

## ANALITIČKA KEMIJA II

- ➔ uvodno predavanje
- ➔ općenito - uzorkovanje; norme i standardi; intelektualno vlasništvo
- ➔ STATISTIKA - osnove
- ➔ EKSTRAKCIJA, KROMATOGRAFIJA - osnove
- ➔ ELEKTROANALITIČKE METODE
- ➔ BOLTZMANNNOVA RAZDIOBA
- ➔ SPEKTROSKOPIJA - osnove; zadaci
- ➔ INSTRUMENTACIJA - osnove; zadaci
- ➔ ATOMSKA SPEKTROSKOPIJA; zadaci
- ➔ MOLEKULSKA SPEKTROSKOPIJA - UV/VIS, fluorescencija
- ➔ IR i Ramanova spektroskopija
- ➔ NMR - uvod
- ➔ NMR - tehnike
- ➔ NMR - seminar
- ➔ **SPEKTROMETRIJA MASA I KROMATOGRAFIJA**

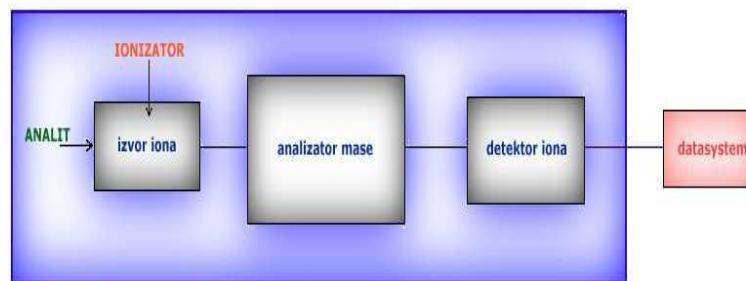
nositelj: prof.dr.sc. P. Novak; šk.g. 2012/13.

## Spektrometrija masa (MS)

P. Novak  
V. Allegretti Živčić, šk. g. 2011/2012.

Primjena spektrometrije masa

- 1) molekulska masa ( $M^+$ ,  $M+1^+$ ,  $M-1^-$ )
- 2) elementna analiza
- 3) izotopni omjeri ( $^{35}\text{Cl}$ ,  $^{37}\text{Cl}$ )
- 4) molekulska formula ( $m/z = 120$ ,  $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4$ ,  $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2$ )
- 5) podaci o strukturi (analiza fragmenata,  $\text{MS}^n$ )

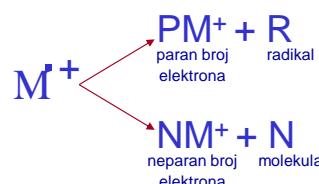


## *Spektrometrija masa (MS)*

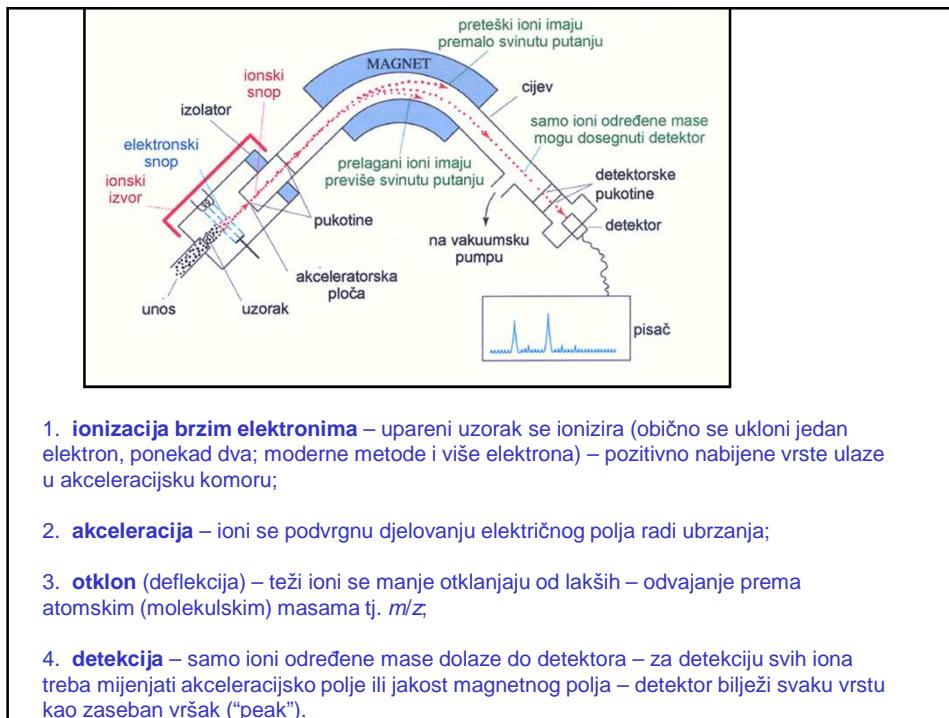
Prvi korak: nastanak molekulskog iona (prekursor ion)



Molekulski ion podliježe fragmentaciji -produktni ioni



Ioni se razdvajaju na temelju njihovih  $m/z$  i detektiraju



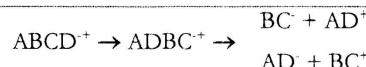
### Tipične reakcije u izvoru s ionizacijom brzim elektronima

#### Tvorba molekulskog iona

##### Fragmentacija

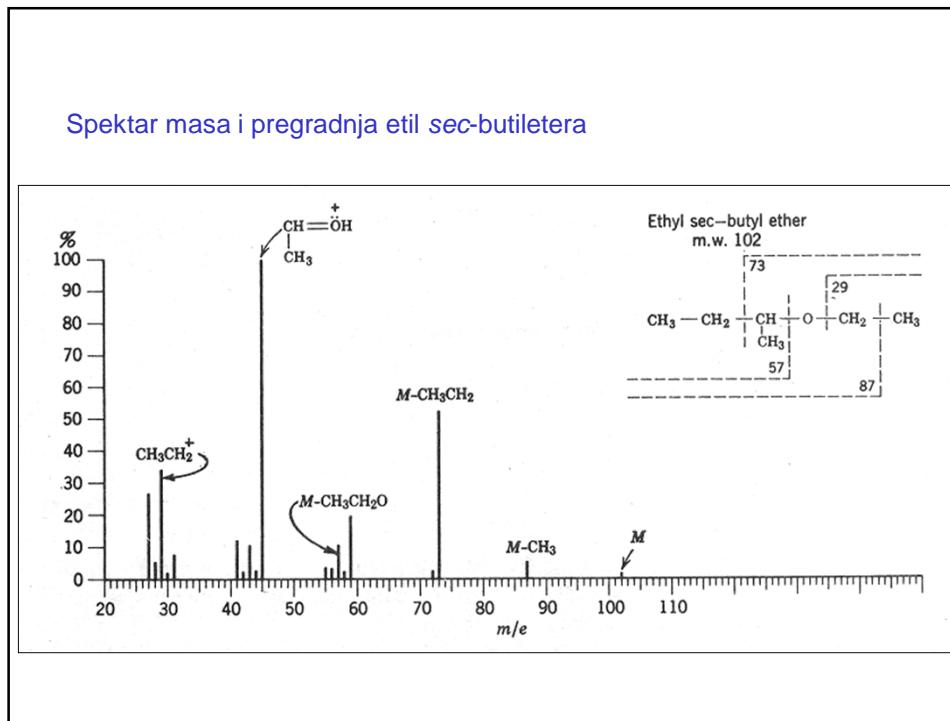
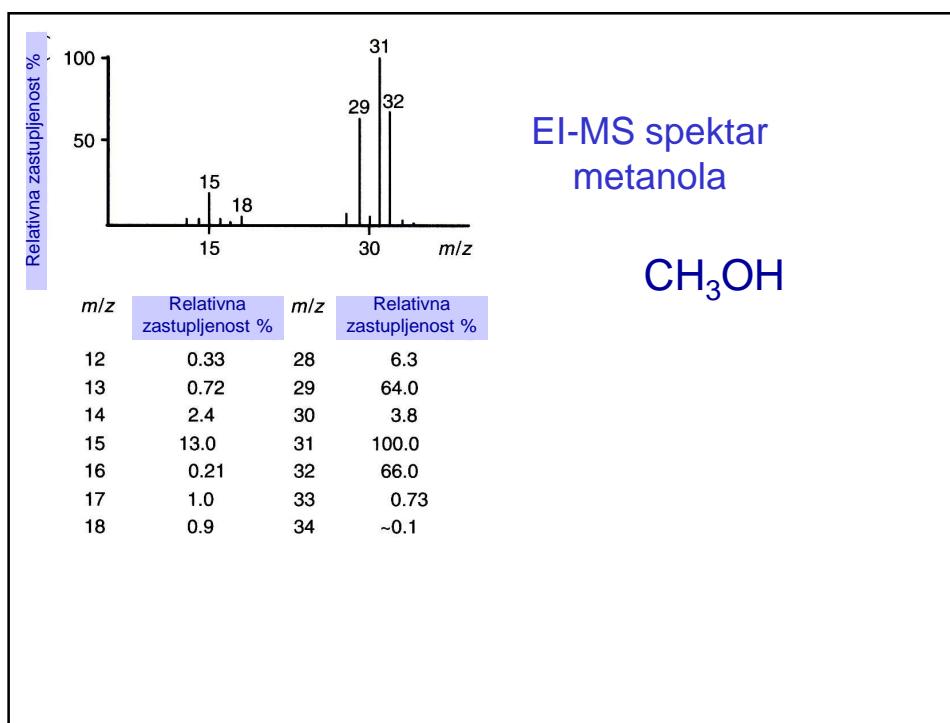


