بخش اول

اصول و مفاهیم کروماتوگرافی مایع - طیف‌سنج جرمی

نویسندگان
مرضیه رضائی[۱و۴]، مریم یوسفی[۲و۴]*
محمود نادری[۳و۴]
*m.yousefi@avicenna.ac.ir

چکیده
کروماتوگرافی مایع - طیف‌سنجی جرمی یک روش شیمی تجزیه‌ای برای شناسایی، تعیین مقدار و آنالیز جرمی مواد است. این روش امکان تعیین ساختار مولکول‌های ناشناخته را از طریق قطعه قطعه شدن می‌دهد. مشابه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، کروماتوگرافی مایع - طیف‌سنجی جرمی از کشش ذاتی ماده به فاز متحرک و فاز ساکن بهره می‌گیرد. در هنگام عبور نمونه با جریان حلال، نمونه از یک ستون تجزیه‌ای عبور کرده و در طول آن، ترکیبات مختلف از یکدیگر جدا می‌شوند. ترکیبات جداسازی شده سپس از یک آشکارساز جرمی عبور می‌کنند. سه نوع از متداول‌ترین روش‌های یونیزاسیون برای یونش نمونه‌ها عبارتند از یونیزاسیون الکترو اسپری[۵](ESI)، یونیزاسیون شیمیایی در فشار اتمسفری[۶] و فوتو یونیزاسیون در فشار اتمسفری[۷]. در هر دو روش ESI و APCI یونیزاسیون در فشار اتمسفری انجام می‌شود. تفاوت میان دو روش تنها در چگونگی یونیزاسیون است. تجزیه‌گر جرمی قطعه دیگری است که برای جداسازی یون‌ها بر حسب نسبت جرم به بارشان (m/z) براساس ویژگی‌های رفتاری آنها در میدان الکتریکی و یا دیا مغناطیسی به کار می‌رود. از متداول‌ترین تجزیه‌گرهای جرمی می‌توان به چهار قطبی، تله یونی و زمان پرواز اشاره کرد که در طی دهه گذشته برای سازگاری با منابع یونش پیشرفت‌های چشمگیری داشته‌اند.

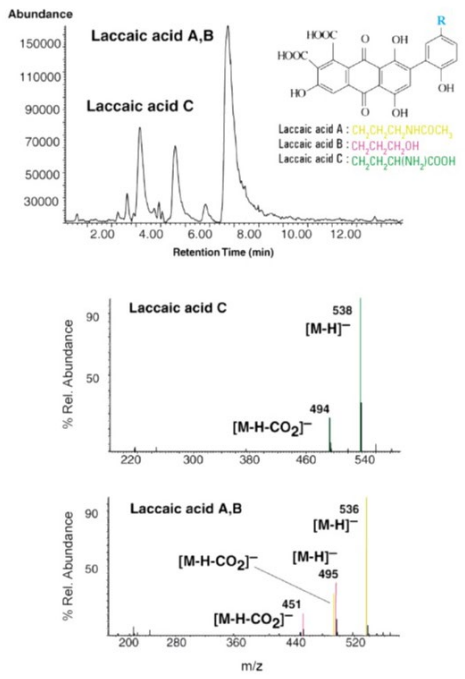
واژه‌های کلیدی
کروماتوگرافی مایع - طیف‌سنج جرمی، منبع یونش، تجزیه‌گر جرمی.

مقدمه

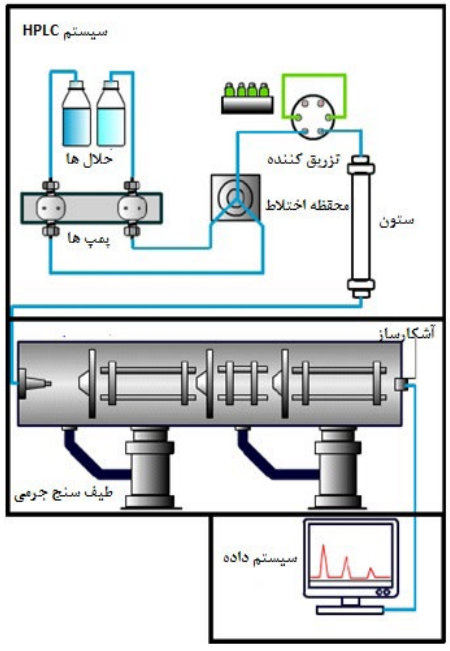
کروماتوگرافی مایع - طیف‌سنج جرمی[۸] روشی است که توانایی بالای جداسازی کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[۹] را با قدرت شناسایی طیف‌سنجی جرمی ترکیب می‌کند. روش HPLC ترکیبات شیمیایی را با استفاده از روش کروماتوگرافی‌های معمول روی یک ستون جدا می‌کند. به‌طور معمول روش مورد استفاده کروماتوگرافی، روش فاز معکوس است که در آن متابولیت‌ها از طریق برهم‌کنش‌های هیدروفوبی به ستون در حضور یک حلال هیدروفیل (برای مثال آب) متصل می‌شوند و سپس با حلالی که هیدروفوبیسیته آن بیشتر است (متانول یا استونیتریل) مورد شویش قرار می‌گیرند. همان‌طور که متابولیت‌ها از انتهای ستون در حال خارج شدن هستند، وارد آشکارساز جرمی می‌شوند که در آن حلال حذف شده و متابولیت‌ها یونیزه می‌شوند. متابولیت‌ها باید به‌صورت یون درآیند چرا که آشکارسازها تنها با یون‌ها کار می‌کنند و مولکول‌های خنثی را آشکارسازی نمی‌کنند. یون‌ها در طول یک محفظه خلأ به پرواز در می‌آیند از همین رو حذف حلال در مرحله اول بسیار حیاتی است. پس از آن آشکارساز جرمی مولکول‌ها را براساس جرم آن‌ها روبش می‌کند و یک طیف

با تفکیک بالا ایجاد می‌شود و یون‌های با جرم مختلف را از یکدیگر جدا می‌کند [۱-۵].

