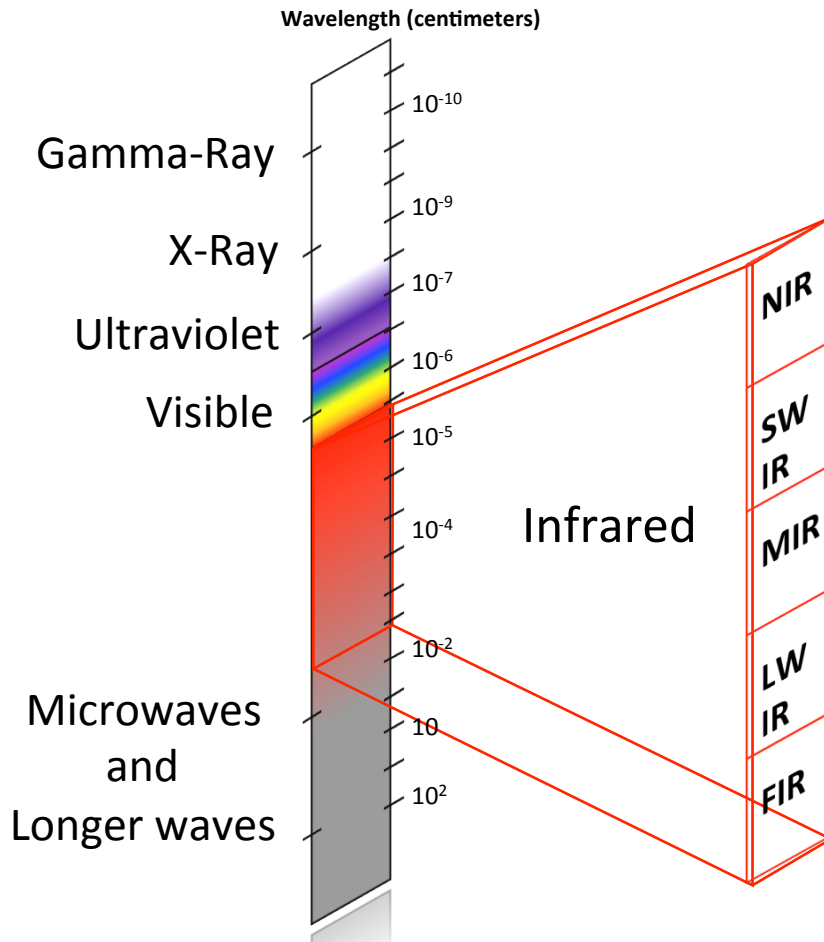


PaGES⁴

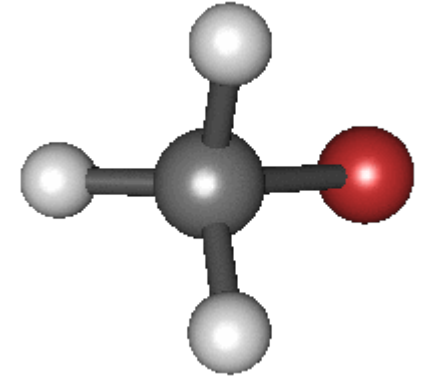
Infrared Spectroscopy

La spettroscopia Infrarossa

Tutto in natura è in movimento, anche alla temperatura dello zero assoluto

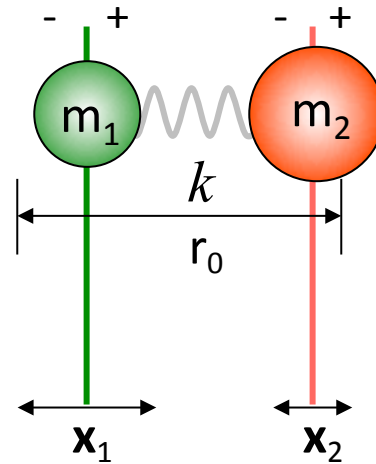


La spettroscopia infrarossa studia le vibrazioni molecolari



	NIR		MIR		FIR
λ (μm)	0.74	3	30		300
ν (THz)	400	100	10		1
$\tilde{\nu}$ (cm^{-1})	~ 13000	~ 3333	~ 333		~ 33
E (eV)	1.65	0.413	0.041		0.004

Il modello “Ball and spring” per la molecola biatomica



m_1 ed m_2 rappresentano 2 atomi

La molla il legame che li unisce

Legge di Hooke:

$$F \text{ (Forza di richiamo)} = -k \cdot x$$

K = Costante di forza (tanto più grande quanto più rigida è la molla)

