

Aula 5

ESPECTROMETRIA DE MASSAS

META

Apresentar a espectrometria de massas molecular;
apresentar os espectrômetros de massas;
apresentar as fontes de íons;
apresentar as aplicações da espectrometria de massas moleculares;
apresentar demais aplicações da espectrometria de massas.

OBJETIVOS

Ao final desta aula, o aluno deverá:
reconhecer um espectro de massas molecular;
compreender a formação de um espectro de massas;
interpretar um espectro de massas;
identificar a instrumentação analítica relacionada à espectrometria de massas;
aplicar a espectrometria de massas em análises qualitativas e quantitativas.

PRÉ-REQUISITOS

Conhecimentos em estrutura molecular

Elisangela de Andrade Passos

INTRODUÇÃO

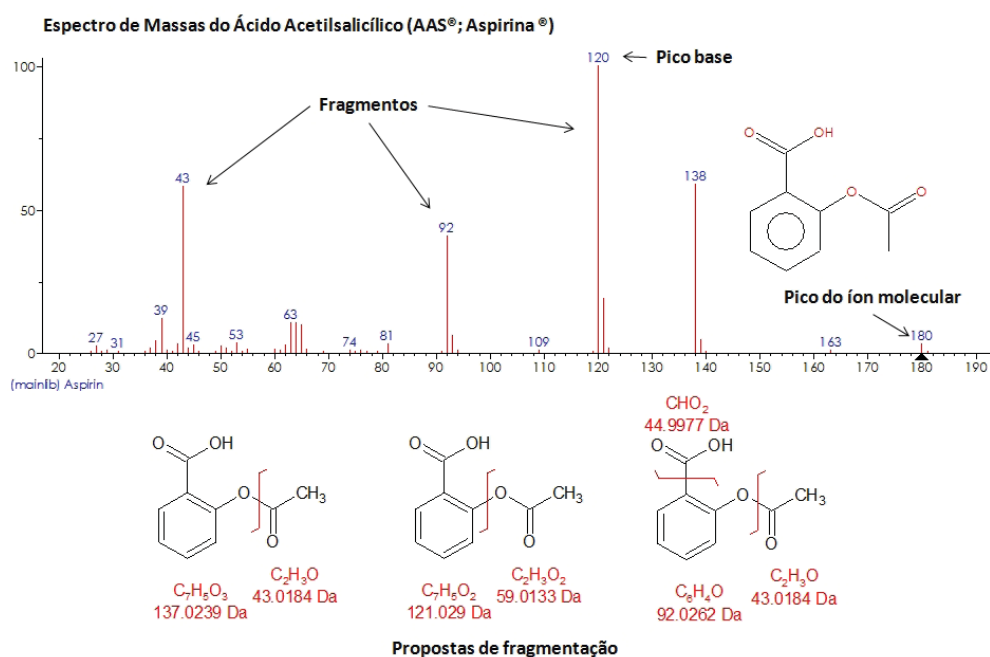
Na aula anterior foi relatado acerca dos fundamentos da espectrometria de emissão atômica no UV-VIS. Foram apresentadas a instrumentação e aplicações dessa técnica espectroanalítica.

Nesta aula trataremos da Espectrometria de Massas. Serão abordados assuntos relacionados aos conceitos e princípios da técnica, a instrumentação, a aplicação e a interpretação de resultados.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas (MS) está baseada na criação de íons em fase gasosa, provenientes de moléculas ou átomos presentes em uma determinada amostra. Estes íons são separados em função da sua relação massa/carga (m/z), os quais têm posteriormente suas abundâncias relativas determinadas. Estes íons recebem o nome de fragmentos, os quais representam frações distintas da molécula ou até o próprio átomo, no caso da aplicação da técnica na área da inorgânica.

O resultado desta ionização dá origem ao espectro de massas, que possui um perfil característico em função do método de ionização empregado. O espectro de massas é composto por linhas que representam os fragmentos com suas relações m/z , e suas respectivas abundâncias. Através do espectro de massas de um analito é possível se obter informações estruturais da molécula, além da massa molar representada pelo fragmento de maior relação m/z , também chamado de pico do íon molecular, e o fragmento de maior estabilidade, que atinge a abundância de 100 %, chamado de pico base.



Detalhamento do espectro de massas para a molécula do ácido acetilsalicílico.

Através do espectro de massas podemos concluir que a massa molar do ácido acetilsalicílico é de 180 g mol^{-1} , baseado no fragmento que representa o pico do íon molecular. O fragmento cineticamente mais favorável (abundância = 100 %) é o de razão m/z 120, que representa a quebra (clivagem) da ligação C–O e a perda do grupamento acetil da estrutura.

ESPECTRÔMETROS DE MASSAS

Os espectrômetros de massas são compostos basicamente por: uma interface com o sistema de introdução de amostra, uma fonte de ionização, um acelerador de íon, um analisador de massas e um detector, sendo que todo o sistema encontra-se sob a ação de alto vácuo. Os espectrômetros de massas normalmente aparecem associados a outras técnicas analíticas, como por exemplo, a cromatografia a gás (GC), cromatografia líquida (LC) e plasma induzido (ICP), além da possibilidade de inserção direta da amostra, conhecidos como sistemas de introdução de amostra.

