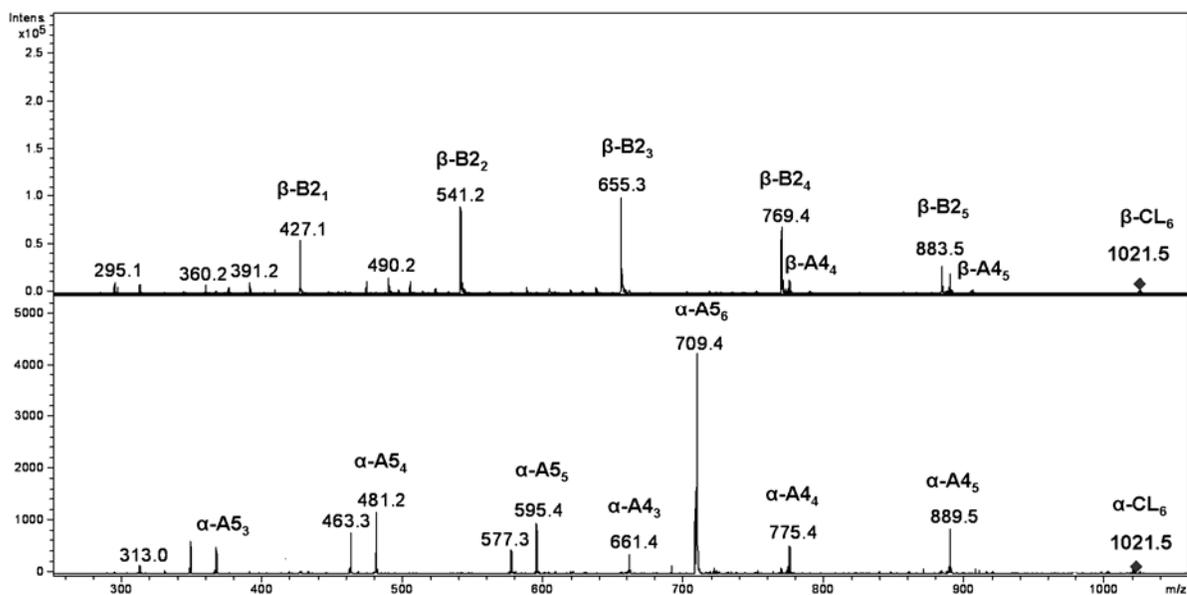


Figura III.24. Fragmentarea MS/MS a speciilor $[DC_6+Li]^+$ la RT = 11,8 (β -DC) si 12,5 (α -DC)

In general mecanismele de fragmentare prin rearanjari de H 1,4 sau 1,3 sunt cel mai adesea intalnite in cazul clivajelor legaturilor de tip ester, caracteristice si poliesterilor [105, 108]. Pe de alta parte fenomene de tip CER sunt arareori mentionate in literatura si aparitia lor nu este explicata in mod riguros. In principiu, faptul ca CER apar concomitent cu rearanjarile de H in cazul speciilor β -DC iar in cazul speciilor α -DC sunt remarcate doar rearanjari de H 1,4 conduce la concluzia ca rearanjarile de H sunt specifice catenelor liniare in timp ce fragmentarile de tip CER pot coexista cu rearanjarile de H 1,4 in conditii structurale indeplinite de speciile β -DC. De fapt, structura β -DC poate fi asimilata cu o structura ramificata si in esenta fenomenele CER pot fi corelate cu acest tip de structura.

Fragmentarile de tip CER au fost descrise in literatura de specialitate doar pentru cativa compusi care prezinta in structura lor legaturi de tip ester precum di- si tri-acilglicerolii [109] si polifitalatii [105-107]. Aceste studii au aratat ca CER are loc prin eliminarea sarurilor neutre ale acizilor carboxilici concomitent cu formarea unor ioni de oxoniu cu structura ciclica. Acest fenomen poate fi consecinta unei dispuneri spatiale specifice a legaturilor esterice astfel incat sa se formeze structuri ciclice de tip oxoniu cu participarea a doua legaturi de tip ester si implicarea cationului din componenta ionului aduct aflat in faza de gaz.

In cazul de fata se poate remarca o anumita similaritate structurala intre β -DC si diacil gliceroli fapt ce poate sta la originea fenomenelor de tip CER. Fragmente rezultate in urma CER (de exemplu seria β -B2 din **figura III.24.**) contin un numar variabil de unitati CL (de la 1 la 5), picul de baza β -B2₃ rezultand in urma pierderii neutre a trei unitati CL.

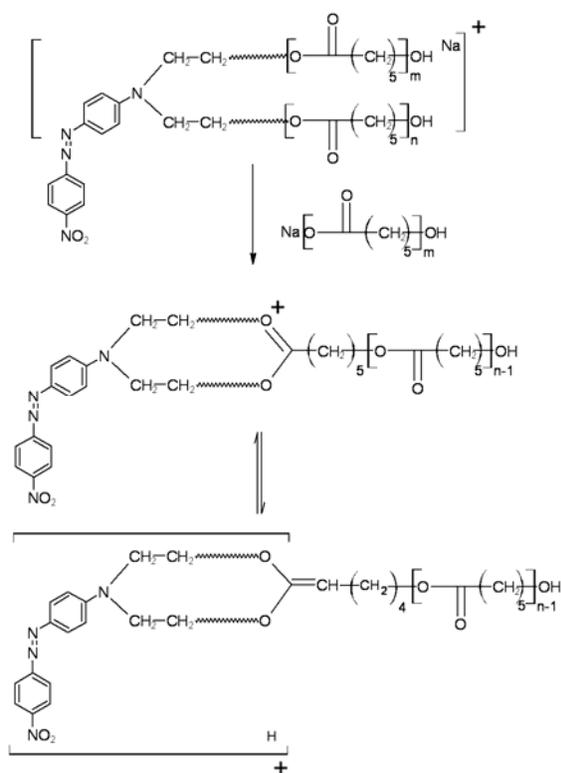


Figura III.25. Fragmentarea CER cu formare de ioni oxoniu

Conform **figurii III.25.**, procesul de formare a seriei de fragmente cu succesiunea de 114 Da poate fi explicat printr-o scindare aleatorie a legaturii esterice dintre doua unitati monomere urmata de o ciclizare si formare a ionului de oxoniu. Daca se considera ionul parinte β -B₂₆ avand o structura cu cele 6 unitati CL distribuite in mod egal intre cele doua lanturi de oligomer esterificate la gruparile OH ale DR19, mecanismul prezentat in **figura III.25.** explica doar aparitia fragmentelor β -B₂₅, β -B₂₄ si β -B₂₃. Totusi, ionul parinte poate contine si alti izomeri pozitionali in care bratele de CL au lungimi variabile aplicandu-se astfel aparitia tuturor fragmentelor observate. Spre exemplu, fragmentarea unui izomer al β -B₂₆ avand atasat un oligomer cu 5 unitati de CL la un brat si 1 unitate CL la celalalt poate conduce la eliminarea a unei sari carboxilice de Li cu 5 unitati de CL si formarea fragmentului β -B₂₁.

Capitolul IV. Sinteza si caracterizarea prin spectrometrie de masa derivatilor de ciclodextrina

IV.3. Cracterizarea prin spectrometrie de masa a derivatilor de ciclodextrina obtinuti prin ROP a esterilor ciclici

IV.3.2. Sinteza si caracterizarea conjugatelor PHB- β -CD - polimerizare in masa

Sinteza derivatilor de cilodextrina cu poly(3-OH butirati) reprezinta o abordare relativ recenta in obtinerea de polimeri conjugate covalent cu oligozaharide ciclice. Chiar daca a fost raportata sinteza PHB- β -CD prin ROP a β -BL [57] cateva aspecte raman de clarificat:

- Mecanismul ROP care guverneaza reactia
- Caracterizarea riguroasa a produsilor de reactie
- Detaliile modului de substitutie a CD

In general, cataliza organica a reactiei de polimerizare prin deschiderea a esterilor ciclici presupune activarea acestora de catre un agent electrophil si/sau activarea initiatorului sau a capatului activ de lant aflat in propagare de catre o baza [132].

In ceea ce priveste polimerizarea BL rezultatele raportate in literatura [77-87] sustin faptul ca principalele specii active in ROP anionica sunt ionii carboxil. Dupa cum am mentionat anterior acest fapt conduce la formarea de produse secundari de reactie care nu retin functiunea initiatoare, in acest caz ciclodextrina. Astfel, chiar si in conditiile unei reactii in prezenta CD exista posibilitatea formarii de homopolimeri PHB ca produse secundari de reactie. In consecinta, ROP a BL in prezenta CD merita reinvestigata. Strategia de sinteza utilizata pentru obtinerea de conjugate de tip PHB- β -CD presupune realizarea reactiei la o temperatura mai mica cu adaugarea simultana a unei amine ca baza activatoare reactiei de deschidere a esterilor ciclici.

Reactia condusa in masa a avut ca rezulta un amestec care a fost separat in doua fractii prin precipitare repetata in diclorometan. Fractia solubila F1 a fost izolata prin evaporarea blanda a solventului la ROTAVAP iar precipitatul, fractia F2, a fost uscat la etuva de vid, la 40 °C. Analizele efectuate au aratat ca fractia F1 contine homopolimeri PHB in timp ce fractia F2 contine CD libera si conjugati de tip PHB- β -CD (**figura IV.9.**).

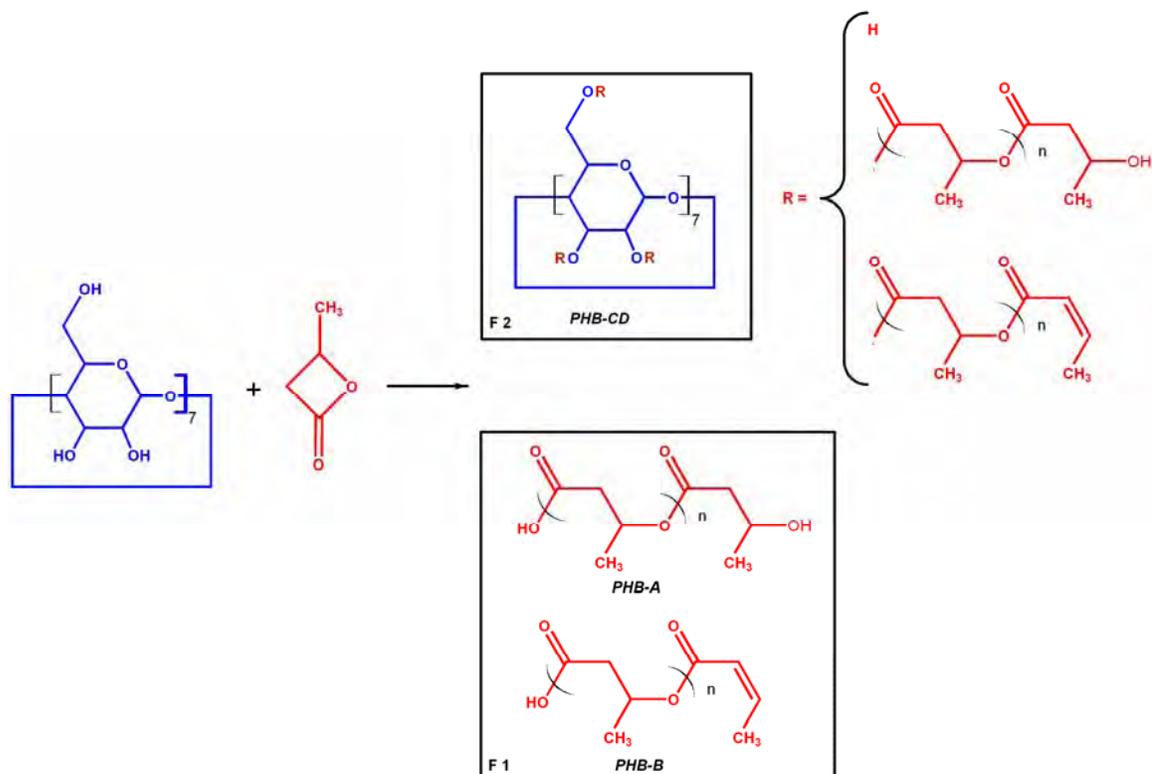


Figura IV.9. Polimerizarea BL in prezenta CD [130]

IV.3.2.1. Caracterizarea fractiei F1 prin LC MS

Spectrul LC ESI MS (figura IV.10.) obtinut in cazul fractiei F1 confirma obtinerea de PHB-A avand drept capete functiuni acid 3-OH butiric si COOH ca produs principal, precum si PHB-B avand pe capat acid crotonic si COOH. Masa polimerilor ovtinuti variaza intre aproximativ 300 si 5000 g/mol. Masa speciilor ionice corespunzatoare picurilor din spectrul LC MS este obtinuta utilizand urmatoarea relatie de calcul: $2 \cdot m/z = 18 + n \cdot 86 + 2 \cdot 23$ (unde n reprezinta gradul de polimerizare, 18 - masa apei, 86 – masa unitatii monomere de BL, 23 – masa cationului de Na). Formarea aductilor de Na nu este o caracteristica a speciilor eluate prin LC MS dar se poate explica priprezenta sarurilor de Na reziduale fie in sticlaria utilizata fie chiar in sursa ESI utilizata. In afara speciilor dublu incarcate se pot observa aducti ai PHB-A cu una sau trei sarcini, avand o abundenta relativa mai joasa.

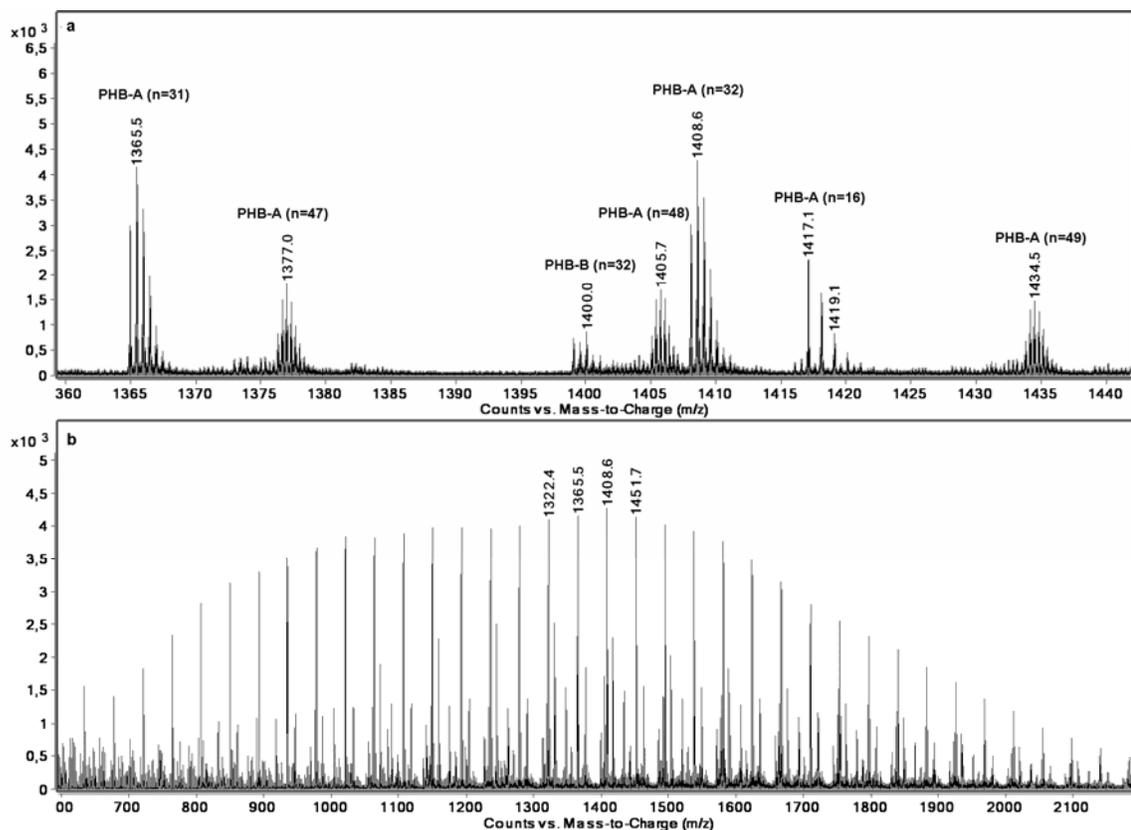


Figura IV.10. Spectrul LC MS al fractiei F1 – detaliu in regiunea m/z 1360 – 1440

IV.3.2.2. Caracterizarea fractiei F2 prin LC MS

Fractia F2 precipitata din amestecul de reactie a fost caracterizata prin LC MS, RMN si MS/MS. In **figura IV.11.** este reprezentata cromatograma TIC obtinuta, intre timpii de retentie 7,3 si 9,8 min. impreuna cu spectrul MS extras.

Spectrul LC MS extras pe perioada 7,3-9,8 min. (ambele picuri cromatografice) prezinta specii ionice corespunzand $[\beta\text{-CD}+\text{Na}]^+$ (picul de la 7,4 min, $m/z = 1157$ - masa moleculei de $\beta\text{-CD}$ + masa Na). Celelate picuri corespund conjugatelor de PHB- $\beta\text{-CD}$, aduct cu sodiu incarcat cu una sau doua sarcini. Gradul mediu de polimerizare este 14, calculul fiind realizat pe baza speciilor dublu incarcate. Seria principala de picuri prezinta un increment de masa corespunzator polimerilor de tip PHB, de 86 Da pentru speciile incarcate cu o singura sarcina si de 43 Da pentru speciile incarcate cu doua sarcini. Corelatia dintre raportul m/z corespunzator picurilor observate si natura chimica a speciilor ionice a fost realizata pe baza urmatoarelor ecuatii:

- $m/z = 1134 + n \cdot 86 + 23$ in cazul speciilor aduct cu o singura sarcina
- $2 \cdot m/z = 1134 + n \cdot 86 + 2 \cdot 23$ in cazul speciilor aduct cu doua sarcini

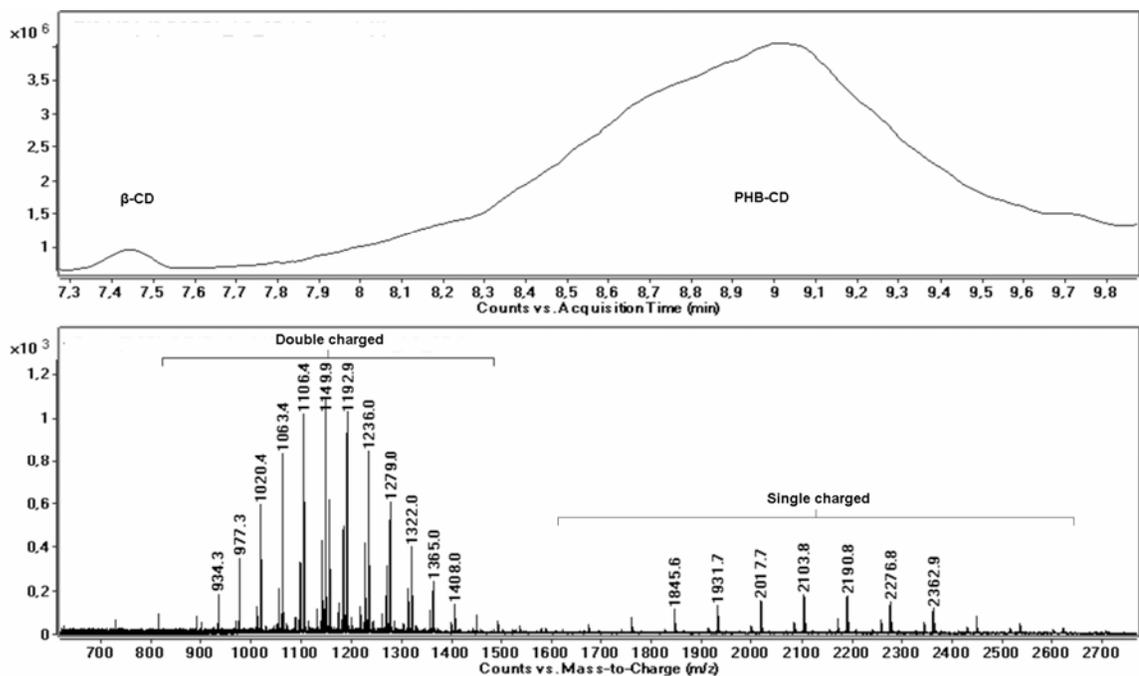


Figura IV.11. Spectrul LC MS si cromatograma TIC a fractiei F2

Calculul gradului mediu de polimerizare a luat in considerare picurile dublu incarcate datorita reprezentativitatii mai bune a acestora in cazul probei analizate precum si pornind de la ipoteza ca eficienta de ionizare este similara pentru toate speciile ionice considerate.