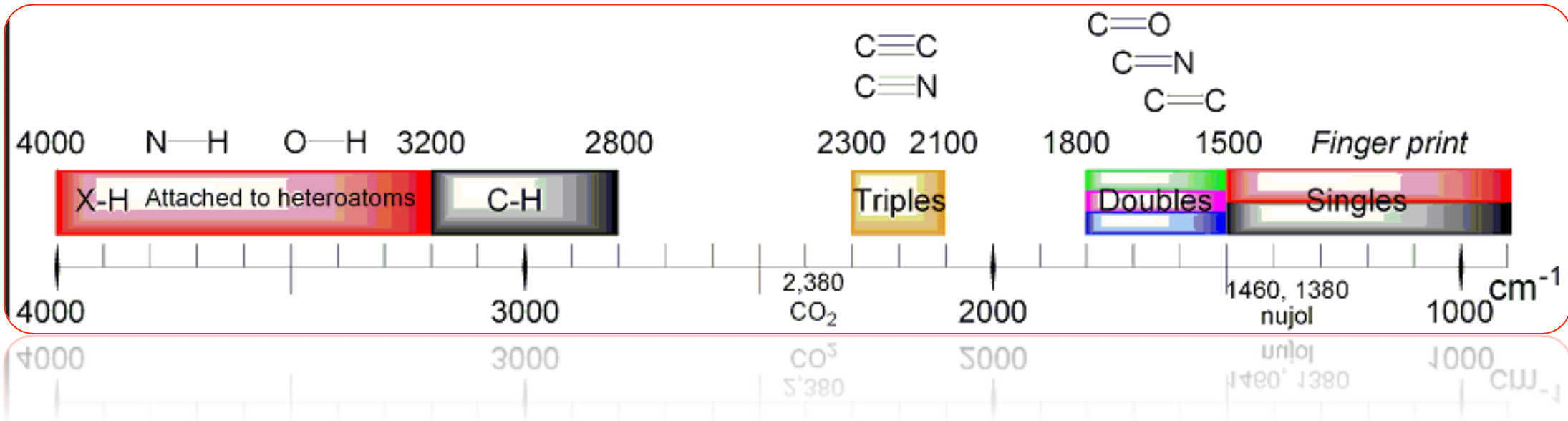
X = Spostamento dalla posizione di equilibrio

$$\nu = 1/2\pi \sqrt{K/\mu}$$

$$\mu = \text{massa ridotta} = m_1 m_2 / (m_1 + m_2)$$

A che energia vibrano le molecole

MAGGIORE È LA COSTANTE DI FORZA/LEGAME K → MAGGIORE È LA FREQUENZA DELLA VIBRAZIONE
 → MAGGIORE L'ENERGIA AD ESSA ASSOCIATA



MAGGIORE È LA MASSA RIDOTTA → MINORE È LA FREQUENZA DELLA VIBRAZIONE
 → MINORE L'ENERGIA AD ESSA ASSOCIATA

L'interazione della radiazione IR con le molecole

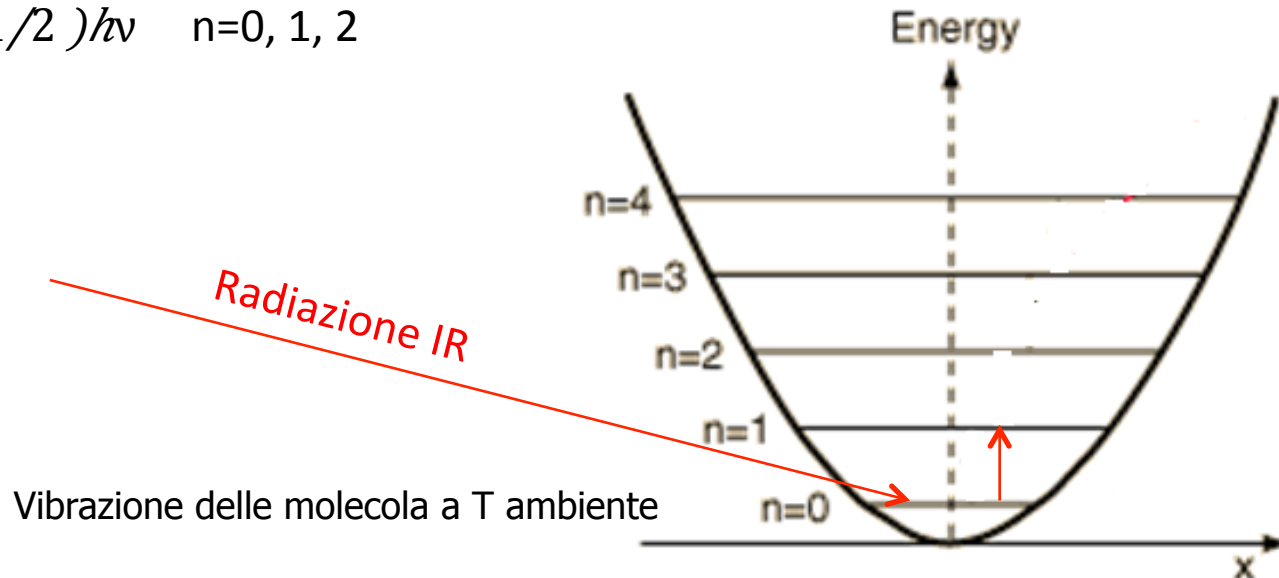
Se un sistema in vibrazione viene investito da una radiazione avente la **frequenza ν numericamente uguale a quella del moto vibrazionale** tale radiazione verrà assorbita e il sistema acquisterà energia e comincerà a vibrare alla stessa frequenza, con maggiore ampiezza.