آشکارسازهای متداول در کروماتوگرافی مایع، آشکارسازهای ضریب شکست، الکتروشیمیایی، فلورسانس و فرابنفش (UV-Vis) هستند. برخی از این آشکارسازها داده‌های دوبعدی ایجاد می‌کنند و به آن معناست که داده‌ها، قدرت سیگنال را بر حسب زمان نشان می‌دهند. بقیه آشکارسازها مانند فلورسانس و آشکارسازهای آرایه دیودی (UV-Vis) داده‌های سه‌بعدی ایجاد می‌کنند. داده‌های سه‌بعدی نه تنها قدرت سیگنال بلکه داده‌های طیفی در هر نقطه از زمان را هم ارائه می‌دهند. طیف‌سنج جرمی هم داده‌های سه‌بعدی را به‌دست می‌دهد و علاوه بر قدرت سیگنال، داده‌های طیف جرمی را هم نشان می‌دهد که می‌تواند اطلاعات مفیدی در مورد وزن مولکولی، ساختار، ماهیت، مقدار و خلوص نمونه هم به‌دست دهد (شکل ۱). داده‌های طیف‌سنج جرمی ویژگی خاصی را به آشکارسازی می‌دهند که اطمینان از صحت نتایج کمی و کیفی آنالیز را افزایش می‌دهد. طیف‌سنجی جرمی روشی با بازه تجزیه‌ای وسیع، که شامل تولید و متعاقبا جداسازی و تشخیص گونه‌های باردار است که به‌صورت مخفف LC-MS نامیده می‌شود. نمایی از دستگاه LC-MS در شکل (۲) نشان داده شده‌است.

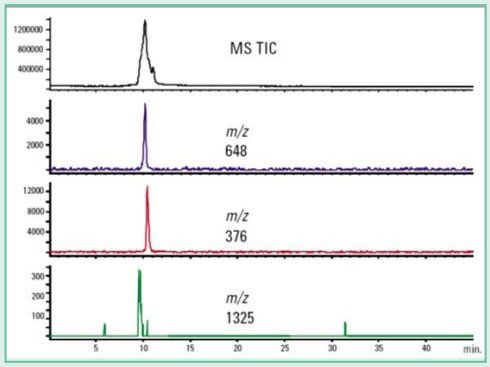


شکل ۱: داده‌های فراوانی دوبعدی و داده‌های طیف جرمی سه‌بعدی از طیف‌سنج جرمی، طیف‌سنج جرمی حساس‌تر و ویژه‌تر از دیگر آشکارسازهای موجود است [۱].



شکل ۲: نمای کلی دستگاه LC-MS [۱]

آشکارساز جرمی تمامی ترکیباتی را که کروموفور مناسبی ندارند آنالیز کرده و همچنین ترکیباتی را که پیک‌های کاملاً تفکیک نشده ندارند هم به خوبی آشکارسازی می‌کند؛ از این رو نیاز به یک کروماتوگرافی کامل و بی‌نقص را کاهش می‌دهد (شکل ۳).



شکل ۳: آشکارسازی سه ترکیب در کروماتوگرافی که پیک‌ها در آن به خوبی تفکیک نشده‌اند [۱].

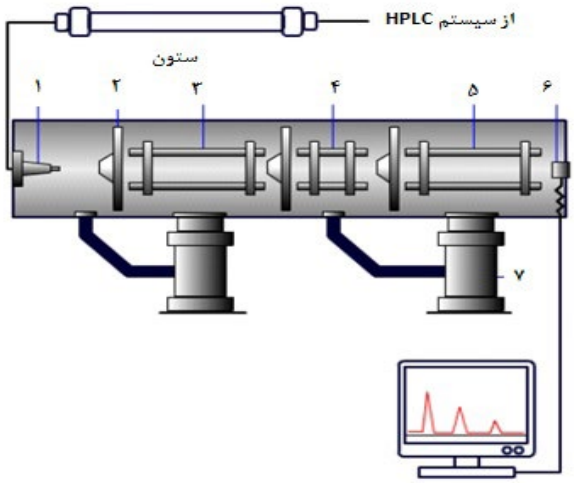
داده‌های طیف‌سنج جرمی، داده‌های حاصل از سایر آشکارسازها در کروماتوگرافی مایع را کامل می‌کند. در حالی که دو ترکیب ممکن است طیف‌های UV یکسان یا طیف‌های جرمی مشابهی داشته باشند، غیرمعمول است که هر دو طیف UV و جرمی آن‌ها یکسان باشد. دو مجموعه داده را می‌توان برای با اطمینان تشخیص دادن ماهیت و تعیین مقدار ترکیبات استفاده کرد. برخی از طیف‌سنج‌های جرمی توانایی انجام مراحل متعدد طیف‌سنجی جرمی روی یک نمونه واحد را دارا هستند. چنین طیف‌سنج‌هایی می‌توانند یک طیف جرمی ایجاد کنند که در آن یک یون خاص در طیف انتخاب شده و آن یون مجدداً قطعه قطعه شده و طیف جرمی دیگری ایجاد کند و این عمل را می‌توان بارها و بارها تکرار کرد. چنین طیف‌سنج‌هایی می‌توانند یک مولکول پیچیده را قطعه به قطعه باز کرده و در نهایت، ساختار آن را مشخص کنند [۶-۹]. در مقاله حاضر اصول و مفاهیم اولیه و دستگاهوری (شامل منابع یونی و تجزیه‌گرهای جرمی) در LC-MS مورد بحث قرار گرفته و در بخش دوم مقاله به انواع آشکارسازها و کاربردهای این روش در شاخه‌های مختلف علوم پرداخته خواهد شد.

