

لاستشراب السائل المزود بمقياس طيف الكتلة

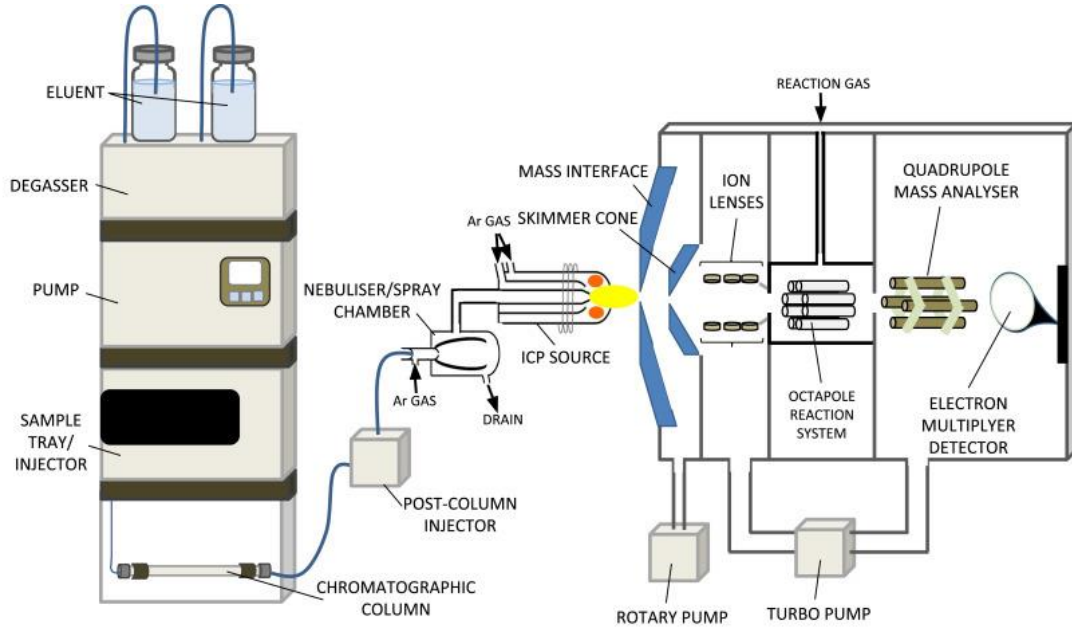
Liquid Chromatography HPLC-MS

الأستاذ الدكتور ضياء فالح الفيكي 2022

هي طريقة لاكتشاف وتحديد المستويات المنخفضة من المركبات شبه المتطايرة أو غير المتطايرة LC-MS ، خاصة في مصفوفات العينات المعقدة



أنواع من أجهزة HPLC -MS



يجمع LC-MS بين عمليات الفصل الكروماتوغرافيا السائلة المشابهة لطرق HPLC مع قياس الطيف الكتلي عالي الدقة. تُحقن العينة أولاً في عمود كروماتوغرافيا ويتم فصل المكونات الفردية وفقاً لخصائصها الفيزيائية. يتم تمرير المكونات المنفصلة عبر مصدر تأين عالي الجهد ينتج أيونات مشحونة يتم تحليلها بناءً على كتلتها. والنتيجة هي طيف كتلة يظهر بصمة كيميائية فريدة لكل مركب .

في تقنيات LC-MS ، من الممكن ملاحظة قمم الأيونات الجزيئية المقابلة للكتلة الجزيئية للمركبات في العينة. في حالة تحليل عينة غير معروفة ، يعطي LC-MS عالي الدقة بيانات دقيقة للغاية عن الكتلة الجزيئية. يتيح ذلك درجة عالية من الدقة في تحديد المركبات غير المعروفة LC-MS. هي طريقة حساسة للغاية. يمكن الكشف عن المستويات المركبة في نطاق الأجزاء لكل مليار (جزء في البليون) وقياسها. يمكن الكشف عن العديد من المركبات العضوية مثل الأدوية ومضادات الأكسدة وإضافات البوليمر والمبيدات الحشرية وتحديدتها بدقة باستخدام دقة الكتلة العالية لهذه التقنية.