Na cromatografia a gás, por exemplo, uma mistura de compostos é previamente separada e os compostos introduzidos no espectrômetro de massas através da coluna capilar. Processo semelhante a cromatografia líquida, a qual é aplicada a compostos ou misturas de compostos termicamente instáveis que sofreriam decomposição em sistemas de cromatografia a gás. O Probe de inserção direta é empregado nos casos em que o analito não é passível de análise por GC ou LC, normalmente aplicado a amostras líquidas e sólidas que apresentam baixa pressão de vapor.

FONTES DE IONIZAÇÃO

Neste tópico, trataremos dos sistemas mais comuns e convencionais de ionização.

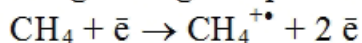
Existem vários sistemas de ionização do analito, que em geral excitam uma molécula neutra, a qual libera um elétron dando origem a um cátion radical (M^+), outro método utiliza uma reação íon molecular para gerar aductos do tipo MH^+ , ambos conhecidos como Ionização por Elétrons (EI) e Ionização Química (CI) respectivamente. Estas duas formas de ionização ocorrem estritamente na fase gasosa. Outras formas de ionização como Fast Atom Bombardment (FAB), Atmospheric Pressure Ionization (API) e Eletrospray (ESI) e Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI), entre outras são aplicados ao analito na sua forma condensada.

O modo de ionização por elétron é a técnica mais comum aplicada na espectrometria de massas, devido sua grande abrangência de moléculas na fase gasosa e por apresentar espectros com grande reprodutibilidade, sendo muito empregado na identificação de moléculas através da comparação do espectro do analito com espectrotescas, como por exemplo, a NIST e a

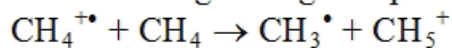
Wiley. Sua limitação é o alto grau de fragmentação da molécula, omitindo na grande maioria dos casos o pico do íon molecular. Nesta técnica o analito é ionizado atravessando um feixe de elétrons, produzido através da passagem de uma corrente elétrica através de um filamento (resistência), que possui elétrons acelerados a uma energia de 70 eV. Estes elétrons com esta energia é que são responsáveis por arrancar os elétrons de valência produzindo cátions radicais e fragmentando a molécula (quebra de ligações químicas formando fragmentos menores carregados positivamente). A abundância dos íons gerados na fragmentação da molécula é resultante da cinética de fragmentação e da energia aplicada. Alterando a energia, altera-se a distribuição da fragmentação.

A Ionização Química é reconhecida como um modo soft de ionização, ou seja, é um modo o qual se aplica uma quantidade de energia inferior a EI, o que por consequência gera um número muito menor de fragmentações, enfatizando o pico do íon molecular, e atuando como uma técnica complementar a EI. Na CI o analito é ionizado por uma nuvem iônica, gerada pela previa ionização de um gás reagente pelo feixe de elétrons empregado na EI, o qual posteriormente irá ionizar o analito. Os gases reagentes mais comuns são: metano, amônia, isobutano e acetonitrila. O esquema a seguir demonstra as etapas da CI.

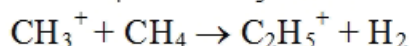
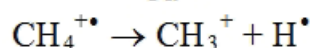
A) Ionização do gás reagente para a formação de íons



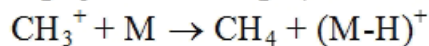
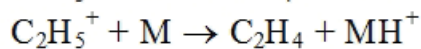
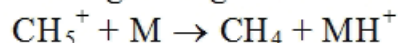
B) Reação dos íons do gás reagente para formar aductos



ou



C) Reação dos íons do gás reagente com as moléculas do analito



Esquema de reações no processo de Ionização Química (CI).

Na técnica de ionização Fast Atom Bombardment (FAB), um feixe de alta energia produzido pelo movimento de átomos neutros de um gás inerte (argônio) e usado para arrancar e ionizar em uma única etapa a molécula do analito a partir da matriz, normalmente líquida ou sólida, ou dissolvida em um solvente inerte e não volátil como o glicerol. Esta técnica opera muito bem para moléculas com massa molecular na ordem de alguns milhares de Dalton (1000 - 10000 Dalton). Esta técnica é muito empregada na análise de amostras biológicas principalmente na caracterização de proteínas e demais compostos que se decompõem termicamente pelas técnicas convencionais.

A Atmospheric Pressure Ionization (API) e Eletrospray (ESI) caracterizam-se pela ionização da amostra a pressão atmosférica, com ampla aplicação aos compostos termicamente instáveis como, peptídeos, proteínas e polímeros sem a necessidade de prévia preparação. Neste modo os íons formados são direcionados ao espectrômetro de massas através de diferentes estágios de vácuo.

O MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) ioniza e vaporiza o analito na sua forma condensada a partir da aplicação de um laser sobre a amostra. A preparação da amostra em uma matriz, que pode ser o glicerol, favorece a distribuição da energia do laser na amostra, tornando-o um método soft de ionização, favorecendo a identificação do pico do íon molecular, e ampliando sua aplicação a moléculas de alta massa molecular, chegando a 200.000 Dalton.

