

INTRODUZIONE ALLA SPETTROSCOPIA

La spettroscopia è uno dei principali metodi sperimentali per determinare la struttura della materia. Il suo approccio si basa sull'interazione fra la materia e la radiazione elettromagnetica. Il campione di una sostanza è capace in opportune condizioni sperimentali di emettere, di assorbire o di diffondere radiazioni di frequenza caratteristica della sostanza e questo fenomeno è correlabile con la struttura della sostanza. Il diagramma della intensità della radiazione emessa o assorbita o diffusa dal campione in funzione della frequenza si chiama *spettro* rispettivamente di *emissione* o di *assorbimento* o di *diffusione*. A seconda che il campione sia allo stato atomico o molecolare si parla di spettroscopia atomica o molecolare.

Natura della radiazione elettromagnetica

La radiazione elettromagnetica è descrivibile come una oscillazione del campo elettromagnetico generato da cariche elettriche in moto accelerato. La radiazione è caratterizzata dalla lunghezza d'onda λ , dalla frequenza ν (in Hz), dal numero d'onda $\bar{\nu}$ (in cm^{-1}). Queste grandezze sono collegate dalle relazioni seguenti

$$\lambda(\text{m}) = \frac{c(\text{m s}^{-1})}{\nu(\text{Hz})} \qquad \bar{\nu}(\text{cm}^{-1}) = \frac{1}{\lambda(\text{cm})}$$

dove $c = 2.998 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$ è la velocità della luce nel vuoto.

Il carattere ondulatorio della radiazione si manifesta in fenomeni come l'interferenza e la diffrazione, ma invece per fenomeni come l'effetto fotoelettrico è conveniente descrivere la radiazione come un flusso di particelle, a cui si dà il nome di *fotoni* o quanti di energia radiante. L'energia del singolo fotone è data dalla relazione:

$$E = h\nu = h\frac{c}{\lambda}$$

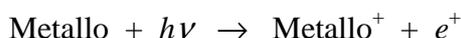
dove $h = 6.626 \times 10^{-34} \text{ J s}$ è la costante di Planck.

L'energia di una mole di fotoni si ottiene moltiplicando l'energia del fotone per il numero di Avogadro:

$$E = N_{\text{Av}} h \frac{c}{\lambda} = \frac{(6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1})(6.626 \times 10^{-34} \text{ Js})(2.998 \times 10^8 \text{ ms}^{-1})}{\lambda} = \frac{1.196 \times 10^5}{\lambda(\text{nm})} \text{ kJ mol}^{-1}$$

A questa quantità è stato dato il nome di un *einstein*.

L'effetto fotoelettrico si spiega come l'emissione di un elettrone dalla superficie di un metallo fotosensibile causata dal fotone

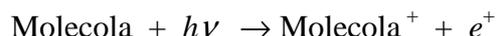


La condizione per il verificarsi di questo processo è che l'energia $h\nu$ del fotone incidente sia superiore all'energia di legame Φ fra l'elettrone ed il solido, detta *funzione lavoro* del metallo; la differenza fra questi due valori è l'energia cinetica $\frac{1}{2} m v^2$ acquisita dall'elettrone espulso, o fotoelettrone:

$$\frac{1}{2} m v^2 = h\nu - \Phi$$

Questa relazione indica che l'energia cinetica del fotoelettrone è direttamente proporzionale alla frequenza della radiazione incidente e indipendente dalla sua intensità, cioè da numero di fotoni da cui è costituita, come si verifica sperimentalmente.

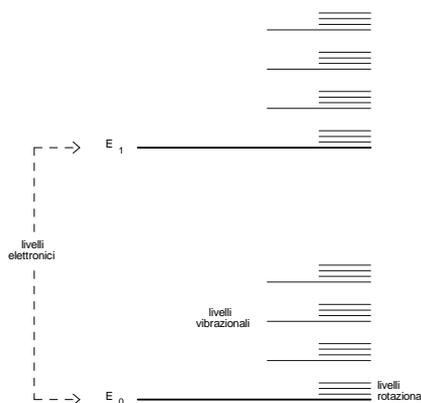
Analogo effetto si osserva con gli atomi e le molecole:



in questo caso il fenomeno prende il nome di ionizzazione, e la grandezza si chiama *potenziale di ionizzazione*. Quest'ultimo effetto è alla base della spettroscopia fotoelettronica.

Interazione tra materia e radiazione

Una molecola viene descritta come un sistema avente diversi valori possibili quantizzati di energia. L'energia complessiva si può distinguere in energia traslazionale della molecola ed energia di movimento rispetto al centro di massa della molecola. Secondo l'approssimazione introdotta da Born e Oppenheimer quest'ultima si può separare in due diversi contributi, che provengono dal moto dei nuclei e dal moto degli elettroni considerati separatamente. Inoltre l'energia dei nuclei si può dividere in rotazionale e vibrazionale. In definitiva l'energia complessiva della molecola, si può distinguere in energia elettronica, energia rotazionale ed energia vibrazionale. Tutte queste forme di energia sono quantizzate, come indicato nel seguente schema:



A questi contributi si può aggiungere l'energia di orientamento in un campo magnetico degli spin elettronici e nucleari.

L'interazione della materia con la radiazione si può schematizzare semplicemente con le due seguenti equazioni:



in cui l'asterisco indica che la molecola è ad un livello quantico di energia maggiore. Una molecola può passare da uno stato quantico di energia $E_{iniziale}$ ad un altro di energia E_{finale} solo se scambia con la radiazione la differenza di energia $\Delta E = E_{finale} - E_{iniziale}$. Se questa transizione o salto quantico è associata allo scambio di energia con un solo fotone $h\nu$ il principio di conservazione dell'energia richiede che

$$\Delta E = h\nu$$

Questa relazione è nota come *condizione di Bohr* ed è la regola fondamentale per tutte le transizioni spettroscopiche ad un fotone (Per completezza conviene aggiungere che transizioni con assorbimento simultaneo di più fotoni sono osservabili solo con l'uso di sorgenti laser molto potenti, ma non sono oggetto della spettroscopia tradizionale).

Frequenza delle righe spettrali

Dalla precedente equazione si ricava che la misura delle varie frequenze spettroscopiche ν presenti in uno spettro, che vengono appunto chiamate righe spettrali, permette di ricavare informazioni sui livelli energetici delle molecole.

In particolare le tipiche spaziatore energetiche fra i livelli di energia elettronica sono dell'ordine di grandezza delle centinaia di kJ mol^{-1} e corrispondono a fotoni nella regione visibile e ultravioletta dello spettro elettromagnetico. Le transizioni sono oggetto della *spettroscopia elettronica*.

Le spaziatore energetiche fra i livelli di energia vibrazionale sono minori e corrispondono a fotoni nella regione infrarossa dello spettro, le relative transizioni vengono osservate nella *spettroscopia vibrazionale* di assorbimento IR e di diffusione anelastica Raman. Le spaziatore energetiche fra i livelli di energia rotazionale sono ancora più piccole e corrispondono a fotoni nella regione delle microonde dello spettro, le transizioni sono oggetto della *spettroscopia rotazionale*.

Le transizioni spettroscopiche degli spin elettronici in un campo magnetico avvengono nella regione delle microonde e vengono studiate dalla spettroscopia di *risonanza di spin elettronico*, ESR. Invece le transizioni spettroscopiche degli spin nucleari nel campo magnetico avvengono nella regione delle onde radio e vengono studiate dalla spettroscopia di *risonanza magnetica nucleare*, NMR.

Infine bisogna aggiungere che le spaziatore fra i livelli energetici traslazionali delle molecole in contenitori macroscopici sono troppo piccole per poter essere osservate spettroscopicamente.

Nella tabella seguente sono riportate riassuntivamente le diverse gamme di frequenza dello spettro elettromagnetico con le corrispondenti energie dei fotoni ed i vari tipi di eccitazione dei livelli energetici che sono di pertinenza dei vari tipi di tecniche spettroscopiche.

Radiazione	Lunghezza d'onda	Num. d'onda cm^{-1}	Frequenza Hz	Energia J mol^{-1}	Eccitazione
Onde radio	> 0.3 m	< 0.03	< 1.0×10^9	< 0.3	NMR
Micro-onde {	0.3 m	0.03	1.0×10^9	0.3	ESR rotazione molecolare
	1 mm	10	3.0×10^{11}	120	
Infrarosso lontano {	25 μm	400	1.2×10^{13}	4.8×10^3	vibrazione molecolare
Infrarosso medio {	2.5 μm	4000	1.2×10^{14}	48×10^3	
Infrarosso vicino {	700 nm	14285	4.3×10^{14}	171×10^3	eccitazione elettroni periferici
Luce visibile {	400 nm	25000	7.5×10^{14}	299×10^3	
Ultravioletto A {	320 nm	31250	9.4×10^{14}	374×10^3	
Ultravioletto B {	290 nm	34482	1.0×10^{15}	412×10^3	eccitazione
Ultravioletto C {	200 nm	50000	1.5×10^{15}	598×10^3	
Ultravioletto lontano {	10 nm	10^6	3.0×10^{16}	1.2×10^4	
Raggi X {					

	10 pm	10^8	10^{20}	1.2×10^7	elettroni interni
Raggi gamma	<10 pm	$>10^8$	$>10^{20}$	$> 1.2 \times 10^7$	eccitaz. nuclei

Intensità delle righe spettrali

Le righe sono caratterizzate oltre che dalla loro posizione nello spettro di frequenze anche da due altri importanti parametri, la loro intensità e la loro larghezza.

La frazione di radiazione monocromatica $-dI/I$ assorbita da uno spessore infinitesimo dl di un campione perpendicolare al raggio incidente e contenente la specie chimica assorbente X è proporzionale allo spessore dl e alla concentrazione $[X]$ attraverso un coefficiente di assorbimento κ

$$-\frac{dI}{I} = \kappa[X] dl$$

Per trovare l'intensità di radiazione trasmessa si integra questa equazione

$$-\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = \kappa[X] \int_0^l dl$$

e si ottiene

$$\ln \frac{I}{I_0} = -\kappa[X] l \quad \text{oppure} \quad 2.303 \log_{10} \frac{I}{I_0} = -\kappa[X] l$$

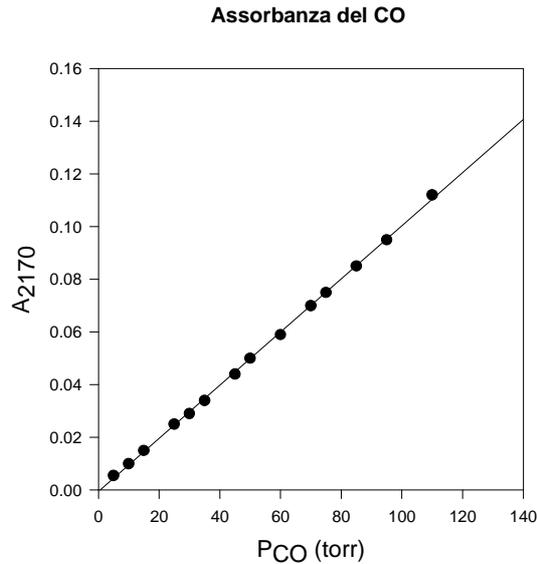
Definendo il coefficiente molare di assorbimento $\varepsilon = \kappa / 2.303$ e la trasmittanza $T = I / I_0$, come rapporto fra la radiazione emergente e la radiazione incidente, si ha infine la nota legge di Lambert-Beer:

$$\log T = -\varepsilon [X] l$$

Il coefficiente di assorbimento ε (in passato chiamato coefficiente di estinzione) è un parametro che dipende dalla natura della specie chimica X e dalla frequenza o lunghezza d'onda della radiazione. Le dimensioni di ε sono (concentrazione \times lunghezza)⁻¹ e le unità sono di solito $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Il valore massimo del coefficiente di assorbimento di una riga spettrale ne caratterizza l'intensità. Transizioni intense hanno coefficienti dell'ordine di $10^4 - 10^5 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Il prodotto adimensionale $A = \varepsilon [X] l$ si chiama *assorbanza* (in passato densità ottica). Il diagramma di T o di A in funzione della frequenza costituisce lo *spettro di assorbimento*. Dato che l'assorbanza è proporzionale alla concentrazione della specie assorbente questo parametro può essere usato per l'analisi quantitativa.

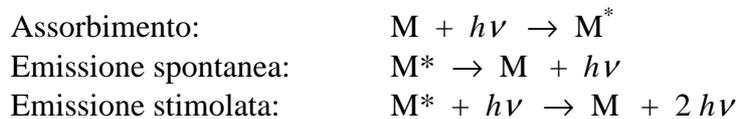
Esempio

L'assorbanza del monossido di carbonio CO gassoso presenta un massimo a 2170 cm^{-1} , cioè nella regione dello spettro infrarosso. Misurando campioni contenenti quantità variabili di CO si trova la seguente correlazione lineare.



Questa correlazione può essere usata per determinare la concentrazione di ossido di carbonio presente nei gas di scarico di un motore a scoppio.

La diversa intensità delle righe di uno spettro è attribuita a due fattori, la popolazione degli stati molecolari attraverso i quali avvengono le transizioni energetiche e l'entità dell'interazione fra le molecole e la radiazione elettromagnetica. Una molecola che ha due generici stati quantizzati, M ad energia inferiore ed M* ad energia superiore, può interagire con il fotone di energia $h\nu$ (uguale alla differenza di energia fra i due stati molecolari, in accordo con la condizione di Bohr) con tre meccanismi, così schematizzati:



L'assorbimento è una transizione stimolata dalla radiazione con velocità proporzionale al numero N di molecole nello stato M ed al numero di fotoni, cioè alla densità della radiazione $\rho(\nu)$, attraverso una costante di proporzionalità B , che si chiama coefficiente di Einstein per l'assorbimento:

$$-\frac{dN}{dt} = B N \rho$$

Si noti che B non è una costante universale, ma un parametro caratteristico della coppia di stati M ed M*. La densità della radiazione è espressa dalla distribuzione di Planck:

$$\rho(\nu) = \frac{8\pi h \nu^3}{c^3} \cdot \frac{1}{e^{h\nu/kT} - 1}$$

L'emissione spontanea è indipendente dalla radiazione e quindi avviene con velocità proporzionale al numero N^* di molecole nello stato eccitato M* tramite il coefficiente di Einstein A:

$$-\frac{dN^*}{dt} = A N^*$$

Invece l'emissione stimolata, analogamente all'assorbimento, dipende dalla densità della radiazione

$$-\frac{dN^*}{dt} = B N^* \rho$$

All'equilibrio termico ad una temperatura T

$$B N \rho = A N^* + B N^* \rho$$

dove il rapporto N/N^* è regolato dalla la distribuzione di Boltzmann

$$\frac{N}{N^*} = e^{h\nu/kT}$$

da cui

$$\rho = \frac{A N^*}{B(N - N^*)} = \frac{A}{B} \cdot \frac{1}{e^{h\nu/kT} - 1}$$

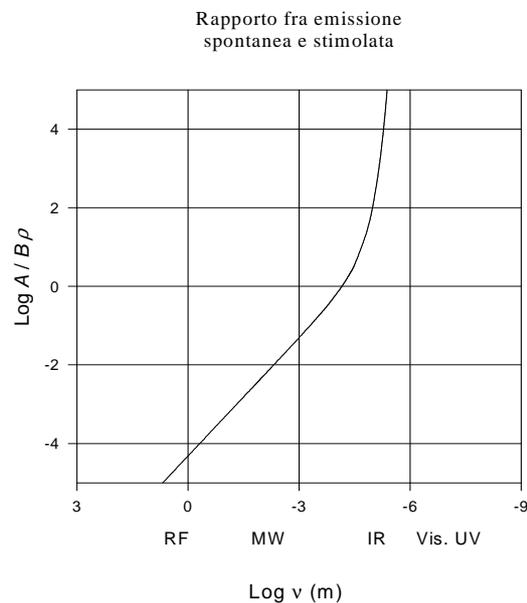
Confrontando con la legge di Planck si ottiene infine

$$\frac{A}{B} = \frac{8\pi h \nu^3}{c^3}$$

Questa relazione indica che l'emissione spontanea aumenta rapidamente con la frequenza della radiazione. Il rapporto fra le due velocità di emissione è

$$\frac{A N^*}{B N^* \rho} = \frac{A}{B \rho} = e^{h\nu/kT} - 1$$

Questo risultato, diagrammato nel seguente grafico, indica che il contributo dell'emissione spontanea è rilevante per la spettroscopia elettronica (regione visibile ed ultravioletto) e trascurabile per la risonanza magnetica (regione microonde e radiofrequenze).



La meccanica quantistica dimostra che il coefficiente B dell'assorbimento e dell'emissione stimolata della radiazione per una transizione fra due stati i e j è proporzionale al quadrato del momento di transizione M_{ij} definito dall'integrale

$$M_{ij} = \int \psi_i \hat{\mu} \psi_j dq$$

in cui le ψ sono le funzioni d'onda degli stati molecolari, μ è l'operatore momento elettrico dipolare della molecola e l'integrazione viene eseguita su tutte le coordinate abbreviate nel simbolo q .

Il momento di transizione è una misura della ridistribuzione di carica elettrica provocata nella molecola dal campo elettromagnetico della radiazione nel corso della transizione spettroscopica. Se la ridistribuzione di carica non ha carattere dipolare il momento di transizione è nullo, la transizione non si osserva nello spettro e viene tecnicamente chiamata *transizione proibita*, se invece il momento è diverso da zero si ha la cosiddetta *transizione permessa*.

Da questo punto di vista si può dire che la molecola si comporta in modo simile all'antenna della televisione, in cui il campo elettromagnetico a radiofrequenza induce una oscillazione di carica.

In conclusione due sono i fattori che determinano l'intensità di una riga dello spettro. Il primo è la probabilità di transizione che è proporzionale al quadrato del momento di transizione. Il secondo è il numero di molecole che si trovano nello stato iniziale da cui ha origine la transizione. Il numero di molecole di uno stato di energia E è regolato dal fattore $\exp(-E/kT)$ della distribuzione di Boltzmann. Pertanto la popolazione di stati ad energia maggiore di kT è relativamente bassa e transizioni che originano da tali stati non sono osservabili, a meno che artificialmente la popolazione non venga arricchita. Questo artificio si ottiene con metodi termici come nella spettroscopia di emissione che fa uso della fiamma, della scintilla o dell'arco elettrico. L'alternativa ai metodi termici è quella del pompaggio ottico, usato nella tecnica laser.

Larghezza delle righe spettrali

In base al principio di Heisenberg la durata nel tempo e l'incertezza nell'energia di uno stato sono correlate dalla relazione

$$\tau \Delta E = \frac{h}{2\pi}$$

cioè l'energia di uno stato che esiste per un tempo breve non può essere precisa. Questa indeterminazione dell'energia si ripercuote sulla indeterminazione della frequenza di transizione che è allargata di un fattore

$$\Delta \nu = \frac{1}{2\pi\tau}$$

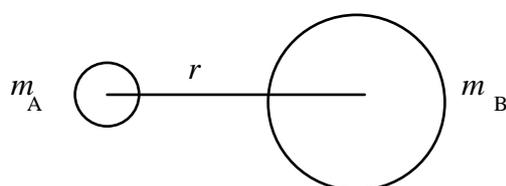
Dato che nessuno stato ha durata infinita le righe spettrali sono più o meno larghe a seconda della durata degli stati. La durata degli stati è l'inverso del coefficiente di emissione spontanea, che si è visto dipende dal cubo della frequenza. Ad esempio le transizioni rotazionali a bassa frequenza sono caratterizzate da righe molto strette dell'ordine dei mHz, mentre le transizioni elettroniche a frequenza maggiore possono raggiungere larghezze di riga dell'ordine dei MHz.