##### Pregradnja i fragmentacija



##### Sudar i fragmentacija





atomska i molekulska masa općenito se izražava u atomskim jedinicama mase, amu ("atomic mass unit") → prema ugljikovom izotopu  $^{12}\text{C}$  kojemu je pripisana masa točno 12 amu

$$\begin{aligned}1 \text{ amu} &= 1 \text{ dalton} = 1 \text{ u} \\&= \frac{1}{12} \left( \frac{12 \text{ g } ^{12}\text{C}/\text{mol } ^{12}\text{C}}{6,0221 \times 10^{-23} \text{ atoma } ^{12}\text{C}/\text{mol } ^{12}\text{C}} \right) \\&= 1,66054 \times 10^{-24} \text{ g/atom } ^{12}\text{C} \\&= 1,66054 \times 10^{-27} \text{ kg/atom } ^{12}\text{C}\end{aligned}$$

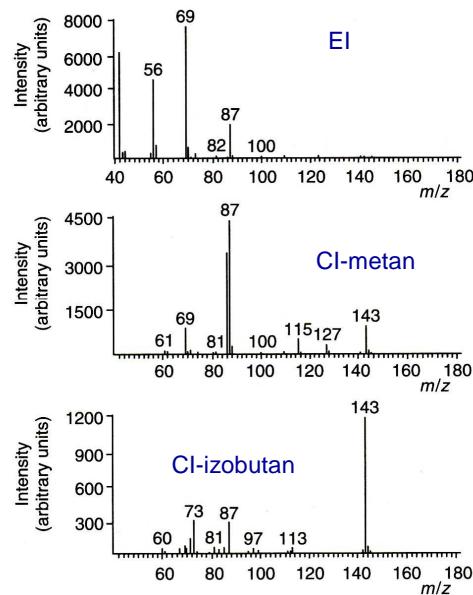
- MS ne mjeri masu, nego m/z!
- Atomic mass unit = Dalton = 1/12  $^{12}\text{C}$ -mase izotopa nisu cijelobrojne vrijednosti!
- Molekulski ion daje masu molekule s isključivo najzastupljenijim izotopima (Formula Mass) - masu molekule dobivamo izračunavanjem po zastupljenosti

## Tehnike ionizacije

- Ionizacija elektronima, "Electron ionization" (EI)
- Kemijska ionizacija (CI)
- FAB (Fast atom bombardment)
- MALDI (Matrix assisted laser desorption/ionisation)
- Termoraspšenje (TS-Thermospray)
- Ionizacija pri atmosferskom tlaku (API-Atmospheric pressure ionisation):
  - Elektroraspšenje (ESI-Electrospray)
  - APCI (Atmospheric pressure chemical ionisation )
- Ionizacija poljem, FI
- Desorpcija poljem, FD

## Ionizacija brzim elektronima (EI)

- Ionizacija u plinskoj fazi za lakohlapljive i tremostabilne molekule
- Velika fragmentacija - molekulski ion se često ne vidi u spektru
- $E \approx 20 - 70 \text{ eV}$



## Kemijska ionizacija (CI)

- Manje energije nego EI - manja fragmentacija - prisutan molekulski ion u spektru
- Sudari molekule s ionima
- Najčešće se koriste metan, izobutan, amonijak koji se prvo ioniziraju EI
- Najčešće nastaje  $\text{MH}^+$  molekulski ion



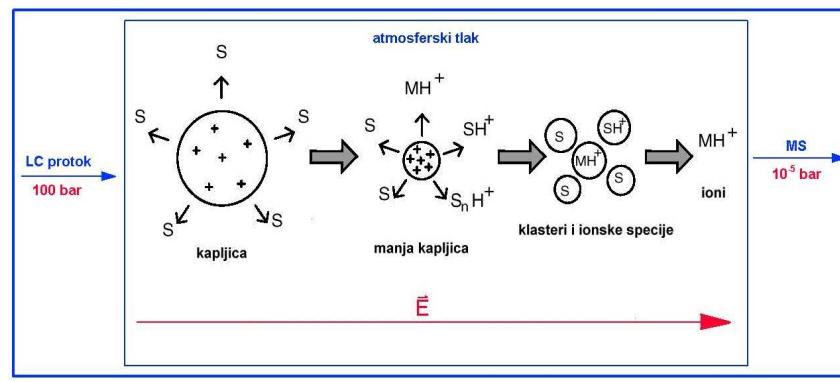
## MALDI

(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization)

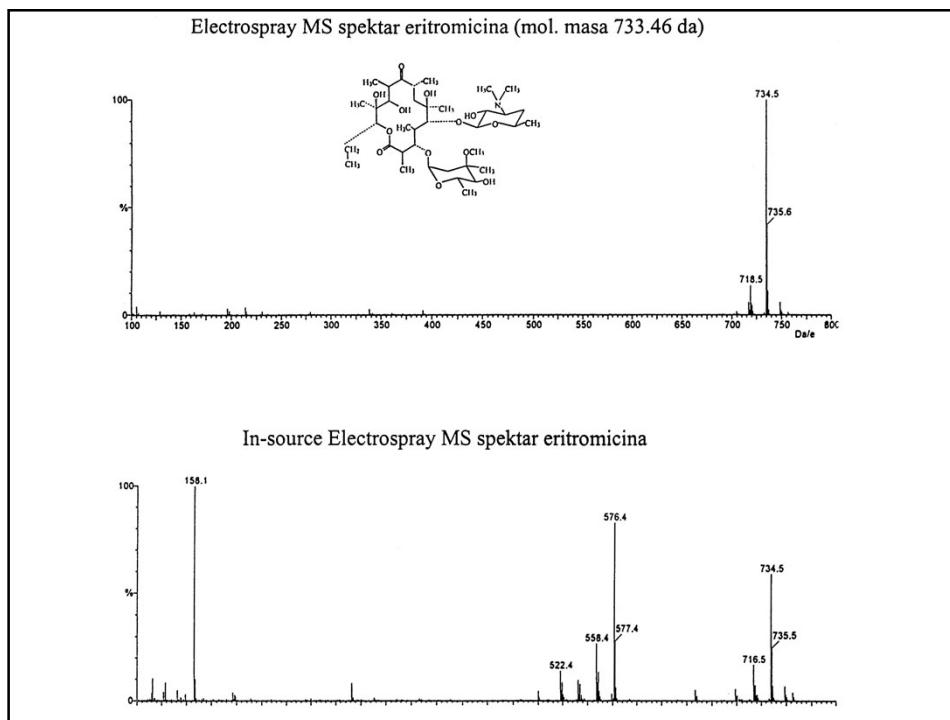
- a) Uzorak se pomješa s matricom (otopina organske molekule)
  - Sušenje smjese
  - Nastaje “solid solution” (čvrsta otopina)
- b) Kratki laserski puls jakog intenziteta
  - Brzo zagrijavanje kristala matrice
  - Prelazak u plinovito stanje
  - ionizacija

## Ionizacija elektroraspršenjem

- jedna od najblažih tehnika ionizacije
- proces desolvatacije iona ("evaporacija iona")
  - eluat je raspršen u sičušne kapljice u električnom polju; površinska distribucija iona kod određenih dimenzija kapljica postaje prevelika i zbog elektrostatske repulzije ioni su "izbačeni" s površine kapljice



- fragmentaciju je moguće postići tako da se molekulama malo poveća kinetička energija na njihovom putu kroz izvor iona - fragmentacija je tada posljedica sudara među molekulama (tzv. in-source collision induced dissociation, CID)
- fragmentacija je ograničena na najlabilnije veze



## Kemijska ionizacija pod atmosferskim tlakom (APCI)

- tehnika "meke" ionizacije
- zagrijavanjem molekule prelaze u plinovitu fazu ("flash evaporation"), gdje se odvija proces kemijske ionizacije pod utjecajem molekula otapala
- uvjet: spoj mora biti hlapljiv
- $(M+H)^+$  i  $(M-H)^-$  kvazimolekulski ioni, ali i čitav niz adukata sa molekulama otapala

