

SPETTROSCOPIA INFRAROSSA

La spettroscopia infrarossa, più spesso abbreviata con l'acronimo IR, riveste una certa importanza nell'ambito della caratterizzazione dei composti organici e inorganici grazie alla sua rapidità ed economicità e permette di verificare la presenza o meno di determinati gruppi funzionali nella molecola esaminata.

L'IR è impiegato principalmente per l'identificazione di strutture di composti incogniti e nel controllo qualità dei prodotti chimici, come per esempio nell'analisi di vernici e pigmenti, ma anche dei vini (!) e degli alimentari in genere; il metodo è molto rapido e di semplice applicazione (per capire se il composto cercato è presente o meno nella miscela esaminata la maggior parte delle volte basta semplicemente dare un'occhiata al risultato visivo dell'analisi, senza eseguire alcun calcolo). Anche in campo astronomico e astrofisico si utilizza l'IR.

Uno spettro IR si ottiene irraggiando un campione, che può essere liquido, solido o gassoso, con radiazione elettromagnetica di lunghezza d'onda compresa tra 1 e 500 micrometri; in seguito all'irraggiamento i legami delle molecole contenute nel campione possono assorbire energia deformandosi e l'entità dell'assorbimento è funzione sia della quantità che della tipologia dei legami interessati dalla deformazione. Le frequenze alle quali ci sono assorbimenti di radiazione IR ("picchi "o" segnali") possono essere correlate direttamente ai legami all'interno del composto in esame.

La radiazione infrarossa si riferisce, in generale, a quella parte dello spettro elettromagnetico che si trova tra le regioni del visibile e delle microonde.

In particolare dividiamo questa zona in:

- IR vicino (NIR) \square 13.000 - 4.000 cm^{-1}
- IR medio (MIR) \square 4.000 - 200 cm^{-1}
- IR lontano (FIR) \square 200 - 10 cm^{-1}

La zona che comunque interessa maggiormente il chimico organico è quella compresa fra 4.000 e 400 cm^{-1} .

La spettroscopia IR è una tecnica analitica che si basa sull'interazione fra una radiazione elettromagnetica e la materia. Più precisamente, questa è una **spettroscopia di vibrazione**; infatti quando una molecola organica viene investita da una radiazione infrarossa la cui frequenza (espressa in termini di numeri d'onda, inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda) sia compresa fra 10.000 e 100 cm^{-1} , l'energia ceduta dalla radiazione stessa viene convertita in energia vibrazionale, e sono due i modi fondamentali in cui la molecola può vibrare:

- **VIBRAZIONE DI STRETCHING** (stiramento): dovuto a stiramento ritmico lungo l'asse di legame
- **VIBRAZIONE DI BENDING** (piegamento) dovuto a variazione dell'angolo di legame

Una **vibrazione di stretching**, quindi, è un movimento ritmico lungo l'asse di legame con conseguente aumento e diminuzione della distanza interatomica.

Una **vibrazione di bending**, invece, può essere dovuta ad una variazione dell'angolo dei legami con un atomo in comune, oppure ad un movimento di un gruppo di atomi rispetto al resto della molecola senza che si muovano gli atomi nel gruppo, uno rispetto all'altro.

In questo caso abbiamo:

- vibrazioni sul piano ? scissoring e rocking
- vibrazioni fuori dal piano ? wagging e twisting

Quando queste vibrazioni determinano una variazione del momento dipolare della molecola, allora si ha una vibrazione **IR attiva**.

Quando si ha una tale variazione, infatti, la molecola, vibrando, produce un campo elettrico oscillante: ciò rende possibile lo scambio di energia con le onde elettromagnetiche.

L'intensità di una banda dipende dal valore del momento dipolare del legame a cui si riferisce:

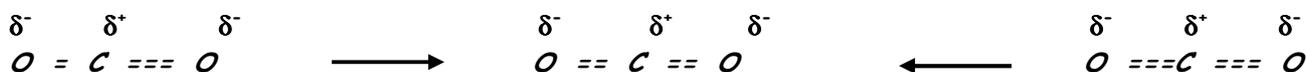


L'intensità di una banda dipende dall'elettronegatività relativa degli atomi coinvolti nel legame a cui quella banda si riferisce.

Ora, per capire il concetto di vibrazione IR attiva o inattiva, facciamo riferimento a un sistema più complesso.

Nel caso della CO_2 , che possiede un momento dipolare nullo, lo stiramento simmetrico dei legami carbonilici non porta ad assorbimento nell'IR perché ogni momento dipolare associato ad un legame $C=O$ è annullato dall'altro (la vibrazione simmetrica non distrugge il centro di simmetria del sistema).

Invece lo stiramento asimmetrico comporta la comparsa di un momento dipolare variabile nel tempo, e cioè assorbimento.



stiramento IR attivo
nullo

stiramento IR

Maggiore è la variazione del momento dipolare, maggiore è l'assorbimento.

Lo spettro IR, ottenuto diagrammando l'intensità dell'assorbimento in funzione della lunghezza d'onda, sebbene sia riferito alla molecola nella sua interezza, **è caratterizzato da dei picchi riferibili a gruppi funzionali specifici, facenti parte della sua struttura.**

È proprio grazie alla riproducibilità di questi picchi, e soprattutto dei valori caratteristici di assorbimento, che noi siamo in grado di risalire alla struttura della molecola in esame.

VANTAGGI:

- fornisce per ciascun composto esaminato una complessa e caratteristica impronta digitale;

- avendo a disposizione uno standard del composto, un controllo computerizzato dello strumento IR permette la perfetta sovrapposizione delle impronte digitali e il riconoscimento certo del composto.

LIMITI:

- usata raramente nella tecnica quantitativa a causa della difficoltà nella preparazione del campione e della complessità dello spettro;
- identifica solo impurezze grossolane;
- la preparazione del campione richiede un certo grado di abilità (pasticche di KBr);
- la manipolazione del campione può avere effetto sullo spettro e rendere la tecnica non del tutto riproducibile.

TEORIA DELL'ASSORBIMENTO IR

Abbiamo a nostra disposizione una legge che ci permette di prevedere la frequenza alla quale un certo gruppo funzionale presente nella molecola assorbirà, e questa è la **LEGGE DI HOOKE**.

In questo caso *due atomi legati fra loro sono considerati come un semplice oscillatore armonico*, rappresentato da due masse legate da una molla:



Una volta messa in moto, la sfera oscillerà, o vibrerà avanti e indietro sulla molla, ad una certa frequenza, a seconda delle masse delle sfere e della rigidità della molla.

- sfere piccole sono più facili da muovere, quindi più piccole sono le masse, maggiore è la frequenza alla quale oscillano
- più rigida è la molla, maggiore sarà la frequenza alla quale si ha l'oscillazione

Ciò significa che, in una molecola organica:

- oscillatori costituiti da masse piccole oscillano a frequenze più alte
- atomi uniti da un legame singolo vibrano a frequenze più basse rispetto a quelli uniti da legami doppi o tripli

Quando un oggetto vibra ad una determinata frequenza ed incontra un'altra vibrazione esattamente della stessa frequenza, l'oscillatore assorbe questa energia. A qualsiasi temperatura sopra lo zero assoluto, tutti i piccoli e semplici oscillatori armonici che formano qualsiasi molecola vibrano intensamente, con una frequenza di oscillazione caratteristica. La luce degli infrarossi si trova sulla stessa frequenza della molecola vibrante. Se viene colpita una molecola vibrante con luce IR, la molecola stessa assorbirà le frequenze della luce che si combinano esattamente con le frequenze dei diversi oscillatori armonici che formano quella molecola. Quando questa luce viene assorbita, i piccoli

oscillatori nella molecola continueranno a vibrare alla stessa frequenza ma poiché hanno assorbito l'energia della luce, avranno una maggiore ampiezza di vibrazione. La "molla" si allungherà di più rispetto a come era prima di assorbire la luce. La luce residua, non assorbita da alcun oscillatore all'interno della molecola, viene trasmessa ad un rivelatore tramite il campione ed un computer analizzerà la luce trasmessa e determinerà quali frequenze sono state assorbite.

Secondo la legge di Hooke :

$$V_{vibr} = \frac{1}{2\pi c} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

con:

vibr = *n° d'onda*
 c = *velocità della luce*
 k = *costante di forza*

$$\mu = \frac{M_1 \cdot M_2}{M_1 + M_2} = \textit{massa ridotta}$$

Possiamo quindi dire che:

MAGGIORE È LA COSTANTE DI FORZA K, MAGGIORE È LA FREQUENZA DI ASSORBIMENTO

MAGGIORE È LA MASSA RIDOTTA, MINORE È LA FREQUENZA

Su questa affermazione bisogna fare però attenzione; per esempio, un paragone basato sulle masse atomiche del gruppo C-H con i gruppi F-H potrebbe portare a dire che la frequenza di stretching del legame F-H possa essere inferiore rispetto a quella del legame C-H.

Tuttavia, l'aumento della costante di forza k (che aumenta spostandosi da sinistra a destra lungo le prime due righe della tavola periodica) ha un effetto maggiore rispetto all'incremento della massa: è per questo che il gruppo F-H assorbe a una frequenza più alta rispetto al gruppo C-H

Quando due oscillatori condividono un atomo comune (come nel caso della CO₂) quella che si ha è un'interazione meccanica fra i due oscillatori.

Si avranno così due vibrazioni di stretching fondamentali, simmetrico e asimmetrico.

Lo **stretching simmetrico** consiste in uno stiramento e una contrazione in fase: questo non determina una variazione del momento dipolare dell'oscillatore e quindi genera una vibrazione IR inattiva.

Lo **stretching asimmetrico** consiste in due stiramenti fuori fase (un legame si stira mentre l'altro si contrae): questo determina una variazione del momento dipolare e quindi genera una vibrazione IR attiva, determinando una variazione della frequenza di assorbimento dell'oscillatore rispetto a quella del semplice gruppo C=O.

Stesso discorso vale per le vibrazioni di **bending**.

LE VIBRAZIONI DELLE MOLECOLE

Consideriamo una molecola generica costituita da n atomi.

Per definire in modo completo il movimento nello spazio compiuto da ogni singolo atomo della molecola si fa riferimento alle tre coordinate dello spazio: x, y, z .

In altre parole ciò equivale a dire che **ogni atomo possiede TRE GRADI DI LIBERTÀ** (3 coordinate per definire la sua posizione).

Di conseguenza, il numero di gradi di libertà posseduti dall'intera molecola è uguale a $3n$, e in questo valore vengono compresi tutti i possibili movimenti della molecola: traslazioni, rotazioni e vibrazioni.

I movimenti traslazionali riguardano la molecola nel suo complesso, intesa come un corpo rigido, e possono essere descritti con il movimento del baricentro lungo le tre coordinate: la molecola avrà quindi **tre gradi di libertà traslazionali**.

Anche i movimenti rotazionali possono avvenire intorno ai tre assi cartesiani, per cui si hanno anche **tre gradi di libertà rotazionali**, che *nel caso di molecole lineari si riducono a due* perché la molecola è bidimensionale.

I **gradi di libertà vibrazionali** si ricavano invece per differenza dai gradi di libertà totali $3n$, così:

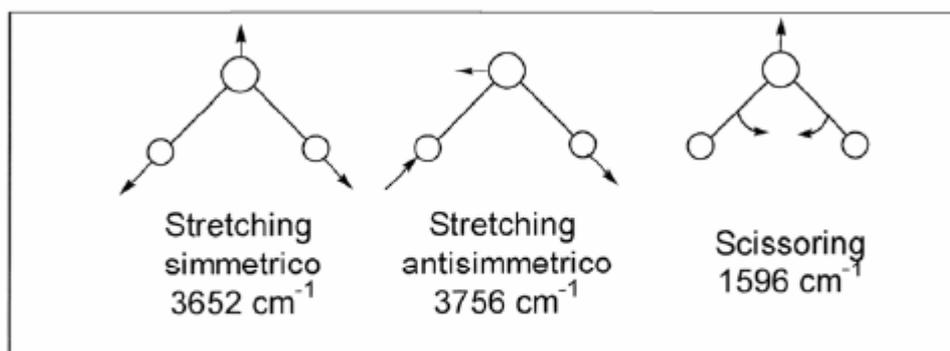
GRADI DI LIBERTÀ TOTALI - [GRADI LIBERTÀ TRASLAZIONALI + GRADI DI LIBERTÀ ROTAZIONALI]

GRADI DI LIBERTÀ VIBRAZIONALI molecole non lineari = $[3n - (3+3)]$

GRADI DI LIBERTÀ VIBRAZIONALI molecole lineari = $[3n - (3+2)]$

Abbiamo così che nel caso di una molecola non lineare come H_2O ($n = 3$) si hanno:

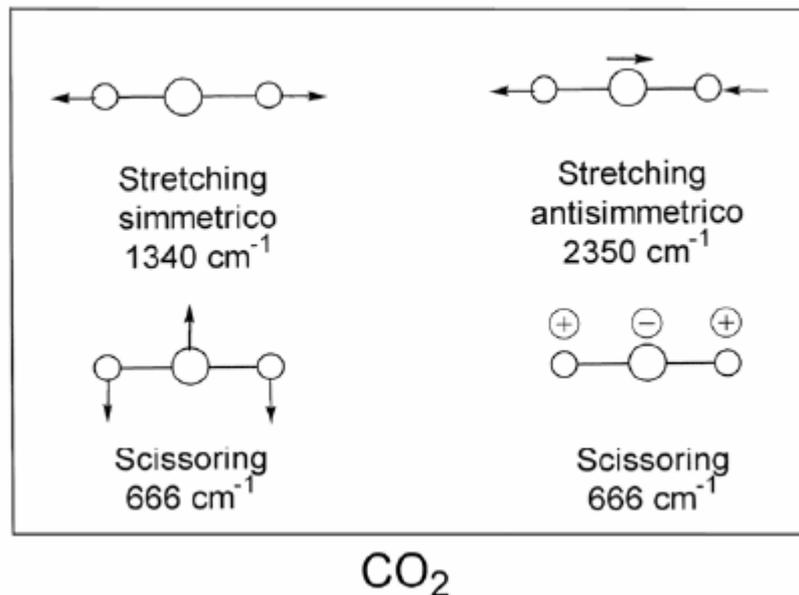
- $(3 \cdot 3) = 9$ gradi di libertà totali
- 3 gradi di libertà rotazionali
- 3 gradi di libertà traslazionali
- $[9 - (2+3)] = 3$ gradi di libertà vibrazionali



H_2O

Nel caso di una molecola lineare come CO_2 il discorso, come abbiamo visto, è leggermente diverso; infatti anche se $n = 3$ abbiamo:

- $(3 \cdot 3) = 9$ gradi di libertà totali
- 2 gradi di libertà rotazionali
- 3 gradi di libertà traslazionali
- $[9 - (2+3)] = 4$ gradi di libertà vibrazionali



In questo caso:

- 1) la vibrazione di stretching simmetrica non è IR attiva poiché non determina alcuna variazione del momento dipolare della molecola;
- 2) la vibrazione di stretching asimmetrica è IR attiva poiché determina variazione del momento dipolare della molecola ;
- 3) le vibrazioni di bending sono equivalenti, hanno la stessa frequenza e si dice che sono doppiamente **degeri**.

FATTORI CHE MODIFICANO IL NUMERO TEORICO DELLE VIBRAZIONI FONDAMENTALI

In realtà il numero teorico di vibrazioni fondamentali sarà raramente osservato nello spettro, e questo perché vi sono fattori che fanno aumentare o diminuire il numero delle bande.

Il numero teorico delle bande verrà ridotto dai seguenti fenomeni:

- frequenze fondamentali che cadono al di fuori della zona $4.000 - 400 \text{ cm}^{-1}$;

- frequenze fondamentali che sono troppo deboli per poter essere osservate;
- vibrazioni fondamentali che sono così vicine da confondersi (coalescenza);
- il manifestarsi di una banda degenera provocata da diversi assorbimenti della stessa frequenza in molecole molto simmetriche;
- l'incapacità di alcune vibrazioni fondamentali di apparire nell'IR, dovuta alla mancanza di variazione del momento dipolare.

Il numero teorico delle bande verrà invece aumentato dai seguenti fenomeni:

- ➔ overtone (armoniche, cioè multipli di una data frequenza)
- ➔ toni di combinazione (somma di due vibrazioni)

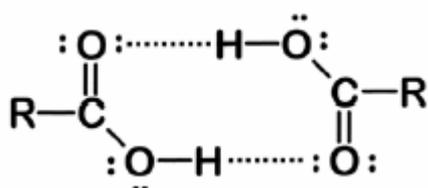
FATTORI CHE INFLUENZANO LA FREQUENZA DI ASSORBIMENTO

Torniamo ora alla legge di Hooke: abbiamo detto che questa relazione ci permette di conoscere la frequenza alla quale assorbirà un oscillatore di tipo X - Y.

Tuttavia i valori ottenuti in questa maniera sono poco attendibili, e questo perché non si tiene conto né delle interazioni accoppiate, né dell'intorno dei due atomi nell'ambito della molecola.

Analizziamo alcuni fattori che determinano una variazione del valore della frequenza di assorbimento di un gruppo rispetto al valore teorico:

ASSOCIAZIONE MOLECOLARE



Le molecole all'interno di un campione possono instaurare dei legami fra di loro, e in particolare possono formare dei *legami idrogeno*, sia intermolecolari (come accade nel caso degli acidi carbossilici), sia intramolecolari.

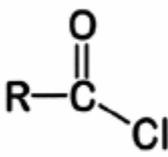
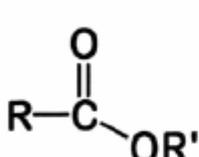
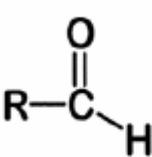
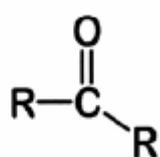
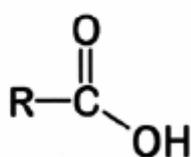
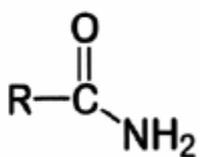
Il legame idrogeno si forma in qualsiasi sistema contenente un gruppo donatore di protoni (X-H) e un gruppo accettore.

- ➔ Gruppi donatori: carbossili, ossidrili, ammine ammidi
- ➔ Gruppi accettori: ossigeno, azoto, alogeni

Il legame idrogeno modifica la costante di forza di entrambi i gruppi, perciò vengono alterate le frequenze di vibrazione sia dello stretching che del bending; più precisamente si osserva un generale spostamento delle frequenze verso valori più bassi, cosa che porta a bande più intense e allargate.

La frequenza di assorbimento di un gruppo funzionale dipende soprattutto dall'intorno che si trova da affrontare; la presenza di gruppi elettrondonatori o elettronattrattori (gruppi che richiamano elettroni attraverso i legami chimici) la influenza notevolmente.

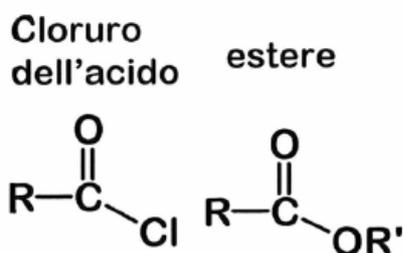
Consideriamo la serie del gruppo C=O, prendendo come valore di riferimento 1715 cm⁻¹, il valore di assorbimento del carbonile chetonico:

Cloruro dell'acido	estere	aldeide	chetone	Acido carbossilico	ammide
					
1800	1735	1725	1715	1710	1690

Si può osservare che:

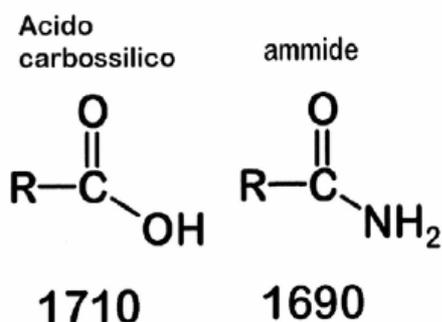
- l'effetto induttivo riduce la lunghezza del legame C=O: aumenta la costante di forza e la frequenza di assorbimento
- l'effetto di risonanza aumenta la lunghezza del legame C=O e riduce la frequenza

In particolare:



In entrambi i casi prevale l'effetto induttivo, e quindi ciò riduce la lunghezza del legame C=O.

Il cloro però è un atomo più grande dell'O, e questo fa sì che il rapporto di massa sia minore, e sappiamo che secondo la legge di Hooke, minore è la massa, maggiore è la frequenza di assorbimento.



In entrambi i casi prevale l'effetto di risonanza.

La separazione di carica fa perdere la natura di doppio legame e questo fa diminuire il valore della costante di forza e diminuire la frequenza di assorbimento.

Nel caso dell'acido però si ha una carica positiva sull'ossigeno, che mal tollera una carenza di elettroni; questo farebbe prevalere la natura di doppio legame, determinando un aumento della costante di forza e quindi della frequenza di assorbimento.

LO SPETTRO IR

Lo spettro infrarosso si presenta come una sequenza di bande di assorbimento registrate in funzione della lunghezza d'onda (o del numero d'onda).

Nel caso di composti in fase gassosa le bande appaiono di solito alquanto complesse in quanto prodotte da transizioni vibro-rotazionali delle molecola (sono però di difficile interpretazione).

Questo non accade in fase solida e praticamente neanche in liquida perché le molecole si urtano prima di aver compiuto una rotazione completa e gli spettri si presentano relativamente più semplici.

I parametri che caratterizzano una banda di assorbimento IR sono:

POSIZIONE

La posizione di una banda viene indicata con la sua λ_{\max} (in micrometri, μm) o più spesso in numero d'onda ν (cm^{-1})

La ν_{\max} (e quindi la λ_{\max}) dipende dalla costante di forza del legame interessato: più è rigido il legame, tanto maggiore è l'energia necessaria per amplificare le vibrazioni.

INTENSITÀ

L'intensità dell'assorbimento (cioè l'altezza del picco) dipende strettamente dalla variazione del momento dipolare: così il carbonile, che possiede un forte momento dipolare in grado di variare in modo sensibile, fornisce di solito bande molto intense.

Al contrario, il doppio legame di una molecola simmetrica come il 2-butene ($\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH}_3$) non assorbirà del tutto, dato che in questo caso il momento dipolare è addirittura assente né può generarsi durante la vibrazione.

È dunque consuetudine classificare le bande in:

- forti (*strong*): s
- medie (*medium*): m
- deboli (*weak*): w

FORMA

La forma delle bande IR possono essere di due tipi:

- stretta (*sharp*)
- larga (*broad*)

Da notare che la forma può risentire dell'unità scelta per la registrazione: lunghezza d'onda o numero d'onda.

Suddivisione dello spettro infrarosso in una serie di regioni

Solitamente i limiti dello spettro IR vanno da 4000 a 400 cm^{-1} di numero d'onda, tuttavia la regione dell'infrarosso si estende anche oltre.

Le bande osservabili al di sopra dei 4000 cm^{-1} sono dette *bande di overtones*. Si chiamano overtones proprio perché risuonano al di fuori del campo specifico dell'infrarosso e saranno sempre dei multipli di altre bande caratteristiche.

In generale lo stretching si trova a numeri d'onda più elevati del bending

<p>Zona tra 4000 - 2700 cm^{-1} X - H</p>	<p>Qui si trovano gli assorbimenti relativi agli stiramenti dei legami X-H che assorbono ad un numero d'onda così elevato a causa della piccola massa dell'idrogeno che influenza la massa ridotta (μ) dell'intero sistema.</p> <p>X può essere C, Si, O, N.</p> <p>Per localizzare con precisione un particolare X-H in questa zona bisogna tener conto che per masse atomiche progressivamente crescenti la banda di assorbimento viene spostata verso numeri d'onda minori, e che quanto più intensa è la forza fra 2 atomi, tanto più elevata è la frequenza di vibrazione.</p>
<p>Zona tra 2500 e 2000 cm^{-1} $C \equiv C$, $C \equiv N$</p>	<p>Qui si trovano gli assorbimenti relativi agli stiramenti dei legami tripli. Essi assorbono, quindi, a numeri d'onda più alti rispetto ad un legame doppio o semplice: ciò in virtù del fatto che l'energia di legame, e dunque la k relativa a un triplo legame, risulta essere superiore rispetto a quella di un doppio legame o un singolo legame.</p> <p>In questa zona possiamo trovare picchi relativi a $C \equiv C$ (alchini), $C \equiv N$ (nitrili), $C=O$ (monossido di carbonio 2140 cm^{-1}).</p>
<p>Zona tra 1900 e 1600 cm^{-1} legami doppi</p>	<p>Qui si trovano gli assorbimenti relativi agli stiramenti dei legami doppi. Prendendo in considerazione il caso di un doppio legame ($C=C$) si può notare come non vi sia un'eccessiva differenza di elettronegatività tra i due atomi di C. Questo, però, non implicherà l'assenza del momento dipolare in quanto la coppia di elettroni, ridistribuendosi, può generare campi elettrici oscillanti.</p> <p>Tutti gli altri casi che rientrano in tale range sono caratterizzati da una forte variazione del momento dipolare. Per via di queste variazioni tale zona è caratterizzata da picchi molto intensi quindi facili da interpretare.</p>
<p>Zona da 1500 a 1200 cm^{-1} legami singoli</p>	<p>Qui si trovano gli assorbimenti relativi agli stiramenti di gruppi funzionali tipo: C-O, C-N, C-C.</p> <p>Questi ultimi sono difficili da interpretare e spesso entrano in risonanza con il resto della molecola dando origine a bande complesse.</p> <p>Molti altri gruppi tra i quali quelli del tipo X-Y, a legame semplice, cadono in regioni dello spettro infrarosso alquanto caotiche ed è per questo motivo che le</p>

	<p>loro bande di assorbimento non sono facilmente identificabili.</p> <p>Questi assorbimenti cadono nella regione al di sotto di 1500 cm^{-1} detta "dell'impronta digitale" (zona non interpretabile, ma attribuibile per confronto se lo spettro è sovrapponibile a quello di una sostanza nota). Le bande che si evidenziano sono dovute ai moti vibrazionali della molecola nel suo insieme, portando ad un assorbimento caratteristico per ogni diverso composto: per questo motivo quella zona dello spettro viene chiamata "zona delle impronte digitali".</p> <p>Tuttavia alcuni picchi caratteristici come nel caso $C-O$ e $C\equiv N$ per la loro intensità saranno facilmente riconoscibili.</p>
<p>Zona < 1200 cm^{-1}</p>	<p>Al di sotto dei 1200 cm^{-1} è possibile identificare i legami $C-X$ ($X =$ alogeno) che hanno numeri d'onda molto bassi perché, ad eccezione del fluoro, gli alogeni sono degli atomi molto grandi.</p> <p>Inoltre, a causa della forte differenza di elettronegatività, esistente fra i due atomi il momento dipolare tra un C e un alogeno è particolarmente elevato e, quindi, è possibile osservare una banda molto intensa.</p>

ZONE DI ASSORBIMENTO DI ALCUNI GRUPPI FUNZIONALI

$3600 - 3000\text{ cm}^{-1}$ $3530 - 3060\text{ cm}^{-1}$ H	} zone degli stiramenti X-	bande caratteristiche dell'O-H
$3200 - 3000\text{ cm}^{-1}$ 2720 cm^{-1}		bande caratteristiche dell'N-H
$2260 - 2240\text{ cm}^{-1}$ $2260 - 2100\text{ cm}^{-1}$		stiramenti dei legami C-H (tripli, doppi, singoli) assorbimento aldeidi (C-H) assorbimento nitrile (C≡N) assorbimento alchini (C≡C)
$2000/1800 - 1650\text{ cm}^{-1}$		dita dell'aromatico
$1850 - 1700\text{ cm}^{-1}$		stiramento dei carbonili (C=O)
intorno a 1600 cm^{-1}		stiramento dello ione carbossilato
$1660 - 1640\text{ cm}^{-1}$		C=C non coniugato e non aromatico
$1680 - 1630\text{ cm}^{-1}$		stretching -C-O-R
$1200 - 1100\text{ cm}^{-1}$		stretching C-O-R

BANDE CARATTERISTICHE DELL'O-H ($3600 - 3000\text{ cm}^{-1}$)

La regione dell'O-H è quella che raggiunge numeri d'onda più elevati.
L'O-H genera una banda molto intensa e slargata che è facilmente riconoscibile.

Poiché questa banda si genera ogni qualvolta sia presente un gruppo O-H è necessario considerare alcuni problemi riscontrabili nell'analisi di uno spettro. Infatti anche nel caso di molecole che non presentino gruppi ossidrilici è possibile riscontrare la presenza di bande relative all'O-H: ciò si determina a causa di possibili contaminazioni del campione dovute alla presenza di H₂O che ritroviamo anche come umidità atmosferica.

Un altro problema è rappresentato dalla CO₂ che determina la formazione di 2 bande di cui una rientra nella zona dell'impronta digitale, l'altra cade in una regione interpretabile e potrebbe comportare problemi nella lettura dello spettro. È perciò necessario adottare alcuni accorgimenti per evitare che nel sistema ci siano tracce di H₂O o di CO₂; ad esempio riempiendo lo spettrometro di gas inerte oppure filtrando l'aria, ecc.

BANDE CARATTERISTICHE DELL'N-H (3530 - 3060 cm⁻¹)

La banda dell'N-H si trova a lunghezza d'onda simile a quella del O-H.

STIRAMENTI DEI LEGAMI C-H (tripli, doppi, singoli) (3200 - 3000 cm⁻¹)

Nella zona relativa agli stiramenti C-H è possibile distinguere il legame di un alchino terminale (\equiv C-H) da quello di un alchene (=C-H), di un aromatico(\approx C-H) o anche di un semplice alcano (-C-H).

Se ad esempio prendiamo in considerazione un alchene a lunga catena, ci aspetteremo di trovare gli stretching del carbonio ibridato sp² e quello del carbonio ibridato sp³.

Nel caso di un alchino avremo la sovrapposizione dell'orbitale p del carbonio con l'orbitale s dell'idrogeno.

Considerando la natura del legame C \equiv C esso è caratterizzato da una ibridazione di tipo sp e dunque, poiché l'orbitale s è di geometria sferica, a differenza dell'orbitale p che presenta una simmetria bilobale direzionale allungata, esso risulta essere più corto e dunque più forte (cioè con energia di legame superiore) rispetto a quello di un C-C ibridato sp³ e di un C=C ibridato sp².

Quindi, poiché k e v sono direttamente proporzionali, il numero d'onda a cui cadrà un picco relativo ad un \equiv C-H di un alchino terminale assumerà valori più elevati.

ASSORBIMENTO ALDEIDI (C-H, 2720 cm⁻¹)

Il C-H dell'aldeide è un legame un po' più debole di quello che ci si aspetterebbe, infatti risuona a un numero d'onda di 2720 cm⁻¹.

ASSORBIMENTO NITRILE (2260 - 2240 cm⁻¹, C \equiv N), ASSORBIMENTO ALCHINI (2260 - 2100 cm⁻¹, C \equiv C)

Per i tripli legami possiamo avere 2 casi: gli alchini e i nitrili.

Questi ultimi danno bande più intense rispetto ai primi per la presenza dell'azoto.

Gli alchini sono difficili da osservare se interni.

Se consideriamo, ad esempio, il 2-butino, notiamo che la molecola è simmetrica rispetto al $C\equiv C$ e anche se la nube π dà un effetto di variazione del momento dipolare, tale fenomeno non è rilevante.

Per un alchino terminale, poiché non c'è simmetria rispetto a $C\equiv C$, la banda relativa allo stretching è più facile da rilevare.

ZONA DELL'AROMATICO (2000/1800 - 1650 cm^{-1})

Poiché la zona 2000 - 1800 cm^{-1} è abbastanza sgombra sono facilmente visibili le cosiddette DITA DELL'AROMATICO, costituite da 2, 3 bande.

Queste sono bande multiple di altre presenti a 1000 o a 500 e sono relative a vibrazioni di scheletro C-C.

STIRAMENTO DEI CARBONILI (1850 - 1700 cm^{-1} , C=O)

Intorno a 1850 - 1700 cm^{-1} troviamo la banda dei carbonili (C=O) che è molto evidente.

Poiché questo gruppo funzionale è caratteristico di molte molecole, per determinare l'esatta natura del composto è necessario considerare delle "bande d'appoggio". Ad esempio il C-H a 2700 cm^{-1} per le aldeidi, il C-O a 1200 cm^{-1} per l'estere, l'O-H a 3330 cm^{-1} per l'acido carbossilico, ecc.



Il carbossilato è caratterizzato da un ν più basso rispetto alla zona 1850 - 1700 cm^{-1} , giacché la massa è sempre la stessa rispetto ad un acido o ad un estere (che invece si trovano a circa 1700) ciò che varia è la forza del legame e questo indica che il C=O in tal caso è più debole.

Ciò accade perché è possibile scrivere due strutture di risonanza equivalenti: dunque avremo un ordine di legame 1,5 e quindi inferiore a 2.

In generale la forza di legame del carbonile è influenzata dal sostituente legato al C, infatti esso può avere un effetto induttivo, che ne riduce la lunghezza aumentando così la sua k e la frequenza di assorbimento, e un effetto coniugativo o di risonanza che aumenta la lunghezza del legame e ne riduce la frequenza di assorbimento.

TABELLA A: ASSORBIMENTI PER IL CARBONILE IN VARI COMPOSTI R - C - G

Effetto induttivo predominante del sostituente G	
G	ν C=O (cm^{-1})
Cl	1815 - 1785
F	~1869
Br	1812
OH (monomero)	1760
OR	1750 - 1735
Effetto di risonanza predominante del sostituente G	
G	ν C=O (cm^{-1})
NH ₂	1695 - 1650
SR	1720 - 1690

Fra i 1630 - 1680, un po' al di sotto dei carbonili, troviamo i C=C non coniugati e non aromatici. Al di sotto dei 1200 abbiamo poi quelle zone di difficile interpretazione.

STRUMENTAZIONE

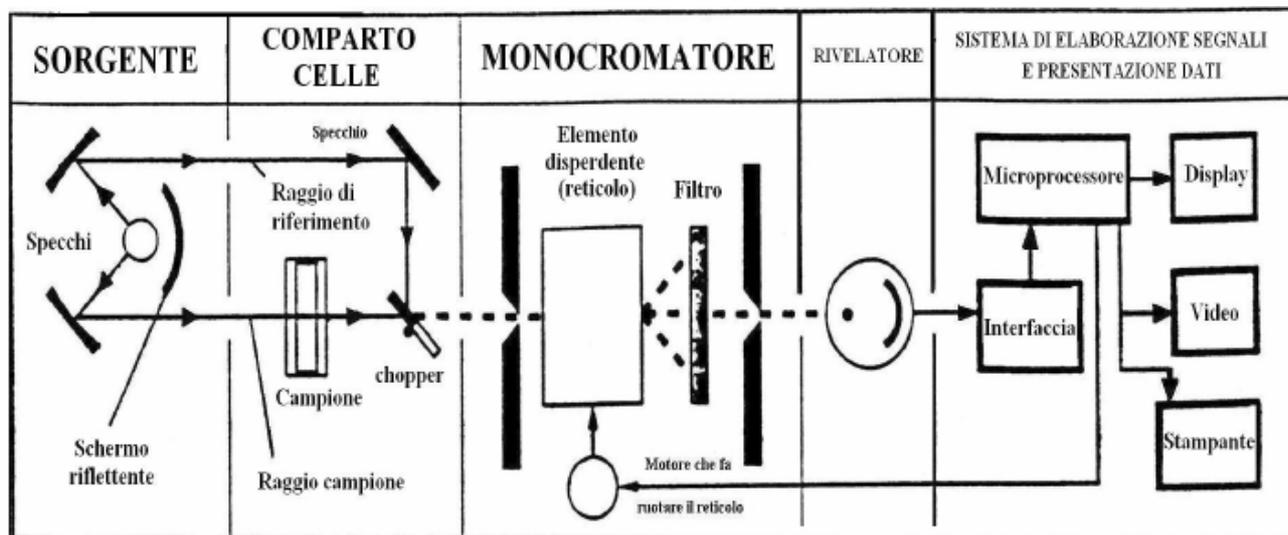
I dispositivi strumentali oggi a nostra disposizione per ottenere spettri nel medio e lontano IR (lo studio e le applicazioni del vicino infrarosso sono relativamente recenti) sono sostanzialmente di due tipi:

- SPETTROFOTOMETRI A DISPERSIONE
- SPETTROFOTOMETRI A INTERFERENZA

I primi sono senz'altro quelli maggiormente diffusi nei moderni laboratori, soprattutto per motivi di costo; i secondi offrono invece prestazioni senz'altro superiori ma i costi sono decisamente più elevati.

L'intervallo di lunghezze d'onda coperto dagli strumento è generalmente compreso tra **4000 e 625 cm^{-1}** , corrispondente al *medio IR*, ma sono anche molto diffusi quelli con intervallo spettrale esteso verso λ più elevate, fino a **400 e 200 cm^{-1}** , che include anche il *lontano IR*.

SPETTROFOTOMETRIA A DISPERSIONE



SPETTROFOTOMETRO IR A DISPERSIONE

Questi strumenti lavorano per lo più nella configurazione a doppio raggio: un dispositivo (chopper) ripartisce la radiazione continua emessa dalla sorgente in due fasci di uguale intensità.

Uno dei fasci viene fatto passare attraverso il campione, l'altro serve come riferimento ed attraversa di solito l'aria e, nel caso di soluzioni, una cella contenente il solvente puro. Dopo l'azzeramento ottico, i due fasci sono nuovamente riuniti.

Il monocromatore (prisma o reticolo) scompone la radiazione risultante nelle sue componenti spettrali. Queste possono quindi essere analizzate, secondo le varie lunghezze d'onda, dal rivelatore, nel quale è registrata istante per istante la radiazione monocromatica (scansione).

Dopo amplificazione i segnali sono espressi, mediante un registratore, sotto forma di spettro. La registrazione di uno spettro richiede mediamente 10 minuti.

In questo strumento il monocromatore di trova a valle del comparto celle in quanto le radiazioni IR hanno energia minore rispetto a quelle UV, ed è quindi necessario sfruttarle al massimo per ottenere uno spettro.

Da notare che se usassimo una radiazione UV non scomposta la sua elevata energia causerebbe la decomposizione del campione.

SORGENTE	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Globalar: filamento di carburo di silicio (richiede eccessiva potenza) ▪ Filamento di Nernst: costituito da una miscela di ossidi fusi (troppo fragile) ▪ Filamento di Nichel-Cromo: il più usato perché poco costoso, resistente e assorbe poca potenza ▪ Filamento di Wolframio: per il vicino IR
SISTEMA FOTOMETRICO	<p>Composto da:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ sistema di specchi + chopper: servono a portare nello stesso cammino i due raggi (riferimento e campione) separatamente ▪ cuneo ottico (o pettine) che, collocato sul raggio di riferimento, assorbe la stessa quantità di energia che il campione assorbe dal raggio che lo attraversa
MONOCROMATORE	<p>Formato essenzialmente da:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ fenditura d'ingresso per la radiazione policromatica ▪ dispositivo di dispersione (reticolo di riflessione), che separa le componenti della radiazione policromatica ▪ dispositivo di focalizzazione (filtro) che preleva dall'insieme delle radiazioni disperse un sottile intervallo di lunghezze d'onda (banda) ▪ fenditura d'uscita <p>I movimenti del reticolo e del filtro consentono di far passare dalla fenditura di uscita, in successione, la sequenza ordinata di tutte le bande che nel loro insieme compongono la radiazione policromatica. Tale movimento realizza la cosiddetta scansione delle lunghezze d'onda.</p>
RIVELATORE	<p>Si tratta del dispositivo in grado di convertire la radiazione termica (IR) in un segnale elettrico, che viene poi inviato al sistema di elaborazione e di registrazione.</p>

Come avviene la registrazione dello spettro?