SPETTROSCOPIA NELL'INFRAROSSO

I principali settori della spettroscopia ottica sono la spettroscopia rotazionale, quella vibrazionale e quella elettronica. Gli spettri dovuti a transizioni fra livelli energetici rotazionali si presentano nella regione dell'infrarosso lontano o micro-onde, al di sotto di 400 cm^{-1} . La loro applicazione chimica è la determinazione delle distanze interatomiche in molecole allo stato gassoso. Gli spettri dovuti a transizioni fra livelli energetici rotazionali vibrazionali si presentano nella regione dell'infrarosso che va da 4000 a 400 cm^{-1} ; per questo motivo si parla anche di spettroscopia IR. La spettroscopia vibrazionale dà informazioni sulle forze di legame e sulla geometria molecolare. Dal punto di vista dell'analisi chimica è una tecnica utile per il riconoscimento di molecole o di gruppi caratteristici nelle molecole e per il loro dosaggio.

Spettro rotazionale

I livelli quantizzati dell'energia cinetica rotazionale di una molecola biatomica

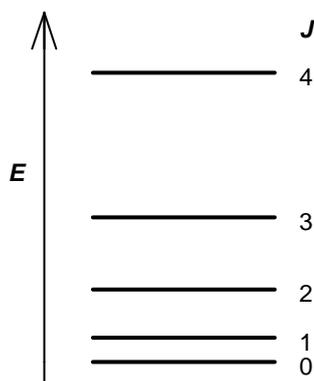


sono dati dalla relazione

$$E_J = \frac{J(J+1)\hbar^2}{2I}$$

dove $J = 0, 1, 2, \dots$ è il numero quantico rotazionale e $I = \frac{m_A m_B}{m_A + m_B} r^2$ è il momento di inerzia. Ad

ogni livello corrispondono $2J + 1$ stati degeneri. La scala dei livelli energetici è illustrata nel seguente diagramma:



Le transizioni spettroscopiche osservabili corrispondono alla regola di selezione $\Delta J = \pm 1$, dove il segno positivo corrisponde all'assorbimento e quello negativo all'emissione, cioè sono quelle fra livelli adiacenti, $0 \leftrightarrow 1$, $1 \leftrightarrow 2$, $2 \leftrightarrow 3$ e così via.

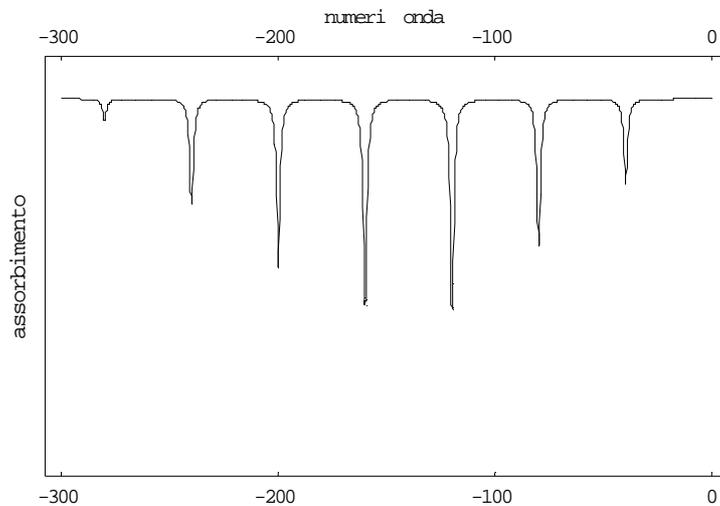
La differenza di energia fra un livello J e quello precedente $J - 1$ è

$$\Delta E = 2J \frac{\hbar^2}{2I},$$

e la frequenza delle transizioni rotazionali espressa in numeri d'onda al centimetro è

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} = \frac{\Delta E}{hc} = 2J \frac{\hbar}{4\pi c I} = 2J B$$

in cui B è la *costante rotazionale*, dell'ordine di grandezza dei cm^{-1} . Si osserva che la frequenza delle righe dello spettro cresce all'aumentare di J e la loro separazione è la costante $2B$. Per esempio l'acido fluoridrico ha lo spettro che segue, con $B=40.5 \text{ cm}^{-1}$:



Spettro IR delle molecole biatomiche

Il modello semplice per il moto vibrazionale di una molecola biatomica è l'*oscillatore armonico* monodimensionale. Un oscillatore è un sistema capace di convertire con periodicità l'energia potenziale in energia cinetica e viceversa; l'oscillatore è armonico se la dinamica è descritta dalla relazione

$$f = -kx$$

che indica che la forza di richiamo f è proporzionale al contrario dello spostamento dalla posizione di equilibrio $-x$ attraverso la costante k , detta *costante di forza*. La funzione energia potenziale è data dall'espressione

$$V = -\int f dx = \frac{1}{2} kx^2$$

cioè un oscillatore armonico è caratterizzato da una energia potenziale di tipo parabolico. Se si inserisce questa funzione nell'equazione di Schroedinger relativa al moto di due atomi di massa m_1 ed m_2 si ottengono gli autovalori dell'energia specificati dal numero quantico vibrazionale ν

$$E_\nu = \left(\nu + \frac{1}{2}\right) h\nu = \left(\nu + \frac{1}{2}\right) hc\tilde{\nu} \quad ; \quad \nu = 0, 1, 2, \dots$$

dove ν è la frequenza di vibrazione in s^{-1} e invece $\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c}$ è la frequenza di vibrazione in cm^{-1}

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad , \quad \tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \text{con} \quad \frac{1}{\mu} = \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2}$$

Due sono le differenze fra l'oscillatore quantistico e quello classico. La prima è che le energie permesse al sistema sono solo quelle corrispondenti ai diversi valori discreti del numero quantico vibrazionale e separate fra di loro della quantità costante $h\nu$. La seconda è che l'energia minima corrispondente al numero quantico $v = 0$ non è nulla, ma vale $\frac{1}{2} h\nu$, quantità che viene appunto denominata *energia del punto zero*. In altri termini la vibrazione molecolare non si arresta al punto di equilibrio, neppure allo zero assoluto.

Quando la molecola biatomica interagisce con la radiazione elettromagnetica subisce transizioni tra i livelli vibrazionali la cui probabilità è data dall'integrale del momento di transizione. Da questo si ricava la regola di selezione per il numero quantico $\Delta v = \pm 1$, dove il segno positivo corrisponde all'assorbimento e quello negativo all'emissione. Dunque la frequenza delle transizioni permesse coincide con la frequenza di vibrazione.

Si noti inoltre che se la molecola biatomica è formata da due atomi uguali come quella dell'azoto N_2 il momento dipolare è nullo e non varia per effetto della vibrazione dei due nuclei. Quindi il momento di transizione è nullo e la molecola non assorbe nell'infrarosso. Se invece la molecola è eteronucleare, come per esempio l'ossido di carbonio, allora ha momento dipolare che può variare durante la vibrazione e quindi la transizione è attiva nell'infrarosso. Riassumendo le regole di selezione per gli spettri vibrazionali di molecole biatomiche sono:

$$\mu \neq 0 \quad \Delta v = \pm 1$$

Struttura fine rotazionale

Quando si misura uno spettro infrarosso di un gas come l'ossido di carbonio con uno spettrometro ad alta risoluzione si nota che la banda di assorbimento è costituita da una serie di picchi separati da pochi cm^{-1} . Questa struttura fine è dovuta a transizioni energetiche vibrazionali fra diversi sottolivelli rotazionali.

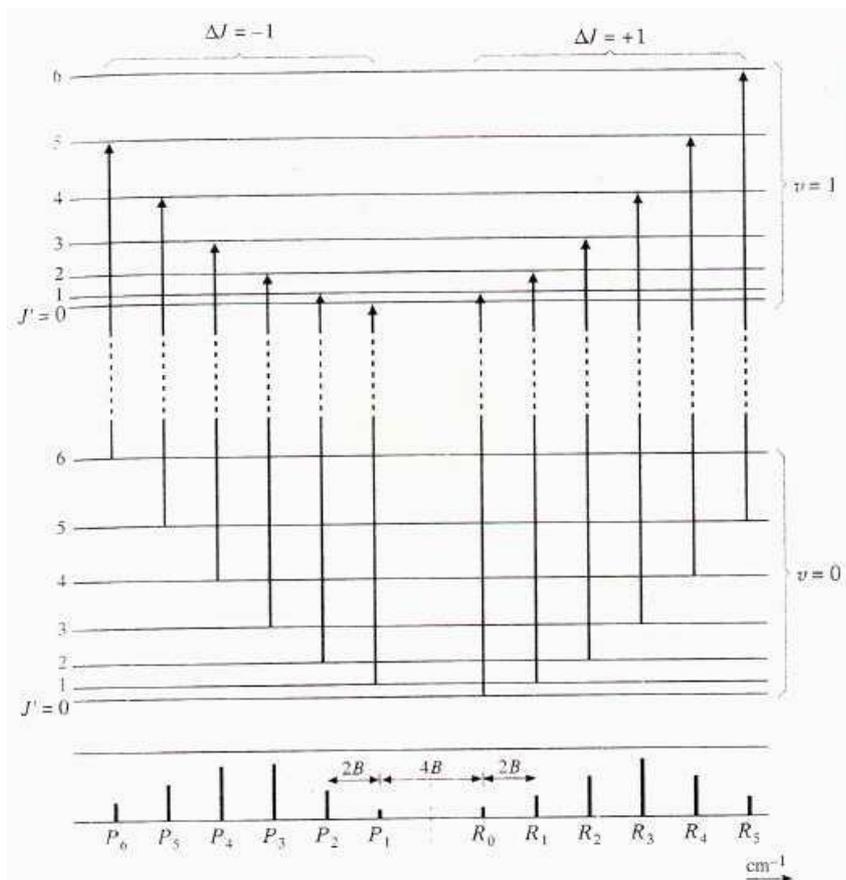
Infatti l'energia di una molecola biatomica considerata come oscillatore armonico e rotatore rigido è quantizzata secondo l'espressione

$$E = \left(v + \frac{1}{2} \right) h\tilde{\nu} + B J(J+1) \quad v = 0, 1, 2, \dots \quad ; \quad J = 0, 1, 2, \dots$$

dove B è la costante rotazionale, e J è il numero quantico rotazionale. Le regole di selezione per gli spettri roto-vibrazionali di molecole biatomiche sono:

$$\mu \neq 0 \quad \Delta v = \pm 1 \quad \Delta J = \pm 1$$

Il gruppo di righe con $\Delta J = +1$ si chiama ramo R mentre il gruppo di righe con $\Delta J = -1$ si chiama ramo P. L'intensità delle transizioni sono regolate dalle popolazioni dei livelli energetici, che dipendono dalla legge di distribuzione di Boltzmann.

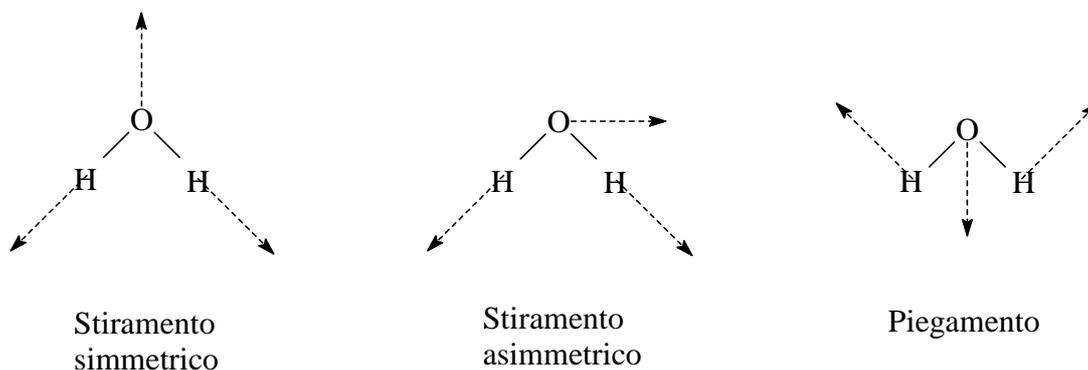


Spettro IR delle molecole poliatomiche

Una molecola biatomica ha un unico modo di vibrazione, nel quale i due atomi oscillano lungo una direzione o grado di libertà x mentre il centro di massa rimane stazionario. Una molecola composta di N atomi ha più modi normali di vibrazione. La posizione di un singolo atomo è descritta da tre coordinate e quindi la configurazione spaziale degli N atomi della molecola richiede un totale di $3N$ coordinate. Queste coordinate vengono chiamate anche *gradi di libertà* della molecola. Tre di tali coordinate possono specificare la posizione del centro di massa della molecola considerata come un sistema rigido, le restanti $3N - 3$ coordinate descrivono i moti interni della molecola, che lasciano inalterata la posizione del centro di massa: tali coordinate sono chiamate *gradi di libertà interni* di rotazione e di vibrazione. Infatti tre di queste coordinate sono i tre angoli necessari a descrivere la rotazione della molecola attorno alle tre direzioni dello spazio geometrico. Le restanti $3N - 6$ coordinate interne sono i gradi di libertà di vibrazione degli N atomi, che possono descrivere gli altrettanti modi collettivi sincroni e indipendenti di vibrazione, denominati *modi normali* di vibrazione.

Esempio

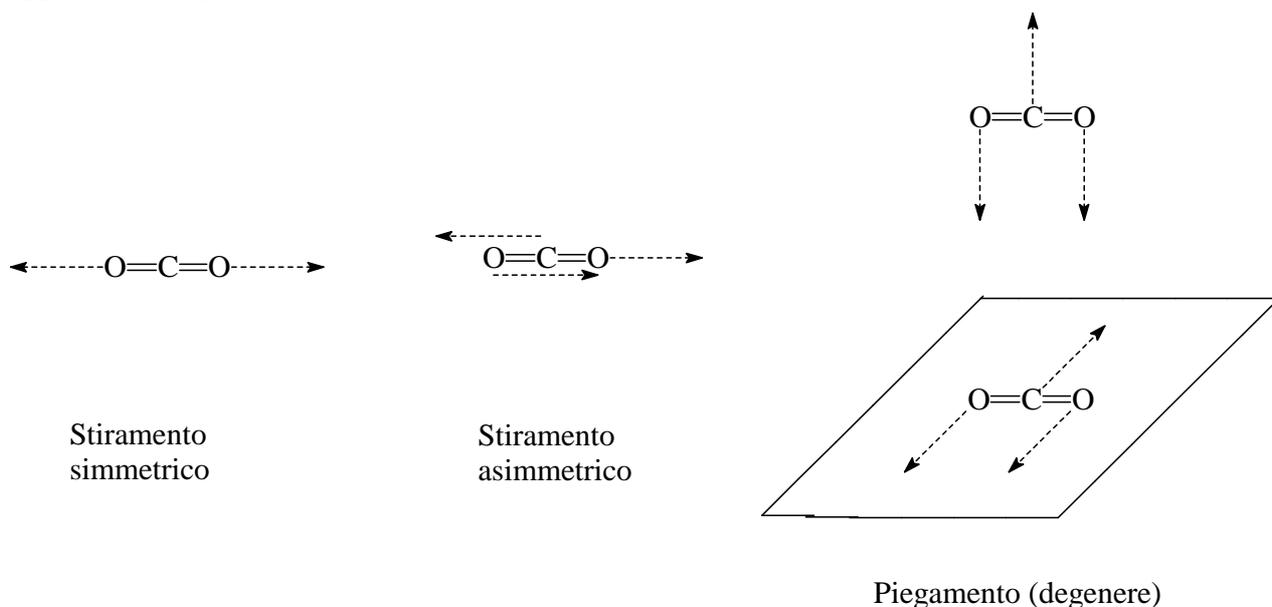
La molecola H_2O , triatomica e non lineare, può avere $3 \times 3 - 6 = 3$ modi normali di vibrazione. Questi sono schematizzati nella maniera seguente, indicando con una freccia tratteggiata lo spostamento di un atomo nel corso della vibrazione (si noti che la nomenclatura internazionale usata universalmente è stretching = stiramento, bending = piegamento o modo angolare).



Nel caso in cui la molecola sia lineare sono necessarie solo due coordinate di rotazione e quindi i possibili modi normali di vibrazione salgono a $3N - 5$.

Esempio

La molecola CO_2 , triatomica e lineare, può avere $3 \times 3 - 5 = 4$ modi normali di vibrazione. E' da notare che si hanno due modi possibili di piegamento; alternativamente questo modo è detto *doppiamente degenere*.



Ogni modo normale si può considerare come un oscillatore armonico indipendente. La massa ridotta è formata dalle masse degli atomi che si spostano nella vibrazione, ad esempio l'atomo di carbonio che rimane immobile nello stiramento simmetrico della CO_2 non contribuisce alla massa ridotta. La costante di forza dipende da come gli atomi si stirano e si piegano durante la vibrazione.

La regola generale di selezione perchè un modo normale sia attivo nell'infrarosso è che sia associato ad un momento di dipolo elettrico variabile. Per esempio lo stiramento simmetrico della CO_2 lascia inalterato il momento dipolare che resta nullo prima e dopo della oscillazione; dunque questo modo è IR inattivo. Invece i modi di stiramento asimmetrico e di piegamento sono associati a cambiamenti del momento dipolare e quindi sono IR attivi. Nello stiramento asimmetrico il momento dipolare varia lungo la direzione parallela all'asse molecolare e la transizione spettrale si chiama perciò banda parallela (simbolo \parallel), invece nel piegamento il dipolo varia perpendicolarmente all'asse e la transizione si chiama banda perpendicolare (simbolo \perp).

In una molecola organica di struttura più complessa delle molecole triatomiche alcuni modi normali si possono assimilare a movimenti di singoli gruppi funzionali, che hanno frequenze di vibrazione caratteristiche della struttura del gruppo e non della molecola, come per esempio lo stiramento del legame carbonilico C=O, che ha una frequenza caratteristica nell'intervallo 1640-1780 cm⁻¹. Le frequenze di gruppo sono la base dell'analisi qualitativa IR di molecole organiche. Invece i modi che non si possono considerare localizzati sono da attribuire a movimenti complessi di vibrazione della molecola nel suo insieme: le corrispondenti transizioni spettrali si presentano nella regione delle frequenze inferiori a 1500 cm⁻¹. Questi modi sono caratteristici della struttura della molecola e sono anche essi utili per la identificazione di particolari sostanze di cui sia noto lo spettro IR nella regione delle basse frequenze: per questo motivo la regione viene chiamata, con un nome poliziesco, regione delle *impronte digitali*.

Spettro Raman

In questa tecnica spettroscopica ideata da Raman si fa arrivare sul campione un raggio di luce monocromatica visibile e si registra la radiazione diffusa in direzione perpendicolare al raggio incidente. Il fotone del raggio luminoso può essere diffuso dalla molecola del campione urtandola in modo elastico oppure in modo anelastico; in quest'ultimo caso può cedere alla molecola, oppure assorbire, un quanto di energia vibrazionale $h\nu_{vib}$. Ne risulta che l'energia $h\nu$, e conseguentemente la frequenza, dei fotoni diffusi può essere inalterata, maggiore o minore di quella dei fotoni incidenti:

$$\begin{aligned}h\nu &= h\nu_0 \\h\nu &= h\nu_0 - h\nu_{vib} \\h\nu &= h\nu_0 + h\nu_{vib}\end{aligned}$$

La riga corrispondente alla frequenza inalterata si chiama riga di diffusione Rayleigh, quella a frequenza minore riga Stokes e quella a frequenza maggiore riga anti-Stokes.

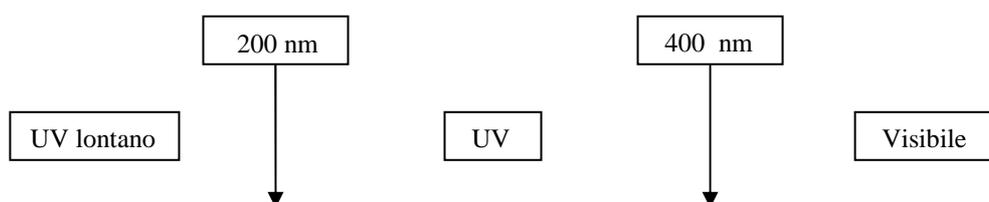
Si noti per inciso che l'effetto Raman è diverso dalla fluorescenza: nella fluorescenza la molecola assorbe il fotone e poi riemette un fotone di frequenza minore, e dunque la luce incidente deve coincidere con una frequenza di assorbimento della molecola. Invece nell'effetto Raman la luce incidente non viene assorbita e quindi può avere qualsiasi frequenza.

