

มวลโมเลกุลจากสเปกตรัมมวล MOLECULAR MASS FROM MASS SPECTRUM

มาลัย สติรพันธุ์

ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม

ติดต่อผู้พิมพ์ : smalai@su.ac.th

MALAI SATIRAPHAN

Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Sanamchandra Palace, Nakhon Pathom

Corresponding Author: smalai@su.ac.th

บทคัดย่อ

สเปกตรัมมวลเป็นสเปกตรัมที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนมวลต่อประจุกับปริมาณสัมพัทธ์ของไอออนนั้น ๆ สเปกตรัมมวลควบคู่กับข้อมูลจากสเปกโตรสโคปีชนิดอื่น ๆ ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางเพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ และการพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบอินทรีย์ทั่วไปและชีวโมเลกุล บทความนี้นำเสนอปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะของไอออนโมเลกุลและสเปกตรัมมวลได้แก่ ชนิดของแหล่งกำเนิดไอออน อำนาจจำแนกของเครื่องวิเคราะห์มวล และชนิดของสารประกอบที่นำมาวิเคราะห์

คำสำคัญ : มวลโมเลกุล, สเปกตรัมมวล, ไอออนโมเลกุล, แหล่งกำเนิดไอออน, เครื่องวิเคราะห์มวล

Abstract

Mass spectrum is a spectrum showing the relationship between mass to charge ratio (m/z) of the ions and their relative abundance. In conjunction with other spectroscopic data, mass spectrum has been extensively used for identification and structure elucidation of general organic compounds and biomolecules. This article presents factors affecting characteristics of molecular ions and mass spectrum including types of ion sources, resolution of mass analyzers and type of analyzed compounds.

Keywords: molecular mass, mass spectrum, molecular ion, ion source, mass analyzer

คำย่อของแหล่งกำเนิดไอออน และเครื่องวิเคราะห์มวล

แหล่งกำเนิดไอออน	อีไอ	Electron impact, EI
	ซีไอ	Chemical ionization, CI
	อีเอสไอ	Electrospray ionization, ESI
	มาลดี	Matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI
	แฟบ	Fast atom bombardment, FAB

เครื่องวิเคราะห์มวล

ทอฟ

Time of flight, TOF

คิวทอฟ

Quadrupole-time of flight, QTOF

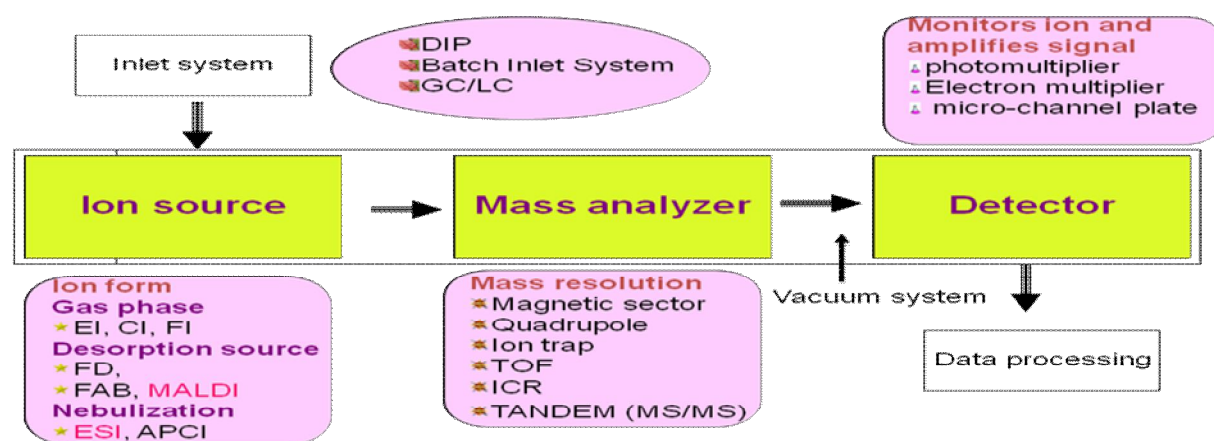
ไอออนแทรป

Ion trap

บทนำ

เครื่องสเปกโตรมิเตอร์มวล (mass spectrometer) เป็นเครื่องมือสำคัญในการวิเคราะห์หามวลโมเลกุล มีการใช้ครั้งแรกในอุตสาหกรรมปิโตรเลียมเมื่อต้นทศวรรษ 1940^{1,2} เทคโนโลยีนี้มีการพัฒนาให้มีศักยภาพมากขึ้นเรื่อย ๆ ปัจจุบันเครื่องสเปกโตรมิเตอร์มวลถูกนำมาใช้ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพอย่างกว้างขวาง องค์ประกอบหลักของเครื่องสเปกโตรมิเตอร์มวลแสดงในภาพที่ 1 ได้แก่ ระบบนำส่งตัวอย่าง (inlet system) แหล่งกำเนิดไอออน (ion source) เครื่องวิเคราะห์มวล (mass analyzer) และเครื่องตรวจจับไอออน (detector) ระบบนำส่งตัวอย่างสามารถรับตัวอย่างทั้งในรูปแก๊ส และของเหลว นอกจากนี้ยังสามารถคู่ต่อกับเครื่องโครมาโทกราฟีแก๊ส (จีซี, GC) เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (เอชพีแอลซี, HPLC) หรือเครื่องแคปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส (ซีอี, capillary electrophoresis, CE)³ จากนั้นโมเลกุลตัวอย่างจะถูกเปลี่ยนที่บริเวณแหล่งกำเนิดไอออน ให้อยู่ในรูปของไอออนโมเลกุลสถานะแก๊ส (gaseous molecular ion) ไอออนโมเลกุลบางส่วนอาจเกิดการแตกย่อย (fragmentation) ให้ไอออนย่อย (fragment ion, daughter ion) จากนั้นไอออนทั้งหมดจะเข้าสู่เครื่องวิเคราะห์มวลซึ่งทำหน้าที่แบ่งแยกไอออนไปตามอัตราส่วนมวลต่อประจุ (m/z ratio)

ในยุคเริ่มต้นตัวอย่างต้องถูกทำให้กลายเป็นแก๊สก่อนเกิดเป็นไอออน เรียกว่าแหล่งกำเนิดไอออนแบบแก๊ส (gas phase source) ทำให้ใช้ได้เฉพาะกับโมเลกุลขนาดเล็กที่มีมวลโมเลกุลไม่เกิน 1000 ดาลตัน (dalton) ต่อมาได้มีการพัฒนาแหล่งกำเนิดไอออนแบบคายโมเลกุล (desorption source) และแบบพ่นละออง (nebulization source) สามารถทำให้เกิดไอออนโมเลกุลโดยไม่จำเป็นต้องทำให้ตัวอย่างอยู่ในสถานะแก๊ส ดังนั้นจึงสามารถวิเคราะห์มวลของโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่า 1000 ดาลตันได้ วิวัฒนาการของแหล่งกำเนิดไอออนดังกล่าวส่งผลให้ปัจจุบันสามารถวิเคราะห์มวลทั้งที่มีโมเลกุลเล็กไปจนถึงสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่เช่น โปรตีน เปปไทด์ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ คาร์โบไฮเดรต เปปติโดไกลัยแคน และกรดนิวคลีอิก มีประโยชน์ต่อการควบคุมคุณภาพเภสัชภัณฑ์และการศึกษาชีวโมเลกุล ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ตัวอย่างเช่นการวิเคราะห์ β -sitosterol ด้วยเครื่อง GC-MS สามารถใช้ความสูงหรือพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมมาเพื่อคำนวณหาปริมาณของสาร (ภาพที่ 2ก) ในขณะเดียวกัน สเปกตรัมมวล ณ เวลาที่เกิดสัญญาณบนโครมาโตแกรม (ภาพที่ 2ข) ถูกนำมาใช้ในเชิงคุณภาพ โดยเทียบกับสเปกตรัมมวลอ้างอิง (ภาพที่ 2ค) ได้เช่นกัน