Come abbiamo detto, il chopper indirizza sul rivelatore il raggio campione ed il raggio di riferimento in maniera alternata (ciò permette di effettuare un confronto continuo fra l'intensità dei due raggi).

Fintantoché tali intensità si mantengono uguali (cioè il campione non assorbe) il rivelatore e il registratore rimangono in equilibrio.

Quando invece l'intensità del raggio campione diminuisce (a seguito del fenomeno di assorbimento) il segnale elettrico generato dal rivelatore, e opportunamente elaborato, muove un motore che insinua un cuneo ottico sul cammino del raggio di riferimento.

L'ampiezza dell'attenuazione operata dal cuneo per equalizzare le intensità dei due raggi è direttamente proporzionale alla variazione di intensità del raggio campione.

L'intensità residua del raggio dopo la variazione viene espressa come percentuale rispetto all'intensità iniziale, e rappresenta la trasmittanza percentuale %T del campione.

L'intera operazione viene effettuata in continuo per tutto l'intervallo spettrale.

SPETTROFOTOMETRIA IN TRASFORMATA DI FOURIER (FT-IR)

Questa tecnica strumentale è basata sulla spettroscopia infrarossa classica. Si tratta di una tecnica recente creata grazie alla computerizzazione del laboratorio strumentale.

Il suo principio di base è rappresentato dalla possibilità di cogliere contemporaneamente tutte le frequenze dello spettro IR nel rivelatore, il che rende superflua la scansione della lunghezza d'onda.

Questo è possibile trasformando, per mezzo di un *interferometro*, la radiazione IR policromatica emessa dalla sorgente (istante per istante con la medesima intensità) in un *interferogramma*, dove l'assorbimento non è più funzione della frequenza, ma del tempo (cioè *si passa da dominio delle frequenze a dominio dei tempi*).

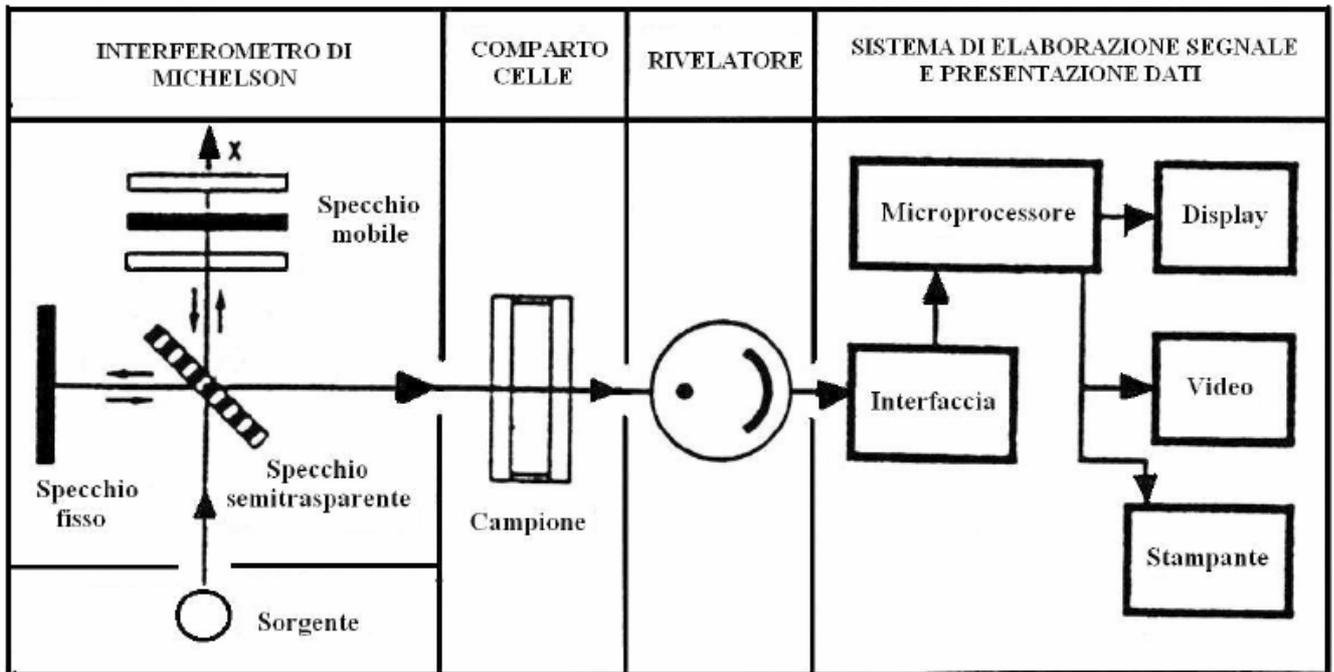
Contrariamente agli spettrofotometri tradizionali, quindi, in questa apparecchiatura non si ha un monocromatore a dispersione, ma viene utilizzato *l'interferometro di Michelson*, il quale produce nel corso di una speciale scansione l'interferogramma della sostanza in esame.

Dopo il passaggio della radiazione così "trattata" attraverso il campione, l'interferogramma viene trasformato dal calcolatore collegato allo strumento in un tradizionale spettro infrarosso mediante un'operazione matematica, la cosiddetta *trasformata di Fourier*.¹ In questa maniera si passa perciò dall'interferogramma, un grafico dello spazio o del tempo, a uno spettro comune, che rappresenta però

¹ Algoritmo di Fourier

$$F(\nu) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) e^{-i(2\pi)\nu t} dt \quad \text{and} \quad f(t) = \int_{-\infty}^{\infty} 2\pi F(\nu) e^{i(2\pi)\nu t} d\nu$$

la variazione dell'intensità del segnale in funzione del numero d'onda (o della lunghezza d'onda) della radiazione.



SPETTROFOTOMETRO IR A TRASFORMATTA DI FOURIER

Una sorgente luminosa ad incandescenza emette un raggio luminoso nel campo dell'IR; tale raggio giunge ad uno specchio semiriflettente (*beamsplitter*, un cristallo di KBr rivestito di Germanio) che lo divide in 50% ad uno specchio fisso ed un 50% allo specchio mobile.

I raggi riflessi da questi specchi sono inviati un'altra volta allo specchio semiriflettente il quale ricongiunge i due raggi e li invia al rivelatore. Anche se i due raggi hanno raggiunto il rivelatore congiunti essi hanno compiuto un diverso *cammino ottico*: a seconda della differenza del cammino ottico dei due raggi si creano delle interferenze costruttive o distruttive che creano un segnale al rivelatore proporzionale alla differenza di cammino ottico dei due raggi e quindi dalla posizione dello specchio mobile in quell'istante.

In base al movimento del suddetto specchio tutte le radiazioni monocromatiche contenute nella luce emessa dalla lampada danno luogo ad un segnale complessivo di interferenza (*interferogramma*) che contiene in sé le informazioni riguardanti la frequenza e l'intensità della radiazione emessa.

La trasformata di Fourier, effettuata dal calcolatore dello strumento una volta che il raggio è arrivato al detector, mostra sullo schermo un tradizionale spettro infrarosso, trasformando il segnale di intensità luminosa in funzione del tempo (spostamento dello specchio) in segnale di intensità in funzione del numero d'onda.

Un requisito fondamentale del FT-IR è quello di ottenere un buon interferogramma, dal quale dipende la precisione dello spettro ottenuto: in altre parole lo specchio mobile deve avere una velocità costante e la sua posizione deve essere nota in maniera esatta in ogni istante. Lo specchio deve inoltre mantenere una planarità costante durante tutto il suo spostamento

VANTAGGI

Rispetto alla tecnica convenzionale la spettroscopia FTIR offre tre vantaggi:

- 1) **Un notevole risparmio di tempo:** siccome la radiazione di tutte le lunghezze d'onda viene registrata contemporaneamente dal rilevatore, il tempo di misura si riduce a pochi secondi rispetto ai 10 minuti circa degli strumenti tradizionali.
- 2) **Un miglior rapporto segnale-rumore:** rispetto alla tecnica a scansione, dove è registrata sempre una sola lunghezza d'onda (mentre tutto il resto va perso in intensità), la potenza complessiva della sorgente di radiazione rimane costantemente disponibile. Al rivelatore arriva dunque una maggiore potenza rispetto agli strumenti a dispersione.
- 3) **Elevata precisione dei numeri d'onda:** è possibile sovrapporre al segnale come standard interno la radiazione monocromatica di una sorgente laser, in cui la frequenza è nota con estrema precisione.
- 4) **Nessun effetto di riscaldamento del campione:** la sorgente è infatti sufficientemente lontana dal campione
- 5) **Possibilità di interfacciare un gascromatografo**
- 6) **Assenza di luce diffusa**

La tecnica FT rende inutile pure la suddivisione delle radiazioni in un raggio di misura ed in uno di riferimento, operazione che è soggetta a disturbi; gli spettrometri FT-IR sono **monoraggio**.

Campione e riferimento sono supportati su una slitta, che li porta entrambi nel cammino ottico uno dopo l'altro (se si fa riferimento all'aria, si lascia semplicemente vuoto il relativo contenitore). Gli spettri sono raccolti e memorizzati separatamente ed infine lo spettro di riferimento (background) viene sottratto numericamente dello spettro del composto.

Grazie alla rapidità della misura FTIR si è resa possibile un'applicazione molto utile al chimico organico: l'accoppiamento fra gascromatografia e spettroscopia IR.

SOLVENTI IN SPETTROFOTOMETRIA IR

Per le analisi spettrofotometriche i campioni diluiti sono molto più utilizzati, poiché è possibile intervenire sia sulla concentrazione che sul cammino ottico della cella in modo da operare nell'intervallo migliore d'assorbanza.

Purtroppo questa tecnica non può essere molto utilizzata nell'IR poiché non esistono solventi organici che siano trasparenti in tutta la regione dello spettro IR, perciò vengono utilizzate, sia per i campioni liquidi che per quelli solidi, tecniche che a volte possono complicare la determinazione accurata del campione.

I solventi organici più utilizzati per analisi IR sono il **tetracloruro di carbonio**, il **cloroformio**, il **solfo di carbonio**. Per i liquidi spesso non esiste un solvente opportuno perciò si è costretti ad eseguire l'analisi sul liquido puro.

SOLVENTI	ZONA SPETTRALE ESENTE DA BANDE	TOSSICITÀ
CCl ₄	625 - 4000 cm ⁻¹	+++
CHCl ₃	1300 - 4000 cm ⁻¹	++
CS ₂	625 - 1330 cm ⁻¹	+++
n-eptano	1000 - 625 cm ⁻¹	++
CCl ₂ FClF ₂ (Freon 113)	1300 - 4000 cm ⁻¹	+

MATERIALI IMPIEGATI IN SPETTROFOTOMETRIA IR

MATERIALE	PROPRIETÀ
NaCl	È il materiale più diffuso ed economico
KBr	È trasparente in un intervallo spettrale più ampio. È più igroscopico del cloruro di sodio ma più resistente
CsI	Ha un intervallo spettrale di uso ancora più ampio. È resistente ma molto igroscopico e soffice; inoltre si graffia facilmente. Reagisce con molte sostanze organiche
CaF₂	È molto duro, stabile e poco igroscopico. Ha un intervallo spettrale ristretto.
AgBr	È insolubile in acqua, e si usa per analisi in soluzione acquosa. È fragile e tende a scurirsi per effetto della luce UV
ZnS / ZnSe	Sono duri, insolubili in acqua e hanno un elevato indice di rifrazione. Sono utilizzati nelle analisi di riflettanza insieme ad una miscela di Sali di tellio (TII e TIBr), miscela chiamata KRS-5. Questa miscela è molto solubile in acqua e nelle basi, ma non negli acidi. Ha anch'essa un elevato indice di rifrazione.

PREPARAZIONE DI UN CAMPIONE

Per registrare uno spettro IR è necessario collocare il campione lungo il percorso del raggio di analisi, ma i dispositivi per fare ciò sono ovviamente diversi a seconda che i campioni siano solidi, liquidi o gassosi.

Preparazione di un campione solido

I solidi spesso non sono solubili nei comuni solventi usati per l'infrarosso, o comunque i solventi impiegati in genere causano interferenze con l'analisi.

I campioni perciò si preparano in maniera alternativa; si può quindi preparare:

- una sospensione del campione in fase liquida
- una dispersione del campione in fase solida

1) **Sospensione in olio:** circa 1mg di sostanze solida con alcune gocce di OLIO DI PARAFFINA (per esempio) è macinato finemente in un mortaio di agata. La pasta che ne risulta viene messa fra 2 lastre di NaCl in modo da ottenere un film uniforme.

Poiché il nujol è un idrocarburo ad alto peso molecolare, viene sostituito con esafluorobutadiene (*fluorolube*, $F_2C=CF-CF=CF_2$) per permettere la misurazione di vibrazioni relative al C-H.

2) **Pastiglie di KBr:** il solido viene macinato e quindi aggiunto al KBr anidro (o altro alogenuro anidro come KBr, NaCl o CsI), da 10 a 100 volte il suo peso in un mortaio di agata ed infine compresso sottovuoto con una pressa idraulica fino ad ottenere una pastiglia omogenea. Si usa il KBr poiché risulta completamente trasparente all'IR.

Preparazione di un campione liquido

La preparazione del campione dipende dal fatto che ci si debba riferire a liquidi puri o a soluzioni.

Nel caso di **liquidi puri**, una goccia di liquido si pone fra due lastre piane di NaCl (trasparente tra 4000 e 667 cm^{-1}).

Se il liquido risulta essere corrosivo vengono utilizzate pastiglie di AgCl (più costose).

Nel caso di **soluzioni**, l' H_2O non sarà un solvente adatto poiché potrebbe creare grossi problemi di corretta lettura dello spettro.

Gli alcoli, i chetoni (acetone), i solventi alogenati (cloroformio, diclorometano...) sono tutti solventi che provocano interferenze evidenti: nel caso degli alcoli oltre all'O-H avremo anche bande relative al C-H, nei chetoni abbiamo i C=O.

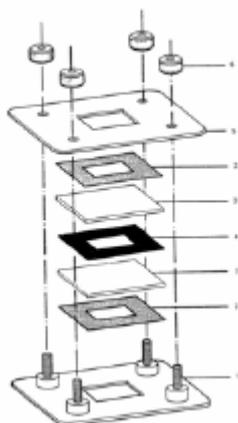
Il $C-Cl_4$ potrebbe essere utilizzato (o al massimo il $CHCl_3$), tuttavia avremo fra 700 - 800 (fascia relativa ai C-Cl) una forte interferenza determinata dal fatto di avere una maggiore quantità di solvente rispetto alle molecole di soluto.

In questi casi si effettuano due spettri: uno relativo al solvente e uno alla soluzione, poi si interfacciano i due spettri in modo tale che la maggior parte delle bande relative al solvente vengano sottratte allo spettro della soluzione.

Più precisamente i metodi sono:

- preparazione di un film sottile (se la sostanza è un polimero plastico)
- soluzione in un solvente
- sospensione in un liquido viscoso
- vaporizzazione in cella (se ha un p.e. basso)

Il campione può essere preparato sciogliendolo in un opportuno solvente, ma in genere si effettua l'espansione in celle sotto vuoto, dopo aver preventivamente essiccato lo stesso gas.



I campioni sia liquidi che solidi per essere alloggiati nello strumento hanno bisogno di essere prima messi in un'apposita cella smontabile.

Il campione viene posto fra due finestre di un alogenuro alcalino (NaCl, KBr), e tali finestre necessitano di essere conservate in essiccatori perché non assorbano umidità.

La finestra contenente il campione viene poi alloggiata nella cella smontabile: le più sofisticate sono corredate anche di appositi spessori per variare lo spazio di riempimento della finestra.

Le finestre avranno forme diverse a seconda del tipo di campione che devono ospitare:

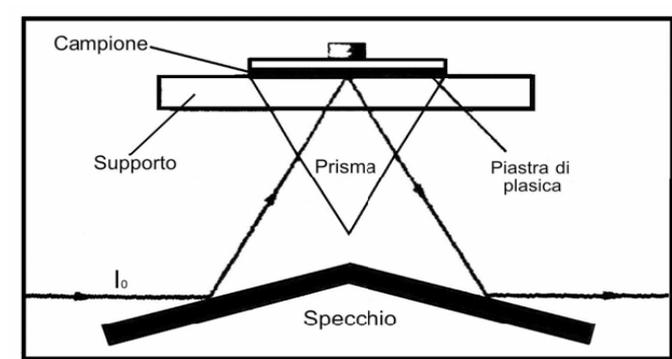
- ➔ celle rettangolari vengono impiegati se il campione è una soluzione o un liquido poco viscoso
- ➔ celle rotonde vengono impiegate se il campione è una soluzione o un liquido molto viscoso

ANALISI IN RIFLETTANZA

Quando si desidera registrare lo spettro IR di una sostanza opaca, è possibile eseguire una tecnica che non prevede l'attraversamento del campione da parte della radiazione. In questo caso, infatti, vengono impiegati degli apparecchi il cui funzionamento è basato sul fenomeno della riflessione: quella che conduciamo è un'analisi in riflettanza.

Le tecniche a nostra disposizione sono diverse:

ANALISI IN RIFLETTANZA ATTENUATA TOTALE (ATR)



La sostanza viene deposta in polvere al di sopra di un prisma costituito da un materiale ad elevato indice di rifrazione per tutte le radiazioni infrarosse (AgCl o KRS-5, una miscela di bromuri e ioduri di tallio). Ad ogni riflessione il raggio penetra per qualche frazione di micron nella sostanza, venendone in piccola parte assorbito (o *attenuato*). Dopo alcune riflessioni (9-10, ma anche 25 con i sistemi ottici più complessi) la diminuzione dell'intensità del raggio è sufficiente per essere rilevata dallo spettrofotometro, dando *uno spettro IR in Riflettanza Totale Attenuata (ATR)*.

La tecnica ATR però determina uno spostamento delle lunghezze d'onda di assorbimento e una certa distorsione delle bande; di conseguenza per l'interpretazione qualitativa degli spettri bisogna fare riferimento a cataloghi registrati in ATR. Inoltre gli spettri delle sostanze sono confrontabili solo se registrati con lo stesso angolo di incidenza.

Capitolo 2

La spettroscopia NMR

2.1 Introduzione

La Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) è una tecnica strumentale che consente di conoscere proprietà a livello sub-molecolare di materiali di varia natura, tramite lo studio dell'interazione tra il materiale in esame e un campo magnetico in cui il materiale stesso viene immerso. Il fenomeno su cui si basa è stato scoperto dai fisici Felix Bloch e Edward Purcell nel 1946 e da allora questa tecnica ha conosciuto continue evoluzioni sia teoriche che sperimentali. Nonostante il primo esperimento NMR sia stato effettuato su un campione di paraffina allo stato solido, negli anni successivi tutta la ricerca fu rivolta allo sviluppo di tecniche per lo studio di sistemi allo stato liquido. Nei sistemi liquidi la mobilità molecolare è tale da rendere l'interpretazione degli spettri meno complessa. Tuttavia negli anni '70 vennero introdotte tecniche (Rotazione ad angolo magico (MAS); Cross-polarization (CP) e Disaccoppiamento eteronucleare ad alta potenza (DD)) che hanno permesso di ottenere spettri ad alta risoluzione anche in fase solida, dando così nuovo impulso alle applicazioni dell'NMR.

Nel seguito saranno dati alcuni cenni sui principi dell'NMR e sugli esperimenti utilizzati per l'analisi di solidi, con particolare riferimento a quelli sul nucleo di Carbonio 13. Per una trattazione più esauriente di questi argomenti si rimanda a testi monografici (Schmidt-Rohr e Spiess, 1994; AAVV, Ed. Blackwell Science, 2002; Levitt, 2002, Mehring, 1983).

2.2 Principi della risonanza magnetica nucleare

La risonanza magnetica nucleare si basa sull'interazione nucleare fra il momento magnetico di certi nuclei ed un campo magnetico statico.

I nuclei atomici sono costituiti da un insieme di protoni e neutroni, particelle elementari che, così come gli elettroni, sono dotate di momento angolare intrinseco (spin) che da' luogo, quindi, ad un momento magnetico di spin protonico e neutronico. Il numero quantico di spin, o più semplicemente spin, I ,

di un nucleo risulta dalla combinazione degli spin protonici e neutronici secondo le seguenti regole:

1. se il nucleo ha numero pari di neutroni e di protoni, esso ha spin nullo;
2. se il nucleo ha numero pari di neutroni e dispari di protoni o viceversa, esso ha spin semi-intero ($1/2, 3/2, 5/2, \dots$);
3. se il nucleo ha numero dispari di neutroni e di protoni, esso ha spin intero ($1, 2, 3, \dots$).

Ciascun elemento può quindi possedere più di un isotopo con spin nucleare non nullo, ciascuno con la propria abbondanza naturale. Alcuni esempi sono riportati in tabella 2.1.

nucleo	Abbondanza naturale %	I	g_I	γ (rad/sec.gauss)
^1H	99.98	1/2	5.5856912	26753
^{11}B	80.42	3/2	1.792424	8583,343343
^{13}C	1.108	1/2	1.40482	6726,77432
^{14}N	99.63	1	0.4037607	1932,547543
^{15}N	0.37	1/2	- 0.5663784	2710,792313
^{17}O	$3.7 \cdot 10^{-2}$	5/2	- 0.757516	3626,81503
^{19}F	100	1/2	5.257732	25168,41981
^{23}Na	100	3/2	1.478391	7076,43603
^{27}Al	100	5/2	1.456601	6971,118386
^{29}Si	4.7	1/2	- 1.1106	5314,48345
^{31}P	100	1/2	2.26320	10829,792753
^{207}Pb	22.6	1/2	1.1748	5597,173483

tabella 2.1: esempi di isotopi a spin nucleare non nullo.

Il momento angolare totale di un nucleo ha modulo:

$$|I| = \hbar \sqrt{I(I+1)} \quad (2.1)$$

dove I è il numero quantico di spin e $\hbar = h/2\pi$, con $h=6,63 \cdot 10^{-27}$ erg·s la costante di Planck. In base alla meccanica quantistica il momento angolare è quantizzato, ovvero non può assumere orientazione qualsiasi rispetto ad un dato asse arbitrario ma può avere solo $2I+1$ orientazioni. In particolare, la componente del momento angolare lungo l'asse scelto (z) è:

$$I_z = m_I \hbar \quad (2.2)$$

dove m_I può assumere i valori $I, I-1, \dots, -I$.

Il nucleo ^1H (comunemente chiamato protone) ha $I=1/2$ e può presentare quindi 2 differenti orientazioni; altri nuclei con $I=1/2$ sono ^{13}C , ^{19}F e ^{31}P . Nel caso di nuclei con $I=1/2$, lo stato con $m_I = +1/2$ (\uparrow) è di solito indicato con α mentre quello con $m_I = -1/2$ (\downarrow) è indicato con β .

Un nucleo con momento angolare non nullo possiede anche momento magnetico $\vec{\mu}$, essendo:

$$\vec{\mu} = \gamma \hbar \vec{I} \quad (2.3)$$

dove γ è il rapporto giromagnetico del nucleo, che può, a sua volta, essere espresso in termini di un fattore empirico, fattore g nucleare (g_I), e del magnetone nucleare μ_N (che rappresenta una unità di momento magnetico):

$$\gamma = g_I \mu_N / \hbar \quad (2.4)$$

dove $\mu_N = e\hbar / 2m_p = 5.051 \cdot 10^{-27} \text{JT}^{-1}$ con m_p la massa del protone ed e la carica dell'elettrone. I fattori nucleari g sono numeri compresi fra -4 e $+6$ circa: valori positivi di g denotano un momento magnetico parallelo allo spin, mentre valori negativi denotano un momento magnetico antiparallelo allo spin.

Un nucleo con spin non nullo, possedendo momento magnetico, interagisce quindi con eventuali campi magnetici che agiscono su di esso. La Risonanza

Magnetica Nucleare sfrutta proprio l'interazione fra il momento magnetico nucleare ed un campo magnetico esterno.

In assenza di campi magnetici esterni, gli stati con diverso valore di m_I , ovvero diversa orientazione del momento magnetico nucleare, sono *degeneri*, cioè hanno stessa energia; in presenza di un campo magnetico esterno, invece, le $2I + 1$ orientazioni del nucleo corrispondono a stati ad energia diversa, data da:

$$E_{m_I} = -\mu_z B_0 = -\gamma \hbar m_I B_0 \quad (2.5)$$

dove B_0 è l'intensità del campo magnetico e l'asse z è scelto lungo \vec{B} . Si definisce frequenza di Larmor ω_0 (misurata in radianti/s) il prodotto γB_0 , per cui l'equazione 2.5 può essere riscritta come:

$$E_{m_I} = -\hbar \omega_0 m_I \quad (2.6)$$

La frequenza di Larmor rappresenta la frequenza di precessione del momento magnetico di spin intorno al campo magnetico applicato. Infatti in presenza di un campo magnetico, il momento magnetico di ogni spin inizia a ruotare intorno all'asse del campo applicato (precessione) mantenendo l'angolo fra l'asse di spin ed il campo (fig. 2.1).

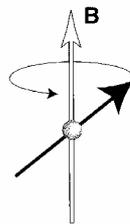


figura 2.1: precessione del momento magnetico di spin intorno al campo magnetico applicato

B.

Questo comportamento è dovuto al fatto che il nucleo possiede momento angolare. Il segno di ω_0 , e quindi di γ , indica il verso della precessione intorno

al campo magnetico: un valore di $\gamma > 0$, implica $\omega_0 < 0$ ed una rotazione in senso orario, un valore di $\gamma < 0$ indica rotazione in senso antiorario (fig. 2.2).

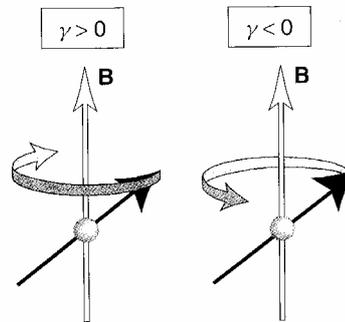


figura 2.2: precessione oraria e precessione antioraria.

La differenza di energia tra i due stati di un nucleo con spin 1/2 (schematizzata in figura 2.3) è:

$$\Delta E = E_\beta - E_\alpha = \gamma \hbar B_0 = \hbar \omega_0 = h \nu_0 \quad (2.7)$$

dove $\nu_0 = \omega_0 / 2\pi$ è la frequenza di Larmor espressa in Hz. Lo stato α ad energia più bassa, E_α , corrisponde al caso in cui lo spin è parallelo al campo, mentre lo stato β ad energia più alta, E_β , corrisponde al caso in cui lo spin è antiparallelo al campo.

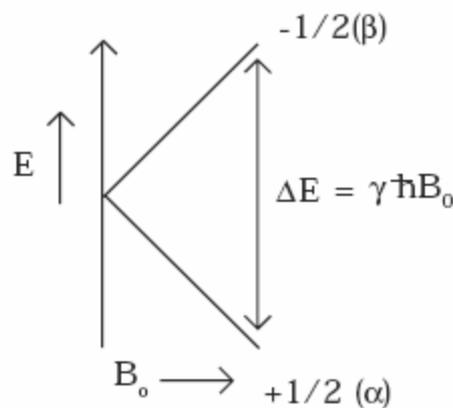


figura 2.3: differenza di energia fra i due stati di spin di un nucleo con spin 1/2 in presenza di un campo magnetico di intensità B_0 .

Dall'equazione 7 è evidente che la separazione energetica dei livelli ΔE dipende dal tipo di nucleo (dipendendo da γ) e dall'intensità del campo magnetico applicato. In particolare la differenza di energia è direttamente proporzionale a B_0 , per cui aumenta linearmente con l'aumentare del campo applicato. Il valore di ΔE per i campi magnetici utilizzati in NMR è tale che ν_0 è nel campo delle radiofrequenze ($\nu \approx 10^6 \div 10^9$ Hz). Così, per esempio, in un campo di 12T la frequenza di Larmor per il protone è di circa 500 MHz.

Gli stati α e β di nuclei con $I = 1/2$ posti in un campo magnetico vengono popolati secondo la distribuzione di Boltzmann:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\Delta E/kT} \quad (2.8)$$

con k la costante di Boltzmann. Lo stato α risulta quindi leggermente più popolato dello stato β . Per esempio a temperatura ambiente in un campo magnetico di 7 Tesla, ΔE è dell'ordine di 10^{-2} cm^{-1} mentre kT è di circa 200 cm^{-1} , per cui la differenza di popolazione è di $5 \cdot 10^{-5}$. Quando un nucleo nello stato di spin a più bassa energia viene irradiato con una radiofrequenza di energia pari a ΔE , viene assorbita energia e il nucleo *salta* dallo stato di spin α a quello β , ovvero dallo stato di spin allineato al campo magnetico allo stato di spin opposto al campo magnetico applicato. L'esperimento base di risonanza magnetica nucleare misura proprio la differenza di energia tra i diversi livelli energetici mediante applicazione di un campo a radiofrequenza; quando la frequenza uguaglia la frequenza di Larmor del nucleo in esame si ha la condizione di *risonanza*, ovvero assorbimento di radiazione elettromagnetica.

2.2.1 Chemical shift

Se non vi fossero altri effetti, l'NMR sarebbe di scarsa utilità in quanto nuclei di uno stesso isotopo risuonerebbero alla stessa frequenza. Fortunatamente in sistemi reali un nucleo non è mai isolato, ma è soggetto a campi magnetici locali, molto meno intensi del campo esterno applicato, generati dagli elettroni e

dai nuclei circostanti. L'interazione del nucleo con questi campi locali modifica i livelli energetici precedentemente descritti rendendo quindi le differenze di energia misurate tramite l'NMR dipendenti, oltre che dal tipo di nucleo, anche dall'intorno chimico del nucleo stesso. Infatti, nelle molecole, gli elettroni, essendo dotati di spin, e i nuclei a spin non nullo, generano un campo magnetico proporzionale al campo applicato e convenzionalmente espresso come

$$\delta\mathbf{B} = -\boldsymbol{\sigma} \cdot \mathbf{B}_0 \quad (2.9)$$

dove $\boldsymbol{\sigma}$ è in generale un tensore di 2° rango a causa del carattere anisotropo di questa interazione rappresentabile quindi con una matrice 3x3:

$$\boldsymbol{\sigma} = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{zx} & \sigma_{zy} & \sigma_{zz} \end{pmatrix} \quad (2.10)$$

In soluzione, a causa dei moti rapidi, tale interazione è mediata come segue:

$$\sigma_i = 1/3 \text{Tr}\{\boldsymbol{\sigma}\} = 1/3(\sigma_{xx} + \sigma_{yy} + \sigma_{zz}) \quad (2.11)$$

σ_i è detta *costante di schermo*, e può essere sia positiva che negativa. Il campo effettivo che agisce su un nucleo è quindi:

$$B_{eff} = (1 - \sigma_i)B_0 \quad (2.12)$$

Quindi, nuclei dello stesso tipo che si trovano in intorni chimici diversi entrano in risonanza a frequenze differenti.

In soluzione se $\sigma > 0$, il campo effettivo sul nucleo è meno intenso di quello applicato e quindi il nucleo è schermato; se $\sigma < 0$, il campo effettivo è più intenso di quello applicato per cui il nucleo è de-schermato.

Lo spostamento nella riga di risonanza dovuto allo schermo è quindi caratteristico della densità elettronica e della distribuzione della nube elettronica attorno al nucleo e costituisce una sorta di impronta digitale della struttura chimica del frammento nel quale il nucleo è allocato.

E' definito *chemical shift* (δ) il rapporto espresso in ppm:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_0}{\nu_0} \times 10^6 \quad (2.13)$$

dove ν è la frequenza di risonanza del nucleo nel campione in esame e ν_0 è la frequenza di risonanza dello stesso nucleo in uno standard. Il vantaggio di questa definizione consiste nel fatto che δ risulta indipendente dal campo magnetico applicato in quanto sia il numeratore che il denominatore sono direttamente proporzionali a B_0 . In questo modo il valore di δ per un dato nucleo non dipende dallo strumento utilizzato.

Lo standard utilizzato per spettri protonici in soluzione è il $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ (TMS) che presenta il vantaggio di avere ben 12 protoni che risuonano alla stessa frequenza, di essere poco reattivo e di sciogliersi facilmente in molti solventi.

E' da notare che δ può assumere sia valori positivi che negativi: un valore positivo di δ indica che la frequenza di risonanza del nucleo in questione è maggiore di quella dello standard. Per convenzione la scala di chemical shift negli spettri NMR aumenta da destra a sinistra.

2.2.2 Accoppiamento dipolare

L'effetto di schermo è dovuto agli elettroni intorno al nucleo in esame, che sono a loro volta influenzati dai nuclei circostanti. Tuttavia i nuclei interagiscono anche tra loro in due modi:

1. attraverso l'interazione spaziale diretta dipolo-dipolo;
2. attraverso l'accoppiamento indiretto tramite i legami chimici.

L'interazione diretta fra due nuclei (*accoppiamento dipolare*) nasce dal fatto che un nucleo con spin non nullo genera un campo magnetico intorno a sé i cui campi di forza dipendono dalla direzione del momento magnetico di spin. Un

nucleo vicino risente di questo campo magnetico e l'energia di interazione può essere espressa come:

$$E_D = -\frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_i \gamma_j \hbar}{r_{ij}^3} f(\mathbf{I}_i, \mathbf{I}_j, \mathbf{r}_{ij}) \quad (2.14)$$

dove \mathbf{r}_{ij} è il vettore internucleare e r_{ij} la distanza fra i due nuclei. L'interazione dipolare dipende dalle orientazioni relative degli spin dei due nuclei interagenti e del vettore internucleare. Allo stato liquido le interazioni dirette dipolo-dipolo sono mediate a zero dalle veloci riorientazioni dei vettori internucleari, mentre allo stato solido sono mediate ad un valore diverso e si manifestano con allargamento dei segnali, di entità diversa a seconda che le interazioni siano omo- o eteronucleari. E' da notare che l'entità delle interazioni dipolari è maggiore per nuclei spazialmente vicini (vedi equazione 2.14).

L'interazione fra due nuclei tramite gli elettroni di legame è detta invece *accoppiamento indiretto*. Questa interazione è di grande utilità per l'interpretazione degli spettri NMR in soluzione; allo stato solido, invece, è trascurabile rispetto all'interazione dipolare.

Nell'interpretazione delle risonanze presenti in uno spettro NMR, occorre tenere presente l'abbondanza naturale del nucleo in esame. Il ^{13}C , nucleo investigato in questo lavoro di tesi, è una specie a bassa abbondanza naturale (1,1%) per cui non si osservano accoppiamenti dipolari tra nuclei ^{13}C , mentre sono rilevanti le interazioni ^1H - ^{13}C vista l'abbondanza naturale dei nuclei ^1H (99,98%).

2.2.3 Esperimento NMR di base

Una descrizione rigorosa degli esperimenti NMR richiede l'utilizzo della meccanica quantistica; per i nostri scopi è tuttavia sufficiente dare una descrizione qualitativa utilizzando un approccio vettoriale, che consente di spiegare in maniera semplice gli esperimenti di base.

Come già accennato in assenza di campo magnetico in un sistema di spin i momenti magnetici assumono tutte le possibili orientazioni (fig. 2.4), ovvero la distribuzione è isotropa, per cui il momento magnetico totale dell'insieme di spin è nullo. In presenza di un campo magnetico gli spin possono assumere diverse orientazioni ben definite a seconda del loro spin; per esempio uno spin 1/2 può

assumere due differenti orientazioni (parallela o antiparallela al campo) che corrispondono a due diversi livelli di energia. All'equilibrio termico, questi saranno popolati secondo la distribuzione di Boltzmann (vedi eq. 2.8) con un leggero eccesso di spin nello stato α (orientazione parallela al campo) (fig. 2.5). In questo modo, la somma vettoriale dei momenti magnetici di tutti gli spin dà luogo ad una magnetizzazione netta non nulla lungo il campo magnetico esterno, la cui direzione è scelta convenzionalmente come asse z del sistema di laboratorio.



figura 2.4: distribuzione isotropa dai momenti magnetici di un sistema in assenza di campo magnetico.

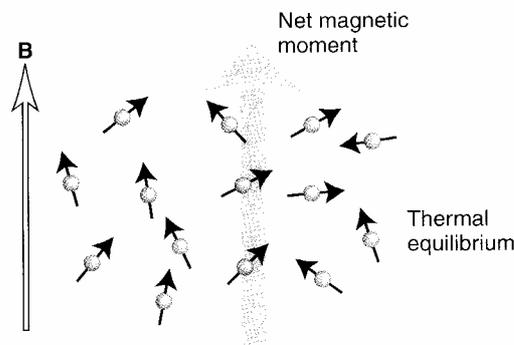


figura 2.5: distribuzione di spin all'equilibrio termico in presenza di un campo magnetico (\mathbf{B}).

L' esperimento NMR più semplice consiste nel perturbare il sistema di spin con un impulso di radiofrequenza, generato applicando per alcuni microsecondi un campo magnetico \mathbf{B}_1 oscillante perpendicolare a \mathbf{B}_0 . Il campo oscillante, pur essendo ordini di grandezza più piccolo del campo statico, ha un notevole effetto sugli spin nucleari perché è risonante con la frequenza di precessione degli spin intorno al campo statico. Applicando il campo oscillante per un tempo τ , si riesce a ruotare il momento magnetico di ogni spin di un angolo che

dipende da τ stesso. Se, per esempio, si applica il campo \mathbf{B}_1 un tempo tale da ruotare il momento magnetico di $\pi/2$ intorno all'asse x , questo si porterà lungo l'asse y (fig. 2.6).

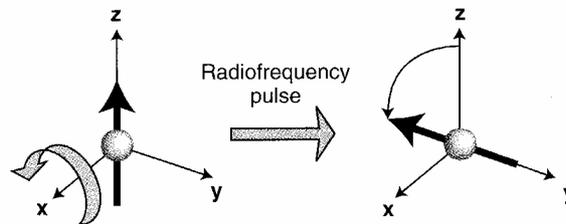


figura 2.6: applicazione di un campo tale da far ruotare il momento magnetico di $\pi/2$.

Poiché i momenti magnetici di tutti gli spin ruotano di $\pi/2$, si avrà una rotazione di $\pi/2$ anche per il vettore magnetizzazione (fig. 2.7).

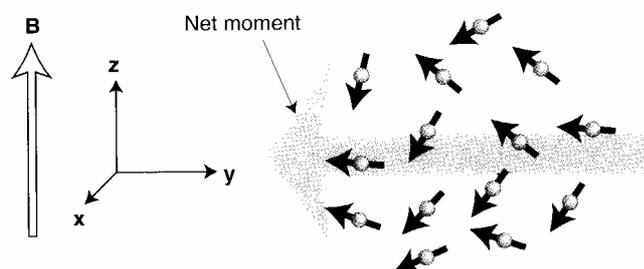


figura 2.7: rotazione del vettore di magnetizzazione.

Il momento magnetico risultante perpendicolare al campo magnetico statico è detto magnetizzazione trasversa.