LC-MS هي تقنية مرنة. تُستخدم أوضاع التشغيل المختلفة لتخصيص تحليل لنوع عينة معين. تشمل المعلمات القابلة للتعديل مصدر التأين ، قطبية التأين ، التجزئة والحساسية. يعد Electro spray (ESI) هو المصدر الأكثر شيوعاً للتأين ، وغالباً ما تُستخدم هذه الطريقة كنوع أول من التحليل لعينة في ESI إيجابي أو وضع ESI سلبي. التأين الكيميائي للضغط الجوي (APCI) متاح في كلا الوضعين الموجب والسالب. تقنية التأين هذه مفيدة بشكل خاص للمركبات شديدة الكراهية للماء مثل المنتجات البترولية.

يستخدم LC-MS في وضع MS ، ويوفر القليل من الانهيار للأيونات الرئيسية. وضع MS / MS متاح أيضاً. في هذا النهج ، تمر المواد التحليلية عبر خلية تصادم لتحفيز التفكك الذي يساعد في إلقاء الضوء على مركب غير معروف. من خلال الجمع بين شظايا الأيونات ، من الممكن التمييز بين التركيب الجزيئي للمركب الأصلي. تزيد تقنيات MS / MS أيضاً من حساسية LC-MS لتحليل ذي أهمية ولها العديد من التطبيقات في التحليل الكمي.

بالإضافة إلى ذلك، نستخدم منصة kimformatics قوية لدمج جميع البيانات التي تم الحصول عليها بواسطة LC-MS وربط تحليلنا بقواعد البيانات الخارجية لمزيد من المساعدة في وصف الهيكل.

يمكن تحليل مجموعة متنوعة من أنواع العينات بواسطة LC-MS للمركبات شبه المتطايرة وغير المتطايرة. تتميز الطريقة بحساسية عالية تسمح حتى لكميات العينات الصغيرة (حوالي 1 جرام) بتوفير مجموعة بيانات غنية للتحليل. يمكن تعديل العديد من مصفوفات العينات بناءً على LC-MS ، بما في ذلك الخلائط المائية ، وتركيبات البوليمر ، والمصفوفات البيولوجية .

قد تكون هناك حاجة لبعض عمليات التنظيف الأولية والاستخراج للعينات الأكثر تعقيداً. يمكن إذابة التحليلات ذات الأهمية في الماء أو المذيبات العضوية. بشكل عام ، لا يمكن تحليل المعادن والعديد من المعادن العضوية الهجينة بنجاح باستخدام LC-MS.

هو أحد تقنيات الكيمياء التحليلية التي تجمع بين قدرات الفصل الفيزيائي بواسطة الاستشراب (السائل) أو (HPLC) مع قدرات مطيافية الكتلة (MS). إن دمج تقنيات الفصل الكروماتوغرافيا مع مطيافية الكتلة أمر شائع في التحليل الكيميائي لأن ذلك يعزز القدرات الفردية لكل تقنية. في حين أن الفصل الكروماتوغرافيا السائل يفصل المكونات المتعددة للمخاليط، يوفر مطياف الكتلة البنية الكيميائية للجزيئات بدقة وحساسية عالية. تستغل مميزات هذا الدمج بين التقنيات في تحليل المركبات الكيميائية الحيوية والعضوية وغير العضوية الموجودة عادة في العينات المعقدة من الأصل البيئي والبيولوجي. لذلك، يستخدم LC-MS في مجموعة واسعة من القطاعات بما في ذلك التكنولوجيا الحيوية، الرصد البيئي، معالجة الأغذية وصناعة الدواء، الكيماويات الزراعية وصناعة مستحضرات التجميل .