Il modello classico spring and ball prima presentato non consente di spiegare questo comportmento, ma dobbiamo cercare aiuto nella **fisica quantistica**.

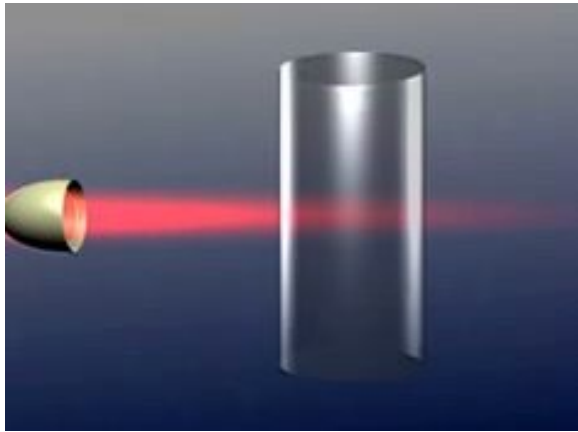


Per una data vibrazione di frequenza ν possono esistere stati vibrazionali a diversa energia

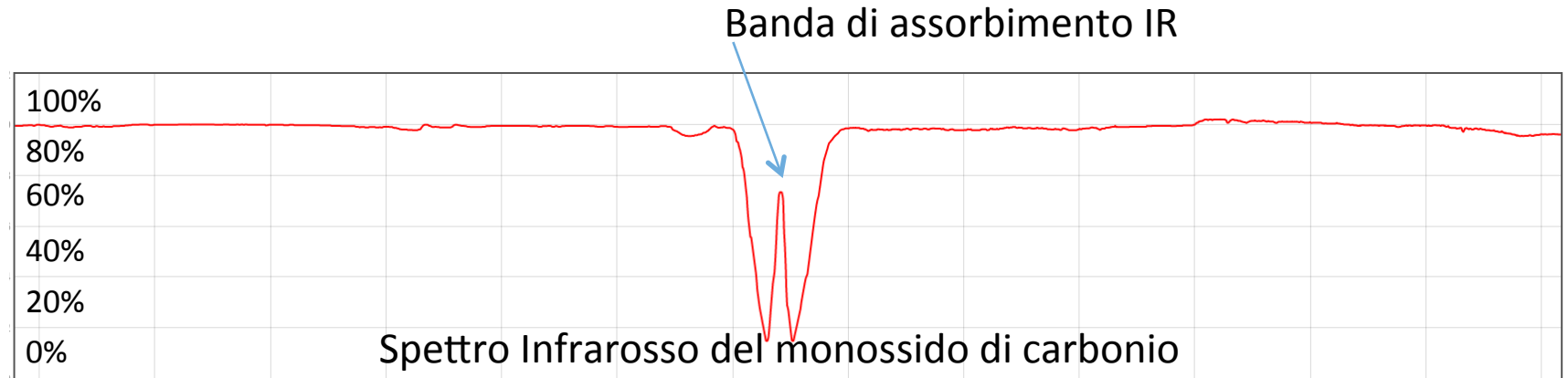
$$E = (n + 1/2) h\nu \quad n=0, 1, 2$$



Lo spettro infrarosso



Percentuale di intensità luminosa trasmessa (Trasmittanza, T)

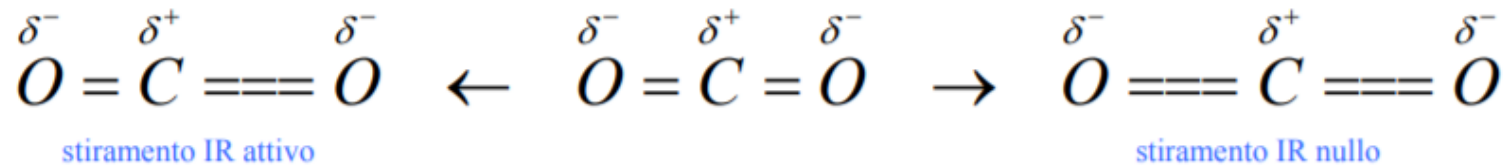


Energia della radiazione assorbita $\equiv$ Energia della vibrazione

La **posizione** della **banda di assorbimento** dipende dal **tipo di molecola** (dagli atomi costituenti attraverso le masse e dalla costante di forza attraverso la forza del legame covalente).

