

SPETTROMETRIA DI MASSA

INTRODUZIONE

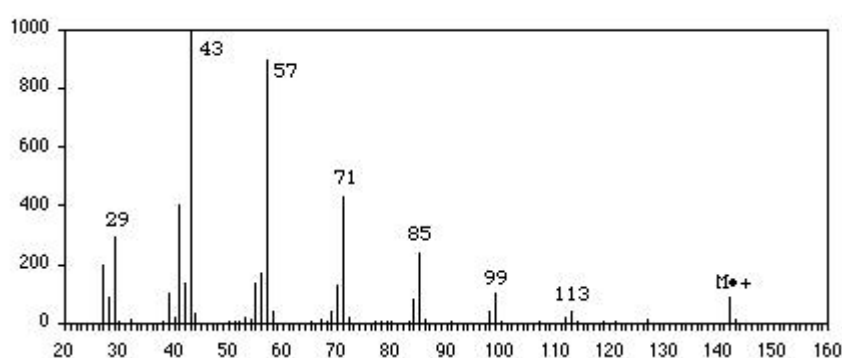
La spettrometria di massa è una tecnica analitica di delucidazione strutturale basata sulla **ionizzazione** di una molecola e sulla sua successiva **frammentazione** in ioni di diverso rapporto massa / carica (M/z).

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.

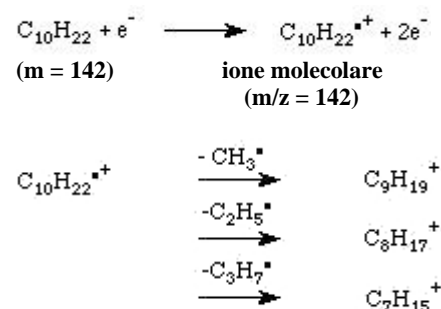
Il principio su cui si basa è il seguente: una molecola è ionizzata per espulsione di un elettrone; il catione radicalico che si forma (*ione molecolare*) in parte si frammenta dando molecole e/o radicali neutri (che lo strumento non rileva), in parte generando cationi e/o radicali cationi (*ioni frammento*). 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



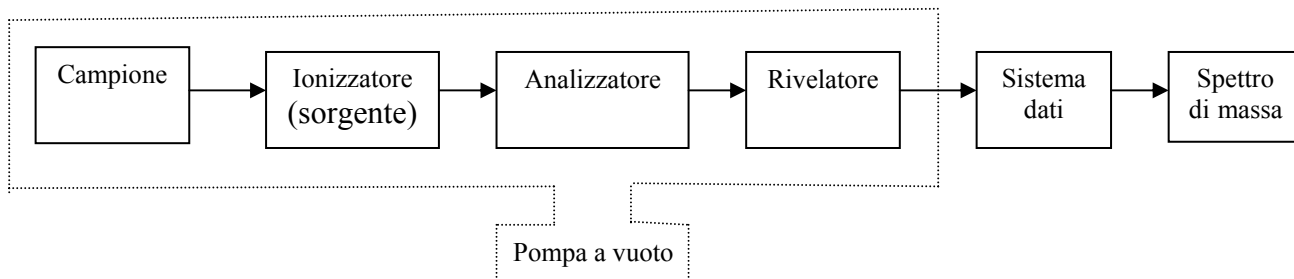
Questa tecnica consente di misurare le masse molecolari (sia nominali che esatte) e di ottenere dei profili di frammentazione che sono specifici per ciascun composto, di cui costituiscono quindi un'impronta digitale.

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.)

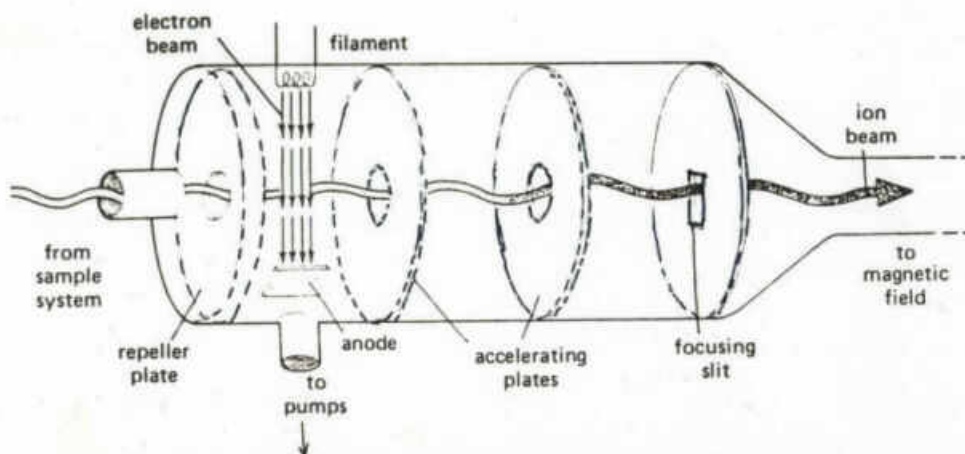
IMPATTO ELETTRONICO (E.I.)