Nell'istante in cui l'impulso cessa, il sistema non è all'equilibrio, essendo la magnetizzazione perpendicolare al campo applicato. I singoli spin nucleari precessono intorno al campo esterno alla frequenza di Larmor, facendo sì che anche il momento magnetico risultante precessa intorno al campo esterno alla frequenza di Larmor (fig. 2.8).

Poiché i singoli spin non precessono esattamente alla stessa frequenza a causa delle piccole fluttuazioni dei campi magnetici locali, essi gradualmente vanno

fuori fase perdendo la sincronizzazione e, conseguentemente, il vettore di magnetizzazione trasversa decade a zero (fig. 2.9).

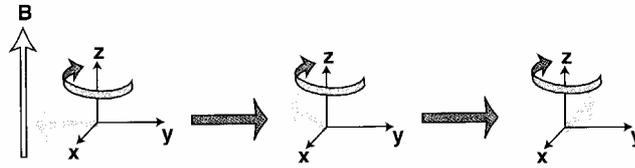


figura 2.8: precessione del vettore magnetizzazione intorno al campo esterno **B**.

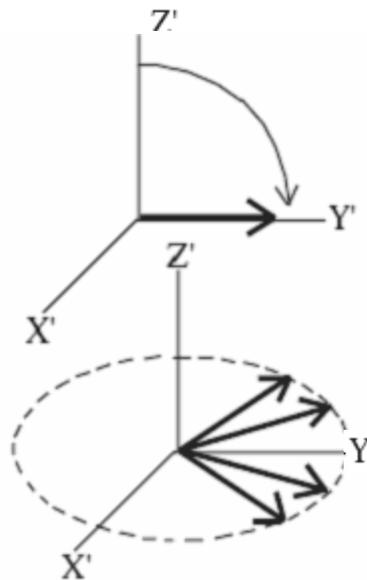


figura 2.9: decadimento della magnetizzazione trasversa.

Le componenti del vettore magnetizzazione nel piano xy al tempo t dopo l'impulso (fig. 2.10) sono quindi date da:

$$M_y = -M_{eq} \cos(\omega_0 t) \exp\{-t/T_2\} \quad (2.15a)$$

$$M_x = -M_{eq} \sin(\omega_0 t) \exp\{-t/T_2\} \quad (2.15b)$$

dove M_{eq} è il modulo del vettore magnetizzazione all'equilibrio e T_2 è detto tempo di rilassamento trasverso o spin-spin.

Le componenti M_x e M_y della magnetizzazione trasversa dopo l'impulso hanno quindi l'andamento mostrato in figura 2.11.

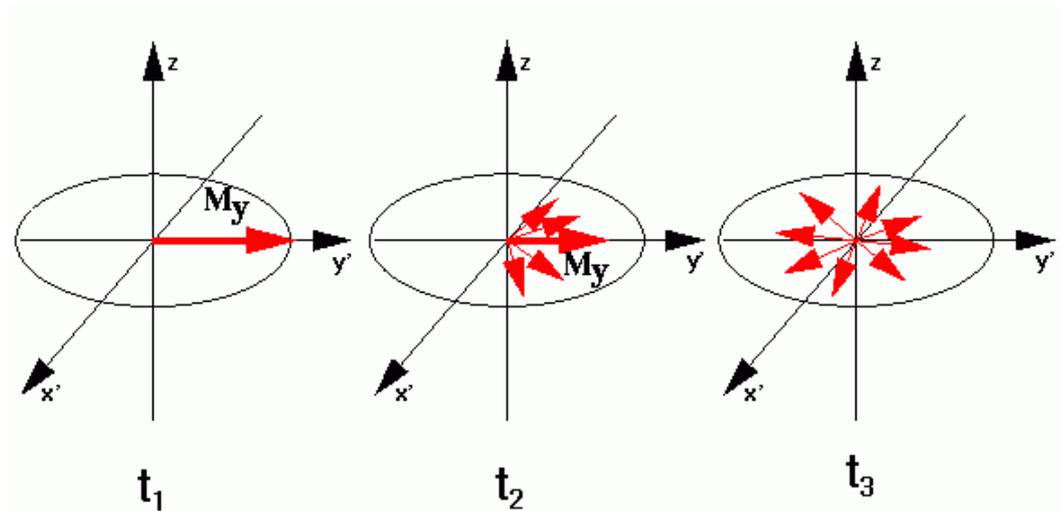


figura 2.10: variazione nel tempo delle componenti della magnetizzazione nel piano xy.

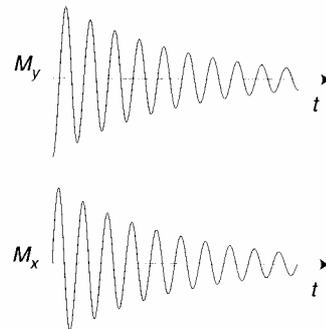


figura 2.11: andamento nel tempo delle componenti della magnetizzazione trasversa dopo l'impulso.

Questo decadimento è ciò che viene registrato in un esperimento NMR sfruttando il fatto che un momento magnetico ruotante genera un campo magnetico ruotante che quindi genera un campo elettrico oscillante in una bobina posta in prossimità del campione (fig. 2.12).

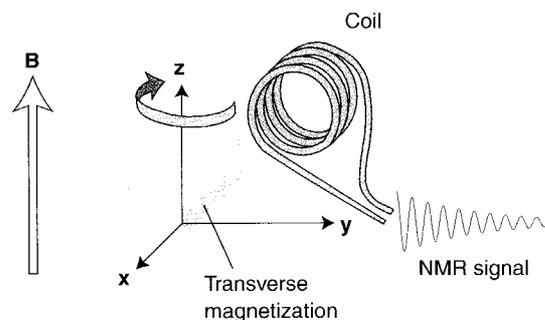


figura 2.12: generazione del segnale NMR.

La corrente elettrica oscillante indotta dalla magnetizzazione trasversa costituisce il segnale NMR ed è detto Free Induction Decay (FID) contenente in forma implicita tutte le frequenze di risonanza dei nuclei presenti nel campione. Gli esperimenti NMR vengono in genere schematizzati mostrando gli impulsi a radiofrequenza, indicandone la durata e la fase, e l'acquisizione; nel caso dell'esperimento di base qui descritto la rappresentazione è la seguente:

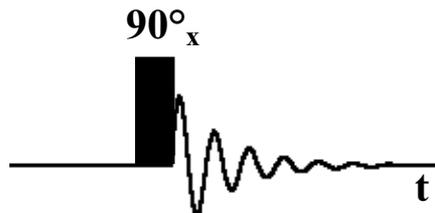


figura 2.13: rappresentazione di un esperimento NMR di base.

Il FID è un segnale in funzione del tempo e per convertire l'informazione temporale in informazione nel dominio delle frequenze, occorre effettuare la trasformata di Fourier. La trasformata di Fourier del FID dà luogo allo spettro NMR, nel quale è riportata l'intensità del segnale in funzione della frequenza:

$$S(\omega) = \int_0^{\infty} s(t) \exp\{-i\omega t\} dt \quad (2.16)$$

dove $S(\omega)$ è lo spettro NMR ed $s(t)$ è il FID (fig. 2.14).

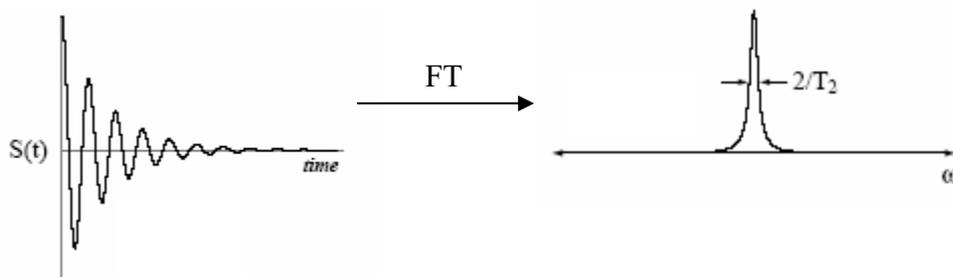


figura 2.14: FID e relativo spettro.

E' utile in genere acquisire più FID e sommarli in modo da avere un miglior rapporto segnale/rumore (S/N) (fig. 2.15); infatti sommando i FID di ns ripetizioni successive dello stesso esperimento (scansioni) il segnale aumenta più velocemente del rumore e:

$$\frac{S}{N} \cong \sqrt{ns} \quad (2.17)$$

E' da tenere presente che le diverse scansioni devono essere eseguite a intervalli di tempo sufficienti a garantire che fra una scansione e la successiva la magnetizzazione ritorni all'equilibrio iniziale.

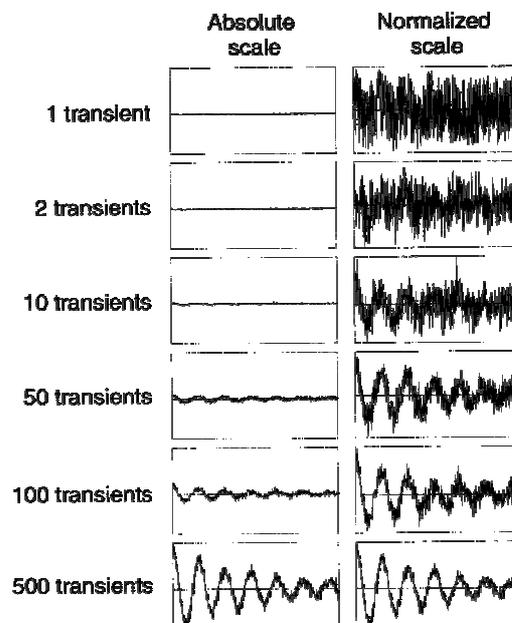


figura 2.15: miglioramento del rapporto S/N con l'aumento del numero di scansioni.

Infatti, oltre al rilassamento trasverso già menzionato, il vettore magnetizzazione è soggetto ad un processo di rilassamento, detto longitudinale, che tende a riportarlo lungo il campo statico esterno, ovvero alla situazione di equilibrio precedente all'applicazione dell'impulso a radiofrequenza.

Tale processo di rilassamento è dovuto alle fluttuazioni, dovute a moti molecolari e moti interni, dei piccoli campi magnetici generati dalle diverse particelle dotate di spin presenti nelle molecole; il campo magnetico locale percepito dal singolo nucleo risulta quindi dipendente dal tempo e ciò consente uno scambio di energia con l'intorno e quindi un ritorno all'equilibrio.

Tale processo è detto rilassamento spin-reticolo e la sua costante tempo caratteristica è indicata con T_1 ed è detta tempo di rilassamento spin-reticolo o longitudinale. T_1 dipende dal nucleo e da proprietà del campione quali la temperatura e la viscosità. Per piccole molecole in soluzione, T_1 e T_2 sono dello stesso ordine di grandezza (dell'ordine dei secondi). Per macromolecole in soluzione o per sistemi allo stato solido, T_1 e T_2 possono essere molto diversi, con T_2 anche dell'ordine dei microsecondi, per cui la magnetizzazione trasversa decade in un tempo molto breve dando luogo a segnali molto larghi.

Le forme di riga dei picchi NMR in soluzione, risultanti dalla trasformata di Fourier del FID, sono generalmente delle curve Lorentziane:

$$S(\omega) = \frac{T_2}{\pi} \frac{1}{1 + T_2^2(\omega - \omega_0)^2} \quad (2.18)$$

La larghezza di riga a metà altezza (fig. 2.16), misurata in rad/s, è pari a $2/T_2$.

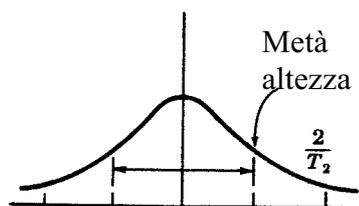


figura 2.16: forma di riga Lorentziana.

Nel caso di solidi, invece, si hanno spesso picchi descritti da curve Gaussiane:

$$S(\omega) = \frac{T_2}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}T_2^2(\omega - \omega_0)^2} \quad (2.19)$$

in cui la larghezza in corrispondenza dei punti di massima pendenza è pari a $2/T_2$ (fig. 2.17).

In entrambi i casi un decadimento rapido della magnetizzazione trasversa (ovvero T_2 corto) corrisponde ad un picco largo; viceversa un decadimento lento (ovvero T_2 lungo) corrisponde ad un picco stretto.

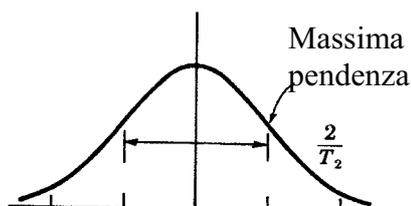


figura 2.17: forma di riga Gaussiana.

2.3 NMR allo stato solido

La spettroscopia NMR misura le componenti delle interazioni magnetiche lungo la direzione del campo magnetico statico applicato. Quindi, a causa della natura anisotropa di queste interazioni, la frequenza di risonanza di un dato nucleo dipende dall'orientazione del frammento molecolare che lo contiene rispetto al campo. In un liquido i rapidi e casuali moti molecolari rendono il mezzo isotropo per cui l'interazione risulta mediata al suo valore isotropo. L'interazione dipolare ha valore medio isotropo nullo per cui in fase liquida non si osserva, mentre il chemical shift risulta mediato al suo valore isotropo non nullo (σ_i in equazione 12). In un solido l'assenza di moti isotropi fa sì che lo spettro NMR dipenda dalle diverse orientazioni delle molecole rispetto al campo e dalla loro distribuzione. In un cristallo singolo, dove tutti gli elementi che formano il cristallo sono disposti in modo ordinato e ripetitivo, si avranno frequenze NMR che dipendono da come è orientato il cristallo all'interno del campo magnetico. In figura 2.18 si riporta un esempio relativo all'andamento del chemical shift dei segnali ^{13}C NMR di un cristallo singolo di tartrato di ammonio in funzione dell'orientazione del cristallo rispetto al campo magnetico.

Negli spettri NMR di campioni policristallini le frequenze di risonanza corrispondenti a tutte le diverse orientazioni delle molecole rispetto al campo

sono presenti contemporaneamente dando luogo al cosiddetto *spettro di polvere* di cui un esempio è mostrato in figura 2.19.

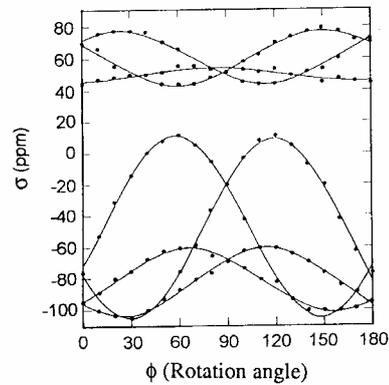


figura 2.18: Andamento del chemical shift dei segnali ^{13}C NMR di un cristallo singolo di tartrato di ammonio in funzione dell'orientazione del cristallo rispetto al campo esterno (A. Pines et al., 1974).

2.3.1 Rotazione ad angolo magico e disaccoppiamento dipolare

Magic Angle Spinning (MAS)

Per un'interazione anisotropa la frequenza di risonanza può essere in generale espressa come:

$$\omega_{aniso} = f(\theta, \phi) \quad (2.20)$$

con (θ, ϕ) le coordinate polari del vettore lungo il campo magnetico esterno. E' possibile, mediante trasformazione del sistema di riferimento, riferire l'orientazione del frammento molecolare rispetto ad un asse arbitrario che forma un angolo θ_r rispetto al campo magnetico esterno e da questo passare al sistema di laboratorio, il cui asse z coincide con la direzione del campo magnetico stesso. Se inoltre si ruota rispetto a tale asse, la frequenza risulta un valore medio sulle diverse orientazioni (definite dagli angoli polari θ_a e ϕ_a) assunte dal frammento molecolare rispetto all'asse di rotazione. In particolare si ha che:

$$\omega_{aniso} = f^a(\theta_a, \phi_a) \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta_r - 1) \quad (2.21)$$

da cui risulta che nel caso in cui l'asse di rotazione sia a 54.74° rispetto al campo magnetico esterno, valore per il quale il termine $(3 \cos^2 \theta_r - 1)$ si annulla, ω_{aniso} diventa uguale a zero, e la sola componente isotropa dell'interazione contribuisce allo spettro. Tale angolo è detto *angolo magico*.

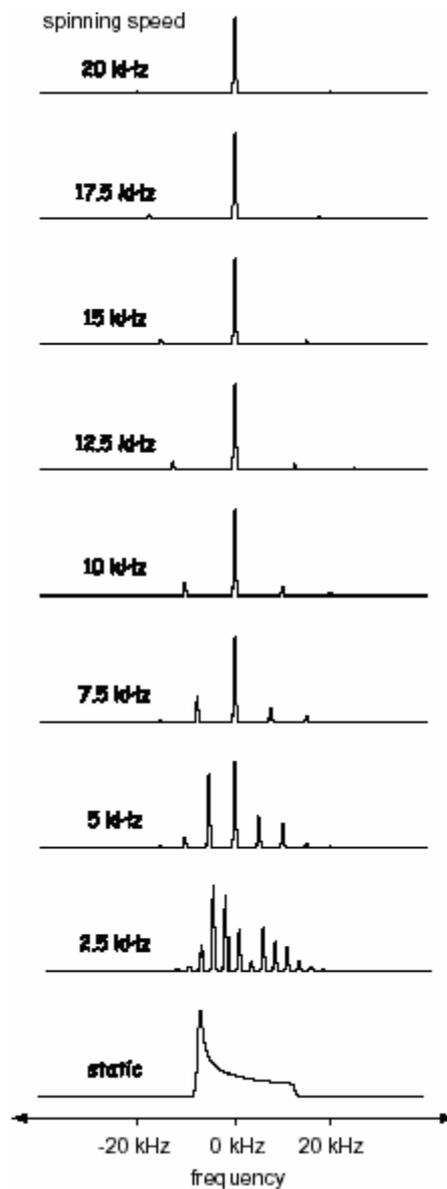


figura 2.19: andamento delle bande rotazionali in funzione della velocità di rotazione all'angolo magico. In basso è lo spettro statico (spettro in polvere)

E' da tenere presente che la rotazione ad angolo magico annulla l'effetto delle anisotropie delle diverse interazioni soltanto se la frequenza di rotazione è molto maggiore di ω_{aniso} . Per velocità inferiori si osserva una serie di bande, dette bande rotazionali, distanziate della frequenza di rotazione ω_r (figura 2.19). Con i moderni spettrometri si ottengono velocità massime pari a circa 30 kHz sufficienti quindi ad eliminare l'anisotropia del chemical shift, ma non tutti gli accoppiamenti dipolari.

Per esempio, nel caso di molecole organiche in cui le distanze carbonio-protone sono piccole (dell'ordine di 1-2 Å), l'accoppiamento dipolare ^{13}C - ^1H non viene mediato a zero dalla rotazione ad angolo magico. E' necessario in questo caso combinare la tecnica MAS con il disaccoppiamento dipolare ad alta potenza.

Disaccoppiamento dipolare (DD)

Il metodo più comunemente usato per annullare l'interazione dipolare eteronucleare ^{13}C - ^1H in esperimenti ^{13}C MAS, consiste nell'irraggiamento continuo con un campo B_1 perpendicolare a B_0 alla frequenza di risonanza dei nuclei protonici durante il periodo di acquisizione del segnale. In questo modo la magnetizzazione del nucleo ^1H precessa intorno a B_1 ed il nucleo ^{13}C vede una situazione media in cui il momento magnetico del nucleo protonico è nullo.

2.3.2 Cross-Polarization

Le tecniche fin qui descritte servono per ottenere spettri ^{13}C NMR ad alta risoluzione in fase solida. Tuttavia, per ottenere questi spettri in tempi di misura ragionevoli devono essere risolti altri due importanti problemi. Il primo problema nasce dalla lunghezza dei tempi di rilassamento longitudinale T_1 dei nuclei ^{13}C (anche dell'ordine dei minuti); l'altro problema è costituito dalla, bassa abbondanza naturale e bassa sensibilità NMR (basso γ) del ^{13}C che impongono la necessità di acquisire un elevato numero di FID per avere un buon rapporto S/N (equazione 2.17). Insieme questi due fattori possono rendere i tempi di misura proibitivi.

Una delle tecniche più utilizzate per ovviare a questi problemi in sistemi organici è la cross-polarization (CP) che sfrutta la possibilità di trasferire magnetizzazione (o polarizzazione) dall' ^1H , cioè da uno spin abbondante, al

^{13}C , cioè ad uno spin raro, ad esso accoppiato dipolarmente. Per avere trasferimento di polarizzazione tra due nuclei accoppiati dipolarmente occorre innanzitutto che entrambi siano in condizione di *spin-lock*. Si ha *spin-lock* quando la componente della magnetizzazione lungo un campo applicato B_1 , perpendicolare a B_0 e molto maggiore dei campi locali (accoppiamenti dipolari, chemical shift), non precessa intorno a B_1 ma rimane allineata lungo tale direzione. La magnetizzazione di un sistema di spin può essere tenuta a lungo in questa situazione, l'unica limitazione temporale, essendo legata al *rilassamento longitudinale nel sistema ruotante* il cui tempo caratteristico è $T_{1\rho}$ (figura 2.20). Lo scambio di polarizzazione fra ^1H e ^{13}C accoppiati dipolarmente avviene quando si irradiano contemporaneamente i due nuclei con campi B_1 alle rispettive frequenze di risonanza tali che sia verificata la condizione di Hartmann-Hann:

$$\gamma_H B_{1H} = \gamma_C B_{1C} \quad (2.22)$$

dove γ_I è il rapporto giromagnetico del nucleo I e B_{1I} l'intensità del campo magnetico trasversale applicato sul nucleo I. L'equazione 2.22 implica che:

$$\omega_1^H = \omega_1^C \quad (2.23)$$

ovvero i due sistemi di riferimento ruotanti sono sincroni e si ha possibilità di trasferimento di magnetizzazione.

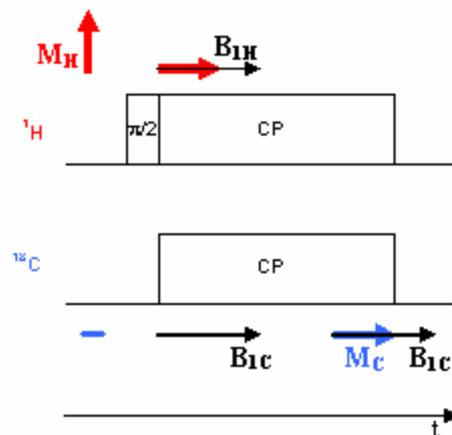


figura 2.20: rappresentazione del processo di cross-polarization.

Se si parte da una situazione in cui si ha solo magnetizzazione dei nuclei ^1H , dopo il trasferimento di magnetizzazione la componente della magnetizzazione dei nuclei ^{13}C è proporzionale a quella dei nuclei ^1H che l'hanno generata, ovvero quelli che interagiscono dipolarmente.

Il guadagno in magnetizzazione rispetto all'eccitazione diretta del nucleo ^{13}C è al massimo $\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{C}}=4$. E' da tenere presente inoltre che ai fini del tempo di attesa fra una scansione e quella successiva, conta il T_1 del nucleo ^1H che, rispetto agli altri nuclei, ha tempi di rilassamento molto più corti. In questo modo è possibile registrare spettri ^{13}C in abbondanza naturale in tempi relativamente brevi. L'esperimento ^1H - ^{13}C CP è generalmente schematizzato come riportato in figura 2.21.

La crescita della magnetizzazione dei nuclei ^{13}C durante il tempo di contatto τ_{CP} segue un andamento esponenziale con tempo caratteristico T_{CH} che dipende dalle interazioni dipolari dei nuclei coinvolti nel trasferimento di magnetizzazione.

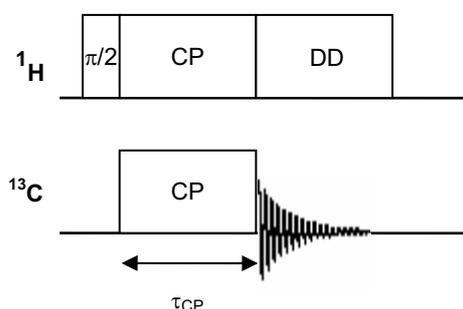


figura 2.21: rappresentazione dell'esperimento ^1H - ^{13}C CP.

E' chiaro quindi che per nuclei ^{13}C direttamente legati a nuclei ^1H la crescita della magnetizzazione sarà più rapida rispetto a quella di nuclei quaternari. Inoltre, durante il tempo di contatto la magnetizzazione dei nuclei ^1H e quella dei nuclei ^{13}C che si viene formando sono soggette a rilassamento longitudinale $T_{1\rho}$. Tutto ciò fa sì che, in primo luogo, le intensità dei diversi picchi in uno spettro CP non rispettino le quantità relative dei diversi tipi di nuclei ^{13}C presenti nel campione, e in secondo luogo, la dinamica di CP, cioè l'andamento della magnetizzazione del ^{13}C nel tempo, non sia una semplice funzione esponenziale. In particolare si ha che:

$$M(t) = M_0 \left(1 - \frac{T_{CH}}{T_{1\rho}^H} \right)^{-1} \left(e^{-t/T_{1\rho}^H} \right) \left(1 - e^{-t/T_{CH}} \right) \quad (2.24)$$

ovvero, nel caso più generale in cui il processo di cross-polarizzazione sia descrivibile da due diverse funzioni esponenziali con peso relativo diverso:

$$M(t) = M_0 \left[\beta \left(1 - \frac{T_{CH(1)}}{T_{1\rho(1)}^H} \right)^{-1} \left(e^{-t/T_{1\rho(1)}^H} \right) \left(1 - e^{-t/T_{CH(1)}} \right) + (1 - \beta) \left(1 - \frac{T_{CH(2)}}{T_{1\rho(2)}^H} \right)^{-1} \left(e^{-t/T_{1\rho(2)}^H} \right) \left(1 - e^{-t/T_{CH(2)}} \right) \right] \quad (2.25)$$

dove β è la frazione della componente 1 e $T_{CH(1)}$, $T_{CH(2)}$, $T_{1\rho(1)}$ e $T_{1\rho(2)}$ sono le costanti tempo rilevanti per le due componenti (Keeler et al., 2003).

L'eq. 2.24 (o 2.25) consente di ottenere M_0 , magnetizzazione massima ottenibile da $M(t)$ noti i valori di T_{CH} e $T_{1\rho}$ per i diversi tipi di carbonio. M_0 è direttamente proporzionale al numero di nuclei ^{13}C che contribuiscono al picco in esame e la sua determinazione consente quindi di ricavare le quantità relative dei diversi tipi di carbonio presenti in un campione.

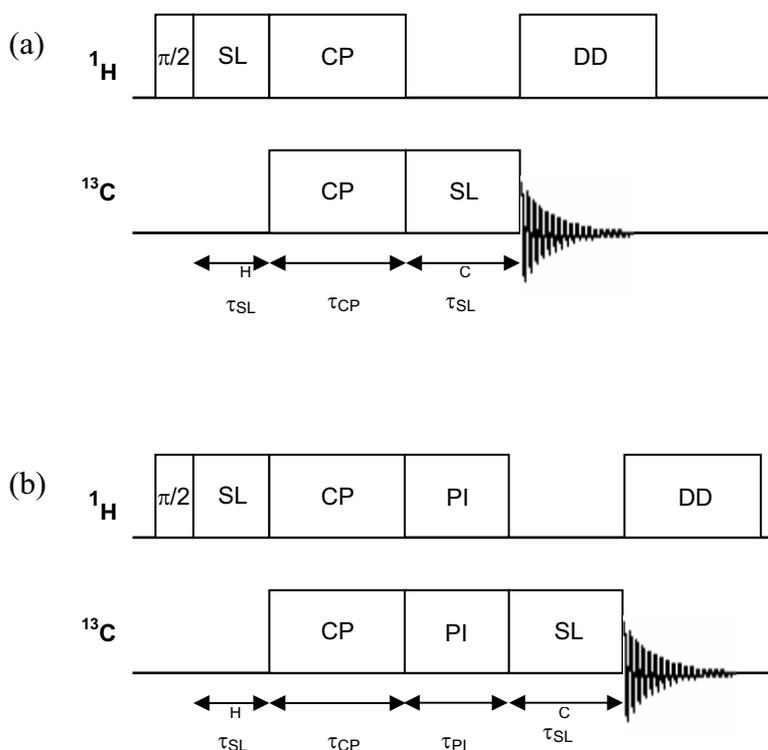
2.3.3 Spectral editing

Nel caso di sistemi organici complessi, dove gli spettri ^{13}C CPMAS risultano di difficile interpretazione a causa del gran numero di picchi e della loro sovrapposizione, si possono utilizzare tecniche selettive in cui le intensità dei diversi picchi sono variate sfruttando differenze nel tempo di cross-polarizzazione T_{CH} dei diversi tipi di nuclei. In un tempo di contatto molto corto ($\sim 40 \mu\text{s}$) i nuclei ^{13}C metinici (CH) e metilenici (CH_2) raggiungono una condizione di quasi-equilibrio con i protoni direttamente legati. Per tempi di contatto più lunghi (dell'ordine dei ms) contribuiscono al trasferimento di magnetizzazione anche protoni più distanti attraverso la diffusione di spin fra nuclei ^1H . Grazie a questo processo anche nuclei ^{13}C quaternari (nel seguito indicati come C_{quat}), non direttamente legati a protoni, vengono polarizzati, anche se in tempi più lunghi. Per quanto riguarda i nuclei ^{13}C di gruppi metilici (CH_3), questi, pur avendo 3 protoni direttamente legati, hanno T_{CH} dell'ordine di $200 \mu\text{s}$ a causa della rapida rotazione a cui generalmente i gruppi metilici sono

soggetti; questo moto riduce gli accoppiamenti dipolari ^{13}C - ^1H di 2/3 circa rispetto al valore statico.

Quindi è facile comprendere che se si effettua un esperimento CP con tempo di contatto corto si otterrà uno spettro con i soli CH e CH_2 con intensità relativa di circa 1:2 a causa del diverso numero di protoni direttamente legati.

Per separare i contributi di gruppi CH_3 , CH_2 , CH e C_{quat} in uno spettro ^{13}C CPMAS è stato proposto un metodo di *spectral editing* (Wu et al., 1994) che consiste nella registrazione di spettri CP che prevedono cross-polarizzazione con diversi tempi di contatto seguiti da tempi di inversione della polarizzazione di durata tale che la magnetizzazione ^{13}C che si è venuta a creare in seguito alla CP si riduca, si annulli o diventi negativa. Se, inoltre, prima dell'acquisizione si utilizza un impulso di depolarizzazione sul protone, si provoca una depolarizzazione dei nuclei ^{13}C che presentano forte accoppiamento dipolare con protoni, ovvero su gruppi CH e CH_2 . I diversi esperimenti previsti da questo metodo possono essere schematizzati come indicato in figura 2.22.



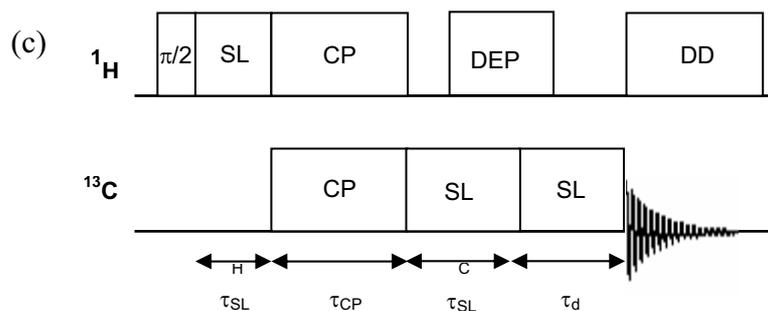


figura 2.22: schema di impulsi per gli esperimenti usati nella procedura di spectral editing: (a) esperimenti SCP e LCP; (b) esperimento SCPPI; (c) esperimenti SCPD ed LCPD.

Scopo della procedura di spectral editing è quello di ottenere spettri separati per nuclei di carbonio quaternari (C_{quat}), terziari (CH), secondari (CH_2) e primari (CH_3) a prescindere dal gruppo funzionale in cui si trovano. La procedura prevede i seguenti esperimenti:

- 1) Long Cross-Polarization (LCP), ovvero un esperimento di polarizzazione incrociata con tempo di contatto τ_{CP} lungo (dell'ordine di alcuni ms) in modo da ottenere segnali da tutti i tipi di carbonio (C quaternari, CH, CH_2 , CH_3).
- 2) Short Cross-Polarization (SCP), ovvero un esperimento di polarizzazione incrociata con tempo di contatto τ_{CP} corto (dell'ordine di alcune decine di μs) in modo da ottenere segnali prevalentemente da nuclei di carbonio secondari e terziari (CH_2 e CH).
- 3) Short Cross-Polarization with Polarization Inversion (SCPPI), ovvero un esperimento SCP con inversione di polarizzazione prima dell'acquisizione per un tempo τ_{PI} , che idealmente non dovrebbe presentare segnali di gruppi CH_3 e C quaternari a causa del τ_{CP} corto, e neanche di gruppi CH a causa del τ_{PI} scelto; un valore di τ_{PI} dell'ordine di 30-40 μs dovrebbe annullare la polarizzazione del ^{13}C nei gruppi CH e invertire quella del ^{13}C nei gruppi CH_2 dando un picco negativo con intensità ridotta a 2/9 rispetto all'intensità massima ottenibile mediante CP.
- 4) Short Cross-Polarization with ^1H Depolarization (SCPD), ovvero un esperimento SCP con depolarizzazione del protone prima

dell'acquisizione. Il tempo di depolarizzazione τ_d viene scelto in modo tale da dare un effetto di depolarizzazione sui ^{13}C dei gruppi CH e CH₂ in modo che restino unicamente picchi relativi a CH₃ e C quaternari, seppur di bassa intensità a causa del τ_{CP} corto. τ_d è in genere dell'ordine di 100 μs .

- 5) Long Polarization with ^1H Depolarization (LCPD), ovvero un esperimento analogo a quello riportato al punto 4 ma con tempo di contatto lungo. Si ottengono spettri ^{13}C con i soli picchi relativi a CH₃ e C_{quat} come nell'esperimento SCPD ma con intensità maggiori.

Prendendo combinazioni lineari opportune degli esperimenti 2-5 è possibile ottenere spettri di soli C quaternari, soli gruppi CH, soli gruppi CH₂ e soli gruppi CH₃, che consentono quindi di assegnare in maniera univoca i picchi osservati nello spettro LCP. I coefficienti da applicare sono stati determinati teoricamente (Wu et al., 1994), ma poi corretti empiricamente su alcuni sistemi modello (Keeler et al., 2000).

2.4 Lo spettrometro NMR per solidi

Gli elementi essenziali di uno spettrometro NMR sono: un magnete, un sintetizzatore di radiofrequenze, un rilevatore di radiofrequenze e il *probe* in cui viene inserito il campione. In realtà lo spettrometro è costituito da altre componenti quali: un computer collegato alle sue periferiche, un programmatore di impulsi a cui sono connessi il sintetizzatore di radiofrequenze e il modulatore, amplificatori ad alta potenza, uno o più demodulatori collegati al ricevitore, filtri, un convertitore analogico-digitale, un compressore ad aria connesso con l'unità di controllo MAS attraverso una linea deumidificata, un sistema refrigerante collegato all'unità di controllo della temperatura a cui arriva sia la linea dell'aria sia quella dell' N_2 gassoso; infine al magnete arrivano le linee di N_2 liquido e di He liquido (figure 2.23 e 2.24).

I moderni spettrometri NMR per stato solido hanno magneti superconduttori con campi fra 5 e 21 Tesla, corrispondenti a frequenze di risonanza del protone di 200-900 MHz. Un magnete superconduttore è costituito da materiale tale da consentire, in teoria, la conservazione della magnetizzazione all'infinito; viene

perciò *energizzato* una volta e poi conserva la magnetizzazione senza bisogno di essere connesso alla linea elettrica.



figura 2.23: spettrometro NMR per solidi.

Il problema principale dei materiali superconduttori è che essi presentano questa particolare proprietà solamente al di sotto di una temperatura critica che va dai 4 ai 20 K a seconda dei materiali usati.

Il magnete di uno spettrometro va perciò mantenuto alla temperatura richiesta affinché il materiale superconduttore possa mantenere la magnetizzazione acquisita. Questo è possibile grazie all'utilizzo di He e N₂ liquidi e di materiali isolanti. Il magnete è inserito nel guscio più interno di una struttura costituita di intercapedini isolate da entrambe le parti e riempite di He liquido, quella più interna, di N₂ liquido quella più esterna. Nonostante vengano utilizzati materiali isolanti tra un guscio e l'altro, è necessario ricaricare periodicamente l'He e l'N₂ che sono evaporati.

Molti dei componenti riportati in figura 2.24 vanno moltiplicati per il numero di *canali* presenti nello spettrometro, corrispondente al numero di frequenze diverse, e quindi di nuclei diversi, contemporaneamente eccitabili: spettrometri standard contengono due canali (tipicamente uno per i nuclei ¹H e ¹⁹F e l'altro per tutti gli altri nuclei), ma spettrometri a tre canali (usati in ambito biologico nella combinazione ¹H-¹³C-¹⁵N) non sono più una rarità.

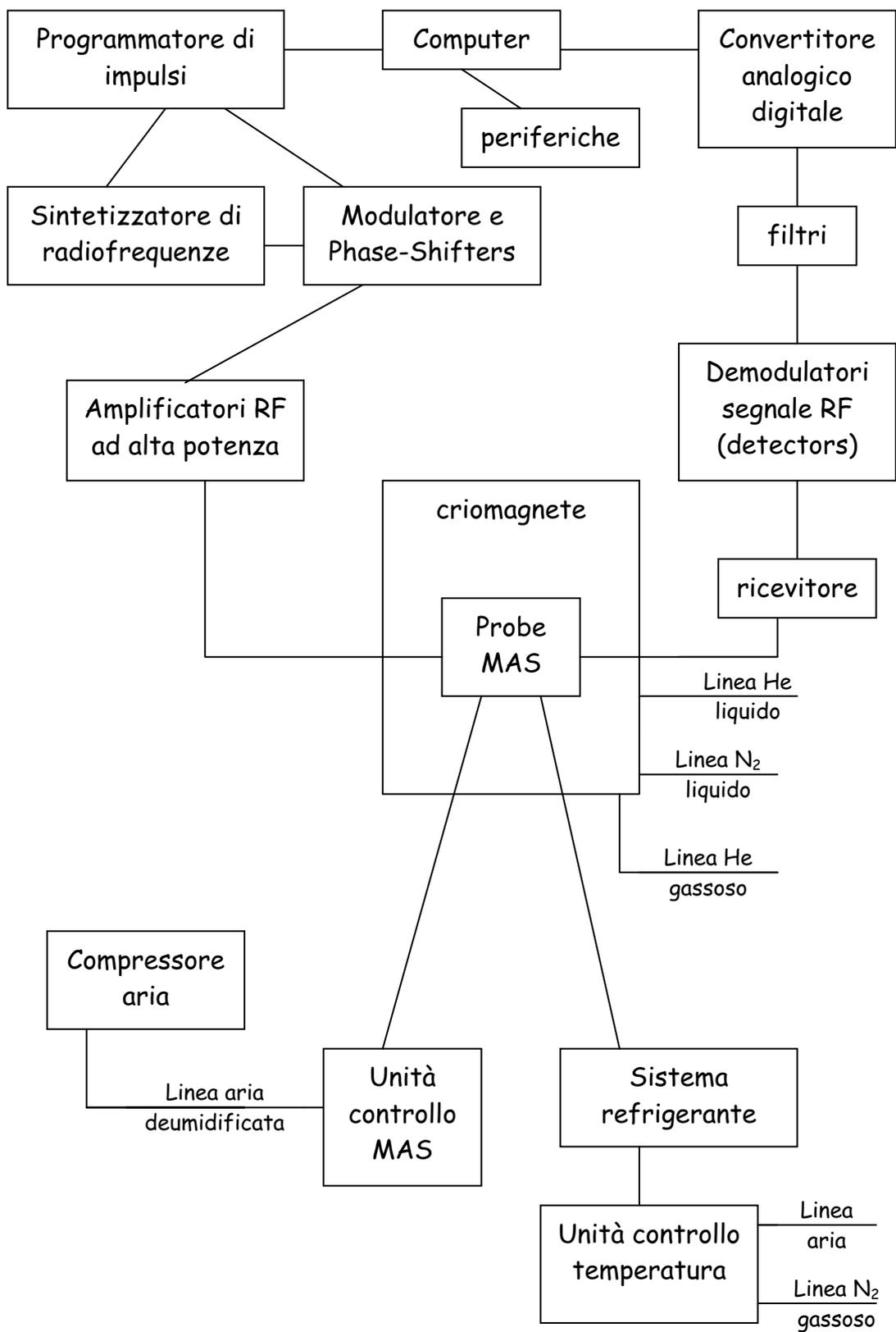


figura 2.24: schema a blocchi di uno spettrometro NMR per solidi.