## Usporedba ESI i APCI

### ESI

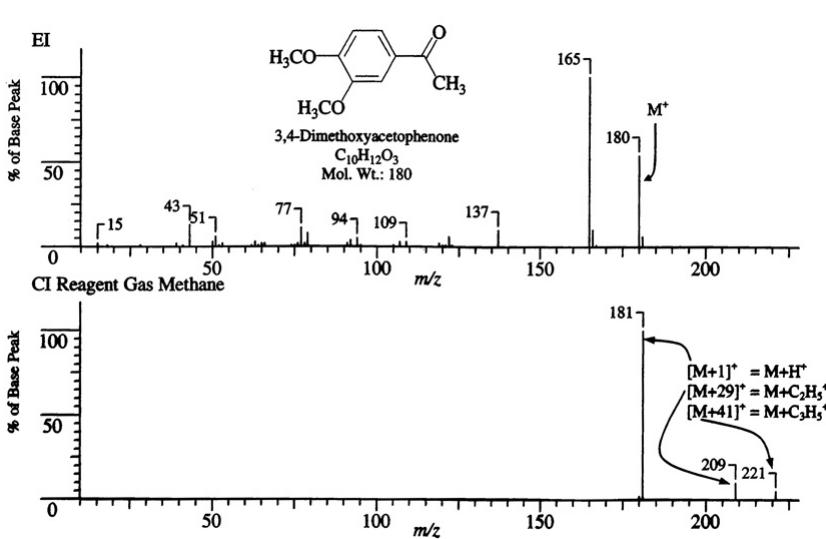
- za polarne organske molekule i (bio)makromolekule koje postoje ionizirane u otopini

### APCI

- za molekule manje molekulske mase koje su manje polarne, hlapljive i mogu formirati ione u plinovitoj fazi

- manji protoci
- usko područje linearног odziva detektora
- osjetljivost značajno ovisi o pH i ionskoj jakosti, tj. koncentraciji elektrolita u mobilnoj fazi

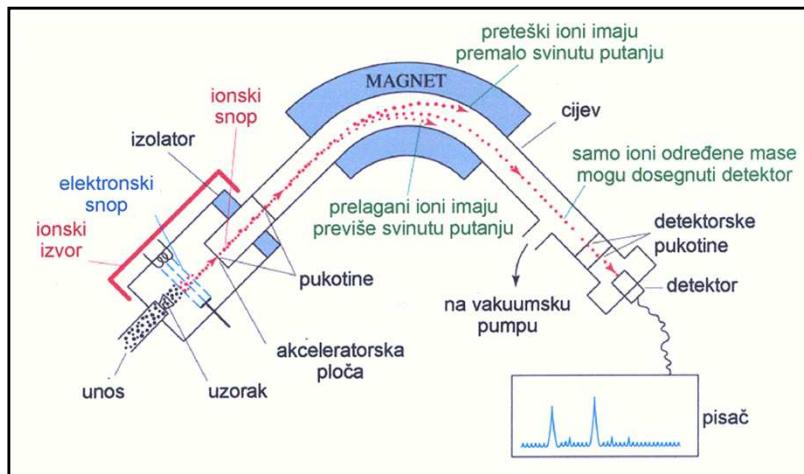
- stabilnost analita na povišenim temp
- limit od ~1000 Da (hlapljivost)



## Analizatori mase

- Analizatori s magnetnim sektorom
- Kvadrupolni analizatori mase
- Kvadrupolna "stupica za ione"
- Analizatori vremena leta
- Fourier transformirana MS "stupica za ione"

### Magnetski sektor



- Velika rezolucija, mase do 10000 da (s ESI i više)

## Magnetni sektor

$$E_K = zeV = \frac{1}{2}mv^2 \quad \left\{ \begin{array}{l} E_K = \text{kinetička energija iona} \\ m = \text{masa iona} \\ z = \text{nabojni broj} \\ V = \text{napon između ulazne i izlazne pukotine} \\ v = \text{brzina iona poslije ubrzavanja} \\ e = \text{naboj iona } (e = 1,60 \times 10^{-19} \text{ C}) \end{array} \right.$$

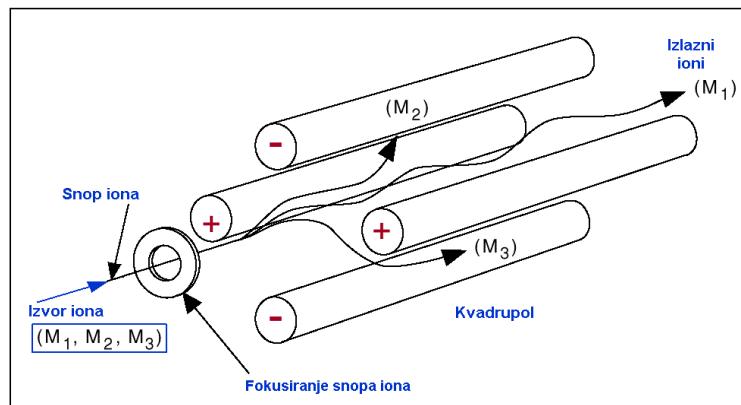
$$\left. \begin{array}{l} F_M = \text{Lorentzova (magnetna) sila} \\ B = \text{jakost magnetnog polja} \end{array} \right\} F_M = Bzev$$

$$F_C = \frac{mv^2}{r} \quad \left\{ \begin{array}{l} F_C = \text{centripetalna sila (ravnotežna)} \\ r = \text{polumjer zakrivljenja magnetnog sektora} \end{array} \right.$$

Da bi ion prošao do detektora:  $F_M = F_C$   
..... preuređenje za  $v = \dots$ , uvrštavanje  $v$  u  $E_K$ ....., konačan izraz:

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

## Kvadrupolni analizator mase



## Kvadrupolni analizator mase

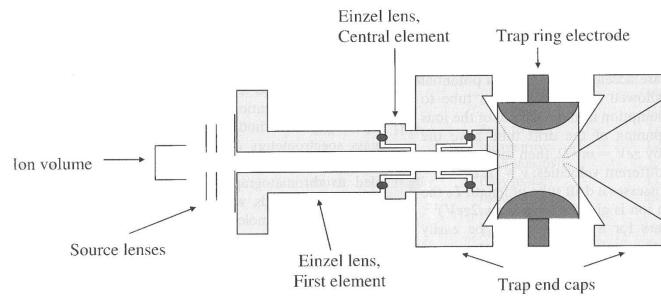
- Primjenom RF i DC električnog polja duž zajedničke osi šipki kvadrupola moguće je filtrirati ione ovisno o vrijednosti omjera mase i naboja iona ( $m/z$ )
- kvadrupol je “filter” mase, jer za određenu vrijednost električnog polja propušta ione samo jedne vrijednosti  $m/z$

## Kvadrupolni analizator mase

- kontinuiranom promjenom RF električnog polja moguće je motriti željeni raspon masa
- kvadrupol je posebno pogodan za spregnute tehnike zbog brzine skeniranja koju je njime moguće postići
- glavni nedostatak kvadrupola je manja rezolucija nego kod ostalih vrsta analizatora

## Kvadrupolna stupica za ione (ion trap)

- Izvedba slična kvadrupolu
- Bolja osjetljivost, dobra rezolucija, mogućnost  $MS^n$
- najčešće 3 elektrode: centralna prstenasta elektroda (rf) i dvije "end cap" elektrode



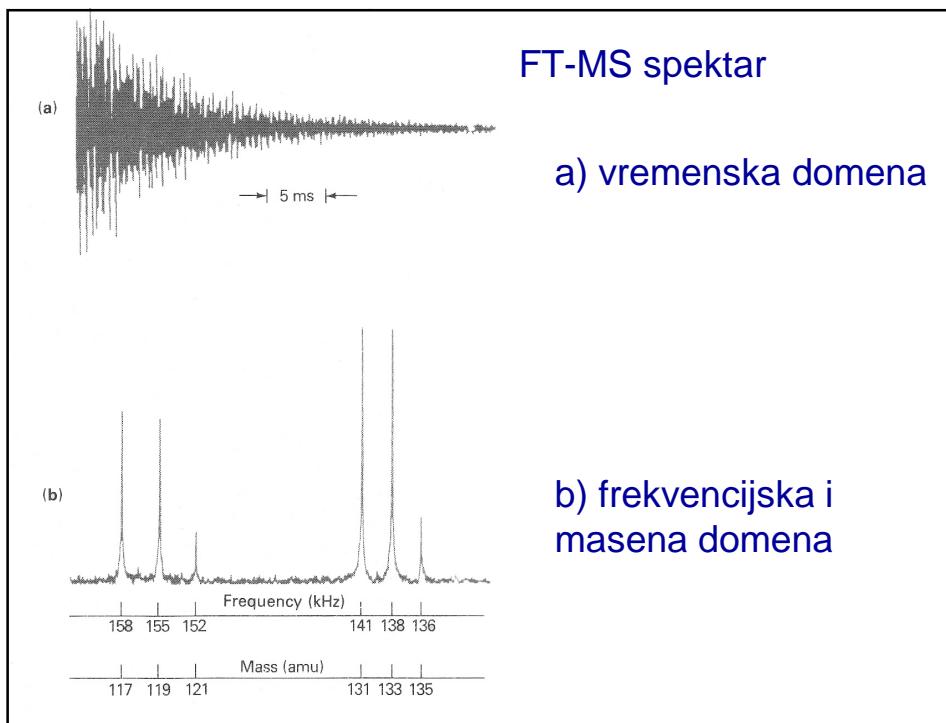
- Ioni su uhvaćeni, izbačeni iz stupice i detektirani-Spektar mase