Outros métodos de ionização podem ser encontrados e vem sendo desenvolvidos visando aplicações específicas.

O ICP é uma das técnicas mais avançadas para aplicação na identificação de compostos inorgânicos. Nesta técnica o analito é ionizado através de um plasma de argônio a temperaturas aproximadas de 10.000 K. Desta forma a técnica proporciona a ionização de 100 % dos átomos de praticamente toda a tabela periódica, sendo possível determinar simultaneamente aproximadamente 70 metais num período de 3 minutos. Associado a sua alta sensibilidade possui grande aplicação principalmente em análises ambientais.

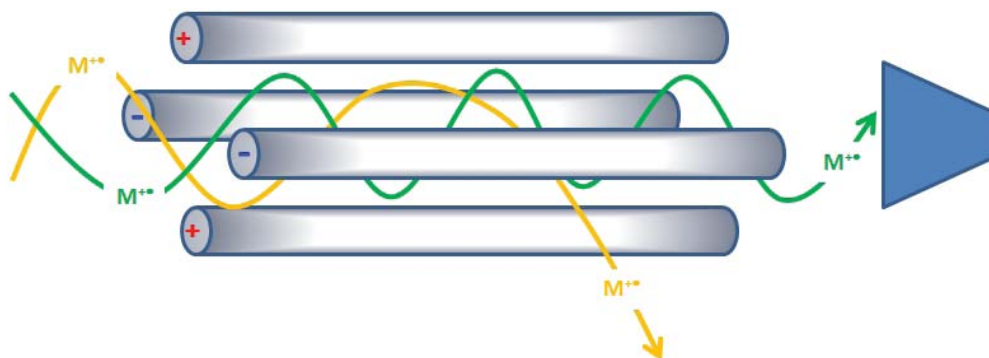
ANALISADORES DE MASSAS

Após os íons serem formados na região da fonte de ionização eles são direcionados ao analisador de massas por um campo eletromagnético. O analisador de massas separa os íons através das suas relações m/z . A seleção de um analisador de massas depende da resolução, faixa de massas, taxa de escaneamento e limite de detecção para a aplicação específica. Cada analisador apresenta características muito diferentes e a seleção de um instrumento requer um grande conhecimento da aplicação.

Os analisadores são tipicamente distribuídos em contínuos e pulsados. Analisadores contínuos incluem os quadropolos e seção magnética. Neste analisador opera como um filtro, podendo selecionar apenas um íon de m/z específica melhorando significativamente a relação sinal/ruído (S/N) do equipamento. A desvantagem é a perda de informações do restante dos íons formados. Os analisadores de massas pulsado representam a maioria dos analisadores, que incluem: Time-of-flight (TOF), Ion Cyclotron Resonance (ICR) e Ion Trap.

Quadropolo: é o mais comum dos analisadores. É compacto, possui alta taxa de escaneamento, alta eficiência de transmissão e requer um sistema de vácuo moderado, excelente para quem procura um equipamento com

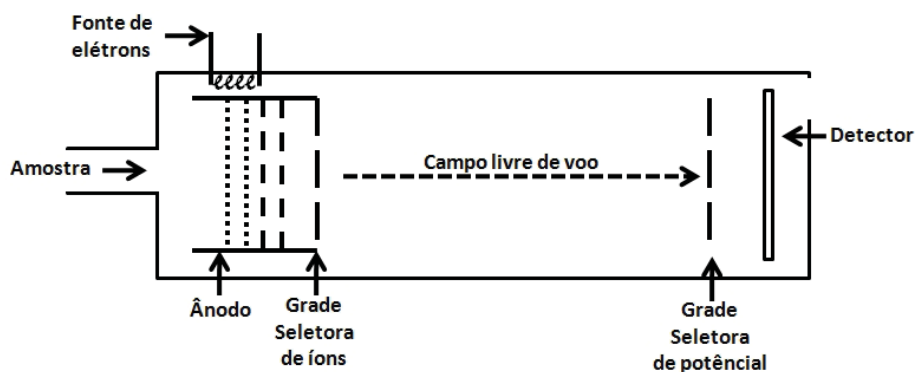
boa relação custo x benefício. Sua limitação está na resolução e na faixa de massas que pode chegar a 1000 Da. Neste analisador, o íon é acelerado por um campo elétrico da região da fonte de ionização, ao analisador de massas que compreende 4 eletrodos dispostos paralelamente com cargas contrárias como mostra a Figura 3.



Esquema de um analisador de massas tipo quadrupolo.