دستگاهوری

طیف‌سنج‌های جرمی به‌منظور جداسازی یون‌ها بر حسب مقادیر نسبت جرم به بار (m/z) طراحی شده‌اند. در طیف‌سنج جرمی گونه‌های باردار که طی فرآیند یونش در منبع یونی تولید شده‌اند، با استفاده از تجزیه‌گر جرمی جداسازی و سپس توسط آشکارسازهای مناسب آشکارسازی می‌شوند. دو عامل کلیدی در این فرآیند، منبع یونی که یون‌ها را تولید می‌کند و تجزیه‌گر جرمی است که یون‌ها را مرتب می‌کند. انواع مختلفی از منابع یونی برای استفاده در کروماتوگرافی مایع - طیف‌سنج جرمی استفاده می‌شوند که هر کدام برای دسته خاصی از ترکیبات کارایی دارند. به همین شکل تجزیه‌گرهای جرمی متنوعی نیز وجود دارد که هر کدام بسته به نوع اطلاعات مورد نیاز مزایا و معایبی دارند.

بسیاری از پیشرفت‌ها در LC-MS طی ده سال گذشته در زمینه توسعه منابع یونی و روش‌هایی است که مولکول‌های آنالیت را یونیزه کرده و یون‌های به‌دست آمده را از فاز متحرک جدا کند. در دستگاه‌های LC-MS اولیه، فاز متحرک از مولکول‌های آنالیت جدا نمی‌شد و یا این عمل قبل از یونیزاسیون انجام می‌شد. پس از آن مولکول‌های آنالیت درون طیف‌سنج جرمی در شرایط خلأ، اغلب با استفاده از یونیزاسیون الکترونی، یونیزه می‌شدند. این فرآیند تنها برای تعداد محدودی از ترکیبات موفق بود. به‌صورت چشمگیری، ظهور یونیزاسیون در فشار اتمسفری[۱۰] تعداد ترکیباتی که می‌توان با موفقیت به‌وسیله LC-MS آنالیز کرد را افزایش داد. در این روش، مولکول‌های آنالیت ابتدا در فشار اتمسفر یونیزه می‌شوند و سپس یون‌های آنالیت به روش مکانیکی و الکتروستاتیکی از مولکول‌های خنثی جدا می‌شوند. روش‌های یونیزاسیون متداول یونیزاسیون الکترواسپری، یونیزاسیون شیمیایی در فشار اتمسفری و فوتو یونیزاسیون در فشار اتمسفری هستند [۱۰-۱۵].

در شکل (۴) نمایی از بخش‌های مختلف دستگاه LC-MS نشان داده شده‌است. بخش‌های اصلی طیف‌سنج جرمی منبع یونش اتمسفری، سیستم خلا و آشکارساز هستند. در ادامه به هر کدام از این بخش‌ها اشاره می‌شود.



شکل ۴: نمایی از بخش‌های مختلف دستگاه LC-MS [۱]

۱. منبع یونش: محلول خارج شده از دستگاه HPLC درون محفظه‌ای با فشار اتمسفر اسپری می‌شود و در طول فرآیندهای مختلف بسته به نوع منبع یونش، یون‌های آنالیت در این مرحله تولید می‌شوند.

۲. مخروط تماسی: یک صفحه مخروطی شکل با منفذی برای ورود نمونه است که به‌طور انتخابی یون‌های فاز گازی نمونه را گزینش کرده و ورود بار گاز اضافی به سیستم خلاء تجزیه‌گرهای جرمی را نیز کاهش می‌دهد.

۳. تجزیه‌گر چهار قطبی[۱۱]: تجهیزاتی که از میدان‌های الکتریکی به‌منظور جداسازی یون‌ها مطابق نسبت جرم به بارشان (m/z) استفاده کرده و یون‌ها را در طول مرکز محور ۴ الکترود چهار قطبی که به‌صورت موازی قرار گرفته‌اند، عبور می‌دهند.

۴. محفظه شکست[۱۲]: یون‌های خروجی از تجزیه‌گر جرمی اول، که با استفاده از پتانسیل‌های مختلف شتاب داده شده‌اند با برخورد به مولکول‌های گاز بی‌اثر همچون هیدروژن، نیتروژن و آرگون شکسته می‌شوند.

۵. تجزیه‌گر چهار قطبی: تجهیزاتی که از میدان‌های الکتریکی به‌منظور جداسازی یون‌ها مطابق نسبت جرم به بارشان (m/z) استفاده کرده و عملکردی مشابه چهار قطبی ذکر شده در مورد (۳) دارد.

۶. آشکارساز: پس از تولید و جداسازی یون‌ها نیاز است یون‌ها آشکارسازی و تبدیل به پیام‌های قابل استفاده شوند. افزاینده‌های الکترونی[۱۳]، دینود[۱۴]، فتودیود[۱۵] و پلیت‌های چند کاناله[۱۶] سیستم‌های آشکارسازی هستند که به‌صورت گسترده در بیشتر دستگاه‌های پیشرفته طیف‌سنجی جرمی به کار گرفته می‌شوند.

۷. سیستم خلاء: تجزیه‌گرهای جرمی نیاز به سطوح بسیار بالای خلاء دارند تا در شرایط موثر و پیش‌بینی شده کار کنند. سیستم‌های خلاء اغلب دستگاه‌های LC-MS پیشرفته، شامل دو یا بیش از دو محفظه خلاء هستند که به‌صورت متفاوتی پمپ می‌شوند و با استفاده از بفل‌ها[۱۷] و یا صفحات روزنه‌دار با طراحی‌های متفاوت بسته به تولید کننده دستگاه از هم جدا می‌شوند.

