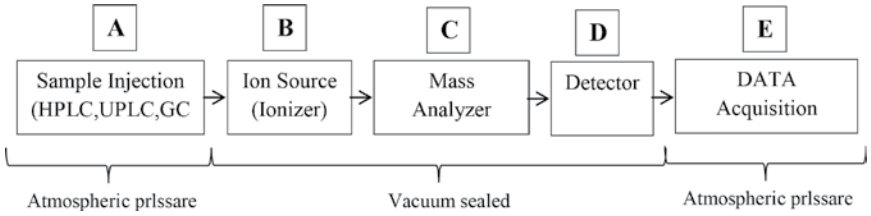
مهندس علی مرادی
کارشناس آنالیز دستگاهی

TENDEM MASS؛
ساختارو کاربردهای گونه گون آن در کلینیک

دستگاه های اسپکترومتر جرمی دوگا نه (MS/MS) از جمله سیتسم های آنالیتیکال (تجزیه ای) با تکنولوژی پیشرفته (High-Tech)است که برای نخستین بار در سال ۱۹۲۸ میلادی از سوی دانشمند آمریکایی تامسون که بر روی انحراف پرتوهای کاتدی در میدان های الکترومغناطیسی کار می کرد، به جهان معرفی شد. اساس ساختاری تمامی سیستم های Mass Spectrometers بر مبنای یونیزاسیون و جداسازی یون ها (ذرات باردار) براساس نسبت جرم بر بار الکتریکی(M/Z) استوار است. البته این نسبت قدر مطلق نبوده و بستگی به فراوانی نسبی (غلظت یا پراکندگی) یون ها نیز دارد، تا جرم ثابت آنها به تنهایی. قسمت های مختلف دستگاههای Mass Spectrometer بطور کلی شامل ۵ بخش (Component) مجزا از هم به شرح زیر است، که به جز بخش های A و E ما بقی بخش ها در محیط خلاء است.



A) بخش تزریق نمونهSample injection

در بخش آغازین دستگاه Mass Spectrometers، سیستم تزریق نمونه قرار دارد که می تواند به گونه ی مستقیم نمونه توسط پمپ و سرنگ Harvard تزریق گردد، و یا غیر مستقیم از با ی ک دستگاه GC, UPLC و یاHPLC به دستگاه MS تزریق شود، که در نوع دوم (غیرمستقیم) با توجه به اینکه جداسازی اولیه اجزائ نمونه بر اساس اصول شیمائی جداسازی مواد انجام پذیرفته است، و نمونه تغلیض شده با تداخل کمتر وارد سیستم MS می شود. بدین روی از حساسیت و دقت بالاتری نسبت به روش تزریق مستقیم برخوردار است.

B) سمت منبع یون (Ion source):

در این بخش اتم های اجزای نمونه (sample) به کمک تکنیک های مختلفی به شرح زیر یونیزه می شود.

B1) یونیزاسیون سخت (Hard Ionization): در این روش یونیزاسیون، بمباران اتم های نمونه به گونه ی مستقیم با پرتوهای الکترونی پر انرژی موجب تشکیل یون مولکول (Ion Molecule) می شود که می تواند در بخش بعدی یعنی Mass Analyzer جداسازی شود. کاستی بزرگ این روش یونیزاسیون نمونه ایجاد شکست (Fragmentation) در ساختار مولکول های نمونه است که با ایجاد تغییر در ساختار (شکل) فضائی و مولکولی آنها در واقع موجب تغییر ماهیت نمونه و کاهش دقت و حساسیت این روش می شود.

B2) یونیزاسیون نرم (Soft Ionization): در این روش یونیزاسیون، بخش های نمونه بجای بمباران با پرتوهای پر انرژی الکترونی با اتم های کم انرژی تری بمباران می شود، که به لحاظ ایجاد حداقل تغییرات در ساختار فضائی مولکول های نمونه ،حساس تر و دقیق تر بوده و کاربرد بیشتری نیز دارد.

گونه های یونیزاسیون نرم (Soft Ionization)

B2-1) یونیزاسیون الکترو اسپری

ESI (Electrospray Ionization)

در این روش نمونه را در یک حلال قطبی مانند متانل یا استو نیتریل حل می کنند، و آنرا از راه یک لولهٔ موئینه (Capillary) با ضخامت ۱۰۰µm با شدت جریان یا بیشتر پم می کنند، در دهانهٔ خروجی لولهٔ موئینه اختلاف پتانسیلی در حدود (KV ٥-٤) اعمال می شود که موجب یونیزاسیون اجزا نمونه در حین خروج و پاشیده شدن از نوک لوله می شود، مخلوط پودر شده ذرات حلال و نمونه که به صورت یونیزه شده (باردار) وارد محفظهٔ خلاء منبع یونیزاسیون می شود پس از تبخیر کوچک تر شده و همزمان طی برخورد با جریان ثابتی از گاز خشک نیتروژن با خلوص بالا (٪۹۹/۹۹۹) ضمن خشک شدن الکترون خود را از سطح اتم آزاد می نماید. باتوجه به این که این فرآیند در دمای محیط (Ambient) انجام می پذیرد روش ESI جهت یونیزاسیون اکثر مولکول های بیولوژیک با جرم مولکولی بالا و ذرات قطبی ناپایدار از نظر حرارتی (Volatile)مانند پروتئین ها، آنزیم ها، هورمون ها و سایر مشتقات آنها روش انتخابی (Method of Choice) به شمار می رود.