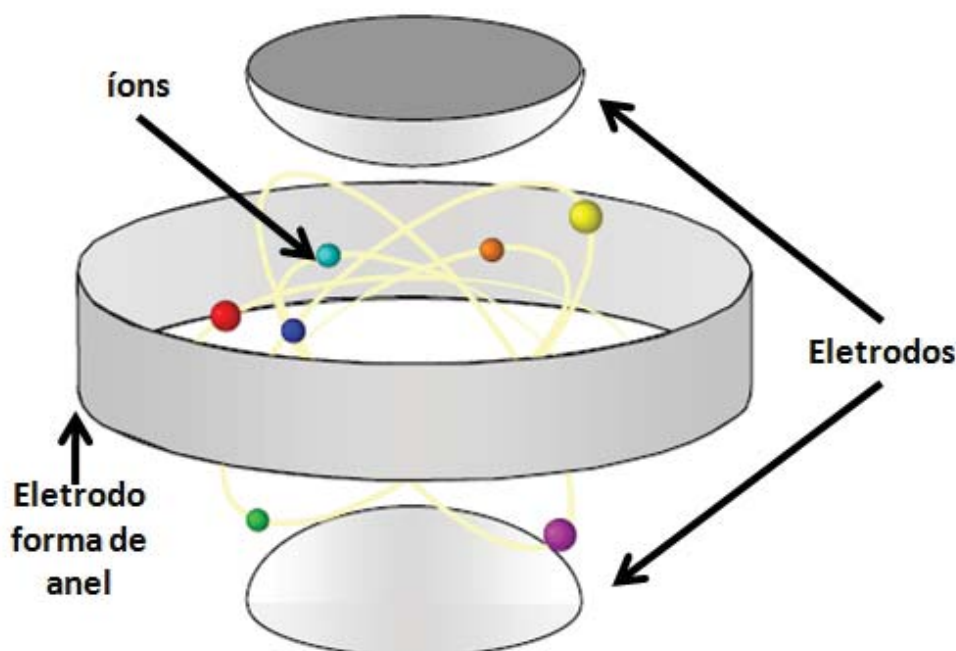
Seção Magnética: foi o primeiro analisador de massas desenvolvido por J.J. Thomson em 1897, que emprega um magneto para determinar a razão m/z . Possui maior resolução que o quadrupolo, porém necessita de um alto vácuo e sua taxa de escaneamento é baixa. Analisa massas de até 5.000 Da, podendo ser estendido até 30.000 Da.

Time-of-flight (TOF): os íons são separados em função do tempo de voo através de um tubo. É um analisador muito simples, que opera com voltagens fixas e não requer campo magnético. O ponto negativo é a baixa resolução. As vantagens são: alta eficiência de transmissão, baixos limites de detecção, sem limites para a relação m/z e alta taxa de escaneamento. Neste modo um pacote de íons são formados rapidamente na ordem de nanossegundos, e acelerados num tubo de voo pela ação de um campo elétrico aplicado entre as extremidades. Como todos os íons estão sujeitos a mesma distância, sob a mesma força, ambos possuem a mesma energia cinética, a relação m/z é determinada em função da velocidade atingida pelo íon, que esta relacionada ao tempo de voo do íon através da seção de campo livre do tubo.



Esquema de um analisador de massas TOF.

Ion Trap: é um analisador que vem se tornando popular, em função de seu custo, da sua alta sensibilidade e taxa de escaneamento. Neste analisador todos os íons são presos e analisados, o que aumenta a relação S/N. O analisador consiste de um eletrodo na forma de um anel com outros dois como se fossem tampas deste primeiro, como mostra a figura 5.



Esquema de um analisador de massas Ion Trap.

Ion Cyclotron Resonance: este tipo de analisador de massas tem uma alta resolução (ca. 10⁹). Esta é uma técnica bastante recente, comercialmente desde 2003, o que torna o equipamento extremamente caro. Nesta técnica o íon se movimenta numa órbita circular provocada por um magneto supercondutor. Além da altíssima resolução, outra vantagem é que se trata de uma técnica não-destrutiva, o que possibilita o acúmulo de íons e a diminuição considerável da relação S/N.

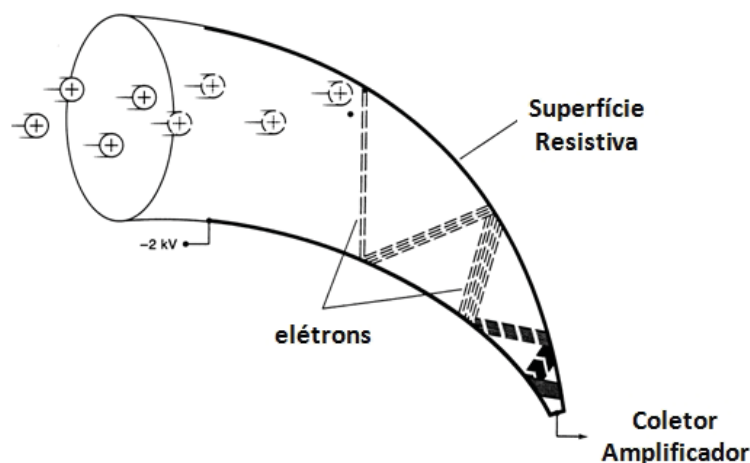
ESPECTROMETRIA DE MASSAS MODO TANDEM

Este é o nome dado a técnica que opera na forma de massa-massa (MS-MS; MS_n). Neste processo um íon pai é novamente submetido a ionização dando origem a um íon filho e assim sucessivamente quantas vezes o instrumento permitir. No caso dos analisadores quadrupolos, comercialmente encontramos o triplo quadrupolo. No caso dos Ion Trap, existem configurações capazes de operar com MS₆, ou seja, com seis fragmentações sucessivas do íon pai. A técnica de ICR também permite operar no modo Tandem. Este modo tem uma vasta aplicação na elucidação de estruturas complexas.