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^+ .

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.

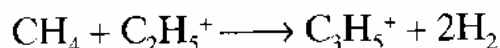
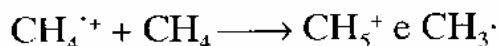
Questo tipo di ionizzazione è *hard*. Gli ioni vengono generati ad un livello energetico molto alto e si possono avere frammentazioni estese che lasciano poco o nulla dello ione molecolare. Per risolvere questo problema sono state messe a punto altre tecniche di ionizzazione, dette tecniche *soft* (e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

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

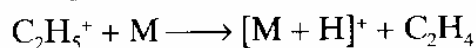
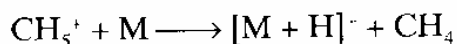
La ionizzazione chimica viene utilizzata quando gli ioni molecolari prodotti con il metodo dell'impatto elettronico sono troppo poco stabili e si frammentano completamente.

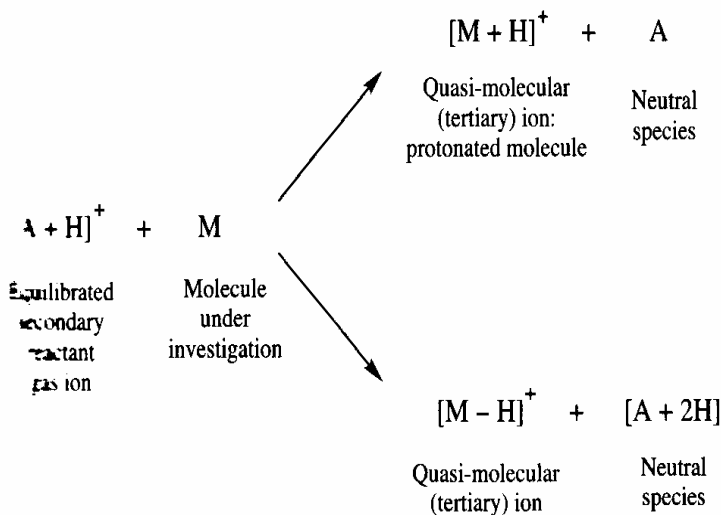
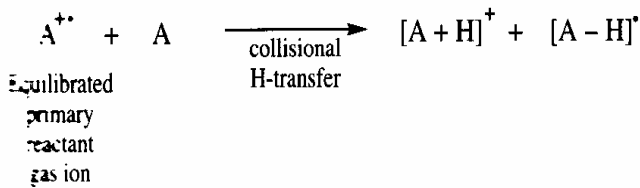
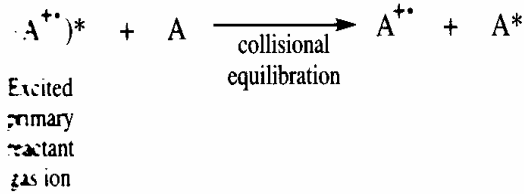
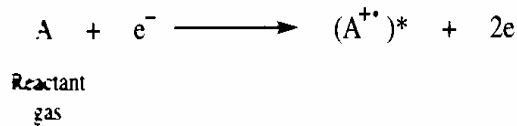
Questa è una tecnica di ionizzazione più "mild", che si basa sull'interazione del campione vaporizzato con un reagente ionizzato, che di solito è un acido di Bronsted gassoso.

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⁺.





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.

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.