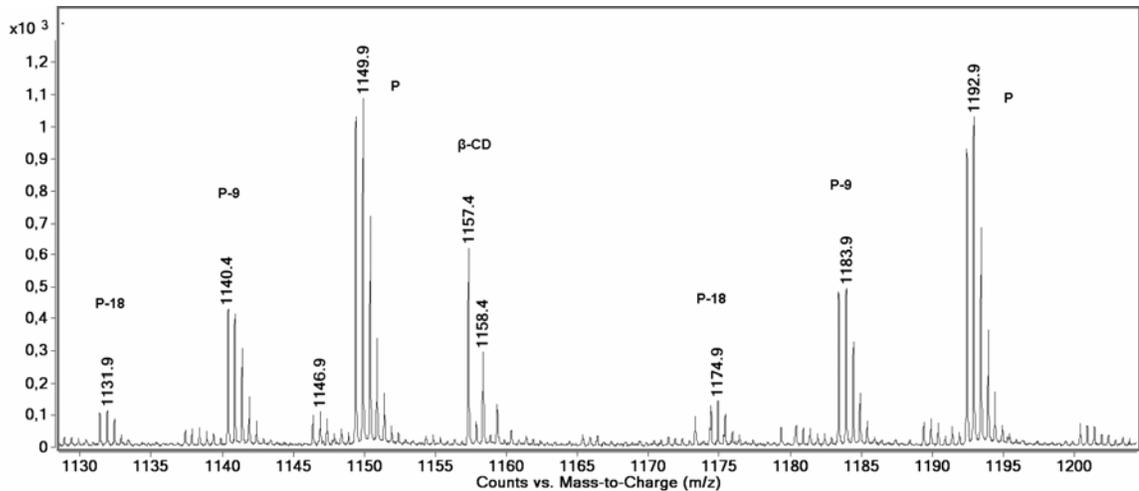


Figura IV.12. Spectrul LC MS PHB- β -CD; detaliu intre $m/z = 1130 - 1200$

Spectrul detaliat cuprinzand regiunea m/z dintre 1130 si 1200 (**figura IV.12.**) arata ca picurile caracteristice compusilor de tip PHB- β -CD (notate cu P) suntacompaniate de picuri cu o abundenta relativa mai joasa. Calculele efectuate au demonstrat ca aceste serii de picuri pot fi corelate cu prezenta unor specii notate cu P-9 si P-18 a caror structura este prezentata in **figura IV.13.** Aceste picuri sunt asociate cu specii de tip PHB- β -CD care au pierdut una ($9 \cdot 2$ – speciile P-9) sau doua ($18 \cdot 2$ – speciile

P-18) molecule de apa. O posibila explicatie pentru aparitia acestor picuri este posibilitatea ca speciile P-9 sa aiba un capat de lant transformat din acid 3-OH butiric (104 Da) in acid crotonic (86 Da) iar speciile P-18 sa aiba doua capete de lant cu acid crotonic.

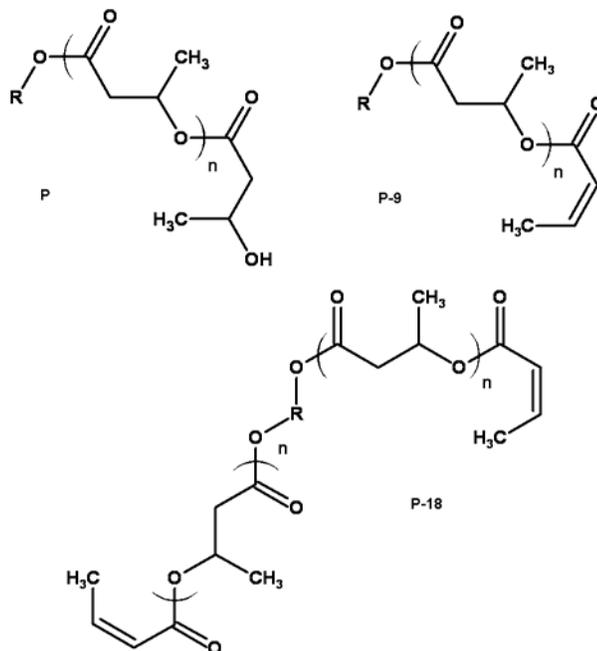


Figura IV.13. Structura speciilor PHB-β-CD: P, P-9 si P-18 (R reprezinta restul de CD)

IV.3.2.3. Caracterizarea fractiei F2 prin RMN

Rezultatele obtinute prin spectroscopie RMN indica faptul ca ROP a BL in prezenta CD si SP implica o substituire a gruparilor OH legate de C2. Spectrul fractiei F2, prezentat in **figura IV.16.**, contine picuri caracteristice CD si oligomerilor de PHB. Raportul dintre integralele picurilor suprapuse corespunzand protonilor H2 si H4 (intre 3,25 si 3,39 ppm) si integralele picurilor corespunzatoare H3, H5, si H6 (inte 3,45 si 3,70 ppm) este mai mic decat 0,5, valoare specifica ciclodextrinei native. Acest fapt se datoreaza modificarii deplasamentului chimic specific protonilor H2 in regiunea protonilor H3, H5 si H6 in urma esterificarii CD. In plus, raportul integralelor picurilor corespunzatoare H1/OH6/OH(2+3) este 1/1/1,66 si nu 1/1/2, raport caracteristic ciclodextrinei nemodificate. Acest fapt indica substituirea uneia dintre gruparile OH2 sau OH3. Esterificarea in pozitia C2 este sustinuta si de spectrul de corelare inversa H-C HMBC (**figura IV.16.**), in care se poate observa semnalul de corelare intre H2 la 3,6 ppm si atomul de C din gruparea carbonilica a PHB.

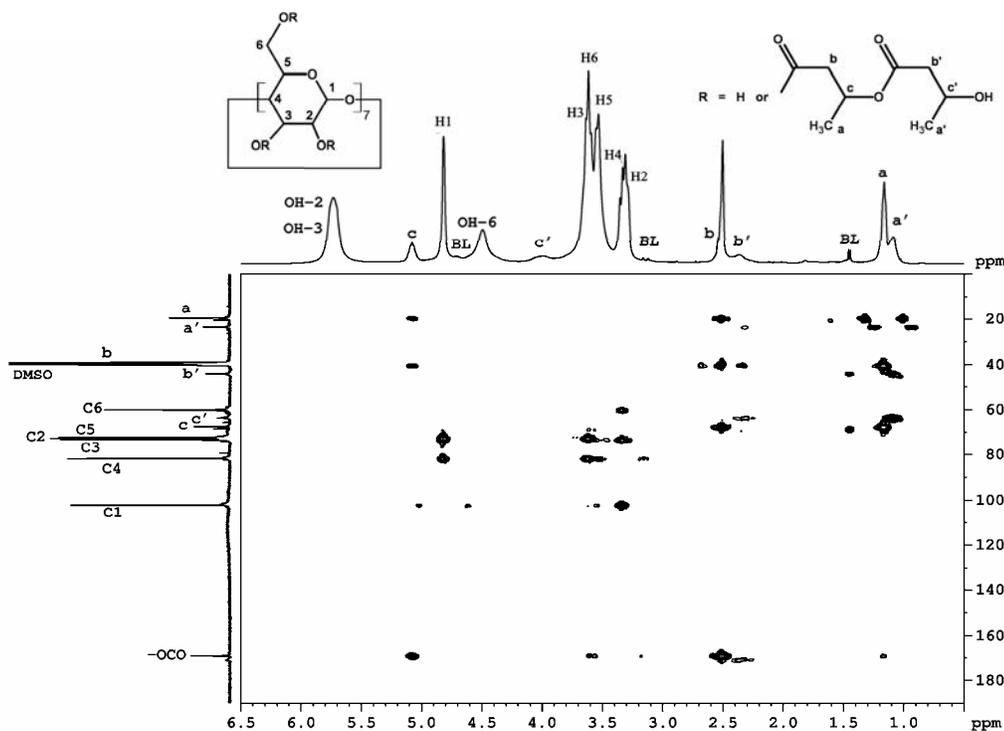


Figura IV.16. Spectrul RMN de corelare inversa proton-carbon HMBC al fractiei F2 [130]

Analiza spectrului ^1H RMN releva faptul ca lanturile de PHB esterificate pe CD au o masa moleculara relativ scazuta. Utilizand raportul integralelor picurilor caracteristice gruparilor metilice apartinand monomerilor din interiorul lanturilor PHB (1,19 ppm) si cele situate la capat de lant in vecinatatea gruparilor OH (1,10 ppm) se obtine o lungime medie a lanturilor de PHB de aproximativ trei unitati monomere. Picurile corespunzatoare capetelor de lant de acid crotonic nu au fost identificate, motivul probabil fiind concentratia redusa a acestora sau suprapunerii unor picuri caracteristice altor componente ale amestecului.

O alta informatie structurala necesara in descrierea compusilor PHB-CD consta in modul de distribuire a unitatilor monomere de PHB in raport cu gruparile OH posibilii initiatoare ale ROP apartinand moleculei de CD. Datele de literartura pledeaza pentru o structura in care CD este esterificata cu un singur lant de poliester fapt justificat de posibilele impidicari sterice care influenteaza reactia in faza de initiere. In principiu aceste afirmatii au la baza faptul ca molecula de CD odata esterificata nu mai permite formarea unui nou lant de polimer.

In urma studiului prezentat in aceasta lucrare, este evident ca o singura molecula de CD este capabila de multiple initieri. Acest fapt rezulta din comparatia rezultatelor obtinute prin LC MS si RMN. Lungimea medie a lanturilor de PHB calculata prin RMN este de trei unitati monomere in timp

ce numarul mediu de unitati monomere atasate unei singure molecule de CD este 14, dupa cum reiese din interpretarea rezultatelor LC MS. Aceasta discrepanta poate fi explicata doar prin atasarea a cel putin 5 lanturi de PHB compuse din trei unitati monomere unei molecule de CD. Aceste lanturi pot fi aleatoriu distribuite intre toate cele 21 de grupari OH apartinand unei molecule de CD. Astfel, fiecare pic observat in spectrul LC MS corespunde catorva izomeri de pozitie care nu au fost decelati de metoda de separare cromatografica utilizata.

Pe de alta parte, prezenta a doua unitati de acid crotonic in amestecul F2 (speciile P-18) indica atasamentul a cel putin doua lanturi de PHB la o singura molecula de CD.

IV.3.3. Sinteza si caracterizarea PHB-CD in prezenta α - si γ -CD

In cazul conjugatelor de tip PHB- α -CD spectrul LC-MS a evidentiat formarea de CD libera si conjugate cu un grad redus de polimerizare (**figura IV.18.**). Amestecul precipitat contine α -CD libera precum si conjugate de tip PHB- α -CD cu un grad de polimerizare cuprins in $n = 5$ si $n = 14$.

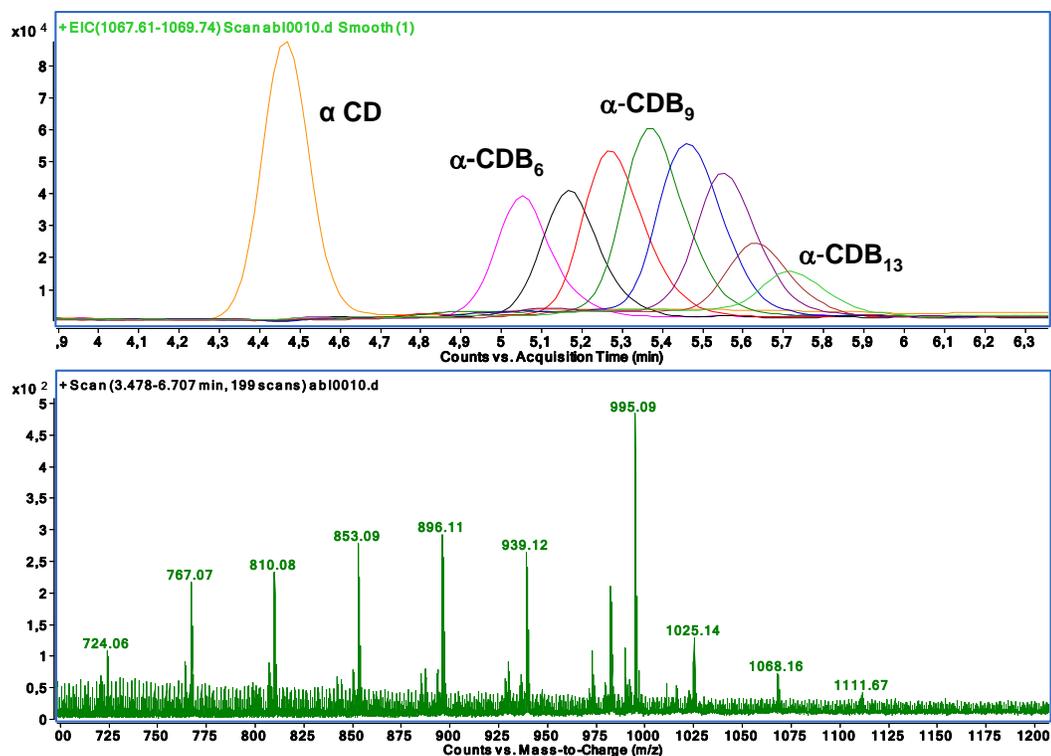


Figura IV.18. Spectrul LC MS al conjugatilor de tip PHB- α -CD si EIC

Masa compusilor determinati poate fi calculata utilizand relatia: $2 \cdot m/z = 972 + n \cdot 86 + 2 \cdot 23$, unde 972 reprezinta masa α -CD. Pe langa picurile dominante se pot observa si specii de tip P-9 corespunzand lanturilor de poliester terminate in acid crotonic. Separarea cromatografica a produsilor cu grade diferite de polimerizare este mai clara decat in cazul PHB- β -CD probabil datorita influentei

diminuate a ciclodextrinei, avand un volum hidrodinamic mai redus si astfel o influenta diminuada asupra proceselor de retentie specifice HPLC.

Comparand ROP in prezenta α -CD cu cea in prezenta β -CD se poate observa ca gradul de polimerizare maxim este mai mic, $n = 13$ fata de $n = 18$, in aceleasi conditii de reactie.

Spectrul LC MS obtinut in cazul conjugatelor de tip PHB- γ -CD confirma formarea derivatilor de γ -CD cu un numar maxim de 22 unitati monomere atasate. Picurile din spectru sunt asociate cu prezenta speciilor ionice dublu incarcate cu Na, determinarea structurala realizandu-se cu ajutorul urmatoarei relatii: $2*m/z = 1296 + n*86 + 2*23$, unde 1296 reprezinta masa γ -CD

Aceste rezultate in corelatie cu cele obtinute in cazul α -CD indica o anumita scadere a gradului de polimerizare odata cu diminuarea numarului de grupari OH ale CD sau cu reducerea dimensiunii cavitatii interne.

Obtinerea de derivati de CD pentru toate tipurile de oligozaharide ciclice utilizate indica faptul ca reactia are o buna aplicabilitate in sinteza acestui tip de compusi. Pentru a demonstra mai departe posibilitatea de a diversifica produsii obtinuti prin ROP in prezenta sistemului CD/SP a fost abordata ROP a ϵ -caprolactonei. Conditiiile de reactie au fost aceleasi iar produsii au fost analizati prin LC MS. Spectrul LC MS obtinut in cazul derivatilor PCL- α -CD este prezentat in **figura IV.20**. Picurile sunt asociate cu aducti de Na ai PCL- α -CD, formula de calcul aplicata fiind urmatoarea:

$$m/z = 972 + n*114 + 23, \text{ unde } 972 - \text{masa } \alpha\text{-CD}, 114 - \text{masa } \epsilon\text{-CL si } 23 - \text{masa Na}.$$

Se poate observa ca sistemul de reactie functioneaza si in cazul ϵ -CL cu toate ca energia necesara in reactia de deschidere de ciclu este mai mare decat in cazul BL. Gradul maxim de polimerizare al polimerilor obtinuti este $n = 11$ asemanator cu cel obtinut in cazul BL.

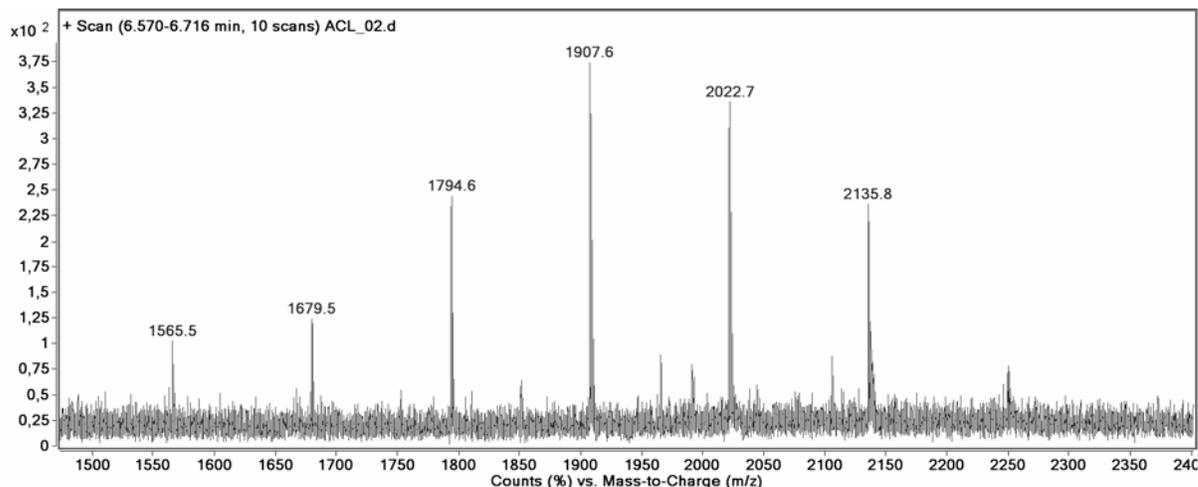


Figura IV.20. Spectrul LC MS al conjugatilor de tip PCL- α -CD

IV.3.4. Sinteza conjugatelor de tip PHB- β -CD - polimerizare in solutie

Reactivitatea gruparilor OH ale CD in reactii de tip ROP poate fi modificata prin efectuarea reactiei in solutie. Acest fapt a fost demonstrat de Shen si col.[115] in sinteza de derivati de CD esterificate cu oligolactida, utilizand drept mediu de reactie DMF la o temperatura de 80-85 °C. Produsii obtinuti au un grad maxim de polimerizare de $n = 5$ considerand lactida ca unitate monomera si $n = 10$ in cazul acidului lactic.