ภาพที่ 1 องค์ประกอบหลักของเครื่องสเปกโตรมิเตอร์มวล

(DIP = direct probe inlet, GC = gas chromatography, LC = liquid chromatography, EI = electron impact, CI = chemical ionization, FI = Field ionization, FD = field desorption, FAB = fast atom bombardment, MALDI = matrix-assisted laser desorption ionization, ESI = electrospray ionization, APCI = atmospheric-pressure chemical ionization, TOF = time of flight, ICR = ion cyclotron resonance)

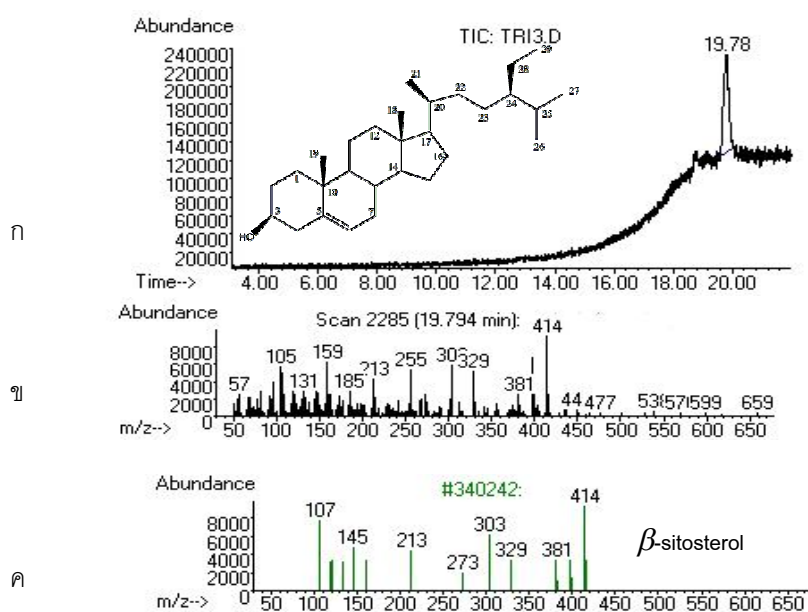
สเปกตรัมมวลเป็นสเปกตรัมที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนมวลต่อประจุ (m/z) ของไอออนกับปริมาณสัมพัทธ์ของไอออนนั้นกับไอออนอื่น จากตัวอย่างในภาพที่ 2x และ 2c ไอออนที่ให้ m/z ที่ 414 มีจำนวนมากกว่าไอออนอื่น ส่วนใหญ่ประจุของไอออนมักจะเป็น ± 1 ดังนั้นตำแหน่ง m/z จึงบอกถึงมวลของไอออนนั้น ๆ ไปโดยปริยาย แต่ในกรณีที่ไอออนมีประจุมากกว่า 1 ซึ่งมักพบในเครื่องที่มีแหล่งกำเนิดไอออนแบบคายโมเลกุล และแบบพ่นละออง ต้องมีการคำนวณที่ซับซ้อนมากขึ้น โดยจะกล่าวในหัวข้อถัดไป

มวลโมเลกุลของไอออนที่ผ่านเข้าสู่เครื่องวิเคราะห์มวล คำนวณได้จากผลรวมของมวลอะตอมที่แท้จริง (exact mass, ตารางที่ 1) เช่น β -sitosterol ($C_{29}H_{50}O$) น้ำหนักโมเลกุล

(MW) ที่คำนวณจากตารางธาตุซึ่งเป็นน้ำหนักเฉลี่ยของอะตอมได้ 414.7198 กรัมต่อโมล เมื่อคำนวณด้วยน้ำหนักที่แท้จริงของไอโซโทปที่มีมากที่สุดในธรรมชาติ คือ $^{12}C_{29}^{1}H_{50}^{16}O$ จะมีมวล (M) 414.3864 ดาลตัน จากสเปกตรัมมวลในภาพที่ 2x ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์มวลที่มีความละเอียดต่ำ (low resolution) จะพบว่าสัญญาณของไอออนโมเลกุล (M^+) ขึ้นที่ตำแหน่ง m/z 414 ตามมวลที่แท้จริง และพบสัญญาณจากไอออนย่อย อันเนื่องมาจากการแตกย่อยของไอออนโมเลกุลปรากฏในสเปกตรัมมวล เช่น ตำแหน่ง 399, 381, 329 และ 303 ด้วยเช่นกัน นอกจากนั้นสัญญาณของแต่ละไอออนจะมีสัญญาณเล็ก ๆ ขึ้นข้าง ๆ ห่างทีละหนึ่งหน่วย อันเนื่องจากการมีไอโซโทปที่มีน้ำหนักมากกว่าปะปนอยู่ใน

ไอออน เช่น สัญญาณจากโมเลกุล $^{13}\text{C}_{12}\text{C}_{28}^1\text{H}_{50}^{16}\text{O}$ หรือ $^{12}\text{C}_{29}^2\text{D}^1\text{H}_{49}^{16}\text{O}$ จะพบสัญญาณของไอออนโมเลกุลเหล่านี้ที่ m/z 415 สัญญาณอันเนื่องมาจากไอโซโทปที่หนักกว่าเหล่านี้เรียกว่า พีกไอโซโทป (isotope peak) ความสูงของพีกไอโซโทปขึ้นกับปริมาณไอโซโทปของธาตุนั้น ๆ ในธรรมชาติ^{4,5} เช่น

พีกไอโซโทปของสารประกอบที่มีโบรมีน 1 ตัวอยู่ในโมเลกุลจะเกิดขึ้นที่ตำแหน่ง $M+2$ และมีความสูงเกือบเท่าสัญญาณไอออนโมเลกุล (M^+) เนื่องจากไอโซโทปที่มีมากที่สุดในธรรมชาติของโบรมีนคือ 79 รองลงมาคือ 81 และไอโซโทปทั้งสองมีปริมาณเกือบเท่ากัน (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 2 ผลการวิเคราะห์ β -sitosterol ด้วย GC-MS (70 eV EI) ก) โครมาโทแกรมจากเครื่อง GC-MS พบสัญญาณของ β -sitosterol นาทีที่ 19.78 ข) สเปกตรัมมวลของสารที่ถูกชะออกมาที่นาทีดังกล่าว ค) สเปกตรัมมวลอ้างอิง

