

Spettroscopia infrarossa

Utilizzata per studiare i livelli vibrazionali nelle molecole

Energie in gioco: $5000\text{-}200\text{ cm}^{-1}$ (corrispondono a $2000\text{-}50000\text{ nm}$),

Table 7-1
Biologically useful spectroscopic regions

Typical wavelength (cm)	Approximate energy (kcal mole ⁻¹)	Spectroscopic region	Techniques and applications
10^{-11}	3×10^8	γ -Ray	Mössbauer
10^{-8}	3×10^5	X-ray	X-ray diffraction, scattering
10^{-5}	3×10^2	Vacuum UV	Electronic spectra
3×10^{-5}	10^2	Near UV	Electronic spectra
	Carbon-carbon bond energy		
6×10^{-5}	5×10^3	Visible	Electronic spectra
10^{-3}	3×10^0	IR	Vibrational spectra
	<i>RT at ambient temperature</i>		
10^{-2}	3×10^{-1}	Far IR	Vibrational spectra
10^{-1}	3×10^{-2}	Microwave	Rotational spectra
10^0	3×10^{-3}	Microwave	Electron paramagnetic resonance
10	3×10^{-4}	Radio frequency	Nuclear magnetic resonance

Il coefficiente di estinzione è circa di un ordine di grandezza più basso rispetto a quello delle transizioni elettroniche

1

Poiché la radiazione incidente interagisce con il momento di dipolo molecolare si ha un segnale solo nel caso di *molecole asimmetriche*: H_2 , N_2 , Cl_2 non assorbono nell'infrarosso

Una molecola non lineare con n atomi possiede $3n-6$ modi vibrazionali fondamentali corrispondenti ai suoi gradi di libertà interni ($3n-5$ se la molecola è lineare):
Pentano=45 modi, decano=90 modi

Molte vibrazioni sono degeneri (hanno la stessa frequenza).

Bande ulteriori sono presenti come armoniche: $1/2$, $1/3$, $1/4$... della lunghezza d'onda della banda principale.

In generale i modi vibrazionali sono accoppiati in tutta la molecola e per risolverli occorre conoscere i *modi normali*: ovvero gli stati stazionari dell'hamiltoniana vibrazionale della molecola. Essi formano una base utile a descrivere tutti i possibili stati.

2

***Table of characteristic IR bands X-H vibrations
bond wavenumbers (cm⁻¹)***

Hydroxyl O-H 3610-3640
 Amines N-H 3300-3500
 aromatic rings C-H 3000-3100
 Alkenes C-H 3020-3080
 Alkanes C-H 2850-2960
triple bonds 2500-1900
double bonds 1900-1500
deformation/heavy atoms 1500-

3

Oscillatore armonico

$$m\ddot{x} = -kx \quad x(t) = A \sin\left(\sqrt{\frac{k}{m}}t\right) \quad \sqrt{\frac{k}{m}} = 2\pi\nu$$

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k(m_1 + m_2)}{m_1 m_2}} \quad \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k(m_1 + m_2)}{m_1 m_2}}$$

Cost. di forza per legami singoli, doppi, tripli=
 1x(5x10⁵), 2x(5x10⁵), 3x(5x10⁵) dyne cm⁻¹

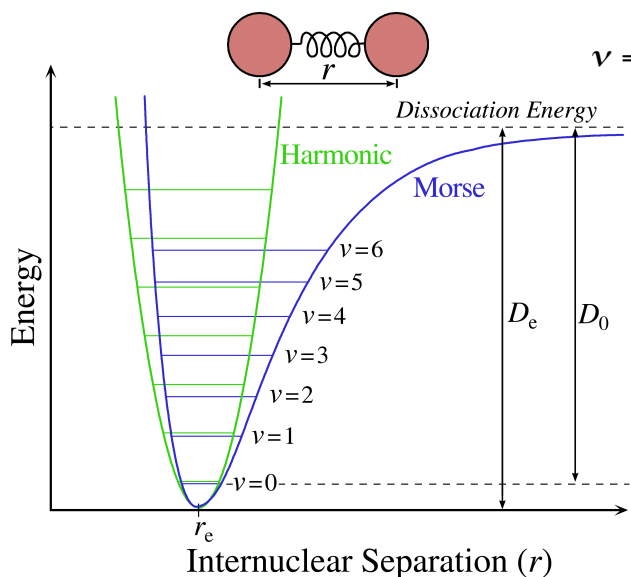
Legame C-H:

$$\frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{6.28 \times 3 \times 10^{10}} \sqrt{\frac{5 \times 10^5 (1.66 + 12 \times 1.66) \times 10^{-24} \text{ g}^2 \text{ sec}^{-1}}{1.66 \times 10^{-24} \times 12 \times 1.66 \times 10^{-24} \text{ g}^2}} =$$

$$= 3032 \text{ cm}^{-1}$$

4

Oscillatore armonico quantistico



$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \Rightarrow E = h\nu = \left(n + \frac{1}{2}\right) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

regole di selezione
 $\Delta n = \pm 1$

livelli energetici equispaziati

$$\Delta E = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

anarmonicita

$$\Delta E \neq \text{cost}$$

$$V(r) = D_e \left(1 - \exp(-a(r - r_e))\right)^2$$

5

Approssimazione di Born-Oppenheimer

Transizione vibrazionale: $\Psi_0(R, r)\phi_v(R) \rightarrow \Psi_0(R, r)\phi_{v'}(R)$

Elemento di matrice che descrive la transizione:
nel caso di *nuclei stazionari* il momento
di dipolo dipende solo dalle coordinate elettroniche

$$\langle \Psi_0 \phi_v | \vec{\mu} | \Psi_0 \phi_{v'} \rangle = \langle \Psi_0 | \vec{\mu} | \Psi_0 \rangle \langle \phi_v | \phi_{v'} \rangle = 0$$

Il momento di dipolo dipende solo dallo stato elettronico

$$\langle \Psi_0 | \vec{\mu} | \Psi_0 \rangle = 0 \quad \text{Perché dispari rispetto a } r$$

$$\langle \phi_v | \phi_{v'} \rangle = 0 \quad \text{Autofunzioni ortonormali}$$

6

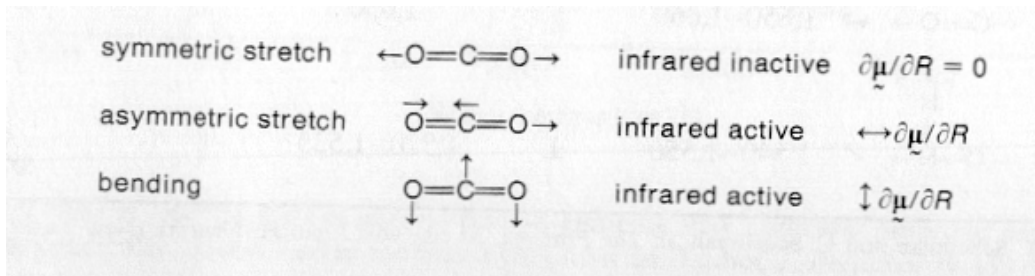
Nuclei oscillanti

$$\bar{\mu}(R, r) = \bar{\mu}(R_0, r) + \left. \frac{\partial \bar{\mu}}{\partial R} \right|_{R_0} (R - R_0) + \dots$$

Distanza di equilibrio tra i nuclei (contributo nullo all'elemento di matrice)

$$\langle \Psi_0 \phi_v | \bar{\mu} | \Psi_0 \phi_{v'} \rangle = \langle \Psi_0 | \left. \frac{\partial \bar{\mu}}{\partial R} \right|_{R_0} | \Psi_0 \rangle \langle \phi_v | (R - R_0) | \phi_{v'} \rangle$$