Le righe Stokes e anti-Stokes possono essere utilizzate per ricavare le energie di transizione vibrazionali in modo complementare alla spettroscopia di assorbimento IR. Il vantaggio rispetto a questa è che la radiazione utilizzata è nella gamma del visibile e quindi non è necessario usare materiali trasparenti all'IR per l'ottica dello spettrometro e per la cella portacampione. La sorgente di luce è un laser, che assicura una frequenza altamente monocromatica e di elevata intensità. Queste due caratteristiche sono essenziali per la risoluzione e la sensibilità delle misure.

SPETTROSCOPIA ELETTRONICA

Spettri elettronici

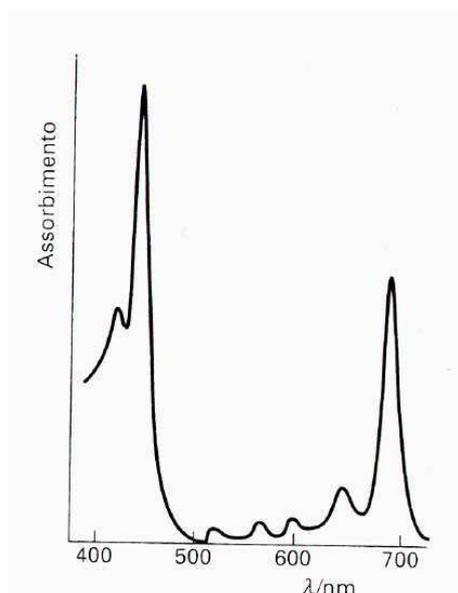
Le transizioni tra i differenti livelli energetici degli elettroni esterni negli atomi e nelle molecole hanno energie simili a quelle dei legami chimici, dell'ordine delle centinaia di kJ mol^{-1} . Queste energie corrispondono a frequenze e lunghezze d'onda nelle regioni spettrali della luce visibile e dell'ultravioletto vicino e lontano



Nella tabella che segue sono riportate le energie di alcune frequenze spettrali:

luce	λ (nm)	$\nu = c / \lambda$ (Hz)	$E = h \nu N_A$ (kJ mol^{-1})
rossa	700	4.28×10^{14}	171
gialla	580	5.17×10^{14}	206
verde	530	5.66×10^{14}	226
blu	470	6.38×10^{14}	254
UV	300	10×10^{14}	400

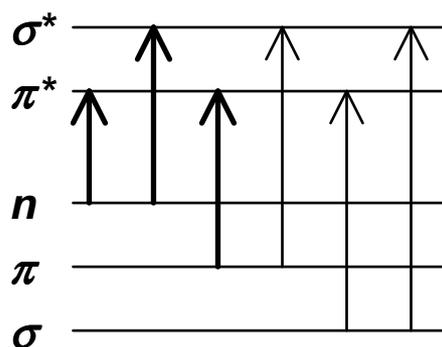
La colorazione delle sostanze naturali è dovuta a transizioni elettroniche. Per esempio, nel caso della clorofilla, si ha assorbimento di radiazione visibile blu e rossa, come si può notare dallo spettro riportato qui di seguito.



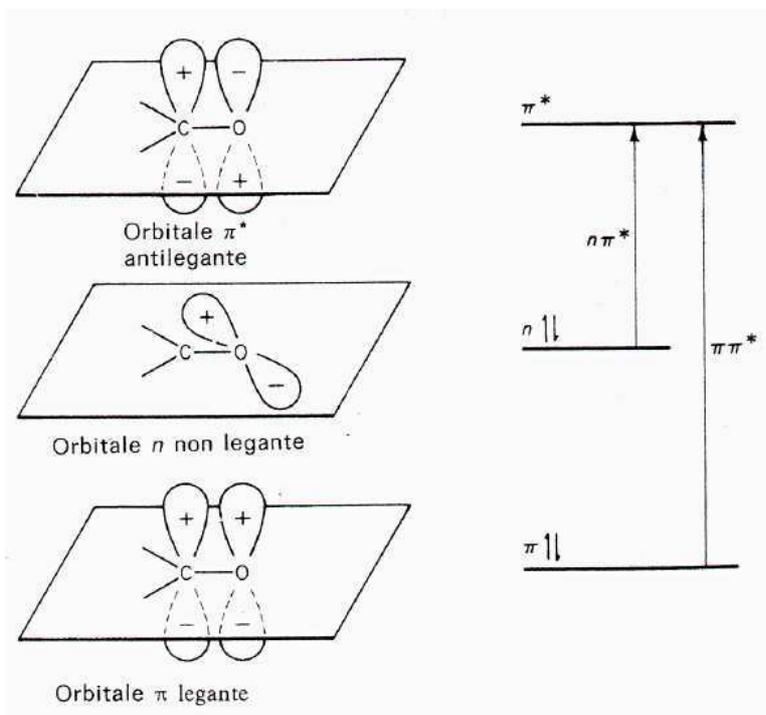
Quindi il colore verde che si osserva è dovuto alla radiazione non assorbita.

Diversamente dalle transizioni vibrazionali e rotazionali non è possibile descrivere i livelli elettronici con formule matematiche semplici. Quindi l'analisi completa di uno spettro elettronico di una molecola poliatomiche e la descrizione dei suoi stati eccitati sono problemi complicati. Tuttavia

è possibile fare una trattazione semplificata considerando le transizioni elettroniche di un piccolo gruppo di atomi. Per esempio lo spettro dei composti contenenti il gruppo carbonilico C=O presenta un caratteristico assorbimento intorno a 280 nm. I gruppi che hanno assorbimento caratteristico si chiamano *cromofori* (dal greco, portatori di colore). Quando due o più cromofori sono coniugati gli assorbimenti sono più intensi e avvengono a frequenze minori, ossia a lunghezze d'onda maggiori. Gli spettri dei cromofori si possono interpretare sulla base dei tipi di orbitali molecolari fra i quali avvengono le transizioni elettroniche. Gli orbitali molecolari allo stato fondamentale sono gli orbitali di legame di tipo σ oppure π . Inoltre si hanno orbitali occupati da doppietti elettronici su eteroatomi come ossigeno ed azoto, chiamati orbitali non leganti di tipo n . Infine si hanno orbitali antileganti ad energia maggiore di tipo σ^* oppure π^* :



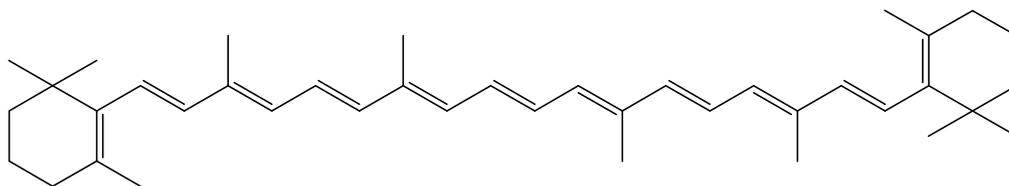
Le transizioni elettroniche comunemente osservate nella regione UV-visibile sono di tipo $n \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. Le altre transizioni, come per esempio quelle $\sigma \rightarrow \sigma^*$ tipiche di legami C-C o C-H, avvengono tra livelli energetici molto distanti e quindi nella regione dell'UV lontano. Le transizioni osservabili per un gruppo carbonilico C=O sono illustrate schematicamente nel seguente grafico.



Nel caso dell'acetone $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{O}$ la transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ assorbe a $\lambda = 188 \text{ nm}$ con $\varepsilon = 90$, mentre la transizione $n \rightarrow \pi^*$ assorbe a $\lambda = 279 \text{ nm}$ con $\varepsilon = 1.5$.

Per il gruppo cromoforo formato dal doppio legame $\text{C}=\text{C}$ olefinico si osserva un'intensa caratteristica transizione $\pi \rightarrow \pi^*$; ad esempio il pent-1-ene $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ assorbe a $\lambda = 190 \text{ nm}$ con $\varepsilon = 1000$.

Nel caso di cromofori coniugati l'energia di transizione diminuisce, cioè la lunghezza d'onda aumenta rispetto ai valori dei cromofori separati (è il cosiddetto spostamento batocromo), e anche il coefficiente ε aumenta. Così nel butadiene $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$, contenente due cromofori $\text{C}=\text{C}$ coniugati, la transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ si osserva spostata a $\lambda = 217 \text{ nm}$ con $\varepsilon = 2100$. Nel benzene e in altri aromatici l'effetto è ancora più marcato. Inoltre se sono presenti molti cromofori coniugati lo spostamento verso le alte λ può raggiungere la regione del visibile. Per esempio il β -carotene, il pigmento arancione delle carote,



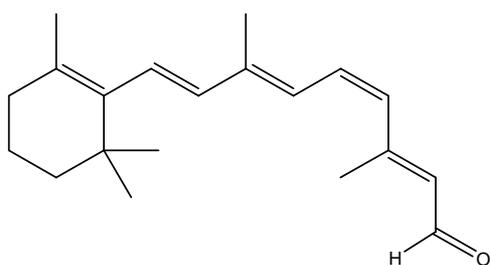
che contiene undici cromofori $\text{C}=\text{C}$, assorbe nel visibile a $\lambda = 450 \text{ nm}$ con $\varepsilon = 15000$.

Le bande di assorbimento tipiche di alcuni gruppi funzionali sono riassunte nella tabella seguente:

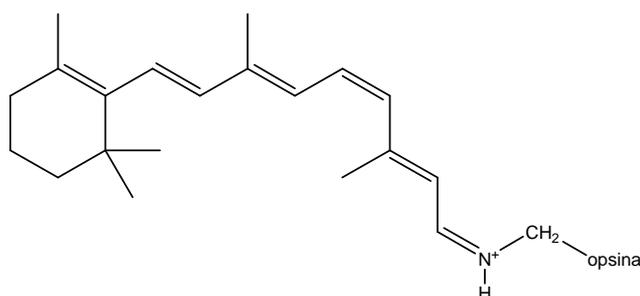
Cromoforo	C-H	C-C	C=C	C=C-C=C	C=C-C=O		C=O	CONH	COOH	NO ₂
λ_{mx} (nm)	125	135	190	210	220 320	190 260	190 280	190 225	200	270
Transizione	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	$\pi \rightarrow \pi^*$	$\pi \rightarrow \pi^*$	$\pi \rightarrow \pi^*$ $n \rightarrow \pi^*$	$\pi \rightarrow \pi^*$	$\pi \rightarrow \pi^*$ $n \rightarrow \pi^*$	$\pi \rightarrow \pi^*$ $n \rightarrow \pi^*$	$n \rightarrow \pi^*$	$\pi \rightarrow \pi^*$

Il meccanismo della visione

L'assorbimento di energia luminosa è alla base del processo della visione, che avviene nella retina dell'occhio, contenente la rodopsina. Questa sostanza consiste di una glicoproteina incolore, *opsina*, a cui è legato il cromoforo 11-*cis*-retinale: questo da solo assorbe nell'UV, ma invece legato all'amino gruppo di una catena laterale di lisina della proteina sotto forma di base di Schiff protonata assorbe a circa 500 nm nel visibile.

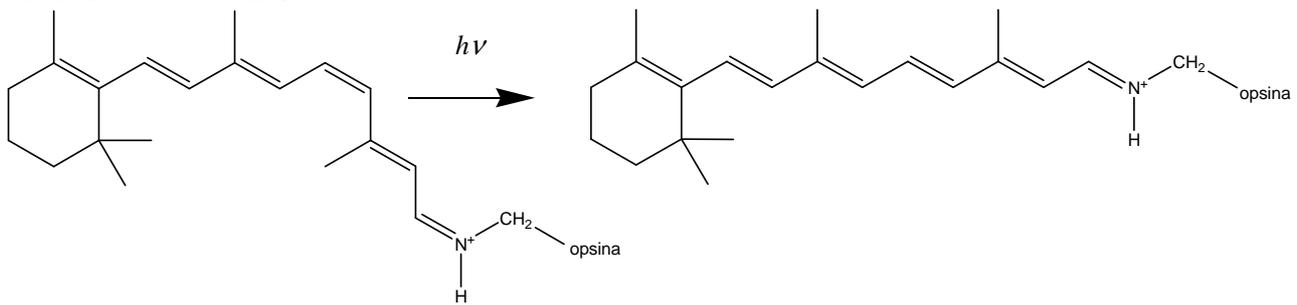


11-*cis*-retinale



base di Schiff protonata

Quando la retina è illuminata la rodopsina viene eccitata e tramite l'energia $h\nu$ assorbita isomerizza nella forma tutta *trans* :

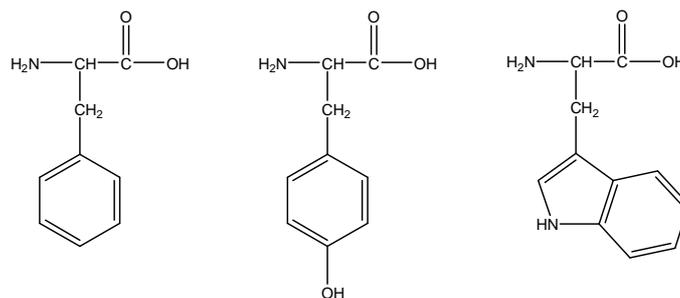


Il cambiamento di configurazione sterica della proteina genera un segnale nervoso che raggiunge il cervello e produce l'immagine visiva. Successivamente la forma *trans* viene riconvertita enzimaticamente nella 11-*cis*, pronta per un nuovo processo.

Spettroscopia elettronica di biomolecole

Spettri delle proteine

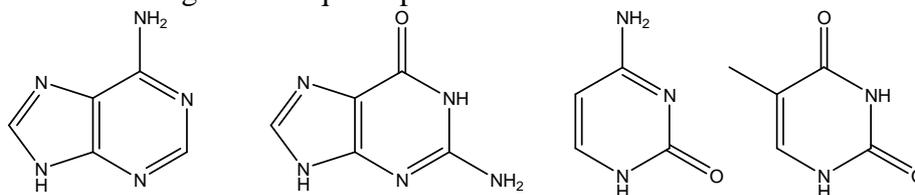
Il gruppo peptidico $-\text{CONH}-$ ha una banda a 220 nm dovuta alla transizione $n \rightarrow \pi^*$ e una a 190 nm dovuta alla transizione $\pi \rightarrow \pi^*$. Inoltre gli aminoacidi aromatici fenilalanina, tirosina e triptofano



presentano assorbimenti tra 240 e 280 nm attribuibili ai cromofori degli anelli aromatici.

Spettri degli acidi nucleici.

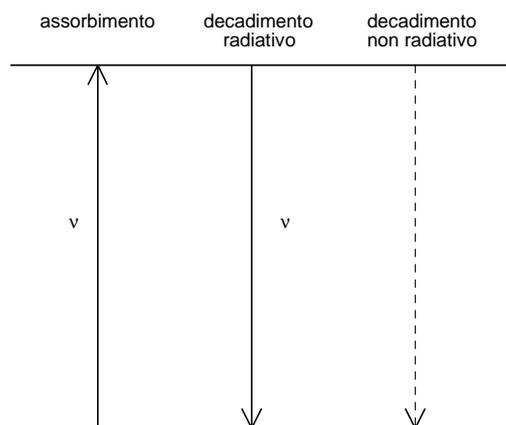
Le basi puriniche adenina e guanina e quelle pirimidiniche citosina e timina



hanno spettri simili con un picco a circa 260 nm. Gli acidi nucleici hanno un'assorbanza a 260 nm minore di quella della somma dei singoli nucleotidi: questo fenomeno, chiamato *ipocromismo*, è dovuto all'allineamento delle basi e si può usare per monitorare la transizione elica \rightarrow gomitolo della doppia elica del DNA.

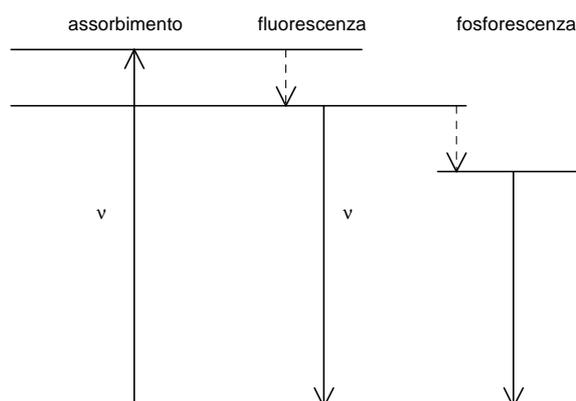
Fluorescenza e fosforescenza

Gli stati elettronici eccitati possono evolvere con diversi meccanismi. Dopo aver assorbito un fotone $h\nu$ la molecola decade allo stato iniziale, e il decadimento può avvenire in due modi.



Il processo di decadimento *radiativo* consiste nell'emissione di un fotone e ritorno della molecola eccitata allo stato energetico fondamentale. Invece nel decadimento *non radiativo* l'energia si trasferisce sulle vibrazioni rotazioni e traslazioni delle molecole circostanti, cioè sotto forma di calore.

Nel caso in cui la molecola sia eccitata ad un sottolivello vibrazionale superiore, può rilassarsi velocemente tramite decadimento non radiativo al livello vibrazionale più basso (*conversione interna*) e da questo può decadere radiativamente allo stato fondamentale emettendo un fotone ad energia $h\nu'$ minore di quella $h\nu$ assorbita inizialmente. Questo fenomeno di emissione di luce si chiama fluorescenza.



La situazione descritta finora era relativa a stati elettronici con spin appaiati, o antiparalleli $\uparrow\downarrow$ detti stati di singoletto S. Molte molecole hanno stati elettronici eccitati con due spin elettronici spaiati o paralleli $\uparrow\uparrow$, detti stati di tripletto T. L'energia di questi stati è superiore a quella dello stato di singoletto fondamentale S_0 e inferiore a quella dello stato di singoletto eccitato. La molecola può decadere non radiativamente con una lenta *conversione tra sistemi* $S \rightarrow T$ e successivamente il tripletto si rilassa radiativamente allo stato fondamentale S_0 emettendo un fotone ad energia minore di quella assorbita inizialmente. Questo decadimento, che segue un meccanismo distinto dalla fluorescenza, si chiama fosforescenza. La fluorescenza avviene con un tempo dell'ordine di nanosecondi, invece la fosforescenza, a causa della lentezza delle transizioni $S \rightarrow T$ e $T \rightarrow S$, ha tempi che vanno dall'ordine dei millisecondi fino ai minuti.

SPETTROMETRIA DI MASSA

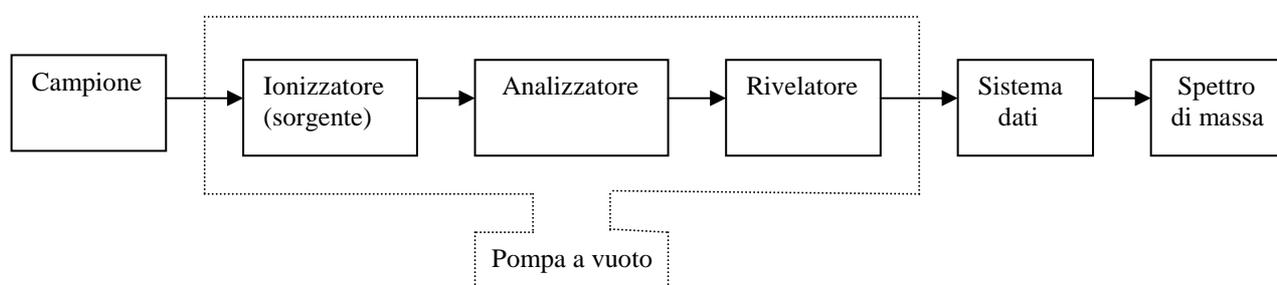
Introduzione

L'esperimento di spettrometria di massa consiste 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 la concentrazione relativa degli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica.