فرآیند آنالیز

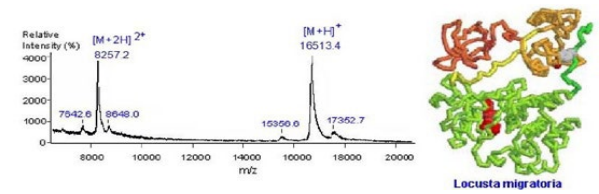
آنالیز در LC-MS در چند مرحله انجام می‌گیرد که در ادامه به این مراحل پرداخته می‌شود. در مرحله اول، جداسازی ترکیبات نمونه توسط ستون HPLC انجام گرفته و آنالیت بین فاز متحرک (حلال) و فاز ساکن توزیع می‌شود. سازوکار بازداری و جداسازی به نوع کروماتوگرافی انجام شده بستگی دارد و می‌تواند به روش‌های برهم‌کنش هیدروفوبی، تبادل یونی و فاز معکوس باشد. سپس نمونه‌های جداسازی شده درون منبع یونش اسپری شده و در فشار اتمسفر تبدیل به یون‌های گازی می‌شوند. بخش بیشتر فاز متحرک در این مرحله حذف می‌شود و یون‌های تولیدی برای جداسازی وارد تجزیه‌گرهای جرمی می‌شوند. در مرحله بعدی، تجزیه‌گرهای جرمی برای دسته‌بندی یون‌ها بر حسب نسبت جرم به بارشان به کار برده می‌شوند. از انواع تجزیه‌گرهای جرمی متداول می‌توان تجزیه‌گرهای چهار قطبی[۱۸]، زمان پرواز[۱۹] و تله یونی[۲۰] را نام برد. از تجزیه‌گرهای جرمی می‌توان برای فیلتر کردن یک یون با نسبت

جرم به بار خاص و یا برای روبش کلیه جرم‌های موجود در نمونه به‌صورت کامل استفاده کرد.

آشکارساز به‌منظور شمارش یون‌های حاصل از تجزیه‌گر جرمی به کار گرفته می‌شود و همچنین پیام تولیدی از هر یک از یون‌ها را تقویت می‌کند، از جمله آشکارسازهایی که به‌صورت گسترده به کار می‌روند می‌توان به آشکارساز افزاینده‌های الکترونی، آشکارساز دینود و آشکارساز پلیت‌های چند کاناله اشاره نمود. همه آنالیزهای جرمی وشناسایی‌ها در خلاءهای بالا انجام می‌شود. استفاده از LC-MS در بسیاری از زمینه‌های کاربردی علم آنالیز با سرعت در حال رشد است.

جداسازی HPLC

برای آنالیز با HPLC، آنالیت باید ابتدا در فاز متحرک حل شود و سپس نمونه‌ها در سراسر یک محدوده با قطبیت گسترده که نمونه‌های یونی را هم در بر می‌گیرد، آنالیز می‌شوند، همچنین در آنالیز با HPLC محدودیت جرمی وجود ندارد و این امر این امکان را ایجاد می‌کند تا پروتئین‌هایی با وزن مولکولی چندین هزار دالتون با استفاده از آن مورد آنالیز قرار گیرند، البته حلالیت در فاز متحرک می‌تواند آنالیز بسیاری از مولکول‌های بزرگ را محدود کند (شکل ۵). برای آماده‌سازی نمونه‌های HPLC آنها را در فاز متحرک یا حلالی با درصد حلال آلی کمتر از فاز متحرک تهیه کرده و حجم ۵۰-۱ میکرولیتر از نمونه را به دستگاه تزریق می‌کنند.



شکل ۵: طیف جرمی پروتئین Locusta migratoria که تحت یونش ESI یونیزه شده‌است [۳].

شناسایی با طیف‌سنج جرمی

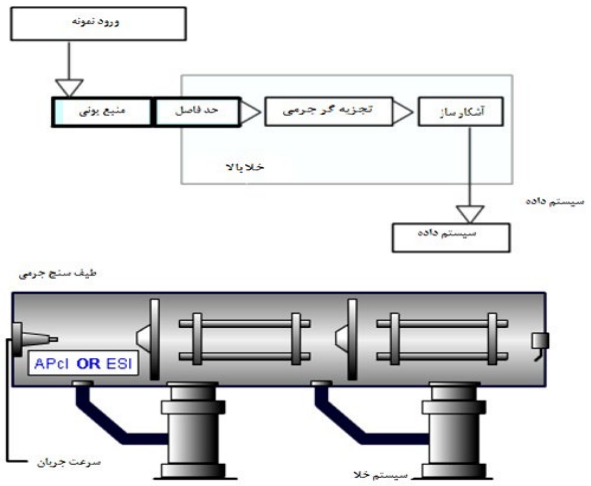
طیف‌سنجی جرمی شناسایی ترکیبات خاص و ساختارشان را از طریق تفسیر طیف جرمی آنها در ترکیب با آنالیز عنصری، میسر کرده و علاوه‌بر این حساسیت بالای آن، اجازه شناسایی مقادیر ناچیز نمونه با غلظت های ppb را نیز می‌دهد. همچنین گزینش‌گری بالای آن بازه گسترده‌ای از آنالیت‌ها را در بر می‌گیرد.

یونش

یونش فرآیندی است که در طی آن الکترون‌ها یا جابه‌جا شده یا به اتم‌ها و مولکول‌ها برای تولید یون اضافه می‌شوند. باردار شدن می‌تواند با اضافه شدن اتم‌ها یا مولکول‌های باردار مانند پروتون (H^+) به دیگر مولکول‌ها انجام شود. یونش در دستگاه LC-MS با استفاده از میدان‌های الکتریکی قوی و در فشار اتمسفر (API) در فاز گازی و یا فاز متراکم (مایع) انجام می‌شود (شکل ۶). از متداول‌ترین روش‌های یونش در LC-MS می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

- یونش الکترواسپری؛
- یونش شیمیایی در فشار اتمسفر؛
- فوتو یونش در فشار اتمسفر.

در یونش الکترواسپری، یونش در فاز متراکم (مایع) انجام می‌شود و در یونش شیمیایی در فشار اتمسفر و فوتو یونش در فشار اتمسفر، یونش در فاز گاز انجام می‌شود. در یونش در فشار اتمسفر حذف حلال و مرحله یونش در منبع یونش انجام می‌شود.