อย่างไรก็ตามตำแหน่งและลักษณะสัญญาณของไอออนโมเลกุลบนสเปกตรัมมวลจะแตกต่างกันไปตามชนิดของสารประกอบแหล่งกำเนิดไอออน และอำนาจการแยก (resolution) ของเครื่องวิเคราะห์มวล ดังนั้นการอ่านค่ามวลโมเลกุลของสารประกอบบนสเปกตรัมมวลให้ถูกต้อง จำเป็นต้องมีความเข้าใจปัจจัยดังกล่าว มิฉะนั้นอาจทำให้อ่านค่ามวลโมเลกุลผิดพลาด หรือทำให้ผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับข้อมูลจากการวิเคราะห์ด้วยสเปก-

โตรสโกปีอื่น ๆ เมื่อทำการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ ตัวอย่างในภาพที่ 3 ถ้าผู้วิเคราะห์ไม่มีความชำนาญในการอ่านค่ามวลโมเลกุลจากสเปกตรัมมวล จะไม่ทราบว่ามวลที่ m/z 851.29, 437.23 และ 415.16 ล้วนมาจากโมเลกุลตัวอย่างเดียวกัน แต่เกิดการรวมตัวกับไอออนบวกต่างชนิดกัน คือ $[\text{dimer}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ และ $[\text{M}+\text{H}]^+$ ตามลำดับ สเปกตรัมมวลในภาพที่ 4 ของ dammarenediol II ไม่ปรากฏสัญญาณที่ตำแหน่ง M^+ ซึ่งไม่สอดคล้อง

กับสเปกตรัมนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์
(nuclear magnetic resonance, NMR) ในส่วน
ของแหล่งกำเนิดไอออนและเครื่องวิเคราะห์มวล

ผู้เขียนจะกล่าวเฉพาะชนิดที่มีการใช้อย่าง
แพร่หลายในงานวิจัยปัจจุบัน

ตารางที่ 1 มวลที่แท้จริงของไอโซโทปของธาตุต่าง ๆ^{5,6}

ธาตุ	น้ำหนัก อะตอม	ไอโซโทป	มวลที่แท้จริง	ปริมาณสัมพัทธ์ ในธรรมชาติ
ไฮโดรเจน	1.00794	¹ H	1.00783	100
		D(² H)	2.0141	0.016
คาร์บอน	12.01115	¹² C	12.00000 (std)	100
		¹³ C	13.00336	1.11
ไนโตรเจน	14.0067	¹⁴ N	14.0031	100
		¹⁵ N	15.0001	0.38
ออกซิเจน	15.9994	¹⁶ O	15.9949	100
		¹⁷ O	16.9991	0.04
		¹⁸ O	17.9992	0.2
ฟลูออรีน	18.9984	¹⁹ F	18.9984	100
ซิลิคอน	28.0855	²⁸ Si	27.9769	100
		²⁹ Si	28.9765	5.1
		³⁰ Si	29.9738	3.35
ฟอสฟอรัส	30.9738	³¹ P	30.9738	100
ซัลเฟอร์	32.066	³² S	31.9721	100
		³³ S	32.9715	0.78
		³⁴ S	33.9679	4.4
คลอรีน	35.4527	³⁵ Cl	34.9689	100
		³⁷ Cl	36.9659	32.5
โบรมีน	79.9094	⁷⁹ Br	78.9183	100
		⁸¹ Br	80.9163	98
ไอโอดีน	126.9045	¹²⁷ I	126.9405	100

ตารางที่ 2 แหล่งกำเนิดไอออนที่ใช้บ่อย⁵⁻⁹

ชนิดแหล่งกำเนิดไอออน	ไอออนโมเลกุลที่เกิดขึ้น	ข้อดี	ข้อเสีย
ชนิดแก๊ส			
อีไอ	M^+	-มีรายละเอียดของการแตกไอออนน้อยมาก เหมาะกับการพิสูจน์เอกลักษณ์ และหาโครงสร้างของสารประกอบ	-อาจไม่พบไอออนโมเลกุล ทำให้ไม่สามารถบอกมวลโมเลกุลได้ -ตัวอย่างต้องระเหยได้
ซีไอ	$[M+H]^+$, $[M+C_2H_5]^+$, $[M-H]^+$, M^+	- ใช้เป็นทางเลือกของการหา มวลโมเลกุล หากไม่พบไอออนโมเลกุล จากอีไอ เพราะการแตกไอออนน้อยมีน้อย	-ขาดรายละเอียดของการแตกไอออนน้อย -ตัวอย่างต้องระเหยได้ ไอออนโมเลกุลมีหลายแบบ
ชนิดฟลักซ์ออน			
อีเอสไอ	$[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[2M+Na]^+$, $[M+nH]^{n+}$, $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$, $[M-nH]^{n-}$	-ใช้กับโมเลกุลขนาดกลางถึงใหญ่ที่ไม่ระเหย	-พบไอออนโมเลกุลหลายรูปแบบ
ชนิดคายโมเลกุล			
มาลดี	$[M+H]^+$, $[M+matrix]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+nH]^{n+}$, $[M-H]^-$	-เหมาะกับสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่มาก เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลีอิก และโพลีเมอร์สังเคราะห์	-ต้องมีการเตรียมตัวอย่าง และเลือกเมทริกซ์
แฟบ	$[M+H]^+$, $[M+matrix]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M-H]^-$	-สามารถวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลขนาด 10,000 ดาลตัน	-อาจพบสเปกตรัมของเมทริกซ์ปนอยู่กับสเปกตรัมของสารตัวอย่าง

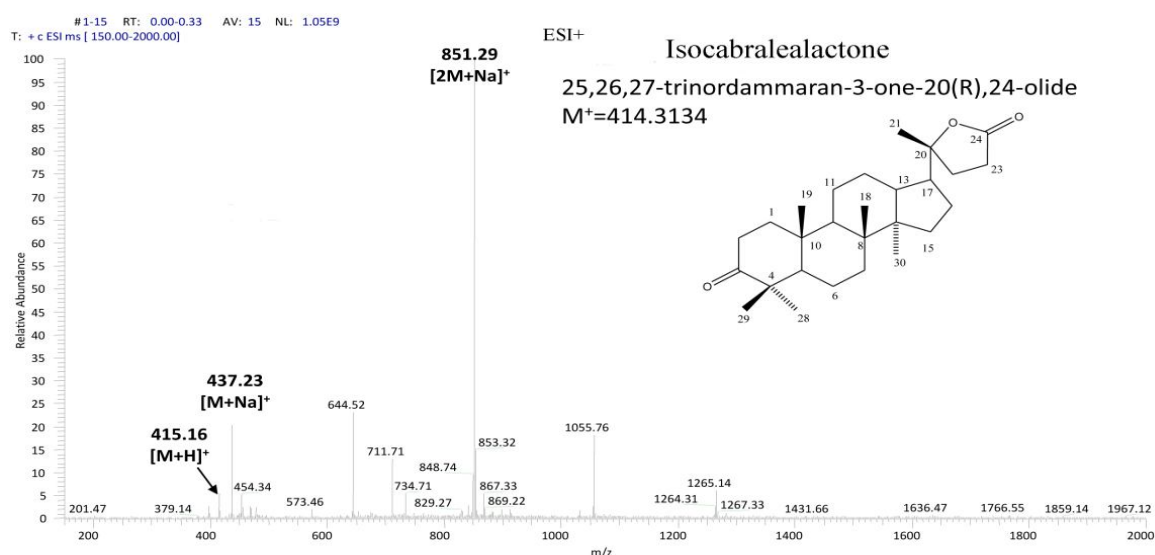
ปัจจัยที่มีผลต่อตำแหน่งและลักษณะของ สัญญาณไอออนโมเลกุล