Influenza di momento di dipolo permanente della molecola



7

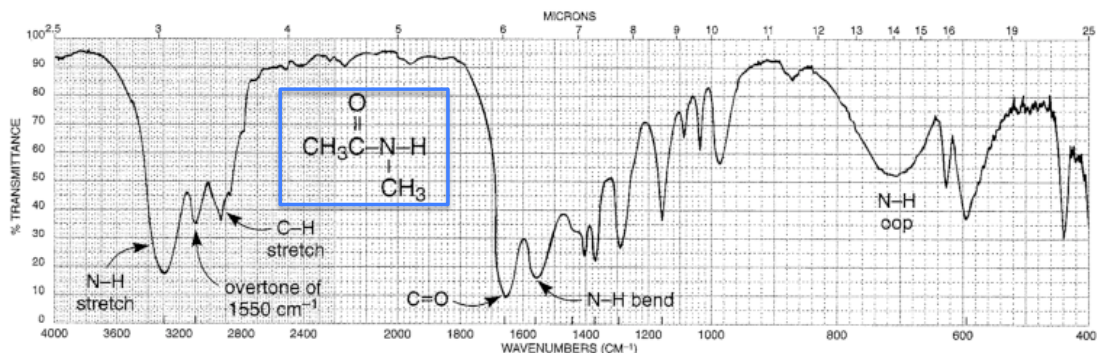
modi normali

N atomi accoppiati da pot. armonici in $3D \rightarrow 3N-6$ modi normali = autofunzioni dell'hamiltoniana armonica

rototraslazione della molecola

la maggior parte dei modi normali e' localizzata su un piccolo gruppo di atomi

esempio: N-methylacetamide: 12 atomi, 30 modi normali



8

Polipeptidi e proteine

Rapporto tra gli stati vibrazionali e le strutture secondarie

Analisi di 3 bande principali:

1. Allungamento N-H, 3300 cm^{-1} , polarizzato lungo N-H
2. Allungamento C=O, $1630\text{--}1660\text{ cm}^{-1}$ (ammide I), polarizzato lungo C=O
3. Deformazione N-H, $1520\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$ (ammide II), polarizzato lungo C-N (legame peptidico). Corrisponde ad una composizione della deformazione di N-H e dell'allungamento di C-N

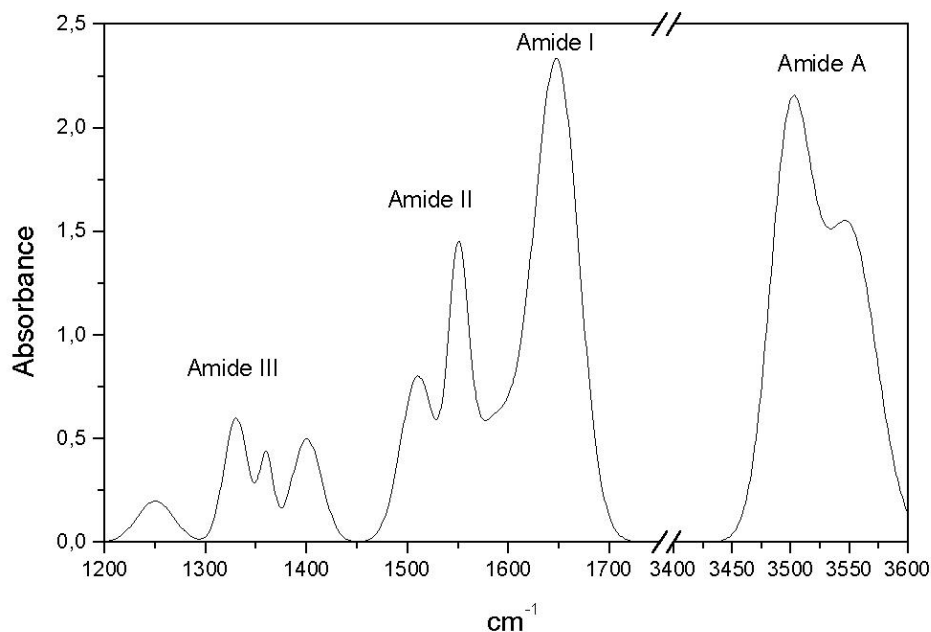
Table 8-5
Characteristics of principal infrared absorption bands of the peptide group

Vibration	$\hat{\mu}/\partial R$	Hydrogen-bonded forms				Non-hydrogen-bonded Frequency (cm^{-1})
		α Helix		β Sheet		
		Frequency (cm^{-1})	Dichroism	Frequency (cm^{-1})	Dichroism	
N—H stretch	$\leftarrow \text{N—H} \rightarrow \leftrightarrow$	3,290–3,300	\parallel	3,280–3,300	\perp	$\sim 3,400$
Amide I (C=O stretch)	$\leftarrow \text{C=O} \rightarrow \leftrightarrow$	1,650–1,660	\parallel	1,630	\perp	1,680–1,700
Amide II	$\begin{array}{c} \uparrow \text{H} \\ \leftarrow \text{C—N} \rightarrow \curvearrowright \\ \downarrow \end{array}$	1,540–1,550	\perp	1,520–1,525	\parallel	$< 1,520?$

SOURCE: Adapted from J. A. Schellman and C. Schellman, in *The Proteins*, 2d ed., vol. 2, ed. H. Neurath (New York: Academic Press, 1962), p. 1.