In acest context, lucrarea de fata isi propune determinarea diferentelor ce pot aparea in sinteza compusilor de tip PHB-CD daca reactia are loc in solutie. Reactantii utilizati in sinteza PHB-CD in masa au fost introdusi intr-o solutie de DMSO, respectand conditiile de reactie aplicate la sinteza in masa. Analiza prin LC MS a fost efectuata de aceasta data fara o separare prealabila a produsilor de reactie.

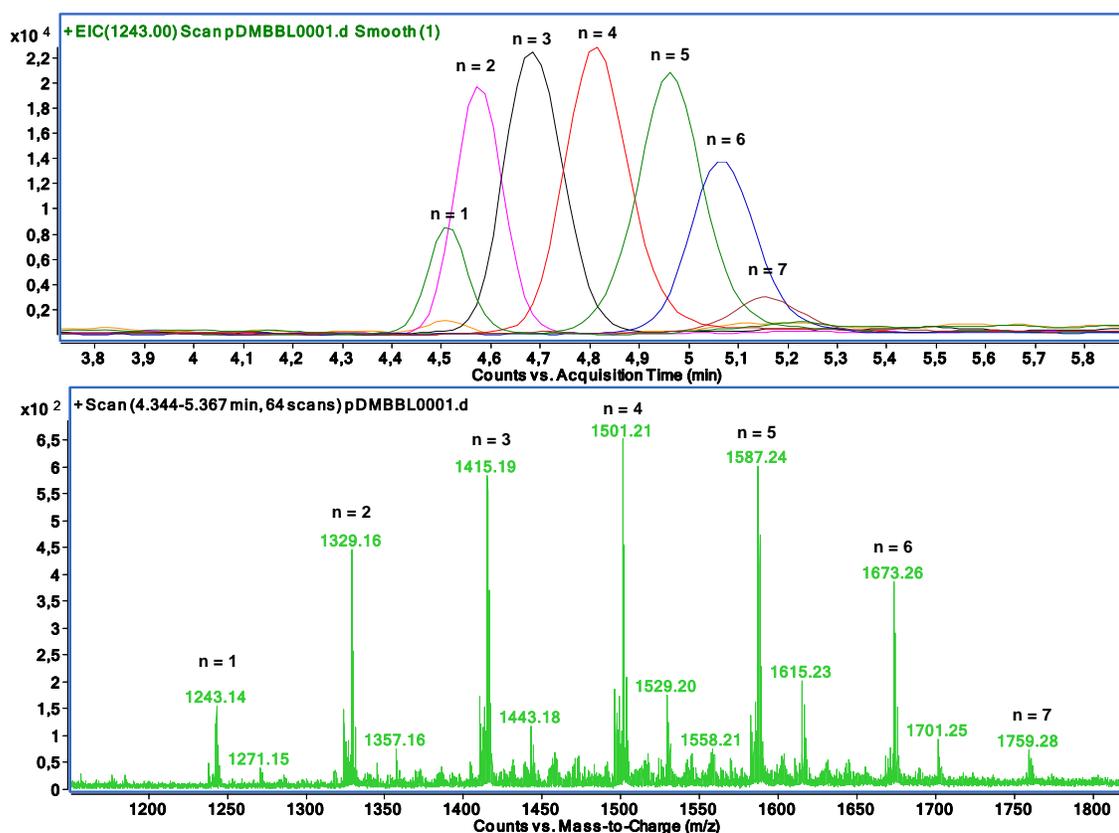


Figura IV.22. Spectrul LC MS si cromatograma TIC a speciilor de tip PHB- β -CD

Produsii de tip PHB- β -CD se regasesc pe cromatograma TIC in regiunea 4,4 - 5,3 min. Intensitatea picurilor cromatografice corespunzand speciilor de homopolimer PHB coeluate cu speciile PHB- β -CD este mai mare, dar avand in vedere ca eficienta de ionizare a celor dou specii este mult in favoarea homopolimerilor, diferenta in intensitate nu trebuie considerata din punct de vedere cantitativ.

Compararea speciilor cu structuri similare si mase moleculare apropiate ca valoare poate fi totusi interpretata intr-un mod semicantitativ

Analiza LC MS a produsilor de reactie de tip PHB- β -CD, prezentata in **Figura IV.22.**, releva faptul ca toata cantitatea de β -CD introdusa in reactie se regaseste in produsii de reactie sub forma esterificata. Acest fapt este surprizator din moment ce in cazul reactiei efectuate in masa o importanta cantitate de β -CD a ramas nereactionata. Picurile observate in spectrul LC-MS, precum si cele evidentiate in cromatograma EIC extrasa pentru valorile m/z corespunzatoare speciilor de tip PHB- β -CD au fost identificate conform formulei de calcul corespunzatoare. Numarul de unitati monomere atasate β -CD variaza intre $n = 1$ si $n = 7$ speciile predominante avand un grad mediu de polimerizare $n = 4$. Comparand rezultatele cu cele obtinute in cazul polimerizarii in masa se poate observa ca gradul de polimerizare este redus. Datele de literatura confirma deasemenea obtinerea de produse cu o valoare similara a gradului de polimerizare [115]. Totodata se remarca si lipsa produsilor rezultati in urma proceselor de degradare.

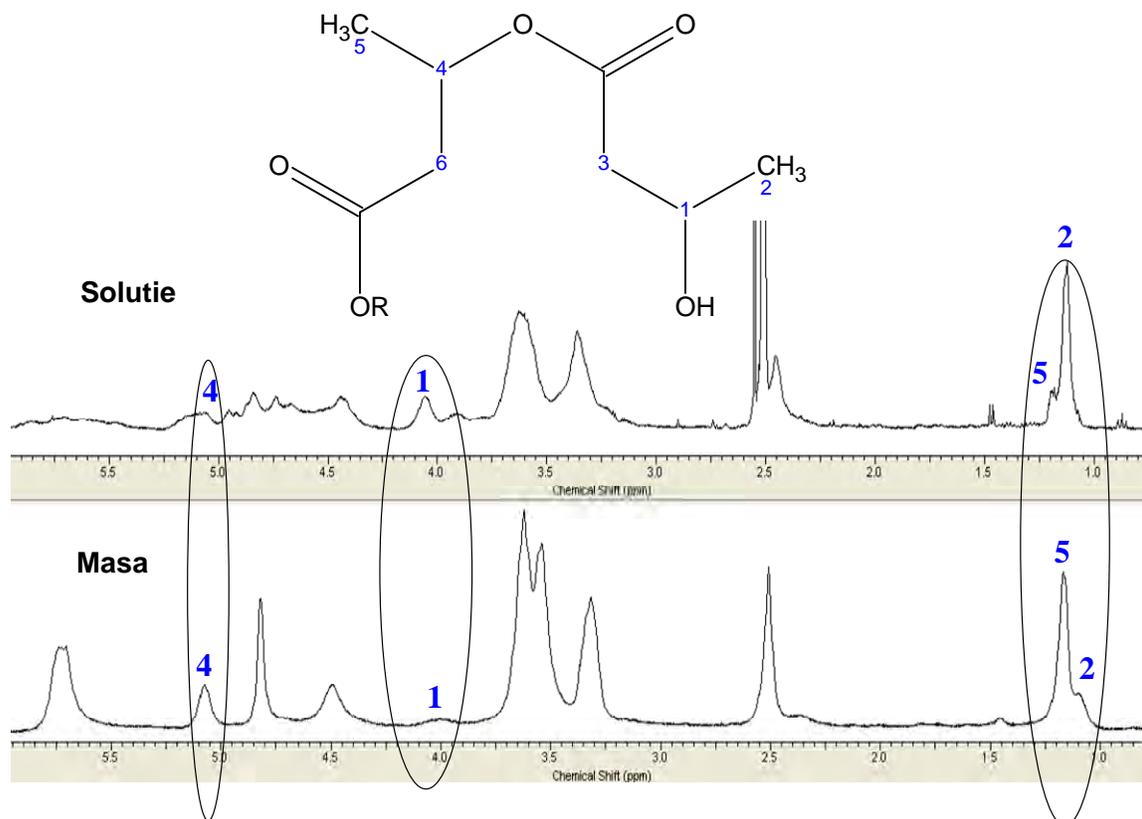


Figura IV.23. Spectrele ^1H RMN ale produsilor de tip PHB- β -CD obtinuti in masa si in solutie
(R = β -CD)

Deși rezultatele MS confirmă formarea produsilor de tip PHB- β -CD, totuși nu se pot obține informații cu privire la lungimea medie a lanțurilor de PHB grefate pe β -CD. Elucidarea acestui aspect

este oferita de studiul prin spectroscopie RMN. In **figura IV.23.** este prezentata o analiza comparativa a spectrelor ^1H RMN in cazul celor doua polimerizari, in masa si respectiv in solutie.

Raportul integralelor picurilor corespunzatoare protonilor metilenici apartinand unitatilor monomere capat de lant (notate cu 2) si a celor din interiorul lantului de PHB (notate cu 5) este mult in favoarea primelor specii, avand o valoare de 1/3. In consecinta se poate presupune ca unitatile monomere sunt predominant atasate de molecula de ciclodextrina in lanturi cu o singura unitate monomera. Inversarea raportului integralelor mai sus mentionate pentru polimerizarea in masa si cea in solutie este evidentiata in **figura IV.23.** Totodata, se poate remarca aplatizarea picurilor corespunzatoare ciclodextrinei fapt care sugereaza functionalizarea tuturor moleculelor din amestec.

IV.3.5. Caracterizarea derivatilor de CD prin tandem MS

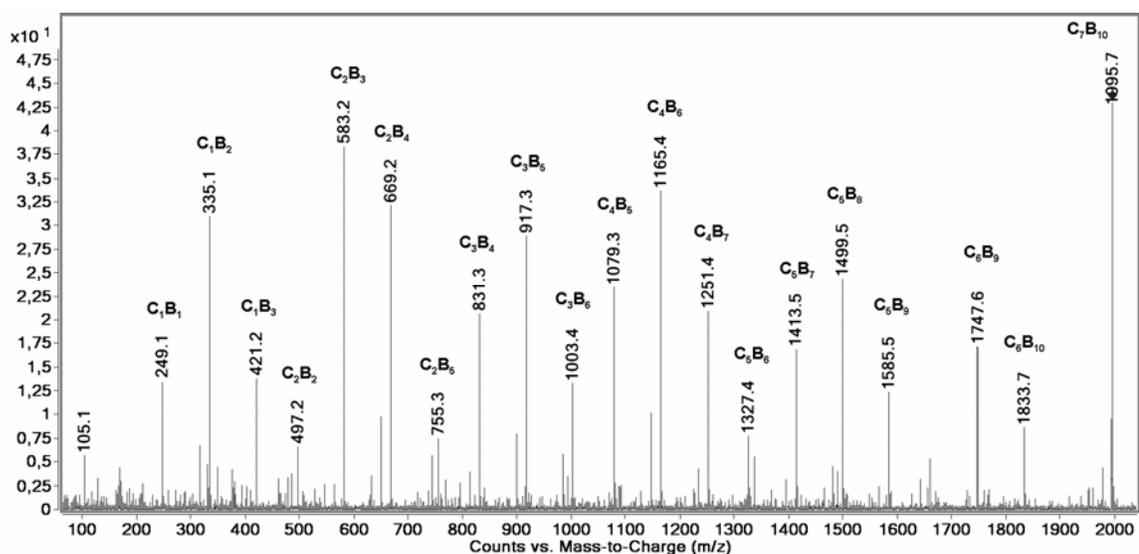


Figura IV.28. Spectrul de fragmentare al decamerului $[\text{PHB-}\beta\text{-CD+H}]^+$ cu $m/z = 1995$

Speciile ionice sunt fragmentate doar la nivelul legaturilor 1,4 glicozidice, functiunile grefate pe ciclodextrina nefiind implicate in proces. Seria C₁ ofera informatii despre numarul de unitati BL atasate de o singura unitate glicozidica. Astfel, se poate observa ca numarul de unitati BL atasate variaza de la 1 la 4, C₁B₂ (335 Da) avand intensitatea ce mai mare. In consecinta, putem considera ca numarul maxim de unitati BL atasate de o singura grupare glicozidica este 4, dar nu se poate spune cu certitudine daca aceste 4 unitati monomere formeaza un singur lant sau mai multe doar pe baza acestui spectru. Studiile de fragmentare confirma faptul ca produsii de tip PHB-β-CD sunt ciclodextrine esterificate in mod aleatoriu cu lanturi scurte de PHB. Utilizarea cationilor de sodiu in fragmentare conduce la obtinerea de informatii privind substituentii ciclodextrinei. In **figura IV.29.** este prezentat spectrul de fragmentare al pentamerului $[\text{PHB-}\beta\text{-CD+Na}]^+$ cu raportul $m/z = 1587$.

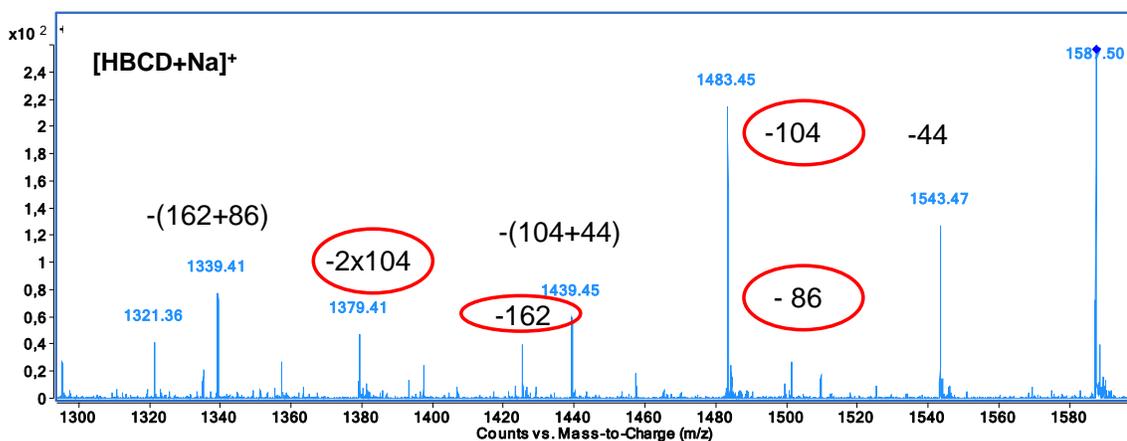


Figura IV.29. Spectrul de fragmentare al pentamerului [PHB-β-CD] cu $m/z = 1587$

Modul de fragmentare evidentiaza clivajul legaturilor esterice si implicarea lanturilor de PHB in procesele de fragmentare, fapt justificat de prezenta pierderilor de 104 Da caracteristice PHB pornind din capatul hidroxilic al catenei. Fragmentul rezultat din pierderea neutra a doua molecule de acid 3-OH butiric ($2 \cdot 104$) demonstreaza ca β-CD este esterificata cu mai multe lanturi de PHB. Aceasta observatie infirma teoria conform careia β-CD nu este capabila de a initia formarea a mai mult de un lant de poliester datorita impiedicarilor sterice.

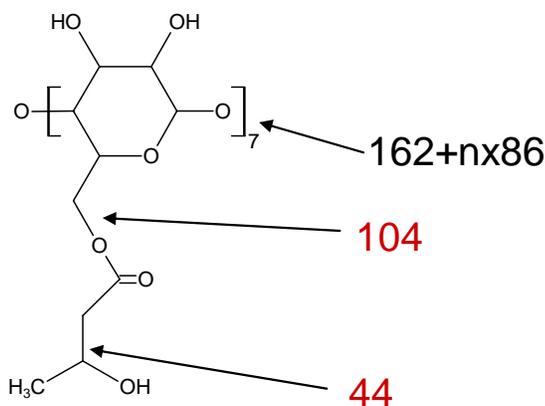


Figura IV.30. Reprezentarea modului de fragmentare a speciilor de tip [PHB-β-CD+Na]⁺

O alta cale de fragmentare specifica speciilor de tip [PHB-β-CD+Na]⁺ este pierderea de 44 Da. O posibila explicatie pentru aparitia acestui fragment este clivajul legaturii C-C indicate in **figura IV.30.** Se poate observa deasemenea si clivajul legaturii esterice C-O acil prin rearanjari de H 1,3 avand ca rezultat pierderea $\Delta m = 86$ Da.

Capitolul V. Aplicatii ale ESI – MS cuplata cu tehnici de separare cromatografice in analiza copoliesterilor

V.3.1. Caracterizare copolimerilor DDBL prin LC MS

Reactia de deschidere de ciclu a BL in prezenta DD a avut ca rezultat un amestec complex de specii oligomerice. Din punct de vedere teroretic o astfel de reactie poate conduce la homopolimeri pe de o parte si la copolimeri pe de cealalta parte. Deoarece temperatura de reactie este relativ ridicata, pe langa formarea de specii de PHB initiate de acidul 12-OH dodecanoic, se mai pot forma si specii copolimere rezultate in urma eventualelor reactii de copolicondensare sau transesterificare intra si intermoleculara a lanturilor de polimeri deja formate. In consecinta, caracterizarea amestecului de reactie a fost realizata prin LC MS.

O prima abordare din punctul de vedere al tehnicii cromatografice a fost separarea in conditii similare cromatografiei lichide la punctul critic de adsorbtie [156-163]. Pseudo-LCCC este independenta de masa depinzand doar de eterogenitatea chimica in cazul polimerilor de functiunile capat de lant. In conditiile LC aplicate amestecul de reactie a fost separat in 6 fractii (**figura V.3.**) descrise in continuare.

Pe intervalul $RT = 1,3 - 1,6$ min au fost eluate speciile de homopolimeri PHB. Spectrul MS insumat pe perioada de elutie demonstreaza continutul in polimeri de tip PHB cu capete OH si COOH (PHB-A) impreuna cu specii de PHB terminate in acid crotonic si COOH (PHB-B). Picurile corespunzatoare din spectrul ESI MS prezinta o succesiune caracteristica de 86 Da cu picul de baza situat la 729 Da. De asemenea se pot remarca si o serie de picuri corespunzand speciilor aduct cu doua sarcini. Speciile ionice observate in spectru sunt preponderent sodiate dar pot fi observate specii ionizate cu amoniu sau protonate. O a doua fractie cromatografica cuprinza intre 1,6 si 2 min contine de fapt doua tipuri de lanturi oligomerice. Spectrul obtinut nu este unul pur deoarece homopolimerii de tip PHB au o perioadade de elutie mai indelungata suprapunandu-se peste speciile de copolimeri de tip DDBL avand o unitate monomera de DD si un numar variabil de unitati monomere de BL. Coelutia PHB cu speciile copolimere DDBL produce o scadere a eficientei de ionizare a ambelor specii semnalata de scaderea brusca in intensitate a TIC in regiunea $RT = 1,6$ min. Speciile ionice observate sunt cuprinse intre $m/z = 325$ si 1271 corespunzand copolimerilor DD_1BL_n cu n avand valori cuprinse intre 1 si 12. Cea de a treia fractie eluata intre $RT = 2,0 - 2,4$ min contine copolimeri DDBL cu doua unitati DD.