DETECTORES

A maioria dos espectrômetros de massas determina um valor de razão m/z por escaneamento. Um detector de canal simples é usado nestes instrumentos, como o Copo de Faraday e a Multiplicadora de elétrons. Já os analisadores TOF, Ion Trap e ICR possuem a capacidade de monitorar diversos íons com razões m/z simultaneamente desde que desejado.

Multiplicadora de elétrons: este detector possui o mesmo conceito que os tubos fotomultiplicadores empregados na espectroscopia óptica (Figura 6).



Esquema básico de uma multiplicadora de elétrons.

O modelo apresentado na Figura 6 representa uma multiplicadora de elétrons de dinodo contínuo. Seu formato cônico é para minimizar os ruídos elétricos e prevenir que íons positivos saiam do detector. A superfície condutora com alta resistência elétrica, assim que colidida com um íon positivo, libera uma quantidade de elétrons proporcional a carga do íon, os quais são acelerados em função de um diferencial de potência para o amplificador, se multiplicando a cada colisão com a superfície do detector.

Copo de Faraday: o mais barato dos detectores, consiste em um copo de metal ou carbono, que captura íons e acumula sua carga. A pequena corrente gerada, na ordem de microamperes, é amplificada e medida. Este detector é absoluto e pode ser empregado na calibração de outros detectores, e em função das suas características, sua principal aplicação é em determinações de razões isotópicas.

Por operar de forma diferente aos sistemas que empregam dinodos, com a multiplicação de elétrons, o Copo de Faraday apresenta baixa sensibilidade.

Outros detectores classificados como Array Detectors, baseados em pratos multicanais de detecção que substituem os pratos fotográficos, são empregados em alguns sistemas TOF.

INTERPRETAÇÃO ESPECTRAL

O espectro de massas é considerado uma impressão digital da estrutura molecular, possibilitando a comparação com padrões de fragmentação para a identificação de compostos em uma matriz, porém um dos principais equívocos é a falta de conhecimento na interpretação e compreensão dos espectros, tomando como verdadeira a sugestão de identificação dos softwares relacionados às espectrotecas.

O procedimento para interpretar um espectro de massas consiste dos seguintes passos:

1. Identifique o íon molecular: a interpretação do espectro de massas inicia pela identificação do pico do íon molecular, o qual apresenta o maior valor de relação m/z , e está relacionado à massa molar do analito. Porém esta identificação deve ser feita com ressalvas, pois, o pico com maior relação m/z no espectro necessariamente não é proveniente da molécula em estudo, e sim de contaminantes, ruído, fase estacionária da coluna devido sangramento entre outros. Deve-se observar também, que em sistemas de ionização EI (70 eV) não é muito comum observar o fragmento referente ao pico do íon molecular. Como alguns instrumentos operam com valores unitários de massas, e o íon molecular representa a somatória das massas dos isótopos abundantes na molécula, podem ocorrer divergências entre os valores teóricos e os observados no espectro de massas. Para isso emprega-se como técnica complementar a ionização química como discutido anteriormente.
2. Aplique a regra do Nitrogênio: através da massa molar identificada pelo íon molecular é possível prever a fórmula molecular do analito na forma $C_x H_y N_z O_n$ através dos valores tabelados encontrados na literatura. Com isso é possível prever quantas insaturações e ciclizações a molécula apresenta através da equação 01.

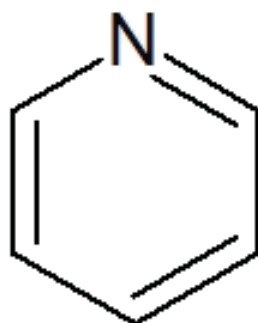
$$\text{Duplas ligações} + \text{ciclizações} = X - \frac{1}{2} Y + \frac{1}{2} Z + 1 \quad (01)$$

Por exemplo, para a Piridina (C_5H_5N):

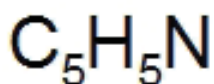
$$\text{Duplas ligações} + \text{ciclizações} = 5 - \frac{1}{2} 5 + \frac{1}{2} 1 + 1$$

$$\text{Duplas ligações} + \text{ciclizações} = 5 - 2,5 + 0,5 + 1 = 4$$

Sendo assim, confirmamos que a molécula da Piridina apresenta 3 insaturações + a ciclização, como mostra a Figura 7.