Ammide I: vibrazione di C=O (70-85%) e vibrazione di C-N (10-20%)

Ammide II: deformazione N-H sul piano (40-60%), vibrazione di C-N (18-40%), e di C-C (10%)



Rapporto tra gli stati vibrazionali e le strutture secondarie: presenza di legami idrogeno particolari.

Analisi di 3 bande principali:

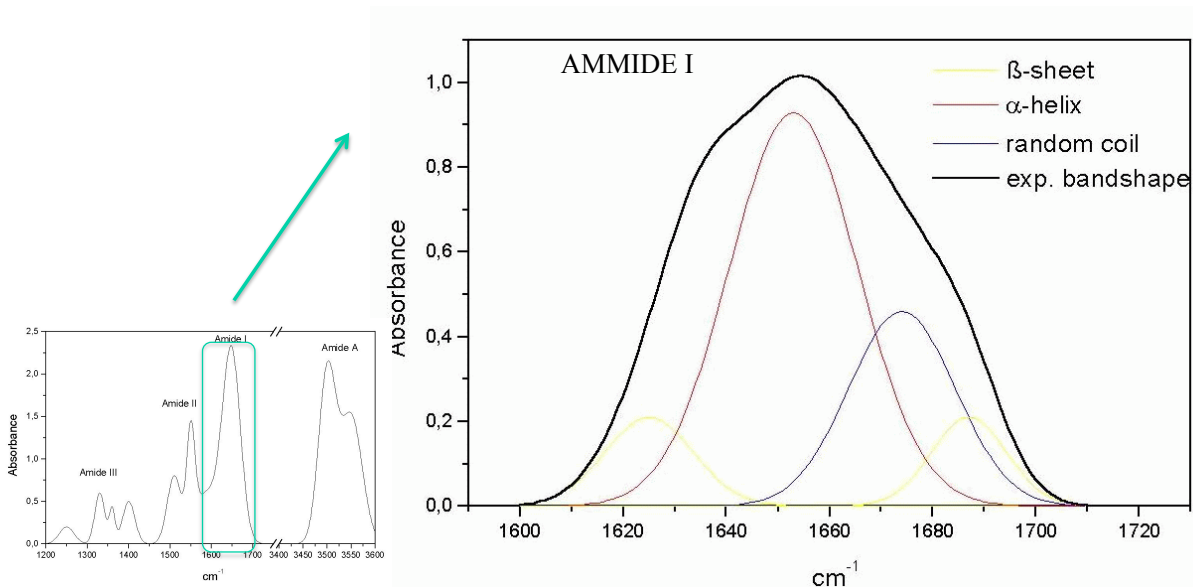
1. Allungamento N-H: l'energia diminuisce in presenza di legami idrogeno
2. Allungamento C=O: l'energia diminuisce in presenza di legami idrogeno
3. Ammide II: l'energia aumenta in presenza di legami idrogeno

La diminuzione nei primi 2 casi dipende da un indebolimento del legame, dovuto alla presenza del **legame idrogeno**.

L'aumento nel terzo caso è dovuto alla **stabilizzazione dell'idrogeno amidico** che non segue le oscillazioni proprie del legame peptidico.