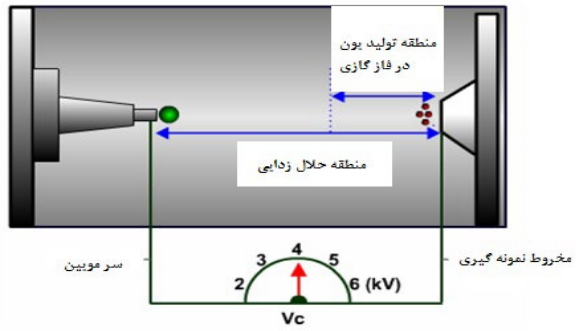
شکل ۶: نمای کامل از مراحل ورود نمونه تا رسیدن به سیستم داده (این بخش با عنوان سرعت جریان به مجموع آنالیت، حلال و سایر افزودنی‌ها که از دستگاه HPLC خارج می‌شوند، اشاره دارد) [۳].

منبع یونش الکترواسپری

قبل از رسیدن نمونه‌ها به تجزیه‌گر جرمی، آنالیت‌ها باید یونیزه شوند. در این مرحله، نمونه پس از جداسازی HPLC در منبع یونش اسپری می‌شود که محفظه‌ای با میدان الکتروستاتیک قوی است و گاز خشک کننده با دمای بالا در آن جریان دارد. در روش الکترواسپری، گاز خشک کننده یک گاز بی‌اثر با دمای حدود ۳۰۰-۲۰۰ درجه سانتیگراد است. این گاز، تبخیر فاز متحرک به همراه آنالیت‌ها و همه مواد افزوده شده به آن‌ها را بر عهده دارد. در سیستم الکترواسپری، جریان خروجی از کروماتوگرافی مایع به پروب الکترواسپری که لوله مویینه دو لایه است و در لایه خارجی آن گاز نیتروژن جریان دارد، وارد می‌شود. این مجموعه سبب تبدیل مایع خروجی به قطرات معلق ریز می‌شود. در نزدیکی پروب اسپری کننده منفذی قرار گرفته که یون‌های تشکیل شده از طریق آن به داخل طیف‌سنج جرمی کشیده می‌شود (شکل ۷).

اختلاف ولتاژ بین سر پروب و صفحه فلزی اطراف منفذ، به کشیده شدن قطرات ریز معلق ایجاد شده به داخل تجزیه‌گر جرمی کمک می‌کند. میدان الکتروستاتیک موجود در محفظه یونش سبب مهاجرت ذرات باردار به سطح قطرات شده و به‌صورت هم‌زمان، بخش اعظم حلال موجود در فاز متحرک به دلیل گاز نیتروژن داغی که در محفظه دمیده می‌شود، حذف می‌شود. این امر سبب کوچک‌تر شدن قطرات شده و منجر به تجمع بار بسیار زیادی

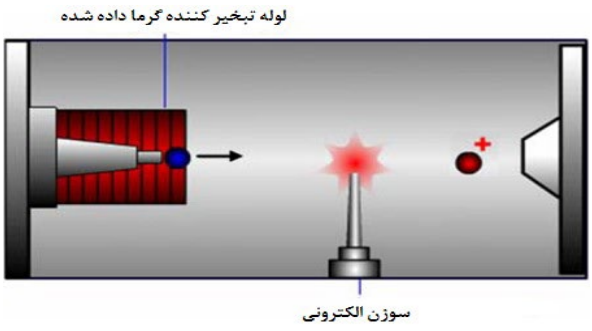
روی ذره با جرم بسیار کم می‌شود و دافعه بین این بارها که در سطح تجمع یافته‌اند سبب متلاشی شدن قطرات و ریزتر شدن آنها می‌شود. این روند به‌صورت مداوم سبب یونیزه شدن آنالیت‌ها شده و سپس یون‌ها به دلیل اختلاف ولتاژ موجود در منبع یونش به داخل تجزیه‌گر جرمی کشیده می‌شوند.



شکل ۷: نمای کلی منبع یونش الکترواسپری [۳].

یونش شیمیایی در فشار اتمسفر

در یونش شیمیایی در فشار اتمسفر، حذف حلال آنالیت و واکنش‌های انتقال بار در فاز بخار برای تولید یون‌های آنالیت در فاز بخار به کار می‌رود. در یونش شیمیایی در فشار اتمسفر فاز متحرک خروجی از HPLC با استفاده از یک لوله مویین شبیه به آنچه که در منبع یونش الکترواسپری طراحی شده‌است به داخل محفظه‌ای که با جریانی از گاز بی اثر و گرم احاطه شده‌است، اسپری می‌شود (شکل ۸)، اما برخلاف منبع یونش الکترواسپری هیچ پتانسیلی روی پروب اسپری کننده اعمال نمی‌شود. درون محفظه گرم و در نزدیکی پروب اسپری کننده یک الکترود قرار گرفته است که پتانسیل بالایی دارد و با یک تخلیه الکتریکی، مولکول‌های اطراف خود را که اغلب بخارات حاصل از فاز متحرک خروجی از HPLC هستند را یونیزه می‌کند (S). آنها نیز به نوبه خود از طریق یونش شیمیایی، یون‌های آنالیت (M) موجود در فاز گازی را یونیزه می‌کند.



شکل ۸: نمای کلی یونش شیمیایی در فشار اتمسفر [۵].