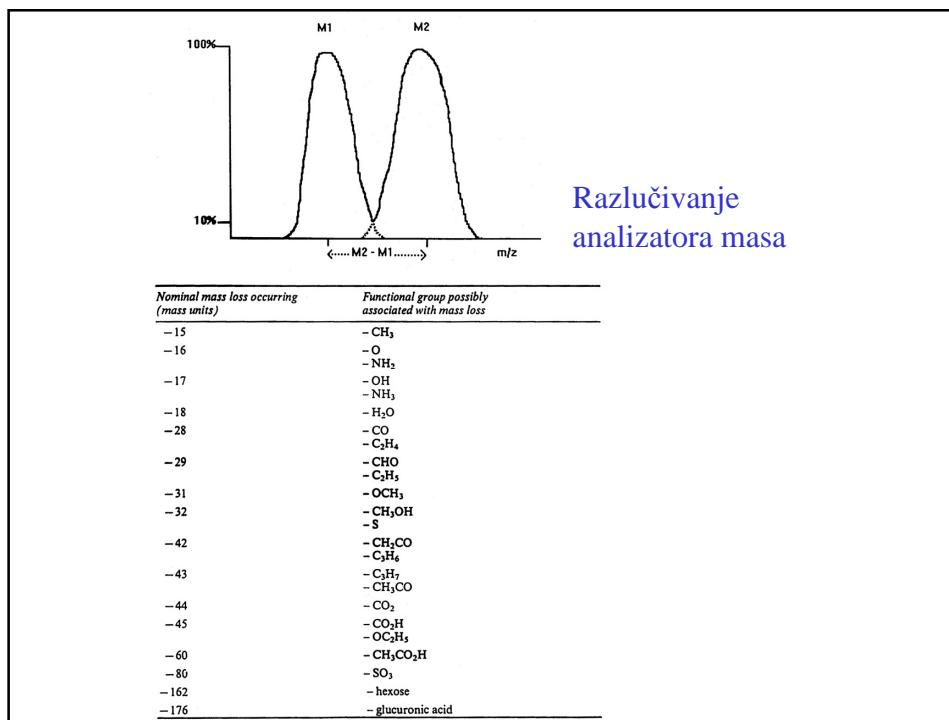
## Analizator vremena leta (Time Of Flight- TOF)

- Ioni se ubrzavaju električnim pulsevima od  $10^3$ - $10^4$  V
- Ubrzani ioni prolaze kroz cijev bez utjecaja magnetnog polja
- Iste kinetičke energije ali različite mase iona
- Lakši ioni putuju brže do detektora
- Odvajanje iona ovisi o vremenu leta (1-30  $\mu$ s)
- Slaba rezolucija, velike mase

## Fourier transformirana MS “stupica za ione”

- Ionska stupica
- Ionska ciklotronska rezonancija
- Ioni uhvaćeni u kružno gibanje u magnetskom polju
- Pobuda jakim rf pulsom (frekvencije jednake ciklotronskoj)
- Nastaje signal u vremenskoj domeni
- Fourierova transformacija  $\Rightarrow$  spektar mase
 
$$\omega_c = v/r = zeB/m$$
- Visoka osjetljivost i rezolucija, velike mase





### Razlučivanje

$$R = m / \Delta m$$

$\Delta m$  = razlika masa dva susjedna vrška koji su upravo razlučeni

$m$  = nominalna masa prvog vrška (ili srednja masa dva susjedna upravo razlučena pika)

smatra se da su dva pika razlučena ako visina udoline između vršaka nije veća od nekoliko postotaka njihove visine (često 10%)

primjeri:

- spektrometar razlučivanja 4000 razlučuje pikove vrijednosti  $m/z$  400,0 i 400,1 (ili 40,0 i 40,01)
- razlikovanje iona iste nominalne mase kao što su  $C_2H_4^+$ ,  $CH_2N^+$ ,  $N_2^+$ ,  $CO^+$  (nominalna masa 28 daltona; točne mase 28,0313, 28,0187, 28,0061 odnosno 27,9949 daltona) zahtijeva razlučivanje od nekoliko tisuća
- ioni niskih molekulskih masa koji se razlikuju za 1 ili više, npr.  $NH_3^+$  ( $m = 17$ ) i  $CH_4^+$  ( $m = 16$ ) mogu se razlučiti uz razlučivanje manje od 50

## Dušikovo pravilo

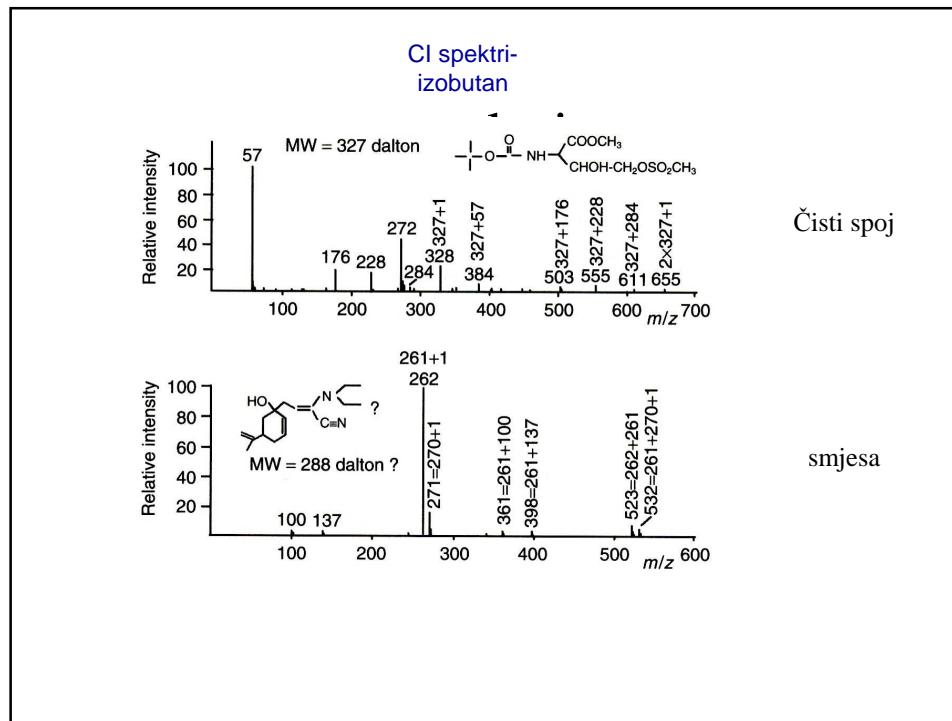
- Ako je molekulska masa paran broj, to upućuje na paran broj dušikovih atoma u strukturi.
- Ako je molekulska masa neparan broj, to upućuje na neparan broj dušikovih atoma u strukturi.  
(Vrijedi za organske molekule do  $M_r \sim 1000$  Da)