ชนิดของแหล่งกำเนิดไอออน

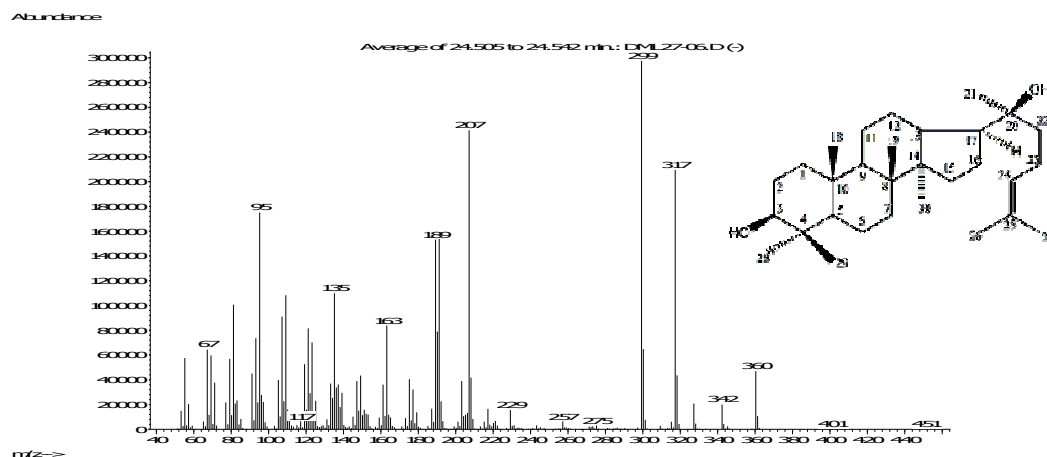
โดยทั่วไปแหล่งกำเนิดไอออน (ตารางที่ 2) แบ่งเป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ คือ แบบสภาวะแก๊ส แบบคายโมเลกุล และแบบพ่นละออง

แหล่งกำเนิดแบบสภาวะแก๊สที่นิยมใช้มี 2 ชนิดคือ แบบชนด้วยอิเล็กตรอน หรืออีไอ (EI, electron impact) และแบบชนด้วยไอออนของสารประกอบ หรือซีไอ (CI, chemical ionization)⁵ สารตัวอย่างในสภาวะโมเลกุลแก๊สในแหล่งกำเนิดแบบอีไอ จะถูกชนด้วยอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูง ทำให้อิเล็กตรอนของสารตัวอย่างหลุดออกไป 1 ตัว เกิดเป็นไอออนโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเป็นจำนวนคี่ (M^+) หลังจากนั้นจะเกิดการแตกไอออนย่อย หรือจัดเรียงตัวใหม่เป็นไอออนย่อยอีกจำนวนมาก ทำให้ได้สเปกตรัมมวลที่มีรายละเอียดที่เป็นลักษณะเฉพาะของสารประกอบนั้น ๆ ดังภาพที่

2ข อย่างไรก็ตามเนื่องจากอีไอทำให้เกิดการแตกไอออนย่อยได้มาก จึงมีข้อเสียคือ บางกรณีอาจทำให้ไม่หลงเหลือสัญญาณไอออนโมเลกุล (ภาพที่ 4) ส่วนในซีไอ โมเลกุลแก๊สของสารตัวอย่างจะถูกชนด้วยไอออนโมเลกุลของแก๊สรีเอเจนต์ (reagent gas) เช่น CH_5^+ , $C_2H_5^+$ (จากมีเทน) ไอออนของโมเลกุลตัวอย่างจะเกิดปฏิกิริยาถ่ายเทโปรตอน จึงมักพบไอออน $[M+H]^+$ (ที่ตำแหน่ง m/z $M+1$) เป็นไอออนหลัก และอาจพบ m/z ที่ $M+29$ จาก $[M+C_2H_5]^+$ ซึ่งเกิดจากการเติมไอออน $C_2H_5^+$ ให้โมเลกุลตัวอย่าง บางครั้งอาจพบ m/z ที่ $M-1$ จาก $[M-H]^+$ ด้วยปรากฏการณ์ถ่ายเทไฮโดรด์ได้เช่นกัน แหล่งกำเนิดไอออนแบบซีไอเป็นแหล่งกำเนิดไอออนทางเลือกสำหรับแหล่งกำเนิดไอออนชนิดแก๊ส เพื่อใช้หาน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่าง เมื่อไม่พบไอออนโมเลกุลจากการใช้อีไอ⁵



ภาพที่ 3 สเปกตรัมมวลของ isocabralealactone ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์มวล (แหล่งกำเนิดไอออนชนิดอีเอสไอในโหมดโพสิทีฟ และเครื่องวิเคราะห์มวลชนิดไอออนแทรป)



ภาพที่ 4 สเปกตรัมมวลของ dammarenediol II ($C_{30}H_{52}O_2$, $M^+ = 444.3967$, $MW=444.7327$) จากเครื่อง GC-MS (70 eV EI)¹⁰

อิเล็กโตรสเปรย์หรืออีเอสไอ (electrospray ionization, ESI)^{1,3,5} เป็นแหล่งกำเนิดไอออนแบบพ่นละอองที่นิยมใช้มากในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถประยุกต์เข้ากับเครื่องเอชพีแอลซีได้ ตัวอย่างที่เข้าสู่แหล่งกำเนิดไอออนจะถูกพ่นเป็นละอองฝอยที่ปลายแคปิลลารี โดยมีแก๊สไนโตรเจนเป็นแก๊สพ่นละออง ผ่านความต่างศักย์ขนาดสูง (3-5 กิโลโวลต์) ในกรณีที่เป็นโหมดโพสิทีฟ (positive mode, +) สนามไฟฟ้าจะทำให้เกิดการสะสมประจุบวกอย่างมากที่บริเวณผิวของละอองตัวอย่าง จากนั้นตัวทำละลายของละอองตัวอย่างจะถูกทำให้ระเหยออกไป ประจุบวกที่อยู่กันอย่างหนาแน่นบนละอองตัวอย่างนั้นจะมีแรงผลักรัน ทำให้แตกออกเป็นละอองย่อยลงไปอีก สารตัวอย่างจะรับโปรตอนจากตัวทำละลายทำให้เกิดไอออนบวก $[M+H]^+$ ของตัวอย่างในสถานะแก๊ส ถ้ามีโซเดียมปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย จะพบไอออน $[M+Na]^+$ ที่ตำแหน่ง m/z $M+23$ รวมทั้งไอออน $[M+K]^+$ (m/z ที่ $M+39$) ก็พบได้เช่นกัน แต่โอกาสพบจะน้อยกว่า นอกจากนั้น ถ้าสารตัวอย่างมีความเข้มข้นสูงจะทำให้เกิดไดเมอร์ (dimer) ของสาร