يحتوي نظام LC-MS على واجهة بينية تنقل المكونات المنفصلة بكفاءة من عمود جهاز الكروماتوغرافيا السائلة إلى مصدر الأيونات . ووجود الواجهة أمر ضروري لأن أجهزة LC و MS نظرياً أنظمة غير متوافقة.

في حين أن الطور المتحرك في نظام LC هو سائل مضغوط، تعمل أجهزة مطياف الكتلة عادة تحت ضغط عالٍ (حوالي 10^{-6} / 10^{-7} تور). وبالتالي، فإنه ليس من الممكن ضخ مباشرة المادة المدمصة والوسط الحامل من عمود الفصل الكروماتوغرافيا إلى مصدر الأيونات بمطياف الكتلة، من الناحية الميكانيكية تعتبر الواجهة أبسط جزء في جهاز الفصل الكروماتوغرافيا المزود بمقياس طيف الكتلة والتي يسمح لها تركيبها البسيط بنقل أكبر قدر ممكن من المادة المدمصة، والتخلص من جزء كبير من الطور المتحرك المستخدم في LC مع الحفاظ على الهوية الكيميائية للمادة المطلوب تحليلها (خاملة كيميائيًا). ومن أهم الشروط التي يجب توافرها في الواجهة ألا يتداخل عملها مع كفاءة التأين وظروف الفراغ لنظام مطيافية الكتلة) في الوقت الحاضر، تعتمد معظم واجهات LC-MS المطبقة على نطاق واسع على استراتيجيات تأين الضغط الجوي (API) مثل التأين بالترذيد الإلكتروني (EI)، التأين الكيميائي تحت الضغط الجوي (APCI)، والتأين الفوتوني تحت الضغط الجوي (APPI). أصبحت هذه الواجهات متوفرة في التسعينيات بعد عملية بحث وتطوير استمرت عقدين من الزمن.

تُعد تقنية اقتران الفصل الكروماتوغرافيا مع مطيافية الكتلة استراتيجية تحليل كيميائي متطورة تعود إلى الخمسينيات من القرن الماضي. حيث تم الدمج بين كروماتوغرافيا الغاز - (GC) ومطيافية الكتلة MS في عام 1952، عندما كان AT James و AJP Martin يحاولان تطوير تقنيات تحليل الفصل الكتلّي بالترادف.^[5]

تخرج مكونات العينة المطلوب تحليلها من خلال عمود الفصل في أجهزة الفصل الكروماتوغرافيا الغازي في صورة غازية وبالتالي يكون الاتصال مع مصدر الأيونات المعتمد على التأين بالترذيد الإلكتروني (EI) أو التأين الكيميائي (CI) أمراً سهلاً من الناحية الفنية ولهذا السبب، كان تطوير أنظمة GC-MS أسرع من LC-MS حيث تم تسويق هذه الأنظمة لأول مرة في السبعينيات من القرن الماضي.^[3] استغرق تطوير أنظمة LC-MS وقتاً أطول من GC-MS وارتبط هذا الأمر بشكل مباشر بتطوير واجهات (وصلات بيئية) مناسبة. بدأ VL Tal'roze والمعاونون تطوير LC-MS في أوائل السبعينيات، عندما استخدموا الأوعية الشعرية لتوصيل أعمدة الفصل الكروماتوغرافيا السائل ومصدر الأيونات في مقياس طيف الكتلة.^{[4][6]}

قام مكلافيرتي ومعاونوه بالتحقيق في إستراتيجية مماثلة عام 1973. كانت هذه هي الطريقة الأولى والأكثر وضوحاً للربط بين LC و MS، وكانت تعرف «واجهة المدخل الشعري». حققت هذه الواجهة الرائدة لجهاز LC-MS نفس الكفاءة التحليلية تقريباً التي يحققها جهاز GC-MS وكان يقتصر على تحليل المواد المتطايرة إلى حد ما والمركبات غير القطبية ذات الكتلة الجزيئية المنخفضة (أقل من 400 دالتون).