L'unità di massa usata dai chimici e biochimici è il Dalton, abbreviato in Da, pari a 1/12 della massa del carbonio-12. Invece l'unità di carica usata è pari alla carica dell'elettrone. In gran parte dei casi gli ioni hanno una sola carica e quindi il rapporto m/z è numericamente uguale alla massa espressa in Da.

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:

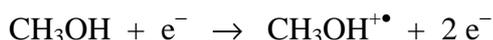


Il campione può essere un gas, oppure un liquido o un solido che vengono vaporizzati o sublimati. In certi casi il campione è inserito in una matrice o adsorbito su un supporto.

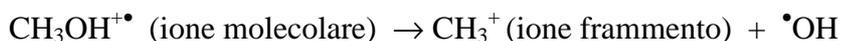
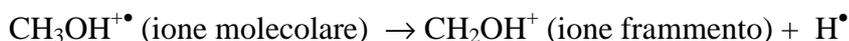
Metodi di ionizzazione

Per la ionizzazione delle molecole si hanno a disposizione le seguenti diverse tecniche.

Ionizzazione elettronica (EI). Il metodo di ionizzazione comunemente usato è quello della ionizzazione elettronica, detto anche ad impatto elettronico. Un fascio di molecole in fase gassosa (ottenuto riscaldando il campione) si introduce nella camera di ionizzazione ad una pressione di circa 10^{-6} torr e si bombarda con un fascio di elettroni ad alta energia, di solito 70 eV, molto maggiore delle energie dei legami chimici (che sono dell'ordine di grandezza di 5-10 eV). L'impatto elettronico sulla molecola determina anzitutto la rimozione di un elettrone dalla molecola M con formazione del cosiddetto ione molecolare $M^{+\bullet}$. Per esempio il metanolo si ionizza così

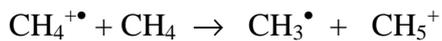


Il simbolo $^{+\bullet}$ indica che si è formato un radical-catione, contenente un elettrone avente lo spin non appaiato. Inoltre l'energia impartita dall'impatto e l'instabilità dello ione molecolare porta alla sua ulteriore scissione in frammenti più piccoli. Nel caso del metanolo

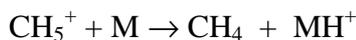


Lo svantaggio di questo metodo altamente energetico è che alcune sostanze si frammentano con estrema facilità, tanto che il picco dovuto allo ione molecolare $M^{+\bullet}$ è difficile da osservare e quindi non si riesce a determinare la massa molecolare. Per questo motivo si ricorre a tecniche alternative meno drastiche, come le seguenti.

Ionizzazione chimica (CI). Il campione gassoso M si introduce nello spettrometro insieme con un eccesso di gas reagente, di solito metano. Quest'ultimo si ionizza per impatto elettronico producendo $CH_4^{+\bullet}$, il quale reagisce con metano dando lo ione secondario CH_5^+ :



Lo ione secondario reagisce con il campione per dare MH^+ , il cosiddetto ione quasi-molecolare



Sia la tecnica EI che la CI si usano per molecole relativamente piccole fino a circa 1000 Da. Per masse molecolari più grandi come quelle di polimeri e macromolecole biologiche si hanno a disposizione le seguenti altre tecniche.

Ionizzazione per desorbimento. La molecola viene desorbita da una superficie e simultaneamente ionizzata.

Il *desorbimento per impatto* si può realizzare bombardando il campione in quattro modi:

i. *Bombardamento con atomi veloci (FAB)*. Impatto di atomi ad alta velocità sul campione disciolto in una matrice liquida. Si usa per masse molecolari fino a 6000 Da, in particolare per sostanze sensibili e non volatili come peptidi, carboidrati e composti organometallici.

ii. *Spettroscopia di massa ioni secondari (SIMS)*. Impatto di ioni ad alta velocità su una pellicola sottile di campione su substrato metallico (o sciolto in matrice liquida).

iii. *Deassorbimento con plasma*. Impatto di frammenti di fissione nucleare sul campione solido depositato su un foglio metallico.

iv. *Deassorbimento e ionizzazione laser su matrice (MALDI)*. Impatto di fotoni ad alta energia tramite laser sul campione inserito in una matrice solida organica. Il metodo viene molto usato per polimeri sintetici e macromolecole biologiche come nucleotidi, peptidi e proteine con masse elevate, fino all'ordine di grandezza di 500'000 Da.

Field desorption (FD). Il campione viene spalmato come pellicola sottile su un filamento posto in un gradiente di campo elettrico di elevata intensità. Gli ioni generati dalla rimozione di un elettrone dalla molecola indotta dal campo elettrico passano nell'analizzatore.

Ionizzazione elettro-spray (ESI) Formazione di gocce di liquido cariche, da cui gli ioni vengono desolvatati o deassorbiti. E' una tecnica di ionizzazione blanda che si usa per molecole non volatili come peptidi, proteine e polinucleotidi, con massa fino a 200'000 Da.

Metodi di separazione degli ioni

Se due picchi vicini m_a e m_b di intensità simile sono separati in modo tale che l'altezza h della valle

tra di loro sia minore del 10% della loro altezza H la *risoluzione* è definita come il rapporto

$$R = \frac{m_a}{m_a - m_b}.$$

Per esempio uno spettrometro che separa due ioni di massa 1999 e 2000 ha una risoluzione

$$R = \frac{2000}{2000 - 1999} = 2000$$

Gli analizzatori di solito si considerano a *bassa risoluzione* se R è inferiore a 5000 e ad *alta risoluzione* se R è superiore a 5000.

Le tecniche di separazione degli ioni si possono riassumere in quattro tipi:

Analizzatore magnetico

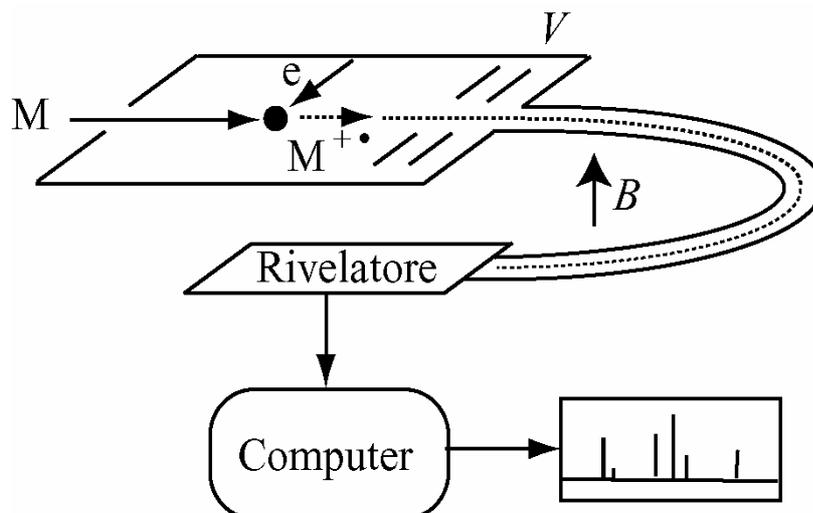
Filtro quadrupolare

Spettrometro a tempo di volo

Spettrometro a trasformata di Fourier

Analizzatore magnetico.

Gli ioni molecolari e i loro frammenti ionici vengono sottoposti prima ad un campo elettrico e poi ad un campo magnetico.



L'effetto del campo elettrico è quello di accelerare gli ioni. L'energia fornita dal campo, data dal prodotto della carica z degli ioni per il potenziale elettrico V , si trasforma in energia cinetica

$$zV = \frac{1}{2} mv^2$$

Gli ioni accelerati passano nell'analizzatore, costituito da un tubo curvo posto in un magnete, e alla fine del tubo si trova il rivelatore. Il campo magnetico B esercita sugli ioni una forza centripeta Bvz che li costringe ad una traiettoria circolare di raggio r . La forza centripeta è uguale alla forza centrifuga:

$$Bvz = \frac{mv^2}{r}$$

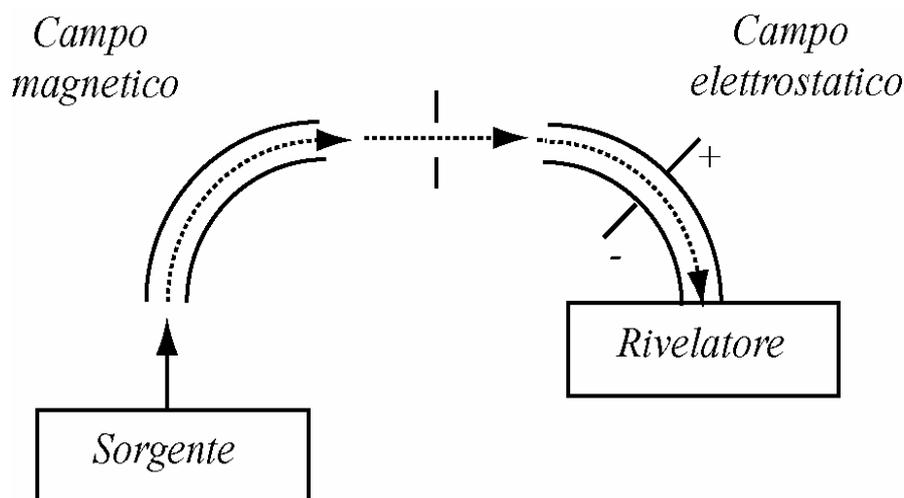
Dalle due equazioni si ha

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

Questa relazione fra il rapporto massa/carica e il campo magnetico indica che ioni con carica uguale e massa differente percorrono la traiettoria verso il rivelatore a valori differenti di campo magnetico. Aumentando progressivamente il campo si portano al rivelatore ioni sempre più pesanti: in pratica la scansione di campo magnetico permette di ottenere lo spettro di massa dei diversi ioni. Il tempo di scansione del campo è dell'ordine dei secondi, e quindi questo strumento non si presta all'accoppiamento come rivelatore per cromatografia. Inoltre questo tipo di analizzatore non ha risoluzione superiore a 5000.

Spettrometro a doppia focalizzazione, magnetica ed elettrostatica.

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

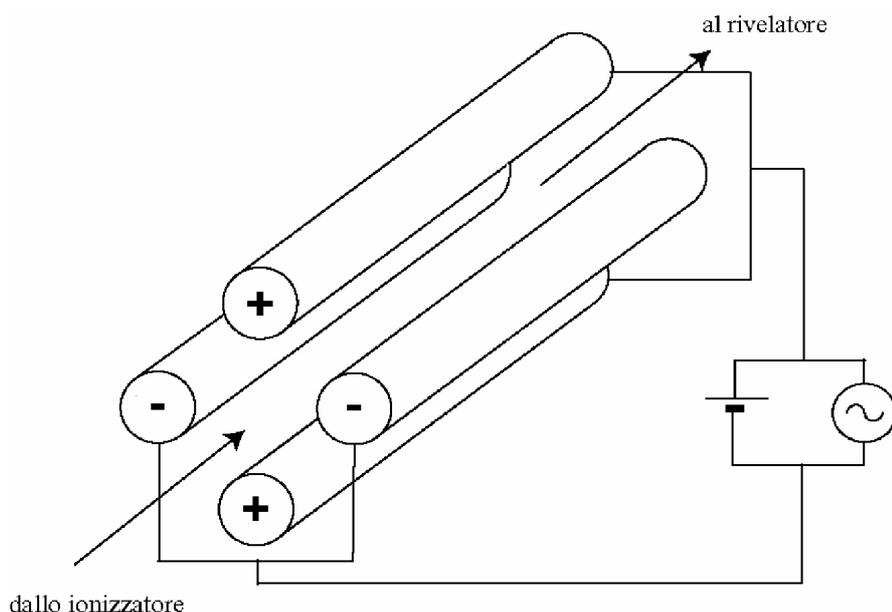


Così la risoluzione può raggiungere 100'000 e oltre. Ciò permette di misurare la massa esatta fino alla quarta cifra decimale. Gli spettrometri ad alta risoluzione di questo genere sono apparecchiature complicate e costose, e quindi il loro impiego non è molto diffuso per misure di routine. Per misure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

La velocità della misura è un parametro particolarmente importante nel caso in cui lo spettrometro di massa venga collegato in serie ad un cromatografo per la rivelazione di diversi picchi cromatografici. La tecnica di accoppiamento al gas cromatografo (GC-MS) o al cromatografo in fase liquida ad alta pressione (LC-MS) è di estrema utilità per l'analisi di miscele di sostanze.

Filtro di massa a quadrupolo .

Questo analizzatore usa quattro barre, due caricate elettricamente a potenziale positivo e due a potenziale negativo (il quadrupolo) come schematizzato qui di seguito:

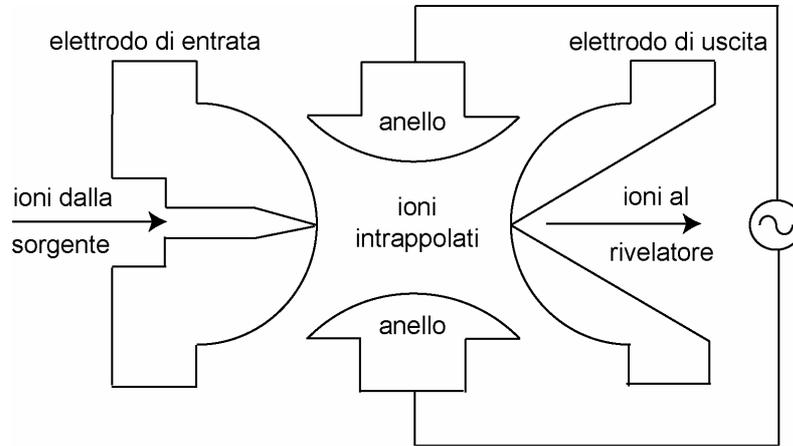


Il potenziale è la somma di una componente continua V_{cc} e una V_{ac} alternata, oscillante a radiofrequenza dell'ordine dei 100 MHz. Gli ioni provenienti dallo ionizzatore attraversano il quadrupolo parallelamente alle barre con una traiettoria oscillante e per un dato valore dei potenziali solo gli ioni con un singolo valore del rapporto m/z , raggiungono il rivelatore (ioni in risonanza), tutti gli altri ioni, aventi valori maggiori o minori di m/z , vanno a collidere sulle barre (ioni fuori risonanza). La scansione di uno spettro si ottiene facendo variare simultaneamente V_{cc} e V_{ac} , mantenendo costante il loro rapporto.

Il tempo di scansione dell'intervallo di massa da 10 a 800 Da è di circa un secondo, molto più breve rispetto agli spettrometri a campo magnetico. Questo tipo di strumento non ha la risoluzione degli analizzatori a doppia focalizzazione, ma permette di misurare facilmente spettri di molecole organiche con risoluzione unitaria, cioè distinguendo due ioni con masse che differiscono di un Da. Ha inoltre il vantaggio di essere uno strumento compatto da banco e il suo uso è per questi motivi molto diffuso nei laboratori di chimica organica. Per l'accoppiamento con i sistemi GC e HPLC viene usato anche nella configurazione che viene descritta qui di seguito, la quale ha il beneficio della elevata sensibilità, indispensabile per un rivelatore cromatografico.

Trappola ionica (ITMS)

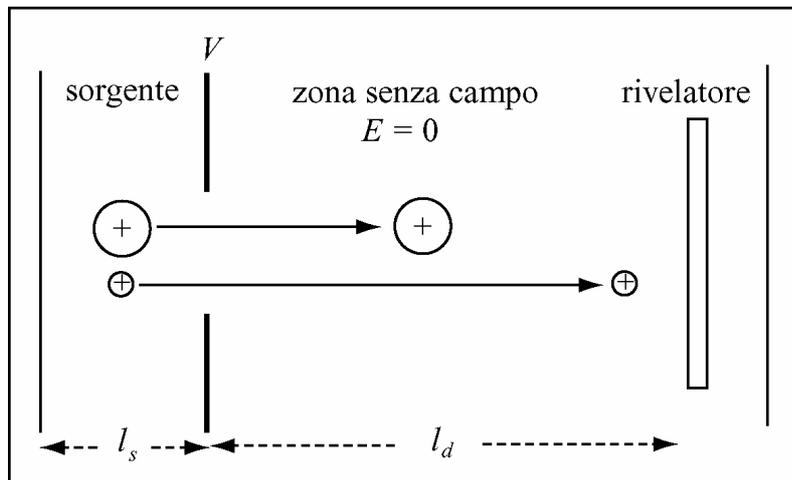
Questa variante dell'analizzatore a quadrupolo usa tre elettrodi (un elettrodo anulare posto fra due elettrodi semisferici di entrata e uscita) per intrappolare ed accumulare gli ioni in una cavità di volume ristretto, la cosiddetta trappola ionica (ion trap), allo scopo di ottenere una elevata sensibilità.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



Lo spettro si ottiene facendo variare il potenziale in modo da far uscire gli ioni dalla cavità e dirigerli al rivelatore in ordine di m/z crescente.

Spettrometro a tempo di volo (TOF)

Questo analizzatore è il sistema più semplice di tutti. Gli ioni generati nella sorgente vengono accelerati da un potenziale elettrico V e fatti volare verso il rivelatore attraverso la zona dello spettrometro priva di campo elettrico, tutti con una stessa energia cinetica.



Le velocità degli ioni e quindi i loro tempi di volo sono diversi, data la diversità delle masse: ioni più leggeri hanno tempi più brevi, ioni più pesanti hanno tempi più lunghi.

Il rapporto massa carica è legato al tempo di volo t dalla relazione che segue

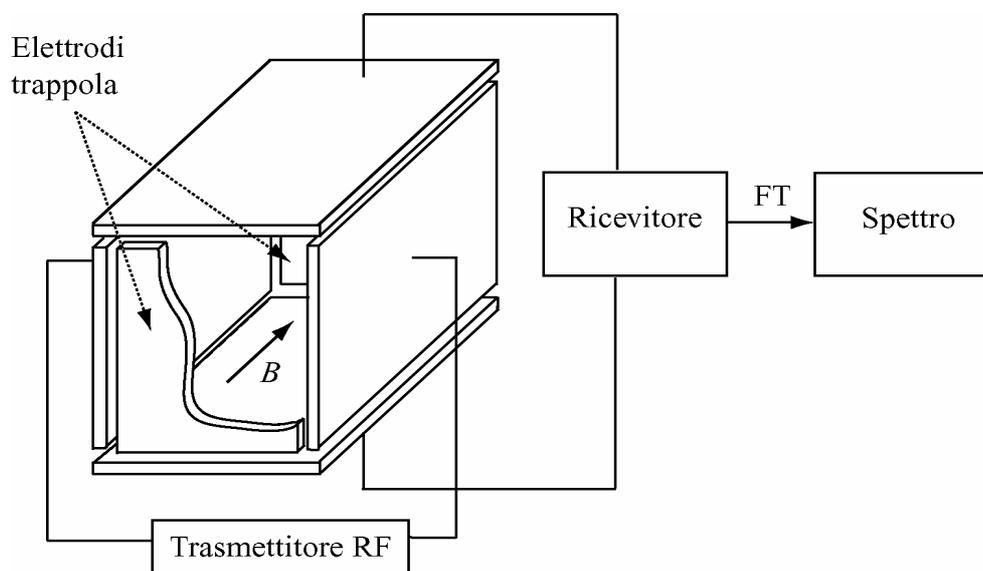
$$\frac{m}{z} = 2 e E l_s \left(\frac{t}{l_d} \right)^2$$

in cui E è il campo elettrico ed e la carica elettronica.

Il metodo ha una risoluzione modesta, ma non ha limitazioni alla massa da determinare, inoltre ha una elevata sensibilità e quindi si presta molto bene allo studio di polimeri sintetici e di macromolecole biologiche. Viene accoppiato con tecniche di ionizzazione sofisticate come MALDI.

Spettrometro a trasformata di Fourier (FTMS)

La cella dello spettrometro è costituita da tre coppie di elettrodi disposti sulle facce opposte di un cubo. Due elettrodi servono a intrappolare gli ioni in una regione di intenso campo magnetico B generato da un criomagnete.