Piridina

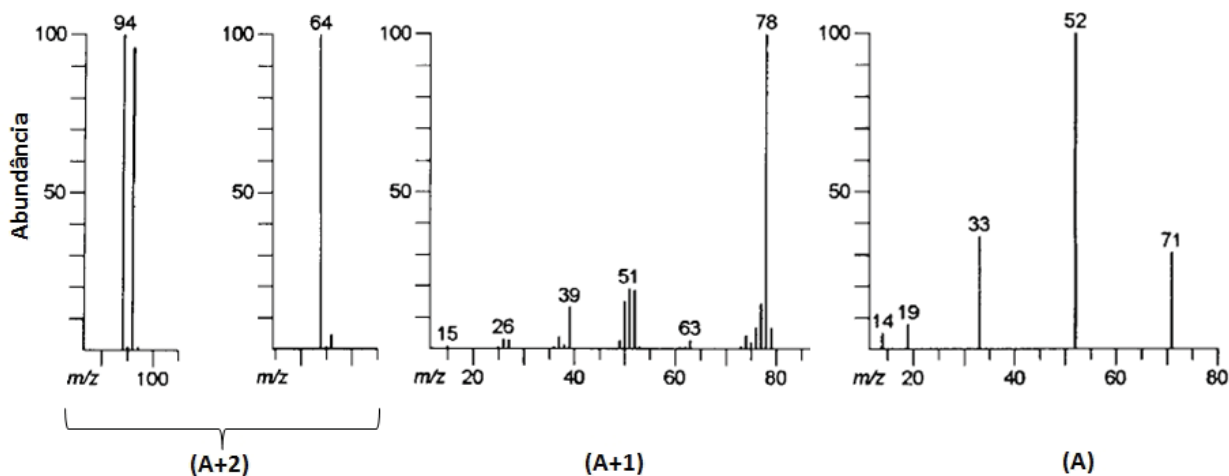


Estrutura e fórmula molecular para a Piridina.

3. Avalie os sistemas (A+2); (A+1); e (A): a partir do pico do íon molecular (A) identifique a presença de isótopos. O íon molecular que representa os elementos (A) que possuem apenas um isótopo natural abundante é caracterizado pela presença de hidrogênio, flúor, fósforo ou iodo.

(A+1) representa os elementos que apresentam dois isótopos naturais, sendo o segundo com 1 u.m.a. (unidade de massa atômica) a mais que o isótopo mais abundante. Três elementos contribuem para esta propriedade, são eles o hidrogênio, o carbono e o nitrogênio, porém, o hidrogênio apresenta uma baixa relação isotópica podendo ser desconsiderado.

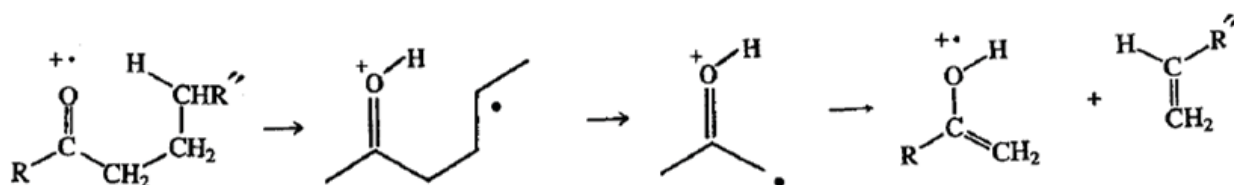
(A+2) é o mais fácil de reconhecer e representa os elementos em que o segundo isótopo apresenta 2 u.m.a a mais que o isótopo mais abundante, comumente encontrado em íons que possuem na sua estrutura, oxigênio, silício, enxofre, cloro e bromo. Sendo que destes o oxigênio é o que apresenta a menor relação isotópica, cerca de 0,2 %.



Representação dos sistemas isotópicos em um espectro de massas.

4. Procure por fragmentos característicos: identifique no espectro de massas fragmentos de perda de massas a partir do pico do íon molecular que sejam característicos a alguns sistemas, como por exemplo, $M^{+\bullet}$ menos 15 atribuído a perda de uma metila ($M^{+\bullet} - \cdot\text{OCH}_3$); $M^{+\bullet}$ menos 31 atribuído a perda de uma metoxila ($M^{+\bullet} - \cdot\text{OCH}_2$); $M^{+\bullet}$ menos 18 atribuído a perda de uma molécula de água ($M^{+\bullet} - \text{H}_2\text{O}$) e assim por diante. Também por íons característicos de sistemas aromáticos, como por exemplo, m/z 77 referente a anel benzênico; m/z 91 referente a anel benzênico monosubstituído por uma metila (íon tropílio); m/z 105 referente a anel benzênico disubstituído por duas metilas; e m/z 128 dois anéis benzênicos condensados. O perfil também traz informações importantes, como por exemplo, para alcanos que apresentam em seu espectro fragmentos com relações m/z 43, 57, 71, 85, ..., separados entre si por uma relação m/z 14, característico de grupo CH_2 .

Diferentes classes orgânicas como alcoóis, éteres, apresentam fragmentações características, mas as cetonas, aldeídos entre outras apresentam um fragmento característico de um rearranjo, conhecido como Rearranjo de MacLafferty.



Rearranjo de MacLafferty.

Neste rearranjo, o hidrogênio na posição gamma da cadeia lateral é capturado pelo oxigênio da carbonila, desencadeando um rearranjo que irá dar origem a um fragmento iônico com massa determinada pelo radical R, além de gerar um alceno neutro.