11

Beta antiparallelo: 2 bande maggiori: 1629 cm^{-1} (1620-1635) cm^{-1} e 1696 (1685-...) cm^{-1}
 Beta parallelo: 1 banda maggiore: 1640 cm^{-1}
 Alpha elica: 2 bande maggiori: (1649-1658) 1652 cm^{-1} (ammide I) e 1548 cm^{-1} (ammide II) (1450 cm^{-1} in D_2O).
 Beta turns: (1665-1690) 1680 cm^{-1}

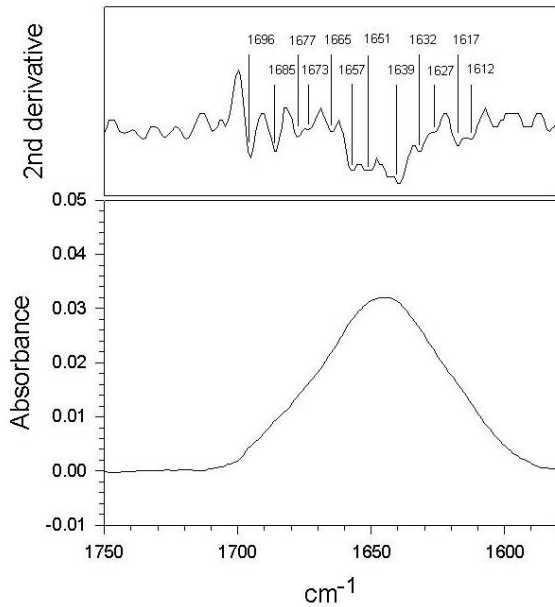


L'area dei picchi da la percentuale di struttura secondaria: assunzione il coefficiente di estinzione è costante per tutti i tipi di ammidie I

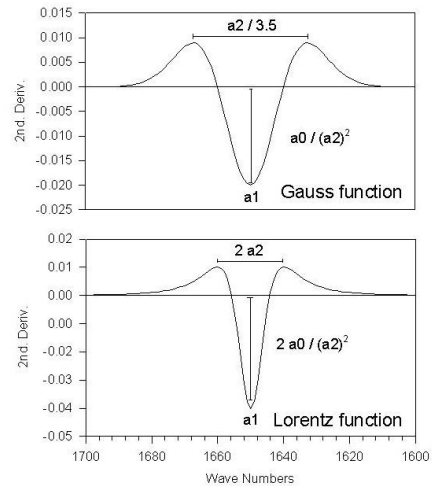
12

La derivata II dello spettro ci permette di individuare i picchi da cui è composto

Lysozyme / ATR
Regione ammido I

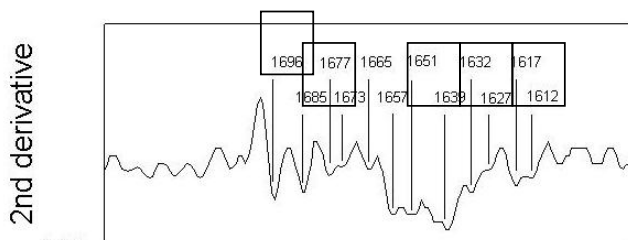


a_1 =posizione del picco
 a_2 =ampiezza del picco
 a_3 =altezza del picco



13

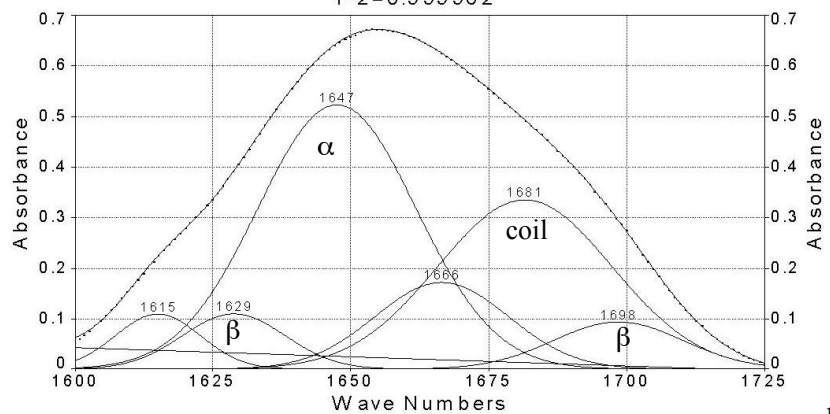
Lysozyme / ATR



Tenendo conto delle fluttuazioni dovute al rumore il numero dei picchi si riduce a 6

	X-ray	FTIR
helix	45	42
beta-sheet	19	16
turn	23	36
random	13	6

Lysozyme
Gauss 6 Peaks
 $r^2=0.999962$



14