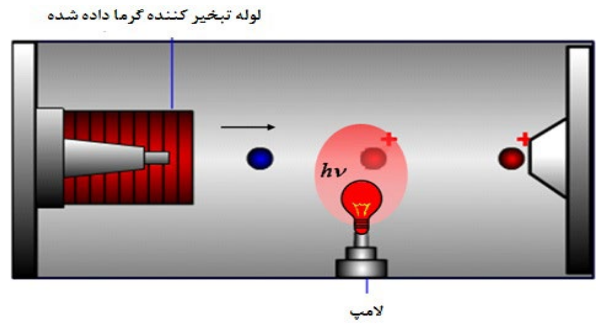
روش‌های ESI و APCI هر دو از روش‌های یونش نرم به شمار می‌آیند، این نامگذاری به این معناست که در طی فرآیند تولید یون مقادیر ناچیزی از انرژی به یون‌ها منتقل می‌شود و در نتیجه یون‌های تشکیل شده به یون‌های با جرم‌های کوچک شکسته و قطعه قطعه نمی‌شوند؛ بنابراین، طیف جرمی حاصل، اغلب بسته به نوع آنالیت و تمایل آن به پروتون که می‌تواند بیشتر یا کمتر از حلال باشد، شامل یون‌های شبه مولکولی $[M+H]^+$ یا $[H-M]^-$ و یا با اضافه شدن یون‌هایی به‌صورت یون‌های شبه مولکولی چون $[M+Na]^+$ خواهد بود.

$$M+[S+H]^+ \rightarrow [M+H]^+ + S$$

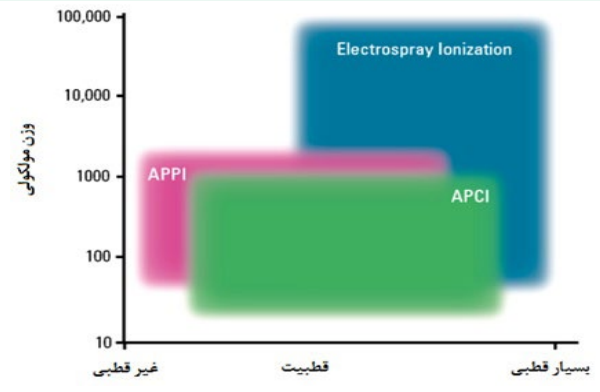
$$M+[S-H]^- \rightarrow [M-H]^- + S$$

فوتویونش در فشار اتمسفر

روش APPI، روشی مکمل برای روش یونش ESI و APCI است که محدوده آنالیت‌های یونیزه شونده در فشار اتمسفر را گسترش داده است. APPI در آنالیز ترکیباتی که به آسانی با استفاده از ESI و APCI یونیزه نمی‌شود مانند ترکیبات غیرقطبی یا با قطبیت پایین (آنالیز هیدروکربن‌های آروماتیک پلی سیکلیک) کاربرد گسترده‌ای دارد. در روش APPI، فرآیند یونش با قرار دادن قطرات ریز اسپری شده در معرض تابش فوتون انجام می‌شود (شکل ۹). در این روش که یونش در فاز گاز انجام می‌شود از یک لامپ کریپتون برای تولید فوتون استفاده می‌شود و سطوح انرژی آن با دقت طوری تعیین شده‌است که بیشترین یونش را برای آنالیت‌ها و حداقل یونش را برای حلال‌هایی چون آب و متانول و استونیتریل داشته باشند. در نمودار زیر تناسب آنالیت بر حسب وزن مولکولی و قطبیت و انتخاب نوع منبع یونش نشان داده شده است (شکل ۱۰).



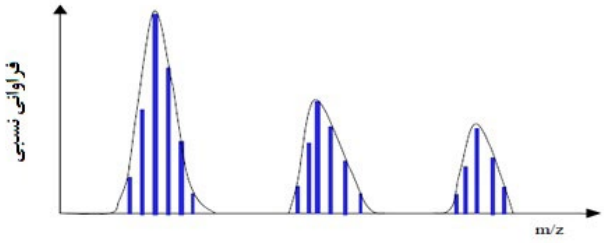
شکل ۹: نمای کلی فوتویونش در فشار اتمسفر [۵].



شکل ۱۰: انتخاب نوع منبع یونش برای آنالیت بر حسب وزن مولکولی و قطبیت [۴].

تجزیه‌گرهای جرمی

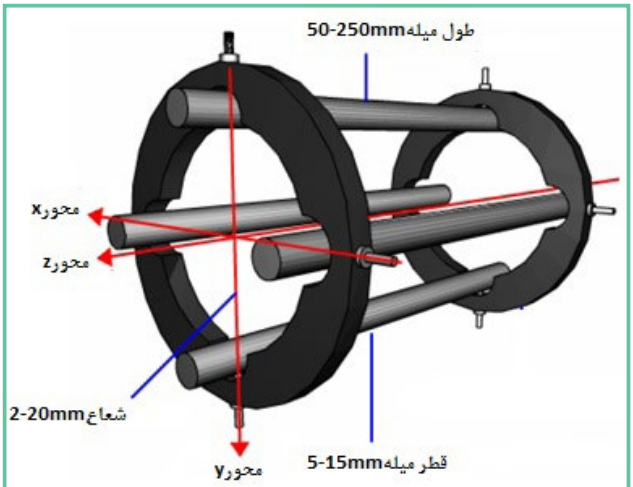
پس از یونیزه شدن آنالیت‌ها در منبع یونش، یون‌ها باید برای جداسازی براساس نسبت جرم به بارشان وارد تجزیه‌گرهای جرمی شوند، ساده‌ترین شکل فرآیند آنالیز جرمی در LC-MS شامل جداسازی و فیلتراسیون یون‌های آنالیت یا یون‌های حاصل از قطعه‌قطعه شدن یون‌های آنالیت است، انواع متداول بی‌شماری از تجزیه‌گرهای جرمی به کروماتوگرافی مایع متصل می‌شوند و تفاوت آنها در راهی است که برای جداسازی گونه‌ها براساس نسبت جرم به بارشان به کار می‌برند. از جمله تجزیه‌گرهای متداول می‌توان به تجزیه‌گر جرمی چهار قطبی و تجزیه‌گر جرمی تله یونی اشاره نمود که در این تجزیه‌گرهای جرمی از میدان‌های الکترواستاتیک برای جداسازی جرم‌های انتخاب شده براساس نسبت جرم به بارشان استفاده می‌کنند. تجزیه‌گر دیگر، تجزیه‌گر جرمی زمان پرواز است که در آن از تفاوت در زمان پرواز یون‌های شتاب داده شده از طریق یک مسیر طولانی برای جداسازی یون‌ها استفاده می‌شود. پس از جداسازی یون‌های آنالیت‌ها و شکست‌های حاصل از آن‌ها، با استفاده از تجزیه‌گرهای جرمی، یون‌های فیلتر شده وارد آشکارساز شده و نمودار حاصل، از نسبت جرم به بارشان بر حسب فراوانی آن‌ها رسم می‌شود که در تصویر زیر، یکی از این دیاگرام‌ها ارائه شده‌است (شکل ۱۱).