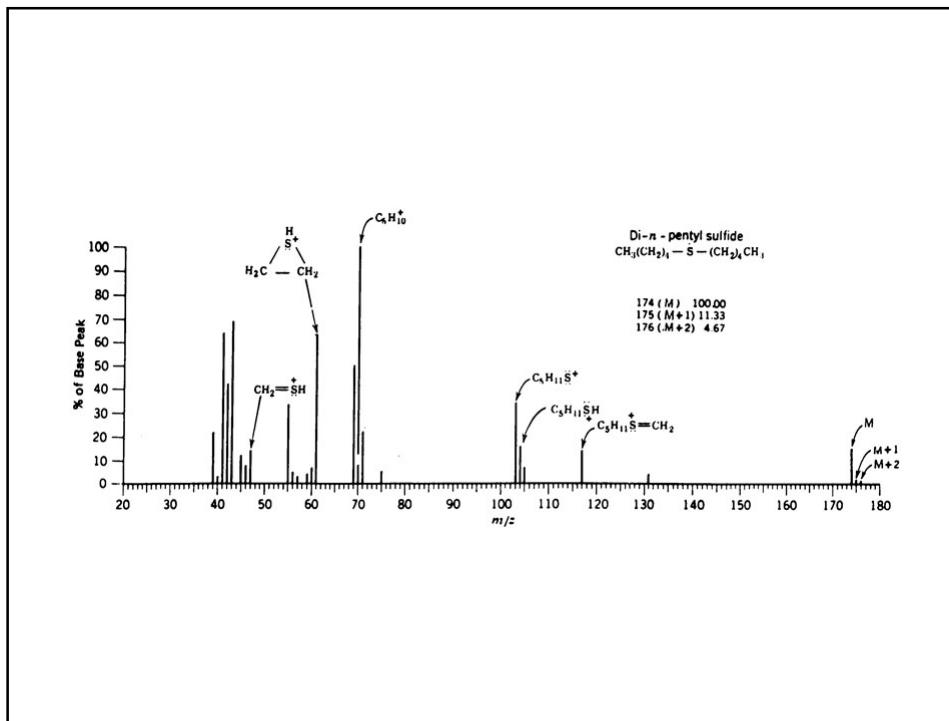
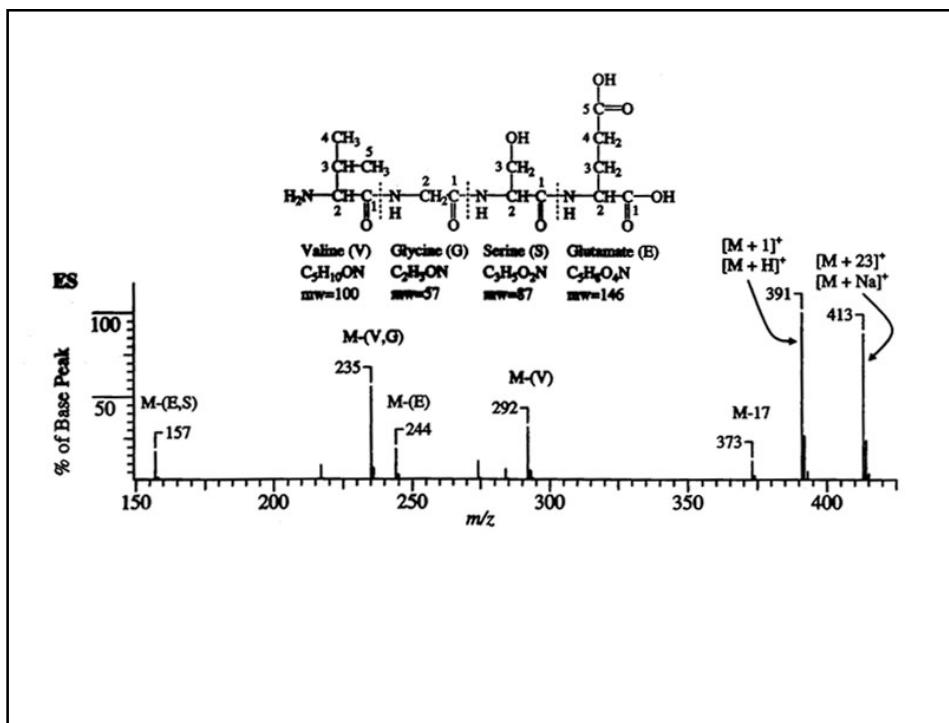
## SPEKTRI MASA

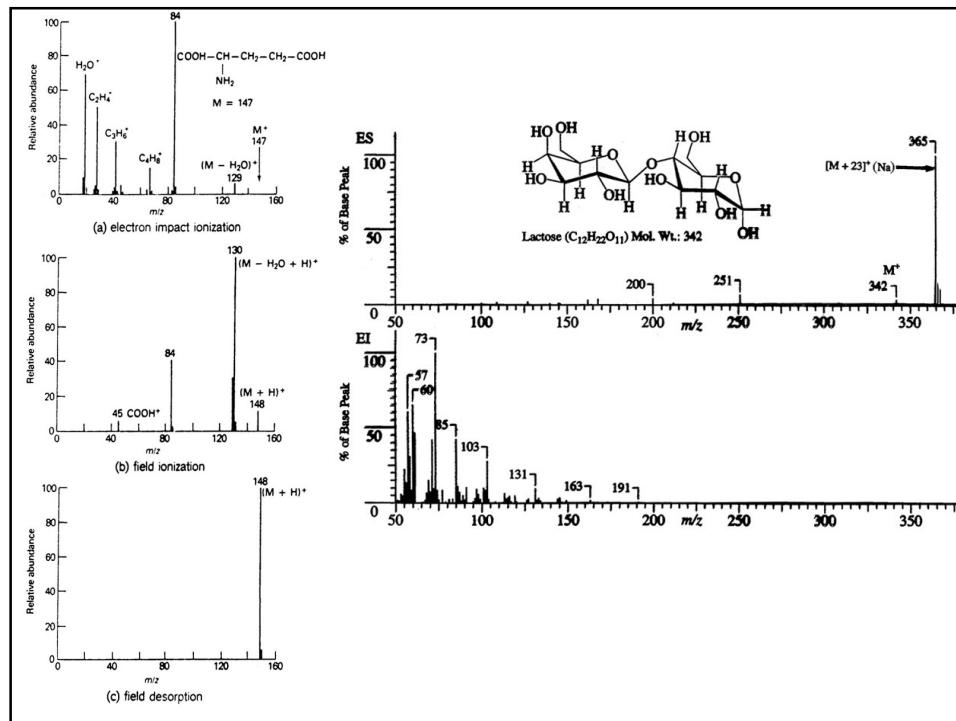
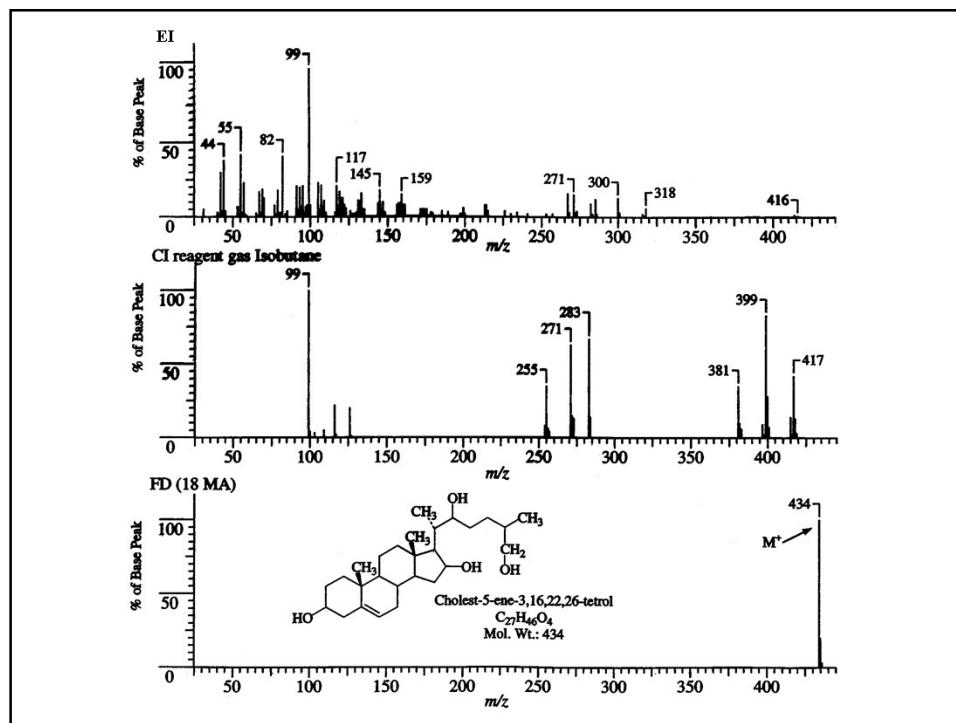
Ionske serije – indikator tipa strukture