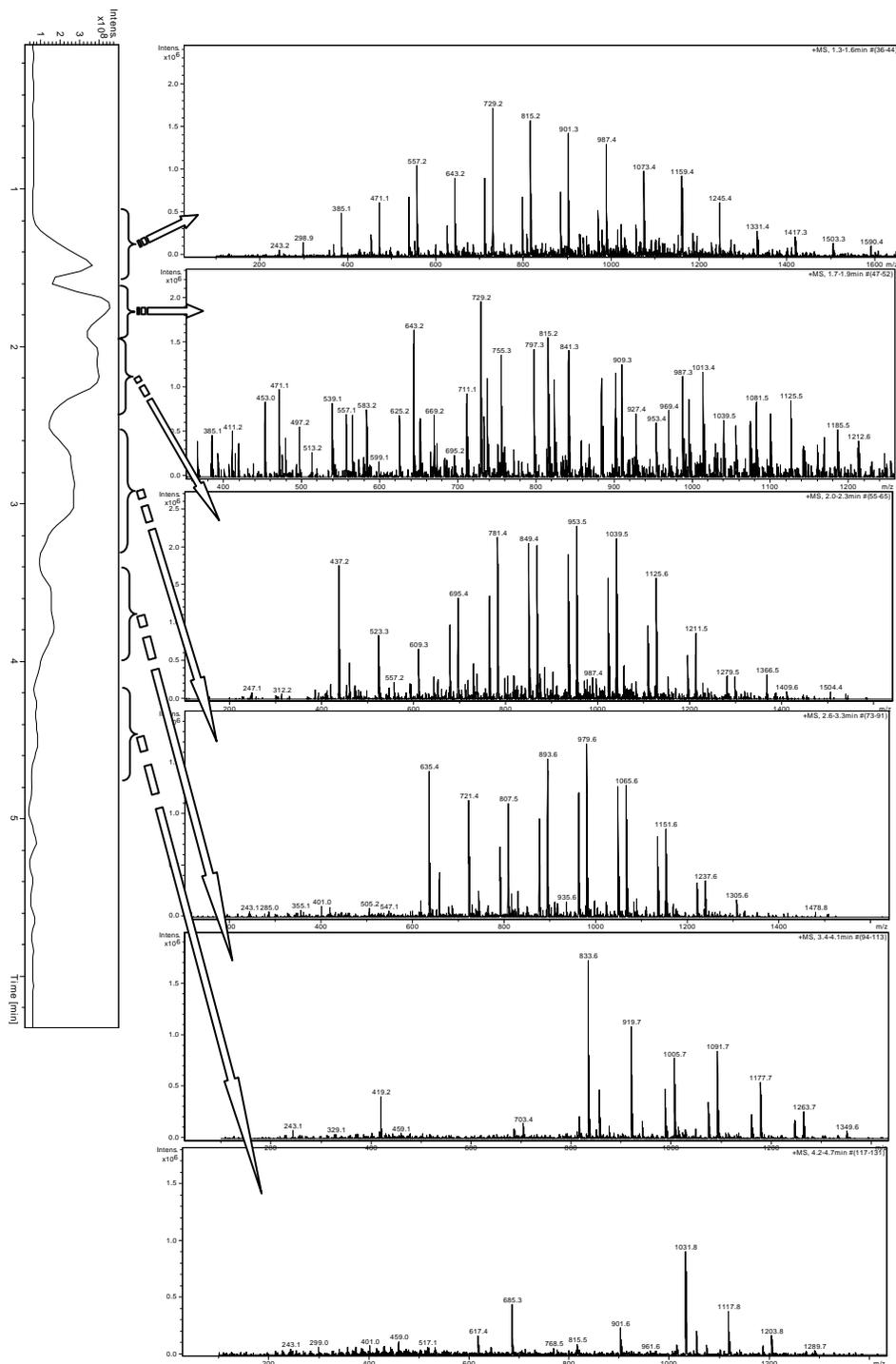


Figura V.3. Separarea cromatografică a copolimerilor DDBL cu detecție ESI MS

În mod similar speciilor de tip DD_1BL_n este însoțită de specii având o masă mai mică cu 18 Da. Spectrul de masă indică eluția speciilor de tip DD_2BL_n cu n cuprins între 0 și 11. Celelalte fracții 4, 5 și 6 conțin specii DDBL cu număr crescător de unități monomere de tip DD. Numărul redus de picuri observate în spectrele de masă se poate explica prin creșterea preponderenței unităților comonomere de tip DD. De altfel se poate observa și din alura TIC faptul că odată cu creșterea numărului de unități DD

are loc o scădere în intensitate. Probabil că monomerii DD având o polaritate ușor redusă în comparație cu BL nu favorizează procesul de ionizare ESI.

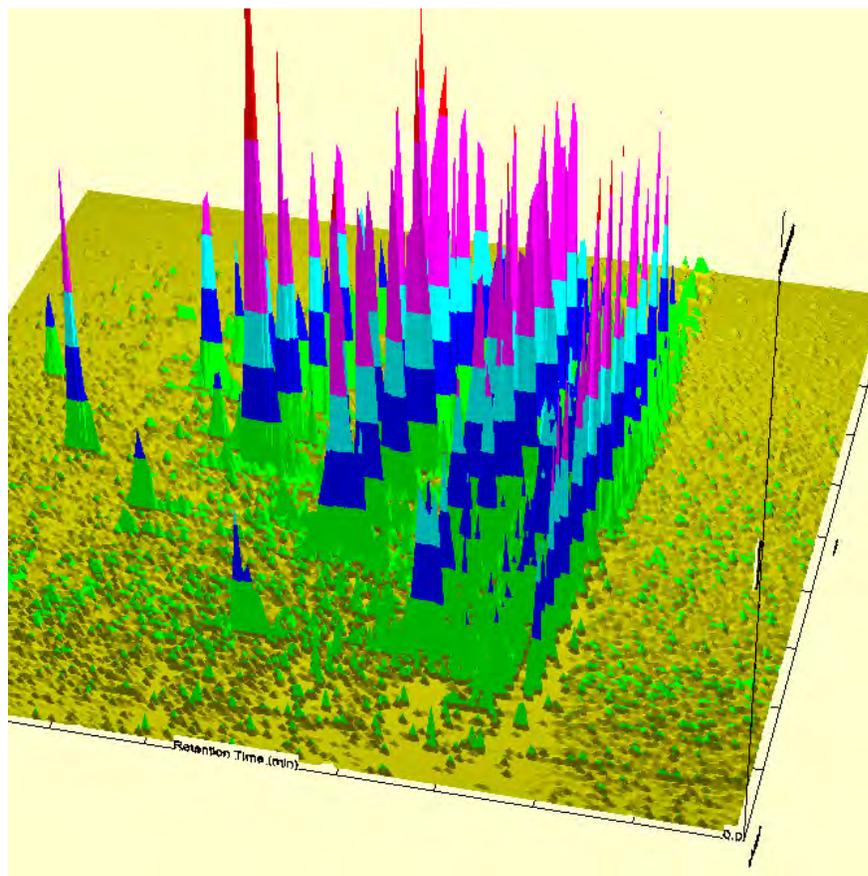


Figura V.4. Reprezentare 3D a separării pseudo-LCCC a copolimerilor de tip DDBL

Separarea cromatografică a amestecului de reacție a avut loc printr-un mecanism de retenție specific. Astfel, componenta DD din amestec suferă o adsorbție mult mai pronunțată decât speciile de tip BL conducând la o separare de tip pseudo-LCCC. În general, LCCC utilizează eluția izocratică la anumite temperaturi. În cazul de față eluția a fost realizată în gradient de solvenți, utilizându-se drept cosolvenți THF și AcN. THF poate solubiliza atât homopolimerii PHB cât și copolimerii DDBL. În schimb AcN solubilizează doar PHB sau secvențele de 3OH-butirat din componenta copolimerilor DDBL. În aceste condiții, utilizând un gradient pornind de la conținut mare de AcN se observă că homopolimerii PHB sunt eluați în bloc, netinându-se cont de masa moleculară a acestora pentru că mai apoi să fie eluate speciile DD într-o ordine crescătoare. Acest experiment oferă rezultate similare cu cele obținute în cazul separărilor combinate de tip SEC-LCCC dar prezintă avantajul că se utilizează o singură coloană. Speciile eluate care au putut fi observate în condițiile LC ESI MS ating o masă moleculară maximă de 1600 în cazul PHB și 1400 în cazul speciilor de copolimeri. Observarea categoriilor de copolimeri în funcție de numărul de unități DD conținute facilitează descrierea

amestecului de reacție. Modul de eluție al amestecului de reacție poate fi mai ușor observat din punct de vedere intuitiv cu ajutorul proiecțiilor tridimensionale în care o dimensiune este reprezentată de m/z , a doua dimensiune timpul de retenție și cea de a treia dimensiune este intensitatea picurilor MS (**figura V.4.**).

V.3.3. Caracterizare copolimerilor DDBL prin MS/MS

Distributia comonomerilor în copolimerii de tip DDBL obținuți prin reacția de deschidere de ciclu a β -BL în prezența acidului dodecanoic este în mod probabil de tip random datorită reacțiilor de transesterificare intermoleculară. Modul de înlanțuire a unităților monomere poate fi studiat prin MS/MS. Spectrul de fragmentare al oligomerilor DD_1BL_3 este prezentat în figura xx.

Fragmentarea are loc prin clivajul legăturilor esterice prin rearanjări de H 1,4 în mod similar poliesterilor prezentați în capitolul II. Diferențele care apar în interpretarea spectrului sunt cauzate de prezența a două tipuri de unități monomere. Astfel, dacă în cazul homopolimerilor seriile de picuri care apar sunt datorate doar funcțiunilor capăt de lanț, în cazul copolimerilor seriile de picuri fragment se multiplică pe de o parte datorită simplei prezențe a unității comonomere și pe de altă parte datorită alternanței diferite a comonomerilor în catena de bază. Pentru a exemplifica acest lucru a fost supusă fragmentării o moleculă relativ simplă, conținând doar o unitate de DD și 3 unități de BL. În **figura V.10.** sunt prezentate tipurile de structuri care pot corespunde ionului părinte cu $m/z = 497$.

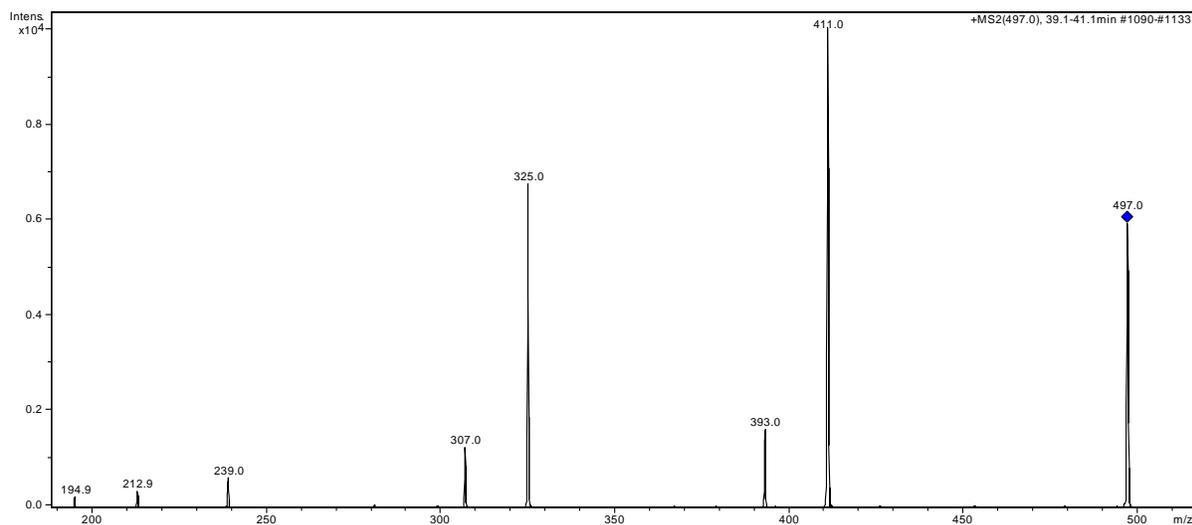


Figura V.10. Spectrul de fragmentare MS/MS al oligomerilor $[DD_1BL_3+Na]^+$

Formarea acestor structuri este perfect posibilă, în condițiile de obținere a oligomerilor putând avea loc reacții de transesterificare. Ținând cont de studiul realizat la capitolul II privind fragmentarea poliesterilor de tip PHB, pierderea de 86 Da justifică structuri de tip **I**, **II** și **III**. În acest caz, pierderea

de 86 Da are loc din capatul carboxilic al polimerilor de tip PHB. O pierdere de 172 Da poate fi asociată unor structuri de tip **I** și **II** reprezentând clivajul a două unități monomere de BL din capatul carboxilic al lanțului. Observarea unei pierderi inițiale de 198 Da ar justifica prezența unui compus de tip **IV**, totuși intensitatea picului de la 299 Th este mult redusă în comparație cu celelalte picuri. Pe de altă parte prezența picului de la 239 Th este corelată cu fragmentarea unei structuri de tip **I** (239 Da reprezintă o moleculă de acid lauric sodiat).

Pierdere neutră de 104 Da (fragmentul având 393 Da) corespunde pierderii de acid 3OH-butiric și este asociată cu structurile de tip **II**, **III** și **IV** în timp ce pierdere de 190 Da (fragmentul având 307 Da) corespunde unor structuri de tip **III** și **IV**.

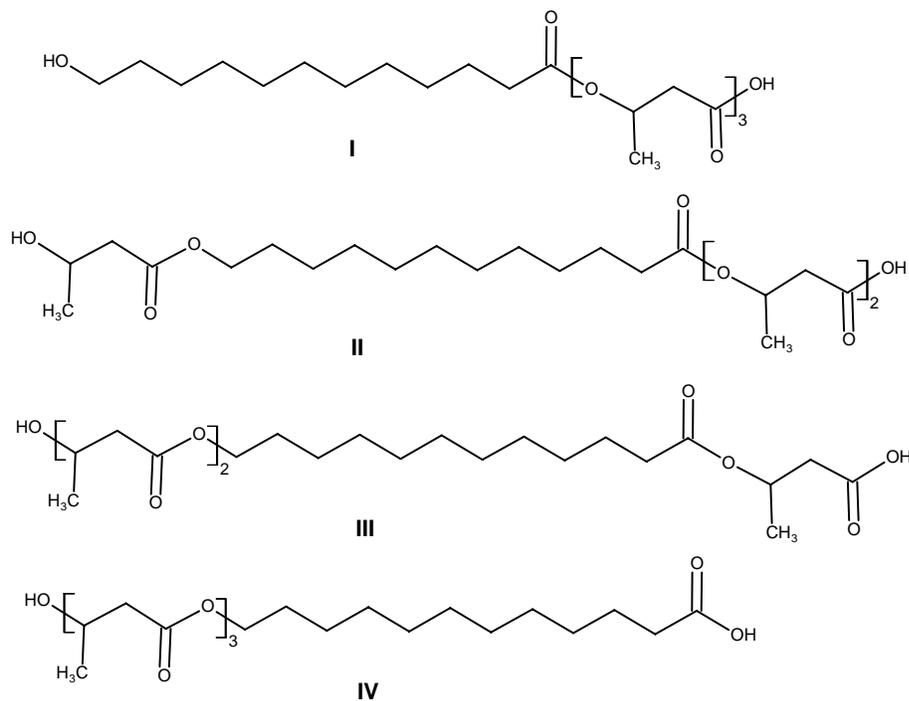


Figura V.11. Structuri asociate picului MS cu $m/z = 497$ (DD₁BL₃)

Fragmentul cu masă de 195 Da (pierdere neutră de acid 3OH-butiric și o unitate monomera de dodecanoat – 104 + 198) marchează prezența unei structuri de tip **II** în timp ce fragmentul cu masă de 213 Da (pierdere neutră de 3OH-butirat și 12OH-dodecanoat – 86 + 198) corespunde unei structuri de tip **III**. Intensitățile relative ale fragmentelor observate în spectrul MS/MS nu reprezintă o măsură cantitativă a speciilor izomere prezente în amestecul analizat acestea depinzând mai degrabă de parametrii cinetici care guvernează procesele de fragmentare responsabile de formarea fragmentelor în cauză. Spre exemplu pierderile de comonomerului 12OH-dodecanoat conduc la formarea de fragmente având o intensitate relativă redusă în comparație cu pierderile de 3OH-butirat.

Analizele de acest tip pot confirma compoziția copolimerilor analizați și totodată faptul că distribuția comonomerilor este aleatorie. Totuși, odată cu creșterea numărului de comonomeri se poate remarca o tendință de copolimerizare bloc și de reducere a numărului de structuri posibile. Spre exemplu, în cazul speciilor de tip DD_2BL_6 spectrul de fragmentare (**figura V.12.**) corespunde unei singure structuri, de tip BL_5-DD_2-BL .

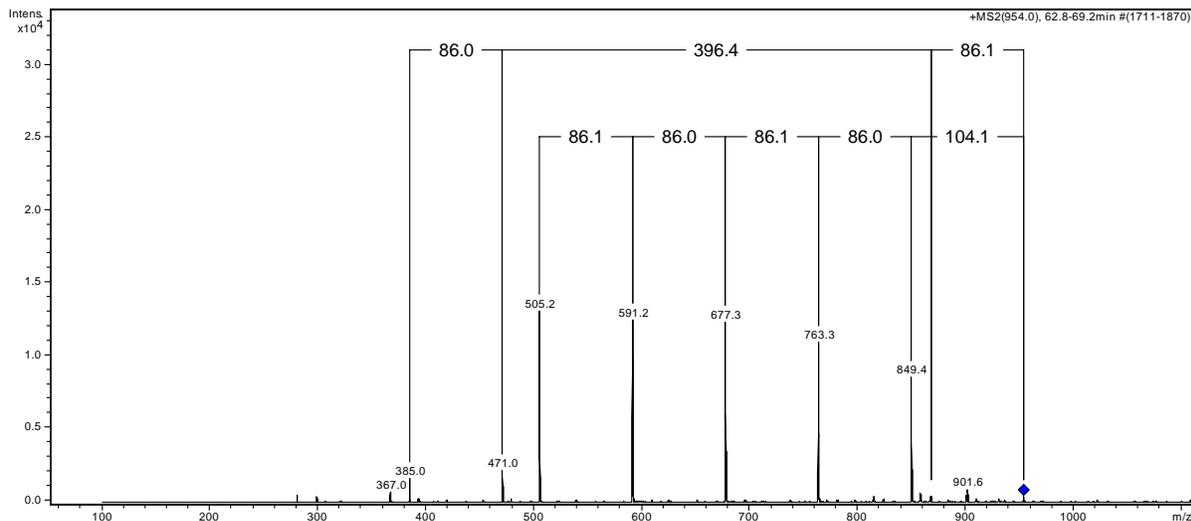


Figura V.12. Spectrul de fragmentare MS/MS al oligomerilor $[DD_2BL_6+Na]^+$

Astfel, pierderea de $86 + 396$ Da justifică o structură având o unitate de 3OH butirat și 2 unități de 12OH dodecanoat, pornind din capatul carboxilic al catenei de baza. Călea de fragmentare, pornind din capatul hidroxilic al catenei este complementară și argumentează existența unei secvențe de PHB având 5 unități monomere.