ตัวอย่าง $[2M+Na]^+$ ในปริมาณที่สูง ดังสเปกตรัมมวลของ isocabralealactone ในภาพที่ 3 กรณีที่สารตัวอย่างมีมวลโมเลกุลมากกว่า 1200 ดาลตัน จะมีโอกาสรับโปรตอนมากกว่า 1 ตัวทำให้ได้ไอออนในรูป $[M+nH]^{n+11}$ (เมื่อ n เป็นจำนวนโปรตอนที่ได้รับหรือปล่อยออกจากโมเลกุลตัวอย่าง) และพบสัญญาณที่ตำแหน่ง $m/z = (M+nH)/n$ แหล่งกำเนิดไอออนข้างต้นเป็นการใช้อีเอสไอในโหมดโพสิทีฟ แต่ถ้าโมเลกุลตัวอย่างถูกวิเคราะห์ในโหมดเนกาทีฟ (negative mode, -) จะทำให้เกิดไอออน $[M-H]^-$ (ภาพที่ 5ก $m/z = 467$) และ $[M-nH]^-$ ซึ่งปรากฏที่ตำแหน่ง $m/z = (M-nH)/n$ (ภาพที่ 6ก กลุ่มสัญญาณที่ $m/z = 1060.5429$ และ 1325.9295 เกิดจากไอออน $[M-5H]^{5-}$ และ $[M-4H]^{4-}$ ตามลำดับ) โมเลกุลหนึ่ง ๆ อาจเกิดไอออนโมเลกุลได้หลายชนิด ดังได้กล่าวมาแล้ว ในภาพที่ 3 และภาพที่ 6ก การเกิดไอออนที่มีประจุมากกว่า 1 (multiply charged ion) จัดเป็นข้อดีอย่างหนึ่งของอีเอสไอ คือเป็นการขยายขีดจำกัดมวล ทำให้สามารถวิเคราะห์สารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่มาก ๆ ได้ แต่ก็ต้องใช้ความชำนาญในการพิจารณาสัญญาณไอออน

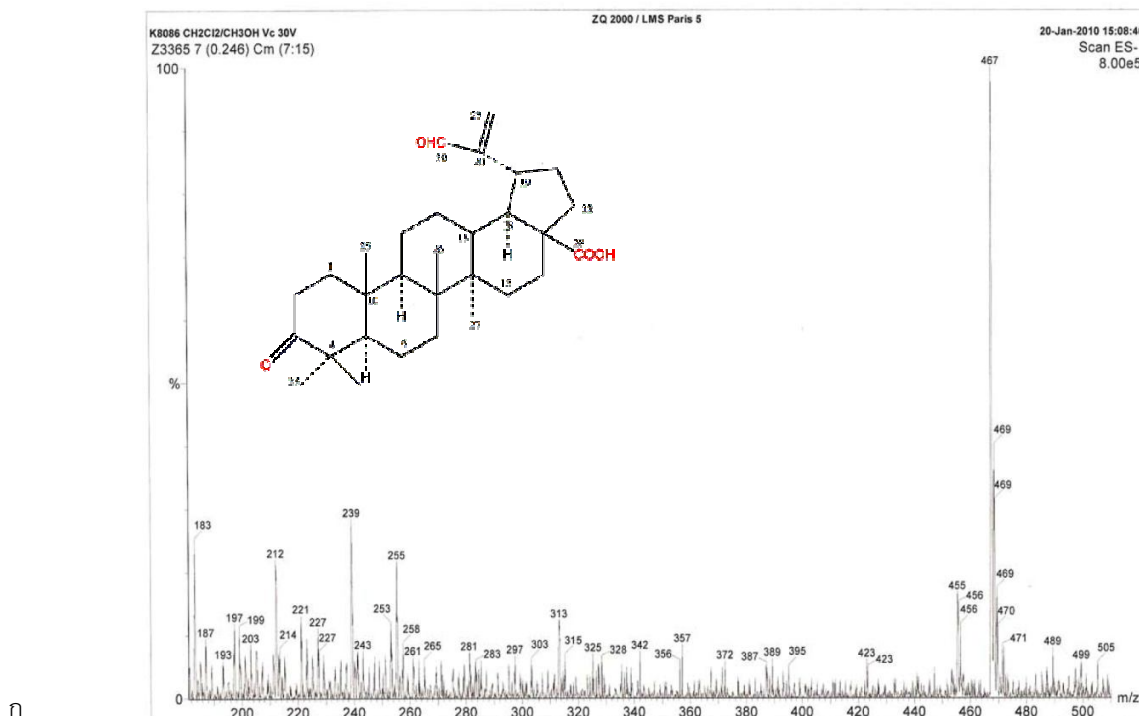
โมเลกุล และใช้เครื่องวิเคราะห์มวลที่มีความละเอียดเพียงพอ แหล่งกำเนิดไอออนชนิดอีเอสไอทำให้เกิดการแตกไอออนย่อยได้เล็กน้อยซึ่งสามารถนำมาเป็นข้อมูลโครงสร้างของโมเลกุล และศึกษาชนิดกรดอะมิโนของโปรตีนได้

สเปกตรัมมวลของไอออนชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ ที่มีประจุมากกว่า 1 จะมีลักษณะกระจายเชิงสถิติในหมู่ไอออนของโมเลกุลเดียวกัน แต่มีประจุต่างกัน² ภาพที่ 6ก เป็นสเปกตรัมมวลของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ชนิดหนึ่งที่ถูกทำให้เป็นไอออนด้วยอีเอสไอ ในโหมดเนกาทีฟ กลุ่มสัญญาณที่ตำแหน่ง $m/z = 1060.5429$ และ 1325.9295 มาจากโมเลกุลเดียวกัน แต่มีประจุต่างกัน เมื่อทำการขยายกลุ่มสัญญาณทั้งสองจะได้สเปกตรัมดังภาพที่ 6ข และ 6ค ตามลำดับ ประจุและมวลของไอออนโมเลกุลสามารถหาได้จาก $m/z = (M-nH)^{2,11}/n$ ดังนั้น $1325.4340 = (M-nH)/n$ และ $1060.1464 = (M-(n+1)H)/(n+1)$ (เพื่อป้องกันปัญหาจากการคำนวณด้วยโมเลกุลที่ประกอบด้วยไอโซโทปต่างกัน จึงควรคำนวณที่ตำแหน่งต่ำสุด) เมื่อ M เป็นมวลโมเลกุลที่แท้จริงของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ n เป็นจำนวนโปรตอนที่สูญเสียไปของไอออนที่ตำแหน่ง 1325.4340 และ H เป็นมวลที่แท้จริงของอะตอมไฮโดรเจน มีค่า 1.00783 ดาลตัน เมื่อแก้สมการทั้งสองซึ่งมี M เป็นค่าที่เท่ากัน จะได้ $n=4$ ทำให้ประจุของไอออนที่ m/z 1325.4340 และ 1060.1464 คือ -4 และ -5 ตามลำดับ ดังนั้น มวลโมเลกุลของสัญญาณที่ m/z 1325.4340 คือ $(1325.4340 \times 4) + (4 \times 1.00783) = 5305.7673$ ดาลตัน จากภาพที่ 6ข และ 6ค พบว่าแต่ละสัญญาณที่ตำแหน่ง $m/z =$