B2-2) یونیزاسیون حرارتی Thermal Ionization(TI)

اساس این روش به این ترتیب است که وقتی مولکول های نمونه با پتانسیل یونیزاسیون(I(e.v با یک سطح فلزی بسیار داغ با درجه حرارت T(k) و تابعی از کار (W (e.v برخورد کنند در ضمن گرم شدن و تبخیر یون هایی نیز از سطح مولکول های تبخیر شده آزاد شده که ضمن هدایت به سمت جدا کننده جرمی (Mass Analyzer) تفکیک می شود. با توجه به انجام این فرایند یونیزاسیون در دمای بالا که موجب ایجاد تغییرات شدید در ساختار مولکول های نمونه و در نتیجه دناتوره شدن پروتئین ها و مشتقات آنها می شود، این روش جهت انجام تحقیقات بیولوژیک مناسب نبوده و کمتر کاربرد دارد.

B2-3) یونیزاسیون میدان الکتریکی EFI (Electron Field)

در این روش یونیزاسیون مولکولهای نمونه (Sample) در معرض یک میدان الکتریکی قوی با اختلاف پتانسیل (V) در حدود (۷۰۰۰-۱۱۰۰۰) و شدت که توسط یک پروب نازک ایجاد می شود، قرار گرفته و یونیزه می شوند. این میزان قدرت و شدت بالای میدان الکتریکی موجب خروج یون ها بر اثر پدیدهٔ برانگیختگی (Incitation) از سطح پتانسیل انرژی ثابت(انتالپی) مولکولی شده و سرانجام موجب ایجاد یون مولکول شده،که با Mass Analyzer جداسازی می شود.

B2-4) یونیزاسیون بمباران اتمی سریع

FABI (Fast Atom Bombardment)

در این روش یونیزاسیون به طور خلاصه نمونه (Sample) مورد نظر را با یک ماتریکس پایدار (غیرفرار) مانند تیوگلسیرول، دی اتانل آمین و یا سولفولان مخلوط کرده، سپس در شرایط خلاء آنرا با پرتوهای پر انرژی حاصل از اتم گازهای بی اثر مانند آرگون Ar، زنون Xe بمباران می کنند تا یونیزه شوند. برتری چشمگیر این تکنیک یونیزاسیون، انجام همه ی فرآیند یونیزاسیون در دمای محیط است، که باعث ایجاد کمترین دگرگونی در ساختار فضائی و شیمایی ترکیبات مهم حساس به حرارت، مانند نوکلئوئیدها، پپتیدها، اسیدهای آمینه، کربوهیدرات ها و غیره می شود و از این رو در پژوهش های بیولوژیکی مورد پسنداست.

B2-5) یونیزاسیون شیمیائی CI (Chemical Ionization)

این تکنیک در مقایسه با روش یونیزاسیون سخت (Hard) که مولکولهای نمونه به گونه ی مستقیم تحت تأثیر پرتوهای پر انرژی الکترونی قرار گرفته و دچار شکست مولکولی (Fragmentation) ومنجر به تغییر در ساختار فیزیکی و شیمائی نمونه و تشکیل یون مولکول (Ion Molecule) می شود، دارای مزایای بیشماری بوده و درصد فراوانی یون مولکول ها در این روش یونیزاسیون افزایش می یابد. در این روش یونیزاسیون اجزاء نمونه به واسطه گازهای واکنش گری مانند ایزوبوتان یا متان که خودشان تحت تأثیر پرتوهای پر انرژی بمباران الکترونی شده (لذا با از دست دادن الکترون یونیزه شده اند و انرژی کمتری نیز دارند) ضمن برخورد, بطور ملایم تری یونیزه شده و به سمت Mass Analyzer جهت تفکیک می روند. این روش یونیزاسیون به خصوص جهت مطالعات ساختار شیمیائی اجزا نمونه کاربردهای فراوانی دارد.