Modul de interpretare propus pentru speciile DD_2BL_6 se verifică și în cazul speciilor DD_2BL_5 după cum se poate observa din spectrul MS/MS prezentat în **figura V.13**. Ionii părinți de la 867 Th sunt fragmentați în două moduri:

- pornind de la capatul hidroxilic al catenei când se pierd specii neutre formate din acid 3OH butiric (104 Da) și un număr de patru unități 3OH-butirat ($4 \cdot 86$ Da)
- pornind de la capatul carboxilic al catenei se pierd specii continuând o unitate de 3OH-butirat (86 Da) și două unități 12OH-dodecanoat ($2 \cdot 198$ Da).

Ținând cont de căile de fragmentare observate se poate presupune că în catena oligomerilor DD_2BL_5 comonomerul prezintă o succesiune de formă BL_4-DD_2-BL . Pe baza observațiilor făcute în cazul speciilor de copolimeri având două unități DD se poate concluziona că acestea formează diade.

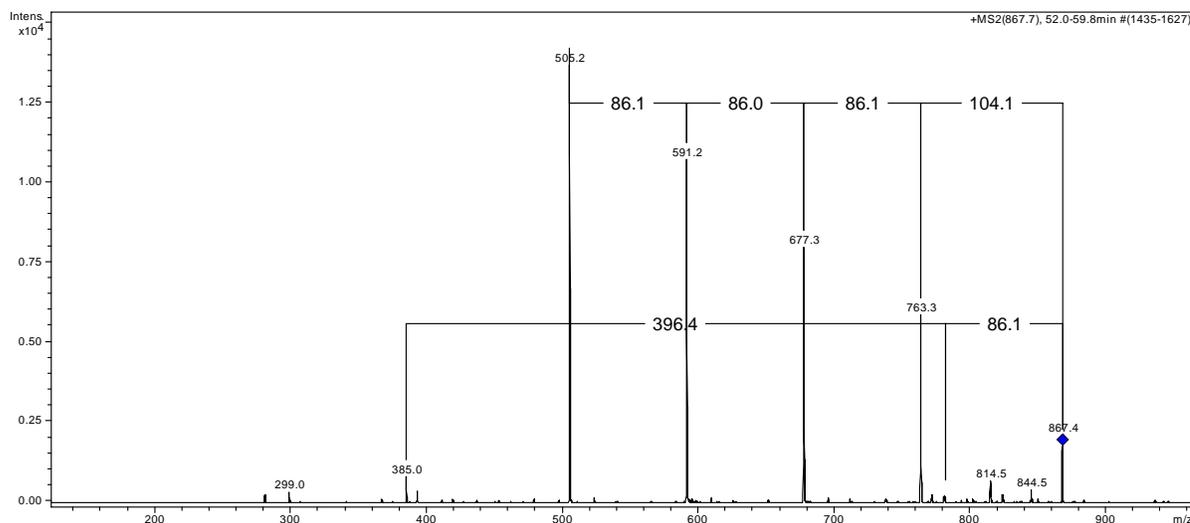


Figura V.13. Spectrul de fragmentare MS/MS al oligomerilor $[DD_2BL_5+Na]^+$

Se poate observa și de această dată că procesele de eliminare a fragmentelor neutre conținând 12OH-dodecanoat conduc la formarea de ioni fragment cu intensitate relativă redusă în comparație cu speciile ionice produse prin eliminarea secvențelor de 3OH-butirat. Probabil că acest fenomen este cauzat de procese de fragmentare concurențiale care conduc la detașarea cationului de sodiu și implicit la formarea de specii neutre. Secvențele de 12OH-dodecanoat conțin un număr redus de legături heteroatomice și implicit de dipoli pentru o anumită lungime a catenei, comparativ cu cele de 3OH-butirat, care să permită coordonarea cationului de Na. Totodată, procesele de fragmentare sunt catalizate de cationul de Na iar în procesele de activare colizională sarcina poate fi detașată dacă densitatea dipolilor care coordonează sarcina scade sub o anumită limită. Astfel, odată cu creșterea numărului de unități de tip DD se poate observa o scădere a intensității picurilor fragment. Spre exemplu, speciile ionice care conțin trei unități comonomere DD, DD_3BL_3 prezintă un spectru de fragmentare (**figura V.14.**) cu doar două picuri fragment marcând pierderea neutră din capătul OH al catenei a unei secvențe de două unități BL (104 + 86 Da). Astfel, în condițiile utilizării Na ca agent de cationizare, observarea unor profile de fragmentare care să conțină informații asupra structurii ionului parinte devine dificilă odată cu creșterea numărului de unități dodecanoat din catena de bază.

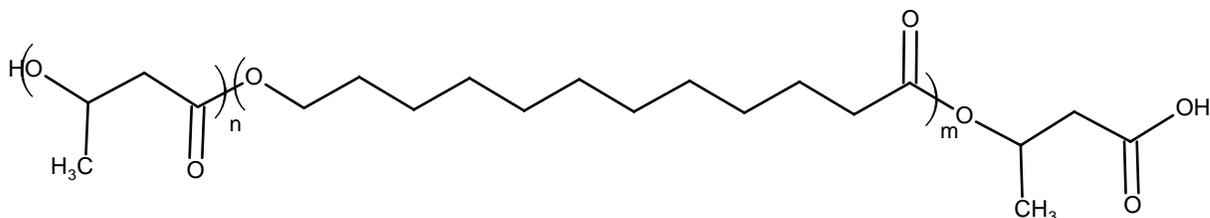


Figura V.15. Structura probabilă a copolimerilor DDBL

Experimentele de tip MS/MS efectuate aduc informații în sensul confirmării tipului de monomeri prezenți în catena copolimerilor de tip DDBL. Totodată, se poate evidenția succesiunea comonomerilor în catena de bază. Astfel, dacă în cazul speciilor de copolimeri cu o singură unitate DD în catena de bază numărul de structuri evidențiate este destul de ridicat, odată cu creșterea numărului de comonomeri DD se remarcă o anumită tendință a acestora de a forma diade. În plus, dispunerea unităților BL prezintă un anumit tipar și anume, o singură unitate BL este legată de capatul carboxilic al catenei următoare de unitățile DD pe de o parte, iar pe de altă parte, celelalte unități BL sunt dispuse în bloc la capatul hidroxilic al catenei (**figura V.15.**).

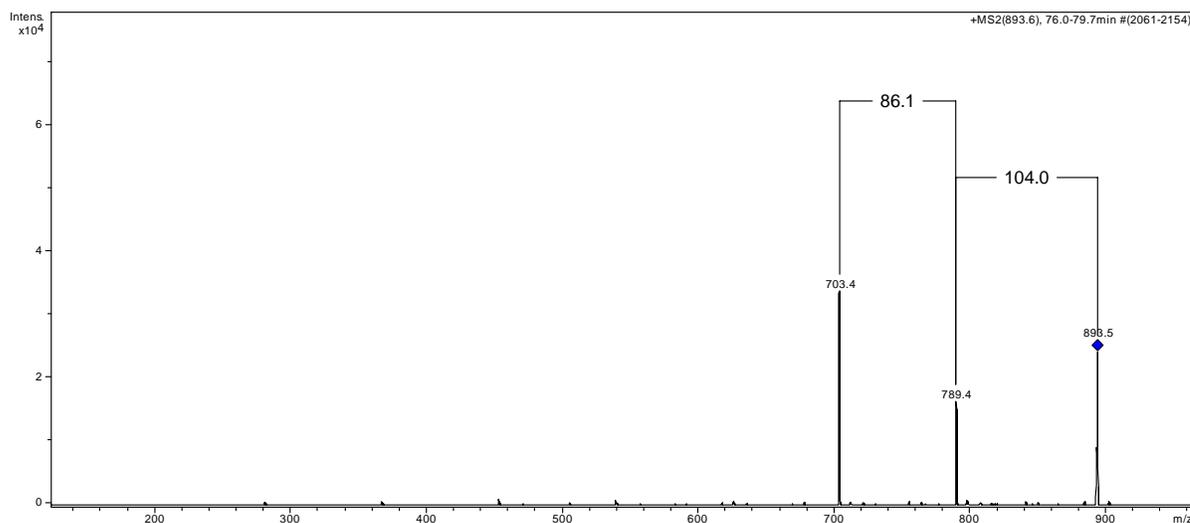


Figura V.14. Spectrul de fragmentare MS/MS al oligomerilor $[DD_3BL_3+Na]^+$

Reacția de copolimerizare a β -BL cu DD la 70 °C, în masă, conduce la formarea speciilor de homopolimeri de tip PHB și copolimeri de tip DDBL. Mecanismul probabil de reacție presupune reacții de tip ROP inițiate cu preponderența de speciile carboxilice ale DD în condițiile de reacție specificate. Cu toate că funcțiunea OH a DD este capabilă de a deschide ciclurile de β -BL, studiile prezentate în literatură (menționate și pe parcursul capitolului IV) au dovedit că inițierea produsă de speciile carboxilice are un randament mult superior celei produse de speciile hidroxilice. Studiile MS/MS au arătat, în mod surprinzător, că speciile comonomere DD formează diade și triade fără imixțiuni ale comonomerilor BL. În consecință se poate presupune că pe parcursul reacției acidul 12OH-dodecanoic este implicat în reacțiile de deschidere de ciclu dar și în reacții de homopolicondensare. Totodată, gruparea OH a DD este implicată în reacții de condensare cu oligomeri PHB fapt dovedit de detectia secvențelor PHB la capatul OH al catenelor. Moleculele de DD participă și la reacții de transesterificare. Preponderența reacțiilor de homopolimerizare a β -BL este o altă

caracteristica a sistemului de reacție fiind evidențiată prin detectia de homopolimeri PHB având capăt de lanț funcționali de tip acid 3OH-butiric sau acid crotonic.

V.4. Analiza copolimerilor pe baza de ϵ -caprolactona și ω -pentadecalactona

În secțiunea următoare este abordată caracterizarea copolimerilor CL-PDL sintetizați enzimatic prin cromatografie lichidă cu detectie ESI MS. Copolimerii sunt obținuți prin e-ROP a PDL inițiată de oligomeri de caprolactona OH telechelici având prin urmare o înlanțuire de tip bloc. Modul de înlanțuire a comonomerilor este demonstrat prin ESI MS/MS.

V.4.1. Caracterizare copolimerilor CL-PDL prin LC MS

Procedura de separare pusă la punct în cazul copolimerilor de tip DDBL a fost utilizată și în cazul copolimerilor CL-PDL. Astfel, separarea diferitelor fracții oligomerice este realizată în funcție de numărul de unități monomere de PDL și neglijând unitățile comonomere de ϵ -caprolactona. Cromatograma LC MS prezentată în **figura V.16**, argumentează modul de separare menționat.

Picul cromatografic eluat în intervalul 1,4-1,6 min este asociat oligomerilor de caprolactona nereacționați. Produsul comercial (PCL diol) utilizat conține doar un singur tip de oligomeri formați din lanțuri de PCL cuplate prin legături esterice. Deși agentul de cuplare este un dietilen glicol (PCL1) s-a observat și prezenta unor lanțuri PCL cuplate prin tetraetilen glicol (PCL2).

Picurile MS care corespund celor două tipuri de PCL se regăsesc în spectrul xxx, în serii succesive având un increment de masă de 114 Da. Spre exemplu picul de la 357 Th corespunde unui oligomer PCL având două unități de caprolactona cuplate prin dietilen glicol ($2 \cdot 114 + 106 + 23$) în timp ce picul de la 331 Th corespunde unei molecule conținând o unitate de caprolactona esterificată cu tetraetilen glicol ($114 + 194 + 23$).

În intervalul de timp 1,7 -2,3 min sunt coeluate mai multe tipuri de specii. În spectrul de masă sumat pe perioada de eluție se remarcă un pic la 453 Th care corespunde speciilor de PCL1 ciclice. De asemenea se pot observa specii de copolimeri PCL1-PDL1 fiind asociate seriei de picuri cu $m/z = 369, 483, 597$, etc. Aceste specii conțin o singură unitate de PDL. Pe lângă aceste specii se observă și copolimeri de tip PCL2-PDL regăsindu-se în spectrul de masă la $m/z = 457, 571, 685, 799$, etc.

Următorul pic cromatografic cuprins în intervalul 2,4 și 3,7 min sunt coeluate trei tipuri de lanțuri de copolimeri. Picurile cele mai pronunțate din punctul de vedere al intensității relative conțin specii inițiate de PCL1 având două unități monomere de PDL. Valorile m/z corespunzătoare se regăsesc la 609, 723, 837, 951 și 1065 Th. O altă serie de picuri cu increment de 114 Da reprezintă speciile eluate corespunzând copolimerilor care conțin PCL2 având în componență tot două unități PDL. O a treia serie

de joasă intensitate corespunde copolimerilor care conțin oligomeri de policaprolactona fără etilen glicol. Valoarea m/z corespunzătoare acestor picuri este de 521, 735 și 849 Th.

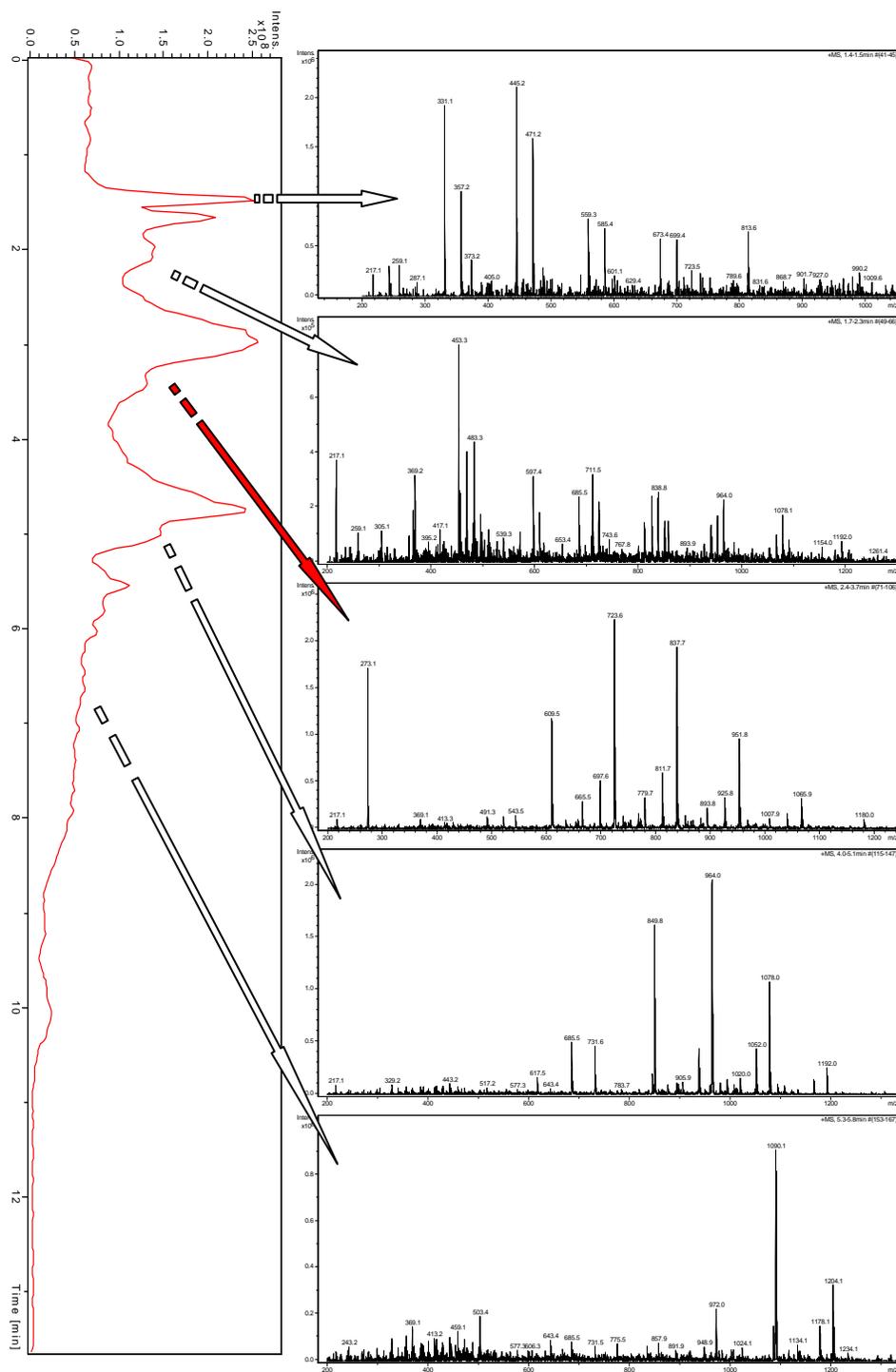


Figura V.16. Separarea cromatografică a copolimerilor CLPDL cu detecție ESI MS

Speciile de copolimeri având în componență trei unități comonomere de PDL și PCL1 sunt eluate între timpii de retenție 4,3 și 5,2 min. Speciile corespunzătoare au rapoarte m/z caracteristice la

849, 963, 1077 și 1191 Th. Acești oligomeri sunt însoțiți de PCL2-PDL cu $m/z = 938, 1052$ și 1166 . Totodată se regăsesc și specii fără etilen glicol în componenta având $m/z = 761$ și 875 . În plus față de celelalte fracții această conține și specii ciclice de copolimeri având în componenta doar homopolimeri PCL și două unități PDL la $m/z = 617, 731, 845$ și 959 .

În ultima fracție se remarcă prezența copolimerilor PCL1-PDL având patru unități de PDL la $m/z = 1090$ și 1204 . Aceste specii sunt coeluate împreună cu copolimeri ciclici având trei unități PDL la $m/z = 972$ și 1086 și copolimeri liniari de tip PCL2-PDL la $m/z = 1178$.

Metoda LC MS aplicată permite diferențierea cromatografică a speciilor de copolimeri în funcție de numărul de unități PDL din lanț. Speciile ciclice sunt coeluate la rândul lor la timpi de retenție mai mari decât omologii liniari. Totodată se observă că PCL utilizată ca macroinițiator este un amestec eterogen complicând interpretarea spectrelor.

În plus, analiza a fost efectuată și prin detecție ESI MS în modul negativ. Pentru a facilita comparația între cele două moduri de detecție spectrele sunt prezentate suprapuse în **figura V.17**.