1060.5429 และ 1325.9295 ห่างกัน 0.20 และ 0.25 atomic mass unit (amu) ตามลำดับ การเกิดกลุ่มสัญญาณนี้เกิดเนื่องจากฟีกไอโซโทป เช่น ฟีกไอโซโทปของไอออนโมเลกุลที่มีประจุ -4 และมี ^{13}C แทนที่ ^{12}C 1 ตัว จะเกิดสัญญาณที่ตำแหน่ง $[5306.7707 - (4 \times 1.00783)]/4 = 1325.6848$ (เนื่องจากโมเลกุลนี้เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ อำนาจการแยกของเครื่องมือจำกัด ไม่สามารถบอกมวลได้ถูกต้องตรงทั้งจุดทศนิยมสี่ตำแหน่ง ตามความสามารถในการรายงานของเครื่อง ทำให้จุดทศนิยมตำแหน่งที่สามและสี่ที่อ่านได้อาจคลาดเคลื่อนไปจากการคำนวณ ดังนั้นในทางปฏิบัติผู้วิจัยอาจรายงานแค่สองตำแหน่ง แทนที่จะรายงานสี่ตำแหน่งตามสเปกตรัม) ในกรณีเดียวกัน สำหรับไอออนของสารประกอบเดียวกันนี้มีประจุ -5 จะพบสัญญาณที่ตำแหน่ง 1060.34 ดังนั้นประจุของไอออนอาจคาดหมายได้จากความห่างของฟีกไอโซโทป โดยคำนวณจากความห่างของแต่ละฟีกไอโซโทปเท่ากับ $1/n$ เมื่อ n เป็นประจุของไอออนนั้น ๆ ในทางปฏิบัติ เครื่องจะสามารถคำนวณมวลโมเลกุลได้ด้วยโปรแกรม ถ้าผู้วิจัยสามารถเลือกกลุ่มสัญญาณได้ถูกต้อง แฟบ (FAB, fast atom bombardment) และ มัลดี (MALDI, matrix assisted laser desorption ionization) เป็นแหล่งกำเนิดไอออนชนิดคายโมเลกุล สารตัวอย่างจะต้องถูกผสมกับเมทริกซ์ (matrix) เพื่อช่วยในการเกิดไอออนในเซชัน ดังนั้นอาจมีการดึงเมทริกซ์เข้ามาอยู่ร่วมกับไอออนตัวอย่างเกิดเป็น $[M+\text{matrix}]^+$ เพิ่มจาก $[M+H]^+$ และ $[M+\text{Na}]^+$ ในแฟบ ตัวอย่างจะถูกผสมกับของเหลวที่ไม่ระเหยได้แก่ กลีเซอรอล หรือไนโตรเบนซิลอัลกอฮอล์⁷ และถูกทำให้กลายเป็นไอออนด้วยอะตอมซีซอน

ที่มีพลังงานสูง ไอออนตัวอย่างไม่เกิดการแตก
ย่อยมากเหมือนอีไอและซีไอ ส่วนมาลติเป็นวิธี
ที่นิยมใช้กับสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ ทั้ง
โปรตีน คาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลีอิก และไขมัน
ตัวอย่างจะถูกผสมกับเมทริกซ์ซึ่งสามารถดูด

กลืนรังสีที่ใช้ได้ แล้วทั้งตัวอย่างและเมทริกซ์
จะถูกคายออกมาพร้อมกันด้วยแสงเลเซอร์
จากนั้นจะเกิดการแยกออกจากกันและไอออน
ในเซชัน



Elemental Composition Report

Multiple Mass Analysis: 3 mass(es) processed

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

62 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)

Elements Used:

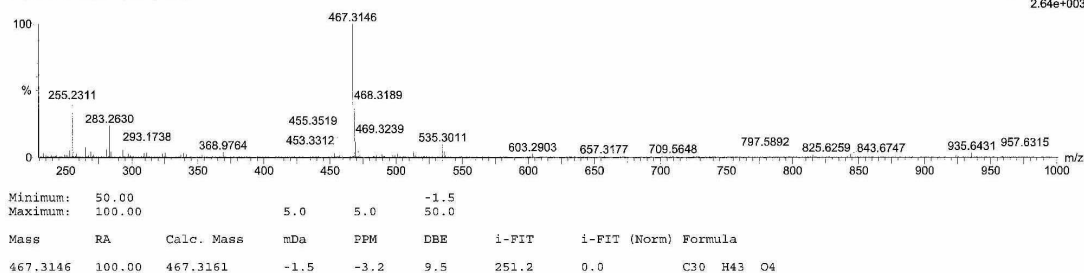
C: 15-50 H: 0-100 O: 0-10

020 / Malai / K8396 /CH2Cl2/MEOH

FT_K8396b 33 (0.724) Cm (33:48)

