

Massispektromeetria (MS)

Ainete määramine nende molekulidest tekitatud ioonide m/z väärtuste abil

6.12.2019

1

Massispektromeetria põhimõte (lihtsustatud)

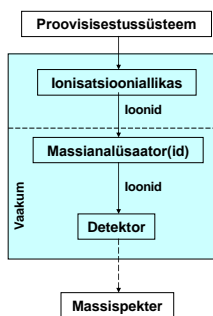
- Analüüsimeetod, mille puhul:
 - Uuritavad molekulid (molekulmassiga M) aurustatakse
 - Need molekulid/aatomid ioniseeritakse
 - Tekivad ioonid M^+ , MH^+ vms (**molekulaarioonid**)
 - Tekkinud ioonid on tihti kõrge energiaga ning **fragmenteeruvad** osaliselt, tekivad mitmesugused väiksema massiga ioonid (ja neutraalsed fragmendid)
 - Kõik ioonid suunatakse massianalüsaatorisse, mis eraldab ioonid nende **massi ja laengu suhted m/z järgi**
 - Detektor määrab vastavate ioonide hulga.
- Massispektromeeter registreerib ainult laetud osakesi.**

6.12.2019

2

Massispektromeetria

- Massispektromeetria etapid:
 - Ioonide genereerimine ja nende kiirendamine elektriväljas.
 - Ioonide eraldamine nende massi ja laengu suhte alusel.
 - Ioonide detekteerimine.
- Tulemus: massispekter.



6.12.2019

3

Ioonide tekitamine

- Gaasifaasist
 - EI** (*electron ionization*) – levinuim gaasikromatograafi MS detektorite (GC-MS) korral.
 - CI** (*chemical ionization*)
- Vedelast faasist
 - ESI** (*electrospray ionization*) – levinuim vedelikkromatograafi MS detektorite (LC-MS) korral.
 - APCI** (*atmospheric pressure chemical ionization*)
- Tahkest faasist
 - MALDI** (*matrix assisted laser desorption/ionization*) – põhiliselt biokeemia rakendustes.

6.12.2019

4

Elektronionisatsioon

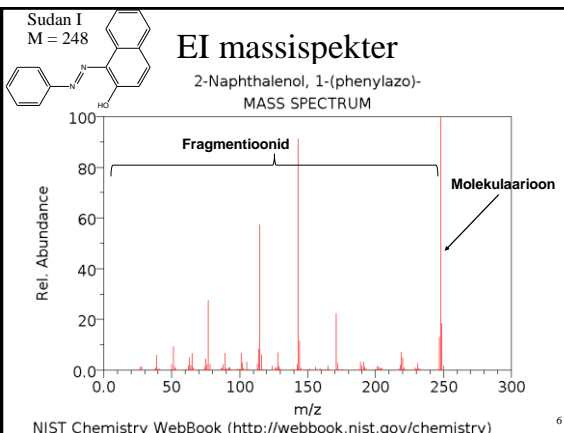
- Kõige levinum ioonide tekitamise meetod on **elektronionisatsioon (EI)**, mille puhul uuritavaid molekule pommitatakse elektronidega.
 - Elektronid "löövad molekulist välja" ühe elektroni ja seeläbi omandab molekul positiivse laengu.

$$M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$$
 - Tekkinud radikaaliooni nimetatakse **molekulaariooniks**.
- Osakese liigse energia või ebapüsivuse tõttu võib see laguneda – **fragmenteeruda**:

$$M^+ \rightarrow F^+ + N$$
 - Massispektromeeter detekteerib ainult laenguga fragmente (F^+).

6.12.2019

5

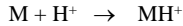


6

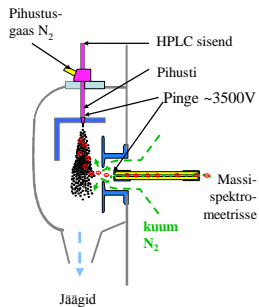
Elektropihustus-ionisatsioon (ESI)

- Ioonid tekivad vahetult lahuses elektrivälja toimele ja "aurustuvad" sealt välja

– Enamasti protoneerumine:



- Aurustumine tagatakse lahuse pihustamisega peeneteks tilkadeks
- Ioonid juhitakse massispektromeetri sisendisse elektrivälja abil
- ESI-MS on levinud detektor LC jaoks