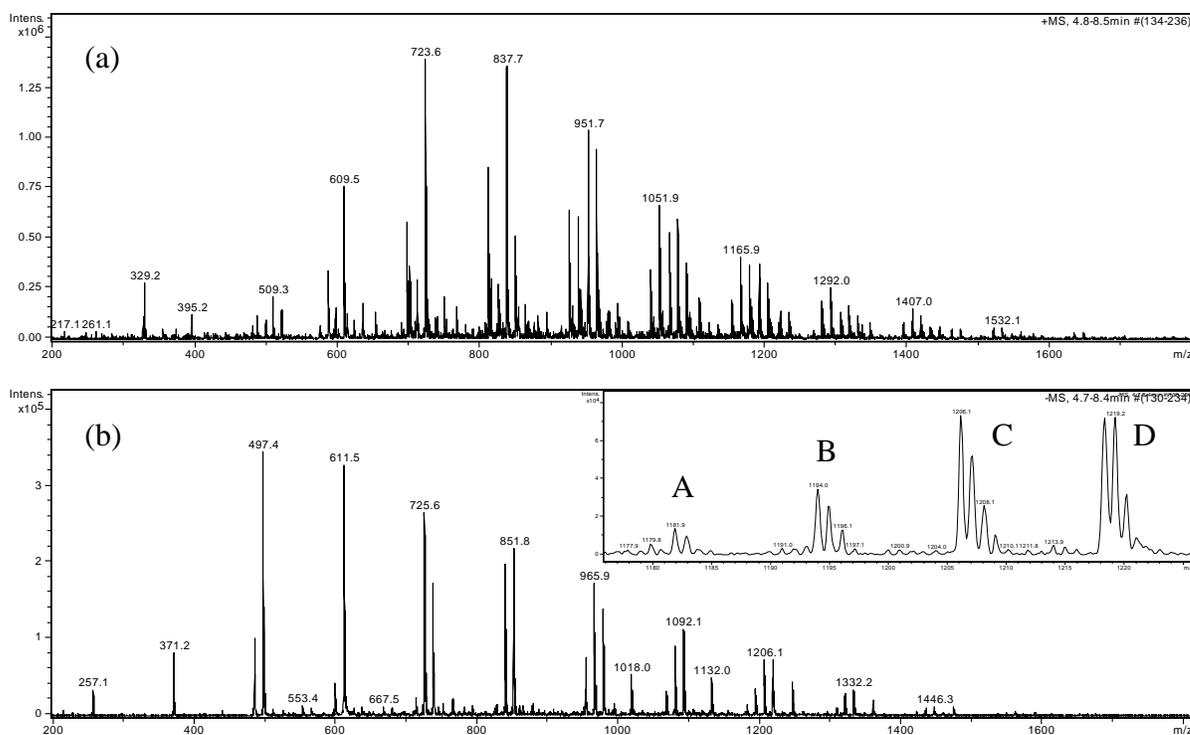


Figura V.17. Spectrele LC MS obținute (a) în modul pozitiv și (b) în modul negativ; în insertie este marita regiunea $m/z = 1170 - 1230$

Spre deosebire de spectrele obținute în modul pozitiv cele colectate în modul negativ reflectă doar prezența speciilor de copolimeri rezultate din e-ROP efectuată de homopolimerii PCL. Valoarea m/z a picurilor prezentate în spectrul MS negativ (**figura V.17.(b)**) corespunde copolimerilor având în componentă un număr variabil de unități monomere CL și/sau PDL. Spre exemplu în insertia

prezentată, picurile notate cu A, B, C, D sunt asociate unor copolimeri având în componența A ($m/z = 1181$) 2 unități PDL și 6 CL, B ($m/z = 1193$) 3 unități PDL și 4 CL, C ($m/z = 1206$) 4 unități PDL și 2 CL și D ($m/z = 1217$) 5 unități PDL și 0 CL. În concluzie, spectrele obținute în modul pozitiv permit vizualizarea speciilor inițiate de PCL având pe capatul catenei funcțiuni hidroxilice și carboxilice.

V.4.3. Caracterizare copolimerilor CL-PDL prin MS/MS

Spectrele MS evidențiază doar compoziția copolimerilor CL-PDL fără a oferi detalii în ceea ce privește modul de înlanțuire a unităților comonomere. În principiu reacția e-ROP a PDL inițiată de oligomerii OH telechelici ar trebui să conducă la formarea de copolimeri bloc. Totuși, lipaza poate cataliza și procese de transesterificare. Pentru elucidarea acestui aspect copolimerii obținuți au fost analizați prin MS/MS.

Spectrul MS/MS al copolimerilor CL-PDL compusi din 2 unități PDL și 2 unități CL legate prin dietilen glicol este prezentat în **figura V.21**. Cele cinci căi de fragmentare observate corespund modurilor diferite de înlanțuire a unităților comonomere. Procesele care conduc la formarea ionilor fragment sunt asociate cu scindarea legăturilor esterice din molecula de copolimer.

O primă cale de fragmentare, A, debutează cu o pierdere de 88 Da justificată prin clivajul dietilenclicolului și apariția fragmentului A1 de la 749 Th. Aceasta este urmată de o pierdere de 114 Da corespunzând unei unități de ϵ -caprolactona și formarea ionului fragment A2 la 635 Th. Această cale de fragmentare corespunde unei structuri a copolimerului CL-PDL de tip II (**figura V.22**).

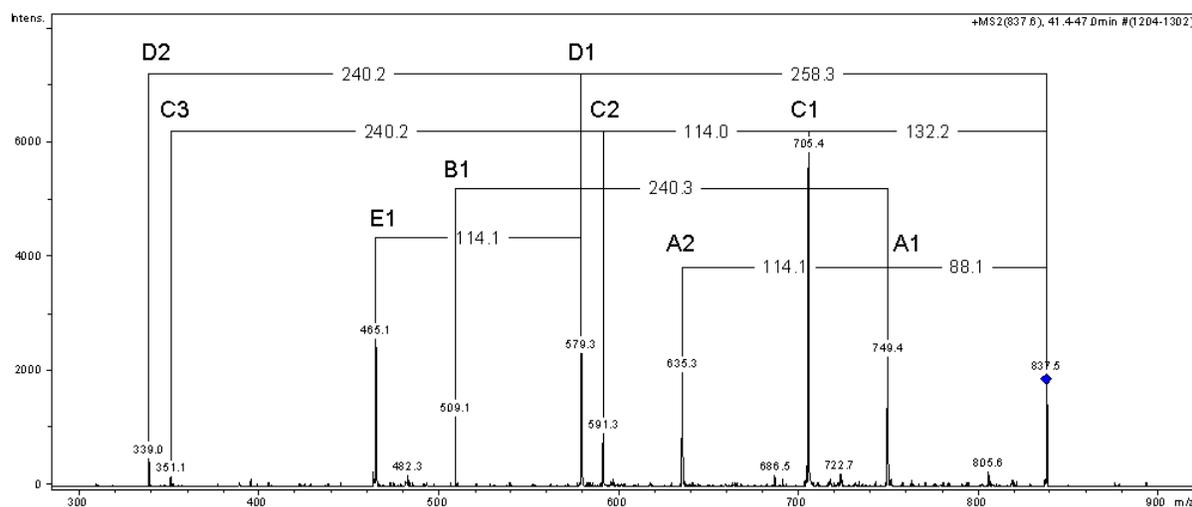


Figura V.21. Spectrul MS/MS al $[\text{CL-PDL}+\text{Na}]^+$ cu masă de 837 Da

Pierderea unei secvențe neutre conținând dietilen glicol esterificat cu o unitate monomerică de PDL este confirmată de prezența unei a doua căi de fragmentare. Fragmentul B1 de la 509 Th corespunde unei pierderi $\Delta m = 88 + 240$ Da și justifică o structură de tip IV.

Picurile C1 și C2 corespund unor structuri de tip **III** având drept capete unități monomere de ϵ -CL neesterificate. Acest fapt este confirmat de pierderea neutră de 132 Da corespunzătoare acidului 6OH-caproic (C1). Picul C2 este format prin pierderea unei secvențe de două unități de tip ϵ -CL. În schimb picul C3 corespunde unei structuri de tip **IV** și este rezultat din pierderea unei secvențe conținând o unitate PDL și două unități ϵ -CL.

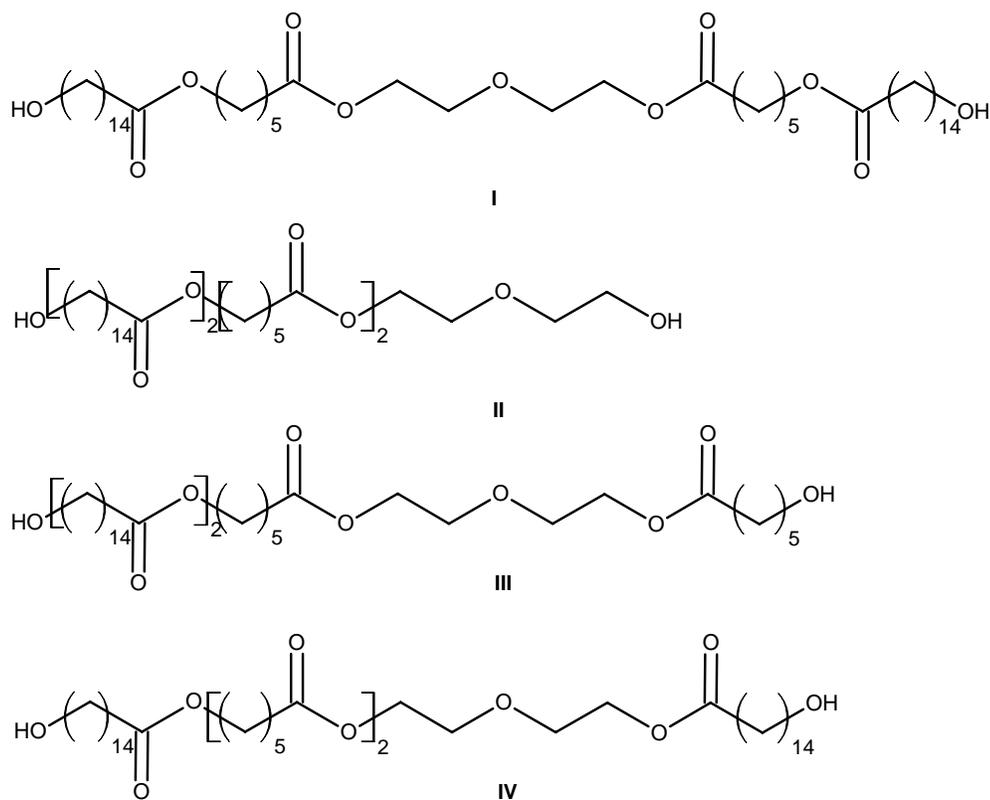


Figura V.22. Structuri posibile ale copolimerilor CL₂-PDL₂

Pierderea de 258 Da echivalentă cu clivajul unei unități monomere PDL aflată la capatul catenei este justificată de apariția picului D1 și corespunde tuturor tipurilor de structuri prezentate în figura xxx. Următorul pic, D2 (339 Th), rezultat din pierderea neutră a unei diade de PDL este observat la un $\Delta m = 258 + 240$ Da față de picul corespunzător ionului parinte. Acest pic corespunde structurilor de tip **II** și **III**.

O ultimă cale de fragmentare observată este cea reprezentată de picul E1 (465 Th) corespunzătoare clivajului unei secvențe formate dintr-o unitate PDL și una ϵ -CL. Astfel, diferența dintre picul corespunzător ionului parinte și picul fragment, $\Delta m = 258 + 114$ Da, justifică o structură de tip **I**.

Studiul prezentat relevă o eterogenitate structurală datorată în primul rând izomerilor conținuți de specia inițiatoare, policaprolactona OH telechelica.

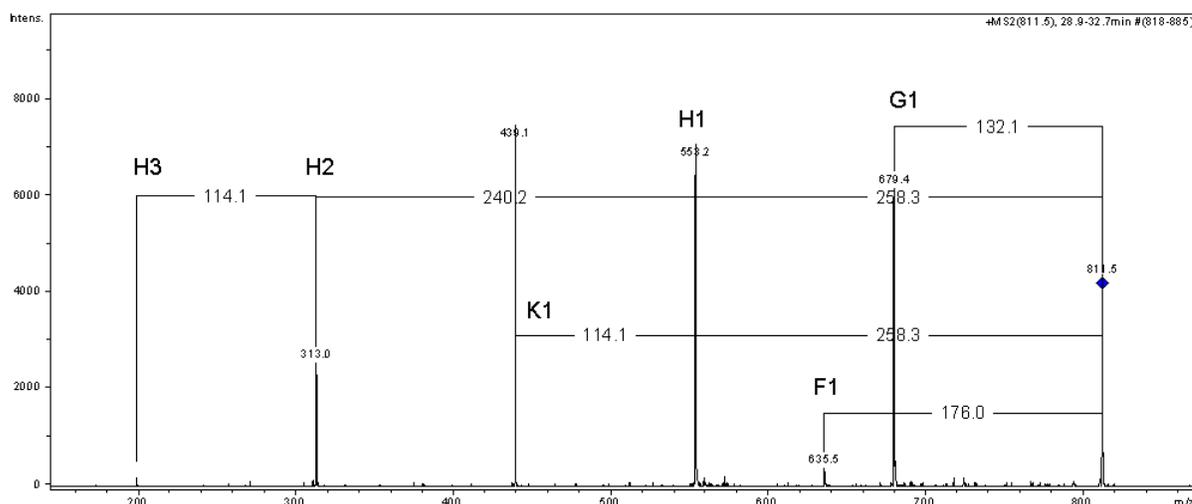


Figura V.23. Spectrul MS/MS al $[\text{CL-PDL}+\text{Na}]^+$ cu masa de 811 Da

O alta specie supusa fragmentarii este ionul cu masa 811 Da corespunzand copolimerilor CL-PDL avand o unitate de ϵ -CL si doua unitati de PDL (**figura V.23.**). Diferenta dintre acesti copolimeri si cei prezentati anterior consta in structura diferita a oligomerilor initiatori de PCL care contin in loc de dietilen glicol (88 Da) tetraetilen glicol (176 Da). Aceste specii de homopolimeri au fost detectate si prin studiile LC MS (notate cu PCL2). Prezenta unitatii de tetraetilen glicol ($\Delta m = 176$ Da) este justificata de pierderea neutra care conduce la formarea fragmentului notat cu F1 (635 Th). In mod similar structurilor propuse in cazul PCL1 prezenta picului F1 confirma o structura de tip **II**.

Picul G1 marcheaza prezenta capetelor de lant de CL fiind situat la o diferenta de masa fata de ionul parinte $\Delta m = 132$ Da. Prezenta acestui pic confirma o structura de tip **III**.

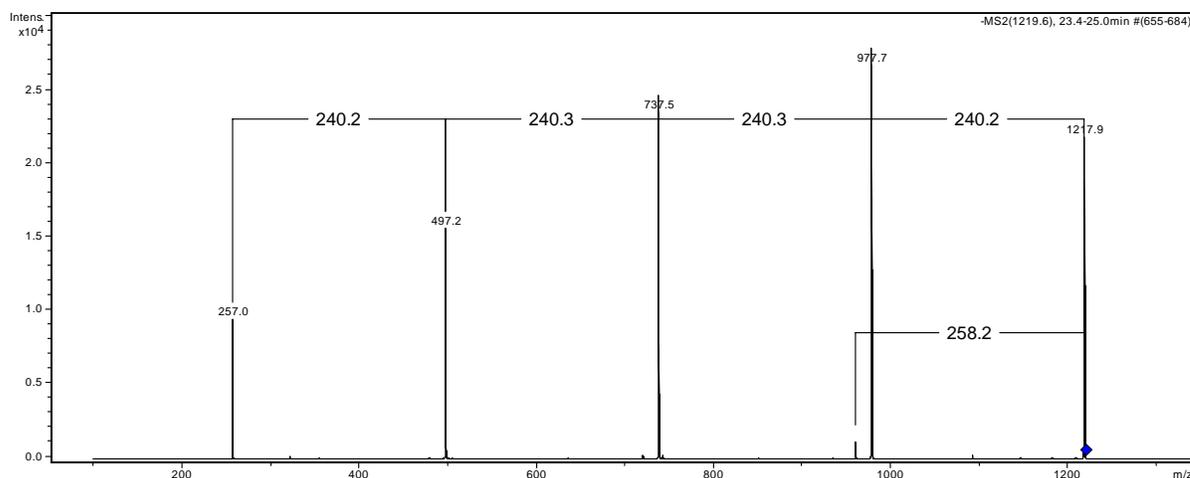


Figura V.24. Spectrul MS/MS al homopolimerilor $[\text{PDL}_5\text{-H}]^-$

Picul H1 este format prin pierderea unei unitati PDL capat de lant fiind identificat la $\Delta m = 258$ Da. Urmatorul pic din seria H, H2, este situat la $\Delta m = 258 + 240$ Da si corespunde pierderii neutre a

două unități PDL. Picul H3 este format prin pierderea suplimentară față de H2 a unei unități de ϵ -CL ($\Delta m = 258 + 240 + 114$ Da) confirmând o structură de tip **II**.

Spectrele MS/MS obținute în cazul speciilor ionice produse în modul negativ (**figura V.24.**) confirmă structurile ionilor observați în etapa de MS. Astfel, în cazul homopolimerilor PPDL rezultați din e-ROP inițiată de eventualele urme de apă din reacție sau în urma reacțiilor de transesterificare catalizate enzimatic se observă un spectru de fragmentare tipic acestor polimeri. Pierderile succesive cu $\Delta m = 240$ Da au loc prin clivajul legăturilor esterice dintre unitățile monomere de PDL pornind din capătul carboxilic al catenei, după cum se poate observa din spectrul MS/MS prezentat în **figura V.24.** obținut în cazul oligomerilor având patru unități monomere. Calea alternativă de fragmentare, pornind din capătul hidroxilic al catenei este mult mai puțin reprezentată, picul situat la $\Delta m = 258$ Da fiind unicul reprezentant.