LCT Premier

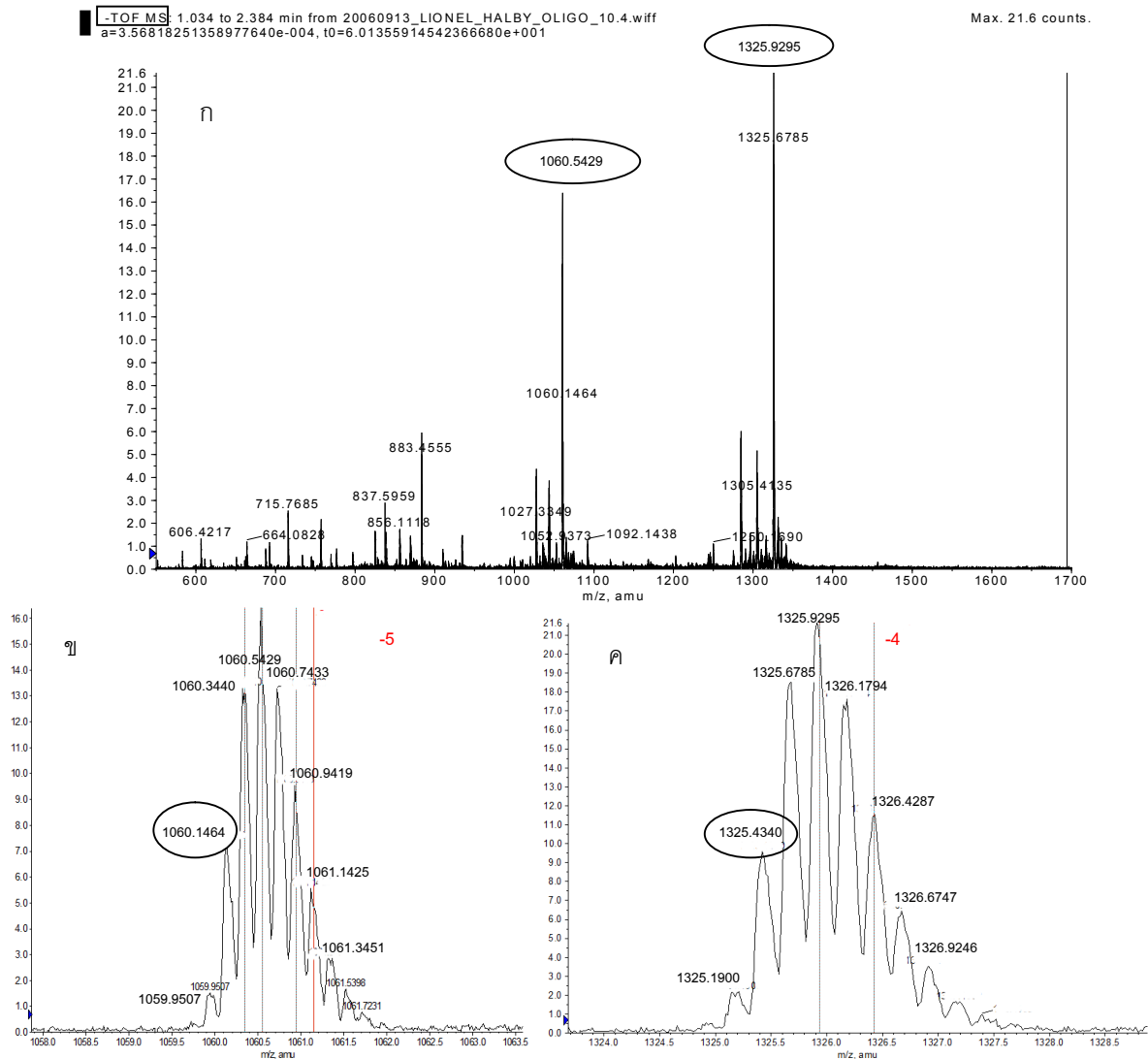
27-Jan-2011 17:07:40
1: TOF MS ES-
2.64e+003



ภาพที่ 5 สเปกตรัมมวลของ 3,30-dioxo-lup-20(29)-en-28-oic acid ($C_{30}H_{44}O_4$, $M^+ = 468.3240$, $MW = 468.6680$) จากเครื่องสเปกโทรมวลที่มีแหล่งกำเนิดไอออนแบบอีเอสไอโนโหมดเนกาทีฟ วิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์มวลที่มี ก) ความละเอียดต่ำ (low resolution) ข) ความละเอียดสูง (high resolution)¹⁰

ปัจจุบันเมทริกซ์ที่นิยมใช้ในมาลติ
ได้แก่ 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB)
และเมทริกซ์กลุ่มกรดซินนามิก ได้แก่
 α -cyanohydroxycinnamic acid (CHCA)
และ 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid

(sinapinic acid, SA)⁸ โดยทั่วไปมวลจากการวิเคราะห์ด้วยไอเอสไอและมาลติจะมีค่าความถูกต้อง $\pm 0.01\%$ ของมวลตัวอย่าง¹¹



ภาพที่ 6 การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของโพลิโกนิวคลีโอไทด์ชนิดหนึ่งด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์มวลที่มีความละเอียดสูง (อีเอสไอ-คิวทอป) ในโหมดเนกาทีฟ ก) แสดงการสแกนมวลทั้งหมดในตัวอย่าง ข) ขยายสัญญาณที่ m/z 1060.5429 ค) ขยายสัญญาณที่ m/z 1325.9295

อำนาจจำแนก (resolution) ของเครื่องวิเคราะห์มวล

อำนาจจำแนกของเครื่องวิเคราะห์มวลหาได้จาก $R = m/\Delta m$ เมื่อ m เป็นค่าเฉลี่ยของมวล 2 มวล และ Δm เป็นความแตกต่างของมวลทั้งสอง หากใช้เครื่องวิเคราะห์มวลที่มีอำนาจจำแนกเท่ากันกัน มวลเล็กจะให้ความละเอียดของมวลมากกว่ามวลใหญ่ (บอกจุดทศนิยมที่เชื่อถือได้ละเอียดกว่า) เครื่องวิเคราะห์มวลมี 2 ชนิด คือ ชนิดความละเอียดสูง และความละเอียดต่ำ (ตารางที่ 3) เมื่อใช้เครื่องที่มีความละเอียดสูงวิเคราะห์ไอออนที่มีมวลไม่เกิน 1000 (amu) จะสามารถบอกความละเอียดของมวลได้ถึงจุดทศนิยมอันดับสี่ และเครื่องสามารถคำนวณสูตรโมเลกุลที่น่าจะเป็นได้ จากภาพที่ 4 ข มวลที่ m/z 467.3146 ดาลตัน น่าจะมีสูตรโมเลกุล $C_{30}H_{43}O_4$ ซึ่งเมื่อคำนวณจากมวลที่แท้จริงจะมีมวล 467.3161 ดาลตัน คลาดเคลื่อนไปเพียง 0.0015 ดาลตัน นอกจากนั้นยังสามารถขยายสัญญาณของไอออนที่มีประจุมากกว่า 1 ดังภาพที่ 6 ข และ 6 ค ทำให้ทราบประจุของไอออนนั้นจากความห่างของแต่ละพีคไอโซโทป ปัจจุบันนิยมใช้แบบทอพอซนิตรีเฟลิกตรอน (reflectron TOF, reflectron time of flight) เมื่อต้องการเครื่องวิเคราะห์มวลที่มีความละเอียดสูง และสามารถวิเคราะห์มวลจากอีเอสไอและมาลดีได้ดี ส่วนเครื่องที่มีความละเอียดต่ำซึ่งปัจจุบันนิยมใช้แบบควอดรูโพลแมสฟิลเตอร์ (quadrupole mass filter) และแบบไอออนแทรป (ion trap) จะบอกความถูกต้องได้เพียงหลักหน่วย (unit mass resolution) เท่านั้น ดังเช่นภาพที่ 3 และ 5 ก ซึ่งไม่ละเอียดเพียงพอที่จะบอกถึงสูตรโมเลกุลที่ถูกต้องได้ แต่นิยมนำไปใช้ในการหาปริมาณ