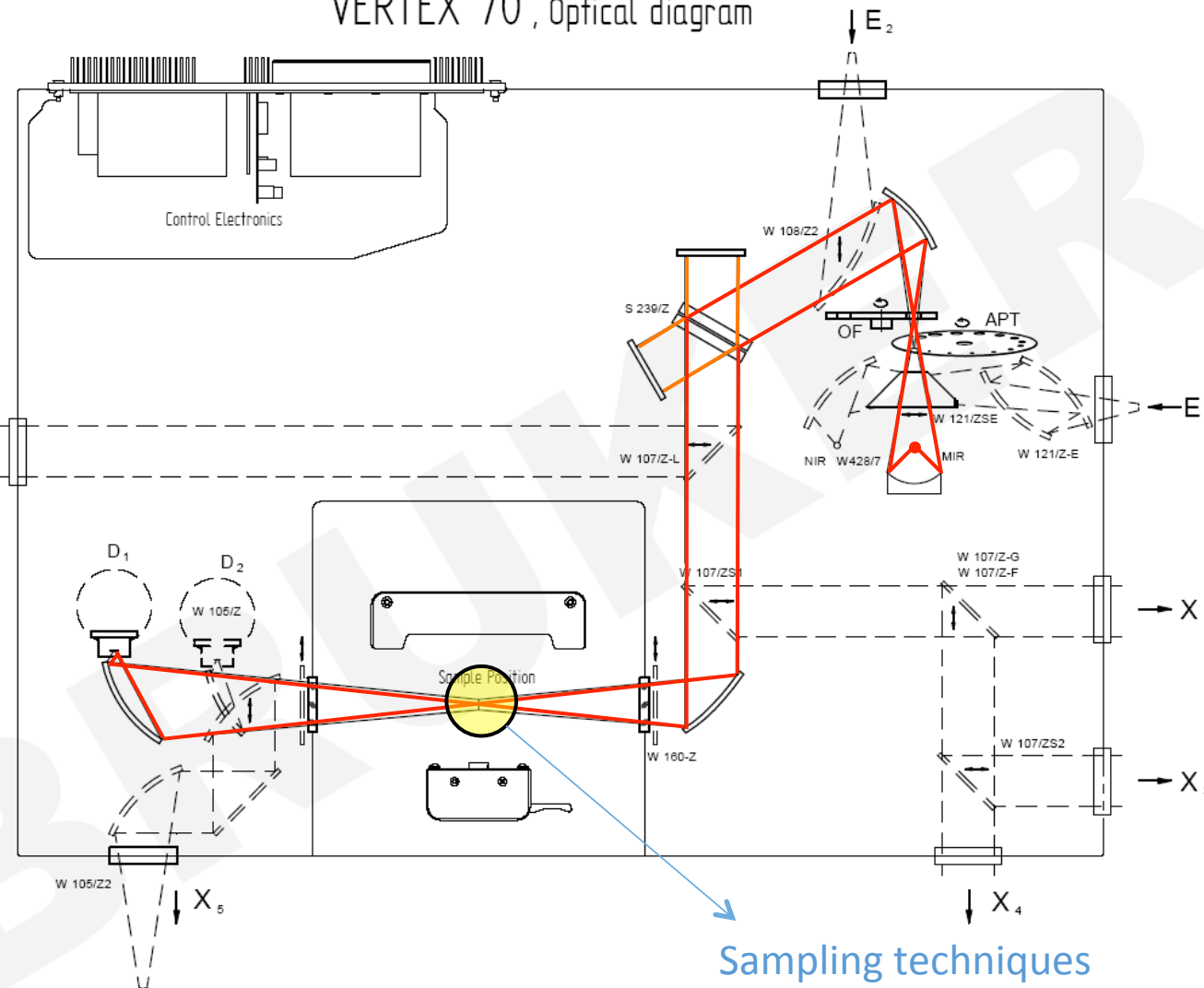
La **percentuale di assorbimento** dipende dalla **concentrazione della molecola**: maggiore la concentrazione di monossido, più intensa sarà la banda.

A parità di concentrazione, le molecole però non assorbono con eguale efficienza la radiazione IR, ma in dipendenza della variazione del **momento dipolare** associato alla vibrazione

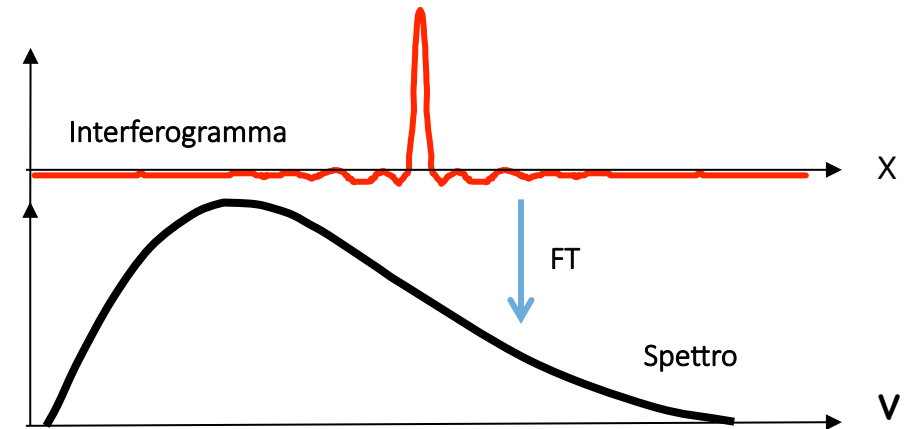
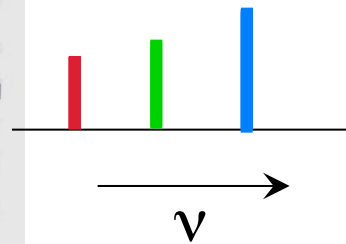
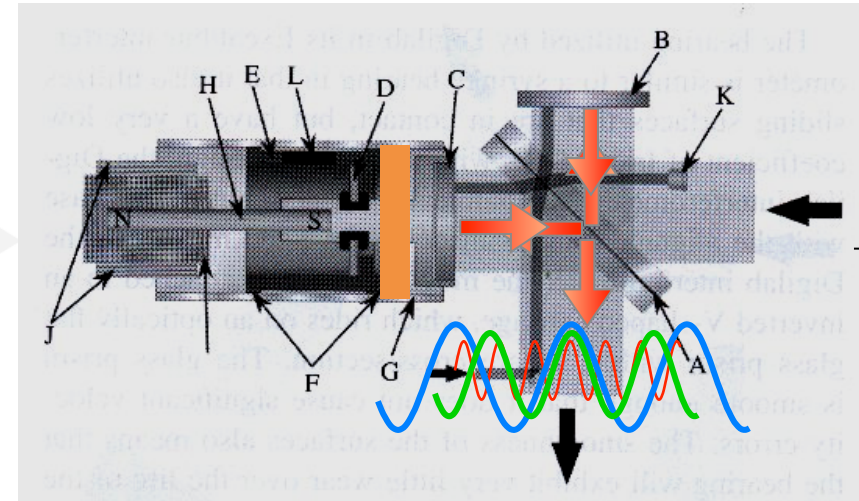