شکل ۱۱: نمودار نسبت جرم به باریون ها بر حسب فراوانی آن‌ها [۸].

تجزیه‌گر چهار قطبی

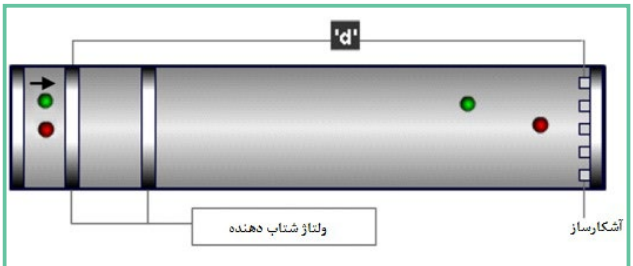
در تجهیزات آنالیز جرمی چهار قطبی از میدان‌های الکتریکی برای جداسازی یون‌ها مطابق نسبت جرم به بارشان استفاده می‌شود. مهمترین بخش چهار قطبی‌ها چهار میله استوانه‌ای است که دو به دو روبروی هم قرار دارند و یون‌ها در امتداد محور مرکزی چهار میله با طول مساوی که به‌صورت موازی هم قرار گرفته‌اند، عبور می‌کند. روی این میله‌ها هم جریان مستقیم (DC) و هم جریان متناوب (AC) اعمال می‌شود، جداسازی یون‌ها با استفاده از کنترل ولتاژ به کار رفته بر هر جفت از کوادراپل‌ها انجام می‌شود. به این صورت که، هر جفت از الکترودها علاوه‌بر جریان AC دریافتی جریان DC هم دریافت می‌کنند که از لحاظ کمی، مقدار برابری دارند ولی علامت آنها عکس هم است؛ به این معنا که دو الکترود رو به روی هم، بار مثبت و دو الکترود دیگر بار منفی دارند. به این صورت یک میدان مغناطیسی در بین این چهار الکترود ایجاد می‌شود و وقتی یونی وارد محوطه بین این چهار الکترود شود، دچار نوسان می‌شود، اگر در طی این نوسان به الکترودها برخورد نکند به آشکارساز می‌رسد و اگر نوسان آن زیاد باشد به الکترودها برخورد کرده و حذف می‌شود. بنابر آنچه گفته شد، درصورت ثابت نگه داشتن ولتاژ DC و AC فقط یک یون خاص با m/z خاص قادر به عبور از مسیر پایدار خواهد بود و بقیه یون‌ها با m/zهای بالاتر و پایین‌تر در میدان مغناطیسی موجود در کوادراپل منحرف شده و حذف می‌شوند. در تصویر (۱۲) مسیر پایداری برای عبور یون‌ها نشان داده شده‌است که محورهای x,y فاصله یون‌ها تا مرکز میله‌ها را تعیین می‌کند که اگر کمتر از r_0 باشد، یون در شرایط نوسان می‌تواند از میان کوادراپل‌ها بدون برخورد با آنها عبور کند و اگر میزان نوسان از r_0 تجاوز کند یون با الکترودها برخورد کرده و حذف می‌شود.



شکل ۱۲: نمای تجزیه‌گر چهار قطبی [۳].

تجزیه‌گر جرمی زمان پرواز

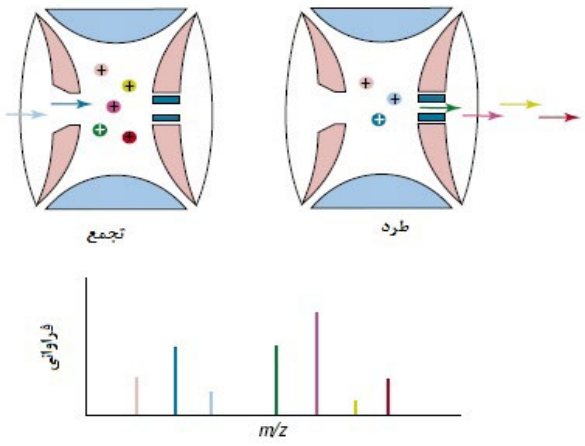
در تجزیه‌گرهای TOF، لوله بلندی در حدود یک متر وجود دارد که هیچ میدان مغناطیسی و الکتریکی به آن اعمال نمی‌شود. یون‌های تولیدی در منبع یونش قبل از رسیدن به TOF به‌وسیله صفحات شتاب‌دهنده، شتاب می‌گیرند (شکل ۱۳). در ابتدای این راه، انرژی جنبشی تمام یون‌ها با هم برابر بوده و هنگامی که در فضای خالی یک متری لوله رها می‌شوند با توجه به اینکه انرژی جنبشی تمام ذرات با هم برابر است، سرعت ذرات سبک‌تر بیشتر از سرعت ذرات سنگین‌تر خواهد بود و به این ترتیب ذرات از سبک به سنگین به آشکارساز می‌رسند و در واقع یون‌ها براساس نسبت جرم به بارشان تفکیک شده و در زمان‌های متفاوتی به آشکارساز می‌رسند.



شکل ۱۳: نمای تجزیه‌گر زمان پرواز [۳].