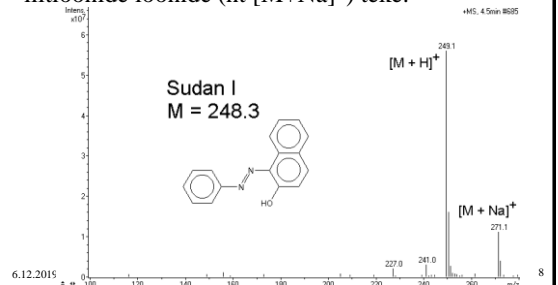


6.12.2019

7

ESI Massispekter

- Ionisatsioon on väga pehme – ei tekita fragmente.
- Iseloomulik on mitmelaenguliste (nt $[M+2H]^{2+}$) ja liitioonide ioonide (nt $[M+Na]^+$) teke.



6.12.2019

8

Massianalüsaatorid

- Magnetiline ja elektrostaatiline sektor
 - Enamasti mõlemad koos – topeltfokuseeriv MS
 - Klassikaline MS, põhimõtted küllalt lihtsad.
 - Kõrge lahutusvõimega.
- Kvadrupool ja ioonlõks
 - Kasutatakse kromatograafias detektoritena.
- Lennuaja MS ja Orbitrap
 - Põhiliselt proteoomika rakendused.
 - Järjest enam väikeste molekulide (kvalit.) analüüsil.
- Ioonsüklotronresonants-MS
 - Kõige kõrgema lahutusvõimega.

6.12.2019

9

MS: Võtmeaspektid

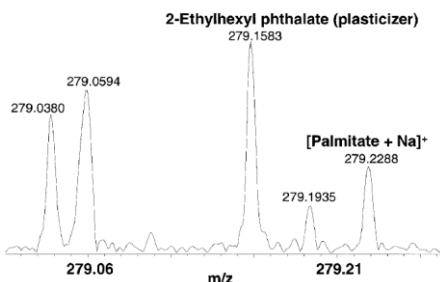
- **Meetodi avastamispiir on väga madal**
- **Selektiivsus:** erinev kõrge lahutusega (HR) ja madala lahutusega (LR) MS korral
- LR-MS
 - sama nominaalse m/z väärtusega ioonide jooned on täielikult kattunud
 - Selektiivsuse suurendamiseks:
 - Ained lahutatakse eelnevalt kromatograafiliselt.
 - Kasutatakse kaht järjestikust massianalüsaatorit – MS/MS.
- HR-MS
 - Sama nominaalse m/z väärtusega ioonide jooned on eristatavad

6.12.2019

10

HR Massispekter

- Kõigi spektrilõigul nähtavate ioonide nominaalne m/z on 279!



11

Võtmeaspektid

- Massispektri annavad põhimõtteliselt kõik ained.
 - Sõltub ionisatsiooni liigist.
- Puhaste ainete massispektrid on **sageli küllaltki karakteristikud** → identifitseerimine.
 - Ainete EI-massispektritest on koostatud suuri andmebaase, millest tarkvara abil saab tundmatuid aineid otsida.
 - ESI ja MALDI andmebaasid on loomisel.
 - Mõned ained ei anna (elektron-ionisatsiooniga) karakteristiklike massispektreid, kuna fragmenteeruvad väga ulatuslikult.
 - ESI on pehmem ja annab molekulaariooni.

6.12.2019

12

Võtmeaspektid

• Meetodi puudused:

- Aparatuur on kallis
- Aparatuur on õrn ja kapriisne, oskamatul käsitsemisel võib kergesti rikki minna
- Aparatuur vajab asjatundlikku hooldust

6.12.2019

13

EI ja ESI võrdlus

• EI

- Ioonid tekivad molekulide pommitamisel elektronidega
- Annab ioone suure saagisega
- Ioonid fragmenteeruvad ulatuslikult
- Spektrid on "puhi" täis
- Lihtne ja odav

• ESI

- Ioonid tekivad lahuses molekulide (de)protoneerimisel. Oluline on elektrivälja olemasolu.
- Ioniseerumine sõltub tugevalt analüüdist. Ionisatsioon tihti segane.
- Väga pehme meetod, st fragmente väga vähe.
- Spektrid on "puhtad"
- Suhteliselt lihtne, uudsuse tõttu kallis.