ANALIZZATORE

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:

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

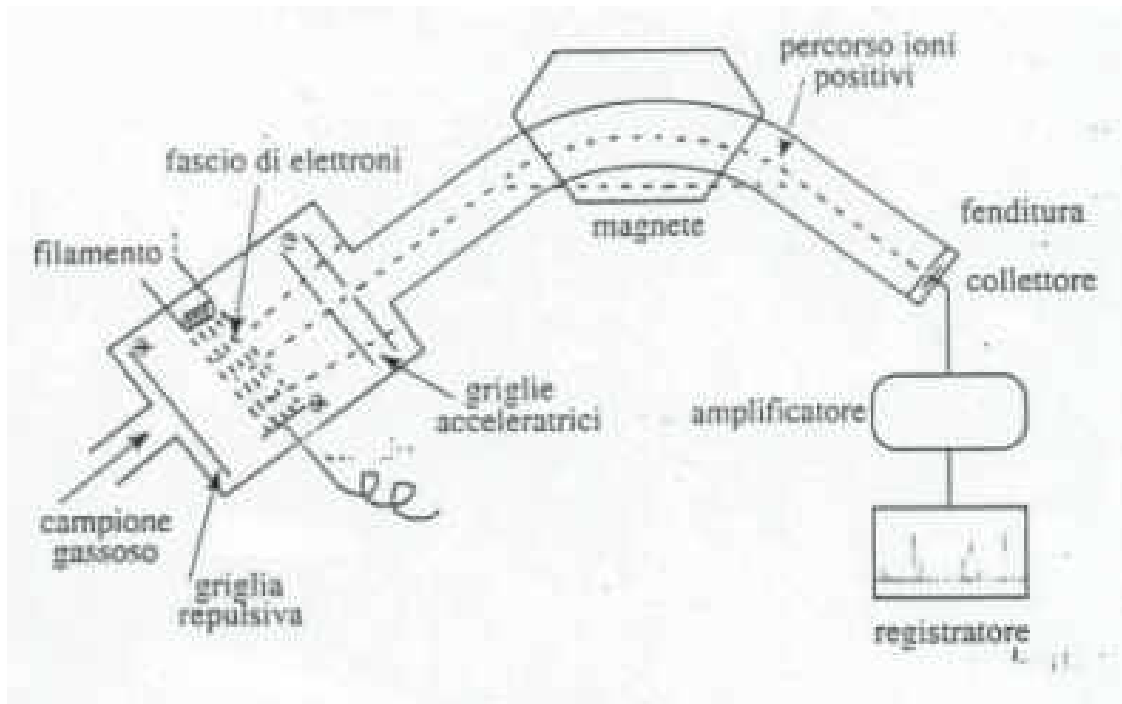
$$\frac{m}{z} = r^2 \cdot \left(\frac{H^2}{2V} \right)$$

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.

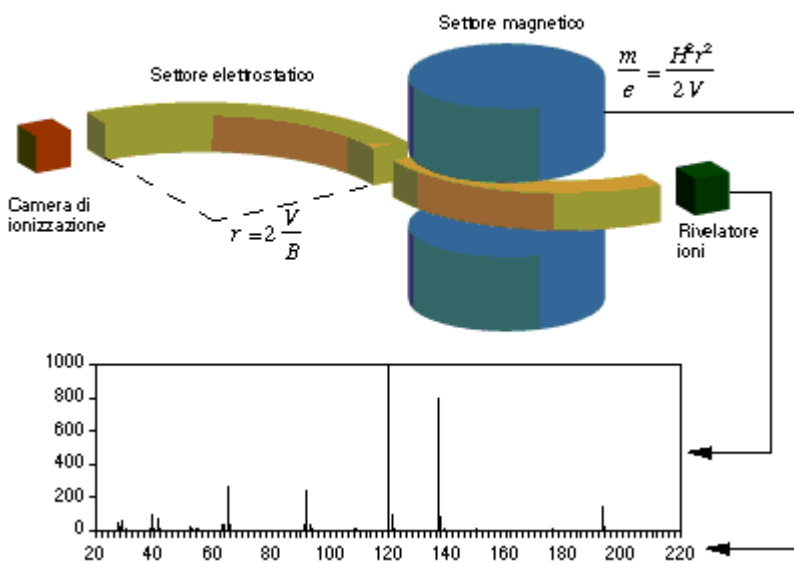
Operando a potenziale V costante e facendo una scansione di campo H è possibile fare uscire dal tubo gli ioni a diversa massa in tempi diversi.

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 .