L'effetto del campo è quello di far ruotare gli ioni perpendicolarmente alla sua direzione, con frequenza di rotazione (denominata comunemente frequenza ciclotronica) inversamente proporzionale al rapporto massa/carica:

$$\omega = \frac{z}{m} B \quad \text{in radianti s}^{-1} \quad \text{da cui si ricava} \quad \frac{m}{z} = \frac{B}{\omega}$$

Dunque la determinazione delle frequenze osservate a campo magnetico costante dà informazione sulla massa degli ioni. La misura della frequenze ciclotroniche dei diversi ioni si esegue in modo analogo alla tecnica usata in risonanza magnetica nucleare, inviando un impulso di radiofrequenza dai due elettrodi del trasmettitore RF e misurando la risposta con i due elettrodi del ricevitore. L'analisi di Fourier dell'interferogramma produce lo spettro delle frequenze, e in definitiva lo spettro di massa. Il metodo viene certe volte descritto anche come Risonanza Ciclotronica Ionica a Trasformata di Fourier, FT-ICR.

Dato che le misure di frequenza sono molto accurate, questa tecnica ha una risoluzione che può raggiungere 10^6 , quindi si presta bene alla determinazione della massa esatta. Inoltre si può usare per masse molto grandi ed ha la sensibilità più elevata degli altri metodi. Lo svantaggio di questo spettrometro è il costo elevato, dovuto alla complessa strumentazione richiesta.

Rivelatore

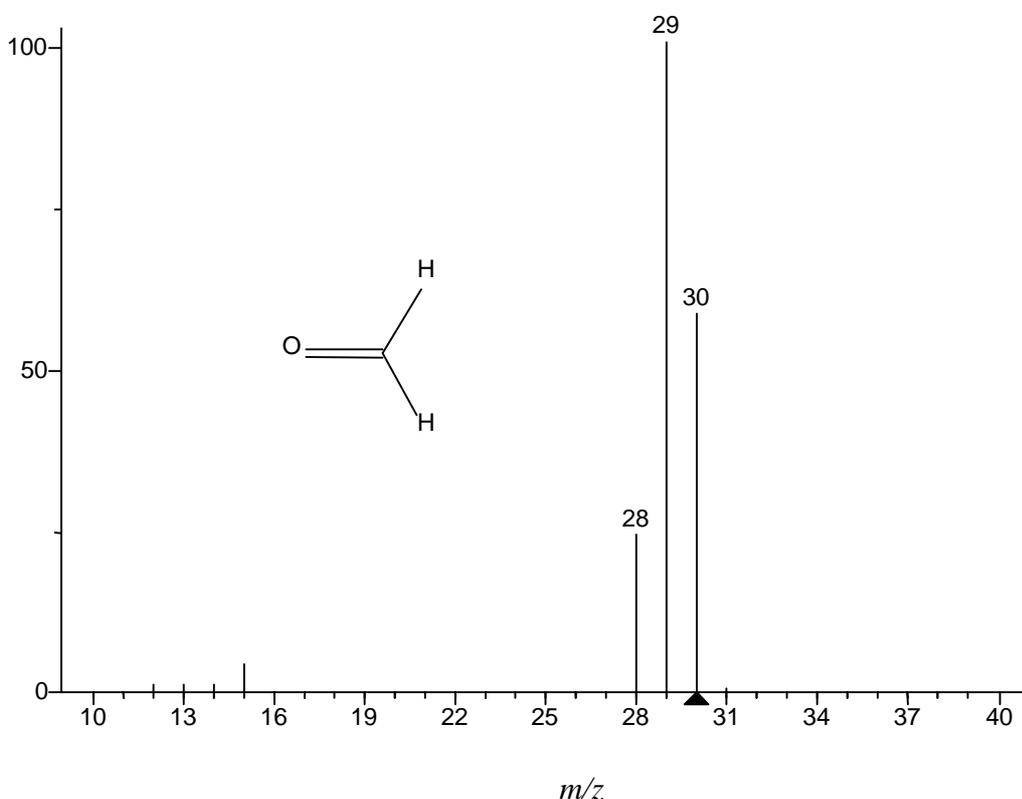
Come collettore e rivelatore degli ioni si usa comunemente un moltiplicatore elettronico, costituito da una serie di elettrodi in cascata. Quando uno ione arriva sul primo elettrodo questo emette un fascio di elettroni che vanno a colpire il secondo elettrodo, il quale a sua volta emette una quantità 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.

Interpretazione dello spettro di massa

Lo spettro di massa si presenta in genere come un grafico a barre (istogramma) della abbondanza relativa degli ioni in funzione del loro rapporto m/z .

Esempio, spettro della formaldeide:



Le intensità dei segnali sono relative a quella del segnale più intenso normalizzato a 100, che in questo esempio si trova a $m/z = 29$; questo segnale si chiama *picco base*. Il segnale all'estrema destra dello spettro a $m/z = 30$ è il *picco dello ione molecolare*, i restanti segnali a sinistra derivano dagli ioni generati nella successiva frammentazione dello ione molecolare e quindi hanno $m/z < 30$.

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 . Però il picco può essere poco intenso o addirittura assente nel caso di molecole facilmente frammentabili. 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:

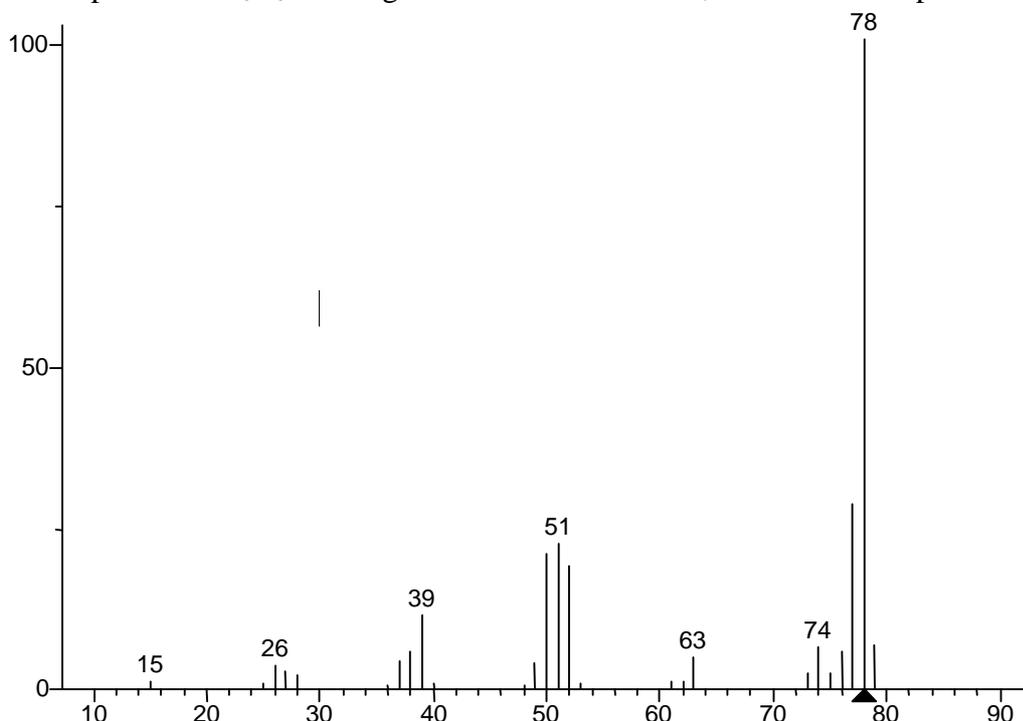
- Picco molto intenso aromatici > olefine coniugate > aliciclici > alcani a catena lineare corta.
- Picco poco intenso chetoni > ammine > esteri > eteri > acidi, aldeidi, ammidi, alogenuri.
- Picco assente molecole ramificate, alcoli terziari, nitrili, nitrocomposti.

Nel dubbio 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 $M + 1$.

In certi casi l'identificazione del picco dello ione molecolare può essere verificata con la cosiddetta regola dell'azoto, secondo cui una molecola contenente un numero dispari di atomi di azoto ha massa molecolare dispari, mentre una molecola senza azoto o con un numero pari di atomi di azoto ha massa molecolare pari.

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. Per esempio il benzene mostra il picco principale a $m/z = 79$, dovuto all'isotopomero $^{12}\text{C}_6\text{H}_6$ e un segnale satellite a $m/z = 80$, dovuto all'isotopomero $^{12}\text{C}_5\text{ }^{13}\text{C}\text{H}_6$:



Per molecole contenenti C, H, N, O, F, P, Si e I l'intensità percentuale del picco $M + 1$ riferita a quella del picco M è data da

$$\frac{M+1}{M} 100 = 1.1 n_{\text{C}} + 0.38 n_{\text{N}} + 5.1 n_{\text{Si}}$$

e quella del picco $M + 2$

$$\frac{M+2}{M}100 = (1.1 n_C)^2 + 0.2 n_O + 3.35 n_{Si}$$

Abbondanza isotopica relativa di elementi più comuni

Isotopo 1	Abbondanza	Isotopo 2	Abbondanza	Isotopo 3	Abbondanza
^1H	100	^2H	0.016		
^{12}C	100	^{13}C	1.11		
^{14}N	100	^{15}N	0.38		
^{16}O	100	^{17}O	0.04	^{18}O	0.2
^{19}F	100				
^{28}Si	100	^{29}Si	5.10	^{30}Si	3.35
^{31}P	100				
^{32}S	100	^{33}S	0.78	^{34}S	4.40
^{35}Cl	100			^{37}Cl	32.5
^{79}Br	100			^{81}Br	98.0
^{127}I	100				

Spettri di massa esatta

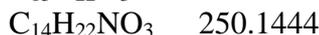
Gli spettrometri ad alta risoluzione permettono di determinare la massa con una accuratezza fino alla quarta cifra decimale, ciò che si chiama comunemente la massa esatta. Dato che le masse dei nuclidi non sono intere, la massa molecolare esatta è un parametro che caratterizza univocamente la formula 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	} $\Delta = 0.0113$
Ossido nitroso	N_2O	44.0011	
Acetaldeide	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$	44.0262	} $\Delta = 0.0251$
Propano	C_3H_8	44.0626	
			} $\Delta = 0.0364$

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 raggiungibile da spettrometri ad alta risoluzione che arrivano fino a 100000.

La conoscenza 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

$$GI = C - \frac{H}{2} - \frac{N}{2} + 1$$

dove

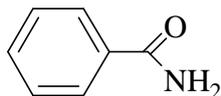
C = numero di atomi di carbonio

H = numero di atomi di idrogeno
 N = numero di atomi di azoto

Ad esempio per la benzamide C_7H_7NO si calcola

$$GI = 7 - 3.5 + 0.5 + 1 = 5.$$

Infatti sono presenti il doppio legame $C = O$ e l'anello benzenico che conta per quattro insaturazioni, tre per i doppi legami $C = C$ e una per il ciclo:



La formula più generale è la seguente:

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

in cui

Atomi Tetraivalenti = C, Si, etc.

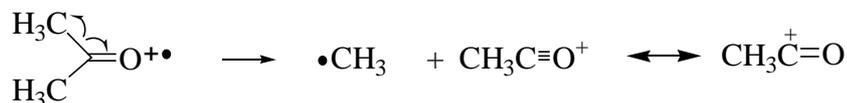
Atomi Trivalenti = N, P, etc.

Atomi Monovalenti = H, alogeni, etc.

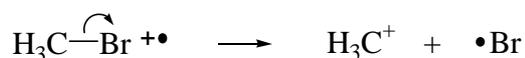
Frammentazione

Lo ione molecolare può subire la scissione di un legame covalente generando due frammenti. La scissione può essere omolitica, cioè con separazione dei due elettroni del legame, oppure eterolitica senza separazione.

Esempio di scissione omolitica:



Esempio di scissione eterolitica:

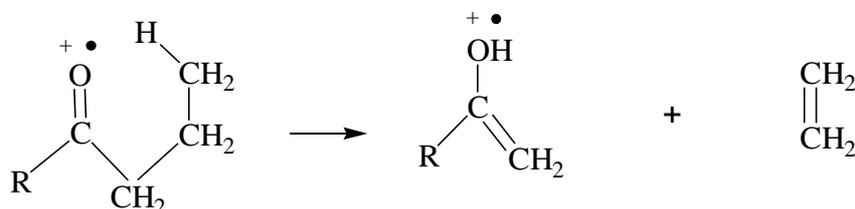


Gli ioni frammento possono subire a loro volta frammentazioni ulteriori.

Frammentazione con trasposizione

Quando la frammentazione avviene con scissione di più di un legame può essere accompagnata da trasposizione di un atomo o di un gruppo.

Il caso più frequente è la frammentazione e trasposizione di McLafferty che avviene in molecole contenenti il gruppo $C = O$, come chetoni, aldeidi, acidi, esteri, amidi:



Il risultato è la perdita di olefina, in questo caso etilene, e la formazione del catione radicale dell'enolo.

Elenco dei *frammenti ionici* più comuni

14 CH ₂	48 CH ₃ S + H
15 CH ₃	49 CH ₂ Cl
16 O	51 CHF ₂ , C ₃ H ₃
17 OH	53 C ₄ H ₅
18 H ₂ O, NH ₄	54 CH ₂ CH ₂ CN
19 F	55 C ₄ H ₇
26 CN, C ₂ H ₂	56 C ₄ H ₈
27 C ₂ H ₃	57 C ₄ H ₉ , C ₂ H ₅ C=O
28 C ₂ H ₄ , CO	58 CH ₃ C(=O)CH ₂ + H, C ₂ H ₅ CHNH ₂
29 C ₂ H ₅ , CHO	59 C ₃ H ₆ OH, CH ₂ OC ₂ H ₅
30 CH ₂ NH ₂	60 CH ₂ COOH
31 CH ₂ OH	61 CH ₃ COO
32 O ₂	65 C ₅ H ₅
33 SH	66 C ₅ H ₆
34 H ₂ S	67 C ₅ H ₇
35 Cl	68 CH ₂ CH ₂ CH ₂ CN
36 HCl	69 C ₅ H ₉ , CF ₃
39 C ₃ H ₃	70 C ₅ H ₁₀
41 C ₃ H ₅	71 C ₅ H ₁₁ , C ₃ H ₇ C=O
42 C ₃ H ₆ , C ₂ H ₂ O	76 C ₆ H ₄
43 C ₃ H ₇ , CH ₃ C=O	77 C ₆ H ₅
44 CH ₂ CHO	78 C ₆ H ₅ + H
45 CH ₃ CHOH, CH ₂ CH ₂ OH, CH ₂ OCH ₂	79 C ₆ H ₅ + 2H, Br
46 NO ₂	91 C ₇ H ₇
47 CH ₂ SH	

Elenco dei *frammenti neutri* più comuni

- | | |
|--|---|
| 17 HO• | 44 CH ₂ =CHOH, CO ₂ , N ₂ O, CONH ₂ |
| 18 H ₂ O | 45 CH ₃ CHOH, CH ₃ CH ₂ O•, CO ₂ H, |
| 19 F• | CH ₃ CH ₂ NH ₂ |
| 20 HF | 46 (H ₂ O + CH ₂ =CH ₂), CH ₃ CH ₂ OH |
| 26 CHCH, •CN | 47 CH ₃ S• |
| 27 CH ₂ =CH•, HCN | 48 CH ₃ SH |
| 28 CH ₂ =CH ₂ , CO | 49 •CH ₂ Cl |
| 29 •CH ₂ CH ₃ , •CHO | 52 C ₄ H ₄ |
| 30 NH ₂ CH ₂ •, CH ₂ O, NO, C ₂ H ₆ | 53 C ₄ H ₅ |
| 31 •OCH ₃ , •CH ₂ OH, CH ₂ NH ₂ | 54 CH ₂ =CH-CH-CH ₂ |
| 32 CH ₃ OH, S | 55 CH ₂ =CHCHCH ₃ |
| 33 HS•, (•CH ₃ + H ₂ O) | 56 CH ₂ =CHCH ₂ CH ₃ |
| 34 H ₂ S | 57 C ₄ H ₉ •, C ₂ H ₅ CO |
| 35 Cl• | 60 C ₃ H ₇ OH |
| 36 HCl, 2 H ₂ O | 63 •CH ₂ CH ₂ Cl |
| 37 H ₂ Cl | 71 C ₅ H ₁₁ • |
| 38 C ₃ H ₂ , C ₂ N, F ₂ | 73 CH ₃ CH ₂ OC(=O)• |
| 39 C ₃ H ₃ , HC ₂ N | 74 C ₄ H ₉ OH |
| 40 CH ₃ CCH | 75 C ₆ H ₃ |
| 41 CH ₂ =CHCH ₂ • | 76 C ₆ H ₄ |
| 42 CH ₂ =CHCH ₃ , CH ₂ =C=O | 77 C ₆ H ₅ |
| 43 C ₃ H ₇ , CH ₃ C•=O | 78 C ₆ H ₆ |

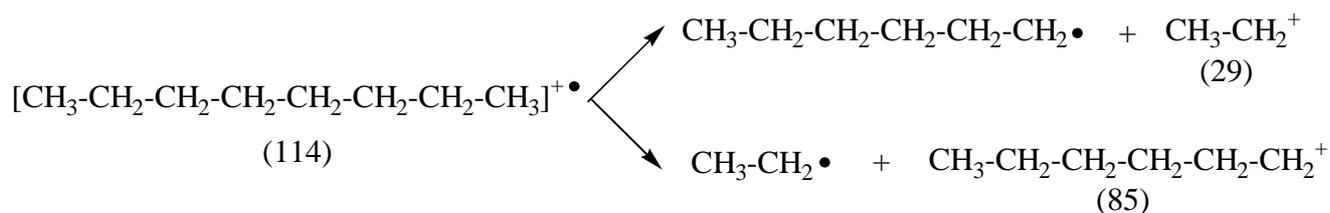
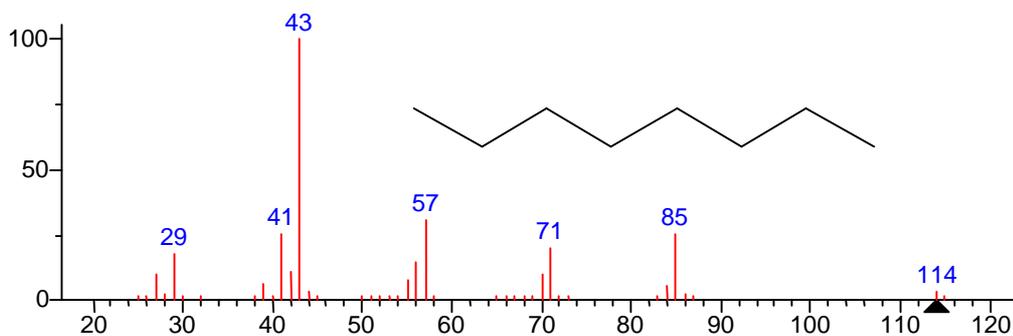
Spettri di massa tipici di classi di molecole organiche

Idrocarburi

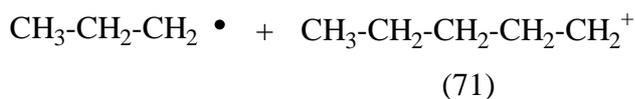
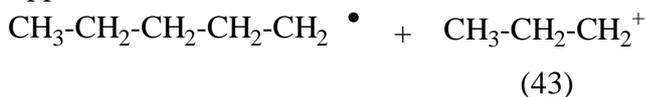
Alcani

Il picco dello ione molecolare è debole, soprattutto per gli isomeri ramificati. Il profilo di frammentazione contiene serie di picchi separati fra loro di 14 Da, che rappresentano la perdita di $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$.