Alcune componenti strumentali sono peculiari di spettrometri per solidi (ad esempio l'unità per la rotazione dell'angolo magico), mentre altri sono apparentemente simili a quelli presenti in spettrometri standard per liquidi, anche se necessitano di prestazioni più efficaci: gli amplificatori devono essere più potenti (1kW), i *phase-shifter* più veloci (con tempi di shift di 50-100 ns) il convertitore analogico digitale deve essere in grado di campionare ad una frequenza più elevata (5-10 MHz), i probe devono sopportare potenze molto elevate anche per tempi piuttosto lunghi (centinaia di ms).

2.5 Applicazione della tecnica ^{13}C CPMAS allo studio della SOM

Negli ultimi anni sono apparse in letteratura numerose applicazioni della spettroscopia NMR a stato solido allo studio dei suoli. In particolare, su suoli coltivati vengono studiati nuclei ^{13}C , ^{31}P e ^{15}N , le analisi ^{31}P NMR e ^{15}N NMR essendo di interesse per valutare l'effetto di concimi azotati in suoli calcarei, la natura del fosforo organico del suolo dopo fertilizzazione, e i cicli di fosforo e azoto in relazione alla produttività vegetale (Laird et al., 2001; Skjemstad et al., 2002; Zhang et al., 1999; Clough et al., 2005; Robinson et al. 1998). Tuttavia, la maggior parte degli studi riguardano la caratterizzazione della SOM in suoli non coltivati mediante tecniche ^{13}C CPMAS. Sono riportati studi sull'analisi della SOM a varie profondità in uno stesso suolo (Zech et al., 1994; Ussiri et al., 2003), altri sulla composizione della SOM in suoli che si differenziano per localizzazione geografica, per materiale parentale, per vegetazione (Miltner et al., 1995), altri sui diversi complessi organo-minerali che si possono formare nei suoli in base alle variazioni di tessitura, e sui vari gradi di decomposizione in relazione alle dimensioni delle particelle (Schmidt et al., 2000), altri ancora riguardano l'interazione fra la SOM e alcuni tipi di contaminanti ambientali (Salloum et al., 2002). Inoltre, Schöning et al. (2002) hanno esaminato il sequestro di carbonio in un suolo caratterizzato da faggete di diverse età, per verificare il mutamento della SOM con il passare degli anni, mentre Certini et al. (2004) hanno studiato la composizione e il tempo medio di residenza di frazioni della SOM a diverso peso molecolare, in due differenti suoli. Infine alcuni studi riportati in letteratura riguardano la caratterizzazione di sostanze umiche precedentemente isolate (Ussiri et al., 2003; Fabbri et al. 1998; Keeler et al.,

2003), di frazioni di SOM separate in base alle dimensioni (Certini et al., 2004; Smernik et al., 2000) o mediante trattamento con acido solforico (Rovira et al., 2001).

Lo spettro ^{13}C CPMAS di un campione di suolo (figura 2.25) presenta generalmente picchi di risonanza in tutto il range di chemical shift tra 0 e 200 ppm, con una elevata sovrapposizione dei picchi dovuta alla presenza nella SOM di un gran numero di composti diversi. Per avere un'idea della complessità degli spettri ^{13}C basta osservare gli spettri di alcune componenti caratteristiche del suolo, cellulosa, lignina ed acido umico, riportati rispettivamente in figura 2.26, 2.27 e 2.28. E' quindi facile immaginare come in un suolo naturale, in cui questi composti sono presenti insieme a molti altri, sia difficile risalire dallo spettro ^{13}C CP MAS alla composizione chimica della SOM. Tuttavia è possibile individuare i gruppi funzionali e stabilire la struttura di base dalla quale derivano, senza avere la pretesa di attribuire un picco ad uno specifico composto. Quindi, negli studi della SOM, lo spettro ^{13}C CPMAS viene generalmente suddiviso in quattro zone corrispondenti a intervalli di chemical shift di nuclei ^{13}C in intorni chimici differenti (Skjemstad et al., 1996) (vedi figura 2.25 e tabella 2.2).

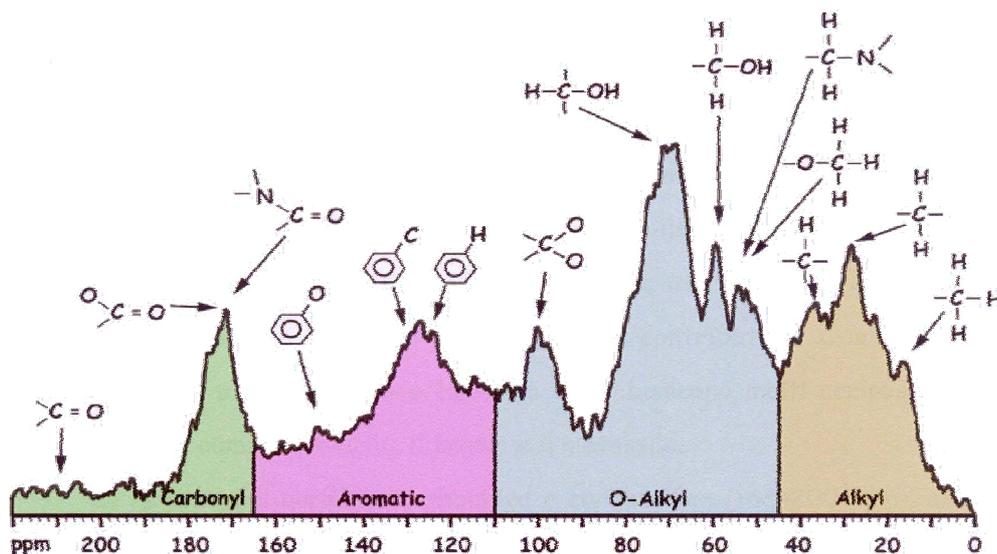


figura 2.25: spettro ^{13}C NMR della SOM diviso in regioni spettrali con attribuzione di alcuni segnali.

C alchilico	C O-alchilico	C aromatico	C carbonilico
0-45 ppm	45-110 ppm	110-165 ppm	165-190 ppm

tabella 2.2: regioni spettrali corrispondenti a nuclei ^{13}C in diversi gruppi funzionali.

Tali nuclei fanno parte di gruppi funzionali caratteristici di componenti specifiche della SOM. Misurando l'area delle diverse regioni si possono ottenere informazioni sulla concentrazione relativa dei diversi gruppi funzionali e quindi un'indicazione della composizione chimica della SOM.

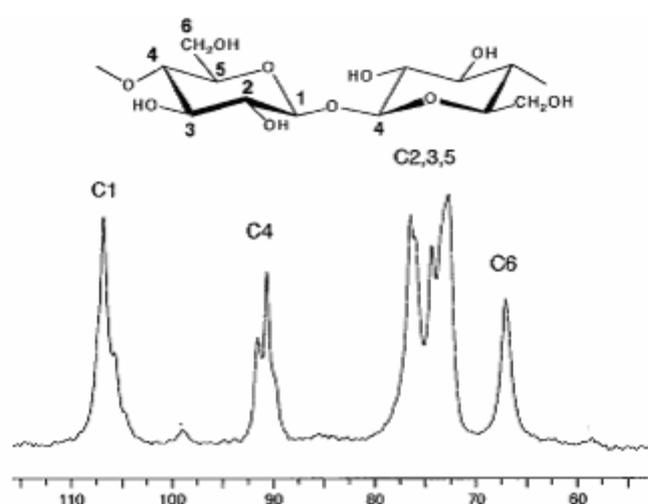


figura 2.26: spettro ^{13}C CPMAS della cellulosa (Kono et al., 2002).

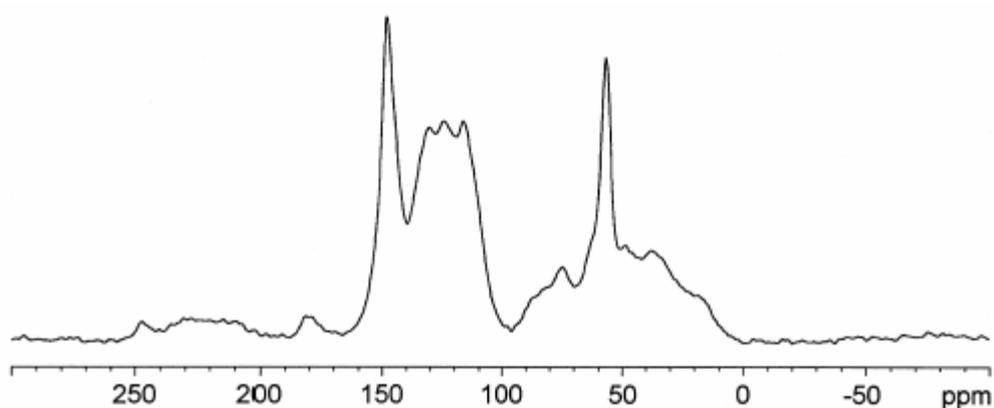


figura 2.27: spettro ^{13}C CPMAS della lignina (Smernik et al. 2000).

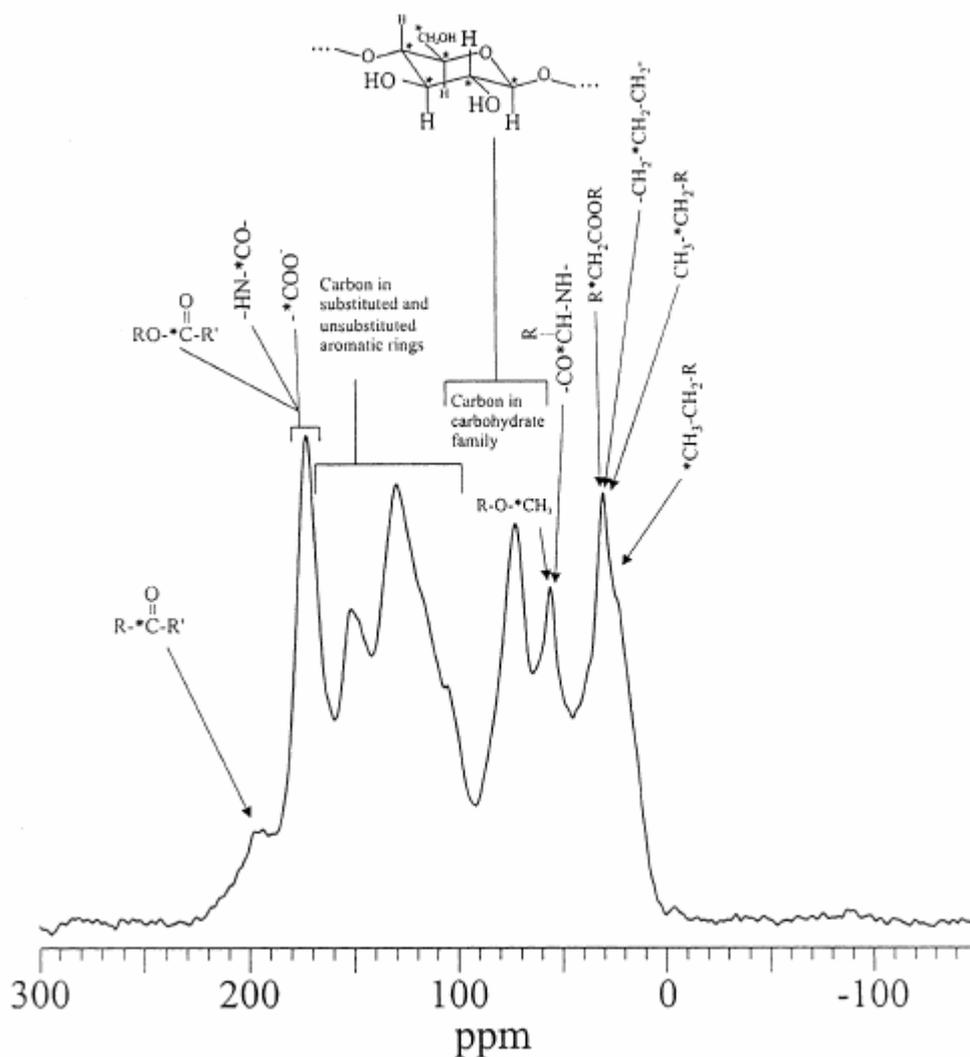


figura 2.28: spettro ^{13}C CPMAS di un acido umico (Keeler et al., 2003).

All'interno della *regione alchilica* (0-45 ppm) i carboni primari ($-\text{CH}_3$) in catene alchiliche risuonano fra 0 e 20 ppm circa, mentre i carboni secondari e terziari generalmente risuonano ad un chemical shift maggiore, fino a 60 ppm. I segnali dominanti in questa regione si trovano generalmente compresi fra 29 e 33 ppm e sono tipici di gruppi CH_3 di acetili alifatici e di gruppi CH_2 presenti comunemente in lunghe catene lipidiche e in biopolimeri alifatici, come suberine, cutine, resine e cere (Krull et al., 2003). Più in generale quindi, i segnali presenti nella regione alchilica si possono associare a lipidi estraibili (grassi e resine), lipidi legati (estraibili solo dopo idrolisi acida) e macromolecole di tipo cutinico (cere). Alcuni autori (Zech et al., 1994; Kögel et al., 1997; Dai et al., 2001; Ussiri et al., 2003) hanno mostrato che le strutture alchiliche sono

molto più recalcitranti rispetto alle strutture O-alchiliche; la loro abbondanza relativa aumenta con il procedere della decomposizione sia perché hanno maggiore resistenza agli attacchi microbici e sia perché i microrganismi stessi producono composti alchilici come prodotti metabolici della decomposizione di altre sostanze.

La *regione O-alchilica* (45-110 ppm) è generalmente dominata dai segnali di cellulose e di altri polisaccaridi. In particolare, i segnali in questa zona sono dovuti alla presenza di carbonio metossilico della lignina e di strutture proteiche (a circa 55 ppm), di alcoli primari (a circa 60 ppm), di alcoli secondari (a circa 70 ppm), di cellulosa (60-95 ppm) e di carboni anomerici tipici dei polisaccaridi (105 ppm); infine anche carboni amminici contribuiscono allo spettro in questa regione fra 50 e 110 ppm (Krull et al., 2003; Salloum et al., 2002; Ussiri et al., 2003).

La *regione aromatica* (110-165 ppm) riflette una combinazione di strutture ariliche, O-ariliche e olefiniche. In questa regione risuonano quindi i carboni di strutture aromatiche e insature come lignine, tannini e carbone di legna (Krull et al., 2003; Salloum et al., 2002). I chemical shift dei carboni aromatici dipendono molto dal grado e dal tipo di sostituzione dell'anello: il picco centrato a circa 115 ppm è associato a carboni aromatici protonati mentre quello a circa 135 ppm è dovuto a carboni aromatici sostituiti. Nelle strutture della lignina i carboni aromatici legati a gruppi OH e OCH₃ risuonano tra 145 e 155 ppm. Inoltre in questa regione risuonano i molteplici segnali di nuclei ¹³C nei sistemi aromatici condensati dell'acido umico (vedi figura 2.28). In generale, un suolo molto umificato sarà quindi caratterizzato da uno spettro ¹³C CPMAS con maggiore intensità relativa in questa regione spettrale.

I nuclei ¹³C che risuonano nella *regione carbonilica* (>165 ppm) possono essere attribuiti ad amidi, acidi carbossilici ed esteri (Ussiri et al., 2003; Krull et al., 2003; Kögel-Knabner, 1997). I gruppi carbossilici, esterei e ammidici non sono facilmente distinguibili l'uno dall'altro, ma nel suolo e nella sostanza vegetale i gruppi ammidici sono quelli che maggiormente contribuiscono a questa regione spettrale. Qualche volta può essere presente un segnale poco intenso ma largo centrato a circa 200 ppm attribuibile ad aldeidi, chetoni o chinoni.

Il contributo relativo di ogni tipo di carbonio allo spettro viene generalmente valutato integrando i segnali della zona di interesse. Le aree di ciascuna regione spettrale possono essere utilizzate per calcolare dei parametri utilizzati come indicatori per alcune proprietà della SOM. Uno di questi è il rapporto tra l'area della regione relativa al carbonio alchilico e quella della regione relativa al carbonio O-alchilico:

$$A/OA = \frac{C^{alchilico}}{C^{O-alchilico}} \quad (2.26)$$

Questo rapporto è ritenuto indicativo del grado di decomposizione dei residui di piante e animali in un suolo (Baldock et al., 1997) ed è tanto maggiore quanto più elevata è la decomposizione.

Un altro indice comunemente usato per valutare il grado di decomposizione della SOM è il cosiddetto grado di aromaticità, definito come:

$$\%Ar = \left[\frac{C^{Ar}}{C^{Ar} + C^{alchilico} + C^{O-alchilico}} \right] \times 100 \quad (2.27)$$

I carboni della regione carbonilica sono omessi dal calcolo dell'aromaticità perché non è noto se essi siano legati a strutture aromatiche o alifatiche (Schnitzer, 1991). Secondo una visione tradizionale, le sostanze contenenti nuclei aromatici tendono ad accumularsi con il procedere della decomposizione e dell'umificazione (Hatcher, 1981).

Anche se generalmente il contributo relativo di ogni tipo di carbonio allo spettro è valutato integrando i segnali della zona di interesse, è da tener presente che in un suolo intero un esperimento ^{13}C CPMAS non vede sempre tutti i nuclei di carbonio presenti. Questo è dovuto alle interazioni degli spin nucleari con gli spin di elettroni spaiati di ioni di metalli di transizione o radicali liberi presenti nel suolo che portano ad una riduzione drastica della magnetizzazione osservabile. Inoltre bisogna tener conto della non quantitatività intrinseca degli spettri CP discussa al paragrafo 2.3.2.

Per ovviare al primo problema i campioni di suolo vengono in genere pretrattati con acido fluoridrico in modo da rimuovere residui paramagnetici, soprattutto

ossidi di ferro. Questo trattamento porta anche ad una parziale distruzione della matrice minerale concentrando quindi la parte organica del suolo. Per ottenere segnali confrontabili, cioè con intensità non dipendenti dalla diversa dinamica di CP dei nuclei ^{13}C in diversi intorni chimici, sarebbe auspicabile applicare i coefficienti di correzione determinati sulla base dei valori di T_{CH} e $T_{1\rho}$ di ciascun tipo di carbonio (Keeler et al., 2003) (vedi equazioni 2.24 e 2.25). Tuttavia questa procedura, che implica la misurazione di questi tempi per ciascun tipo di nucleo ^{13}C che contribuisce allo spettro, e un'attribuzione dettagliata dei segnali, non viene generalmente seguita.

Introduzione alla spettroscopia ESR/EPR

(E. Laurenti - anno accademico 2005/06)

Indice

1. Generalità
2. Momento magnetico orbitale e momento magnetico di spin
 - 2.1 Momento magnetico orbitale
 - 2.2 Momento magnetico di spin
3. Interazione del momento magnetico con il campo magnetico applicato
4. L'esperimento ESR e la legge di Boltzmann
5. Strumentazione ESR
6. Interazione nucleare iperfine
 - 6.1 Lo spettro ESR dell'atomo di idrogeno
 - 6.2 Interazione iperfine con nuclei aventi $I > \frac{1}{2}$
 - 6.3 Interazione iperfine con più di un nucleo
 - 6.3.a Spettro ESR del radicale anione dell'acido glicolico
 - 6.3.b Spettro ESR del radicale anione idrossimetile
 - 6.3.c Spettro ESR del radicale idrossimetile
 - 6.3.d Spettro ESR del radicale metile
 - 6.4 Spettri ESR di radicali π
7. Regole pratiche per l'interpretazione degli spettri ESR
 - 7.1 Come ipotizzare correttamente lo spettro ESR di una specie nota
 - 7.2 Come interpretare lo spettro ESR di una specie ignota

1. Generalità

La risonanza magnetica elettronica è una branca della spettroscopia nella quale la radiazione elettromagnetica è assorbita da molecole, ioni o atomi che possiedono elettroni spaiati. Viene perciò utilizzata nello studio di: radicali organici, composti degli ioni dei metalli di transizione, solidi con difetti elettronici localizzati, sistemi con stati di tripletto, biradicali e sistemi con elettroni di conduzione.

Questo fenomeno viene designato con nomi diversi, ma sostanzialmente equivalenti, che hanno il solo scopo di enfatizzare aspetti differenti dello stesso fenomeno; i più comuni tra essi sono "Risonanza Paramagnetica Elettronica" (o EPR, da Electron Paramagnetic Resonance) e "Risonanza Elettronica di Spin" (o ESR, da Electron Spin Resonance).

Ci sono molte somiglianze ed alcune differenze tra le spettroscopie NMR ed ESR: in NMR i due stati di energia tra cui può avvenire la transizione (quando $I = \frac{1}{2}$) derivano dall'allineamento dei momenti magnetici nucleari in relazione con il campo applicato e la transizione può avvenire quando si applica una radiazione nel campo delle radiofrequenze. In ESR i differenti stati di energia derivano invece dalla interazione dei momenti di spin elettronico con il campo magnetico (il cosiddetto effetto Zeeman elettronico) mentre le transizioni si osservano applicando frequenze dell'ordine delle microonde.

Un'altra differenza tra le due spettroscopie dipende dal fatto che l'elettrone possiede sia un momento angolare intrinseco (o di spin) che un momento angolare orbitale (Fig. 1) ed entrambi questi fattori, in presenza di un campo magnetico applicato, generano un corrispondente momento magnetico di cui occorre tenere conto per descrivere correttamente il fenomeno ESR.

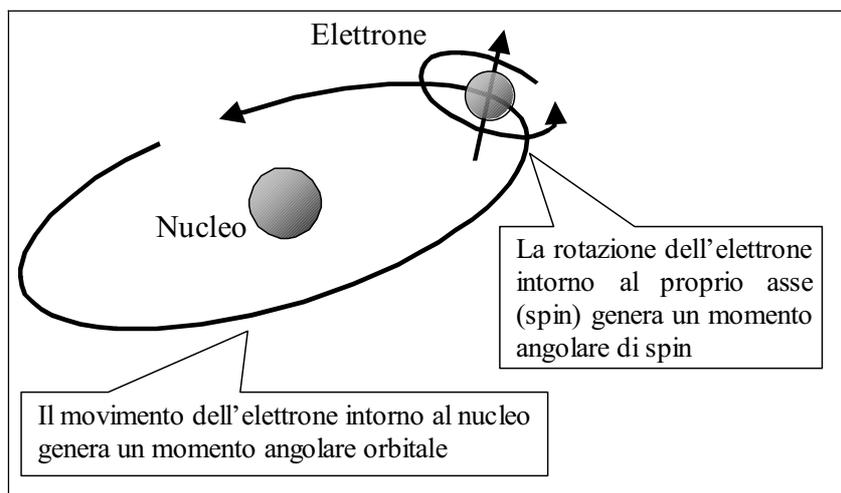
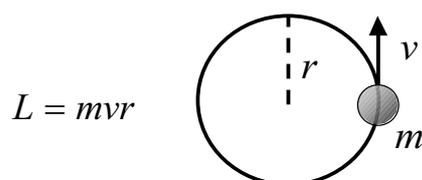


Fig.1: *Momento angolare orbitale e momento angolare di spin*

2. Momento magnetico orbitale e momento magnetico di spin

2.1 Momento magnetico orbitale

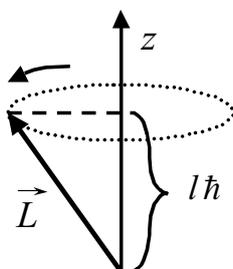
Sappiamo dalla fisica classica che il momento angolare L di una particella di massa m che percorre un'orbita circolare di raggio r con una velocità v , si può esprimere come segue:



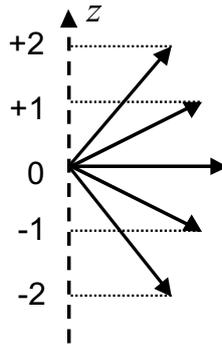
Poichè l'elettrone non percorre un'orbita circolare, ma segue le leggi della meccanica quantistica, questa espressione, anche se verrà utile in seguito per il calcolo del momento magnetico, non è il modo più corretto e preciso per esprimere il momento angolare orbitale. Dalla risoluzione dell'equazione di Schrodinger per le funzioni d'onda che descrivono l'atomo di idrogeno, si ottiene il numero quantico orbitale (o azimutale) l che determina il valore del momento angolare orbitale L secondo la relazione:

$$L = \sqrt{l(l+1)}\hbar$$

Il momento angolare orbitale L può essere visualizzato in termini di modello vettoriale in cui il vettore momento angolare \vec{L} precece lungo una direzione z dello spazio:



La componente del vettore momento angolare orbitale lungo la direzione z è quantizzata e può assumere (in unità di \hbar) solo i valori permessi per il numero quantico magnetico m_l (cioè $m_l = l, l-1, \dots, -l$). Ad esempio per $l = 2$ (orbitali d) avremo $m_l = +2, +1, 0, -1, -2$ come rappresentato in figura:



Associato al momento angolare orbitale c'è un momento magnetico orbitale μ_l che si può trattare come si fa nella fisica classica per una particella di carica q che ruota con un'orbita di raggio r . In questo caso il momento magnetico μ è dato da:

$$\mu = IA \text{ (dove } I \text{ è l'intensità della corrente e } A \text{ è l'area dell'orbita).}$$

poiché: $I = \frac{q}{T}$ (con T periodo dell'orbita dato da $\frac{v}{2\pi r}$) e $q = -e$, si ha: $I = -\frac{e}{T} = -\frac{ev}{2\pi r}$, che si può

anche scrivere: $I = -\frac{em_e vr}{2\pi m_e r^2}$ se si moltiplicano numeratore e denominatore per $m_e r$ (in cui m_e è la massa dell'elettrone).

A questo punto, introducendo nell'equazione del momento magnetico sia l'espressione appena calcolata che la formula per l'area dell'orbita ($A = \pi r^2$) e semplificando si ottiene:

$$\mu = IA = -\frac{em_e vr \pi r^2}{2\pi m_e r^2} = -\frac{em_e vr}{2m_e}$$

Ricordando ora che, come avevamo scritto prima, il momento angolare orbitale dell'elettrone può essere scritto come $L = m_e vr$, possiamo modificare l'equazione precedente per ottenere l'espressione:

$$\mu_l = -\frac{e}{2m_e} L$$

Poiché il momento angolare orbitale è quantizzato, lo è anche il momento magnetico orbitale ad esso associato, perciò:

$$\mu_l = -\frac{e}{2m_e} \sqrt{l(l+1)} \hbar$$

se riuniamo tutte le costanti in un unico valore, il magnetone di Bohr per l'elettrone $\beta_e = \frac{e\hbar}{2m_e}$,

l'espressione precedente diventa:

$$\mu_l = -\sqrt{l(l+1)} \beta_e$$

Anche per il momento magnetico orbitale μ_l la componente lungo l'asse z è quantizzata e può assumere solo valori corrispondenti a m_l , quindi:

$$\mu_z = -m_l \beta_e$$

2.2 Momento magnetico di spin

Nel 1921, in uno degli esperimenti fondamentali sulla struttura della materia, Stern e Gerlach fecero passare un fascio di atomi di argento attraverso un campo magnetico ed osservarono che essi venivano deviati dal campo e suddivisi in due fasci ristretti con angoli opposti rispetto alla direzione iniziale (Fig. 2).

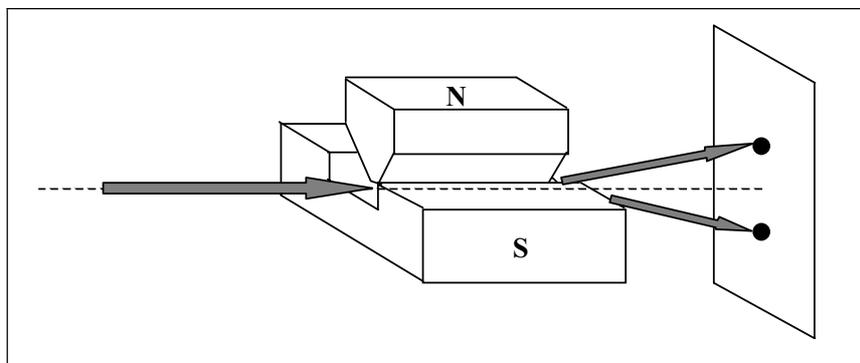
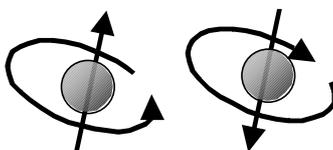


Fig. 2: Esperimento di Stern-Gerlach

La scelta di utilizzare atomi di argento nasceva dalla considerazione che essi possiedono un elettrone spaiato in un orbitale di tipo s (la configurazione elettronica dell'argento è $[\text{Kr}], 4d^{10}, 5s^1$), che ha ovviamente un numero quantico orbitale $l = 0$ e perciò anche un momento angolare orbitale uguale a zero. Quindi non ci sarebbe dovuta essere in teoria alcuna interazione con il campo magnetico, ma l'esperimento mostrò invece che gli atomi di argento possedevano un momento magnetico netto (e quantizzato) che non può avere logicamente origine dal momento angolare orbitale.

Furono poi Goudsmith e Uhlenbeck nel 1925 che, postularono l'esistenza di un momento angolare intrinseco per l'elettrone, indipendente dalle sue caratteristiche orbitali, e introdussero il concetto di spin elettronico e quindi la necessità di un quarto numero quantico per descrivere gli elettroni in maniera completa.

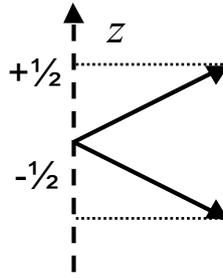
L'idea di spin elettronico si può associare al concetto di elettrone come sfera che ruota intorno al proprio asse. Dato che una carica che gira su se stessa genera un campo magnetico la cui direzione dipende dal senso di rotazione, due spin opposti generano due campi magnetici orientati in direzioni opposte:



Gli elettroni dunque possiedono uno spin elettronico $s = \frac{1}{2}$ ed un momento angolare di spin S i cui valori sono quantizzati e la cui espressione è analoga a quella già vista per il momento angolare orbitale L :

$$S = \sqrt{s(s+1)}\hbar$$

Anche in questo caso la componente del vettore momento angolare di spin lungo la direzione z può assumere (in unità di \hbar) solo i valori permessi dal numero quantico magnetico di spin $m_s = \pm\frac{1}{2}$ come rappresentato nella figura seguente:



Se si prova a calcolare il momento magnetico di spin con le stesse considerazioni già usate per il momento magnetico orbitale, si arriva ad ottenere per la componente lungo l'asse z del momento magnetico di spin elettronico una espressione analoga alla precedente, tuttavia ci si accorge che occorre introdurre un fattore di proporzionalità g (o fattore di Landè) per essere in accordo con i valori misurati sperimentalmente. Per l'elettrone libero il fattore g vale circa 2, quindi il momento magnetico di spin è circa il doppio del momento magnetico orbitale e va espresso come segue:

$$\mu_s = -\sqrt{s(s+1)}g\beta_e$$

E analogamente a quanto visto prima, il momento magnetico di spin può assumere lungo la direzione z solo i valori:

$$\mu_z = -m_s g \beta_e$$

Il fattore g , come vedremo meglio in seguito, è un parametro utilizzato in ESR per descrivere le molecole mentre nella spettroscopia NMR, al contrario, il valore di g del nucleo (g_N) è considerato costante e per descrivere le differenze tra i vari nuclei si introduce la costante di schermo σ . Attraverso la determinazione dell'energia richiesta per una precisa transizione nell'atomo di idrogeno il fattore g è stato misurato accuratamente per l'elettrone libero e il suo valore è:

$$g_e = 2.002319304386.$$

Nella descrizione della spettroscopia ESR il momento angolare di spin e quello orbitale possono essere considerati separatamente, tranne quando occorre introdurre una correzione per tener conto delle cosiddette interazioni spin-orbita (come accade principalmente nel caso degli ioni dei metalli di transizione).

Poiché i radicali liberi hanno quasi sempre un momento angolare orbitale approssimabile a zero, l'interazione spin-orbita è molto piccola e quindi la descrizione dei fenomeni che avvengono in questo caso può essere fatta utilizzando solo il momento magnetico associato al momento angolare di spin.

3. Interazione del momento magnetico con il campo magnetico applicato

Che cosa succede ad un atomo o ad una molecola che possiede un momento elettronico non nullo quando viene introdotto in un campo magnetico esterno? Essenzialmente esso si comporta come un dipolo magnetico e perciò possiede una energia potenziale (E) che dipende dalla sua orientazione rispetto al campo applicato. Questa energia può essere espressa in termini di momento di dipolo magnetico ed è data dal prodotto scalare tra il momento magnetico del dipolo (μ) ed il campo (B) come rappresentato nella seguente figura (Fig. 3):

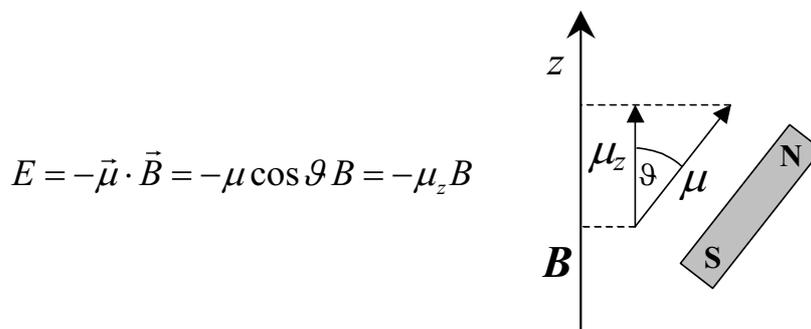


Fig.3: Energia potenziale di un dipolo in un campo magnetico

Come si osserva dalla figura, l'energia E è al minimo quando il dipolo è allineato con il campo applicato ($\vartheta = 0^\circ$). Se nell'equazione precedente si sostituisce a μ_z l'espressione del momento magnetico di spin calcolata in precedenza si ha:

$$E = -\mu_z B = m_s g \beta_e B$$

Quindi l'energia degli elettroni dipende dal valore del numero quantico magnetico di spin e dall'intensità del campo applicato, perciò la possiamo rappresentare come nella seguente Fig. 4:

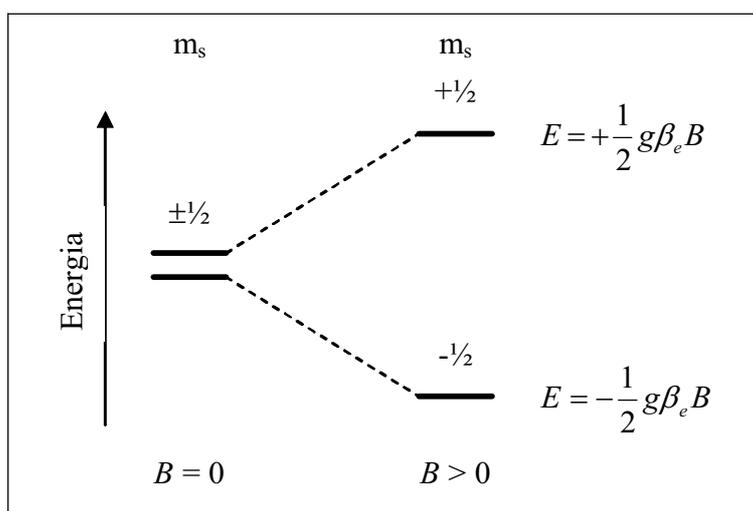


Fig. 4: Le energie degli elettroni immersi in un campo magnetico

In assenza di campo magnetico i due livelli energetici degli elettroni sono degeneri, la presenza del campo magnetico applicato rimuove la degenerazione tra i livelli e la differenza tra i due valori di energia (livelli di Zeeman) aumenterà linearmente con l'aumentare dell'intensità del campo. L'espressione di tale differenza di energia sarà data semplicemente da:

$$\Delta E = +\frac{1}{2} g \beta_e B - \left(-\frac{1}{2} g \beta_e B \right) = g \beta_e B$$

Per poter introdurre successivamente alcuni concetti importanti per l'interpretazione degli spettri ESR è utile esprimere queste energie utilizzando i concetti e i metodi della meccanica quantistica. L'energia del sistema può anche essere espressa come:

$$\hat{H}\Psi_i = E_i \Psi_i$$

in cui \hat{H} è l'operatore per l'energia chiamato operatore Hamiltoniano di spin che agisce sulle due funzioni di spin elettronico α e β corrispondenti, rispettivamente, a $m_s = +\frac{1}{2}$ e $-\frac{1}{2}$.

Poichè la stessa Ψ_i è autofunzione dell'energia e della componente lungo l'asse z del momento angolare di spin, possiamo scrivere per i due stati di spin:

$$\hat{H}|\alpha\rangle = E_\alpha|\alpha\rangle \quad \text{e} \quad \hat{H}|\beta\rangle = E_\beta|\beta\rangle$$

Tenendo presente l'equazione scritta in precedenza per il momento magnetico di spin, si può in maniera analoga scrivere che l'operatore momento magnetico $\hat{\mu}_z$ è proporzionale all'operatore di spin \hat{S}_z :

$$\hat{\mu}_z = -g\beta_e\hat{S}_z$$

Combinando questa equazione con quella che esprime l'energia di un dipolo magnetico si ottiene l'espressione dell'Hamiltoniano elettronico:

$$\hat{H}_e = g\beta_e B\hat{S}_z$$

cioè per ciascun valore di \hat{S}_z :

$$\hat{H}|\alpha\rangle = g\beta_e B\hat{S}_z|\alpha\rangle = +\frac{1}{2}g\beta_e B|\alpha\rangle \quad \text{e} \quad \hat{H}|\beta\rangle = g\beta_e B\hat{S}_z|\beta\rangle = -\frac{1}{2}g\beta_e B|\beta\rangle$$

da cui si ottiene, esattamente come in precedenza:

$$E_\alpha = +\frac{1}{2}g\beta_e B \quad \text{e} \quad E_\beta = -\frac{1}{2}g\beta_e B$$

e quindi nuovamente:

$$\Delta E = E_\alpha - E_\beta = +\frac{1}{2}g\beta_e B - \left(-\frac{1}{2}g\beta_e B\right) = g\beta_e B$$

4. L'esperimento ESR e la legge di Boltzmann

La transizione tra i due livelli energetici che si ottengono per effetto del campo applicato può essere indotta da una radiazione elettromagnetica di frequenza ν tale che la sua energia ($h\nu$) sia uguale a ΔE . In queste condizioni possiamo perciò scrivere l'equazione di risonanza:

$$h\nu = g\beta_e B$$

L'esperimento ESR consiste quindi nel mandare sul campione un fascio di microonde di frequenza opportuna ed eseguire una scansione di campo magnetico sino a raggiungere un valore tale da raggiungere la condizione di risonanza.