และการพิสูจน์เอกลักษณ์จากสเปกตรัมอ้างอิง

ชนิดของสารประกอบ

สารประกอบทั่วไปที่ผ่านแหล่งกำเนิดไอออนแบบอีไอ มักเกิดไอออนโมเลกุลที่ตำแหน่ง M^+ ดังสเปกตรัมมวลของ β -sitosterol ในภาพที่ 2 แต่สารประกอบกลุ่มอัลกอยด์ เอมีน อัลดีไฮด์ และสารประกอบที่มีควอเตอร์นารีคาร์บอน (quaternary carbon) มักเกิดการแตกย่อย (fragmentation) ได้ง่าย จะทำให้พบไอออนโมเลกุลบนสเปกตรัมมวลในปริมาณที่ต่ำหรืออาจไม่พบเลย เช่น ไม่พบสัญญาณไอออนโมเลกุลบนสเปกตรัมมวลของ dammarenediol-II ดังแสดงในภาพที่ 4 สัญญาณที่ m/z 317 เกิดจากการแตกย่อยระหว่างคาร์บอนตำแหน่ง 17 กับ 20 ทำให้โซ่ข้าง (side chain) หลุดออกไปเหลือแต่โครงสร้างวงแหวนหลักสี่วง และเมื่อเกิดการสูญเสียโมเลกุลของน้ำจากหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง 3 ทำให้เกิดสัญญาณที่ m/z 299 อย่างไรก็ตามสเปกตรัมมวลของสารประกอบเหล่านี้ สามารถนำมาศึกษาารูปแบบการแตกไอออนย่อย และใช้ข้อมูลควบคู่กับสเปกตรัมนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ เพื่อการแปลผลของโครงสร้างที่ถูกต้อง และใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ การหามวลโมเลกุลสารประกอบเหล่านี้ ต้องพิจารณาแหล่งกำเนิดไอออนชนิดอื่นที่ทำให้เกิดการแตกโมเลกุลย่อยน้อย เช่น ซีไอ หรืออีเอสไอ นอกจากนั้น ชีวโมเลกุลที่มีหมู่ที่สามารถให้หรือรับโปรตอนได้หลายหมู่ เช่น โปรตีน และนิวคลีโอไทด์ ก็อาจเกิดไอออนที่มีประจุมากกว่า 1 ทำให้ได้สัญญาณที่ $m/z = (M+nH)/n$ หรือ $m/z = (M-nH)/n$ เมื่อใช้แหล่งกำเนิดไอออนเป็นอีเอสไอ ดังได้กล่าวแล้วข้างต้น

การเลือกโหมดโพสิทีฟหรือเนกาทีฟของแหล่งกำเนิดไอออนแบบอีเอสไอและมาลดี ขึ้นกับชนิดของโมเลกุลตัวอย่าง โดยปกติโมเลกุลทั่วไป และชีวโมเลกุล เช่น เปปไทด์ หรือโปรตีน จะใช้โหมดโพสิทีฟ แต่สำหรับการวิเคราะห์สารประกอบที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก

อัลกอฮอล์ และหมู่อัลดีไฮด์ ซึ่งมีแนวโน้มจะให้โปรตอนได้ดี (deprotonate) เช่น น้ำตาล หรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์¹¹ เมื่อถูกทำให้เป็นไอออน มักถูกเร่งด้วยความต่างศักย์ลบในโหมดเนกาทีฟ เกิดเป็นไอออนลบดังกล่าวข้างต้น

ตารางที่ 3 เครื่องวิเคราะห์มวลที่นิยมใช้ในปัจจุบัน^{5,12}

ชนิด	เครื่องวิเคราะห์มวล	ช่วงมวลที่วิเคราะห์	ข้อดี	ข้อเสีย
ความละเอียดต่ำ	ควอดรูโพลแมสฟิลเตอร์	m/z 1-5000	-ความไวสูง เหมาะกับการวิเคราะห์หาปริมาณ -ใช้วิเคราะห์มวลต่ำ ๆ ได้ดี จึงนิยมใช้วิเคราะห์ธาตุ (ICP-MS) -ราคาไม่แพง	-ความละเอียดต่ำ (unit mass) -มีข้อจำกัดด้านขนาดของมวล
	ไอออนแทรป	m/z 1-5000	-ความไวสูง -สามารถทำให้เป็น tandem MS ได้ภายในเครื่องเดียว -ราคาไม่แพง	-ความละเอียดต่ำ (unit mass) -มีข้อจำกัดด้านขนาดของมวล
ความละเอียดสูง	ทอป ซินดรีเฟล็กตรอน (reflectron)	ไม่จำกัด	-ไม่จำกัดขนาดของมวล ทำให้สามารถวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลใหญ่ ๆ ได้ - มีความละเอียดสูงถึงจุดทศนิยม 4 ตำแหน่ง	-ราคาแพง

สรุป

กล่าวโดยสรุป ในการอ่านสเปกตรัมมวลเพื่อให้เกิดการแปลผลมวลโมเลกุลที่ถูกต้อง ผู้ทำการวิจัยควรเข้าใจพื้นฐานของชนิดแหล่งกำเนิดไอออน และเครื่องวิเคราะห์มวล รวมทั้งควรทราบคร่าว ๆ ว่า สารประกอบที่นำมาวิเคราะห์นั้นเป็นสารประกอบประเภทใด การอ่านผลที่ผิดพลาด นำไปสู่การสรุปผลมวลโมเลกุลที่ไม่ถูกต้อง และเกิดความเข้าใจผิดในตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ Department of Regulation, Development and Molecular Diversity, National Museum of Natural History และ Pharmacognosy Laboratory, University Paris Descartes ประเทศฝรั่งเศส รวมทั้งคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ได้ให้การสนับสนุนการวิเคราะห์สารประกอบชนิดต่าง ๆ ที่ได้นำมาแสดงในบทความนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Barker J. Mass spectrometry. In: Ando DJ, editor. Mass Spectrometry Analytical Chemistry by Open Learning. 2nd ed. West Sussex: John Wiley and Sons, Inc; 1999.
2. Hoffmann E, Stroobant V. Mass spectrometry. 3rd ed. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd; 2007.
3. อรุมา โต๊ะยามา, มัลย์ สติรพันธุ์. เทคนิคการคู่ต่อเครื่องมีวิเคราะห์ทางเภสัชศาสตร์. ไทยโภชนาการ. 2549;3:1-23.
4. The mass spectrum. In: Johnstone RAW, Rose ME, editors. Mass

Spectrometry for Chemists and Biochemists. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1996; p.1-21.

5. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. Mass spectrometry. In: Yee J, editor. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 7th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2005.
6. Mass Spectrometry. In: Mendham J, Denney RC, Barnes JD, Thomas M, editors. Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis. 6th ed. Essex: Pearson Education Ltd; 2000;p.717-62.
7. Busch KL. Desorption ionization mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry. 1995;30(2):233-40.
8. Hossain M, Limbach PA. A comparison of MALDI matrices. In: Cole RB, editor. Electrospray and MALDI mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, practicalities, and biological applications. 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2010.
9. Cole RB, editor. Electrospray and MALDI mass spectrometry. 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons;2010.
10. Satiraphan M. Phytochemical Study of *Hopea odorata* Roxb. and *Dipterocarpus costatus* Gaertn.f. [Ph D thesis]. Paris: University Paris Descartes; 2012.
11. Ashcroft AE. An introduction to mass spectrometry [homepage on the Internet]. Leeds: The University of

Leeds; No date [cited 2013 Mar 7].
Available from <http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/MStut/mstutorial.htm>

12. Chernushevich IV, Loboda AV, Thomson BA. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2001;36(8):849-65.