6.12.2019

14

Massispektrite interpreteerimine

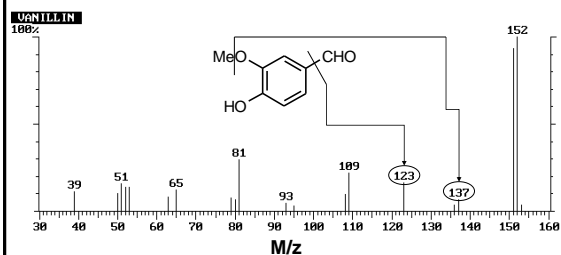
- Vaatleme vaid elektronisatsiooni (EI).
- Üldised põhimõtted:
 - Olulisim ioon on molekulaarioon, selle piik annab meile molekulmassi
 - Ained, millel on sees ...
 - Tsüklid
 - Kordsed sidemed
 - Suure aatom-massiga aatomid (S, Br, I, ...)
 - ... annavad enamasti spektris molekulaariooni piigi

6.12.2019

15

Vanilliini massispekter

- Molekulaarioon on intensiivne ($M = 152$, $z = 1$).



6.12.2019

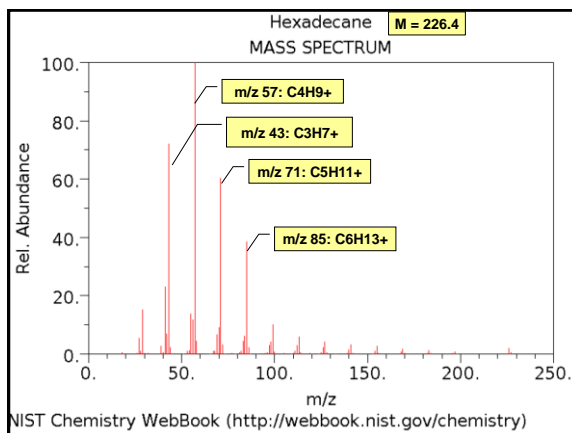
16

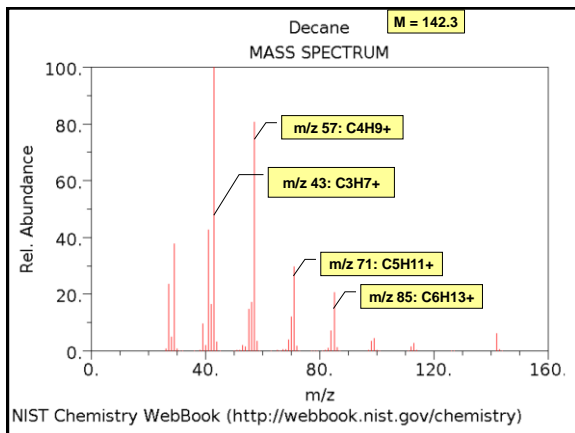
Massispektrite interpreteerimine

- Tuleb teada, millist ionisatsiooni on kasutatud!
- Üldised põhimõtted:
 - Ainetel, mis sisaldavad vaid alküül-osa ja lihtsaid rühmi, nagu -OH, -O-CH₃ jne, annavad sageli spektri, millel molekulaariooni piik on pisike või pole üldse molekulaariooni piiki
 - Sellisel juhul võib spekter olla vähe-karakteristlik.