- alkilna:  $15 + (14)n$  ( $m/z$  29, 43, 57, 71...) zasićeni alifatski ugljikovodici, ketoni, aldehidi
- alkenilna:  $13 + (14)n$  ( $m/z$  27, 41, 55, 69...) alkeni, cikloalkani, cikloalkanoni
- aromatska:  
 $(m/z$  39,  $51 \pm 1$ ,  $64 \pm 1,78 \pm 1$ )
- kisikova: ( $m/z$  31, 45, 59, 73)
- dušikova: ( $m/z$  30, 44, 58, 72)

element	Najzastupljeniji izotop	Drugi izotop	zastupljenost
Vodik	$^1\text{H}$	$^2\text{H}$	0.015
Ugljik	$^{12}\text{C}$	$^{13}\text{C}$	1.08
Dušik	$^{14}\text{N}$	$^{15}\text{N}$	0.37
Kisik	$^{16}\text{O}$	$^{17}\text{O}$ $^{18}\text{O}$	0.04 0.20
Sumpor	$^{32}\text{S}$	$^{33}\text{S}$ $^{34}\text{S}$	0.8 4.4
Klor	$^{35}\text{Cl}$	$^{37}\text{Cl}$	32.5
Brom	$^{79}\text{Br}$	$^{81}\text{Br}$	98.0
silicij	$^{28}\text{Si}$	$^{29}\text{Si}$ $^{30}\text{Si}$	5.1 3.4







Vrste ionizacijskih metoda i njihova kompatibilnost sa različitim tipovima masenih spektrometara			
<i>Ionization method</i>	<i>Principal ions detected (+/-)<sup>a</sup></i>	<i>Mass spectrometer<sup>b</sup></i>	<i>Sample classes (approx. MW limit)</i>
electron impact EI	M <sup>+</sup> * and some fragment ions	M, Q	non-polar and some polar organic compounds, ≤ ca. 1000 da
chemical ionization CI	MH <sup>+</sup> M <sup>-</sup> , (M-H) <sup>-</sup> , M <sup>•-</sup>	M, Q	non-polar and some polar organic compounds, ≤ ca. 1000 da
electrospray ES	MH <sup>+</sup> , (M+nH) <sup>++</sup> (M-H) <sup>-</sup> , (M-nH) <sup>-</sup>	M, Q, TOF	polar organics, proteins, biopolymers, organometallics, ≤ ca. 200 000 da
atmospheric pressure chemical ionization APCI	MH <sup>+</sup> (M-H) <sup>-</sup>	M, Q	polar and some non-polar organic compounds, ≤ ca. 1000 da
fast atom/ion bombardment FAB/FIB/LSIMS	MH <sup>+</sup> (M-H) <sup>-</sup>	M, Q	polar organics, proteins, organometallics, ≤ ca. 10 000 da (but depends on <i>m/z</i> range of MS)
field desorption/ ionization FD/FI	MH <sup>+</sup> (M-H) <sup>-</sup>	M, (Q)	non-polar and some polar organics, inc. synthetic polymers, ≤ ca. 10 000 da (but depends on <i>m/z</i> range of MS)
thermospray TSP	MH <sup>+</sup> , MNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (M-H) <sup>-</sup>	M, Q	polar and some non-polar organic compounds, ≤ ca. 1000 da
matrix assisted laser desorption ionization MALDI	MH <sup>+</sup> (M-H) <sup>-</sup>	TOF	polar and some non-polar biopolymers, synthetic polymers ca. 200 000 da and higher

M = molekulska masa  
M = magnetic sector  
Q = kvadrupol  
TOF = time of flight

## STUPANJ NEZASIĆENOSTI ILI BROJ EKVIVALENATA DVOSTRUKE VEZE

Zasićeni ugljikovodik $C_nH_{2n}+2$	izostanak 2z vodika
z dvostrukih veza	2 ekvivalenta dvostrukе veze
trostruka veza	2 ekvivalenta dvostrukе veze
halogeni (F,Cl,Br,I)	ekvivalenti 1 vodiku
Si, Ge, Sn, Pb	ekvivalenti ugljiku
Ciklička struktura	1 ekvivalent dvostrukе veze

- $F \text{ (IDV)} = (2n + 2 + m) - X / 2$

n - broj ugljikovih atoma i njegovih ekvivalenata  
 m - broj dušikovih atoma atoma i ekvivalenata  
 x - broj vodikovih atoma i ekvivalenata

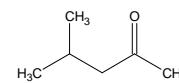
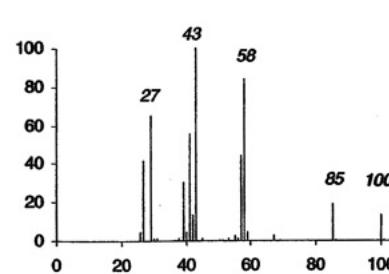
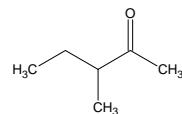
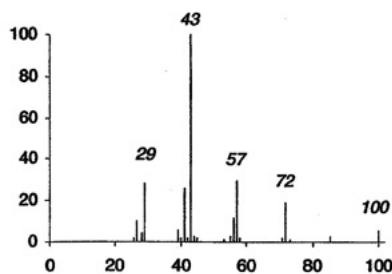
Opći slučaj (najčešći): C, H, N, O, S, Hal

Procjena stupnja nezasićenosti:

- 1) izostavi O i S
- 2) zamjeni halogen vodikom
- 3) zamjeni dušik skupinom CH
- 4) usporedi hipotetski ugljikovodik  $C_nH_x$  sa sastavom zasićenog ugljikovodika  $C_nH_{2n+2}$

$$F = (2n + 2) - x / 2 \text{ uz uvjet da je S dvovalentan, N trovalentan}$$

Na temelju fragmenata u EI-MS spektarima odredite koji spektar pripada spoju 3-metil-2-pantanonu a koji 4-metil-2-pantanonu



## KROMATOGRAFIJA

**Kromatografija** – tehnika kojom se odjeljuju sastojci smjese ovisno o njihovoj raspodjeli između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, dok se druga kreće u određenom smjeru (pokretna faza).

Mihail Semenovič Cvet, 1906.



AKO,07/08

## KROMATOGRAFIJA

### FAZE U KROMATOGRAFIJI:

- Nepokretna faza (stacionarna faza)
- Pokretna faza (mobilna faza)

#### Nepokretna faza

- čvrsta tvar, gel ili tekućina
- ispunjava usku cijev ili je nanesena na ravnoj plohi  
 = *sorbens*

#### Pokretna faza

- tekućina, plin ili fluid
- prolazi kroz ili uzduž nepokretnе faze u određenom smjeru  
 = *eluens* u kromatografiji ispiranjem (eluiranjem)

## PODJELA KROMATOGRAFSKIH METODA

### PODJELA PREMA FIZIKALNOM STANJU FAZA:

- Kromatografske metode ovisno o fizikalnom stanju obje faze
- Plinska kromatografija
- Tekućinska kromatografija
- Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima

### PODJELA PREMA FIZIKALNOM STANJU OBJE FAZE:

	Pokretna faza	Nepokretna faza
Plinsko-tekućinska kromatografija <i>(Gas-Liquid Chromatography, GLC)</i>	Plin	Tekućina
Plinsko-čvrsta kromatografija <i>(Gas-Solid Chromatography, GSC)</i>	Plin	Čvrsta tvar
Tekućinsko-tekućinska kromatografija <i>(Liquid-Liquid Chromatography, LLC)</i>	Tekućina	Tekućina
Tekućinsko-čvrsta kromatografija <i>(Liquid-Solid Chromatography, LSC)</i>	Tekućina	Čvrsta tvar

## PODJELA KROMATOGRAFSKIH METODA

### PLINSKA KROMATOGRAFIJA *(Gas Chromatography, GC)*

- pokretna faza plin
- u koloni

### TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA *(Liquid Chromatography, LC)*

- pokretna faza tekućina
- u koloni i na plohi
- sitne čestice nepokretne faze uz visoki ulazni tlak pokretne faze
- ⇒ tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (visokih tlakova)  
*(High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)*

### FLUIDNA KROMATOGRAFIJA PRI SUPERKRITIČNIM UVJETIMA

*(Supercritical-Fluid Chromatography, SFC)*

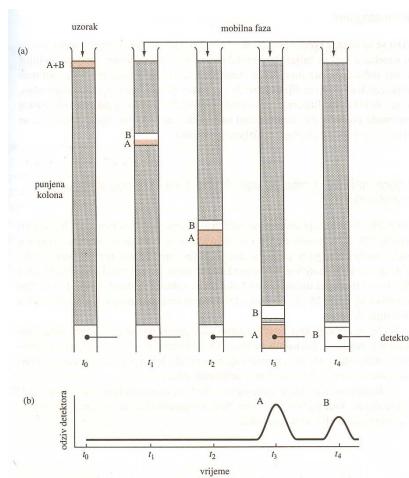
- pokretna faza fluid (plin ili tekućina) iznad ili blizu kritične temperature i tlaka fluida
- u koloni

# Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti- HPLC

- Tehnika normalnih faza
  - Nepokretna faza polarna (silikagel)
  - Pokretna faza nepolarna (heksan, diklormetan, kloroform..)
  