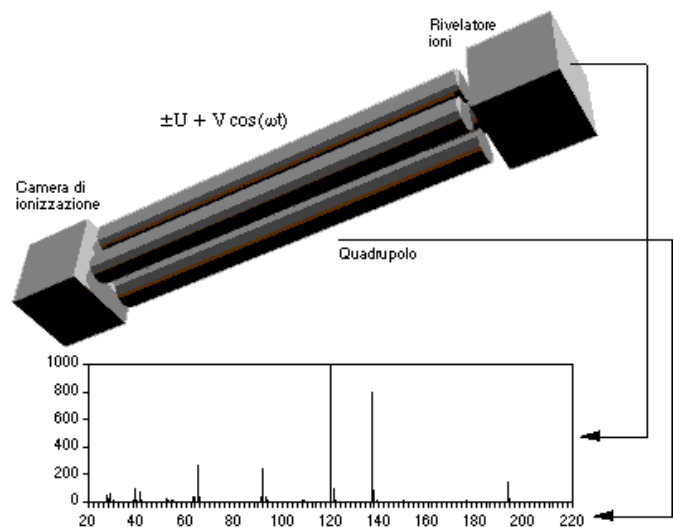
Nel settore elettrostatico gli ioni non vengono separati in funzione del rapporto massa/carica, ma solo focalizzati in base alla loro energia traslazionale; questo perché altrimenti nel settore successivo, quello magnetico, ioni con ugual rapporto m/z ma differente energia traslazionale seguirebbero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

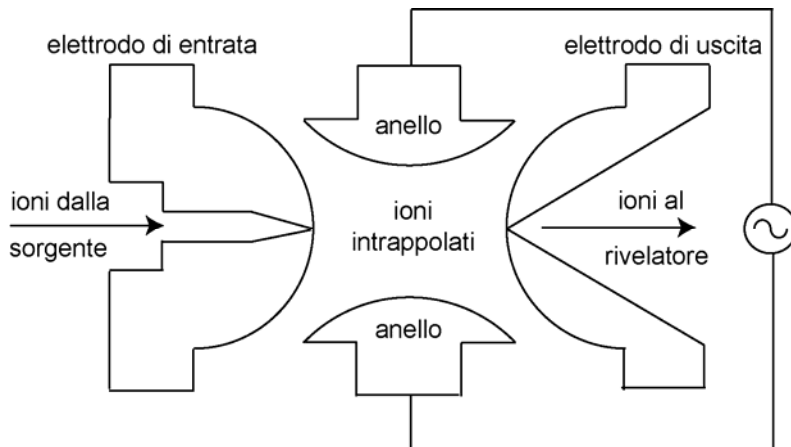


Tuttavia, a causa dell'oscillazione del quadrupolo gli ioni assumono una traiettoria a zig zag e finiscono con lo scaricarsi su una delle barre, tranne quelli che, per un certo valore di frequenza di oscillazione, hanno un'energia cinetica tale per cui il moto diventa sinusoidale e riescono ad uscire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

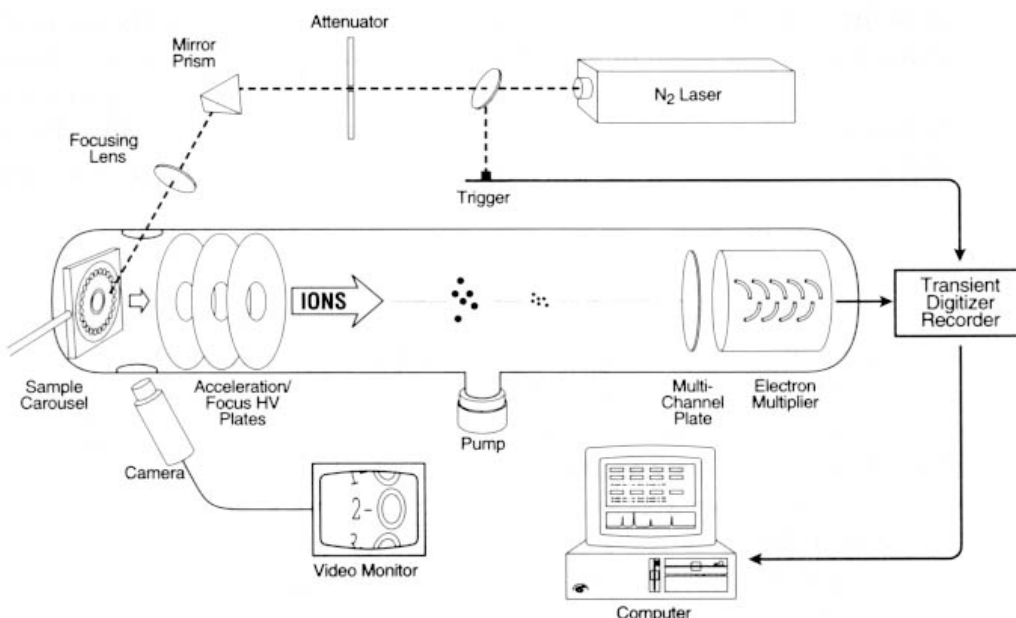
Può essere considerato una variante dell'analizzatore a quadrupolo; qui infatti, anzichè permettere agli ioni di attraversare il campo quadrupolare, la trappola ionica trattiene tutti gli ioni al suo interno.