• واجهة الحزام المتحرك

تم تطوير واجهة الحزام المتحرك (MBI) في عام 1977. وتتكون من حزام متحرك باستمرار يستقبل تدفق السائل من عمود الفصل. حيث يتم تبخير المذيب بالتسخين بلطف واستنفاد أبخرة المذيبات بكفاءة تحت ضغط منخفض في غرفتين مفرغتين. بعد إزالة الطور السائل، تُمتص المواد المطلوب تحليلها من الحزام وتنتقل إلى مصدر الأيونات في مطياف الكتلة. تم استخدام MBI بنجاح لتطبيقات LC-MS بين عامي 1978 و1990.

• واجهة استقبال السوائل مباشرة

تم تطوير واجهة إدخال السائل مباشرة (DLI) في عام 1980. تم التفكير في هذه الواجهة كحل لتبخير السائل داخل واجهة المدخل الشعيري، حيث تم استخدام مرذاذ لتفكيك جزء من السائل المتدفق من العمود. تم استخدام حاجز صغير لتكوين نفاثة سائلة مكونة من قطرات صغيرة تم تجفيفها لاحقاً في غرفة مفرغة تحت ضغط.

• واجهة التبريد الحراري

تم تطوير واجهة التبريد الحراري (TPS) في عام 1983 من قبل مختبرات Vestal في جامعة هيوستن. نتجت الواجهة عن مشروع بحث طويل الأجل يهدف إلى إيجاد واجهة LC-MS قادرة على التعامل مع معدلات التدفق العالية (1 مل / دقيقة) وتجنب تقسيم التدفق في واجهات DLI.

• واجهات تعتمد على القصف الديناميكي للذرات السريعة

تم تطوير واجهتي فريت القصف الديناميكي للذرات السريعة وواجهة القصف الديناميكي للذرات السريعة ذات التدفق المستمر في عامي 1985 و1986 على التوالي.

• الكروماتوغرافيا السائلة هي الفصل المادي لمكونات السوائل حيث يتم توزيع مكونات السائل بين طورين عديمي الامتزاج (طور ثابت وطور متحرك). يمكن تقسيم الكروماتوغرافيا السائلة إلى خمس فئات، الاستشراب انجذابي، استشراب التبادل الأيوني، استشراب استبعاد الحجم، استشراب الادمصاص، استشراب تقاسمي والنوع الأكثر شيوعاً هو وضع الطور العكسي (RP) لتقنية الاستشراب التقاسمي، حيث يتم استخدام طورًا ثابتاً غير قطبي (كاره للماء) وطور متحرك قطبي. في التطبيقات الشائعة، الطور المتحرك عبارة عن مزيج من الماء والمذيبات القطبية الأخرى (مثل الميثانول والإيزوبروبانول والأسيتونيتريل)، ويتم تحضير الطور الثابت عن طريق ربط

مجموعات ألكيل طويلة السلسلة (على سبيل المثال، n -octadecyl أو C18) إلى سطح جزيئات السيليكا قطرها 5 ميكرون بشكل غير منتظم أو كروي .

عادة يتم حقن 20 ميكرو لتر من العينة في جهاز الـ HPLC تسري في تيار الطور المتحرك الذي تضخه مضخة الضغط العالي. يسرى الطور المتحرك حاملاً جزيئات المادة المطلوب تحليلها في جزيئات الطور الثابت في اتجاه محدد. يتم فصل مكونات الخليط اعتماداً على الألفة الكيميائية بينها وبين الطور الثابت والمتحرك يحدث الانفصال بعد تكرار الامتصاص والامتزاز الخطوات التي تحدث عندما يتفاعل السائل مع الطور الثابت. [4] يتم ضخ الطور المتحرك تحت ضغط عالٍ (يصل إلى 400 بار) في عمود معبأ يحتوي على الطور الثابت. ويستخدم الضغط العالي لتحقيق معدل تدفق ثابت لتجارب الكروماتوغرافيا القابلة للتكرار. اعتماداً على التقاسم بين الطور الثابت والطور المتحرك، سوف تتدفق مكونات العينة من العمود في أوقات مختلفة.