Schema Ottico di uno spettrometro in trasformata di Fourier (FTIR)

VERTEX 70 , Optical diagram

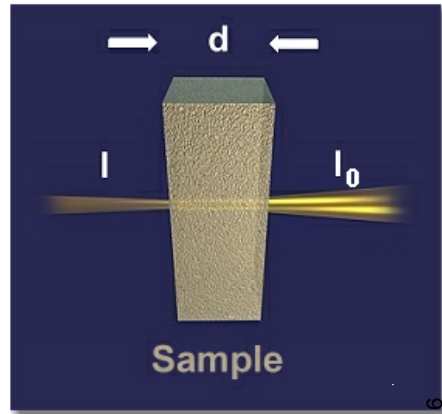


Sampling techniques



Tecniche di campionamento

- TRASMISSIONE



Legge di
Lambert-Beer

$$A = -\log_{10} (I/I_0) = \varepsilon dc$$

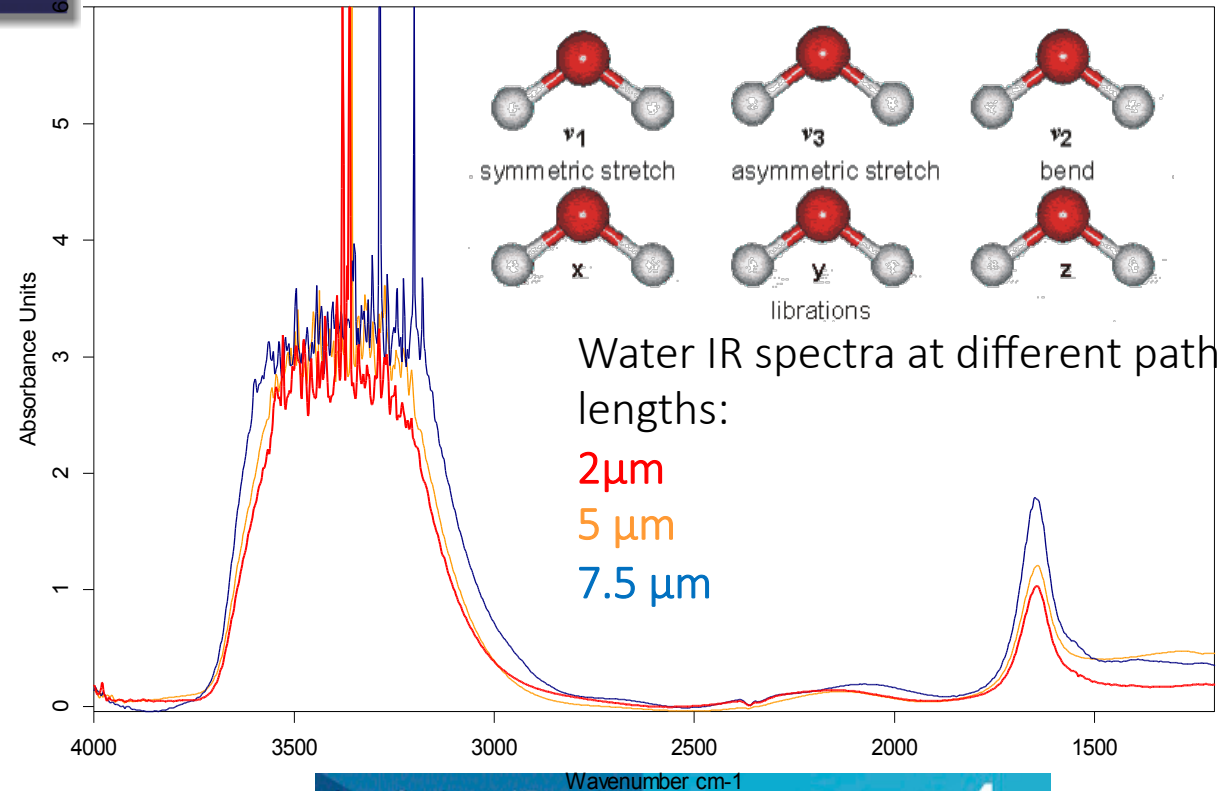
$$[\varepsilon] = L \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}, [c] = \text{mol} \cdot L^{-1}, [d] = \text{cm}$$

ε = coefficiente di estinzione molare

c = concentrazione

d = cammino ottico

Ma se misuriamo molecole in acqua, l'acqua sovrasta il segnale!