6.12.2019

17

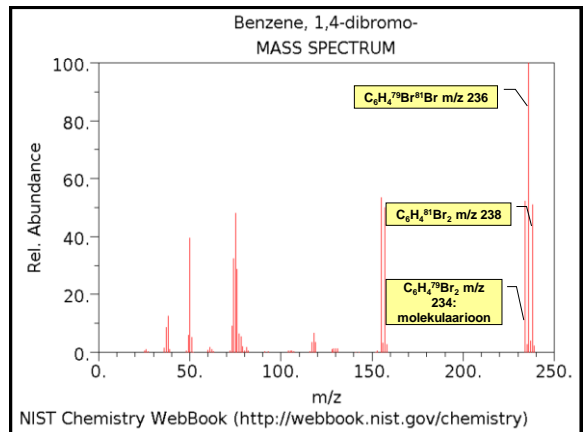
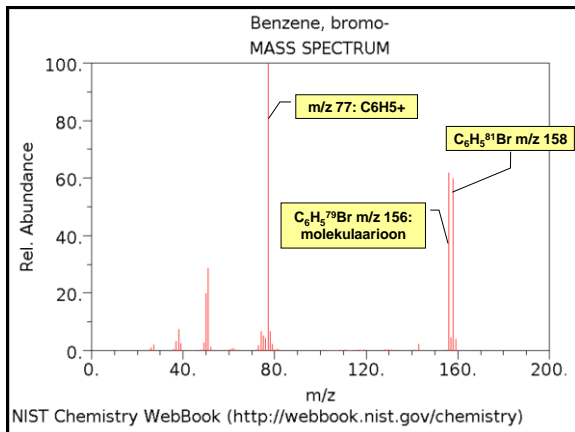




Isotoobid

- MS eristub teistest analüütilise keemia meetoditest selle poolest, et võimaldab eristada elementide isotoope.
- Umbes 1,1% süsinikust on ^{13}C .
 - Massispektris eristuvad sama aine molekulid, milles ^{13}C ei ole, nendest, milles on 1 (või enam) ^{13}C .
- Elementid, mille raskemaid isotoope on kergemaga võrreldavas hulgas:
 - Cl 35:37 3:1
 - Br 79:81 1:1

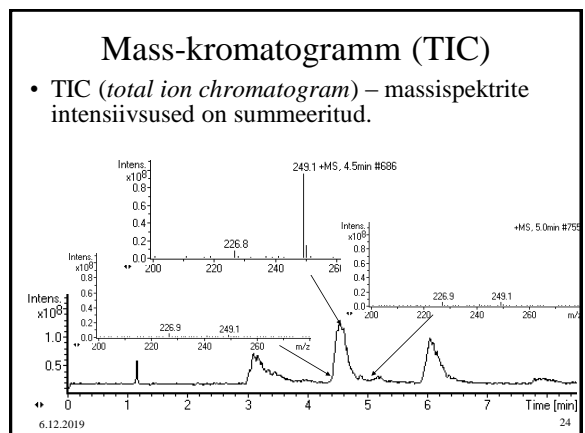
6.12.2019 20



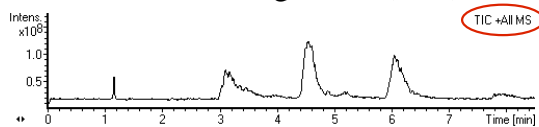
Massispektromeeter kromatograafias

- Detektorina kromatograafilises süsteemis omab massispektromeeter eeliseid:
 - Kvalitatiivne info
 - identifitseerimine (andmebaasid)
 - kinnitus, et piik kuulub analüüdile
 - Kvantitatiivne
 - analüüs ainult ühe kindla massi alusel (EIC)
- Selektiivne detektor – võimaldab analüüsi teostada ka siis kui ainete piigid on kromatograafiliselt lahutamata.
 - Mass-kromatogramm sisaldab kolmemõõtmelist informatsiooni: aeg, m/z ja intensiivsus.

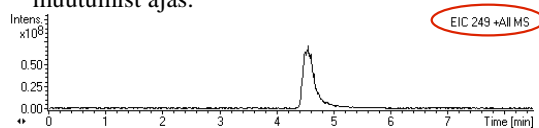
6.12.2019 23



Mass-kromatogramm (EIC)



- EIC (*extracted ion chromatogram*) – vaadeldakse ainult kindla m/z -ga iooni intensiivsuse muutumist ajas.



6.12.2019

25

Massispektromeeter kromatograafias

- GC-MS – gaasikromatograafia detektorina on massispektromeeter juba ammu rutiinkasutuses.
 - Kandegaasi hulk on väike, kuna kasutatakse kapillaarkolonne.
- LC-MS – uus meetod.
 - Analüüsitava aine eraldamine eluendist on probleem, sest vedel keskkond ei sobi vaakumisse.
 - Liides (ESI, APCI), mis tagab analüüdi jõudmise massispektromeetrisse ilma eluendita, jõudis piisavale tehnilisele tasemele 1990-ndatel.

6.12.2019

26