عمود الفصل هو العنصر الأكثر أهمية في نظام LC وهو مصمم لتحمل الضغط العالي للسوائل. يبلغ طول أعمدة LC التقليدية 100-300 مم ويبلغ قطرها الخارجي 6.4 ملم (4/1 بوصة) وقطرها الداخلي 3.0-4.6 مم. بالنسبة للتطبيقات التي تتضمن LC-MS، يمكن أن يكون طول أعمدة الكروماتوغرافيا السائلة أقصر (30-50 مم) وجزيئات التعبئة قطرها 3-5 ميكرون. بالإضافة إلى النموذج التقليدي، تمثل أعمدة LC الأخرى نماذج ضيقة التجويف narrow bore، ذات تجويف ميكرو، شعيرية دقيقة، ونانو. تحتوي هذه الأعمدة على أقطار داخلية أصغر، وتسمح بفصل أكثر كفاءة، وتتعامل مع التدفقات السائلة التي تقل عن 1 مل / دقيقة (معدل التدفق التقليدي). [4] من أجل تحسين كفاءة الفصل، يمكن استخدام (UPLC) بدلاً من HPLC والذي يستخدم أعمدة معبأة بجزيئات أصغر من السيليكا (قطرها حوالي 1.7 ميكرون) ويتطلب ضغوط تشغيل أعلى في حدود 310.000 إلى 775.000 تور .

مقياس طيف الكتلة (MS) هو تقنية تحليلية تقيس نسبة الكتلة إلى الشحنة (ك/ش) للجسيمات المشحونة (الأيونات). (على الرغم من وجود عدة أنواع من مطيافية الكتلة، فجميعها يستخدم المجالات الكهربائية أو المغناطيسية لمعالجة حركة الأيونات الناتجة من المادة المستهدفة بالتحليل وتحديد m/z لها. [8] المكونات الأساسية لمقياس طيف الكتلة هي:

- مصدر الأيونات، حيث تتأين جزيئات العينة الداخلة إلى جهاز مطياف الكتلة بواسطة الأشعة المهبطية، أشعة الفوتون (الأشعة فوق البنفسجية)، حزم أشعة الليزر، التفريغ الهالي.

- محلل الكتلة.
- كاشف.
- أنظمة البيانات.
- نظام التفريغ تحت ضغط.

في حالة التأين بالإرذاذ الإلكتروني، يقوم مصدر الأيونات بتحويل الأيونات الموجودة في العينات السائلة إلى الحالة الغازية. حيث يقوم مصدر الأيونات بشطر وتحويل الجزيئات المتعادلة الموجودة في العينة إلى أيونات غازية الطور يتم إرسالها إلى محلل الكتلة. بينما يطبق محلل الكتلة الحقول الكهربائية والمغناطيسية لفرز الأيونات حسب كتلتها، يقوم المكشاف بقياس وتضخيم التيار الأيوني لحساب وفرة كل أيون. من أجل توليد طيف كتلي يمكن مشاهدته بالعين المجردة، وتقوم النظم الإلكترونية بتسجيل البيانات ومعالجتها وعرضها على أجهزة الكمبيوتر. يُستخدم الطيف الكتلي لتحديد كتلة المادة المطلوب تحليلها، نظائره وتركيبه العنصري، أو توضيح التركيب الكيميائي للعينة. قياس الطيف الكتلي هو تجربة يجب أن تتم في الحالة الغازية وفي حيز مفرغ تحت ضغط (10^{-2} إلى 10^{-6} باسكال). (لذلك، فإن تطوير الأجهزة التي تُسهل نقل العينات من مرحلة الضغط العالي والحالة المكثفة (الصلبة أو السائلة) إلى نظام الفراغ تحت الضغط أمراً ضرورياً لتطوير مقياس طيف الكتلة كأداة فعالة لتحديد وتقدير المركبات العضوية والبيبتيدات