La propagazione della luce e la riflessione totale

Il rapporto fra la velocità c della luce nel vuoto e la velocità v della luce nel mezzo si chiama indice di rifrazione del mezzo e si indica con il simbolo n .

indice di rifrazione del mezzo

$$n = \frac{c}{v}$$

velocità della luce nel vuoto $\left(\frac{\text{m}}{\text{s}}\right)$

velocità della luce nel mezzo $\left(\frac{\text{m}}{\text{s}}\right)$

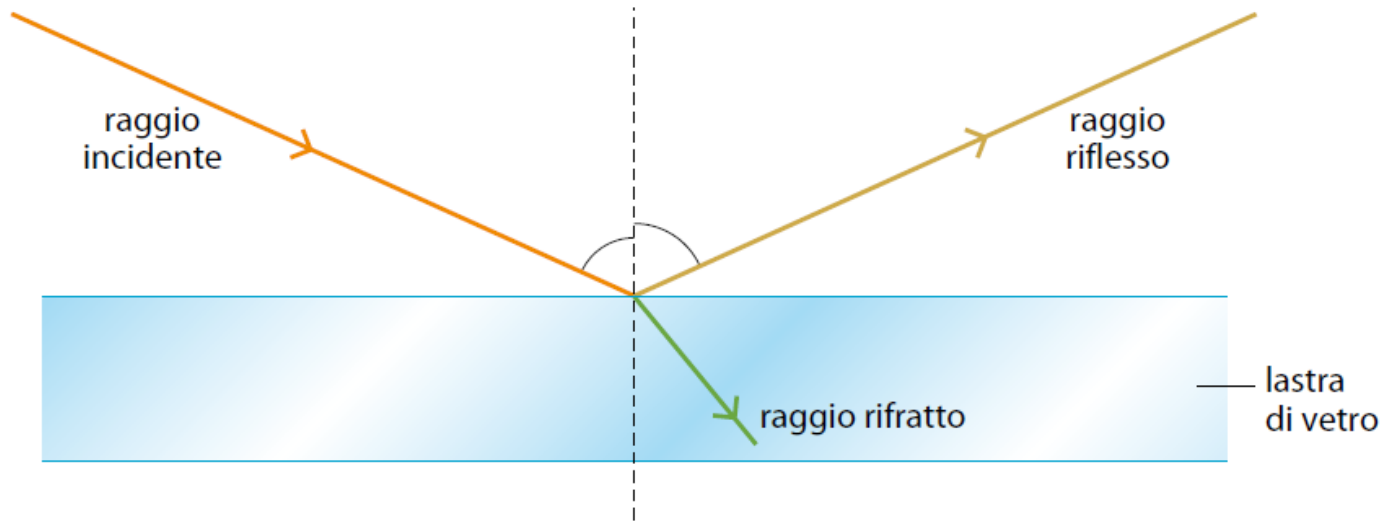
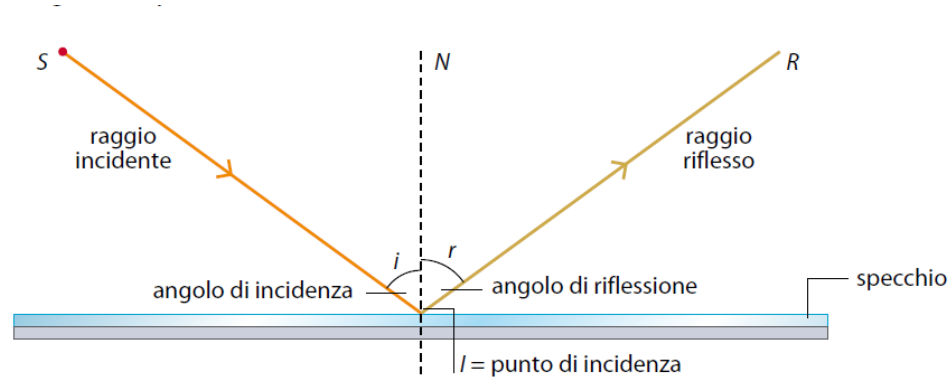


Tabella 1 Indici di rifrazione di alcuni mezzi

Aria	1,00
Acqua	1,33
Glicerina	1,47
Vetro	1,50 ÷ 1,70
Diamante	2,43

Riflessione e Rifrazione

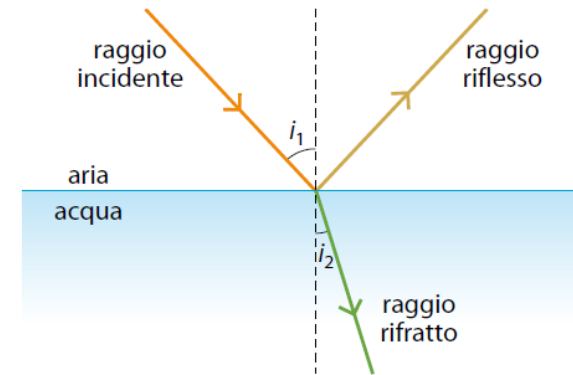


Le due leggi che regolano la riflessione della luce sono state enunciate dal francese René Descartes (1596-1650).