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.

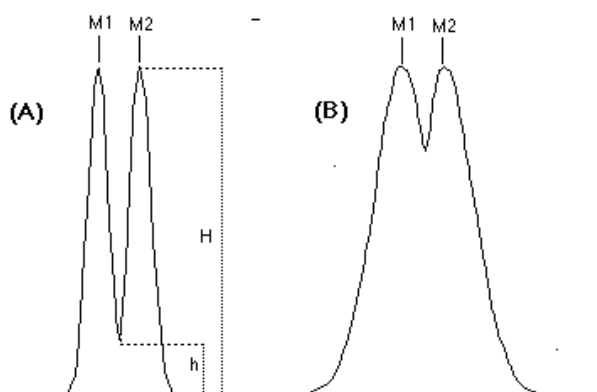
Naturalmente nel caso del metodo FTMS il sistema di rivelazione è invece un ricevitore di radiofrequenza, che a sua volta è collegato al calcolatore per l'analisi di Fourier dell'interferogramma, da cui si ottiene lo spettro di massa.

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.

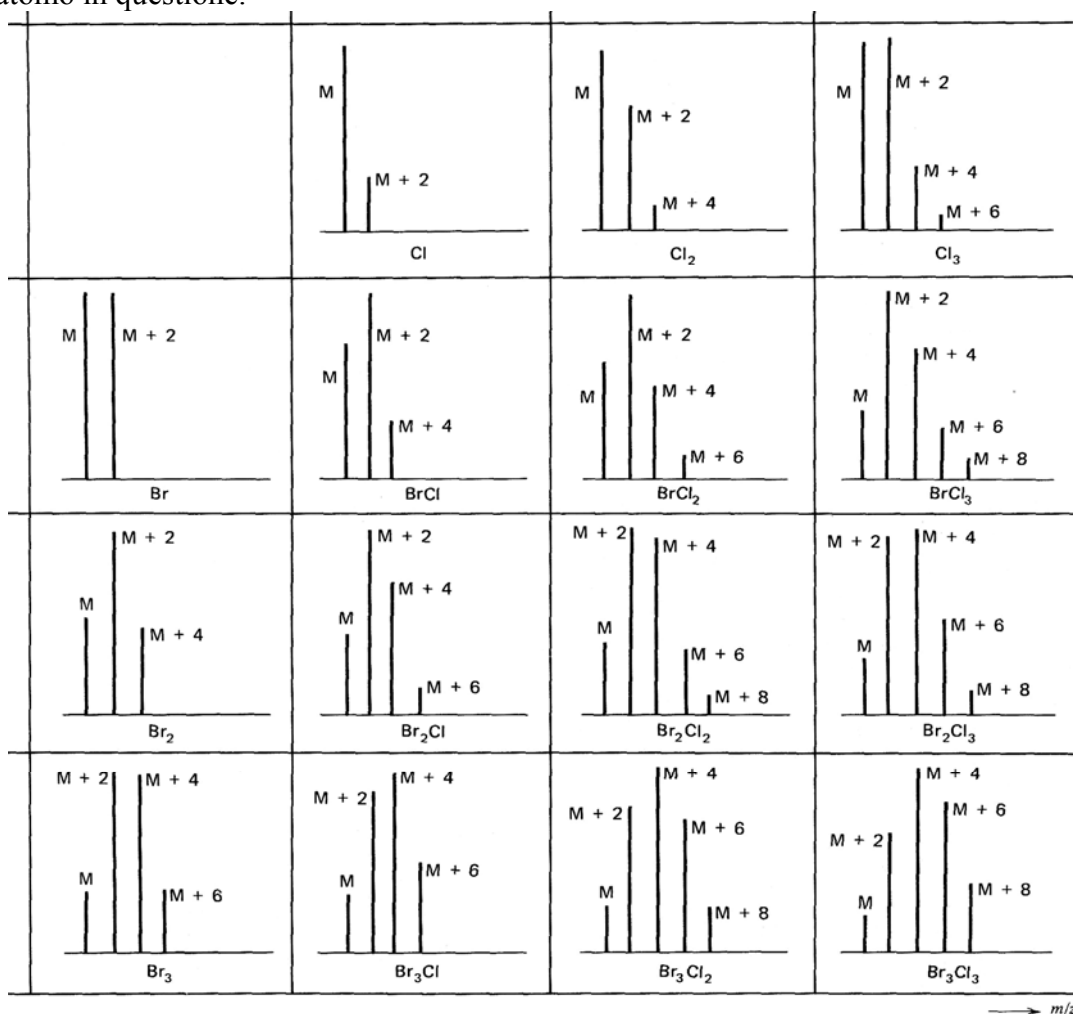
La maggior parte degli elementi che compongono i composti organici, infatti, possiede diversi isotopi naturali, di cui di solito il più leggero è il più abbondante.