Es. *n*-ottano C_8H_{18} , $M = 114$



Oppure



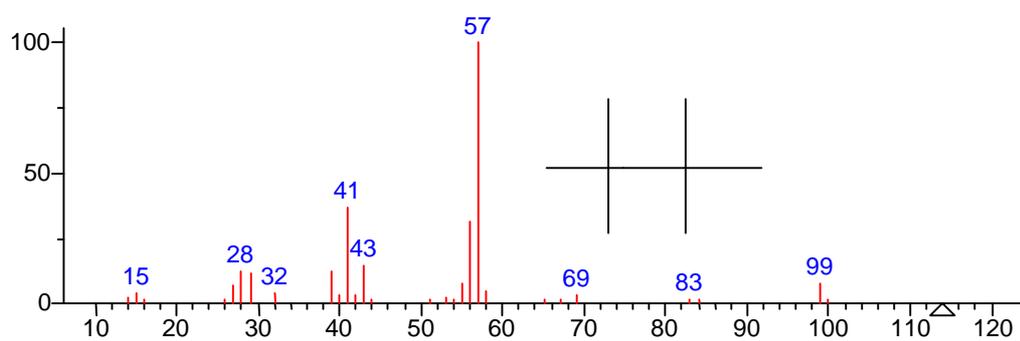
In questo spettro i frammenti $\text{CH}_3^+ = 15$ e $[\text{M} - \text{CH}_3]^+ = 99$ non sono misurabili.

Frammentazione secondaria con perdita della molecola di idrogeno:



Alcani ramificati

Es. tetrametilbutano , C_8H_{18} , $M = 114$

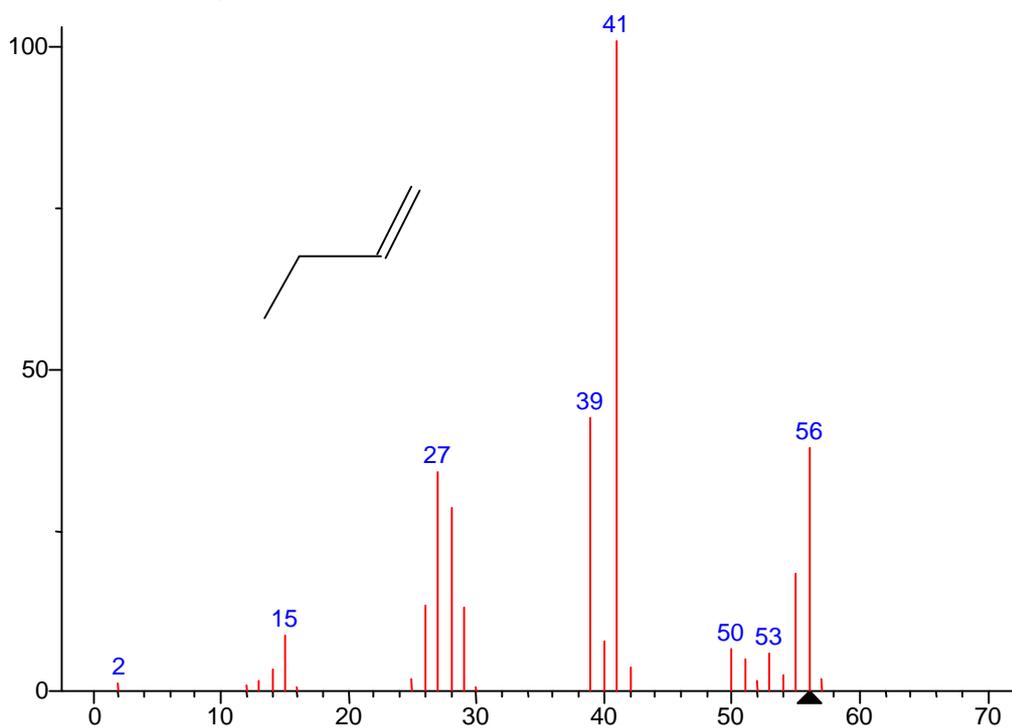


Il picco dello ione molecolare è assente.

Il picco base è dovuto allo ione terziario butile molto stabile $(CH_3)_3C^+ = 57$

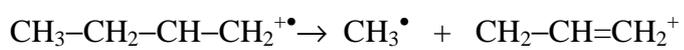
Alcheni

Es. butene-1 C₄H₈, M = 56



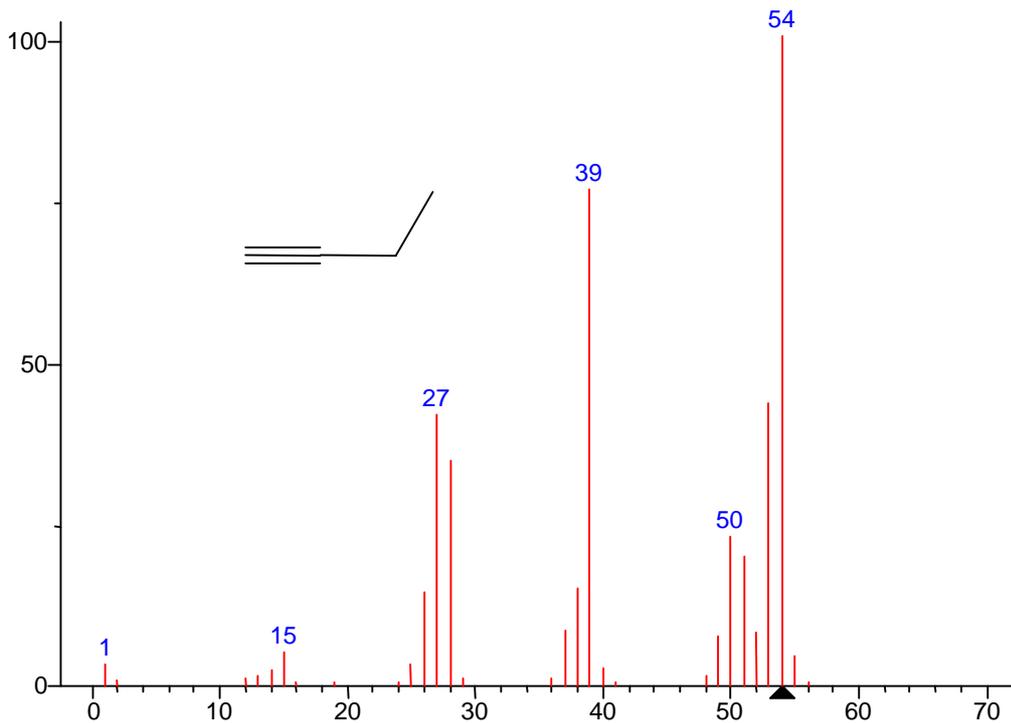
Diversamente dagli alcani il picco dello ione molecolare è visibile.

Il picco base è dovuto al catione allile relativamente stabile



Alchini

Es. butino-1 C₄H₆, M = 54



Analogamente dagli alcheni il picco dello ione molecolare è visibile.

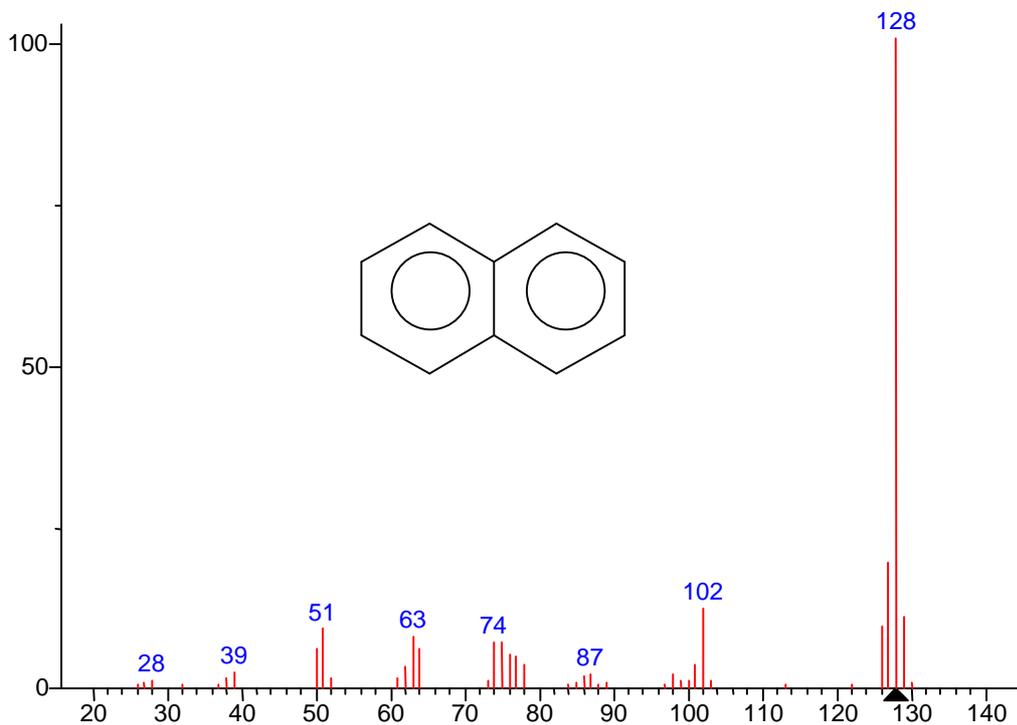
Il picco a m/z 39 è dovuto al catione propargilico relativamente stabile



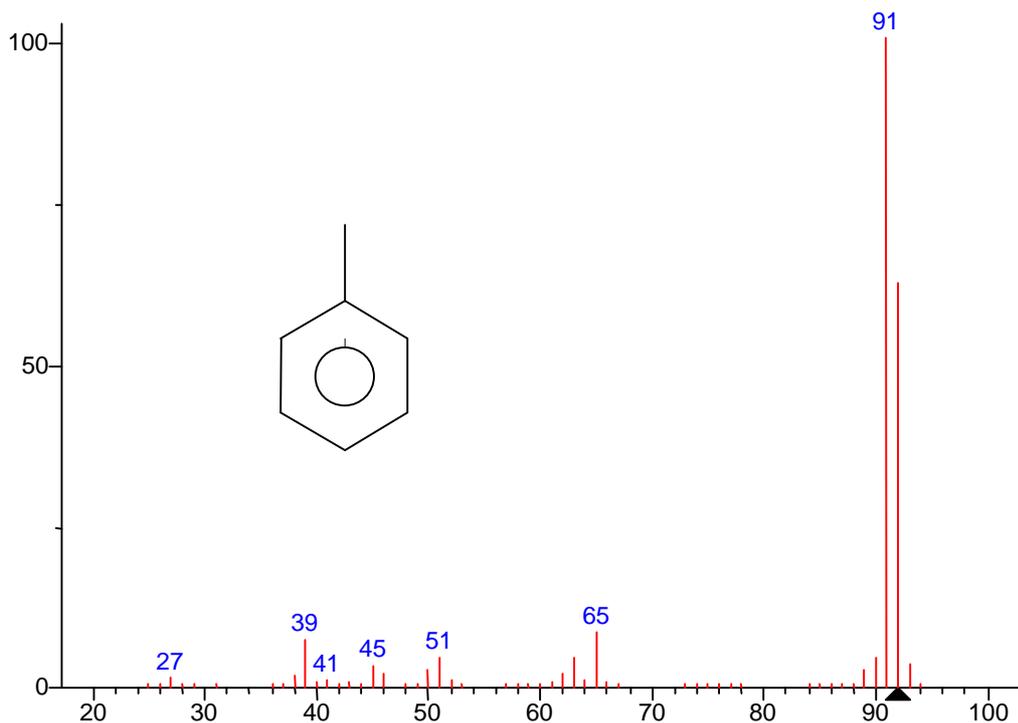
Idrocarburi aromatici

Il picco dello ione molecolare è intenso a causa della stabilità della struttura aromatica.

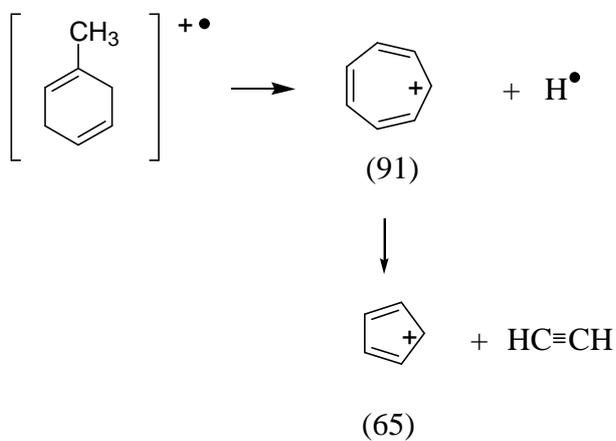
Es. naftalene $C_{10}H_8$, $M = 128$



Es. metilbenzene C_7H_8 , $M = 92$



La frammentazione del legame C – H in posizione $\alpha\beta$ rispetto all'anello aromatico produce il catione tropilio, con m/z 91, che poi per perdita di acetilene dà luogo al catione ciclopentadienile, con m/z 65:



Composti contenenti ossidril

Alcoli

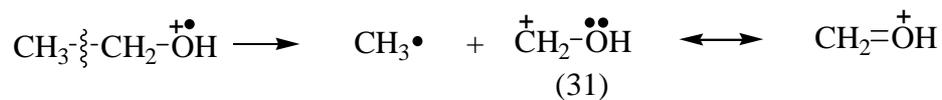
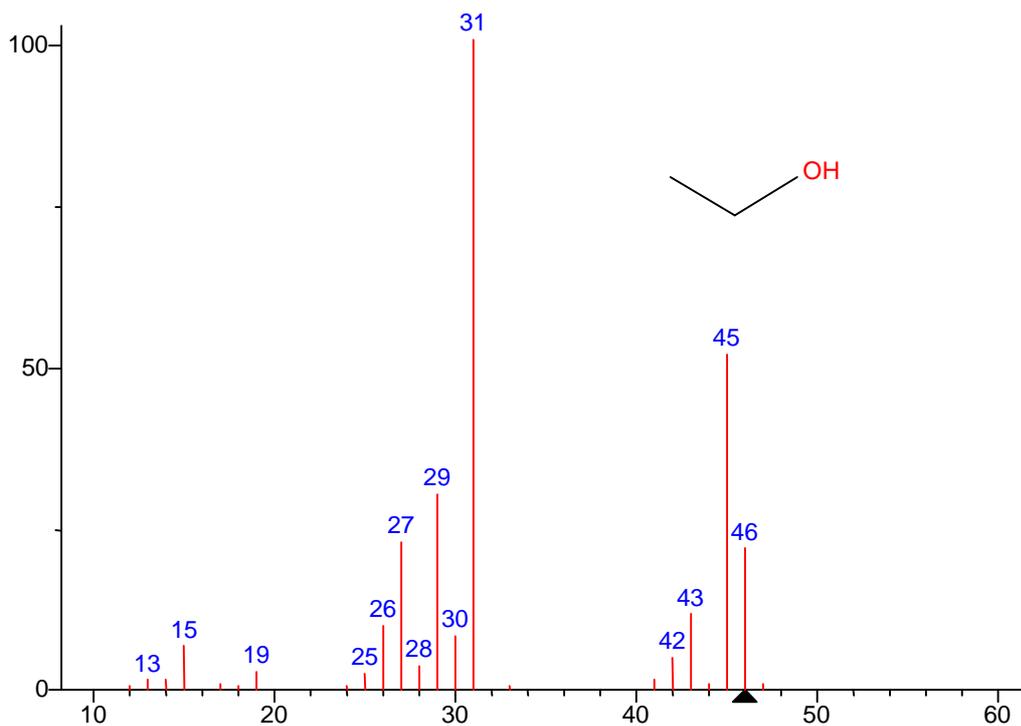
La ionizzazione avviene per espulsione di un elettrone da un doppietto dell'ossigeno.

La frammentazione del legame $C_{\alpha}-C_{\beta}$ vicino all'ossigeno, detta anche α -scissione, è tipica, e porta alla formazione di uno ione stabilizzato per risonanza.

Alcoli primari

Il picco dello ione molecolare è debole.

Es. etanolo C_2H_6O , $M = 46$

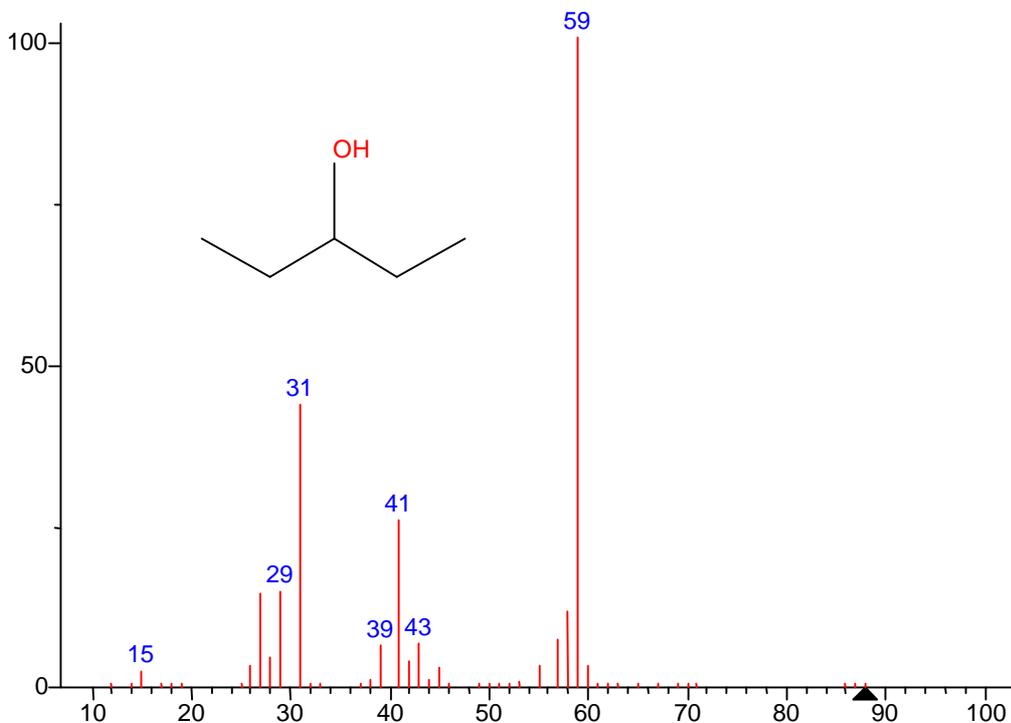


Alcoli secondari

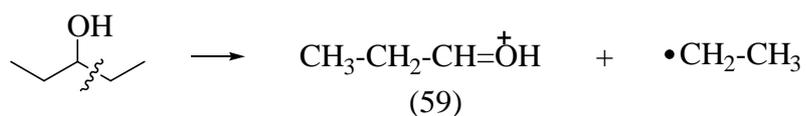
Il picco dello ione molecolare è estremamente debole.

Il frammento prodotto dalla α -scissione perde olefina dando origine ad uno ione abbastanza intenso a m/z 31.