Alle condizioni di risonanza l'energia fornita dalle microonde permette le transizioni tra i due livelli di energia e quindi, essenzialmente, provoca l'inversione dell'allineamento degli spin rispetto alla direzione del campo magnetico (Fig. 5):

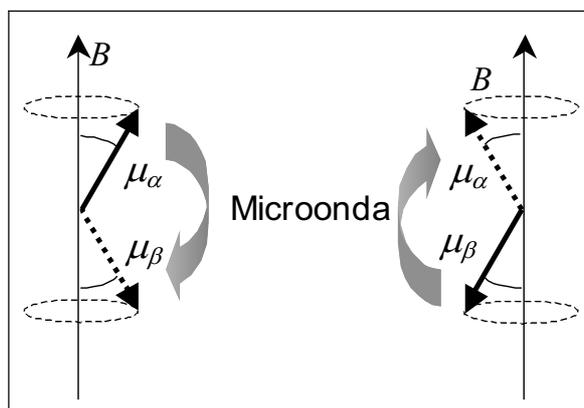


Fig. 5: *Inversione degli spin per effetto delle microonde*

Ciascuna delle due transizioni comporta l'acquisizione o il rilascio esattamente della stessa quantità di energia da parte del sistema (Fig. 6), quindi se le due popolazioni di spin fossero uguali tra loro si avrebbe uguaglianza tra energia assorbita e rilasciata e quindi un trasferimento netto di energia tra il sistema paramagnetico e l'esterno pari a zero.

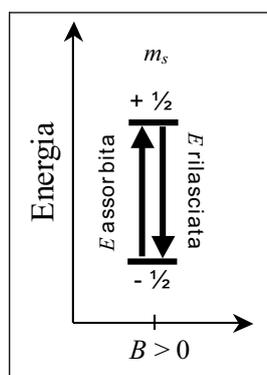


Fig. 6: *Energia delle transizioni*

Fortunatamente gli elettroni seguono la legge di Boltzmann che predice il rapporto tra le popolazioni di spin in funzione della temperatura, della differenza di energia e della costante di Boltzmann (k_B):

$$\frac{n^\circ \text{elettroni}_\alpha}{n^\circ \text{elettroni}_\beta} = e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}}$$

Nelle normali condizioni sperimentali, il livello energetico inferiore ($n^\circ \text{elettroni}_\beta$) sarà sempre leggermente più popolato di quello superiore ($n^\circ \text{elettroni}_\alpha$) e il risultato dell'esperimento ESR sarà perciò, in prima istanza, una curva di assorbimento simile a quella che si potrebbe ottenere con una scansione di lunghezze d'onda in uno spettrofotometro e che avrà il suo massimo al valore di campo magnetico in cui è valida l'equazione di risonanza.

In realtà la spettroscopia ESR presenta una particolarità: poiché le curve di assorbimento in ESR sono tendenzialmente larghe e con un basso rapporto segnale/rumore, si invia sul campione una seconda radiazione elettromagnetica (perpendicolare a quella che arriva dalla sorgente di microonde) scelta opportunamente in modo da produrre come risultato la derivata prima della curva di assorbimento e ottenendo così un netto miglioramento della qualità del segnale (Fig.7).

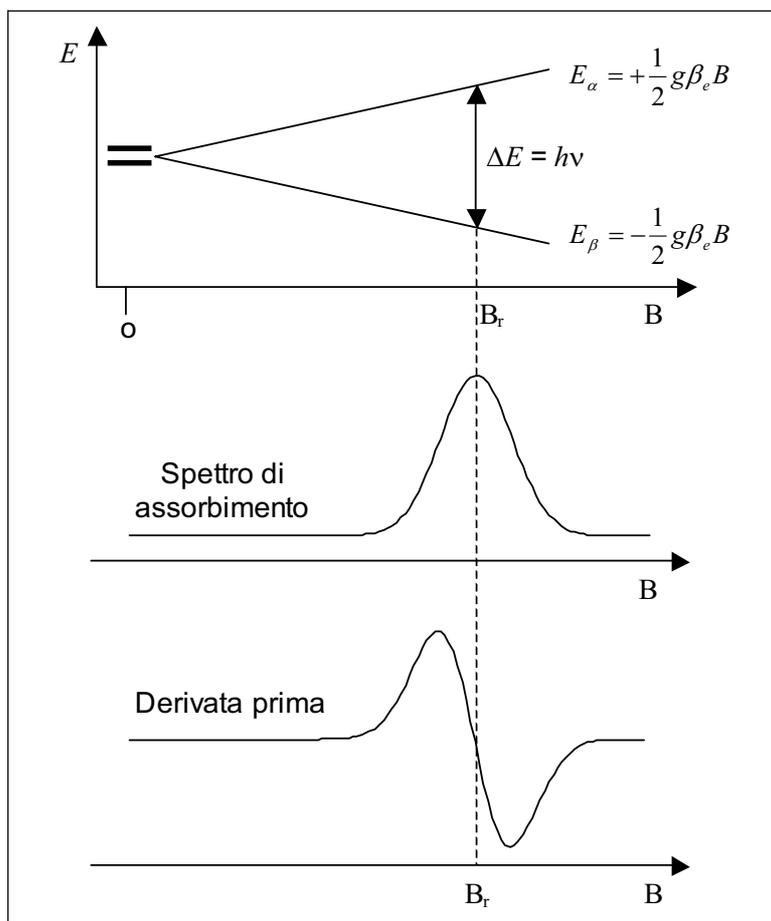


Fig. 7: Segnale ESR dell'elettrone libero

Il valore di g per la specie che si sta esaminando si può calcolare inserendo nella equazione di risonanza i termini noti (h , ν , β_e) e utilizzando il valore di campo magnetico (B_r) corrispondente al massimo della curva di assorbimento (o al punto di flesso della derivata):

$$h\nu = g\beta_e B_r \quad \text{e quindi:} \quad g = \frac{h\nu}{\beta_e B_r}$$

5. Strumentazione ESR

In linea di principio le condizioni di risonanza si possono ottenere con una coppia qualsiasi di valori di intensità di campo magnetico e di frequenza della radiazione elettromagnetica. Esistono però molti problemi pratici da superare nella costruzione di sorgenti di microonde in grado di generare un fascio di radiazioni stabili e di frequenza precisa e pertanto si sono andate affermando nel tempo alcune tipologie ben definite di strumenti caratterizzate dalle coppie di valori (dette "bande") riportati nella seguente tabella:

Banda	Range frequenza (GHz)	Campo magnetico (Gauss)
L	1 – 2	500
S	2 – 4	1000
X	9 – 10	3400
K	24	8500
Q	34	12100
W	94	33500

Nella seguente figura 8 è riportato lo schema di un tipico spettrometro ESR in banda X, la tipologia più comune di strumento che si può trovare nei laboratori di ricerca:

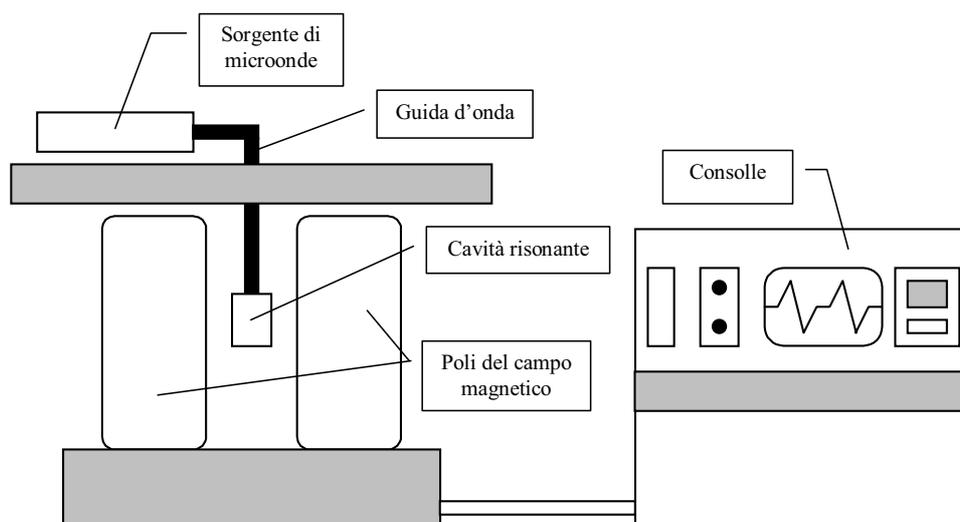


Fig. 8: *Schema di uno spettrometro ESR*

La parti principali dello strumento sono:

1. **campo magnetico**: è generato da un elettromagnete, solitamente raffreddato ad acqua, che è in grado di fornire un campo stabile ed uniforme nella zona in cui viene posto il campione. Utilizza una sonda di Hall per controllare le eventuali variazioni di intensità del campo e per stabilizzarlo sia in condizioni statiche che durante le scansioni.
2. **sorgente di microonde**: può essere un diodo-gunn o un klystron, in entrambi i casi può generare un fascio di microonde a una frequenza precisa e costante compresa tra i 9 e i 10 GHz. Il fascio di microonde generato dalla sorgente viene inviato al campione tramite la guida d'onda.
3. **cavità risonante**: è la cavità in cui viene posto il campione, si trova al centro dei poli del campo magnetico e riceve le microonde per mezzo della guida d'onda. La cavità è disegnata in modo da ottenere al suo interno una distribuzione regolare delle linee di forza del campo magnetico generato dalla radiazione elettromagnetica che arriva dalla sorgente e perpendicolare al campo magnetico statico generato dall'elettromagnete.

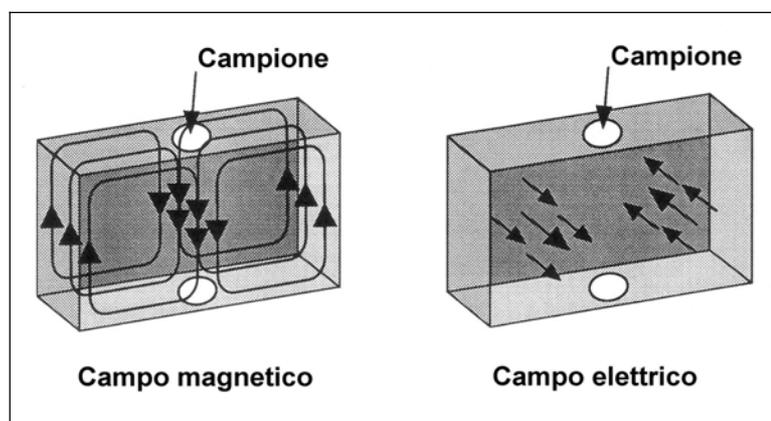


Fig. 9: *Distribuzione delle linee di forza in una cavità risonante rettangolare*

Il campione è solitamente inserito in un tubo di quarzo (materiale privo di impurezze paramagnetiche) di 3-5 mm di diametro che viene introdotto nella cavità e fissato in posizione mediante dei supporti.

Nelle pareti laterali della cavità risonante si trovano le bobine che modulano l'ampiezza del segnale (solitamente ad una frequenza di 100KHz) generando la derivata prima della curva di assorbimento (Fig. 10):

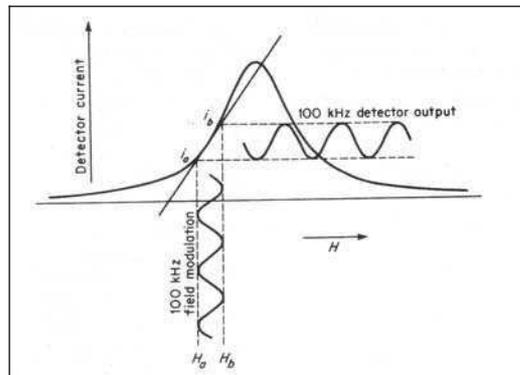


Fig. 10: Effetto della modulazione del segnale ESR

4. consolle: è l'interfaccia tra lo spettrometro e l'utente da cui si possono effettuare tutte le regolazioni e l'impostazione dei parametri per la registrazione degli spettri. Comprende anche uno schermo su cui visualizzare gli spettri, negli strumenti più recenti è spesso sostituita da un normale personal computer collegato al resto dell'apparecchiatura.

6. Interazione nucleare iperfine

Se l'interazione di un elettrone con il campo magnetico provocasse solo la separazione dei livelli di spin visti in precedenza, gli spettri ESR consisterebbero tutti di una sola linea e l'unica informazione utile deriverebbe dal calcolo del valore di g . Fortunatamente esistono altre interazioni che arricchiscono gli spettri ESR di varie componenti.

La prima interazione ha origine dai nuclei vicini al dipolo magnetico di spin elettronico. Alcuni nuclei possiedono infatti un intrinseco momento angolare di spin (I) a cui, come già visto per gli elettroni, è associato un momento magnetico. Di conseguenza, il campo magnetico effettivo di cui risentono gli elettroni è anche funzione del campo magnetico generato dai nuclei.

I meccanismi che stanno alla base della interazione iperfine sono sostanzialmente due: interazione dipolo-dipolo e interazione di contatto.

Il primo di questi consiste nell'interazione classica dipolo-dipolo fra i due dipoli magnetici che sono associati ai momenti angolari di spin elettronico e nucleare. Infatti un dipolo magnetico genera intorno a sé in ogni punto P , un campo magnetico la cui intensità dipende dall'inverso del cubo della distanza di P dal dipolo e la cui direzione dipende dalla direzione relativa del dipolo e della congiungente di quest'ultimo con P .

Poiché nel caso dei radicali liberi in fase acquosa a temperatura ambiente la direzione succitata cambia molto rapidamente nel tempo, il campo magnetico indotto deve quindi essere mediato, ma la media pesata su tutte le direzioni in questo caso è nulla perciò questo contributo sul campo di cui risente lo spin elettronico è anch'esso nullo.

Il secondo meccanismo è quello della interazione di contatto, o di Fermi, che si stabilisce quando un dipolo magnetico, lo spin elettronico, entra in contatto con il secondo dipolo magnetico, il nucleo. Questa interazione è di natura quantistica poiché due dipoli magnetici classici non possono ovviamente compenetrarsi.

L'energia dovuta all'interazione di contatto dipende dalla orientazione reciproca dei due dipoli e dalla probabilità che un dipolo sia presente nell'altro, ed è data dall'espressione:

$$E_{cont} = -\frac{8\pi}{3} \mu_e \mu_N |\psi(0)|^2$$

in cui $\psi(0)$ è la funzione d'onda che descrive l'elettrone spaiato nel punto in cui si trova il nucleo. Poichè, analogamente a quanto visto in precedenza per l'elettrone, anche per il nucleo vale la relazione:

$$\hat{\mu}_N = g_N \beta_N \hat{I}_z$$

in cui il segno meno è sparito per effetto della carica positiva del nucleo, l'equazione dell'operatore Hamiltoniano relativo alla interazione iperfine sarà:

$$\hat{H}_{iperfine} = \frac{8\pi}{3} g \beta_e g_N \beta_N |\psi(0)|^2 \hat{S}_z \hat{I}_z = A \hat{S}_z \hat{I}_z$$

in cui si raggruppano i termini costanti nella **costante di accoppiamento iperfine A**.

A questo punto per completezza occorre scrivere ancora l'equazione dell'operatore hamiltoniano per l'interazione nucleare di Zeeman (\hat{H}_N) anche se le modificazioni energetiche che comporta questo termine sono più piccole di quelle dovute allo Zeeman elettronico:

$$\hat{H}_N = -g_N \beta_N B \hat{I}_z$$

Ne consegue che l'Hamiltoniano di spin completo sarà:

$$\hat{H} = \hat{H}_e + \hat{H}_N + \hat{H}_{iperfine} = g \beta_e B \hat{S}_z - g_N \beta_N B \hat{I}_z + A \hat{S}_z \hat{I}_z$$

Sostituendo agli operatori di spin i valori dei numeri quantici m_s ed m_I , l'espressione dell'energia diventa:

$$E = m_s g \beta_e B - m_I g_N \beta_N B + A m_s m_I$$

6.1 Lo spettro ESR dell'atomo di idrogeno

Il sistema più semplice che mostra una interazione nucleare iperfine è l'atomo di idrogeno ($S = 1/2$, $I = 1/2$), trattiamolo distinguendo i diversi livelli di energie:

a) Energie di ordine zero: riguardano gli Hamiltoniani di Zeeman elettronico e nucleare. Esistono due possibili funzioni di spin per l'elettrone e due per il nucleo che possono essere espresse nei termini delle seguenti equazioni di operatori:

$$\begin{aligned} \hat{S}_z |\alpha_e\rangle &= +\frac{1}{2} |\alpha_e\rangle & \hat{I}_z |\alpha_N\rangle &= +\frac{1}{2} |\alpha_N\rangle \\ \hat{S}_z |\beta_e\rangle &= -\frac{1}{2} |\beta_e\rangle & \hat{I}_z |\beta_N\rangle &= -\frac{1}{2} |\beta_N\rangle \end{aligned}$$

Ciascuna orientazione dello spin elettronico può essere associata con una delle due orientazioni dello spin nucleare per cui possono essere scritte le seguenti funzioni di base come prodotto di una parte elettronica e di una nucleare:

$$\Phi_1 = |\alpha_e \beta_N\rangle \quad \Phi_2 = |\alpha_e \alpha_N\rangle \quad \Phi_3 = |\beta_e \beta_N\rangle \quad \Phi_4 = |\beta_e \alpha_N\rangle$$

Questi quattro stati sono inizialmente degeneri ma, per effetto del campo magnetico applicato si separano in quattro differenti livelli di energia:

$$E_1 = +\frac{1}{2}g\beta_e B + \frac{1}{2}g_N\beta_N B$$

$$E_2 = +\frac{1}{2}g\beta_e B - \frac{1}{2}g_N\beta_N B$$

$$E_3 = -\frac{1}{2}g\beta_e B + \frac{1}{2}g_N\beta_N B$$

$$E_4 = -\frac{1}{2}g\beta_e B - \frac{1}{2}g_N\beta_N B$$

b) Energie di primo ordine: si considera l'effetto dell'Hamiltoniano dell'interazione iperfine sulle funzioni d'onda di ordine zero. L'operatore $\hat{S}_z\hat{I}_z$ moltiplica semplicemente ciascuna funzione di spin di un fattore $\pm 1/2$ per il nucleo e $\pm 1/2$ per l'elettrone, ottenendo una matrice diagonale per $A\hat{S}_z\hat{I}_z$:

$$\langle \alpha_e\alpha_N | A\hat{S}_z\hat{I}_z | \alpha_e\alpha_N \rangle = +\frac{1}{4}A$$

$$\langle \alpha_e\beta_N | A\hat{S}_z\hat{I}_z | \alpha_e\beta_N \rangle = -\frac{1}{4}A$$

$$\langle \beta_e\alpha_N | A\hat{S}_z\hat{I}_z | \beta_e\alpha_N \rangle = -\frac{1}{4}A$$

$$\langle \beta_e\beta_N | A\hat{S}_z\hat{I}_z | \beta_e\beta_N \rangle = +\frac{1}{4}A$$

Questi fattori vanno a sommarsi algebricamente ai valori delle energie di ordine zero mostrati sopra. Il risultato di queste operazioni si può efficacemente riassumere nella seguente Fig. 11:

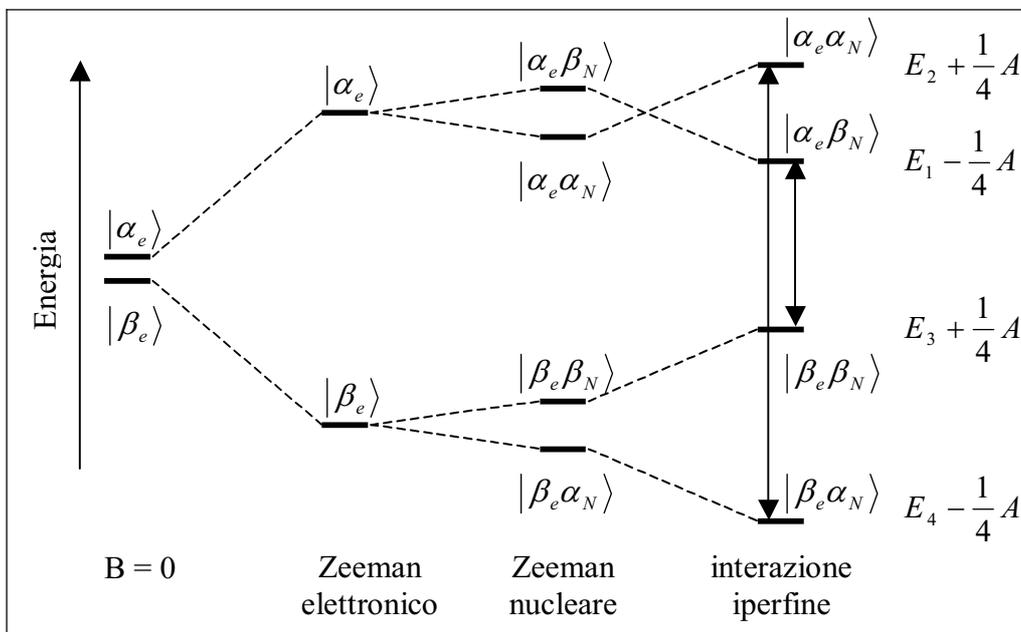


Fig. 11: *Distribuzione dei livelli energetici nell'atomo di idrogeno*

Le frecce rappresentano le transizioni possibili. Si può infatti dimostrare che le uniche transizioni a probabilità non nulla sono:

$$\alpha_e\alpha_N \leftrightarrow \beta_e\alpha_N \quad e \quad \alpha_e\beta_N \leftrightarrow \beta_e\beta_N$$

E quindi si può scrivere, più in generale, che le transizioni permesse sono quelle che modificano solamente l'orientazione degli spin elettronici e quindi obbediscono alle seguenti regole di selezione:

$$\Delta m_s = \pm 1 \quad \Delta m_l = 0$$

Le differenze di energia necessarie per far avvenire le due transizioni sono:

$$\begin{aligned} \Delta E_\alpha &= \left(E_2 + \frac{1}{4} A \right) - \left(E_4 - \frac{1}{4} A \right) = \left(+\frac{1}{2} g\beta_e B - \frac{1}{2} g_N \beta_N B + \frac{1}{4} A \right) - \left(-\frac{1}{2} g\beta_e B - \frac{1}{2} g_N \beta_N B - \frac{1}{4} A \right) \\ \Delta E_\beta &= \left(E_1 - \frac{1}{4} A \right) - \left(E_3 + \frac{1}{4} A \right) = \left(+\frac{1}{2} g\beta_e B + \frac{1}{2} g_N \beta_N B - \frac{1}{4} A \right) - \left(-\frac{1}{2} g\beta_e B + \frac{1}{2} g_N \beta_N B + \frac{1}{4} A \right) \end{aligned}$$

In entrambi i casi i termini derivanti dallo Zeeman nucleare si annullano mentre gli altri si sommano, perciò si ottiene infine:

$$\Delta E_\alpha = g\beta_e B + \frac{1}{2} A \quad e \quad \Delta E_\beta = g\beta_e B - \frac{1}{2} A$$

Nelle normali condizioni sperimentali degli strumenti ESR, cioè con frequenza di microonde costante e campo magnetico variabile, l'energia a cui avvengono le transizioni sarà sempre pari a quella fornita dalle microonde ($h\nu$), perciò dobbiamo rivedere i concetti appena espressi da un altro punto di vista. Possiamo infatti considerare $h\nu = \Delta E_\alpha = \Delta E_\beta$ e scrivere:

$$h\nu = g\beta_e B_1 + \frac{1}{2} A \quad e \quad h\nu = g\beta_e B_2 - \frac{1}{2} A$$

e poi risolvere le due equazioni precedenti in modo da ottenere i due valori di campo magnetico B_1 e B_2 a cui effettivamente avverranno le transizioni:

$$B_1 = \frac{h\nu}{g\beta_e} - \frac{1}{2} \frac{A}{g\beta_e} \quad e \quad B_2 = \frac{h\nu}{g\beta_e} + \frac{1}{2} \frac{A}{g\beta_e}$$

semplifichiamo queste equazioni definendo **la costante di separazione iperfine a** (da non confondersi con la **costante di accoppiamento iperfine A**) come: $a = \frac{A}{g\beta_e}$. Quindi avremo:

$$B_1 = \frac{h\nu}{g\beta_e} - \frac{1}{2} a \quad e \quad B_2 = \frac{h\nu}{g\beta_e} + \frac{1}{2} a$$

Lo spettro dell'atomo di idrogeno sarà quindi formato da due righe che cadono ai valori di campo B_1 e B_2 . L'effetto della interazione iperfine è quindi quello di splittare in due la riga singola dello spettro dell'elettrone spostandola rispettivamente di $-\frac{1}{2} a$ e $+\frac{1}{2} a$, perciò la distanza tra di esse è pari alla costante di separazione iperfine a .

In Fig 12 sono riassunti l'andamento dei livelli energetici in funzione dell'intensità del campo magnetico e lo spettro ESR risultante per l'atomo di idrogeno confrontato con quello dell'elettrone libero (spettro a campo $B_0 = \frac{h\nu}{g\beta_e}$, tratteggiato).

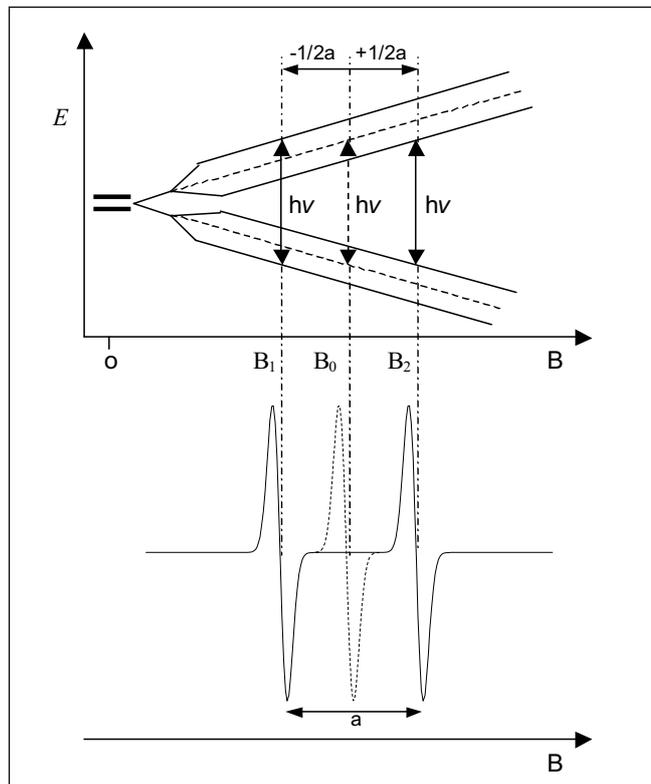


Fig. 12: Spettro ESR dell'atomo di idrogeno

6.2 Interazione iperfine con nuclei aventi $I > \frac{1}{2}$

Le energie di primo ordine dei livelli energetici nell'atomo di idrogeno possono essere scritte in un modo più semplice se si ignora l'effetto dello Zeeman nucleare:

$$E = g\beta_e B m_s + a m_s m_i$$

Questa approssimazione si può fare perchè l'effetto dello Zeeman nucleare (che è comunque piccolo se paragonato agli altri due termini) non interferisce sulla differenza di energia tra i due livelli tra cui avvengono le transizioni come abbiamo visto prima ricavando i valori di ΔE . Utilizzando quindi i valori possibili di m_s e m_i la figura vista in precedenza può essere semplificata come segue:

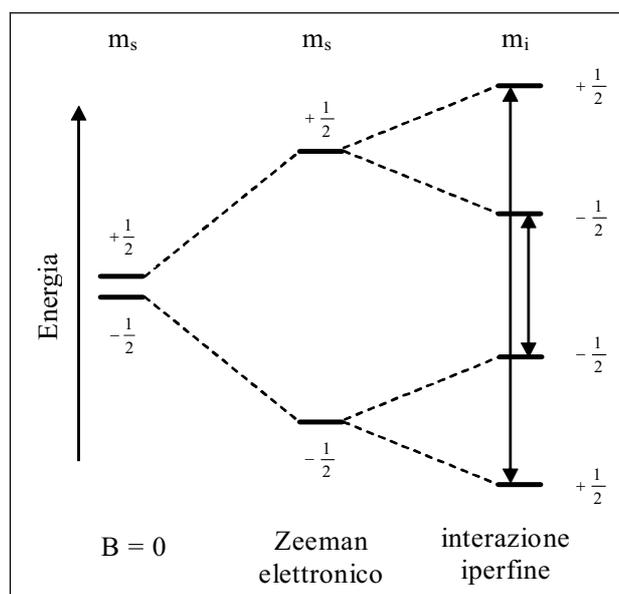


Fig. 13: Schema semplificato dei livelli energetici nell'atomo di idrogeno

La sostituzione dei valori di m_s e m_i ci riporta esattamente nella situazione vista prima:

$$\Delta E_\alpha = \left(+\frac{1}{2}g\beta_e B + \frac{1}{4}A \right) - \left(-\frac{1}{2}g\beta_e B - \frac{1}{4}A \right) = g\beta_e B + \frac{1}{2}A$$

$$\Delta E_\beta = \left(+\frac{1}{2}g\beta_e B - \frac{1}{4}A \right) - \left(-\frac{1}{2}g\beta_e B + \frac{1}{4}A \right) = g\beta_e B - \frac{1}{2}A$$

Questa notazione più semplice si può utilizzare anche per nuclei con $I > \frac{1}{2}$. Bisogna solo ricordare che la proiezione del momento magnetico nucleare lungo la direzione z del campo applicato (m_i) può valere tutti i valori compresi tra $+I, I - 1, \dots, -I$ e quindi il numero totale dei livelli possibili è pari a $2I+1$.

Il caso più comune è quello del ^{14}N che ha $I=1$, in questo caso i livelli energetici possibili sono sei e le transizioni permesse dalle solite regole di selezione saranno tre, come si può vedere nella figura seguente:

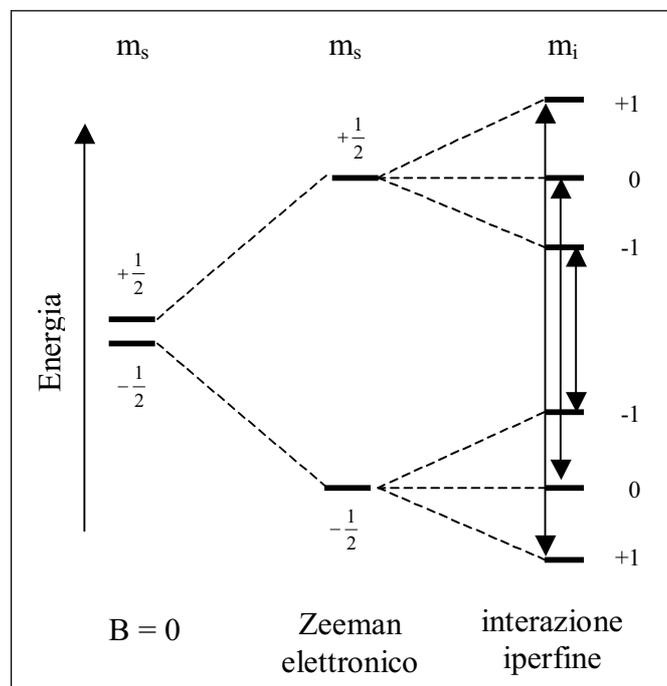


Fig. 14: Livelli energetici nell'atomo di ^{14}N

Le energie in gioco saranno dunque, in ordine decrescente:

$$E_1 = +\frac{1}{2}g\beta_e B + \frac{1}{2}A \quad E_2 = +\frac{1}{2}g\beta_e B \quad E_3 = +\frac{1}{2}g\beta_e B - \frac{1}{2}A$$

$$E_4 = -\frac{1}{2}g\beta_e B + \frac{1}{2}A \quad E_5 = -\frac{1}{2}g\beta_e B \quad E_6 = -\frac{1}{2}g\beta_e B - \frac{1}{2}A$$

E le differenze di energia per le transizioni permesse saranno:

$$\Delta E_{-1} = E_3 - E_4 = g\beta_e B - A$$

$$\Delta E_0 = E_2 - E_5 = g\beta_e B$$

$$\Delta E_{+1} = E_1 - E_6 = g\beta_e B + A$$

Se passiamo ora alla situazione di energia della microonda fissa e campo magnetico variabile, come abbiamo fatto in precedenza per l'atomo di idrogeno, otteniamo i seguenti tre valori di B :

$$B_{-1} = \frac{h\nu}{g\beta_e} - a \quad B_0 = \frac{h\nu}{g\beta_e} \quad B_{+1} = \frac{h\nu}{g\beta_e} + a$$

Quindi lo spettro sarà composto di tre righe separate l'una dall'altra da una distanza pari ad a .

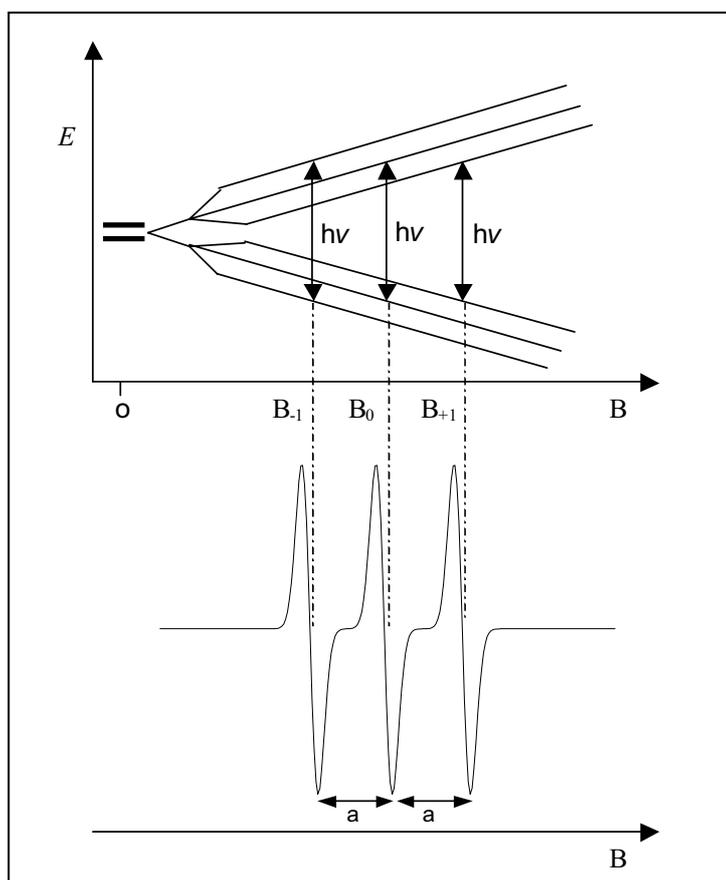


Fig. 15: Spettro ESR dell'atomo di azoto 14

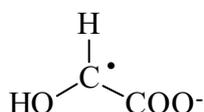
6.3 Interazione iperfine con più di un nucleo

La maggior parte dei radicali liberi sono composti da più di un nucleo con $I \neq 0$, perciò possiamo avere spettri ESR ricchi di molte righe la cui interpretazione non è sempre agevole. In molti casi oltre all'esperienza acquisita è molto utile la possibilità di verificare le ipotesi formulate sulla struttura del radicale mediante la simulazione dello spettro al computer.

Nei casi non troppo complessi è sufficiente tuttavia utilizzare l'approccio che vedremo in questo paragrafo che tratterà esclusivamente radicali contenenti un solo elettrone spaiato ($S = 1/2$) che interagiscono con nuclei aventi $I = 1/2$ (come i nuclei di idrogeno).