يُستخدم مقياس طيف الكتلة حالياً في المختبرات التحليلية التي تدرس الخصائص الفيزيائية أو الكيميائية أو البيولوجية لمجموعة كبيرة ومتنوعة من المركبات. من بين العديد من الأنواع المختلفة من أجهزة تحليل الكتلة، نظمة التحليل الكتلي رباعية الاستقطاب ومطياف الكتلة المختلط، المصيدة الأيونية، مطياف زمن الطيران.[3]

شكل تطوير واجهة مناسبة تصل بين جهاز الاستشراب السائل (HPLC) والذي يتميز بالتدفق المستمر للمحاليل السائلة التي تنشأ عن عملية الاستخراج، وتقنية مطياف الكتلة الذي يتميز بوجود فراغ تحت ضغط تحديداً عظيماً أمام تطوير أجهزة LC-MS. أحدث ظهور تأين بالترذيد الإلكتروني طفرة في تطوير LC-MS حالياً، أكثر واجهات LC-MS شيوعاً هي تأين بالترذيد الإلكتروني (ESI) والتأين الكيميائي تحت الضغط الجوي (APCI) والتأين الفوتوني تحت الضغط الجوي

تأين بالترذيد الإلكتروني ESI

تأين بالترديد الإلكتروني: تم تطوير واجهة ESI لأنظمة LC-MS بواسطة جون فين ومعاونيه في عام 1988. يمكن استخدام هذا النوع (مصدر الأيونات/ الواجهة الأيونية) في تحليل الجزيئات متعادلة الشحنة على سبيل المثال (الأضيات، والغرائب الحيوية، والبيبتيدات). (يتم ضخ السائل الخارج من عمود LC من خلال أوعية شعيرية معدنية تحت قوة محرك كهربائية ثابتة من 3 إلى 5 كيلو فولت).

التأين الكيميائي تحت الضغط الجوي (APCI)

بدأ تطوير واجهة APCI بواسطة هورننج ومعاونيه في أوائل عام 1973. [12] ومع ذلك، تم تقديم تطبيقه التجاري في بداية التسعينيات بعد أن قام هنيون ومعاونوه بتحسين واجهة LC-APCI-MS في عام 1986. [4] يمكن استخدام مصدر الأيونات / واجهة APCI في تحليل الجزيئات صغيرة والمحايدة وغير قطبية والمستقرة حرارياً (مثل الستيرويدات والليبيدات والفيتامينات القابلة للذوبان في الدهون). هذه المركبات ليست مؤينة بشكل جيد وبالتالي لا يمكن استخدام ESI

التأين الفوتوني تحت الضغط الجوي (APPI)

تم تطوير واجهة APPI بشكل آني بواسطة برنس وسياج في عام 2000 [13][4] يستخدم في تحليل المركبات المحايدة التي لا يمكن أن تتأين باستخدام ESI. [3] تشبه واجهة التأين الكيميائي تحت الضغط الجوي (APCI)، ولكن يحدث التأين باستخدام فوتونات تولد بواسطة مصباح تفريغ شحنات.

التطبيقات

أحدث اقتران مطيافية الكتلة مع أنظمة الكروماتوغرافيا السائلة طفرة هائلة لأن الفصل الكروماتوغرافيا السائل يمكن أن يفصل المخاليط الطبيعية البسيطة وكذلك المعقدة، والتي يجب التعرف على تركيبها الكيميائي بدقة عالية (مثل السوائل البيولوجية والعينات البيئية والعقاقير). علاوة على ذلك، يمكن استخدام LC-MS في تحليل البقايا المتطايرة للمتفجرات. يُعد HPLC-MS تقنية رائدة في تحليل البروتينات وفي المختبرات الصيدلانية. والعديد من التطبيقات المهمة الأخرى مثل تحليل الغذاء، والمبيدات الأفات والفينولات النباتية.