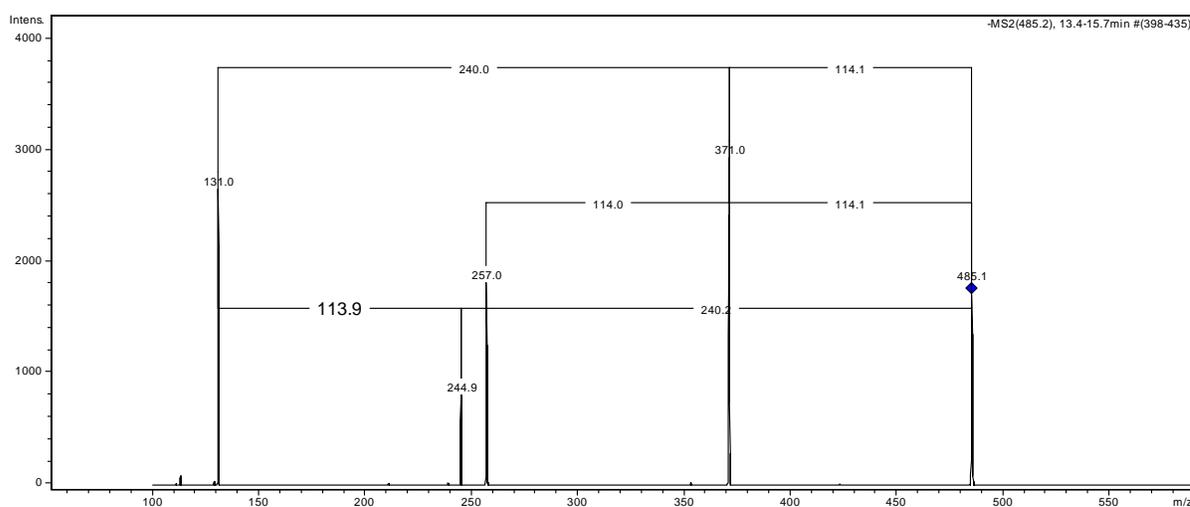


Figura V.25. Spectrul MS/MS al copolimerilor $[\text{CL}_2\text{-PDL}_1\text{-H}]^-$

Spectrul MS/MS (**figura V.25.**) obținut în cazul speciilor conținând două unități ϵ -CL și o unitate PDL, $[\text{CL}_2\text{-PDL}_1\text{-H}]^-$, confirmă faptul că procesele de fragmentare au loc predominant la capătul carboxilic al catenei. Astfel, se observă pierderi neutre asociate unităților monomere fie de ϵ -CL ($\Delta m = 114$ Da) fie de PDL ($\Delta m = 240$ Da). Structurile corespunzătoare ionului părinte cu $m/z = 485$ variază în funcție de poziționarea monomerului PDL. Astfel, pierderile succesive de 114 Da justifică o diadă de unități ϵ -CL la capătul carboxilic în timp ce pierderea de 240 Da urmată de o pierdere de 114 Da justifică prezența PDL la capătul carboxilic. Totodată se observă intercalarea PDL între cele două unități ϵ -CL. Prezența acestor specii sugerează faptul că au avut loc reacții de transesterificare.

Concluzii generale

(A) Poliesterii obtinuti prin reactia de deschidere de ciclu a esterilor ciclici au fost caracterizati prin spectrometrie de masa cu ionizare MALDI si ESI dar si prin tehnici clasice precum RMN si GPC. Spectrele de masa obtinute in cazul oligomerilor de PLA si PCL au fost obtinute cu ajutorul instrumentului ESI QTOF in timp ce in cazul probelor de PHB au fost utilizate trei spectrometre de masa diferite atat ca metode de ionizare (MALDI si ESI) cat si ca detectie (MALDI TOF, ESI TOF si ESI IT). Se remarca faptul ca indiferent de detaliile de constructie ale aparaturii utilizate rezultatele obtinute sunt similare. Probele au fost caracterizate la nivelele MS si MSⁿ. In toate cazurile spectrele de masa furnizeaza informatii din punct de vedere calitativ permitand evidentierea speciilor prezente in probele analizate atat din punctul de vedere a unitatilor monomere cat si al functiunilor capat de lant. Studiile de fragmentare efectuate atat in modul pozitiv cat si in cel negativ confirma calculele teoretice efectuate in asocierea structurii picurilor observate in etapa de MS. In cazul oligomerilor PCL succesiunea picurilor in MS/MS este corelata cu pierderea de unitati monomere de caprolactona cu masa de 114 Da. In cazul PLA si PHB picurile fragment se succed cu 72 Da si 86 Da, valori corespunzatoare unitatilor monomere caracteristice. Functiunile capt de lant identificate in cazul PCL, PLA si PHB-1 sunt grupari hidroxilice sau carboxilice. Procesele responsabile de formarea ionilor fragment sunt in toate cazurile analizate scindari ale legaturilor esterice prin rearanjari de H 1,4 de tip McLafferty. Utilizarea ionilor parinte de tip diferit conduce la imbogatirea informatiilor obtinute din analiza proceselor de fragmentare. Probele de PHB-3 analizate care prezinta o anumita eterogenitate a capetelor de lant au fost utilizate pentru a demonstra utilitatea varierii cationilor utilizati in formarea ionilor parinte. Rezultatele obtinute prin MS² si MS³ evidentiaza un anumit grad de similaritate in procesele de fragmentare induse de sarcina in cazul ionilor Na⁺ si Li⁺ pe de o parte si a ionilor H⁺ si NH₄⁺ pe de cealalta parte. Fragmentarea ionilor parinte amoniati sau protonati permite o evidentiere mai clara a capetelor de lant OH si COOH datorita pierderilor caracteristice moleculei de apa (- 18 Da). Acest fapt are o importanta deosebita in decelarea capetelor de lant de tip carboxilic si acid crotonic.

(B) Reactia de polimerizare a ε-CL si D,L-LA conduce la formarea de oligomeri α-azofunctionali cu structura bine definita si polidispersitate redusa daca este sa luam in considerare valorile maselor moleculare medii obtinute prin MS.

In urma anlizelor efectuate se observa ca reactia de polimerizare are loc prin aditia lactonelor la gruparea hidroxilica a DR prin clivajul selectiv al oxigenului acilic din ciclul de lactona rezultand o grupare esterica. Reactia de polimerizare nu este cantitativa. Se observa atat in cazul DRCL cat si al

DRLA o limita a numarului de unitati monomere ($n = 6-7$) luand in considerare picurile MS cu intensitate maxima care reflecta speciile predominante in distributia lanturilor oligomerice. Acest fapt poate fi pus pe seama reactiilor de transesterificare. Pe langa transesterificarile intramoleculare au loc si transesterificari intermoleculare clar evidentiata cu precadere in cazul polimerizarii D,L-LA.

Metodele de caracterizare MALDI si ESI au oferit informatii pretioase in studiul polimerilor sintetizati. Caracterizarea prin cele doua metode a oferit rezultate similare in conditiile in care MALDI MS este utilizata preponderent in cazul sistemelor macromoleculare cu masa mai ridicata comparativ cu polimerii prezentati in aceasta lucrare. Studiile de fragmentare ESI MS/MS au adus argumente solide in favoarea ipotezelor asupra structurii polimerilor sintetizati.

Ca o concluzie, se observa ca prepararea oligoesterilor alifatici azofunctionali conduce la obtinerea de produse bine definiti din punct de vedere structural. Oligomerii sintetizati vor fi mai ulterior caracterizati din punct de vedere al comportamentului termic si al cristalinitatii si in ultima faza va fi testata aplicabilitatea lor din punctul de vedere al proprietatilor optice.

Funcțiunea DR19 este capabila sa initieze polimerizarea prin deschidere de ciclu a esterilor ciclici, iar oligomerii rezultati constituie un amestec in care funcțiunea azo este legata fie de capatul catenei, ca si in cazul produsilor DR1CL, fie este intercalata in catena de baza a oligomerilor de caprolactona. Prezenta celei de a doua grupari hidroxilice conduce la formarea de oligomeri OH telechelici care pot fi mai departe utilizati in reactii de copolimerizare condensativa si nu numai.

Caracterizarea unor astfel de amestecuri este dificil de realizat prin tehnici clasice precum RMN. De fapt, spectroscopia RMN nu poate aduce informatii cu privire la structuri ramificate de tipul celor considerate in studiul de fata. Astfel, utilizarea spectrometriei de masa devine imperativa in descrierea structurilor de acest tip. Cuplare detectiei MS cu tehnici de separare precum LC permite identificarea structurilor izomerice. Pe de alta parte, diferentierea unor structuri macromoleculare ramificate de structurile liniare asociate poate fi realizata si prin tehnici de fragmentare de tip MS/MS. Avantajul utilizarii fragmentarii asupra tehnicilor de separare consta in usurinta si rapiditatea realizarii unor astfel de experimente. Informatiile furnizate prin fragmentare sunt doar de ordin calitativ si in mod evident pentru obtinerea de informatii cantitative este necesara tehnica HPLC cu detectie UV-VIS.

Pe langa elucidarea structurii compusilor azofunctionali, studiul de fata propune pentru intaia oara un mecanism de fragmentare de tip CER in cazul oligomerilor de caprolactona. Aceste procese sunt in premiera asociate cu structuri poliesterice ramificate permitand identificarea acestora. Producerea unor astfel de fragmentari specifice este conditionata de tipul de sarcina utilizata precum si de factori de ordin steric. Studiul de fata evidentiaza efectul pozitiv asupra CER exercitat de ionii de Li in comparatie cu cei de Na. Acest fapt este in deplina concordanta cu observatiile din literatura de

specialitate realizate in cazul di- si tri-acil glicerolilor. In perspectiva, fenomenele de tip CER la nivelul poliesterilor, vor fi studiate si prin metode de chimie computationala.

(C) Studiul prezentat confirma posibilitatea obtinerii derivatilor de β -CD prin reactia de deschidere a esterilor ciclici in prezenta sparteinei. Reactia are loc in masa sau in solutie la 50 °C. In conditiile polimerizarii in masa se obtine o cantitate importanta de β -CD libera precum si homopolimeri de PHB in timp ce polimerizare in solutie permite o transformare toatala a β -CD. Formarea speciilor PHB- β -CD implica un mecanism de initiere/propagare in care monomerul este activat prin incluziunea in ciclodextrina iar deschiderea esterilor ciclici este realizata de gruparile OH activate de sparteina. Reactiile secundare de degradare a polimerilor formati impiedica cresterea gradului de polimerizare si conduce la formarea de homopolimeri PHB ca produse secundari de reactie.

Aplicabilitatea sistemului CD/SP in ROP a esterilor ciclici este demonstrata si de faptul ca ROP a BL poate fi realizata si in prezenta α - si γ -CD. De asemenea ROP a ϵ -caprolactonei poate fi realizata in prezenta α -CD studiile MS confirmand formarea de ciclodextrine esterificate.

Structura compusilor obtinuti a fost determinata prin LC MS complementata de spectroscopia RMN. Spectrometria de masa MS/MS permite confirmarea structurala la nivel molecular. Derivatii sintetizati pot fi descrisi ca ciclodextrine esterificate cu lanturi scurte de PHB (3 unitati monomere per lant). Atasarea a mai mult de un lant per molecula de β -CD trebuie considerata in cazul unor reactii similare. Modul de fragmentare al ciclodextrinelor esterificate, in conditiile CID, este in mod clar influentat de tipul de cation implicat in formarea speciilor aduct supuse fragmentarii. Astfel, speciile sodiate sunt fragmentate cu precadere la nivelul legaturilor esterice in timp ce speciile protonate sunt predominant scindate la nivelul legaturilor semiacetalice in functie de gradul de substitutie al CD. Acest fapt este confirmat de studiile de fragmentare a ciclodextrinelor esterificate cu acid acetic.

(D) Copoliesterii sintetizati prin transesterificarea BL cu acid 12OH-dodecanoic sau prin e-ROP a ω -pentadecalactonei initiata de oligomeri de policaprolactona hidroxitelechelici au fost caracterizati la nivel molecular prin ESI MS cuplata cu diverse tehnici cromatografice. Metoda originala de separare cromatografica in conditii pseudo-LCCC, ofera o imagine de ansamblu asupra naturii componentelor amestecurilor rezultate din sinteza. Criteriul de separare ia in considerare numarul de unitati comonomere cu polaritate redusa. Desi au fost evidentiata doar fractiile cromatografice cu masa moleculara redusa, informatiile obtinute permit identificarea speciilor rezultate din sinteza.

Metoda ESI MS in modul pozitiv deceleaza majoritatea speciilor prezente in reactie in timp ce detectia in modul negativ evidentiaza doar lanturile terminate in functiuni carboxilice. In cazul sintezei

CL-PDL detectia in modul negativ favorizeaza identificarea produsilor secundari de reactie precum homopolimerii PDL.

Studiile MS/MS confirma structura speciilor detectate in etapa de MS si reflecta secventele de comonomeri si posibilele tipuri de structuri caracteristice copolimerilor sintetizati. In cazul copolimerilor DDBL se remarca o serie de structuri posibile in care blocuri de BL sunt legate de diade si triade de DD indicand o preferinta a DD pentru reactii de co-condensare in timp ce secventele de BL sunt predispuse reactiilor de transesterificare. In cazul copolimerilor CL-PDL studiile de fragmentare releva structura speciilor de macroinitiatori care au participat la formarea copolimerilor.

In urma rezultatelor obtinute in cazul copolimerilor considerati se poate stabili un protocol de abordare a caracterizarii acestui tip de probe prin spectrometrie de masa. Intr-o prima faza este necesara determinarea masei polimerilor prin SEC cu detectie in paralel prin indice de refractie si MS urmata de caracterizarea calitativa a fractiilor de masa mica prin LC si confirmarea structurala prin MS/MS

Bibliografie

1. Gruending, T.; Weidner, S.; Falkenhagen, J.; Barner-Kowollik, C. *Polymer Chemistry* (2010), 1, 599
2. Fenn, J.B.; Mann, M.; Meng, C.K.; Wong, S.F. *Mass Spectrom. Rev.* (1990) 9, 37
3. Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R.C.; Chait, B.T. *Anal. Chem.* (1991) 63, 1193A
4. Fenn, J.B. *Angew. Chem., Int. Ed.* (2003) 42, 3871
5. Hanton, S.D. *Chem. Rev.*, (2001) 101, 527
6. Fenn, J.B. *Mass Spectrometry Reviews*, (1990) 9, 37
7. *Mass Spectrometry: Principles and Applications, Third Edition*, Edmond de Hoffmann and Vincent Stroobant, John Wiley & Sons Ltd, 2007
8. McLuckey, S.A.; Vanberkel, G.J.; Goeringer, D.E.; Glish, L.G. *Anal. Chem.* (1994) 66, 737A
9. *Esquire-LC Operations Manual*, Bruker Daltonics GmbH: Germany, 1999
10. Herbert, C.G.; Johnstone R.A.W. - *Mass spectrometry basics*, CRC Press, 2003
11. Nielen, M.W.F. *Mass Spectrometry Reviews*, (1999) 18, 309
12. Wong, S.F.; Meng, C.K.; Fenn, J.B. *J. Phys. Chem.* (1988) 92, 546
13. Nohmi, T.; Fenn, J.B. *J. Am. Chem. Soc.* (1992) 114, 3241
14. Prokai, L.; William, J.; Simonsick, J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (1993)7, 853
15. O'Conner, P.B.; McLafferty, F.W.J. *Am. Chem. Soc.* (1995) 117, 12826
16. Maziarz, E.P.; Baker, G.A.; Mure, J.V.; Wood, T.D. *Int. J. Mass Spectrom.* (2000) 202, 241
17. Sible, V.S.; Cook, S.D. *Eur. Polym. J.* (1997) 33, 163
18. Deery, M.J.; Jennings, K.R.; Jasieczek, C.B.; Haddleton, D.M.; Jackson, A.T.; Yates, H.T.; Scrivens, J.H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (1997) 11, 57
19. van Berkel, G.J. "Electrospray Ionization Mass Spectrometry", Wiley, New York 1997
20. Nielen, M.W.F. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (1996) 10, 1652
21. Karas, M. and Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* (1988) 60, 2299
22. Montaudo, G. *Prog. Polym. Sci.* (2006) 31,277
23. Lennon, J.D.; Cole, S.P.; Glish, G.L. *Anal. Chem.* (2006) 78, 8472
24. Williams, J.B.; Chapman, T.M.; Hercules, D.M. *Macromolecules* (2004) 36, 3898
25. Malvagna, P; Impallomeni, G; Cozzolino, R.; Spina, E.; Garozzo, D. *Rapid Commun Mass Spectrom* (2002) 16, 1599
26. Jagtap, R.N.; Ambre, A.H. *Bull. Mater. Sci.*, (2005) 28, 515

27. Al-Masri, M. J. *Macromol. Sci.- Pure Appl. Chem.*, (2001) A38(2),107
28. Montaudo, M.S. *Mass Spectrometry Reviews*, (2002) 21,108
29. Jackson, C.A.; Simonsick, W. J. Jr. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* (1997) 2, 661
30. Whitehouse, C.M.; Dreyer, R.N.; Yamashita, M.; Fenn, J.B. *Anal. Chem.* (1985) 57, 675.
31. Jackson, A.T.; Yates, H.T.; McDonald, W.A.; Scrivens, J.H.; Critchley, G.; Brown, J.; Deery, M.J.; Jennings, K.R.; Brookes, C. J. *Am. Soc. Mass Spectrom.* (1997) 8, 132
32. Glockner, G. J. *Appl. Polym. Sci.: Appl. Polym. Symp.* (1992) 51, 45
33. Cools, P.J.C.H.; Maesen, F.; Klumperman, B.; van Herk, A.M.; German, A.L. *J. Chromatogr. A* (1996) 736, 125
34. Philipsen, H.J.A.; Klumperman, B.; German, A.L. *J. Chromatogr. A* (1996) 746, 211
35. Rissler, K.J. *Chromatogr. A* (1997) 786, 85
36. Gorshkov, A.V.; Much, H.; Becker, H.; Pasch, H.; Evreinov, V.V.; Entelis, S.G. *J. Chromatogr.* (1990) 523, 91
37. Gruending, T.; Guilhaus, M.; Barner-Kowollik, C. *Anal. Chem.* (2008) 80, 6915
38. Nielen, M.W.F.; van de Ven, H.J.F.M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (1996) 10, 74
39. Philipsen, H.J.A.; Wubbe, F.P.C.; Klumperman, B.; German, A.L. *J. Appl. Polym. Sci.* (1999) 72, 183
40. Cools, P.J.C.H.; v. Herk, A.M.; German, A.L.; Staal, W. J. *Liquid Chromatogr.* (1994) 17, 3133
41. Koster, S.; Mulder, B.; Duursma, M.C.; Boon, J.J.; Philipsen, H.J.A.; v. Velde, J.W.; Nielen, M.W.F.; de Koster, C.G.; Heeren, R M.A. *Macromolecules* (2002) 35, 4919
42. Nielen, M.W.F; Buijtenhuijs, F.A. *Anal. Chem.* (1999) 71, 1809
43. Moise, M.; Sunel, V.; Profire, L. ; Popa, M. ; Desbrieres, J.; **Peptu, C.** *Molecules* (2009) 14, 2621
44. Gadzinowski, M.; Sosnowski, S.; Slomkowski, S. *Macromolecules* (1996) 29, 6404
45. Penczek, S.; Cypryk, M.; Duda, A.; Kubisa, P.; Slomkowski, S. *Prog. Polym. Sci.* (2007) 32, 247
46. Albertsson, A-C.;Varma, I. K. *Biomacromolecules* (2003) 4, 1466
47. Jedlinski, Z.; Kurcok, P.; Kowalczyk, M. *Macromolecules* (1985) 18, 2678
48. Hsueh, M.L.; Huang, B.H.; Wu, J.C.; Lin, C.C.*Macromolecules*, (2005) 38, 9482
49. Kricheldorf, H. R.; Kreiseraunders. I.; Scharnagl, N. *Makromol. Chem., Macromol. Symp.*, (1990) 32, 285
50. Kricheldorf, H.R.; Kreiseraunders, I. *Makromol. Chem.*, (1990) 191, 1057
51. Kasperczyk, J.E. *Macromolecules*, (1995) 28, 3937

52. Myers, M.; Connor, E.F.; Glauser, T.; Mock, A.; Nyce, G.; Hedrick, J.L. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, (2002) 40, 844
53. Nederberg, F.; Connor, E.F.; Moller, M.; Glauser, T.; Hedrick, J.L. *Angew. Chem., Int. Ed.*, (2001) 40, 2712
54. Biela, T.; Penczek, S.; Slomkowski, S.; Vogl, O. *Makromol. Chem.*, (1983) 184, 811
55. Corley, L.S.; Vogl, O.; Biela, T.; Penczek, S.; Slomkowski, S. *Makromol. Chem., Rapid Commun.* (1981) 2, 47
56. Pratt, R. C.; Lohmeijer, B.G.G.; Long, D.A.; Lundberg, P.N.P.; Dove, A.P.; Li, H.; Wade, C.G.; Waymouth, R.M.; Hedrick, J.L. *Macromolecules* (2006) 39, 7863
57. Takashima, Y.; Osaki, M.; Harada, A. *J Am Chem Soc* (2004) 126, 13588
58. Mei, Y.; Kumar, A; Gross, R.A. *Macromolecules*, (2002) 35, 5444
59. Dong, H.; Cao, S.G.; Li, Z.Q.; Han, S.P.; You, D.L.; Shen, J.C. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, (1999) 37, 1265
60. Kobayashi, S.; Uyama, H.; Namekawa, S. *Polym. Degrad. Stab.*, (1998) 59, 195
61. Namekawa, S.; Uyama, H.; Kobayashi, S.; *Polym. J. (Tokyo)*, (1998) 30, 269
62. Henderson, L.A.; Svirkin, Y.Y.; Gross, R.A.; Kaplan, D.L.; Swift, G. *Macromolecules*, (1996) 29, 7759
63. Kumar, A.; Gross, R.A. *Biomacromolecules*, (2000) 1, 133
64. Adamus, G.; Kowalczyk, M. *Rapid Commun Mass Spectrom* (2000) 14, 195
65. Koster, S.; Duursma, M.C.; Boon, J.J.; Nielen, M.W.F.; de Koster, C.G.; Heeren, R.M.A. *J Mass Spectrom* (2000) 35, 739
66. Laine, O.; Laitinen, T.; Vainiotalo, P. *Anal Chem* (2002) 74, 4250
67. Arnould, M.A.; Wesdemiotis, C.; Geiger, R.J.; Park, M.A.; Buehner, R.W.; Vandervorst, D. *Prog Org Coat* (2002) 45, 305
68. Arnould, M.A.; Polce, M.J.; Quirk, R.P.; Wesdemiotis, C. *Int J Mass Spectrom* (2004) 238, 245
69. Arnould, M.A.; Vargas, R.; Buehner, R.W.; Wesdemiotis, C. *Eur J Mass Spectrom* (2005) 11, 243
70. Rizzarelli, P.; Puglisi, C.; Montaudo, G. *Rapid Commun Mass Spectrom* (2006) 20, 1683
71. Simonsick, W.J. Jr.; Petkovska, V. *Anal Bioanal Chem* (2008) 392, 575
72. McLafferty, F.W.; Turecek, F. *Interpretation of mass spectra*, 2nd edition. Mill Valley, California: University Science Books 2003.