- Tehnika obrnutih faza
  - Nepokretna faza nepolarna (silikagel s C8 ili C18 lancima)
  - Pokretna faza polarna (voda, acetonitril, metanol..)

## KOLONSKA KROMATOGRAFIJA – KROMATOGRAFIJA ISPIRANJEM

**Eluiranje** – pokretna faza ispirje sastojke s nepokretnim fazama



Uzorak otopljen u pokretnoj fazi nanosi se na vrh kolone

Dodavanjem pokretnog faza uzorak se kreće niz kolonu

Sastojci se raspodjeljuju između pokretnog i nepokretnog faza

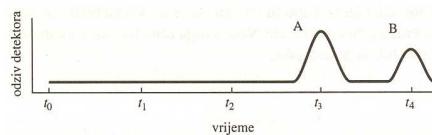
Različita brzina gibanja  $\Rightarrow$   
odjeljivanje sastojaka  $\Rightarrow$   
vrpe ili zone na koloni

**Kromatografske krivulje**  
(krivulje eluiranja, pikovi)

## KOLONSKA KROMATOGRAFIJA – KROMATOGRAFIJA ISPIRANJEM

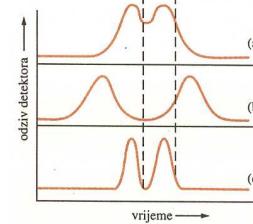
**Kromatogram** – grafički prikaz odziva detektora (funkcija koncentracije analita) u ovisnosti o vremenu ili volumenu eluiranja.

- položaj pika  $\Rightarrow$  kvalitativna analiza (identifikacija sastojka)
- visina ili površina pika  $\Rightarrow$  kvantitativna analiza (količina sastojka)



**Djelotvornost kolone** određuju:

- relativna brzina eluiranja sastojaka  $\Rightarrow$  klasična teorija
- širenje zona eluiranih sastojaka  $\Rightarrow$  kinetička teorija



## KLASIČNA TEORIJA KROMATOGRAFIJE

Klasična teorija kromatografije – odjeljivanje sastojaka ovisi o njihovim relativnim brzinama istjecanja iz kolone

### KONSTANTA RAZDJELJENJA (koeficijent raspodjele)

$$K = \frac{c_s}{c_m}$$

Konstanta razdjeljenja, K – odnos koncentracija odjeljivanog sastojka u nepokretnoj i pokretnoj fazi za ravnotežno stanje

Koncentracija sastojka u nepokretnoj fazi, cS

Koncentracija sastojka u pokretnoj fazi, cM

## KLASIČNA TEORIJA KROMATOGRAFIJE

### VRIJEME ZADRŽAVANJA

 $t_R$ 

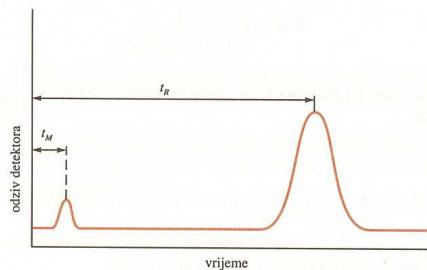
**Ukupno vrijeme zadržavanja**,  $t_R$  – vrijeme od trenutka unošenja uzorka do maksimuma pika

 $t_M$ 

**Zadržano vrijeme** (mrtvo vrijeme),  $t_M$  – vrijeme potrebno da sastojak koji se ne zadržava na koloni prođe kroz kolonu

 $t_R' = t_R - t_M$ 

**Prilagođeno vrijeme zadržavanja**,  $t_R'$



- u GC analogno  $V_R$ ,  $V_M$ ,  $V_R'$

## Sregnute tehnike LC-MS, GC-MS, LC-NMR, GC- IR, LC-IR

- Za učinkovitu analizu smjesa spojeva
  - Identifikacija
  - Određivanje strukture
  - kvantifikacija

**Vrsta uzorka, kromatografska metoda, ionizacijska metoda i  
vrsta analizatora mase**

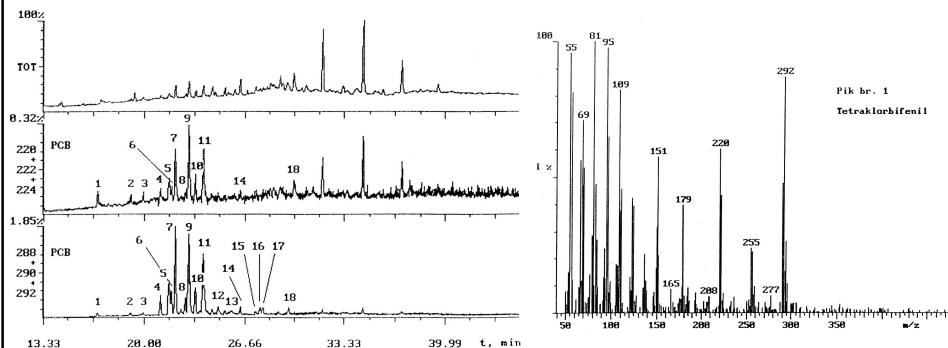
<i>Sample classes</i>	<i>Chromatographic interfaces</i>	<i>Ionization methods</i>	<i>Mass spectrometer*</i>
proteins, peptides, oligonucleotides, oligosaccharides	LC, CE low flow LC, CE none	ES FAB/FIB/LSIMS MALDI	M, Q, TOF M, Q TOF
polar organic compounds	GC LC, CE LC low flow LC, CE none LC	CI ES APCI FAB/FIB/LSIMS FD/FI TSP	M, Q M, Q M, Q M, Q M, (Q) M, Q
non-polar organic compounds	GC, particle beam LC GC none	EI CI FD/FI	M, Q M, Q M, (Q)
synthetic polymers	none none	FD/FI MALDI	M, (Q) TOF

M = magnetni sektor

Q = kvadrupol

TOF = vrijeme leta (time-of-flight)

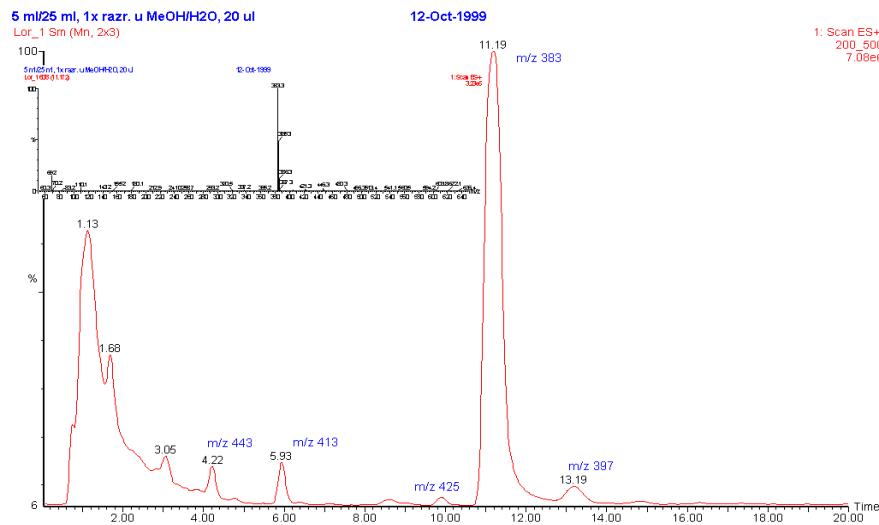
## Primjena GC-MS



Kromatogram ukupne ionske struje i fragmentogrami polikloriranih bifenila ekstrahiranih iz tla