تجزیه‌گر جرمی تله یونی

در این تجزیه‌گرها از یک الکترود حلقوی[21] با ولتاژ متغیر و دو الکترود محدب که به‌صورت نیم‌کره بوده و دارای پتانسیل صفر هستند برای تولید میدان الکتریکی استفاده می‌شود. در این روش، برای به تله انداختن یون‌هایی که در یک محدوده جرمی هستند، ولتاژ متناوب روی الکترود حلقوی اعمال می‌شود و دو الکترود محدب نیم‌کره‌ای شکل را در حالت ولتاژ پایه نگاه می‌دارند (شکل ۱۴). در این تجزیه‌گر جرمی به‌منظور انتقال یون‌ها از منبع یونش تا تله یونی از یک گرادیان ولتاژ بین منبع یونش و تله یونی بهره می‌گیرند. در این روش، یون‌های به دام افتاده در فضای داخلی تله یونی دارای دامنه‌ای از مقادیر m/z هستند که با افزایش تدریجی ولتاژ متناوب، این یون‌ها به نوبت از کوچک به بزرگ از الکترود محدبی که در سطح آن منافذی وجود دارد، خارج می‌شوند. از قابلیت‌های منحصر به فرد این روش، توانایی انجام دادن پایش یون‌های تولیدی چندگانه با حساسیت بسیار خوب است، البته باید به این نکته توجه داشت که طیف به‌دست آمده از تجزیه‌گر جرمی تله یونی به‌صورت قابل توجهی با طیف به‌دست آمده از چهار قطبی از نظر الگوی شکست متفاوت خواهد بود.



شکل ۱۴: نمای تجزیه‌گر تله یونی [۷].

نتیجه‌گیری

کروماتوگرافی مایع - طیف‌سنجی جرمی روشی تجزیه‌ای است که قابلیت جداسازی فیزیکی کروماتوگرافی مایع را با قابلیت آنالیز جرمی طیف‌سنجی جرمی ترکیب می‌کند. کروماتوگرافی مایع به تنهایی اطلاعاتی در مورد ماهیت شیمیایی ماده فراهم نمی‌کند و نمی‌توان در مورد خلوص یک پیک نیز اطمینان داشت. LC-MS روش قدرتمندی است که حساسیت بسیار بالایی فراهم می‌کند و کاربردهای بسیاری نیز دارد. عمده‌ترین کاربرد این روش جداسازی، آشکارسازی کلی و شناسایی بالقوه ترکیبات شیمیایی با جرم‌های مشخص در حضور دیگر مواد شیمیایی (در مخلوط‌های پیچیده)، ترکیبات طبیعی از عصاره‌های ترکیبات طبیعی و یا مواد خالص از مخلوط‌ها یا حد واسط‌های شیمیایی است. تجزیه‌گرهای جرمی بسیاری وجود دارند که در دستگاه LC-MS قابل استفاده هستند که در این مقاله به برخی از متداول‌ترین آنها اشاره شد.

پی‌نوشت

۱. کارشناس مهندسی شیمی، گروه پژوهشی آنالیزی کیمیازی

۲. دکتری شیمی آلی، مرکز تحقیقات ریز فناوری زیستی، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن‌سینا

۳. کارشناس ارشد شیمی آلی، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

۴. عضو کارگروه تخصصی کروماتوگرافی شبکه آزمایشگاهی

5. Electrospray ionization

6. Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)

7. Atmospheric Pressure Photo Ionization (APPI)

8. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)

9. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

10. Atmospheric Pressure ionization (API)

11. Quadrople

12. Collision cell

13. Electron multiplier

14. Dynode

15. Phptodiode

16. Multi plate channlel

17. Baffles

18. Quadrople

19. Time of flight

20. Ion trap

21. Ring elctrode

مراجع

[1] Miller, J. N. and Miller, J. C., Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 4th Edn, Pearson Educational, Harlow, UK, 2000.

[2] Asperger, A., Efer, J., Koal, T. and Engewald, W., J. Chromatogr., A, 937, 65–72 (2001).

[3] Naidong, W., Chen, Y., Shou, W. and Jiang, X., J. Pharm. Biomed. Anal., 26, 753–767 (2001).

[4] Seto, C., Bateman, K. P. and Gunter, B., J. Am. Soc. Mass Spectrom., 13, 2–9 (2002).

[5] Pamme, N., Steinbach, K., Ensinger, W. J. and Schmidt, T. C., J. Chromatogr., A, 943, 47–54 (2001).

[6] McAtee, C. P., Zhang, Y., Yarbough, P. O., Fuerst, T. R., Stone, K. L., Samander, S. and Williams, K. R., J. Chromatogr., B, 685, 91–104 (1996).

[7] Wan, H. Z., Kaneshiro, S., Frenz, J. and Cacia, J., J. Chromatogr., A, 913, 437–446 (2001).

[8] Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M., Principles of Biochemistry, 3rd Edn, Worth Publishers, New York, 2000.

[9] Chapman, J. R., (Ed.), Protein and Peptide Analysis by Mass Spectrometry, Methods in Molecular Biology, Vol. 61, Humana Press, Totowa, NJ, 1996.

[10] Turula, V. E., Bishop, R. T., Ricker, R. D. and de Haseth, J. A., J. Chromatogr., A, 763, 91–103 (1997).

[11] Klarskov, K., Leys, D., Backers, K., Costa, H. S., Santos, H., Guisez, Y. and Van Beeumen, J. J., Biochim. Biophys. Acta, 1412, 47–55 (1999).

[12] Poutanen, M., Salusjarvi, L., Ruohonen, L., Penttila, M. and Kalkkinen, N., Rapid Commun. Mass Spectrom, 15, 1685–1692 (2001).

[13] Bonomo, R. A., Liu, J., Chen, Y., Ng, L., Hujer, A. M. and Anderson, V. E., Biochim. Biophys. Acta, 1547, 196–205 (2001).

[14] Huddleston, M. J., Annan, R. S., Bean, M. F. and Carr, S. A., J. Am. Soc. Mass Spectrom., 4, 710–717 (1993).

[15] Leonil, J., Gagnaire, V., Molle, D., Pezennec, S. and Bouhallab, S., J. Chromatogr., A, 881, 1–21 (2000).