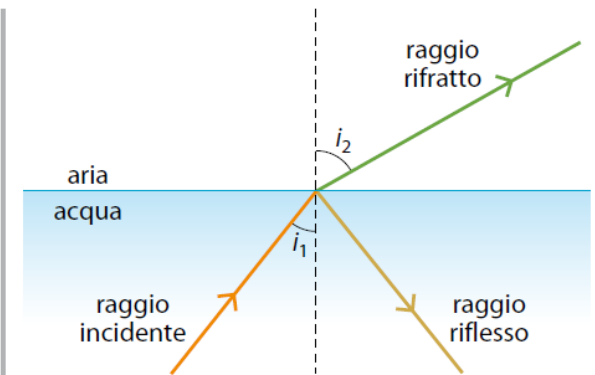
Prima legge della riflessione. Il raggio incidente, il raggio riflesso e la normale nel punto di incidenza sono situati nello stesso piano, detto piano di incidenza.

Seconda legge della riflessione. L'angolo di riflessione è uguale all'angolo di incidenza:

$$i = r$$



a Il raggio di luce che passa da un mezzo meno denso (aria) a uno più denso (acqua) viene deviato e si avvicina alla normale.



b Il raggio che passa dal mezzo più denso (acqua) a uno meno denso (aria) si allontana dalla normale.

Il raggio che penetra nel secondo mezzo si chiama *raggio rifratto*. L'angolo i_2 che il raggio rifratto forma con la normale si chiama *angolo di rifrazione*.

Il raggio incidente, il raggio rifratto e la normale nel punto di incidenza appartengono a uno stesso piano (**prima legge della rifrazione**).

Il rapporto fra il seno dell'angolo di incidenza e il seno dell'angolo di rifrazione è costante.

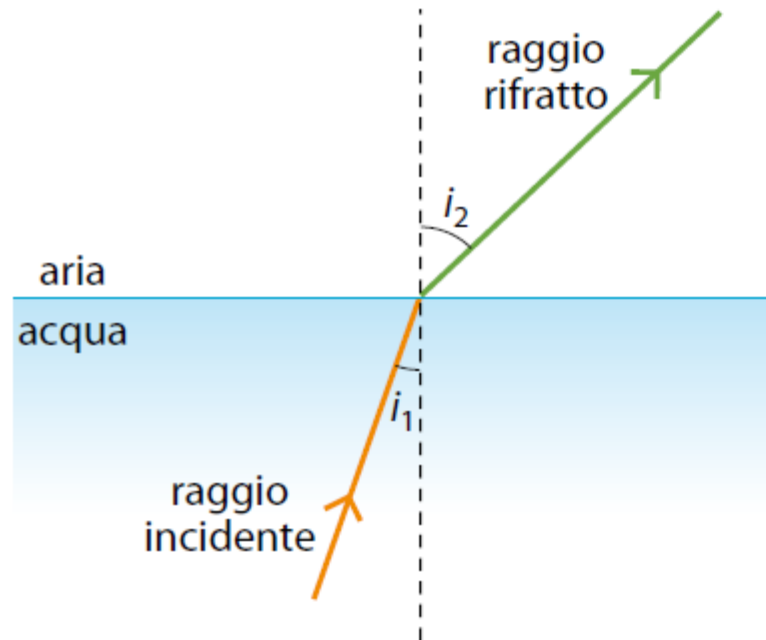
Per via sperimentale si verifica che il valore della costante è uguale al rapporto fra l'indice di rifrazione del secondo mezzo e l'indice di rifrazione del primo mezzo:

$$\frac{\sin i_1}{\sin i_2} = \frac{n_2}{n_1}$$

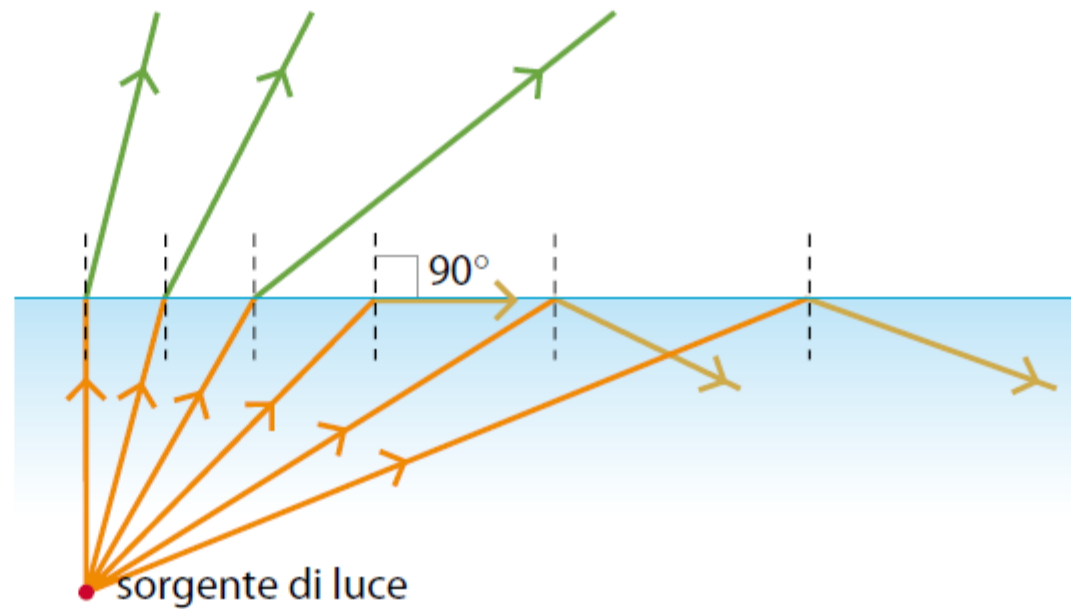
Si può anche scrivere:

$$n_1 \cdot \sin i_1 = n_2 \cdot \sin i_2$$

Riflessione totale



- a** Il raggio incidente proveniente dall'acqua si rifrange nell'aria, allontanandosi dalla normale.



- b** Esiste un angolo di incidenza in corrispondenza del quale il raggio rifratto è parallelo alla superficie dell'acqua.

Quando l'angolo di incidenza supera l'angolo limite si ha il fenomeno della riflessione interna totale

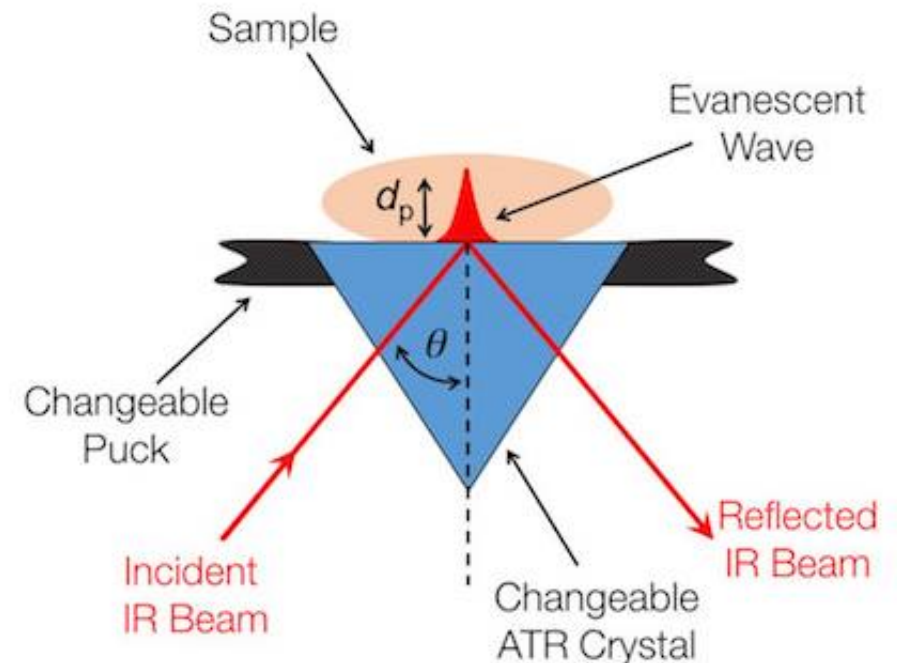
Attenuated Total Reflection (ATR)

La spettroscopia infrarossa ATR si basa sul principio della riflessione totale. Il campione viene appoggiato sopra un cristallo con indice di rifrazione maggiore dell'indice di rifrazione del campione.

L'angolo di incidenza viene modulato di modo da essere superiore all'angolo limite, e pertanto si ha il fenomeno della riflessione interna totale.

Tuttavia, non tutta l'energia del fascio IR viene riflessa, ma una parte si propaga nel campione (campo evanescente) per una distanza piccola (centinaia di nanometri fino al massimo di 1-2 micron), chiamata distanza di penetrazione. Il raggio che viene riflesso porterà quindi con se informazioni sul campione in termini di energia assorbita dallo stesso.

Otterremo quindi uno spettro infrarosso del nostro campione.



Cosa faremo quindi

- Misureremo spettri in modalità FTIR-ATR delle seguenti biomolecole:
 - Bovine Serum Albumine (BSA)
 - Salmon Calf DNA
 - Threalose (Sugar)
- Raccoglieremo prima lo spettro del nostro fondo (aria)
- Raccoglieremo lo spettro del nostro campione
 - Faremo misure ripetute nel tempo per eliminare l'interferenza del solvente
- Guarderemo quindi allo spettro risultante e cercheremo di capire che informazioni esso contiene