6.3.a Spettro ESR del radicale anione dell'acido glicolico

Iniziamo con il caso più semplice, un sistema in cui l'elettrone spaiato interagisce con due protoni come nel caso dell'anione radicale dell'acido glicolico:



Poiché i due atomi di idrogeno non sono *chimicamente* equivalenti è ragionevole pensare che non siano neanche *magneticamente* equivalenti e che quindi contribuiscano allo spettro ESR con due diverse costanti di accoppiamento iperfine (che chiameremo A_1 e A_2). Il diagramma dei livelli energetici, e delle transizioni possibili nel rispetto delle regole di selezione (rappresentate dalle frecce), sono riassunte nella figura 16 in cui il secondo nucleo di idrogeno ha semplicemente l'effetto di provocare un'ulteriore separazione dei livelli energetici creati, come visto in precedenza, dall'interazione all'elettrone spaiato con il primo nucleo di idrogeno:

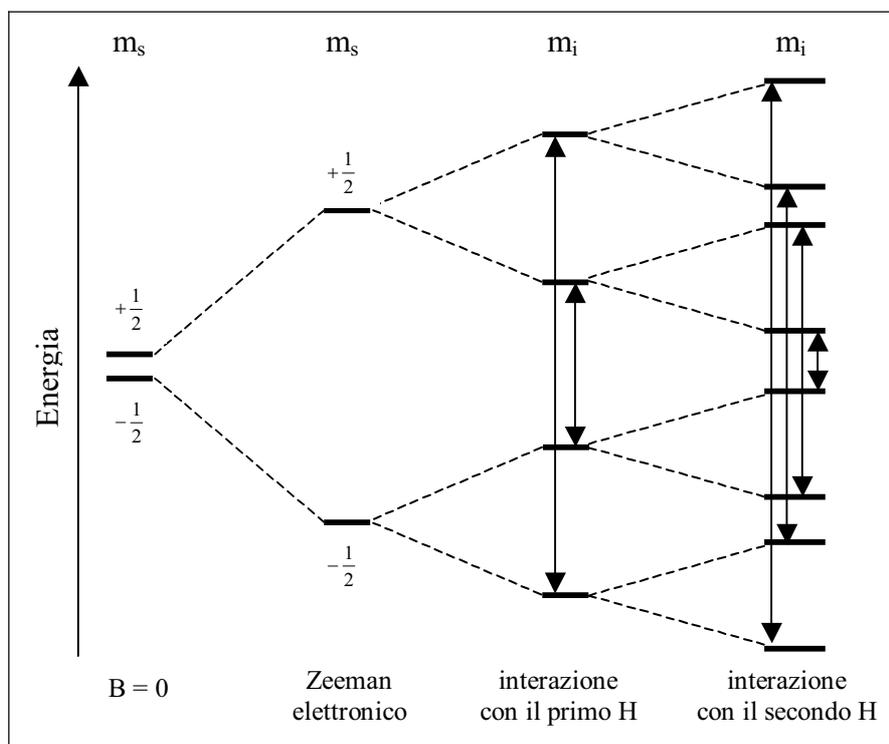


Fig. 16: Diagramma dei livelli energetici per il radicale anione dell'acido glicolico

Se nel caso dell'atomo di idrogeno lo spettro ESR era formato da due righe separate da una costante a , in questo caso il secondo splitting porta ad uno spettro formato da un totale di quattro righe di uguale intensità disposte in due doppietti e separate tra loro da valori di campo magnetico pari alle costanti di separazione iperfine a_1 e a_2 . Lo spettro sperimentale dell'anione dell'acido glicolico è riportato nella seguente fig. 17:

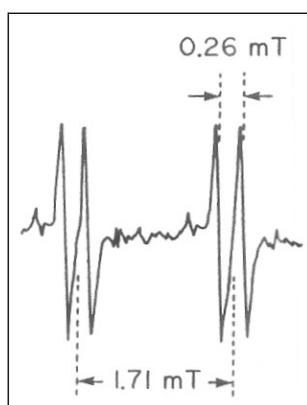
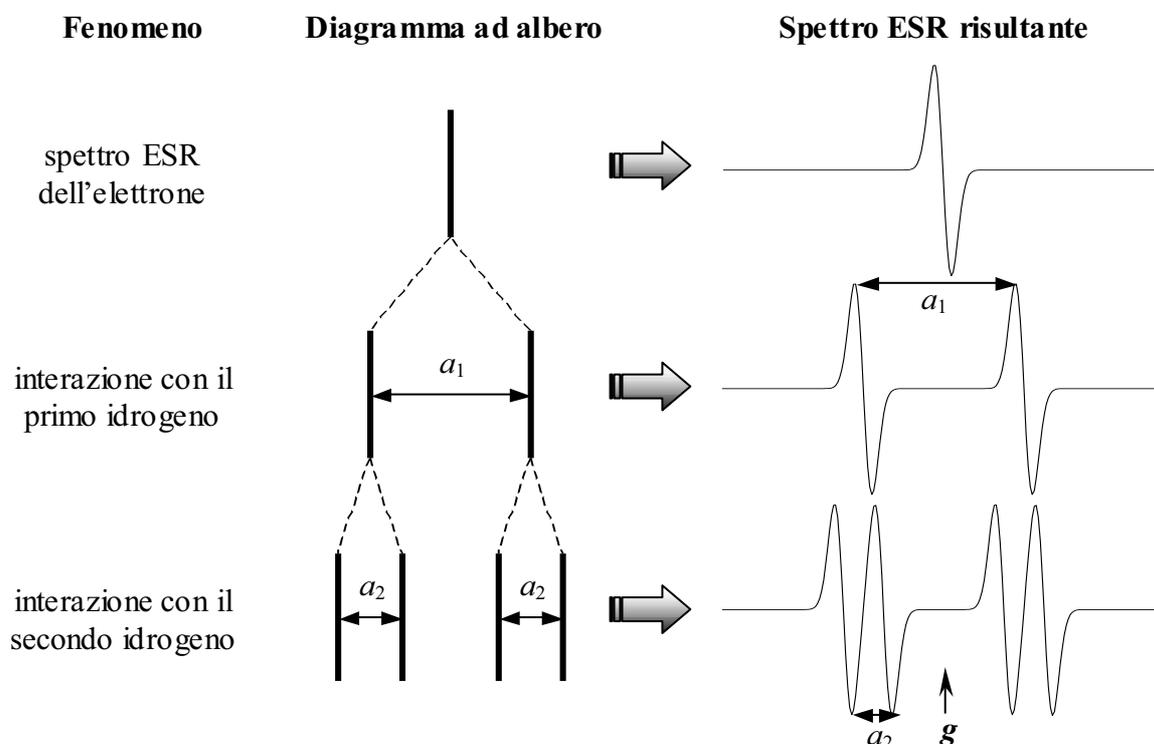


Fig. 17: Spettro ESR del radicale anione dell'acido glicolico

Tenendo presente che la ricostruzione di uno spettro ESR di un radicale organico può essere fatta agevolmente addizionando uno dopo l'altro i vari contributi in gioco, un modo più semplice per fare questa operazione è quello dei cosiddetti **diagrammi ad albero**. In pratica, invece di disegnare uno schema dei livelli energetici e poi da questo risalire alle transizioni, si può descrivere lo spettro disegnando in maniera stilizzata la riga spettrale dell'elettrone libero (in assenza di contributi esterni) e considerare poi, una alla volta, l'effetto delle varie interazioni. Nel caso del radicale dell'acido glicolico il diagramma ad albero sarà come segue:



Dal diagramma precedente si intuisce anche che il valore di g , in tutti gli spettri in cui siano presenti delle interazioni iperfini, si calcola al valore di campo magnetico (B_0) che rappresenta il punto centrale dello spettro (cioè al valore di campo che corrisponde alla posizione della riga spettrale in assenza delle interazioni iperfini). Nella pratica si legge il valore del campo magnetico e si calcola g attraverso l'equazione della risonanza, come già visto in precedenza:

$$g = \frac{h\nu}{\beta_e B_0}$$

Sia h che β_e sono noti, nel caso in cui non sia possibile avere una misura precisa della frequenza ν utilizzata nell'esperimento si può ricorrere a degli standard aventi valore di g noto. Registrando lo spettro ESR del campione a g ignoto (g_x) nelle stesse condizioni di quello del riferimento si possono mettere in relazione i due valori di campo a cui cadono, rispettivamente, il segnale del campione (B_x) e quello del riferimento (B_{rif}):

$$h\nu = g_x \beta_e B_x = g_{rif} \beta_e B_{rif}$$

da cui, semplificando i termini uguali, si ricava:

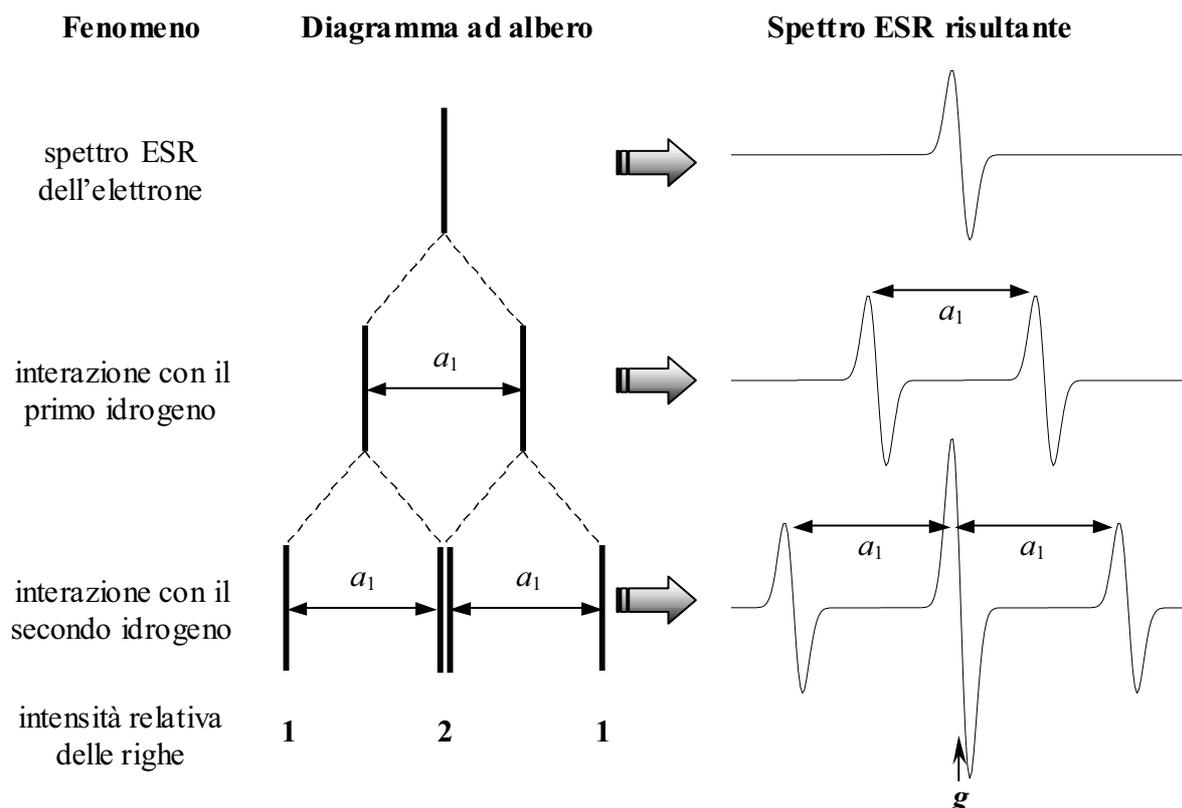
$$g_x B_x = g_{rif} B_{rif}$$

e quindi:

$$g_x = g_{rif} \frac{B_{rif}}{B_x}$$

6.3.b Spettro ESR del radicale anione idrossimetile

Il radicale anione idrossimetile ($\text{H}_2\text{C}^{\bullet}\text{O}^-$) contiene due protoni *chimicamente* (e quindi anche *magneticamente*) equivalenti, perciò è logico aspettarsi che essi contribuiscano allo spettro ESR con la stessa costante di accoppiamento (A_1) che darà luogo ad una sola costante di separazione iperfine a_1 . Anche in questo caso possiamo risalire allo spettro atteso per mezzo del diagramma ad albero:



Per effetto delle due costanti di separazione uguali, due righe spettrali cadono allo stesso valore di campo magnetico e quindi ci si attende complessivamente un tripletto di righe separate tra loro da una distanza pari ad a_1 e con la riga centrale di intensità doppia rispetto a quelle laterali, come in effetti si può verificare nello spettro sperimentale riportato in figura 18.

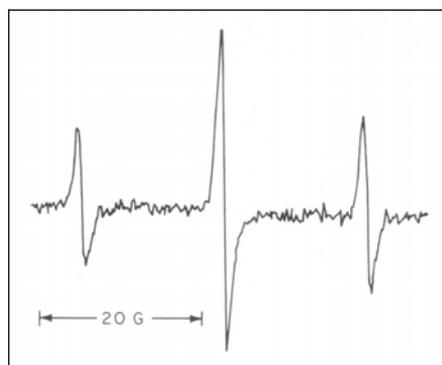


Fig. 18: spettro ESR del radicale anione idrossimetile

6.3.c Spettro ESR del radicale idrossimetile

Nello spettro del radicale idrossimetile ($\text{H}_2\text{C}^\bullet\text{OH}$) in metanolo (Fig. 19) si osservano le interazioni dell'elettrone spaiato con i due protoni equivalenti del gruppo CH_2 e con il protone dell'ossidrilico.

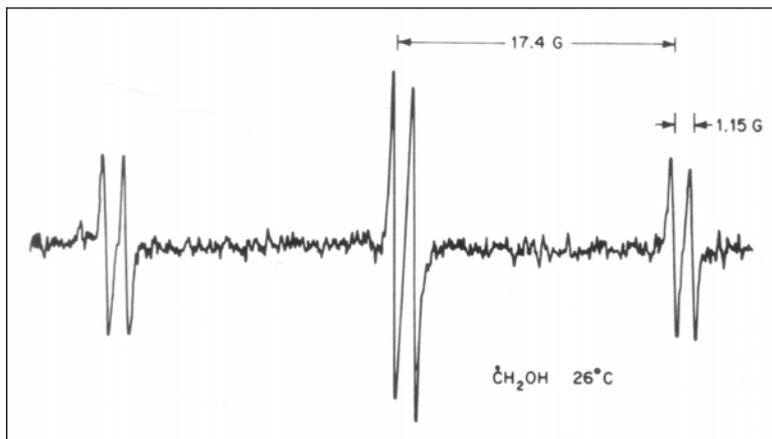
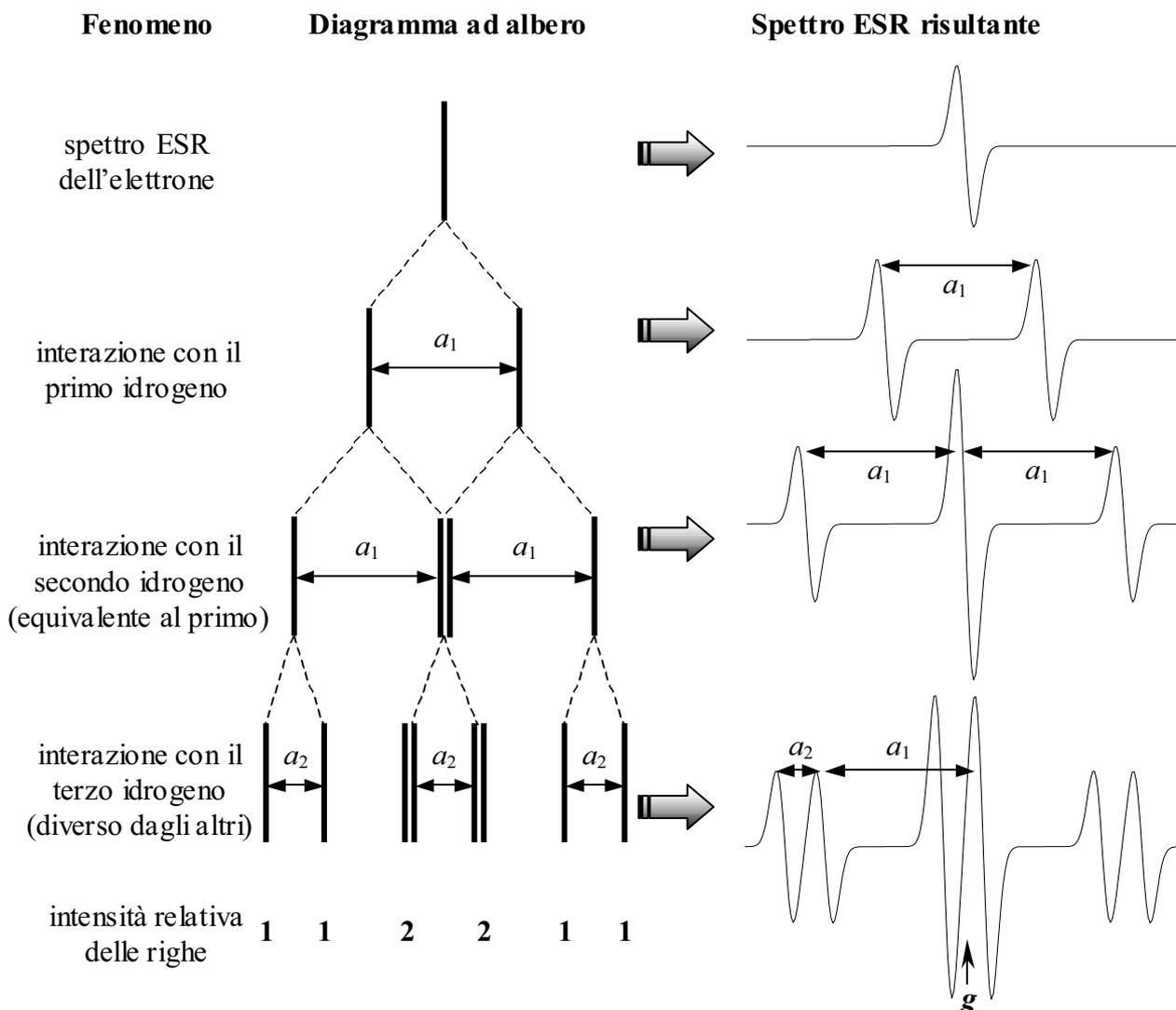


Fig. 19: Spettro ESR del radicale idrossimetile

Il diagramma ad albero che è qui sotto riportato ci permette di individuare i contributi dei tre nuclei allo spettro sperimentale:



6.3.d Spettro ESR del radicale metile

Nel radicale metile (CH_3^\bullet) ci sono tre protoni chimicamente e magneticamente equivalenti che contribuiscono con la stessa costante di accoppiamento alla separazione dei livelli energetici. Anche se i protoni magneticamente equivalenti sono più di due lo spettro risultante si può comunque razionalizzare costruendo il corrispondente diagramma ad albero (non riportato). Per il radicale metile lo spettro ESR sarà formato da quattro righe spettrali separate da una sola costante di separazione iperfine a_1 e le cui intensità sono nei rapporti 1:3:3:1 (Fig. 20).

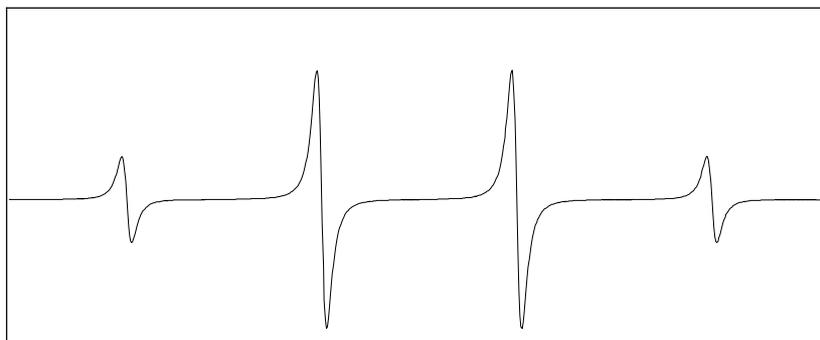


Fig. 20: Spettro ESR del radicale metile

In generale, nel caso di interazione con più nuclei equivalenti, il numero delle righe dello spettro si può facilmente calcolare perchè è pari a $2In + 1$ (dove n è il numero dei nuclei), mentre i rapporti di intensità tra le singole righe si modificano seguendo i coefficienti dell'espansione binomiale $(1+x)^n$, noto anche come triangolo di Tartaglia (Fig. 21):

n	$2In+1$	Intensità relative
0	1	1
1	2	1 1
2	3	1 2 1
3	4	1 3 3 1
4	5	1 4 6 4 1
5	6	1 5 10 10 5 1

Fig. 21: Triangolo di Tartaglia

6.4 Spettri ESR di radicali π

Esistono molti radicali organici che originano da sistemi contenenti legami coniugati in cui l'elettrone spaiato si trova in un orbitale di tipo p . A questo gruppo appartengono ad esempio tutte le molecole contenenti un anello aromatico. In questi casi la sovrapposizione di orbitali p di atomi adiacenti permette agli elettroni in essi contenuti di essere delocalizzati in un sistema di tipo π .

Con una buona approssimazione si possono descrivere gli stati energetici di questi elettroni in termini di orbitali molecolari generati dalla combinazione lineare di orbitali atomici $2p_z$ degli atomi di carbonio. Per esempio nel benzene (Fig. 22) l'orbitale molecolare di tipo π si genera per combinazione lineare dei sei orbitali $2p_z$, che hanno tutti un nodo nel piano molecolare xy , e quindi forma una nuvola elettronica sopra o sotto il piano dei nuclei degli atomi di carbonio.

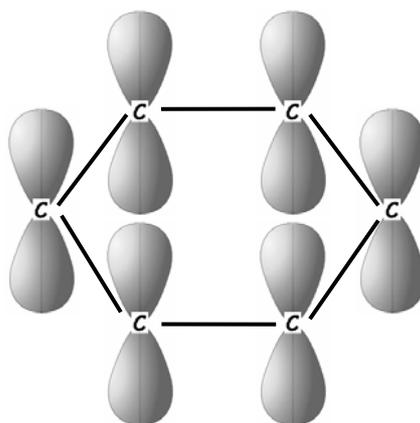


Fig 22: Orbitali $2p_z$ nel benzene

Ciascun elettrone spaiato di un radicale π sarà distribuito sulla molecola; ad esempio, nel caso dell'anione benzene ($C_6H_6^-$), la probabilità media di trovare l'elettrone vicino ad ognuno degli atomi di carbonio sarà ovviamente $1/6$ come richiesto dalla simmetria della molecola. Quando la simmetria è minore, per la presenza ad esempio di sostituenti sull'anello aromatico, il calcolo di questa probabilità richiede l'uso di approcci teorici semplici, come la teoria degli orbitali molecolari di Hückel, o più complessi a seconda delle situazioni in esame.

Registrando gli spettri ESR di radicali di questo tipo si possono osservare in genere le interazioni iperfini con gli atomi di idrogeno legati agli atomi di carbonio in cui trova l'elettrone spaiato e si può notare come per un certo frammento C-H esista una relazione approssimativamente lineare tra la popolazione di elettroni π spaiati presenti su quell'atomo di carbonio (ρ_C) e la costante di separazione iperfine a_H del protone ad esso legato, che può essere espressa in termini di una costante di proporzionalità (Q) in unità di campo magnetico:

$$a_H = Q \cdot \rho_C$$

Il termine di proporzionalità Q rappresenta il valore di a quando l'elettrone spaiato è completamente sul carbonio, dipende da alcuni fattori tra i quali sono compresi ad esempio la carica del sistema o la presenza di più cicli aromatici condensati tra loro e vale 22-27 Gauss.

Come nel caso dei radicali alifatici visti in precedenza, il numero delle righe degli spettri ESR dipenderà dalla presenza o meno di idrogeni chimicamente e magneticamente equivalenti. Nel caso ad esempio del già citato anione benzene, i sei atomi di idrogeno sono tutti equivalenti tra loro e quindi si avrà uno spettro formato da sette righe con intensità relative 1:6:15:20:15:6:1 come quello riportato in Fig. 23.

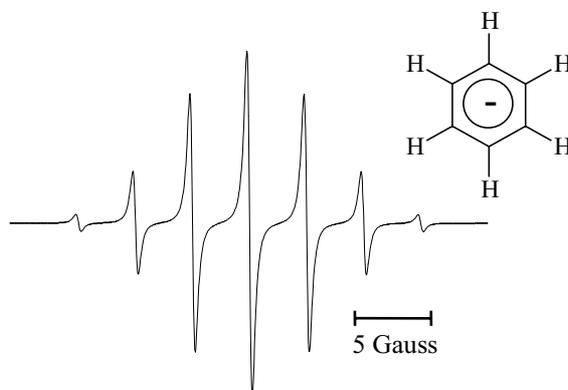


Fig. 23: Spettro ESR dell'anione benzene

Per completare il discorso sui radicali π occorre ancora prendere in considerazione un fatto, in questi sistemi i nuclei degli atomi di idrogeno con i quali si osserva l'interazione si trovano sul piano xy che è un piano nodale per gli orbitali π , ovvero in cui si ha una probabilità nulla di trovare l'elettrone in corrispondenza del nucleo¹. Perciò in questa situazione l'interazione di contatto di Fermi vale zero e quindi ci dovremmo aspettare un'assenza di interazione iperfine se non intervenissero altri meccanismi: la polarizzazione di spin e la iperconiugazione.

Consideriamo un frammento C-H di un sistema coniugato, se si assegna uno spin α all'elettrone presente nell'orbitale $2p_z$, ci sono due diverse possibilità di assegnare gli spin del legame σ C-H come mostrato in figura 24.

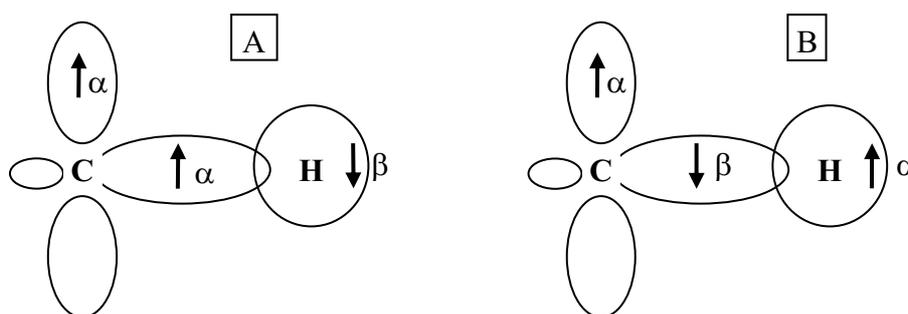


Fig. 24: Configurazioni elettroniche possibili in un frammento C-H

Se non ci fossero elettroni nell'orbitale $2p_z$ le due configurazioni elettroniche avrebbero la stessa probabilità di esistere e quindi la *densità di spin* sul protone sarebbe zero, ma quando invece c'è un elettrone nell'orbitale $2p_z$ le due configurazioni non sono ugualmente probabili poiché la regola di Hund dimostra che quando ci sono su di un atomo due differenti, ma equivalenti, orbitali singolarmente occupati, la configurazione più probabile (e più stabile) è quella in cui i due elettroni hanno spin paralleli, cioè quella di Fig. 24A. In queste condizioni la distribuzione degli elettroni non è più simmetrica, il legame C-H è polarizzato per attrazione su C dell'elettrone avente spin uguale a quello presente nell'orbitale $2p_z$ (**polarizzazione di spin**) e quindi sull'atomo di idrogeno è presente una piccola densità di spin che dà luogo ad una interazione iperfine del protone osservabile nello spettro ESR.

Nel caso invece di un frammento $C_\alpha-C_\beta-H$, la polarizzazione di spin diventa trascurabile, ma è comunque possibile osservare una interazione iperfine per trasferimento diretto dell'elettrone spaiato se il protone si trova al di fuori del piano nodale (**iperconiugazione**). In questo caso la densità di spin spaiato presente sul nucleo di idrogeno dipende anche dall'angolo di legame $C_\beta-H$ e quindi la costante di separazione iperfine si ottiene dalla relazione:

$$a_H^\beta = \rho_C (A + B \cos^2 \theta)$$

in cui: A è una costante che tiene conto della polarizzazione del legame $C_\beta-H$ ed è solitamente trascurabile, B è una seconda costante del valore di circa 50 Gauss e θ è l'angolo che il legame $C_\beta-H$ forma con l'asse dell'orbitale π (Figura 25).

In conclusione questi due meccanismi principali consentono di osservare delle interazioni iperfini con protoni legati direttamente all'atomo di C che possiede una densità di spin non nulla o legati ad un atomo di C ad esso adiacente. Normalmente non si osservano interazioni con atomi più distanti e quindi non si ottengono informazioni al di fuori di questa sfera di legami.

¹ In realtà questo è vero anche per tutti gli esempi di radicali del carbonio fatti in precedenza in cui l'elettrone spaiato si trova in orbitali ibridi (ad esempio: sp^2 nell'acido glicolico, sp^3 nel radicale metile) che hanno un nodo in corrispondenza del nucleo. Anche ad essi si applicano le considerazioni che seguono.

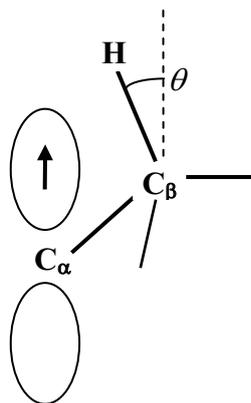


Fig. 25: Rappresentazione di un frammento C_{α} - C_{β} -H con evidenziato l'angolo θ

7. Regole pratiche per l'interpretazione degli spettri ESR

Concludiamo questa trattazione sugli spettri ESR dei radicali organici riassumendo quanto detto in precedenza in alcune regole pratiche utili per l'analisi e l'interpretazione degli spettri stessi.

7.1 Come ipotizzare correttamente lo spettro ESR di una specie nota

A) Occorre innanzitutto esaminare la formula del radicale e determinare quali e quanti nuclei possono influenzare lo spettro ESR. Essi possono essere:

- 1- il nucleo su cui è localizzato l'elettrone
- 2- i nuclei ad esso direttamente legati
- 3- quelli immediatamente successivi.

Attenzione però alla presenza di legami coniugati o ad altri sistemi di delocalizzazione elettronica perché in questo caso l'effetto dell'accoppiamento può risultare più esteso.

B) Costruire il diagramma ad albero utilizzando i seguenti accorgimenti

- 1- Partire dalla ipotetica riga spettrale dell'elettrone libero.
- 2- Valutare l'effetto delle interazioni un nucleo dopo l'altro ricordandosi che il numero delle righe che si ottengono da ciascuno è dato da $2I+1$ e quindi è diverso per nuclei che hanno I differente. Tipicamente: H ($I = 1/2$) dà luogo a due righe, mentre ^{14}N ($I = 1$) dà origine a tre righe. In tutti i casi l'intensità delle righe è la stessa.
- 3- Utilizzare costanti di separazione iperfina (a) in ordine decrescente per evitare complicazioni dovute ad incroci di righe.
- 4- Anche se non è sempre immediato valutare a priori l'entità delle costanti di separazione e quindi assegnare una determinata a a ciascun nucleo, seguire la logica per la quale nuclei più vicini all'elettrone libero hanno generalmente costanti di separazione maggiori di quelli più distanti.
- 5- Ricordarsi che, in presenza di nuclei magneticamente equivalenti o quando si hanno comunque casi di sovrapposizioni, le intensità delle righe non sono più uguali, ma dipendono dal numero delle sovrapposizioni ed i rapporti tra di esse si possono ricavare dal triangolo di Tartaglia.

Occorre dire infine che la ricostruzione di uno spettro ESR con un diagramma ad albero è valida solamente se fa coincidere tutte le righe spettrali dello spettro sperimentale. Tale ricostruzione, anche se fatta con accuratezza non è valida se la larghezza di tutte le righe non è costante e in tutte quelle situazioni in cui esiste una ampia sovrapposizione tra i livelli energetici a causa dei cosiddetti effetti del secondo ordine che provocano la miscelazione delle funzioni di spin e in cui vanno quindi introdotti degli opportuni fattori di correzione.

7.2 Come interpretare lo spettro ESR di una specie ignota

A) Esaminare innanzitutto lo spettro nel suo complesso: la posizione delle righe dovrebbe essere simmetrica rispetto ad un punto centrale. Se, al contrario, è evidente una asimmetria, essa può essere dovuta a diversi fattori:

- 1- Sovrapposizione degli spettri di due radicali con valore di "g" diverso.
- 2- Separazione dovuta anche ad interazioni del secondo ordine.
- 3- Lenta velocità di rotazione della molecola su se stessa (le righe risultano ad esempio allargate in maniera asimmetrica).

B) Iniziare l'analisi dettagliata dello spettro seguendo queste indicazioni:

- 1- Analizzare le distanze tra le righe dello spettro cercando di identificare le costanti di separazione ricordando che:
 - La separazione fra le due righe più esterne è sempre la costante di separazione iperfine più piccola.
 - Quelle successive vanno cercate tra gruppi di righe omogenee.
 - Per nuclei con $I = \frac{1}{2}$ la somma delle costanti di separazione iperfine di tutti i nuclei $(\sum_{i=1}^n n_i a_i)$ deve essere uguale alla separazione in gauss fra le righe più esterne dello spettro.
- 2- Valutare i rapporti delle intensità delle righe per valutare eventuali sovrapposizioni indicative della presenza di due o più nuclei magneticamente equivalenti
- 3- Ricordarsi inoltre che:
 - Uno spettro privo di una riga centrale intensa indica la presenza di un numero dispari di nuclei con $I = \frac{1}{2}$.
 - Il numero massimo possibile di linee (per uno spettro del primo ordine) si ottiene da $\prod(2n_i I_i + 1)$ con n_i uguale al numero di nuclei equivalenti con spin I_i .
- 4- Tentare infine la ricostruzione dello spettro con il metodo del diagramma ad albero.
- 5- Calcolare g utilizzando il valore di campo magnetico nel punto centrale dello spettro.
- 6- Quando la risoluzione dello spettro è bassa oppure sono presenti troppe righe, allora la corretta interpretazione si ottiene solamente mediante simulazione al computer che permette di calcolare esattamente i valori delle costanti di accoppiamento e le eventuali variazioni delle larghezze di riga.

Commento finale (anche in previsione dell'esame):

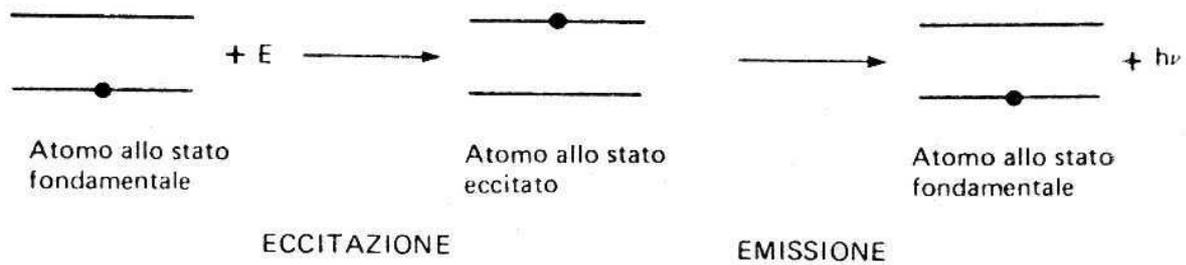
Uno spettro ESR di un radicale organico si intende analizzato quando:

1. è stato calcolato il valore di g
2. sono state misurate con ragionevole precisione le costanti di separazione iperfine (perché da esse si ricavano le informazioni sulla struttura del radicale) e, quando possibile, sono state fatte le assegnazioni delle costanti ai vari nuclei presenti nella molecola.

SPETTROSCOPIA DI EMISSIONE ATOMICA

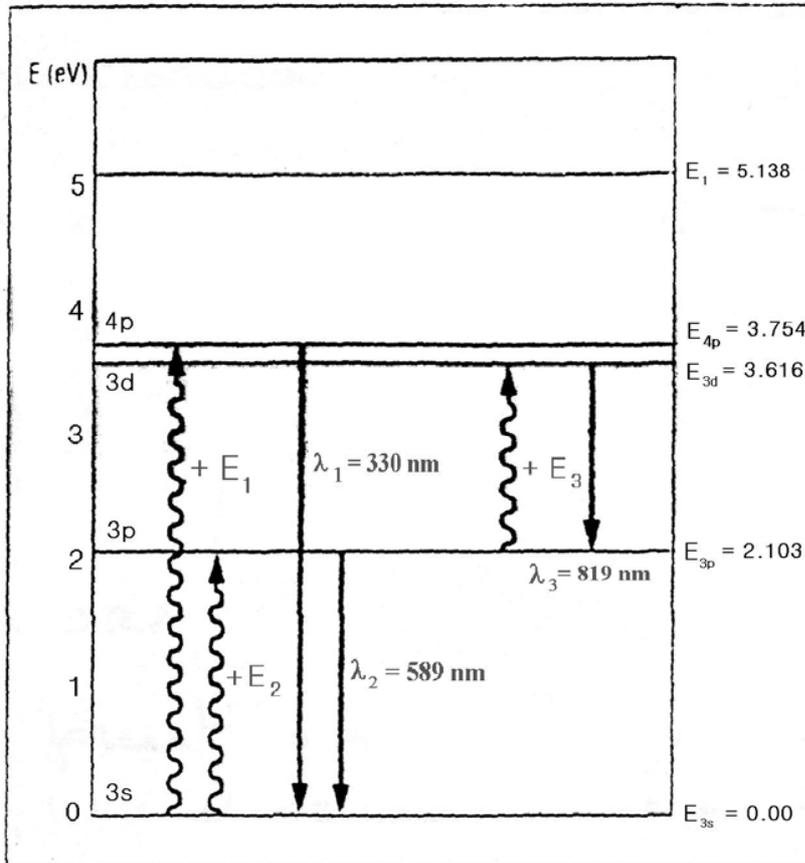
Qualunque sia il modo in cui un elemento allo stato atomico abbia raggiunto un livello energetico superiore a quello fondamentale, esso può restituire all'ambiente l'energia acquisita sotto forma di radiazione elettromagnetica.

In questa maniera, gli elettroni dell'atomo, precedentemente eccitati, ritornano allo stato fondamentale direttamente o passando attraverso livelli energetici intermedi e liberando quanti di luce a varia energia.



Ogni elemento quindi fornisce, una volta eccitato, un caratteristico *spettro di emissione a righe*, ognuna delle quali corrisponde a un possibile salto elettronico.

Consideriamo l'emissione da parte di un atomo di sodio.



Se un atomo di sodio assorbe energia sotto forma di energia termica E_1 , l'elettrone dell'orbitale 3s (stato elettronico fondamentale) può saltare all'orbitale 4p.

Analogamente, l'assorbimento delle energie E_2 e E_3 porta alle transizioni: $3s \rightarrow 3p$ e $3p \rightarrow 3d$

Quasi immediatamente l'elettrone ritorna all'orbitale di partenza, e l'atomo emette una radiazione elettromagnetica la cui lunghezza d'onda dipende dall'energia assorbita.

Se l'atomo assorbe una quantità maggiore dell'energia di ionizzazione ($E_i = 5.138$), l'elettrone 3s viene espulso e l'atomo si ionizza.

FATTORI CHE INFLUENZANO L'INTENSITÀ DELLE RIGHE SPETTRALI

Analizzando uno spettro di emissione a righe si possono ottenere informazioni sul campione in esame, sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo:

- misurando la **lunghezza d'onda** delle varie radiazioni emesse è possibile identificare gli atomi presenti (analisi **qualitativa**)
- misurando l'**intensità** delle varie radiazioni emesse è possibile la determinare la concentrazione (analisi **quantitativa**)

Per quanto riguarda l'intensità, però, esistono diversi fattori che possono influenzarne il valore; questo infatti dipende:

- 1) *dalla probabilità che avvenga la corrispondente transizione elettronica*
- 2) *dall'intensità della radiazione eccitante* (da cui dipende infatti la popolazione dei diversi livelli energetici accessibili all'elemento, da cui gli elettroni decadono per raggiungere il libello più basso consentito)
- 3) *dalla concentrazione dell'elemento nel campione in analisi*
- 4) *dalla temperatura della sorgente* (la cui temperatura, appunto, deve essere elevata, stabile e riproducibile)

Ricordiamoci inoltre che specie chimiche isoelettriche hanno spettri di emissione molto simili!

SPETTROMETRIA DI EMISSIONE A FIAMMA (FES)

Negli spettrometro ad emissione di fiamma, l'emissione viene provocata da una fiamma che oltre ad atomizzare il campione si incarica anche di eccitare una certa frazione molto piccola di atomi. Le temperature che infatti si raggiungono, per quanto dell'ordine di migliaia di gradi kelvin (≈ 3000 K), permettono l'eccitazione di una percentuale di atomi sufficientemente alta solo nel caso di metalli alcalini e alcalino terrosi in soluzione.

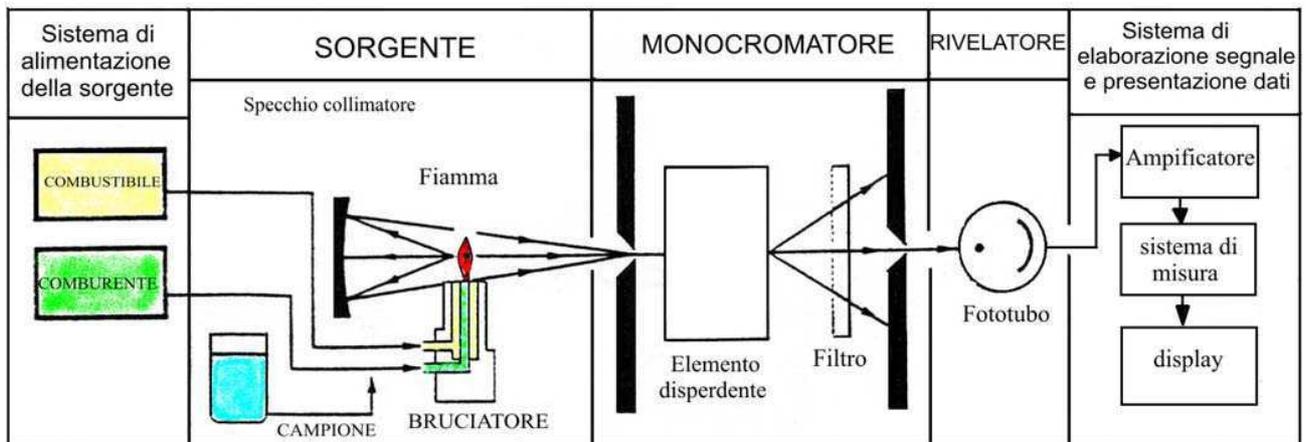
Il campo di utilizzo dei fotometri a fiamma è relativamente ridotto: come ho detto si possono dosare con successo i metalli alcalini e alcalino terrosi.