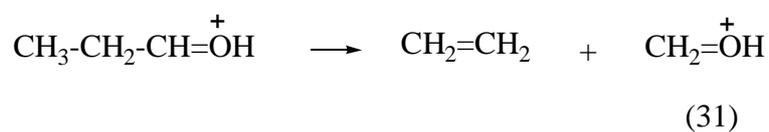
Es. 3-pentanol, $C_5H_{12}O$, $M = 88$



Frammentazione $C_{\alpha}-C_{\beta}$:



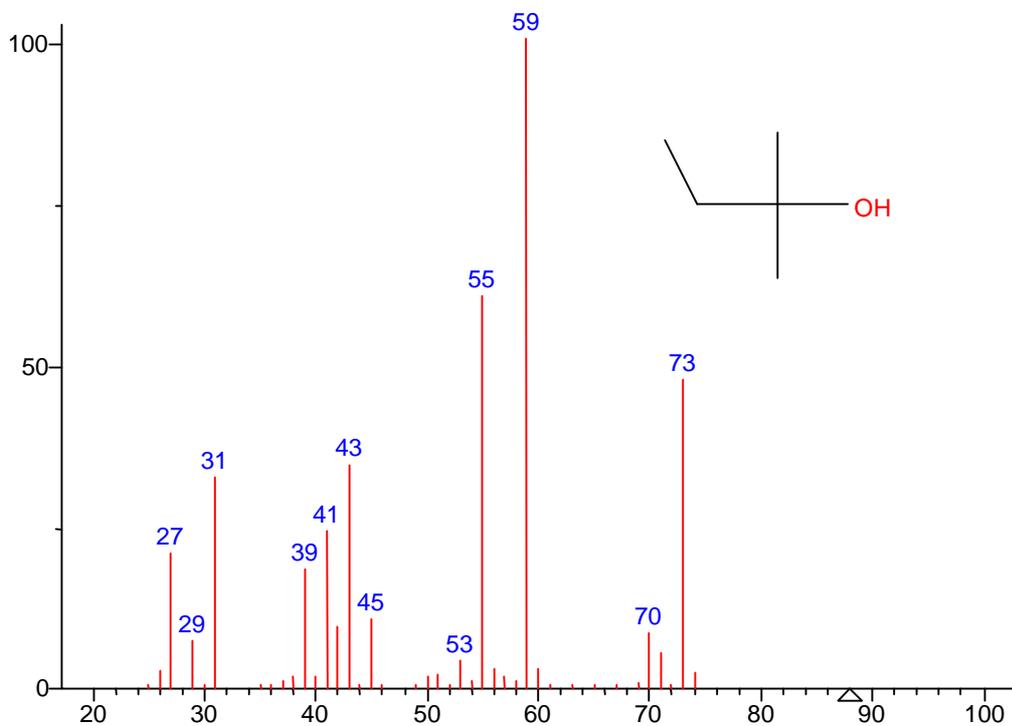
Successiva eliminazione di etilene:



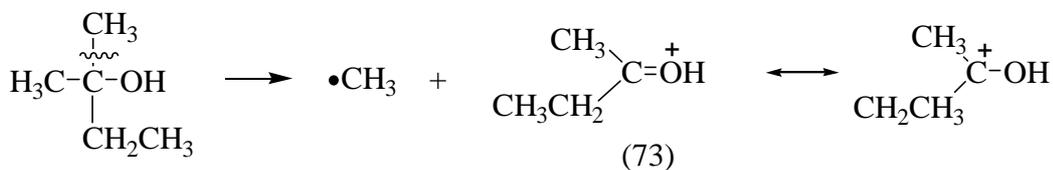
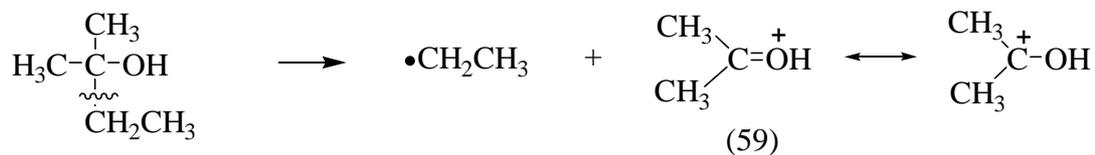
Alcoli terziari

Il picco dello ione molecolare è assente. Nella α -scissione il sostituente più grande viene eliminato più facilmente.

Es. 2-metil-2-butanol $C_5H_{12}O$, $M = 88$



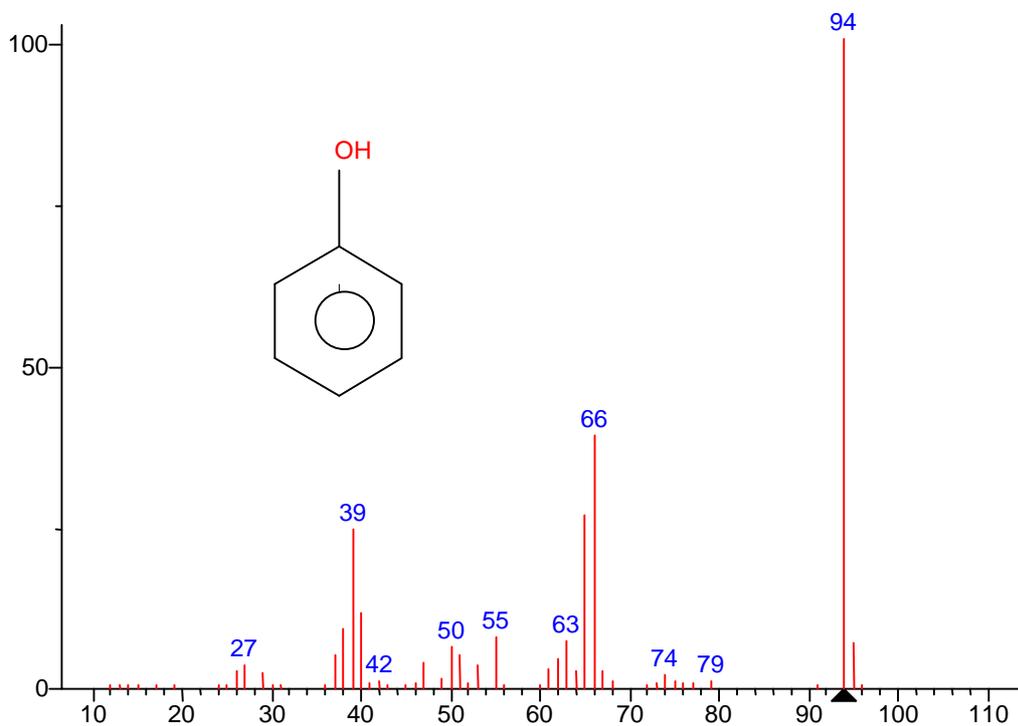
L'eliminazione del gruppo etile è favorita rispetto a quelle del metile, il picco 59 è più intenso del picco 73:



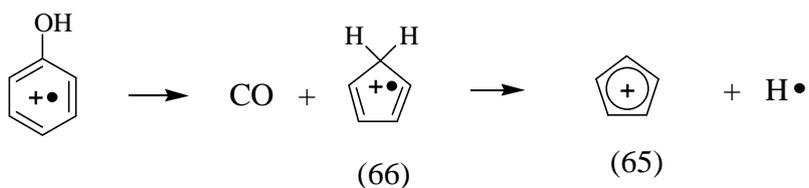
Fenoli

Il picco dello ione molecolare è intenso come per ogni struttura aromatica.

Es. fenolo C_6H_6O , $M = 94$



Per perdita della molecola di CO si forma lo ione ciclopentadienile $C_5H_6^{+\bullet}$ con m/z 66, che per successiva perdita di H^\bullet dà luogo a $C_5H_5^+$ con m/z 65.



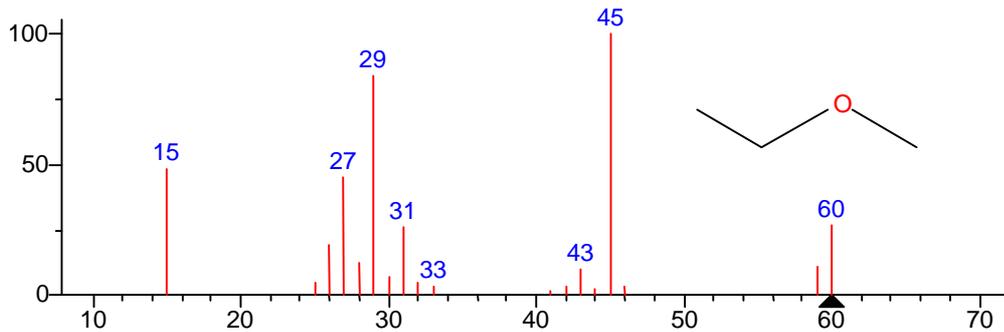
Eteri

La ionizzazione avviene per espulsione di un elettrone da una delle coppie elettroniche dell'ossigeno.



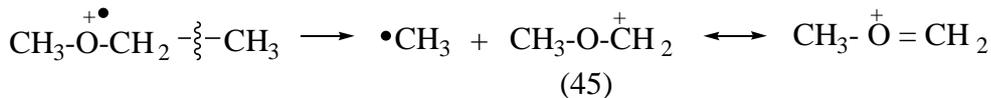
Nella frammentazione prevale la α -scissione, ossia la rottura del legame $C_\alpha-C_\beta$ vicino all'ossigeno, con formazione di uno ione stabilizzato per risonanza.

Es. etil-metil-etere C_3H_8O , $M=60$



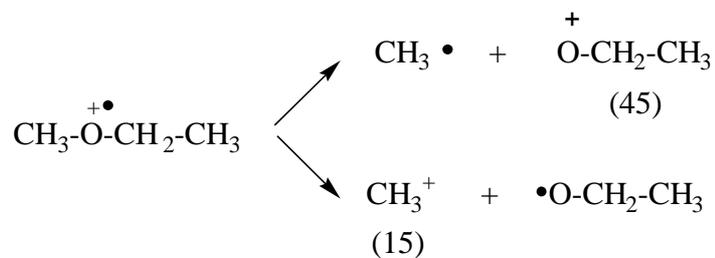
Il picco base deriva dall' α -scissione

Si può avere anche la scissione del legame ossigeno – carbonio, che può avvenire in diversi modi,

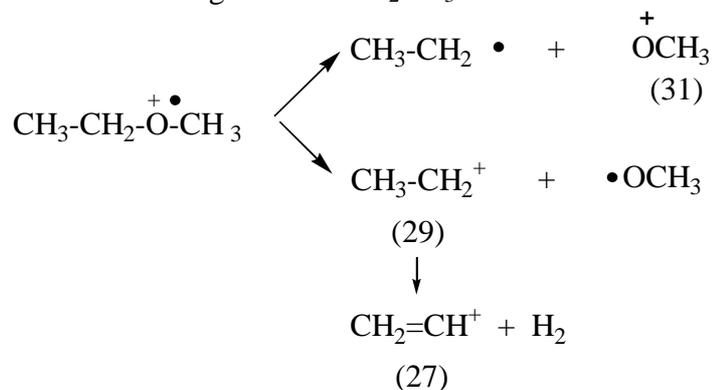


ma in prevalenza la carica resta sul gruppo alchilico.

Scissione del legame $O - CH_3$



Scissione del legame $O - CH_2CH_3$

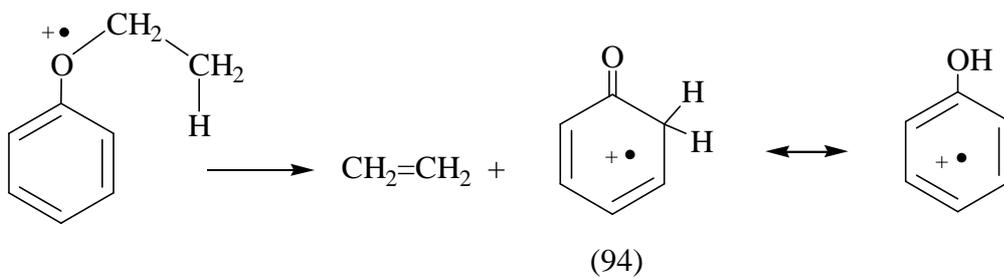
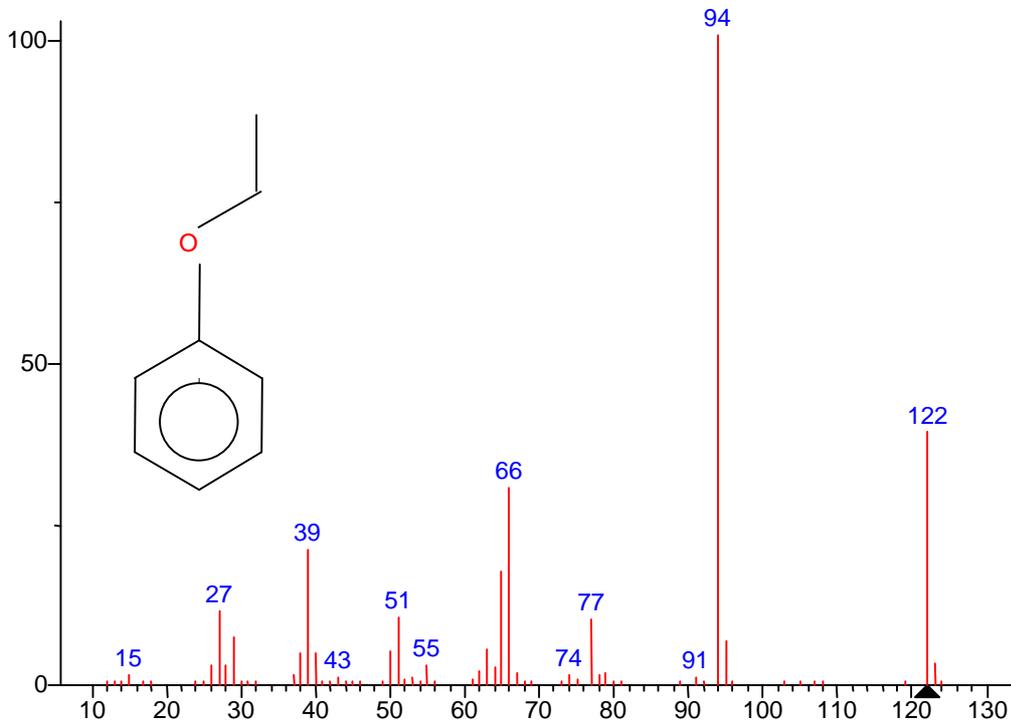


Eteri aromatici

Il picco dello ione molecolare è ben visibile.

La scissione del legame C – O della parte alchilica è accompagnata da migrazione di idrogeno ed eliminazione di olefina.

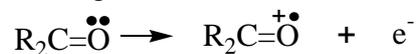
Es. etil-fenil-etero, $C_8H_{10}O$, $M = 122$



Composti carbonilici

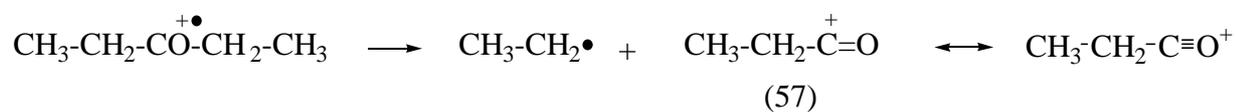
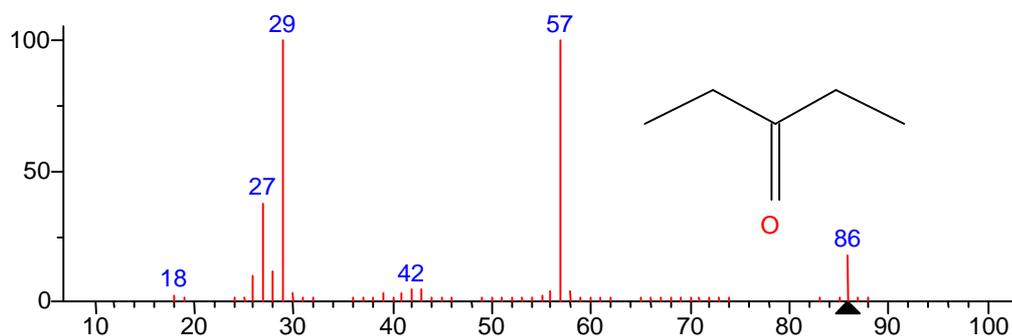
Chetoni alifatici

La ionizzazione avviene per espulsione di un elettrone da una delle coppie elettroniche dell'atomo di ossigeno.

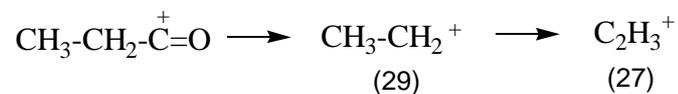


La scissione in α al gruppo carbonilico dà luogo alla formazione dello ione acilio stabilizzato per risonanza.

Es. 3-pentanone $C_5H_{10}O$, $M = 86$



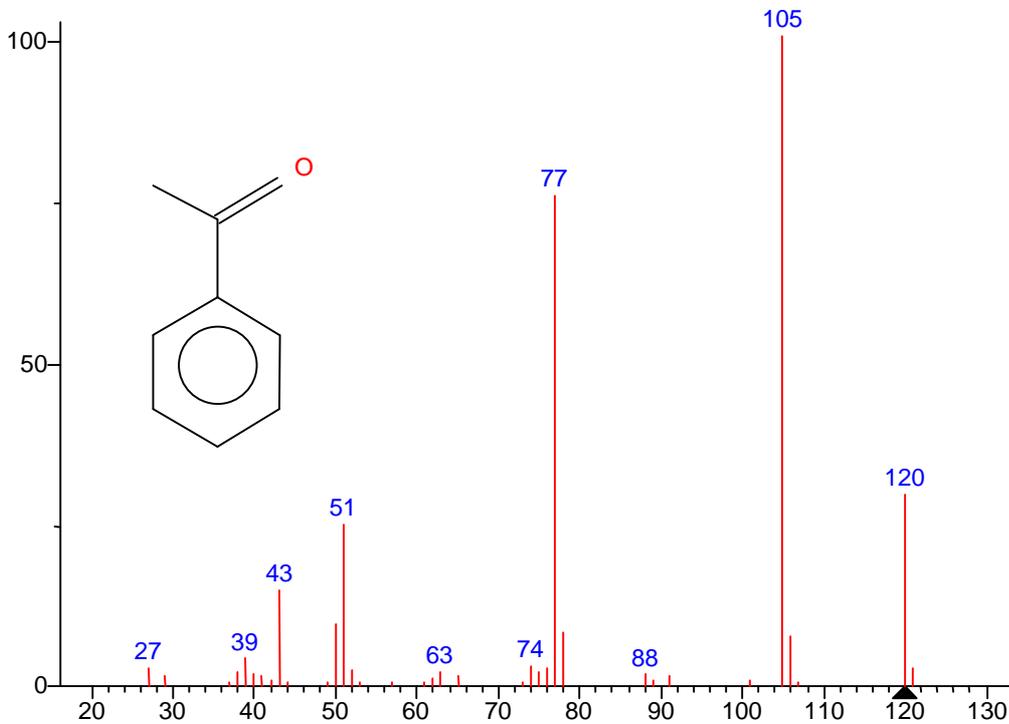
I picchi a 29 e 27 sono dovuti alla perdita di CO dallo ione acilio e alla successiva eliminazione di H_2



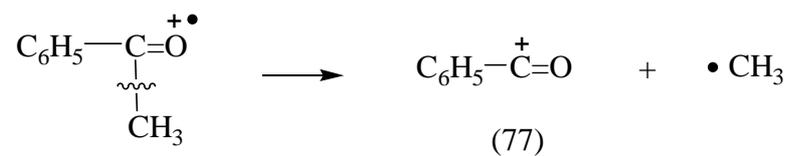
Chetoni aromatici

Il picco dello ione molecolare è ben visibile per l'effetto stabilizzante del gruppo aromatico. La frammentazione avviene in alfa al carbonile.