APLICAÇÕES

A espectrometria de massas possui uma vasta aplicação qualitativa na identificação de analitos presentes em uma matriz através do espectro de massas como discutido até o momento, principalmente por não necessitar de um padrão inicial de referência. Vale salientar que a confirmação da estrutura deve ser realizada com base em outras técnicas complementares como ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono ou utilizando um padrão primário como referência.

No âmbito quantitativo, a espectrometria de massas surge como uma excelente ferramenta para elucidar os problemas de coeluição entre analito e interferentes, já que a quantificação pode ser realizada baseada em um fragmento específico do analito. Na quantificação pode ser trabalhado

tanto com o Cromatograma de Íons Totais (TIC), como também com o Cromatograma de Íon Monitorado ou Seletivo (SIM). Em ambos se trabalha com integração de área do pico relacionado a um padrão interno ou uma curva de calibração externa conforme será discutido nas aulas sobre cromatografia.

A espectrometria de massas é aplicada em análises forenses, ambientais, petroquímicas, geoquímicas, biológicas, inorgânicas entre outras.

PARA SABER MAIS

Para entender as informações acima citadas leia o artigo intitulado “Espectrometria de massa e RMN multidimensional e multinuclear: Revolução no estudo de macromoléculas biológicas” que está disponível na plataforma. Em seguida, faça um resumo sucinto das principais idéias do texto.

CONCLUSÃO

Nesta aula foram apresentados os conceitos relacionados à base da espectrometria de massas, suas características, instrumentação e aplicação.



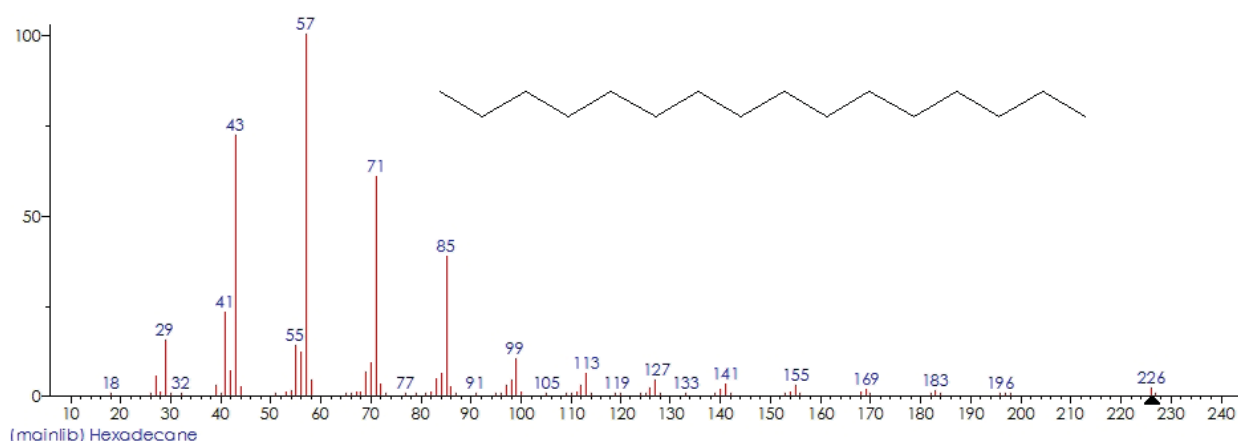
RESUMO

A espectrometria de massas está baseada na identificação e quantificação de um analito através da sua relação m/z . Após a ionização os íons formados são selecionados através de um analisador de massas e direcionados a um detector, o qual irá determinar qual a relação m/z de cada íon formado, chamados de fragmentos. O resultado deste processo é o espectro de massas o qual pode ser considerado uma impressão digital da molécula. Através dele é possível identificar o pico do íon molecular, que nos dá a informação da massa molar da molécula analisada, além dos fragmentos que podem ser identificados e correlacionados com a estrutura desconhecida da molécula. Algumas ferramentas como as espectrotecas auxiliam na identificação, porém devem ser utilizadas de maneira cuidadosa. Além da análise qualitativa, a qual identifica a molécula, a técnica também é aplicada em análises quantitativas na determinação da quantidade do analito presente na matriz, principalmente por tratar-se de uma técnica extremamente seletiva e com alta sensibilidade.