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:

$$(a + b)^m \quad \begin{array}{l} a = \% \text{ abbondanza isotopo più leggero} \\ b = \% \text{ abbondanza isotopo più pesante} \\ m = \text{numero degli atomi dell'elemento presente nella molecola} \end{array}$$

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

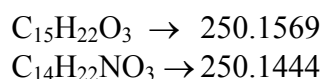
Gli spettrometri ad alta risoluzione permettono di determinare la massa con una accuratezza fino alla quarta cifra decimale, ciò che si chiama comunemente la massa esatta. Dato che le masse dei nuclidi non sono intere, la massa molecolare esatta è un parametro che caratterizza univocamente la formula 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		
				}	Δ = 0.0251
Acetaldeide	C ₂ H ₄ O	→	44.0262		
				}	Δ = 0.0364
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

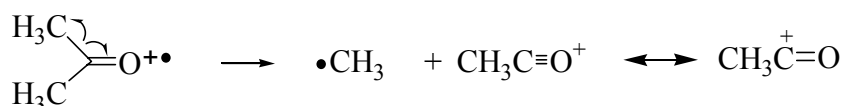
Lo ione molecolare è una specie estremamente ricca di energia e, specialmente nel caso di molecole complesse, le sue sorti possono essere molto diverse. Lo ione molecolare può decomporsi in un'ampia varietà di modi ed i frammenti prodotti possono subire un ulteriore processo di scissione. Le principali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

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

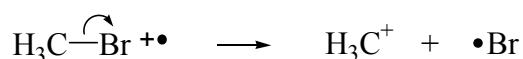
- **SCISSIONI SEMPLICI** (con rottura di un legame semplice fra due atomi)
- **SCISSIONI MULTIPLE O RIARRANGIAMENTI** (reazioni di frammentazione con rottura di due legami covalenti)

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:



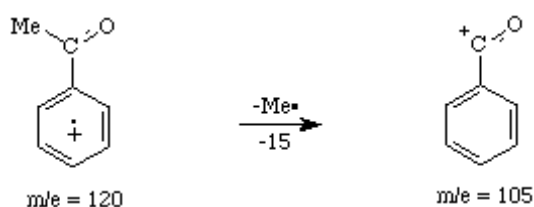
Esempio di scissione eterolitica:



Frammentazioni primarie

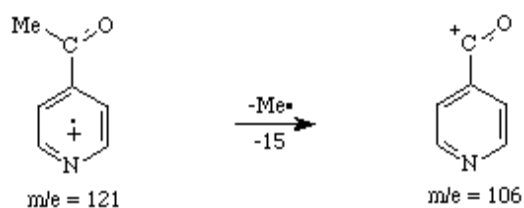
Sono quelle che avvengono direttamente sullo ione molecolare. Avvengono:

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



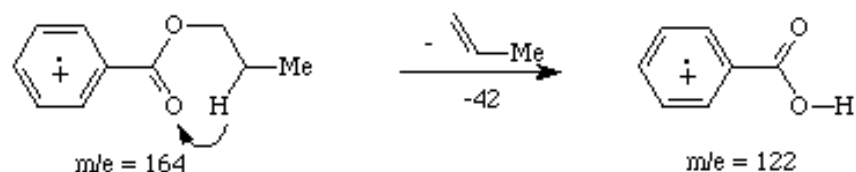
Forniscono un frammento cationico a numero pari di elettroni. Se lo ione molecolare non contiene azoti ed ha quindi massa pari, i frammenti così generati hanno massa dispari

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

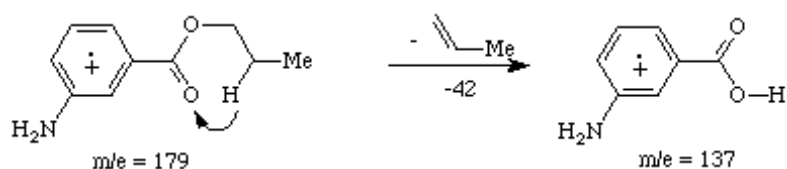


● con perdita di una molecola neutra

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.

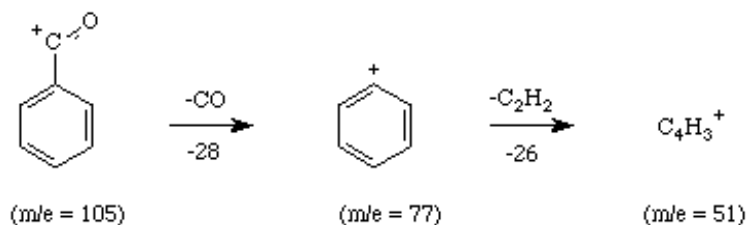


Se e' presente un atomo di azoto (o in generale un numero dispari di atomi di azoto) nello ione molecolare e nel frammento carico, entrambe le masse sono dispari.



Frammentazioni secondarie

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

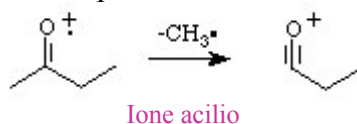


Frammentazioni semplici

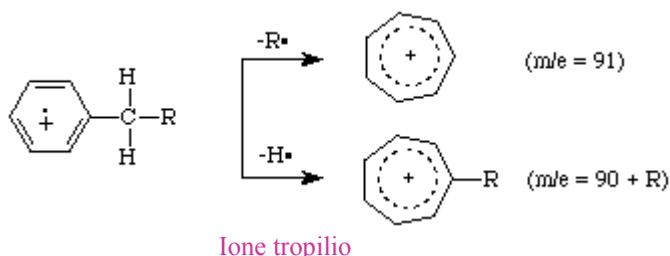
Sono reazioni di frammentazione con rottura di un legame semplice tra due atomi. Quando queste scissioni interessano il catione radicalico producono sempre un catione ed un radicale libero. Possono essere di vario tipo:

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

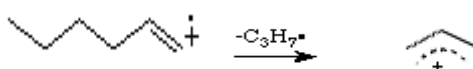
I legami carbonio-carbonio adiacenti al gruppo carbonilico di un'aldeide o di un chetone si rompono con relativa facilità in quando si formano ioni acilio stabilizzati per risonanza.



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.

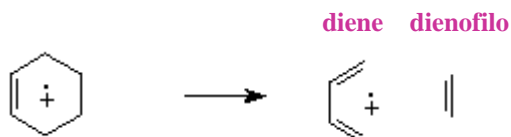
Frammentazioni multiple o Riarrangiamenti

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.

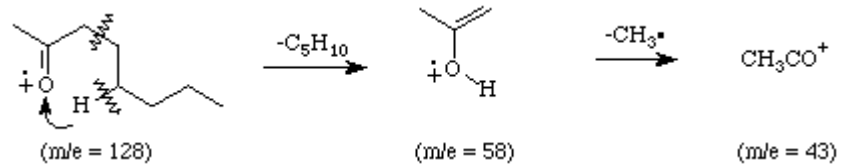
CICLOREVERSIONE DI DIELS-ALDER; generalmente sistemi ciclici insaturi a sei termini possono dare una reazione di Diels-Alder inversa, con formazione di un alchene (dienofilo) e di un catione radicale (diene).

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