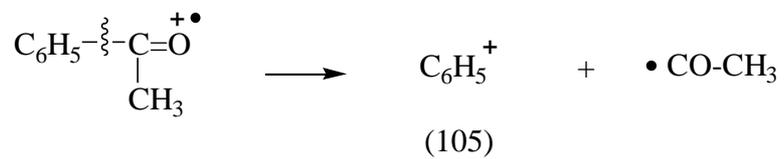
Es. acetofenone C_8H_8O , $M = 120$



Il picco base è dovuto alla scissione del legame metile – CO:



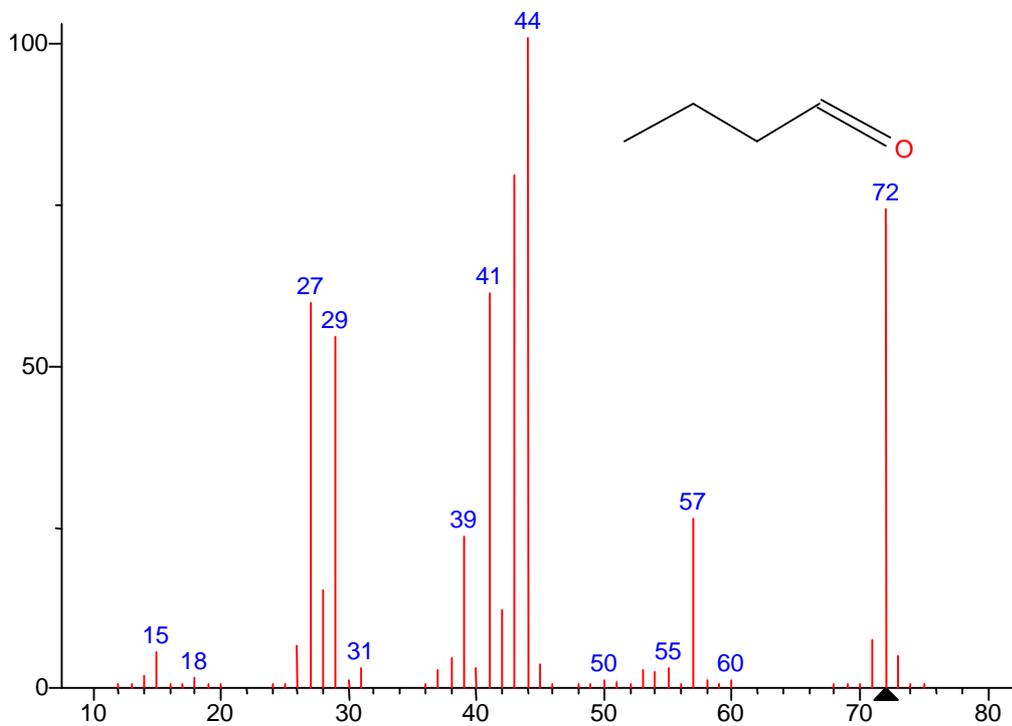
L'altro picco intenso deriva dalla scissione del legame fenile – CO:



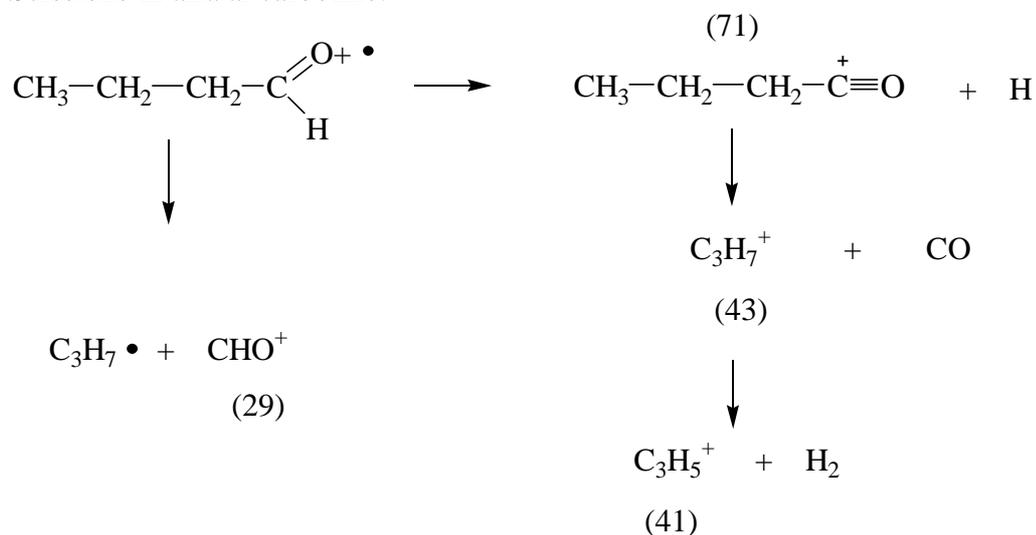
Aldeidi

Il picco dello ione molecolare è rilevabile. La rottura dei legami vicini al gruppo C=O dà luogo alla perdita di idrogeno ($M - 1$) oppure alla perdita di CHO ($M - 29$). Inoltre è possibile la trasposizione di McLafferty.

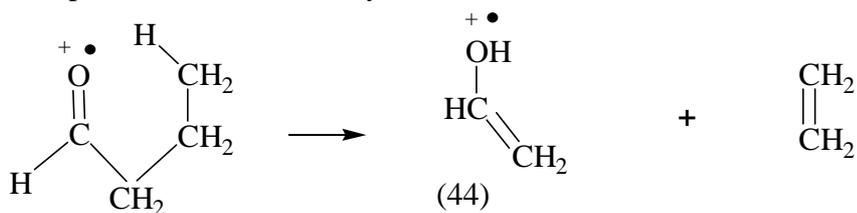
Es. butanale C_4H_8O , $M = 72$



Scissione in alfa al carbonile:

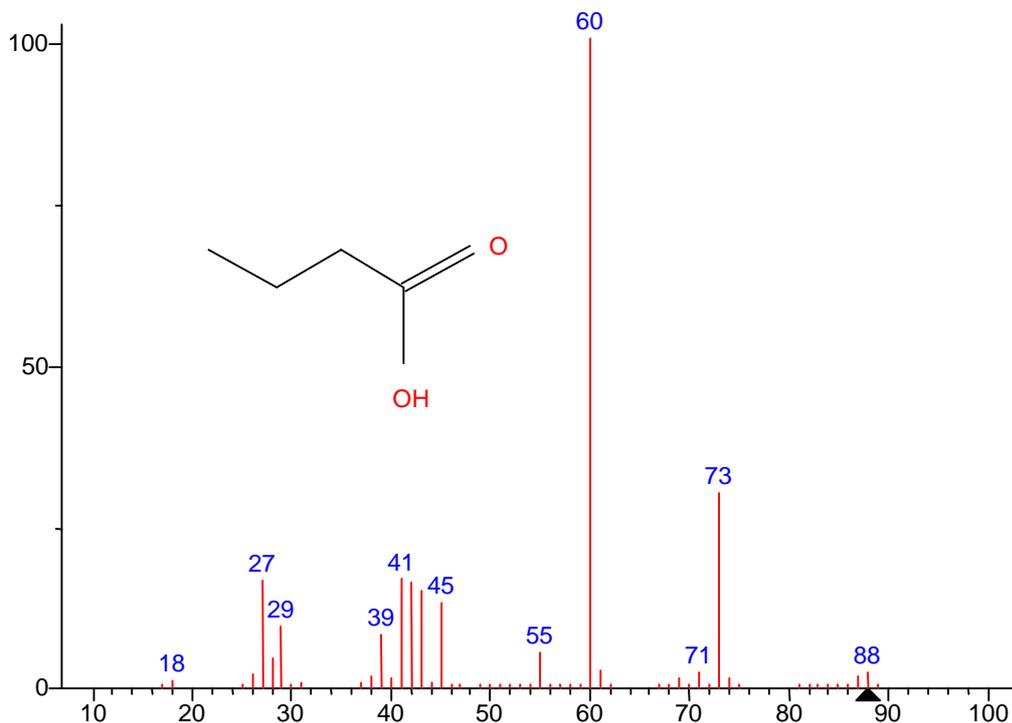


Trasposizione di McLafferty

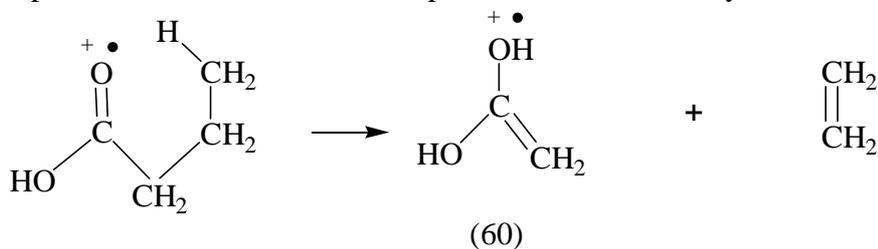


Acidi carbossilici

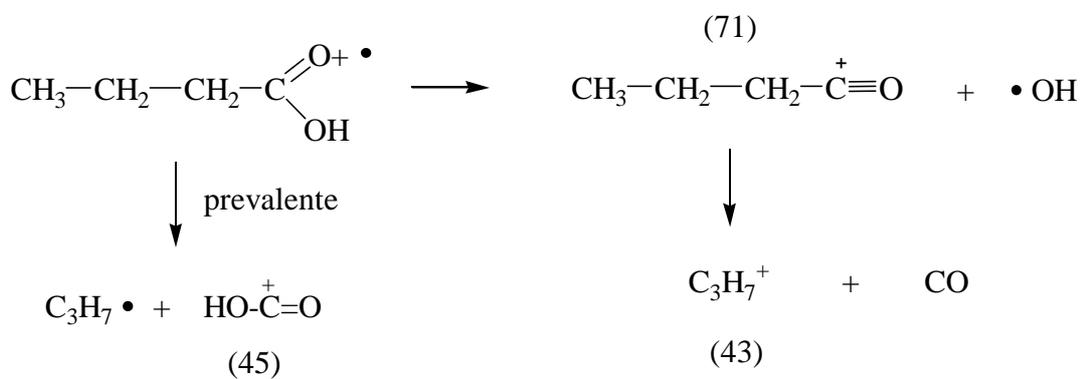
Es. acido butirrico $C_4H_8O_2$, $M = 88$



Il picco di base è dovuto alla trasposizione di McLafferty:



Due sono le possibili scissioni in alfa al carbonile:

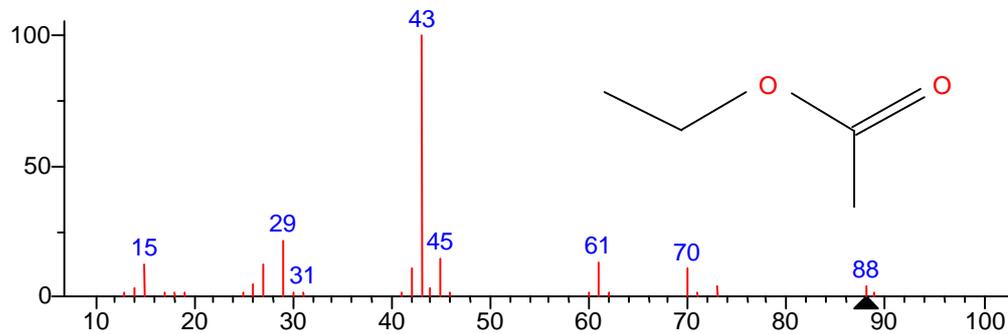


Il picco intenso a $M - 15 = 73$ è dovuto a perdita di metile.

Esteri

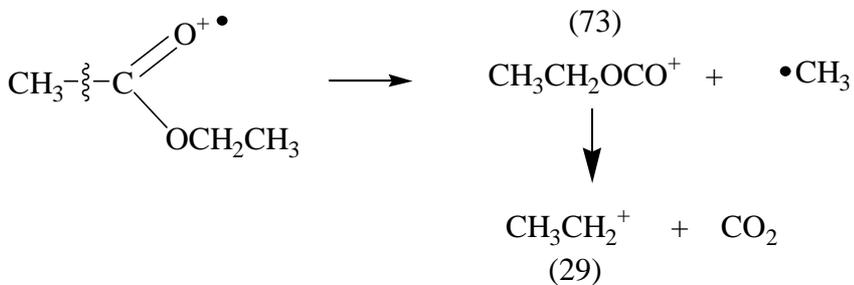
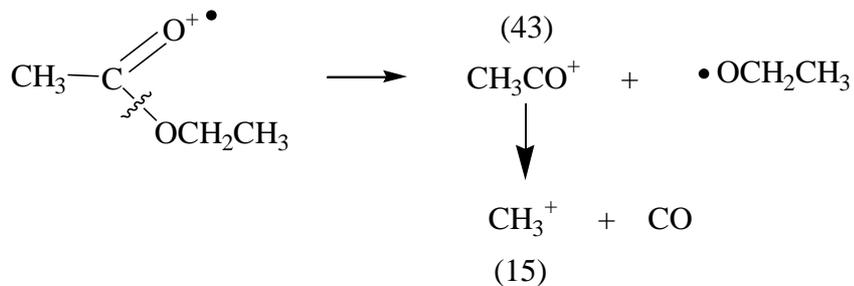
Prevale la frammentazione in alfa al carbonile con perdita del gruppo alcossi $\bullet\text{OR}$.

Es. etile acetato $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, $M = 88$



Il picco base è dovuto allo ione acilico, che poi per frammentazione secondaria produce lo ione CH_3^+ .

La scissione meno favorita produce lo ione di m/z 73, che per frammentazione secondaria dà lo ione etile:

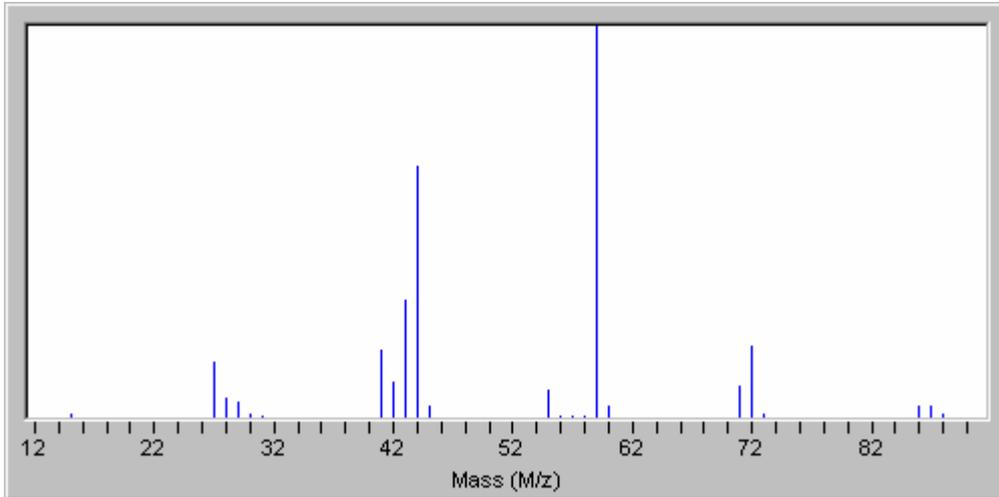


Amidi

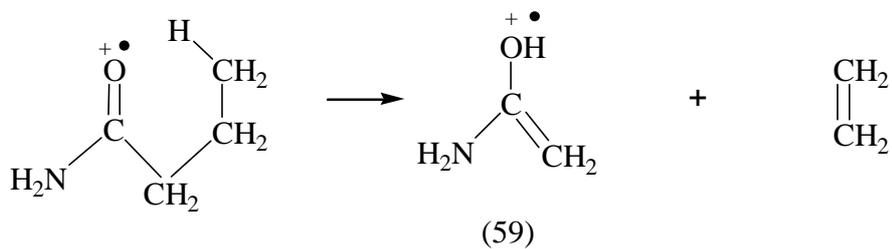
Il picco molecolare di solito è visibile.

Le amidi primarie hanno il picco base dovuto alla trasposizione di McLafferty

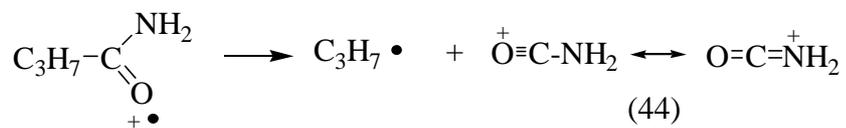
Es. butanamide C_4H_9NO , MW 87



Il picco di base a m/z 59 è dovuto alla trasposizione di McLafferty:



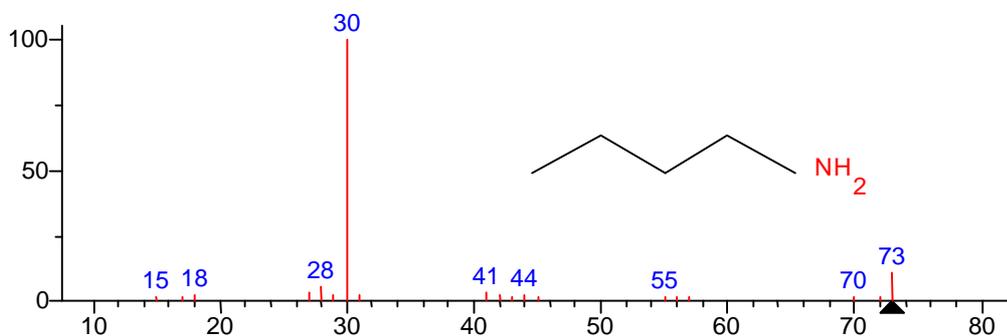
Il picco intenso a m/z 44 risulta dalla scissione del legame C – CONH₂ con formazione dello ione stabilizzato per risonanza:



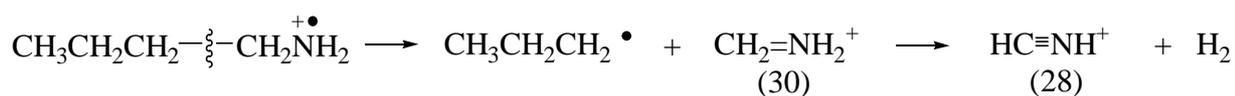
Ammine

Il picco dello ione molecolare dispari conferma una molecola contenente un solo atomo di azoto. Prevale la frammentazione del legame $C_{\alpha}-C_{\beta}$ vicino al gruppo amminico.

Es. n-butilammina $C_4H_{11}N$, $M = 73$



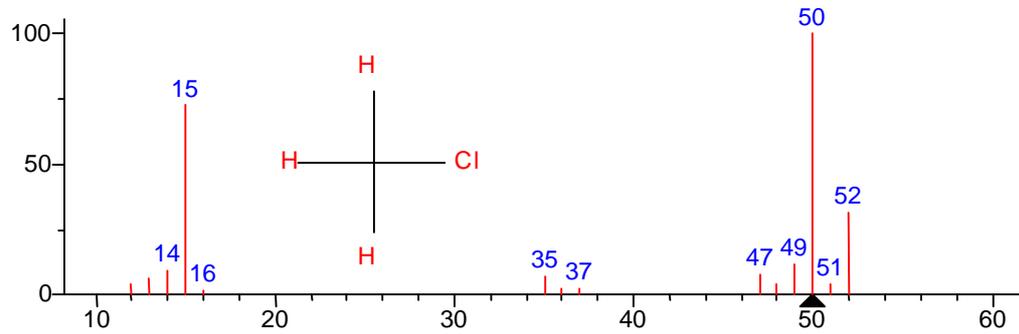
La scissione in α produce lo ione di massa 30, il quale può successivamente eliminare idrogeno:



Composti alogenati

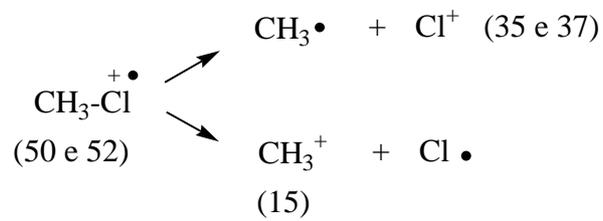
La presenza del cloro e del bromo si riconosce dai picchi isotopici

Es. clorometano CH_3Cl , $M = 50$

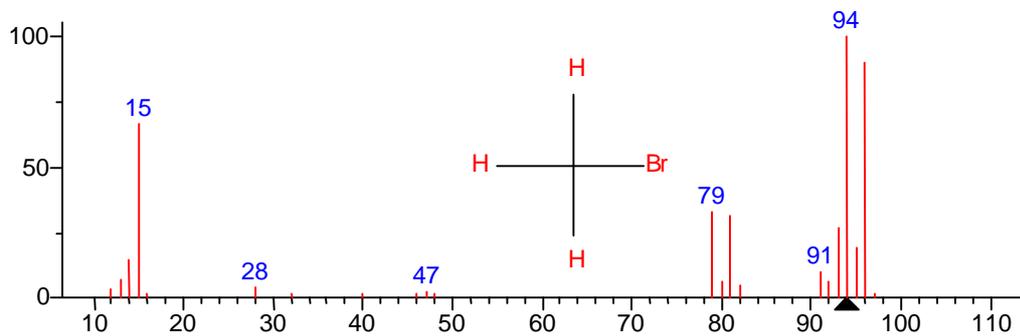


Il picco molecolare a 50 è affiancato dal picco 52 dovuto all'isotopo ^{37}Cl .

Il segnale a 15 è dovuto allo ione CH_3^+ e i due picchi a 35 e 37 agli ioni $^{35}\text{Cl}^+$ e $^{37}\text{Cl}^+$.



Es. brometano CH_3Br , $M = 94$



I due picchi dello ione molecolare sono di intensità paragonabile, dato che le abbondanze naturali dei due isotopi sono simili.