In pratica Li, Na, K, Ca e Mg possono essere dosati in qualsiasi matrice liquida (naturalmente le matrici solide possono essere disgregate e mandate in soluzione).

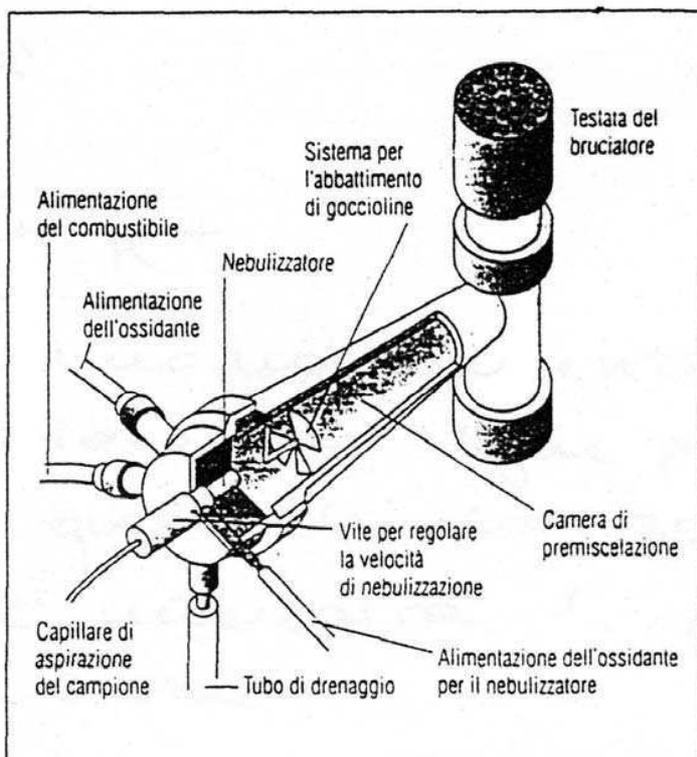
Con un buon monocromatore possono essere determinati anche Cs, Rb, Sr, Ba, Cu, Cr, Ga, In, Fe, Pb e Mn.

In questo caso la soluzione in esame viene nebulizzata all'interno di una fiamma, e quindi vengono misurate le intensità delle radiazioni emesse, caratteristiche delle specie chimiche in esame, allo scopo di ottenere analisi quantitative.

L'analisi quantitativa si basa sul fatto che intensità della radiazione emessa e concentrazione sono direttamente proporzionali ($I_{emessa} = k \cdot C_{campione}$).



La **fiamma** (che non supera mai i 3000K) riesce ad eccitare facilmente gli atomi di Li, Na, K, Ca e Mg, i quali emettono poi le loro radiazioni caratteristiche nell'ambito del visibile. Viene ottenuta dalla combustione di gas liquido (butano-propano) o di acetilene, con aria (l'uso di ossigeno è praticamente abbandonato).



Il **bruciatore** è simile a quello usato in spettroscopia di assorbimento atomico, cioè a premiscelazione con iniettore per nebulizzare il campione nei gas comburenti. La testata è però cilindrica, sulla cui base sono praticati molti buchi per la fuoriuscita dei gas; questo sistema permette una buona stabilità della fiamma.

Un opportuno **sistema di specchi** convoglierà la luce al monocromatore.

Un **monocromatore**, generalmente basato su filtri, farà sì che giunga al rivelatore solo la radiazione utile all'analisi di un singolo elemento.

Il **rivelatore** determina la sensibilità dello strumento: con un fototubo si può arrivare al massimo alle ppm (mg/L), mentre con fotomoltiplicatori si può arrivare fino a 0,01ppm (10 µg/L).

**INTERFERENZE IN
SPETTROMETRIA DI EMISSIONE A FIAMMA
(FES)**

Anche nel caso della spettroscopia di emissione esistono le interferenze, che possono essere sia spettrali che non spettrali.

INTERFERENZE NON SPETTRALI

TIPO DI INTERFERENZA	CAUSA	ACCORGIMENTI
<i>Interferenze chimiche</i>	Formazione di composti refrattari Interferenza da parte di anioni (SO_4^{2-} , PO_4^{3-}) che riducono l'emissione	Aggiungere cloruro di lantanio al campione per trasformare i metalli in cloruri volatili
<i>Interferenze fisiche</i>	Viscosità	
<i>Interferenze da ionizzazione</i>	$\text{K} \rightleftharpoons \text{K}^+$ Durante l'atomizzazione si può verificare il fenomeno della ionizzazione, ed anche gli ioni possono dare emissione con righe praticamente uguali a quelle dei corrispondenti atomi, ma l'intensità dell'emissione non è la stessa!	Il problema si può risolvere aggiungendo al campione un metallo più facilmente ionizzabile, in grado di produrre uno spostamento a sinistra dell'equilibrio descritto (ad esempio si aggiunge SrCl_2 per eliminare la ionizzazione del K nei saggi del KCl)
<i>Interferenze da autoassorbimento</i>	Le radiazioni emesse dagli atomi eccitati possono essere, in parte, assorbite dagli atomi non eccitati che si trovano intorno alla zona più calda della fiamma. L'energia che arriva al rivelatore risulta così attenuata	

INTERFERENZE SPETTRALI

- ♥ emissione di fondo della fiamma
- ♥ sovrapposizione di righe di emissione di specie atomiche o molecolari della matrice
- ♥ assorbimento parziale della riga analitica da parte di specie atomiche o molecolari della matrice

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEL Na E DEL K IN UNA SOLUZIONE PER INFUSIONE ENDOVENOSA

METODO DELLA RETTA DI TARATURA

- ♥ Peso 0,5092 g di NaCl, necessario per la preparazione della soluzione standard
- ♥ Peso 0,1691 g di KCl necessario per la preparazione della soluzione standard
- ♥ Trasferimento di entrambi i sali nello stesso matraccio e diluire a 1000 ml con acqua
- ♥ Prelevare 20 ml della soluzione standard e diluirla a 100 ml (fattore di diluizione = 5)
- ♥ Prelevare dalla soluzione standard diluita 5 ml e portarli a 100 ml (fattore di diluizione = 20); effettuare le letture a 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml.
- ♥ Diluire la soluzione da infusione come segue:
 - 5 ml → 250 ml (fattore di diluizione = 50)
 - 10 ml → 100 ml (fattore di diluizione = 10)
- ♥ Si usa lo strumento con un filtro per il Na per stabilire la curva di taratura per il sodio; poi si cambia il filtro con uno per il K e si fanno le letture per il potassio

Quantità di Na (mg / 100 ml)	Letture fotometro a fiamma	Quantità di K (mg / 100 ml)	Letture fotometro a fiamma
0	0	0	0
0.2002	20.7	0.08863	22.4
0.4004	41.0	0.1773	41.2
0.6006	60.6	0.2659	61.2
0.8008	80.3	0.3545	80.3
1.010	100	0.4431	100

- ♥ Calcolare le concentrazioni di Na e K nella soluzione da infusione in mmol /l

PESO ATOMICO Na → 23

PESO ATOMICO K → 39.1

PESO ATOMICO Cl → 35.5

PESO ATOMICO NaCl → 58.5

PESO ATOMICO KCl → 74.6

0,5092 g NaCl / litro	$0.5092 \cdot \frac{23}{58.5} = 0,2002 \text{ g Na / litro}$	200,2 mg / litro	20,02 mg / 100 ml
------------------------------	--	-------------------------	--------------------------

La concentrazione del sodio nella soluzione standard non diluita è quindi di 20,02 mg / 100 ml.

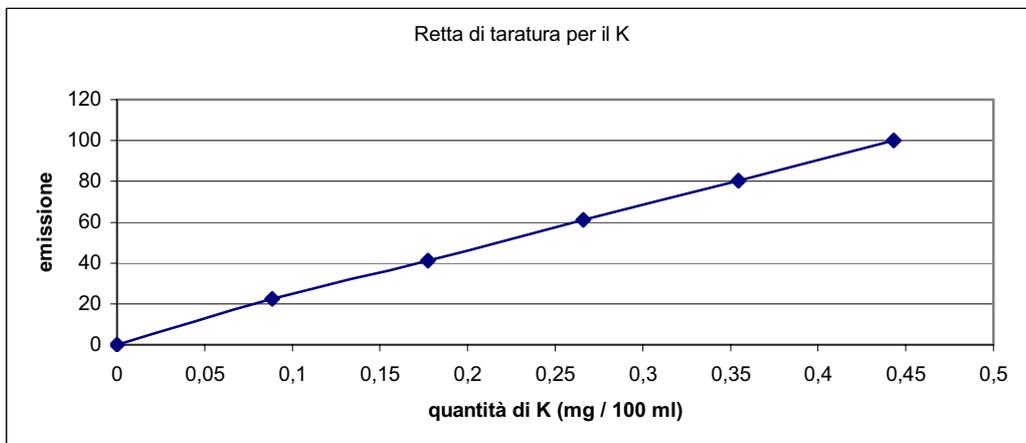
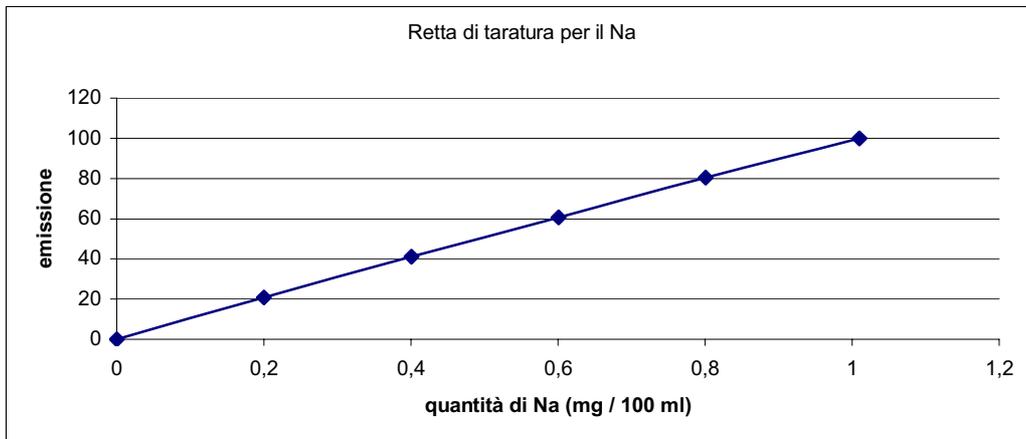
0.1691 g KCl / litro	$0.1691 \cdot \frac{39.1}{74.6} = 0,08863 \text{ g K / litro}$	88.63 mg / litro	8.863 mg / 100 ml
-----------------------------	--	-------------------------	--------------------------

La concentrazione del potassio nella soluzione standard non diluita è quindi di 8,863 mg / 100 ml.

La concentrazione del sodio nella soluzione standard diluita (fattore di diluizione totale = $5 \cdot 20 = 100$) è invece:

$$[Na]_{sol. diluita} = \frac{20.02}{100} = 0.2002 \text{ mg / 100 ml}$$

$$[K]_{sol. diluita} = \frac{8.863}{100} = 0.08863 \text{ mg / 100 ml}$$



L'equazione della retta del sodio è:

$$y = 99,0 x + 0,722$$

x = quantità del metallo
y = intensità dell'emissione

Sappiamo che il campione da analizzare è stato diluito ($50 \cdot 10$) 500 volte, e che l'analisi allo spettrometro per il sodio ci dà un'emissione di intensità 70,2.

Sostituendo nell'equazione della retta:

$$70,2 = 99,0 x + 0,722$$

$$x = \frac{70,2 - 0,722}{99,0} = 0,701 \text{ mg} / 100 \text{ ml}$$

$$0,701 \cdot 500 = 351 \text{ mg di Na} / 100 \text{ ml} \quad \equiv \quad \frac{3510 \text{ mg} / \text{litro}}{23} = 153 \text{ mmol} / \text{litro}$$

La concentrazione del sodio nella soluzione per infusione è dunque di 153 mmol / litro.

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEL Na E DEL K IN UNA SOLUZIONE PER INFUSIONE ENDOVENOSA

METODO DELL'ADDIZIONE STANDARD

- Preparazione delle soluzioni da usare come standard interno:

0,2531 g di NaCl vengono disciolti in 1000 ml di acqua
0,3114 g di KCl vengono sciolti in 1000 ml di acqua

- Si prelevano 20 ml di ciascuna soluzione e li si trasferisce nello stesso matraccio da 100 ml, portando il tutto a volume (fattore di diluizione = 5): ottengo uno standard interno diluito
- Si prendono quindi 5 ml della soluzione per infusione endovenosa (campione) e li si diluisce a 100 ml in matraccio tarato (fattore di diluizione = 20)
- Si preparano quindi diverse soluzioni contenenti lo standard interno diluito. A 5 ml della soluzione campione diluita vengono aggiunte diverse aliquote di standard, portando poi il tutto a volume di 100 ml

QUANTITÀ DI CAMPIONE CUI VIENE FATTA L'AGGIUNTA (ml)	VOLUME DI SOLUZIONE STANDARD AGGIUNTA (ml)	VOLUME FINALE	LETTURA Na	LETTURA K
5	0	100	26,1	30,1
5	5	100	39,3	45,2
5	10	100	54,2	58,8
5	15	100	69,2	73,1
5	20	100	84,1	87,0
5	25	100	100	100

- Effettuiamo i calcoli necessari per la costruzione della retta che ci permetta di correlare la concentrazione dello standard con la concentrazione del sodio nel campione.

I° punto

Concentrazione iniziale NaCl $\rightarrow [0,2531 \text{ g / litro}] \equiv [253,1 \text{ mg / litro}] \equiv [25,31 \text{ mg / 100 ml}]$

Prima diluizione: 20 ml \rightarrow 100 ml (fattore diluizione = 5)

Seconda diluizione: 5 ml \rightarrow 100 ml (fattore diluizione = 20)

Fattore di diluizione totale = $(20 \cdot 5) = 100$

$$[\text{NaCl}]_{\text{I}^\circ \text{ campione}} = \frac{25,31}{100} \text{ mg / 100 ml} = 0,2531 \text{ mg / 100 ml}$$

II° punto

Prima diluizione: 20 ml → 100 ml (fattore diluizione = 5)

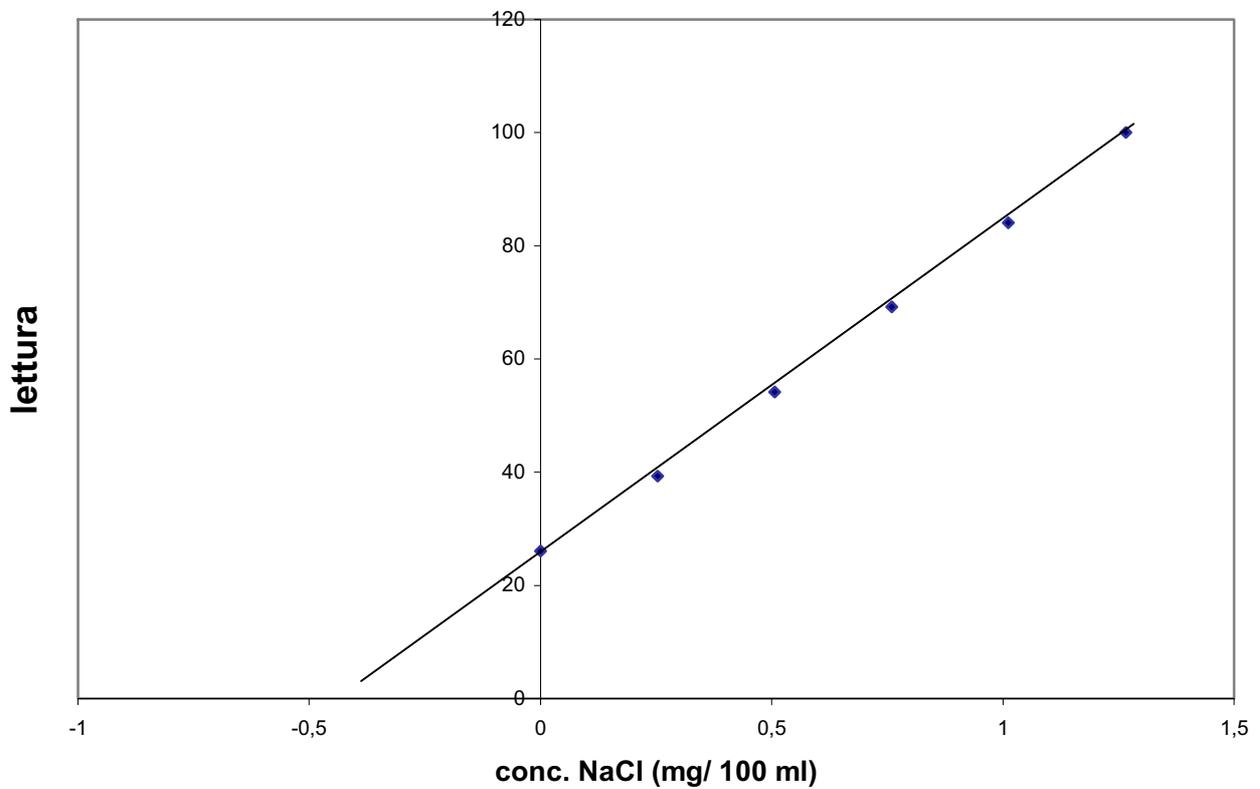
Seconda diluizione: 10 ml → 100 ml (fattore diluizione = 10)

Fattore di diluizione totale = $(10 \cdot 5) = 50$

$$[NaCl]_{II^\circ \text{ campione}} = \frac{25,31}{50} \text{ mg} / 100 \text{ ml} = 0,5062 \text{ mg} / 100 \text{ ml}$$

Così via per gli altri punti; otteniamo questi dati:

Concentrazione NaCl nel campione	Lettura
0	26,1
0,2531	39,3
0,5062	54,2
0,7593	69,2
1,012	84,1
1,266	100



L'equazione di questa retta è:

$$y = 58,57 x + 25,09$$

Per ($y = 0$), il valore negativo di x corrisponde alla concentrazione del NaCl nel campione diluito:

$$x = \frac{25,09}{58,57} = 0,4284 \text{ mg} / 100 \text{ ml}$$

Il campione è però diluito:

prima diluizione: 5 ml \rightarrow 100 ml (fattore diluizione = 20)

seconda diluizione: 5 ml \rightarrow 100 ml (fattore diluizione = 20)

FATTORE DI DILUIZIONE TOTALE = $(20 \cdot 20) = 400$

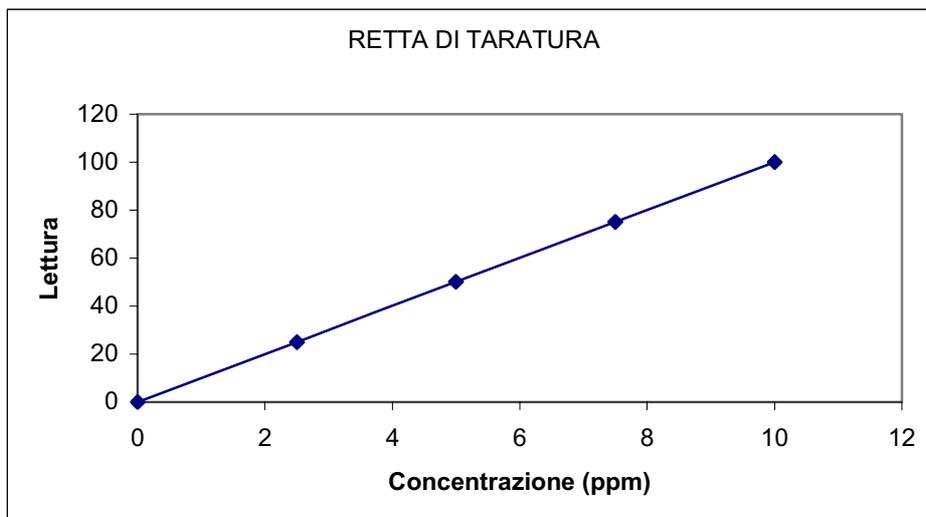
$$[\text{NaCl}]_{\text{campione}} = (0,4284 \cdot 400) = 171,4 \text{ mg} / 100 \text{ ml} \equiv \mathbf{0,1714 \text{ g} / 100 \text{ ml}}$$

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEL LITIO CARBONATO IN CAPSULE

METODO DELLA RETTA DI TARATURA

- Mescolare e pesare il contenuto di 2 capsule (300 mg) di litio carbonato e trasferirlo in matraccio tarato da 100 ml.
- Aggiungere 10 ml di HCl 6 M e agitare fino a cessazione dello sviluppo di CO₂
- Diluire a 100 ml con acqua, tappare il matraccio e agitare accuratamente; se la soluzione risultasse torbida, lasciare sedimentare la parte indisciolta, rappresentata da eccipienti
- Prelevare 1 ml di soluzione limpida, trasferire in matraccio da 100 ml e portare a volume con acqua (fattore di diluizione = 100)
- Eseguire la determinazione fotometrica della soluzione incognita. La lettura si ripete 3 volte lavando il fotometro dopo ogni lettura. Considerando il valore medio delle tre letture otteniamo un valore di 58,5
- Costruiamo ora la retta di taratura, utilizzando una soluzione standard di litio opportunamente diluita, la cui concentrazione massima è di 10 ppm (perché lo strumento non può leggere concentrazioni superiori)

Concentrazione Li ₂ CO ₃ (ppm)	lettura
0	0
2,5	25
5	50
7,5	75
10	100



In questo caso c'è una proporzionalità diretta, e se il nostro campione ci ha dato una lettura di 58,5, allora la sua concentrazione è di 5,85 ppm.

Poiché 1 ppm corrisponde a 1 mg/litro, allora la concentrazione del campione diluito è di 5,85 g/litro, equivalente a 0,585 mg / 100 ml.

La concentrazione del campione iniziale è invece di $(0,585 \cdot 100) = 58,5$ mg/ 100 ml, equivalente a 0,0585 g / 100 ml.

Le moli di litio sono:

$$n(Li) = \frac{0,0585}{6,94} = 8,43 \cdot 10^{-3} \text{ mol / 100 ml}$$

Poiché però noi dobbiamo determinare la concentrazione del Litio nel Carbonato di litio Li_2CO_3 , questo valore va diviso per due:

$$\frac{8,43 \cdot 10^{-3}}{2} = 4,21 \cdot 10^{-3}$$

$$g(Li)_{in Li_2CO_3} = (4,21 \cdot 10^{-3}) \cdot (PM Li_2CO_3) = (4,21 \cdot 10^{-3}) \cdot (73,9) = 0,311 \text{ g}$$

$$\% Li_{in Li_2CO_3} = \frac{0,311}{0,300} = 103 \%$$

SPETTROMETRIA DI MASSA

INTRODUZIONE

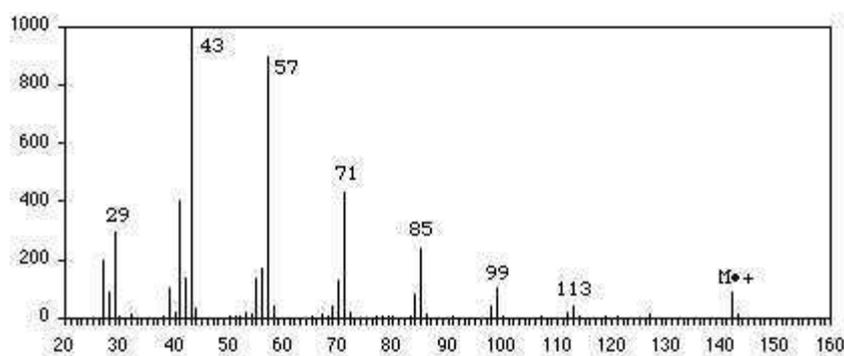
La spettrometria di massa è una tecnica analitica di delucidazione strutturale basata sulla **ionizzazione** di una molecola e sulla sua successiva **frammentazione** in ioni di diverso rapporto massa / carica (M/z).

A differenza delle tecniche spettroscopiche, però, questo è un metodo d'analisi distruttivo (la molecola non rimane intatta dopo l'analisi), e soprattutto non si basa sull'interazione tra radiazioni e materia.

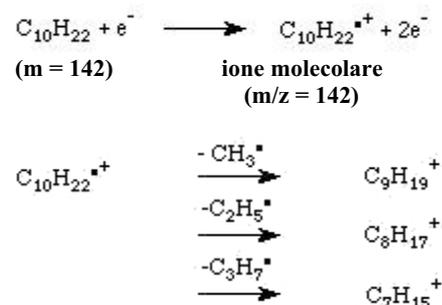
Il principio su cui si basa è il seguente: una molecola è ionizzata per espulsione di un elettrone; il catione radicalico che si forma (*ione molecolare*) in parte si frammenta dando molecole e/o radicali neutri (che lo strumento non rileva), in parte generando cationi e/o radicali cationi (*ioni frammento*). Lo ione molecolare e i vari ioni che si originano per frammentazione (cationi e radicali cationi) vengono discriminati sulla base del loro rapporto massa/carica e rivelati da un detector.

L'esperimento di spettrometria di massa consiste dunque nella *ionizzazione* di molecole in fase gassosa, nella *separazione* dei diversi ioni prodotti e nella loro *rivelazione*.

Il risultato dell'esperimento è lo **spettro di massa**, che rappresenta l'abbondanza relativa degli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica (ricordiamo che per ottenere uno spettro di massa, dunque, il requisito essenziale è di produrre degli ioni in fase gassosa).



Spettro dell'n-decano



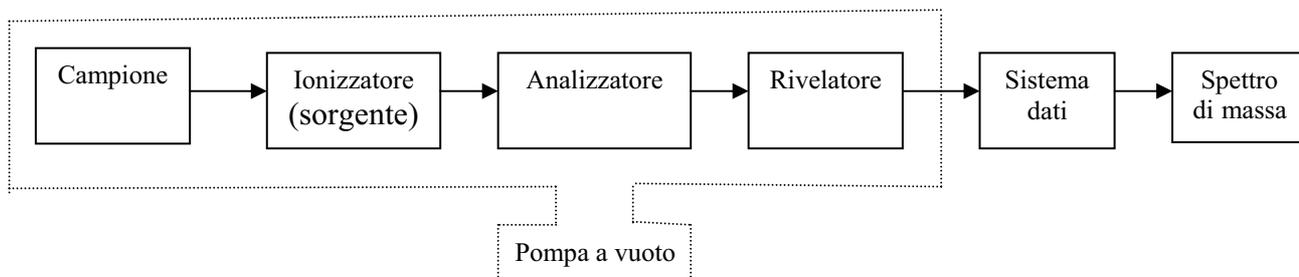
Questa tecnica consente di misurare le masse molecolari (sia nominali che esatte) e di ottenere dei profili di frammentazione che sono specifici per ciascun composto, di cui costituiscono quindi un'impronta digitale.

Si può così individuare la formula di struttura di composti sconosciuti, anche avendone a disposizione piccole quantità.

SPETTROMETRO DI MASSA

L'interpretazione dello spettro di massa consiste nello studio dei segnali dovuti agli ioni generati nell'esperimento, dai quali si può ricostruire a ritroso la struttura molecolare originale.

Lo spettrometro di massa si schematizza così:



Da notare che il vuoto (che si aggira intorno ai $10^{-6} - 10^{-5}$ torr) è necessario per impedire una perdita di ionizzazione per urto con i gas atmosferici.

Introduzione del campione (Sample Inlet System)

L'introduzione del campione nella camera di ionizzazione può essere fatta sia allo stato solido, usando una sonda, che allo stato liquido o gassoso, usando un sistema di valvole che permettono di accedere alla camera di ionizzazione senza che questa venga a contatto con l'esterno.

La quantità di prodotto necessario per registrare uno spettro è dell'ordine dei microgrammi/nanogrammi.

E' possibile utilizzare l'uscita di un sistema GC o HPLC come ingresso dello spettrometro di massa. Queste tecniche, note come GC-MS e HPLC-MS, sono estremamente utili nell'analisi di miscele di prodotti.

Camera di ionizzazione

Se una molecola è investita in fase vapore da un fascio di elettroni di notevole energia cinetica si può avere per urto la sua ionizzazione a ione positivo o negativo.

In genere gli strumenti sono regolati per lavorare unicamente con ioni positivi, i quali possono spontaneamente o per urto decomporsi in una serie di frammenti di massa inferiore e questi a loro volta in altri.

Ogni molecola avrà quindi una sua *frammentazione caratteristica e specifica* che dipenderà sia dalla natura delle molecole sia dalle condizioni operative di ionizzazione.

Il campione viene ionizzato in un'apposita camera di ionizzazione, in cui il fascio di elettroni viene prodotto da una **sorgente ionica** che varia a seconda della tecnica utilizzata.

In genere gli elettroni sono emessi da un filamento caldo di tungsteno o renio, e passano attraverso un condotto, che crea il raggio, nella parte centrale della camera che contiene il campione gassoso.

La frazione di elettroni che non urta contro le molecole è raccolta da una trappola per gli elettroni, le molecole che non sono ionizzate sono allontanate dalla pompa ad alto vuoto, mentre quelle ionizzate

sono accelerate e convogliate verso l'analizzatore.

Il sistema di ionizzazione svolge un ruolo essenziale nella spettrometria di massa, perché da esso dipende anche il numero, la natura e l'abbondanza dei frammenti molecolari che compaiono nello spettro di massa. Per questo motivo le tecniche utilizzate sono numerose e alcune di esse danno origine a particolari varianti nella spettrometria di massa.

Tra i vari dispositivi alcuni consentono di analizzare solo frammenti positivi, altri invece, permettono la rivelazione anche di ioni negativi.

Inoltre alcune tecniche di ionizzazione sono decisamente potenti, operano cioè ad alta energia e portano ad una frammentazione spinta (TECNICHE HARD), altre invece operano a bassa energia producendo un numero inferiore di ioni (TECNICHE SOFT).

SORGENTI

In base al **tipo di sorgente** utilizzata la ionizzazione primaria del campione viene realizzata in vario modo; le tecniche più utilizzate sono:

- 1) impatto elettronico (E.I.)
- 2) ionizzazione chimica (C.I.)
- 3) electrospray (E.S.I.)

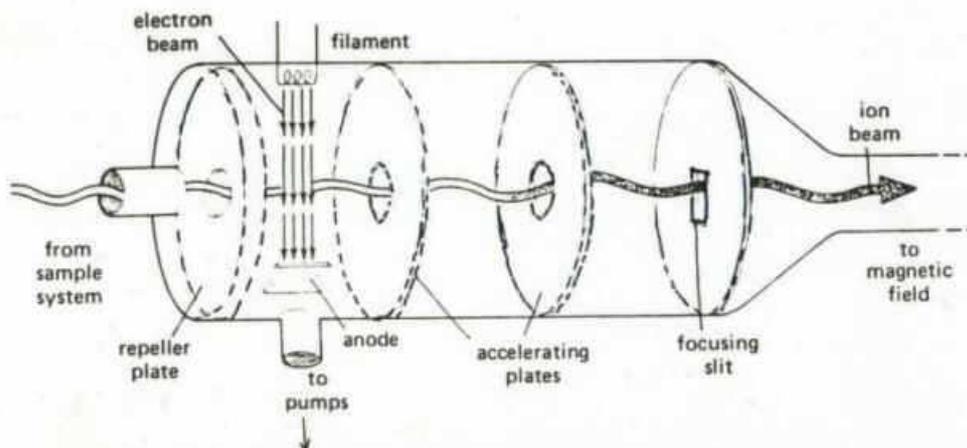
IMPATTO ELETTRONICO (E.I.)

Electronic Impact Ionization

La ionizzazione per impatto elettronico è la tecnica più comune.

Un filamento di tungsteno incandescente emette un fascio di elettroni che, accelerati verso un anodo posto dalla parte opposta al filamento, acquistano un'elevata energia (ca. 70 eV). Quando questi elettroni vengono a contatto con la sfera elettronica di una molecola (impatto elettronico), le trasferiscono la loro energia, provocando l'espulsione di un elettrone con formazione di un radical catione (*ione molecolare*) $M^{+\bullet}$.

Siccome l'energia necessaria per ionizzare una molecola organica è di circa. 13-14 eV, i radical cationi sono prodotti ad un'energia vibrazionale molto alta, che ne può determinare la frammentazione con formazione di un radicale e un catione.



Tutti gli ioni positivi (cationi e radical cationi) sono respinti da una piastra, tenuta ad un potenziale positivo, verso una serie di piastre forate, tenute a potenziale positivo crescente, dette piastre acceleratrici.

Nel loro tragitto *gli ioni subiscono un'accelerazione proporzionale al potenziale V delle piastre acceleratrici* e vengono espulsi, attraverso una fenditura di uscita, con un'energia cinetica:

$$\text{Energia cinetica acquistata dagli ioni} \Rightarrow \frac{1}{2} m \cdot v^2 = z \cdot V$$

- z è la carica degli ioni; in genere = 1
- V è il potenziale della griglia
- m è la massa dello ione
- v è la velocità dello ione

Si può quindi far percorrere agli ioni la giusta traiettoria per giungere al rivelatore variando l'intensità del campo magnetico B, oppure quella del potenziale delle griglie V (di solito si fa variare B).

Così per ogni valore B·r/V arriveranno al rivelatore solo gli ioni che possiedono il valore m/z che soddisfa la precedente equazione.

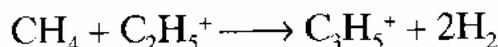
Questo tipo di ionizzazione è *hard*. Gli ioni vengono generati ad un livello energetico molto alto e si possono avere frammentazioni estese che lasciano poco o nulla dello ione molecolare. Per risolvere questo problema sono state messe a punto altre tecniche di ionizzazione, dette tecniche *soft* (e sono le seguenti).

IONIZZAZIONE CHIMICA (C.I.) *Chemical Ionization*

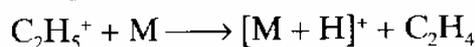
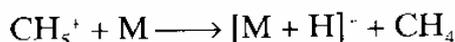
La ionizzazione chimica viene utilizzata quando gli ioni molecolari prodotti con il metodo dell'impatto elettronico sono troppo poco stabili e si frammentano completamente.

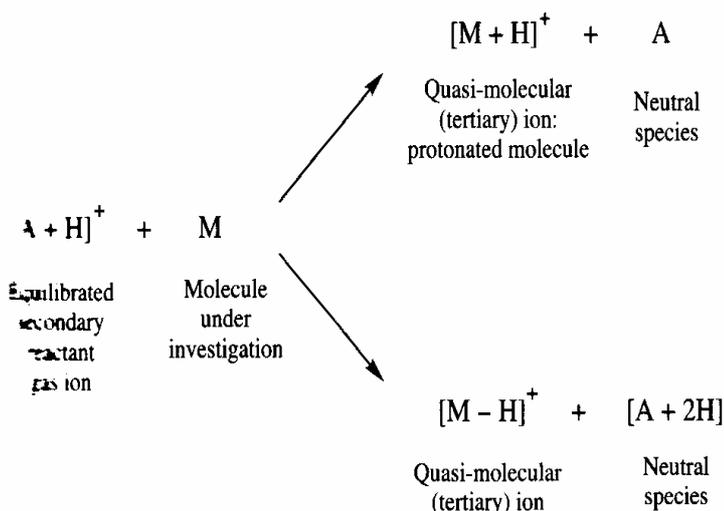
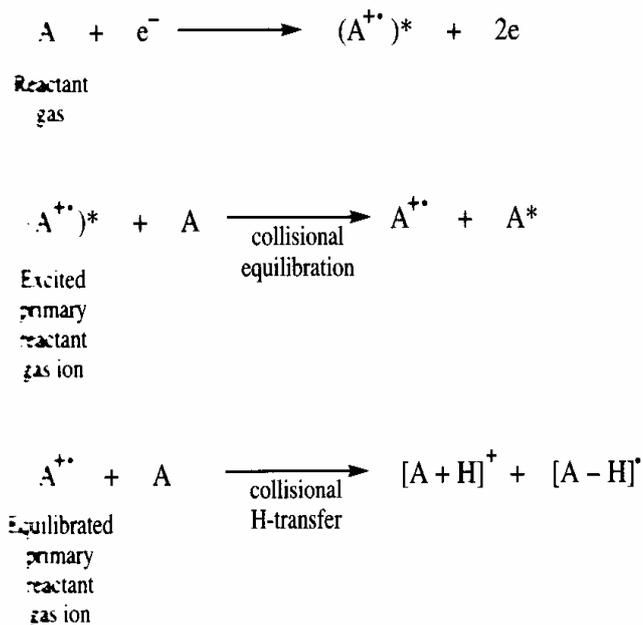
Questa è una tecnica di ionizzazione più "mild", che si basa sull'interazione del campione vaporizzato con un reagente ionizzato, che di solito è un acido di Bronsted gassoso.

I più usati reagenti di questo tipo sono quelli che derivano dalla ionizzazione ad impatto elettronico del metano.



Se la molecola M ha un'affinità per il protone più alta di quella del metano, allora si avrà la formazione dello ione M-H⁺.





IONIZZAZIONE ELETTROSPRAY (E.S.I.) Electron Spray Ionisation

Il campione, sciolto in un solvente polare, è nebulizzato a pressione atmosferica dentro la camera di ionizzazione attraverso un ago tenuto ad un alto potenziale elettrico.

Le goccioline di spray, che si sono caricate positivamente per azione del campo elettrico, vengono attratte verso una "lente di estrazione di ioni", che grossolanamente è costituito da un capillare mantenuto sotto vuoto e a un potenziale negativo; in tal modo il solvente evapora e gli ioni carichi sono accelerati verso l'analizzatore.

Questa tecnica di ionizzazione è largamente usata negli strumenti HPLC-MS.

Gli ioni M-H (detti quasimolecolari) non possiedono una energia così elevata e quindi subiscono una minore frammentazione.

In genere la ionizzazione chimica dà dei frammenti più significativi di quanto non faccia la ionizzazione chimica.

Infatti dopo C.I. i legami C-C tendono a rompersi solo se il prodotto della rottura è particolarmente stabile.

Frequentemente lo scheletro degli atomi di carbonio rimane intatto e il cleavage è limitato a legami tipo C-O, C-S, C-N.

Ne deriva che la CI è particolarmente adatta a molecole come idrocarburi, alcoli, esteri, ammine, amminoacidi, piccoli peptidi che in condizioni di EI darebbero una frammentazione eccessiva.

In pratica il metodo consiste nell'introdurre, insieme al campione, del metano in forte eccesso. Statisticamente sarà il metano ad essere ionizzato per impatto elettronico, generando CH_4^+ ; questo, incontrando un'altra molecola di CH_4 , forma CH_3^+ e CH_5^+ , che funziona da acido per una molecola organica M generando l'acido coniugato MH^+ .