73. De Winter, J.; Lemaur, V.; Marsal, P.; Coulembier, O.; Cornil, J.; Dubois, P.; Gerbaux, P.; J. Am. Soc. Mass Spectrom. (2010) 21, 1159
74. Lee, S.Y. Biotechnol. Bioeng. (1995) 49, 1
75. Anderson, A.J.; Dawes, E.A. Microbiol. Rev. (1990) 54, 450
76. Lenz, R.W.; Marchessault, H. Biomacromolecules (2005) 6, 1
77. Jedlinski, Z.; Kurcok, P.; Kowalczyk, M. Macromolecules (1985) 18, 2678
78. Kurcok, P.; Kowalczyk, M.; Hennek, K.; Jedlinski, Z. Macromolecules (1992) 25, 2017
79. Kurcok, P.; Jedlinski, Z.; Kowalczyk, M. J Org Chem (1993) 58, 4219
80. Kurcok, P.; Jedlinski, Z.; Kowalczyk, M. Macromolecules (1994) 27, 4833
81. Jedlinski, Z.; Kurcok, P.; Lenz, R.W. J Macromol Sci Pure Appl Chem (1995) A32, 797
82. Jedlinski, Z.; Kurcok, P.; Kowalczyk, M.; Kasperczyk, J. Makromol Chem (1986) 187, 1651
83. Kricheldorf, H.R.; Scharnagl, N. J Macromol Sci (1989) A26, 951
84. Duda, A. J Polym Sci A: Polym Chem (1992) 30,21
85. Jedlinski, Z.; Kurcok, P.; Lenz, R.W. Macromolecules (1998) 31, 6718
86. Liu, K.L.; Goh, S.H.; Li, J. Polymer (2008) 49, 732
87. Kurcok, P.; Matuszowicz, A.; Jedlinski, Z. Macromol Rapid Commun (1995) 16, 201
88. Kurcok, P.; Smiga, M.; Jedlinski, Z. J Polym Sci A: Polym Chem (2002) 40, 2184
89. Kemnitzer, J.E.; McCarthy, S.P.; Gross, R.A. Macromolecules (1993) 26, 6143
90. Hori, Y.; Suzuki, M.; Yamaguchi, A.; Nishishita, T. Macromolecules (1993) 26, 5533
91. Wei, Z.Y.; Liu, L.; Qi, M. Eur Polym J (2007) 43, 1210
92. Coulembier, O.; Lohmeijer, B.G.G.; Dove, A.P.; Pratt, R.C.; Mespouille, L.; Culkin, D.A. Macromolecules (2006) 39, 5617
93. Juzwa, M.; Jedlinski, Z. Macromolecules (2006) 39, 4627
94. Monsalve, M.; Contreras, J.M.; Laredo, E.; Lopez-Carrasquero, F. eXPRESS Polymer Letters (2010) 4, 431
95. Adamus, G.; Kowalczyk, M. Rapid Commun. Mass Spectrom. (2000) 14, 195
96. Yesodha, S.K.; Sadashiva Pillai, C.K.; Tsutsumi, N. Prog Polym Sci (2004) 29, 45
97. Evans, R.A.; Hanley, T.L.; Skidmore, M.A.; Davis, T.P.; Such, G.K.; Yee, L.H.; Ball, G.E.; Lewis, D.A. Nat Mater (2005) 4, 249
98. Tian, W.; Chen, Q.; Yu, C.; Shen, J. Eur Polym J (2003) 39, 1935
99. Cerrai, P.; Tricoli, M.; Andruzzi, F.; Paci, M.; Paci, M. Polymer (1989) 30, 338
100. Liu, J.; Liu, L. Macromolecules (2004) 37, 2674
101. Nathanson, A.; Rochon, P. Chem Rev (2002) 102, 4139

102. Racles, C.; Filip, D.; Cazacu, M.; Cozan, V.; Toth, A.; Ioanid, G. *Macromol. Chem. Phys.* (2006) 207, 1599
103. **Peptu, C.**; Harabagiu, V.; Simionescu, B.C.; Adamus, G.; Kowalczyk, M.; Nunzi, J.-M. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* (2009) 47, 534
104. Crecelius, A. C.; Baumgaertel, A.; Schubert, U. S. *J. Mass Spectrom.* (2009) 44, 1277
105. Koster, S.; Duursma, M.C.; Boon, J.J.; Nielen, M.W.F.; de Koster, C.G.; Heeren, R.M.A. *J. Mass Spectrom.* (2000) 35, 739
106. Laine, O.; Laitnen, T.; Vainiotalo, P. *Anal. Chem.* (2002) 74, 4250
107. Arnould, M.A.; Vargas, R.; Buehner, R.W.; Wesdemiotis C. *Eur. J. Mass Spectrom.* (2005) 11, 243.
108. Adamus, G.; Kowalczyk, M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2000) 14, 195
109. Hsu, F.-F.; Turk, J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* (1999) 10, 587
110. Lin, H.-Y.; Voyksner, R. D. *Anal. Chem.* (1993) 65, 451
111. Meetani, M.A.; Hisaindee, S.M.; Abdullah, F.; Ashraf, S.S.; Rauf, M.A. *Chemosphere* (2010) 80, 422
112. Szejtli, J. *Chem Rev* (1998) 98, 1743
113. Wenz, G. *Angew Chem Int Ed Engl* (1994) 33, 803
114. van de Manacker, F.; Vermonden, T.; van Nostrum, C.F.; Hennink, W.E. *Biomacromolecules* (2009) 10, 3157
115. Shen, J.; Hao, A.Y.; Du, G.Y.; Zhang, H.C.; Sun, H.Y. *Carbohydr Res* (2009) 344, 1999
116. Osaki, M.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *Macromolecules* (2007) 40, 3154
117. Harada, A.; Osaki, M.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H. *Acc Chem Res* (2008) 41, 1143
118. Harada, A. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* (2009) 47, 4469
119. Mercier, J.P.; Debrun, J.L.; Dreux, M.; Elfakir, C.; Lafosse, M. *Rapid Commun Mass Spectrom* (2000) 14, 68
120. Jacquet, R.; Elfakir, C.; Lafosse, M. *Rapid Commun Mass Spectrom* (2005) 19, 3097
121. Salvador, A.; Herbreteau, B.; Dreux, M. *J Chromatogr A* (1999) 855, 645
122. Harabagiu, V.; Simionescu, B.C.; Pinteala, M.; Merrienne, C.; Mahuteau, J.; Guegan, P.; Cheradame, H. *Carbohydr Polym* (2004) 56, 301
123. Pedersen, N.R.; Kristensen, J.B.; Bauw, G.; Ravoo, B.J.; Darcy, R.; Larsen, K.L.; Pedersen, L.H. *Tetrahedron Asymmetry* (2005) 16, 615
124. Grard, S.; Elfakir, C.; Dreux, M. *J Chromatogr A* (2001) 925, 79

125. Fifere, A.; Budtova, T.; Tarabukina, E.; Pinteala, M.; Spulber, M.; **Peptu, C.**; Harabagiu, V.; Simionescu, B.C. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* (2009) 64, 83
126. Michalak, M.; Kawalec, M.; **Peptu, C.**; Kurcok, P.; Kowalczyk, M. (Bio)Degradable Polymers from Renewable Resources, Vienna 2007, poster 25, page 58
127. Kieken, F.; West, C.; Keddadouche, K.; Elfakir, C.; Choisnard, L.; Geze, A.; Wouessidjewe, D. *J Chromatogr A* (2008) 1189, 385
128. Jacquet, R.; Elfakir, C.; Lafosse, M. *Rapid Commun Mass Spectrom* (2005) 19, 3097
129. Jacquet, R.; Favetta, P.; Elfakir, C.; Lafosse, M. *J Chromatogr A* (2005) 1083, 106
130. **Peptu, C.**; Nicolescu, A.; Peptu, C.A.; Harabagiu, V.; Simionescu, B. C.; Kowalczyk, M. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, (2010) 48, 5581
131. Kawalec, M.; Adamus, G.; Kurcok, P.; Kowalczyk, M.; Foltran, I.; Focarete, M. L.; Scandola, M. *Biomacromolecules* (2007) 8, 1053
132. Kiesewetter, M.K.; Shin, E. J.; Hedrick, J.L.; Waymouth, R.M. *Macromolecules* (2010) 43, 2093
133. Pratt, R.C.; Lohmeijer, B.G.G.; Long, D.A.; Lundberg, P.N.P.; Dove, A.P.; Li, H.; Wade, C.G.; Waymouth, R M.; Hedrick, J.L. *Macromolecules* (2006) 39, 7863
134. Adamus, G.; Kowalczyk, M. *Rapid Commun Mass Spectrom* (2000) 14, 195
135. Jedliski, Z.; Adamus, G.; Kowalczyk, M.; Schubert, R.; Szewczuk, Z.; Stefanowicz, P. *Rapid Commun Mass Spectrom* (1998) 12, 357
136. Adamus, G.; Montaudo, M.S.; Montaudo, G.; Kowalczyk, M. *Rapid Commun Mass Spectrom* (2004) 18, 1436
137. Adamus, G.; Sikorska, W.; Kowalczyk, M.; Montaudo, M.; Scandola, M. *Macromolecules* (2000) 33, 5797
138. Yamanaka, K.; Kimura, Y.; Aoki, T.; Kudo, T. *Macromolecules* (2009) 42, 4038
139. Sforza, S.; Galaverna, G.; Corradini, R.; Dossena, A.; Marchelli R. *J Am Soc Mass Spectrom* (2003) 14, 124
140. Hubert-Roux, M.; Ba, O.M.; Skiba, M.; Lange, C.M. *Rapid Commun Mass Spectrom* (2008) 22, 1607
141. Philipsen, H.J.A. *J. Chromatogr. A* (2004) 1037, 329
142. Montaudo, G.; Samperi, F.; Montaudo, M.S.; Carroccio, S.; Puglisi, C. *Eur. J. Mass Spectrom.* (2005) 11, 1
143. Pasch, H. *Phys. Chem. Chem. Phys.* (1999) 1, 3879
144. Chang, T.Y. *Adv. Polym. Sci.* (2003) 163, 1

145. Chang, T.Y. *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.* (2005) 43, 1591
146. Budhlall, B.M.; Landfester, K.; Nagy, D.; Sudol, E.D.; Dimonie, V.L.; Sagl, D.; Klein, A.; El-Aasser, M.S. *Macromol. Symp.* (2000) 155, 63
147. Dawkins, J.V.; Nicholson, T.A.; Handley, A.J.; Meehan, E.; Nevin, A.; Shaw, P.L. *Polymer* (1999) 40, 7331
148. Fei, X.; Murray, K. K. *Anal. Chem.* (1996) 68, 3555
149. Stevenson, T.I.; Loo, J.A. *LC-GC* (1998) 16, 54
150. Dwyer, J.; Botten, D. *Am. Lab.* (1996), 51
151. Nielen, M.W.F. *Anal. Chem.* (1998) 70, 1563
152. Boyle, J.G.; Whitehouse, C.M. *Anal. Chem.* (1992) 64, 2084
153. Boyle, J.G.; Whitehouse, C.M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (1991) 5, 400
154. Kumar, A.; Gross, R.A. *Biomacromolecules*, (2000) 1, 133
155. Jedlinski, Z.; Kowalczyk, M.; Adamus, G.; Sikorska, W.; Rydz, J. *International Journal of Biological Macromolecules* (1999) 25, 247
156. Falkenhagen, J.; Weidner, S. *Anal. Chem.* (2009) 81, 282
157. Falkenhagen, J.; Friedrich, J.F.; Schulz, G.; Kruger, R.P.; Much, H.; Weidner, S. *Int. J. Polym. Anal. Charact.* (2000) 5, 549
158. Pasch, H.; Brinkmann, C.; Much, H.; Just, U. *J. Chromatogr.* (1992) 623, 315
159. Malik, M.I.; Trathnigg, B.; Saf, R. *J. Chromatogr. A* (2009) 1216, 6627
160. Much, H.; Pasch, H. *Acta Polym.* (1982) 33, 366
161. Holle, A.; Haase, A.; Kayser, M.; Hoehndorf, J. *J. Mass Spectrom.* (2006) 41, 705
162. Suckau, D.; Resemann, A.; Schuerenberg, M.; Hufnagel, P.; Franzen, J.; Holle, A. *Anal. Bioanal. Chem.* (2003) P376, 952.

Lista publicatii

Postere

1. 26-30 August 2007

Ring Opening Oligomerization of ϵ -caprolactone and D,L-lactide in presence of Disperse Red 19

8th French-Romanian Colloquia on Macromolecular Chemistry – Grenoble, Franta.

C. Peptu, V. Harabagiu, B.C. Simionescu, M. Kowalczyk

2. 18-21 November 2007

Mass spectrometry studies of cyclic esters ring opening oligomerization in the presence of Disperse Red 1

(Bio)degradable polymers from renewable resources, Vienna, Austria.

C. Peptu, V. Harabagiu, B.C. Simionescu, M. Kowalczyk

3. 4-8 May 2008

ESI MS fragmentation behavior of azofunctional ϵ -caprolactone based oligoesters

26th Informal Meeting on Mass Spectrometry, Fiera di Primiero, Italy.

C. Peptu, V. Harabagiu, B.C. Simionescu, M. Kowalczyk

4. 3-7 May 2009

LC MS and tandem MS evaluation of cyclodextrin - oligo(3-OH butyrate) conjugates

27th Informal Meeting in Mass Spectrometry, Retz, Austria

C. Peptu, V. Harabagiu, B.C. Simionescu, M. Kowalczyk

5. 31 May- 4 June 2009

Collision Induced Dissociation Processes in Azofunctional Oligoesters

57th ASMS, Philadelphia, USA

C. Peptu, V. Harabagiu, B.C. Simionescu, M. Kowalczyk

6. 2-6th May, 2010

Structural information on esterified cyclodextrins provided by tandem mass spectrometry

8th Informal Meeting on Mass Spectrometry, , Koszeg, Hungary

C. Peptu, V. Harabagiu, B.C. Simionescu

Prezentari orale

1. 4-8 May 2008

Azofunctional oligoesters - Mass spectrometry of polymers workshop

26th Informal Meeting on Mass Spectrometry, Fiera di Primiero – ITALY

C. Peptu

2. 25-29 April, 2010

ESI-MS fragmentation behavior of azofunctional oligo(ϵ -caprolactone)s

1st Conference of the Romanian Society for Mass Spectrometry, Sinaia, Romania

C. Peptu, V. Harabagiu, B.C. Simionescu, M. Kowalczyk

Articole

1. Disperse Red 1 End Capped Oligoesters. Synthesis by Noncatalyzed Ring Opening Oligomerization and Structural Characterization

Peptu, C.; Harabagiu, V.; Simionescu, B. C.; Adamus, G.; Kowalczyk, M.; Nunzi, J.-M.
J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. 2009, 47, 534–547

2. Inclusion complexes of α -cyclodextrin and carboxyl-modified γ -cyclodextrin with C60: synthesis, characterization and controlled release application via microgels

Fifere Adrian, Tania Budtova, Elena Tarabukina, Mariana Pinteala, Spulber Mariana, **Cristian Peptu**, Valeria Harabagiu, Bogdan C. Simionescu
J Incl Phenom Macrocycl Chem (2009) 64:83–94

3. Synthesis and Biological Activity of Some New 1,3,4-Thiadiazole and 1,2,4-Triazole Compounds Containing a Phenylalanine Moiety

Moise, M.; Sunel, V.; Profire, L. ; Popa, M. ; Desbrieres, J.; **Peptu, C.**
Molecules 2009, 14, 2621-2631

4. Application of synthetic biodegradable polymers in medicine (Zastosowanie syntetycznych polimerow biodegradowalnych w medycynie)

Šišková, **C. Peptu**, M.M. Kowalczyk and W.J. Kowalski
Advances in biomedical technology 2, Zabrze, Poland, 2008, ISBN 978-83-88427

5. Mass Spectrometry Characterization of 3-OH Butyrate β -Cyclodextrin

Cristian Peptu, Alina Nicolescu, Catalina Anisoara Peptu, Valeria Harabagiu, Bogdan C. Simionescu, Marek Kowalczyk
Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, Vol. 48, 5581–5592 (2010)

6. Azofunctional oligo(ϵ -caprolactone) positional isomers detection through liquid chromatography multistage mass spectrometry

Cristian Peptu, Oscar F. van den Brink, Valeria Harabagiu, Bogdan C. Simionescu, Jerzy Silberring, Marek Kowalczyk
Trimisa spre publicare – Decembrie 2010