B2-6) یونیزاسیون MALDI (Matrix assisted laser desorption Ionization)

این روش یونیزاسیون مانند یونیزاسیون ESI جهت یونیزاسیون مولکول های بزرگ باردار (با جرم مولکولی بالا) مانند پروتئین ها و مشتقات آنها کاربردهای فروانی دارد. اصول یونیزاسیون Maldi مانند یونیزاسیون FABI بوده با این تفاوت که نمونه حل شده درگلیسرول را بجای بمباران اتمی توسط پرتوهای لیزری بمباران می کنند. در روش یونیزاسیون MALDI با مخلوط کردن نمونه (Sample) توسط مقادیری مادهٔ پایهٔ (Matrix) که معمولاً از مشتقات Sinapinic Acid و یا مشتق فلئورسنت (Cyno) آن است موجب پایداری آن می شود و سپس مخلوط را در ظرفی خشک و کریستاله کرده و سپس در معرض اشعه لیزر نیتروژن با طول موج ۳۳۷ nm قرار داده تا ضمن گرم شدن، مخلوط نمونه و ماتریکس وارد فاز گازی شده و تصعید شوند و در همین اثناء مولکول های ماتریکس ضمن برانگیخته شدن با آزاد کردن انرژی بصورت پروتون و برخورد و انتقال آن به مولکول های نمونه آنها را به صورت شارژ مثبت (+) یونیزه نموده تا در بخش Mass Analyzer (C) آنالیز شوند.این تکنیک یونیزاسیون به خصوص در مورد مطالعات پپتید ها و پروتئین ها کاربرد فراوانی دارد.

c) تجزیه گرهای جرمی (Mass Analyzers)

رویهمرفته بخش اصلی و تعیین کنندهٔ (قلب) هر سیستم Mass Spectrometer، بخش Mass Analyzer آن است که به طور خلاصه وظیفه اصلی آن جداسازی و متمرکز کردن یون های همسان و تفرق(Differentiation) یون های غیرهمسان و هدایت و خروج آنها از سیستم است. یون های همسان بسوی دستگاه آشکار ساز (Detector) رفته و اندازه گیری می شود. در ادامه با توجه به تنوع تجزیه گرهای جرمی به لحاظ ساختاری وتفاوت تکنیک های جداسازی هر کدام، به طور خلاصه به بررسی و معرفی برخی از آن ها می پردازیم.

c1) آنالیزورهای جرمی چهار قطبی (Quadrupole)

این آنالیزورهای جرمی همانطور که از اسم آن بر می آید متشکل از ٤ میله موازی با مقطع هزلولی (Hyper-bolic) است که توسط غلافی عایق از جنس سرامیک پوشیده شده است. طول هر یک از میله ها در حدود۲۵ cm و قطر داخلی در حدود ٦-٥ mm است، هر جفت

لوله مقابل هم به ولتاژ مستقیم (+DC) و (RF) و جفت لوله دگر به ولتاژ مستقیم (-DC) و (RF) ۱۸۰ درجه خارج فاز (معکوس) متصل هستندو بنابراین با ایجاد یک میدان مغناطیسی ٤ قطبی (Quadrupole) در فضای مابین لوله ها عملا یونهای نمونه ضمن عبور از این فضا بصورت الکترو استاتیکی شارژ می شوند وبدین ترتیب یونهای نمونه با نسبت جرم به بار متنوع با ایجاد تغییر در ولتاژ جریان DC و یا RF در فرکانس مشخصی از هم جدا می شوند. به عبارت دیگر تنها یون هایی از نمونه با نسبت M/Z مشخص در دامنه ولتاژ و فرکانس اعمال شده مشخص شده می توانند از فضای بین لوله ها بدون برخورد با آنها عبور کرده و به آشکارساز(Detector) یا به محفظه برخورد (Collision cell) رسیده و شناسایی شوند و با مابقی یون های نمونه با نسبت های(M/Z) غیر همنوع در حین حرکت منحرف شده و در برخورد با میله ها به فضای خارجی آنها منتقل و حذف شده و به دتکتور نمی رسند. بنابراین می توان گفت که آنالیزور جرمی ٤ قطبی (Quadrupole) در حقیقت به عنوان یک فیلتر جرمی (M/Z)عمل می کند.

[1]-GRIFFITH WJ,ANDREAS PJ,ELECTROSPRAY AND TANDEM MASS SPECTROMETRY IN BIO CHEMISTRY.BIO CHEM J2001,500-600

[2]-GROSS JH.MASS SPECTROMETERY 2ND ED,BERLIN SPRINGER, 2010-11

[3]-KL OLSON,FIELD DESORPTION,IONIZATION MS SPEC.ANAL CHEM, 1989

[4]-WALKER&WILSON PRINCIPLES AND TECHNIQUES OF BIO CHEM AND MOLECULAR BIO,CAMBRIDGE UNI, 2011

[5]-MUNSON MSB,DEV OF CHEM IONIZATION MS SPECTROM,2000,200-300