Questa specie non viene generata ad un livello vibrazionale eccitato, e non frammenta.

La particolarità è che nello spettro vedremo lo ione molecolare + 1.

L'analizzatore consente di differenziare gli ioni generati in base al loro rapporto massa/carica. I più comuni sono:

- ◆ L'ANALIZZATORE MAGNETICO
- ◆ L'ANALIZZATORE A DOPPIA FOCALIZZAZIONE
- ◆ L'ANALIZZATORE A QUADRUPOLO
- ◆ L'ANALIZZATORE A TRAPPOLA IONICA

ANALIZZATORE MAGNETICO

E' l'analizzatore più usato, perchè consente di ottenere le risoluzioni migliori.

E' costituito da un tubo lungo circa 1 metro, piegato con un raggio di curvatura r' ed immerso in un campo magnetico H .

Gli ioni che escono dalla camera di ionizzazione entrano nel tubo analizzatore e, per effetto del campo magnetico, subiscono una deviazione dalla loro traiettoria rettilinea (deflessione). La nuova traiettoria curvilinea ha un raggio di curvatura r che è direttamente proporzionale alla quantità di moto dello ione (mv) e inversamente proporzionale al campo magnetico H .

Le relazioni in gioco sono le seguenti:

$$\text{Energia cinetica degli ioni: } \frac{1}{2} m \cdot v^2 = z \cdot V$$

z = carica dello ione;

V = potenziale di accelerazione

$$\text{Interazione campo magnetico / ione: } H \cdot z = \frac{m \cdot v}{r} \quad H \cdot z = m \cdot v / r$$

H = intensità del campo magnetico

r = raggio di deflessione

Poichè dall'energia cinetica degli ioni abbiamo che:

$$v^2 = \frac{2 \cdot z \cdot V}{m}$$

Combinando la prima espressione con la seconda si ottiene:

$$H^2 \cdot z^2 = \frac{2 \cdot z \cdot V \cdot m}{r}$$

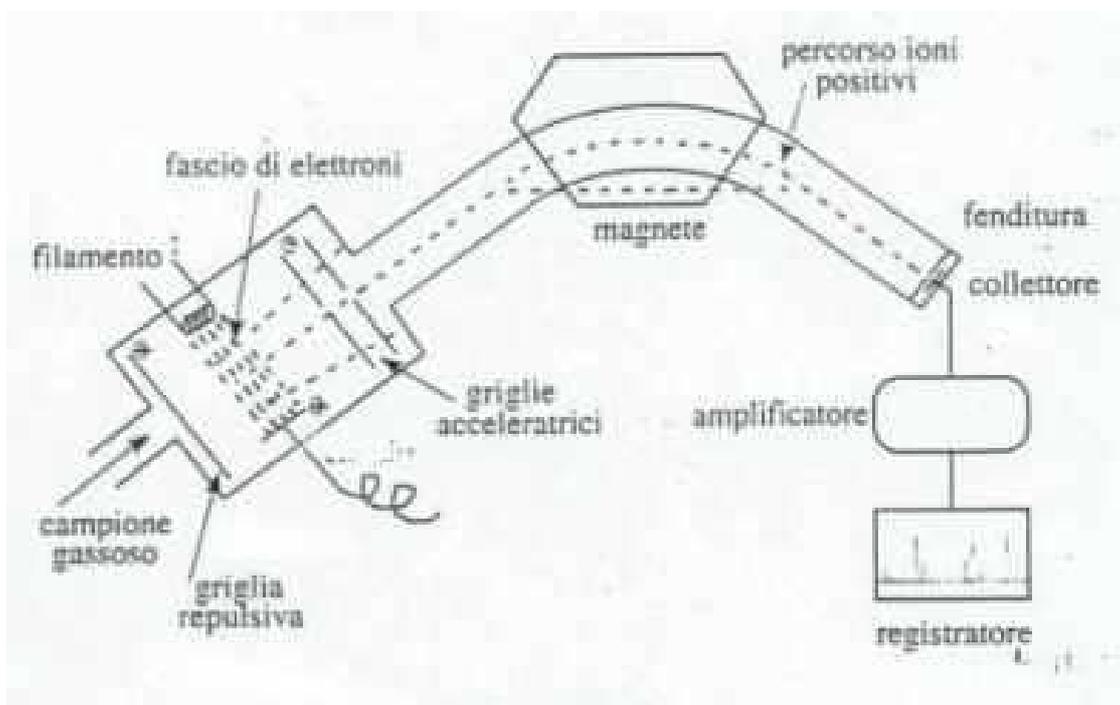
$$\frac{m}{z} = r^2 \cdot \left(\frac{H^2}{2V} \right)$$

Di conseguenza **per un certo valore della coppia H e V esisterà un solo valore di massa m per cui il raggio di deflessione r coincide con il raggio di curvatura del tubo r'.**

Gli ioni che hanno questo valore di massa escono dal tubo, gli altri no.

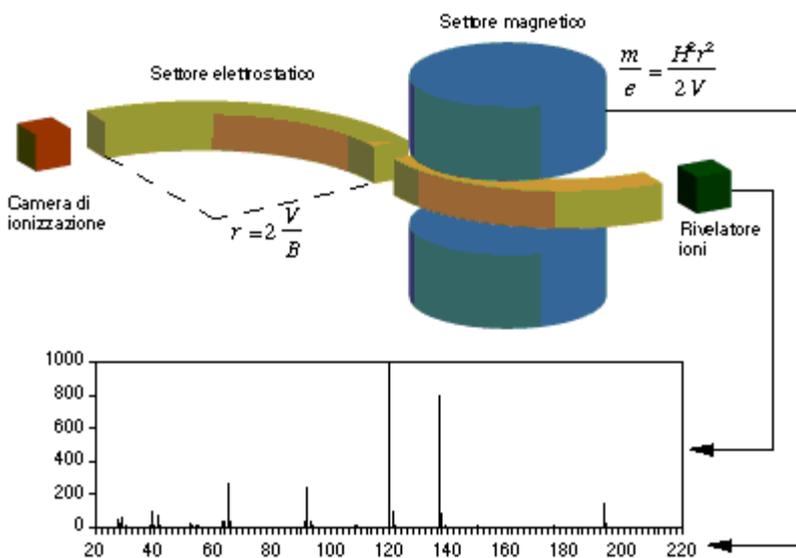
Operando a potenziale V costante e facendo una scansione di campo H è possibile fare uscire dal tubo gli ioni a diversa massa in tempi diversi.

Gli ioni che escono dal tubo vengono raccolti da un fotomoltiplicatore, che traduce l'intensità degli ioni in corrente elettrica (Rivelatore). Gli strumenti sono tarati (si usano dei perfluorocheroseni) in modo che a ciascun valore di campo corrisponda un certo valore di massa. In questo modo la corrente ionica è registrata in funzione non del campo B, ma della massa m. Si ottiene così lo *spettro di massa*, che è un istogramma che riporta in ascisse i valori di massa crescente (gli strumenti sono tarati in genere da 30 a 1000 uma) e in ordinate la corrente ionica.



ANALIZZATORE A DOPPIA FOCALIZZAZIONE

Aggiungendo dopo l'analizzatore magnetico un filtro elettrostatico il percorso degli ioni positivi viene focalizzato ulteriormente in direzione dal campo elettrico statico .



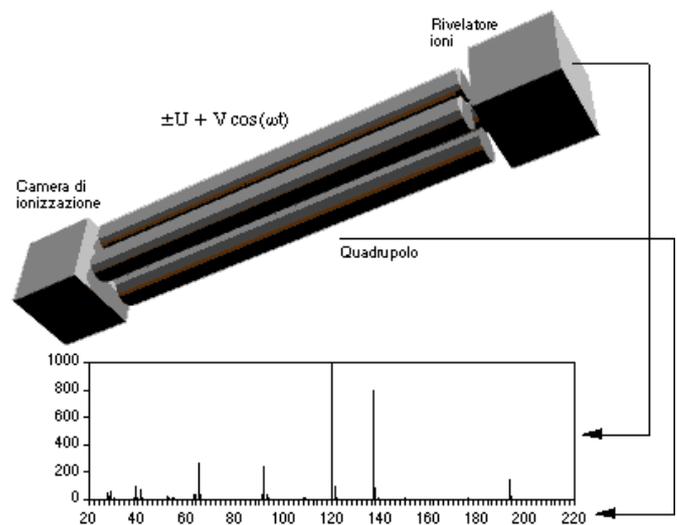
Nel settore elettrostatico gli ioni non vengono separati in funzione del rapporto massa/carica, ma solo focalizzati in base alla loro energia traslazionale; questo perché altrimenti nel settore successivo, quello magnetico, ioni con ugual rapporto m/z ma differente energia traslazionale seguirebbero traiettorie diverse, diminuendo la risoluzione dello strumento.

Così la risoluzione può raggiungere 100'000 e oltre. Ciò permette di misurare la **massa esatta** fino alla quarta cifra decimale. Gli spettrometri ad alta risoluzione di questo genere sono apparecchiature complicate e costose, e quindi il loro impiego non è molto diffuso per misure di

ANALIZZATORE A QUADRUPOLO

È costituito da quattro barre cilindriche metalliche, lunghe circa 20 cm., che delimitano il "cammino" percorso dagli ioni provenienti dalla camera di ionizzazione e diretti al detector.

Le barre sono mantenute ad un potenziale elettromagnetico oscillante, in modo che quando le due sbarre verticali hanno potenziale positivo quelle orizzontali l'hanno negativo, e viceversa. Gli elettroni, accelerati dalle piastre acceleratrici, entrano nel tunnel delimitato dalle barre e vengono respinti dai poli positivi ed attratti dai negativi.

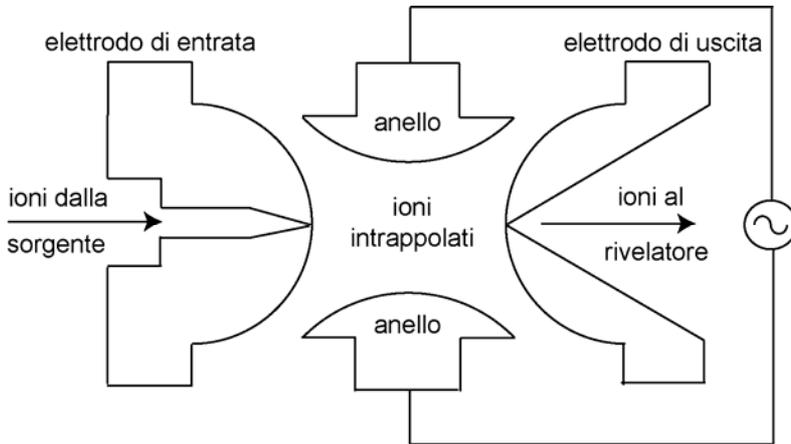


Tuttavia, a causa dell'oscillazione del quadrupolo gli ioni assumono una traiettoria a zig zag e finiscono con lo scaricarsi su una delle barre, tranne quelli che, per un certo valore di frequenza di oscillazione, hanno un'energia cinetica tale per cui il moto diventa sinusoidale e riescono ad uscire dal tunnel ed entrare nel sistema di rivelazione (fotomoltiplicatore).

Operando quindi una scansione di frequenza di oscillazione del campo è possibile far uscire ioni a massa molecolare crescente. Rispetto all'analizzatore a tubo il quadrupolo ha una risoluzione più bassa (< 1000), ma tempi di scansione più bassi e un minor costo.

ANALIZZATORE A TRAPPOLA IONICA

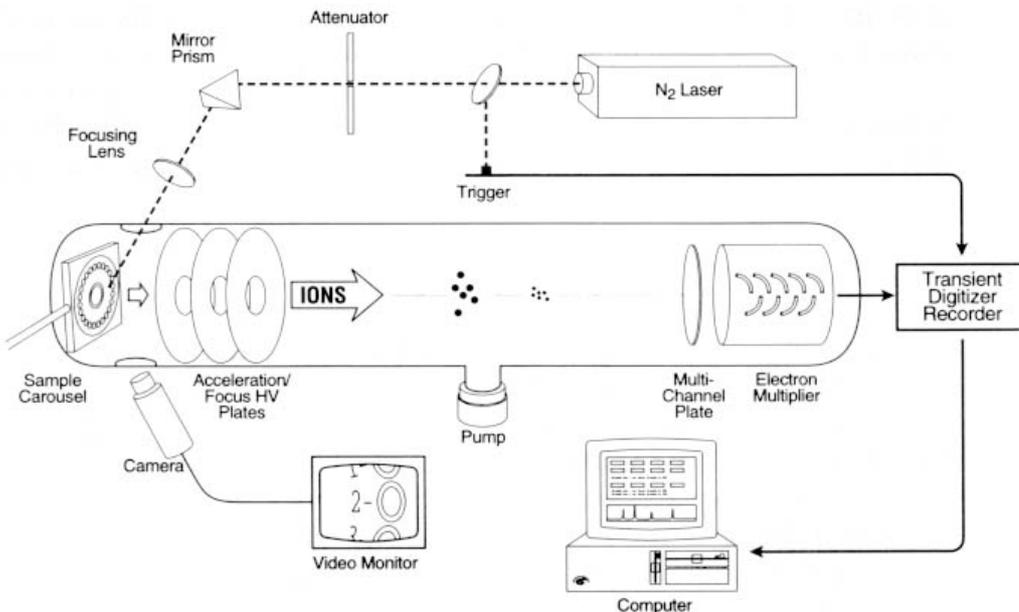
Può essere considerato una variante dell'analizzatore a quadrupolo; qui infatti, anzichè permettere agli ioni di attraversare il campo quadrupolare, la trappola ionica trattiene tutti gli ioni al suo interno.



Questa variante dell'analizzatore a quadrupolo usa tre elettrodi (un elettrodo anulare posto fra due elettrodi semisferici di entrata e uscita) per intrappolare ed accumulare gli ioni in una cavità di volume ristretto, la cosiddetta trappola ionica (ion trap), allo scopo di ottenere una elevata sensibilità. I due elettrodi laterali hanno un piccolo foro al centro attraverso il quale passano gli ioni.

Lo spettro di massa è generato variando il potenziale elettrico in modo da espellere in sequenza dalla trappola verso il rivelatore gli ioni secondo un valore m/z crescente.

ANALIZZATORE A TEMPO DI VOLO (TOF)



Il principio su cui si basa questo analizzatore è che ioni di differente valore massa/carica hanno uguale energia, ma differente velocità dopo l'accelerazione subita nella camera di ionizzazione. Ne deriva che il tempo che ciascuno mette per attraversare l'analizzatore è differente.

ION CYCLOTRON RESONANCE (FT-MS)

Gli ioni generati da un filamento vengono intrappolati in una cella cubica, in cui per opera di un campo magnetico unitamente ad un campo elettrico assumono un'orbita cicloidale con frequenza dipendente dal rapporto m/z .

TANDEM MASS SPECTROSCOPY (MS/MS)

In questa spettrometria si usano due spettrometri di massa in serie.

RIVELATORE

Come collettore e rivelatore degli ioni si usa comunemente un moltiplicatore elettronico, costituito da una serie di elettrodi in cascata.

Quando uno ione arriva sul primo elettrodo questo emette un fascio di elettroni che vanno a colpire il secondo elettrodo, il quale a sua volta emette una quantità maggiore di elettroni e così via. Il risultato è una forte amplificazione del segnale che viene poi digitalizzato ed elaborato infine dal calcolatore dello spettrometro per la presentazione dello spettro di massa.

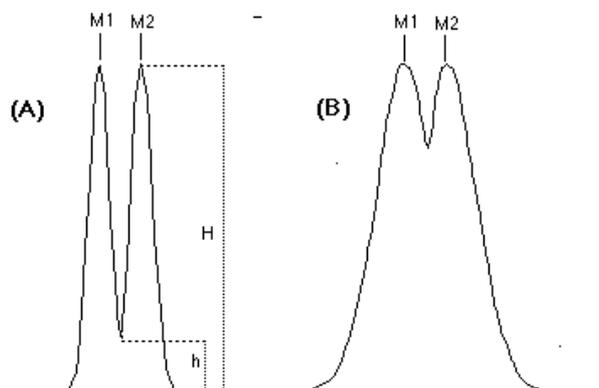
Naturalmente nel caso del metodo FTMS il sistema di rivelazione è invece un ricevitore di radiofrequenza, che a sua volta è collegato al calcolatore per l'analisi di Fourier dell'interferogramma, da cui si ottiene lo spettro di massa.

RISOLUZIONE DELLO STRUMENTO

Il potere risolutivo dello strumento determina la capacità di separare tra di loro ioni di uguale massa nominale ma diversa massa esatta.

Nell'esame delle caratteristiche di uno strumento e' necessario stabilire cosa si intenda per "separare". Nella figura, gli ioni sono in entrambi i casi separati, ma ovviamente la risoluzione e' maggiore nel caso A.

I dati di potere risolutivo sono per convenzione misurati su coppie di segnali separati tra di loro da una valle (h) alta il 10% dell'altezza (H).



Il potere risolutivo viene quindi definito come

$$\text{Potere Risolutivo} = \frac{\text{Massa 1}}{\text{Massa 2} - \text{Massa 1}}$$

La risoluzione di uno strumento può essere regolata agendo su fenditure micrometriche che restringono la dispersione del fascio ionico. Riducendo l'ampiezza delle fenditure aumenta la risoluzione (fino al limite dello strumento), ma diminuisce la sensibilità (meno ioni raggiungono il rivelatore).

Il livello di informazione che possiamo ottenere da uno spettrometro di massa dipende dal suo potere risolutivo. Strumenti a bassa risoluzione forniscono solo la massa nominale degli ioni. Strumenti ad alta risoluzione forniscono la massa esatta degli ioni, che in genere definisce univocamente la composizione elementare degli ioni corrispondenti.

Ad esempio, in uno strumento a bassa risoluzione CO, C₂H₄ ed N₂ forniscono un unico segnale a massa nominale 28; in uno strumento ad alta risoluzione si possono osservare invece tre ioni separati di massa esatta.

Lo strumento in questo caso per separare CO da N₂ si dovrà usare uno strumento che abbia un potere risolutivo:

$$\frac{28}{28,006148 + 27,994915} = \frac{28}{0,011233} = 2492,65 \approx 2500$$

Per risolvere picchi con differenze di rapporto m/z inferiori ci vogliono strumenti con potere risolutivo maggiore.

LO SPETTRO DI MASSA

Lo spettro di massa si presenta quindi come un insieme di linee verticali (*picchi*) di intensità diversa, ciascuna corrispondente al valore di massa di uno ione frammento.

Il picco a valore di massa più elevato è quello relativo allo ione molecolare. In genere, la corrente ionica è normalizzata a 100, ossia il picco più alto (*picco base*) ha valore 100, indipendentemente dal suo valore assoluto.

Dallo spettro di massa si può risalire dunque alla struttura di un composto incognito, attribuendo ai singoli ioni una composizione elementare e ricostruendo i meccanismi di frammentazione seguendo schemi tipici per le varie classi di composti.

Nell'interpretazione di uno spettro si segue una procedura abbastanza semplice:

- ➡ identificazione dello ione molecolare.
- ➡ identificazione di ioni caratteristici.

- ➡ identificazione di processi di frammentazione caratteristici.
- ➡ ricostruzione della struttura della molecola sulla base della conoscenza di meccanismi di frammentazione standard

PICCO DELLO IONE MOLECOLARE

Lo ione molecolare si genera dalla molecola originale M per eliminazione di un elettrone: è un radicale catione contenente un elettrone a spin spaiato, indicato dal simbolo •



La sua massa è praticamente uguale a quella della molecola originaria, dato che la perdita di massa dovuta all'espulsione dell'elettrone è trascurabile. In pratica, assegnando con certezza il picco dello ione molecolare di una sostanza pura si determina immediatamente la massa molecolare M.

Tuttavia il picco può essere poco intenso o addirittura assente nel caso di molecole facilmente frammentabili (l'intensità del picco dipende dalla stabilità della specie che lo genera); *la sua intensità è maggiore per molecole lineari e minore per molecole ramificate, inoltre in una serie omologa diminuisce all'aumentare della massa molecolare.*

In generale si osserva la seguente graduatoria di intensità per le diverse classi di composti organici:

- ▶ - Picco molto intenso aromatici > olefine coniugate > alcani a catena lineare corta.
- ▶ - Picco poco intenso chetoni > ammine > esteri > eteri > acidi, aldeidi, ammidi, alogenuri.
- ▶ - Picco assente molecole ramificate, alcoli terziari, nitrili, nitrocomposti.

In generale quindi *a parità di struttura l'intensità del picco decresce all'aumentare del PM.*

Nel dubbio, se il picco è troppo basso, si può ricorrere alla misura alternativa dello spettro con ionizzazione chimica, che essendo più blanda dell'impatto elettronico dà poca frammentazione e un picco intenso corrispondente a massa M + 1.

Se infatti agissimo diminuendo la differenza di potenziale tra filamento ed anodo (nell'impatto elettronico) dai normali 70 eV a 10 – 15 eV, il picco aumenterebbe sì di intensità ma diminuirebbe di molto la sensibilità dello strumento!

In certi casi l'identificazione del picco dello ione molecolare può essere verificata con la cosiddetta **REGOLA DELL'AZOTO**, secondo cui:

- Se la molecola contiene solamente C, H, O, S, Alogeni o un numero pari di atomi di azoto, lo ione molecolare è di massa nominale **pari**.
- Se la molecola contiene un numero dispari di atomi di azoto, la massa nominale dello ione molecolare è **dispari**.

Lo stesso discorso vale per la massa nominale!

PICCHI ISOTOPICI

Il picco dello ione molecolare è spesso accompagnato da altri picchi, in genere più deboli, a massa $M + 1$, $M + 2$, ecc. dovuti ai cosiddetti *isotopomeri*, cioè alle molecole contenenti isotopi degli elementi che le costituiscono.

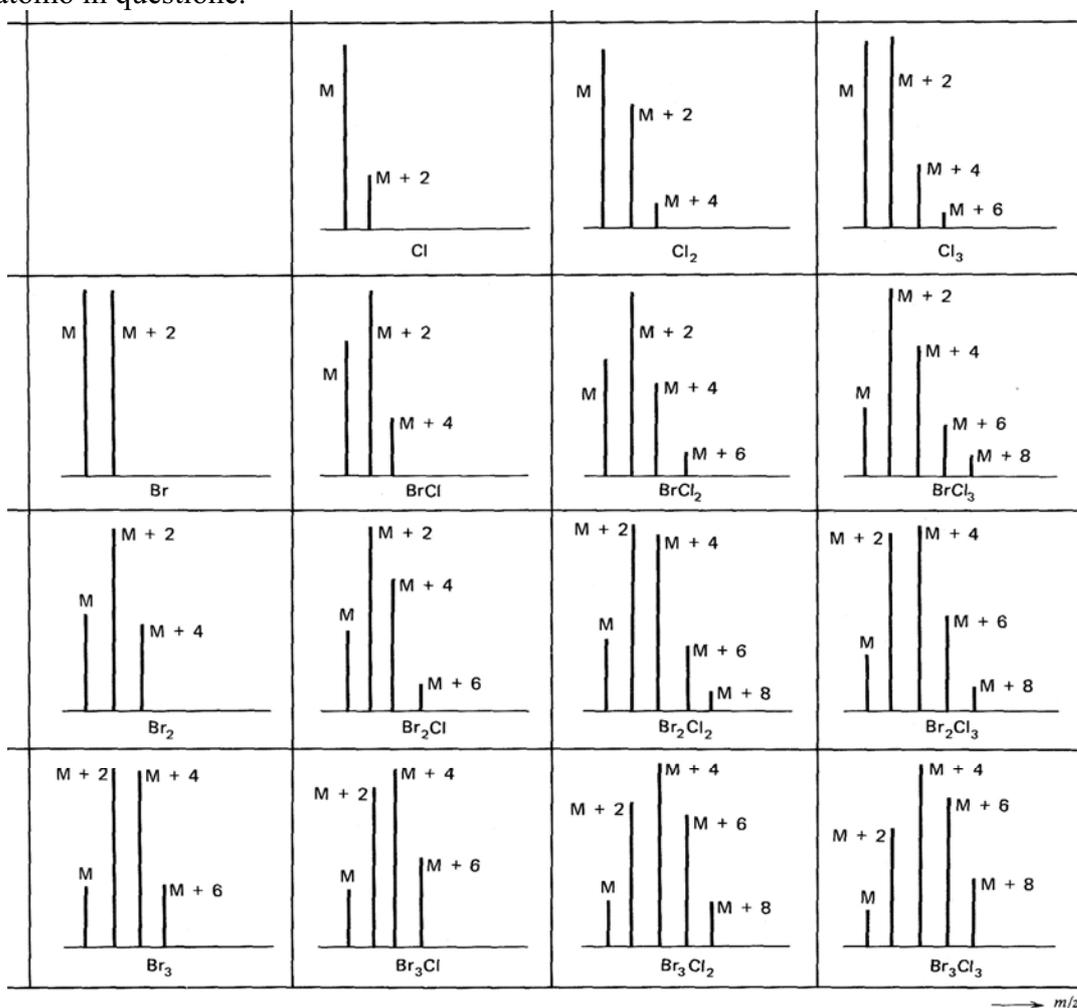
La maggior parte degli elementi che compongono i composti organici, infatti, possiede diversi isotopi naturali, di cui di solito il più leggero è il più abbondante.

Per tre elementi – carbonio, idrogeno e azoto – il principale isotopo pesante è quello la cui massa è superiore di un'unità a quella dell'isotopo più comune. Quando questi elementi sono presenti in un composto organico lo spettro di massa mostra dei piccoli picchi isotopici a $M+1$.

Nel caso di ossigeno, zolfo, cloro e bromo, le masse dei principali isotopi pesanti sono superiori di due unità a quelle degli isotopi più abbondanti. Perciò la presenza di questi elementi è rivelata dai picchi isotopici a $M+2$.

Dallo studio dei picchi isotopici e conoscendo le percentuali di abbondanza naturale dei vari isotopi, è possibile risalire alla formula molecolare.

Inoltre la presenza di alcuni atomi come cloro e bromo, che hanno composizioni isotopiche peculiari (^{35}Cl e ^{37}Cl 3:1; ^{79}Br e ^{81}Br circa 1:1), può facilmente essere ipotizzata osservando le intensità dei picchi isotopici dello ione, che rispecchieranno quelle relative all'abbondanza naturale dell'atomo in questione.



Ora, se nella molecola sono presenti solo C, H, N, O, F, P, I, le intensità percentuali approssimative attese per (M+1) ed (M+2) possono essere calcolate usando le seguenti formule:

$$\%(M + 1) = [(1.1 \cdot \text{numero atomi di C}) + (0.38 \cdot \text{numero atomi di N})]$$

$$\%(M + 2) = \left[\left(\frac{(1.1 \cdot \text{numero atomi di C})^2}{200} \right) + (0.2 \cdot \text{numero atomi di O}) \right]$$

In generale diciamo che se in una molecola sono presenti più di un atomo di un elemento costituito da due isotopi, le abbondanze dei picchi si ottengono dal risultato della seguente espressione binomiale:

$$(a + b)^m$$

a = % abbondanza isotopo più leggero
b = % abbondanza isotopo più pesante
m = numero degli atomi dell'elemento presente nella molecola

IONI DOPPIAMENTE CARICHI

Come detto, lo spettro di massa si presenta come un insieme di righe verticali (*picchi*), ciascuna corrispondente ad un certo valore di massa m.

Il picco a valore di m più elevato è lo ione molecolare, gli altri corrispondono a ioni-frammento derivati per frammentazione dello ione molecolare. L'altezza dei picchi è normalizzata a 100. Il picco alto 100 è il *picco base*; corrisponde allo ione-frammento più stabile, che può essere o meno lo ione molecolare.

Nella camera di ionizzazione (soprattutto quando si usa l'elettrospray) può succedere che alcuni ioni subiscono un ulteriore strappo di elettroni, con formazione di **ioni doppiamente carichi** (M^{++}). Questi vengono focalizzati come se fossero ioni di massa $(M/2)^+$. Nonostante che questo fenomeno sia molto raro, è comunque corretto mettere in ascisse non la massa m, ma il rapporto m/z, dove z è la carica dello ione

IONI METASTABILI

Spesso la frammentazione di uno ione m_1 non avviene nella camera di ionizzazione, ma nella zona immediatamente precedente l'analizzatore magnetico, per dare uno ione di massa m_2 .

L'energia traslazionale dello ione m_2 sarà (m_2/m_1) eV. Ne deriva che lo ione formatosi m_2 non apparirà ad un valore di m/z eguale ad m_2 bensì ad:

$$m^* = m_2^2/m_1$$

Ioni di tale tipo vengono detti metastabili, e sono riconoscibili perchè hanno valori non interi di m/z, e sono più larghi e meno abbondanti dei picchi normali.

Correlando i picchi di massa m_1 ed m_2 , ossia trovando quali sono i picchi, che soddisfano l'equazione m^* , si possono estrarre importanti informazioni sulle molecole e le loro frammentazioni.

SPETTRI DI MASSA ESATTA

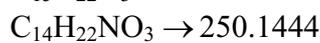
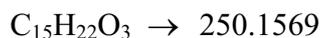
Gli spettrometri ad alta risoluzione permettono di determinare la massa con una accuratezza fino alla quarta cifra decimale, ciò che si chiama comunemente la massa esatta. Dato che le masse dei nuclidi non sono intere, la massa molecolare esatta è un parametro che caratterizza univocamente la formula bruta della sostanza.

Es. quattro molecole di massa 44 e differenti formule brute hanno le seguenti masse esatte:

Biossido di carbonio	CO ₂	→	43.9898	}	Δ = 0.0113
Ossido nitroso	N ₂ O	→	44.0011		
Acetaldeide	C ₂ H ₄ O	→	44.0262	}	Δ = 0.0251
Propano	C ₃ H ₈	→	44.0626		

La differenza minima 0.01 è facilmente misurabile con uno spettrometro avente una risoluzione di almeno $44/0.01 = 4400$.

Naturalmente all'aumentare della massa molecolare è necessaria risoluzione maggiore. Per esempio le due molecole di massa circa 250:



differiscono di 0.0125 e quindi la risoluzione deve essere $250/0.0125 = 20000$. Ma anche questo valore è raggiungibili da spettrometri ad alta risoluzione che arrivano fino a 100000.

La massa esatta può essere determinata anche indirettamente, facendo un confronto dello spettro dove si ottiene la massa nominale con lo spettro di una sostanza di riferimento di cui sia nota la massa esatta.

Poiché:

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2}{2V}$$

mantenendo costante B e facendo variare il potenziale di accelerazione V si può calcolare il valore di m/z confrontandolo col rapporto tra m/z e V di un picco di riferimento di cui si conosce la massa esatta.

La conoscenza della massa esatta e quindi della formula bruta permette il calcolo del **GRADO DI INSATURAZIONE** (GI), che dà la somma del numero dei doppi legami, degli anelli e del doppio dei tripli legami presenti nella molecola. Il GI si calcola con la formula

$$GI = \text{Tetra valenti} - \frac{\text{Mono valenti}}{2} + \frac{\text{Tri valenti}}{2} + 1$$

Atomi Tetraivalenti = C, Si, etc.

Atomi Trivalenti = N, P, etc.

Atomi Monovalenti = H, alogeni, etc.

FRAMMENTAZIONE

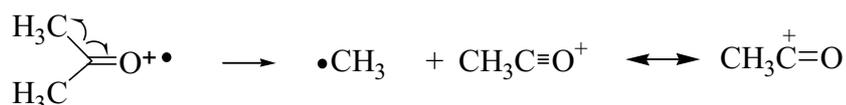
Lo ione molecolare è una specie estremamente ricca di energia e, specialmente nel caso di molecole complesse, le sue sorti possono essere molto diverse. Lo ione molecolare può decomporsi in un'ampia varietà di modi ed i frammenti prodotti possono subire un ulteriore processo di scissione. Le principali frammentazioni delle molecole organiche si distinguono in:

- **SCISSIONI PRIMARIE** (che avvengono sullo ione molecolare)
- **SCISSIONI SECONDARIE** (che avvengono sui frammenti)

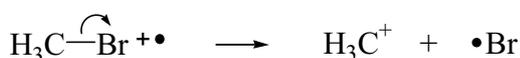
- **SCISSIONI SEMPLICI** (con rottura di un legame semplice fra due atomi)
- **SCISSIONI MULTIPLE O RIARRANGIAMENTI** (reazioni di frammentazione con rottura di due legami covalenti)

Ricordiamo inoltre che la scissione di un legame sullo ione molecolare può essere *omolitica*, cioè con separazione dei due elettroni del legame, oppure *eterolitica* senza separazione.

Esempio di scissione omolitica:



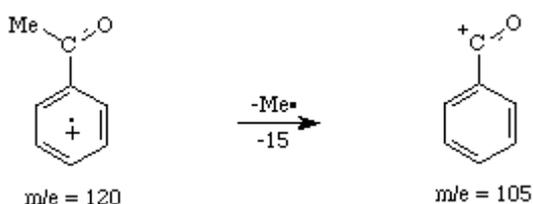
Esempio di scissione eterolitica:



Frammentazioni primarie

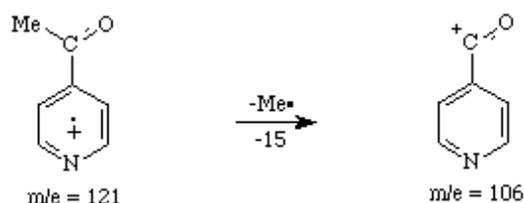
Sono quelle che avvengono direttamente sullo ione molecolare. Avvengono:

- con perdita di un radicale (a numero dispari di elettroni)



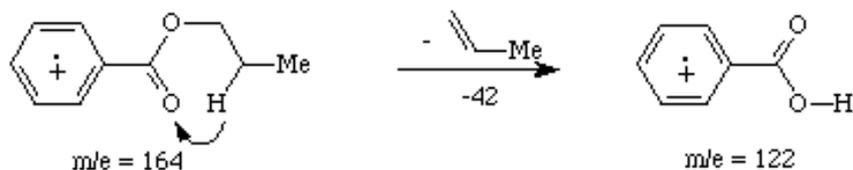
Forniscono un frammento cationico a numero pari di elettroni. Se lo ione molecolare non contiene azoti ed ha quindi massa pari, i frammenti così generati hanno massa dispari

Se ione molecolare e frammenti contengono un numero dispari di atomi di azoti, la regola è invertita.

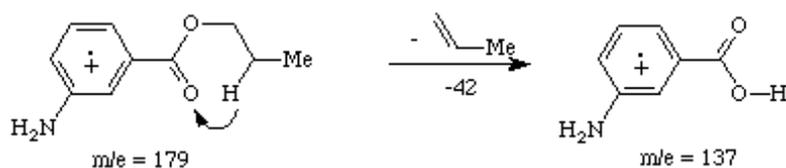


● con perdita di una molecola neutra

Il frammento e' ancora un radicale catione a numero dispari di elettroni. Se nella molecola non sono contenuti atomi di azoto, le masse nominali di ione molecolare e frammento sono in questo caso entrambe pari.

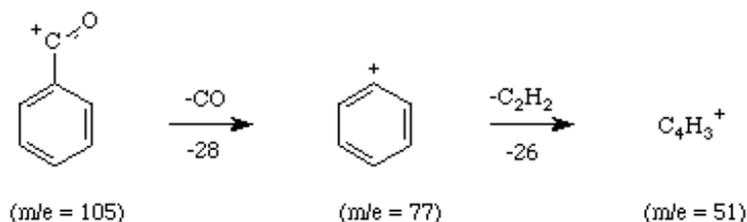


Se e' presente un atomo di azoto (o in generale un numero dispari di atomi di azoto) nello ione molecolare e nel frammento carico, entrambe le masse sono dispari.



Frammentazioni secondarie

Gli ioni generati dalle frammentazioni primarie possono ancora contenere un eccesso di energia e subire a loro volta processi di frammentazione:

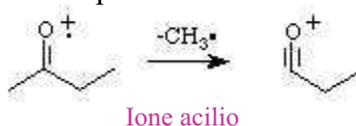


Frammentazioni semplici

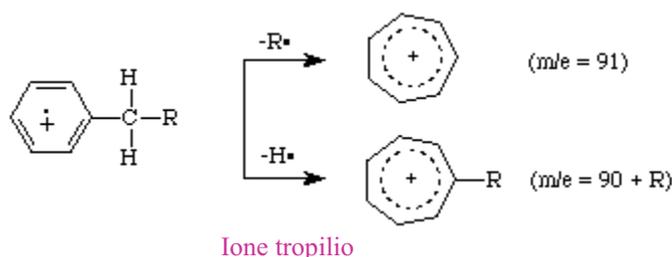
Sono reazioni di frammentazione con rottura di un legame semplice tra due atomi. Quando queste scissioni interessano il catione radicalico producono sempre un catione ed un radicale libero. Possono essere di vario tipo:

SCISSIONI IN α ATTIVATE, avvengono in α ad eteroatomi e a gruppi funzionali.

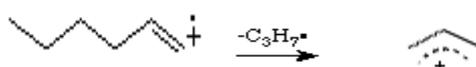
I legami carbonio-carbonio adiacenti al gruppo carbonilico di un'aldeide o di un chetone si rompono con relativa facilità in quando si formano ioni acilio stabilizzati per risonanza.



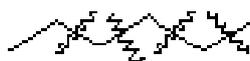
SCISSIONE BENZILICA, negli alchilbenzeni si verifica la perdita di un atomo di idrogeno o di un radicale metilico con formazione dello ione tropilio (ione estremamente stabile). Questa frammentazione si traduce in un picco molto intenso a m/z 91.



SCISSIONE ALLILICA; frequentemente la frammentazione degli alcheni produce carbocationi allilici.



SCISSIONI IN α NON ATTIVATE, frammentazioni che avvengono in composti che non hanno eteroatomi e non hanno particolari insaturazioni (idrocarburi alifatici).



M-15; M -29; M -43; ecc.

Frammentazioni multiple o Riarrangiamenti

Sono reazioni di frammentazione con rottura di due legami covalenti.

Quando si verificano a carico di uno ione radicale i prodotti sono un altro catione radicale ed una molecola neutra.

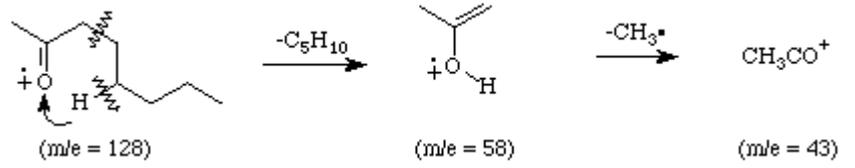
CICLOREVERSIONE DI DIELS-ALDER; generalmente sistemi ciclici insaturi a sei termini possono dare una reazione di Diels-Alder inversa, con formazione di un alchene (dienofilo) e di un catione radicale (diene).

Es.



TRASPOSIZIONE DI MCLAFFERTY; questo riarrangiamento è tipico dei chetoni, degli acidi e degli esteri alifatici.

L'idrogeno migrante si deve trovare sull'atomo in γ rispetto a quello portante l'eteroatomo, in modo che si possa avere uno stato di transizione ciclico a sei membri.



Da notare che è possibile riconoscere una scissione multipla da una frammentazione classica.

Scissione classica: M^+ pari \rightarrow frammentazione dispari (e viceversa)

Riarrangiamento: M^+ pari \rightarrow frammentazione pari