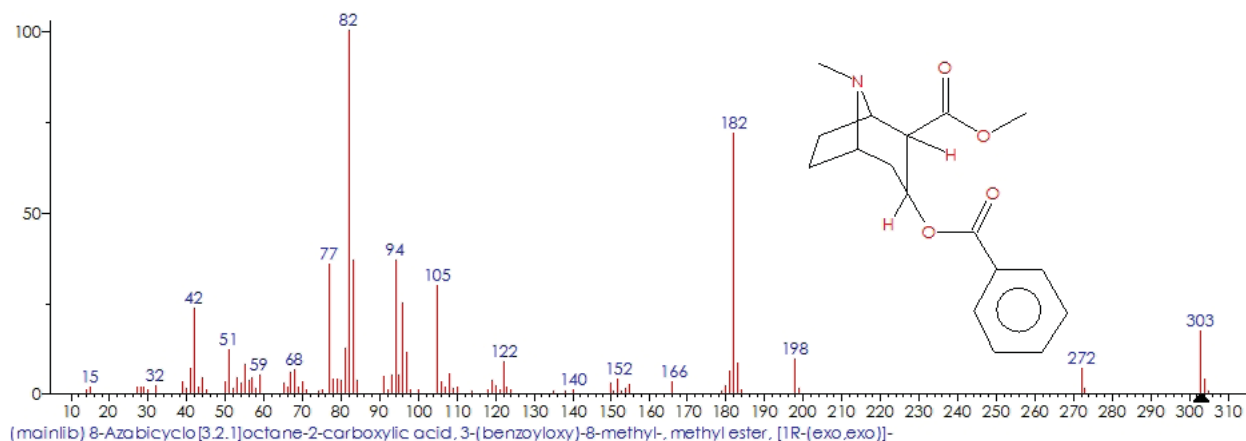


ATIVIDADES

1. Com base no espectro a seguir a que tipo de classe orgânica o composto analisado pertence?



2. O espectro de massas abaixo foi obtido para a molécula da cocaína. Indique qual a relação m/z para o pico do íon molecular, para o pico base e para o fragmento referente ao anel aromático.



3. Determine o índice de insaturações e ciclização para a molécula com fórmula molecular C_7H_7NO .

4. Abaixo está apresentado o espectro de massas para a molécula do safrol. Faça a previsão dos principais fragmentos.

3. Aplicando a equação 01:

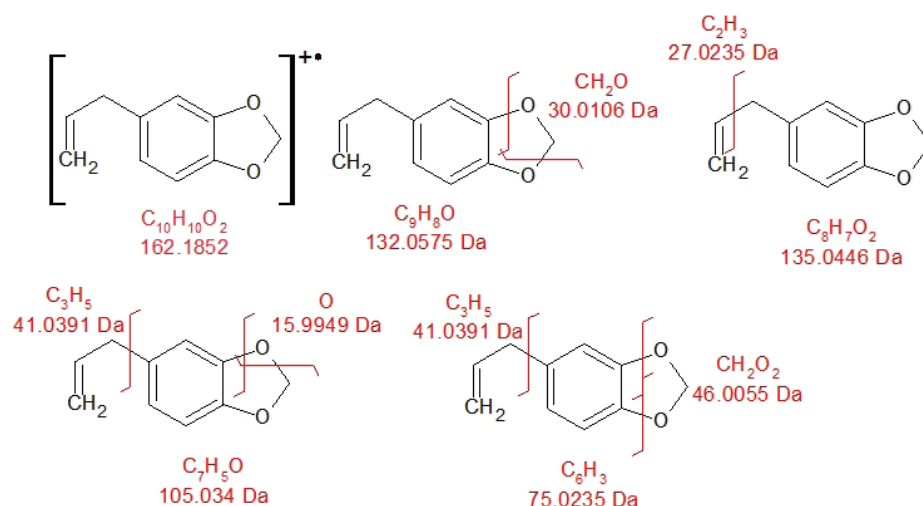
$$\text{Duplas ligações} + \text{ciclizações} = X - \frac{1}{2} Y + \frac{1}{2} Z + 1$$

Temos:

$$\text{Duplas ligações} + \text{ciclizações} = 7 - \frac{1}{2} 7 + \frac{1}{2} 1 + 1$$

$$\text{Duplas ligações} + \text{ciclizações} = 7 - 3,5 + 0,5 + 1 = 5$$

4. O principal fragmento neste caso do íon molecular (m/z 162) também é equivalente ao pico base (abundância 100%), logo representa a molécula como um todo, apenas na forma de cátion radical. Os demais fragmentos, m/z 135, 131, 104 e 77 estão propostos na sequência.





AUTO-AVALIAÇÃO

- Consigo reconhecer um espectro de massas molecular?
- Sou capaz de explicar a formação de um espectro de massas?
- Consigo interpretar um espectro de massas?
- Sinto-me capaz identificar a instrumentação analítica relacionada a Espectrometria de Massas?
- Prevejo as aplicações da Espectrometria de Massas em análises qualitativas e quantitativas?



PRÓXIMA AULA

Na próxima aula iremos abordar acerca dos métodos eletroanalíticos.

REFERÊNCIAS

- MACLAFFERTY, F.W.; TURECEK, F. Interpretation of mass spectra. 4 ed. University Science Books, Mill Valley, California, 1993.
- ROBINSON, J.W.; FRAME, E.M.S; FRAME II, G.M. Undergraduate Instrumental Analysis, 6th edition, Marcel Dekker, New York, 2005.
- SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; Spectrometric Identification of Organic Compounds, 6 th ed., John Wiley & Sons, 1998.
- COLNAGO, L.A.; ALMEIDA, F.C.L.; VALENTE, A. P. Espectrometria de massa e RMN multidimensional e multinuclear: **Revolução no estudo de macromoléculas biológicas**. Química Nova na escola, v.16, p. 9-14, 2002.