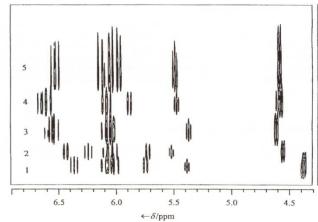
MS Spektar tetraklorbifenila

## LC/MS primjena

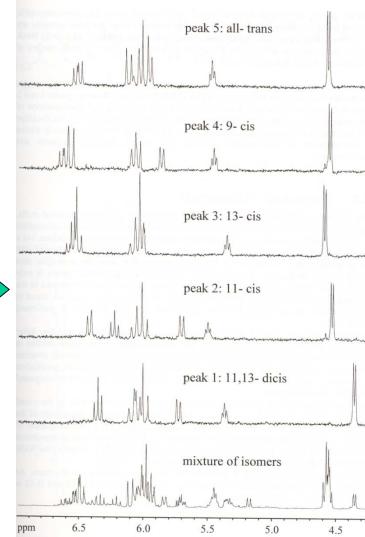


## LC-NMR-primjena spektri kontinuiranoga protoka

<sup>1</sup>H LC-NMR spektri kontinuiranog protoka



Odvajanje izomera vitamina A



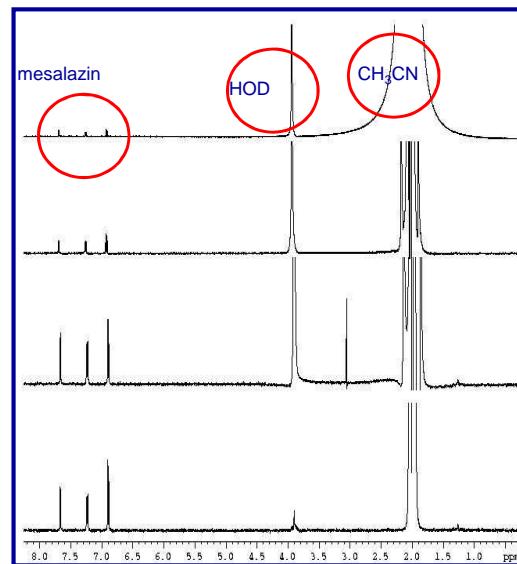
### Protonski NMR spektri mesalazina u 71% $\text{CH}_3\text{CN}$ i 29% $\text{D}_2\text{O}$

a) običan spektar

b) prezasićenje  $\text{CH}_3\text{CN}$

c) dvostruko prezasićenje  $\text{CH}_3\text{CN}$  i HDO

d) Dvostruko prezasićenje  $\text{CH}_3\text{CN}$  i HDO uz  $^{13}\text{C}$  rasprezanje



## LC-IR i GC-IR

- direktnim povezivanjem kromatografa i infracrvenog spektrometra omogućuje se odvajanje i detekcija uzorka

odvajanje → kromatografija

detekcija → infracrvena spektroskopija

### Prednosti

- mjerjenje u realnom vremenu
- visoko razlučivanje
- kombinacija spektroskopskih i kromatografskih informacija o analitu
- manja mogućnost kontaminacije, oksidacije i kristalizacije analita<sup>1</sup>

### Nedostaci

- poteškoće prilikom korekcije pozadinskog zračenja
- loša osjetljivost

- podaci dobiveni vezanim tehnikama kromatografije i infracrvene spektroskopije zahtijevaju statističku obradu
- najznačajnije multivariatne metode analize su:
  - analiza glavnih komponenti  
(engl. *Principal Components Analysis*, PCA)
  - **parcijalni najmanji kvadrati**  
(engl. *Partial Least Squares*, PLS)
- koriste se za dobivanje maksimalne količine informacija iz dostupnih podataka te za uklanjanje pozadinskog zračenja

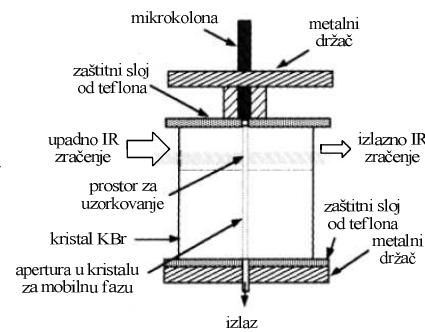
#### Vezane tehnike kromatografije i infracrvene spektroskopije *on-line*:

- Tekućinska kromatografija - infracrvena spektroskopija *on-line*  
(engl. *Liquid Chromatography - Infrared Spectroscopy on-line*, LC-IR)
- Plinska kromatografija - infracrvena spektroskopija *on-line*  
(engl. *Gas Chromatography -Infrared Spectroscopy*, GC-IR)

Tekućinska kromatografija - infracrvena spektroskopija *on-line*

## Tekućinska kromatografija - infracrvena spektroskopija *on-line* (engl. *Liquid Chromatography - Infrared Spectroscopy on-line*, LC-IR)

- uzorak iz tekućinskog kromatografa prolazi kroz IR protočnu mikroćeliju sa stijenkama od kalijevog bromida
- prolaskom kroz mikroćeliju dolazi do djelomične apsorpcije IR zračenja



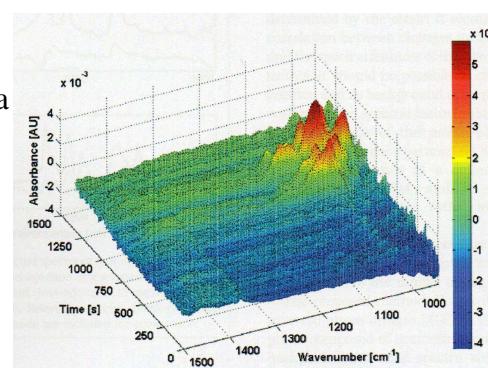
Shema IR protočne mikroćelije

Tekućinska kromatografija - infracrvena spektroskopija *on-line*

### Primjena LC-IR

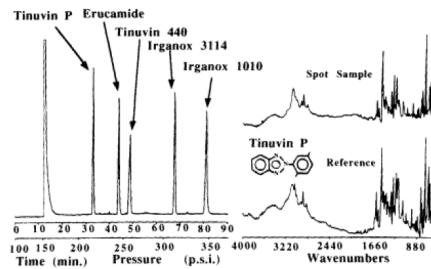
- kvalitativna i kvantitativna analiza:

- aromatskih ugljikovodika
- steroida u biološkim uzorcima
- polimernih dodataka
- flavonoida u voću
- farmaceutskih proizvoda
- smjese ugljikohidrata (Slika)

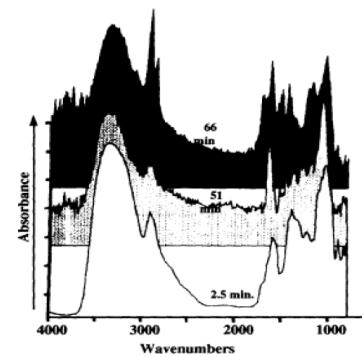


Analiza smjese fruktoze,  
glukoze, saharoze i maltoze<sup>1</sup>

### Tekućinska kromatografija - infracrvena spektroskopija *on-line*



Određivanje polimernih dodataka pomoću LC-IR

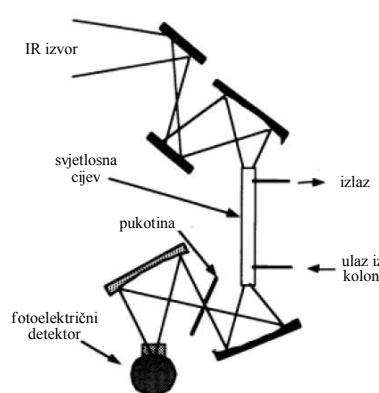


IR spektri sastojaka narančinog soka  
čiji se kromatografski pikovi pojavljuju  
pri 2,5 min, 51 min i 66 min

### Plinska kromatografija - infracrvena spektroskopija *on-line*

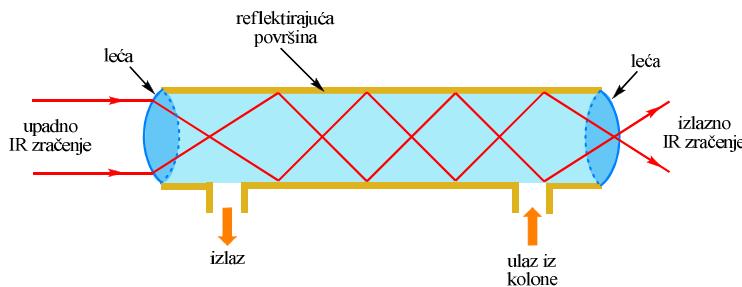
#### Plinska kromatografija - infracrvena spektroskopija *on-line* (engl. *Gas Chromatography - Infrared Spectroscopy on-line*, GC-IR)

- uzorak iz kromatografske kolone ulazi u svjetlosnu cijev s unutarnje strane obloženu reflektirajućim materijalom
- IR zračenje prolazi kroz svjetlosnu cijev te se djelomično apsorbira
- transmitirano zračenje detektira se pomoću fotoelektričnog detektora



### Plinska kromatografija - infracrvena spektroskopija *on-line*

- višestrukom refleksijom IR zračenja u svjetlosnoj cijevi povećava se duljina puta zrake kroz uzorak
- detekcija uzorka u plinovitom stanju pri **niskim koncentracijama**



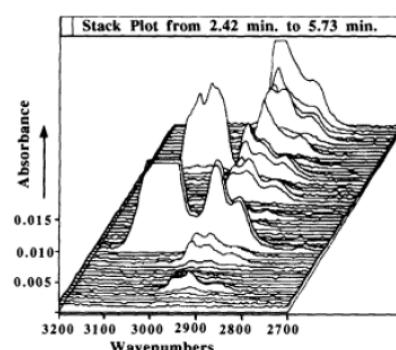
Prolazak infracrvenog zračenja kroz svjetlosnu cijev

### Plinska kromatografija - infracrvena spektroskopija *on-line*

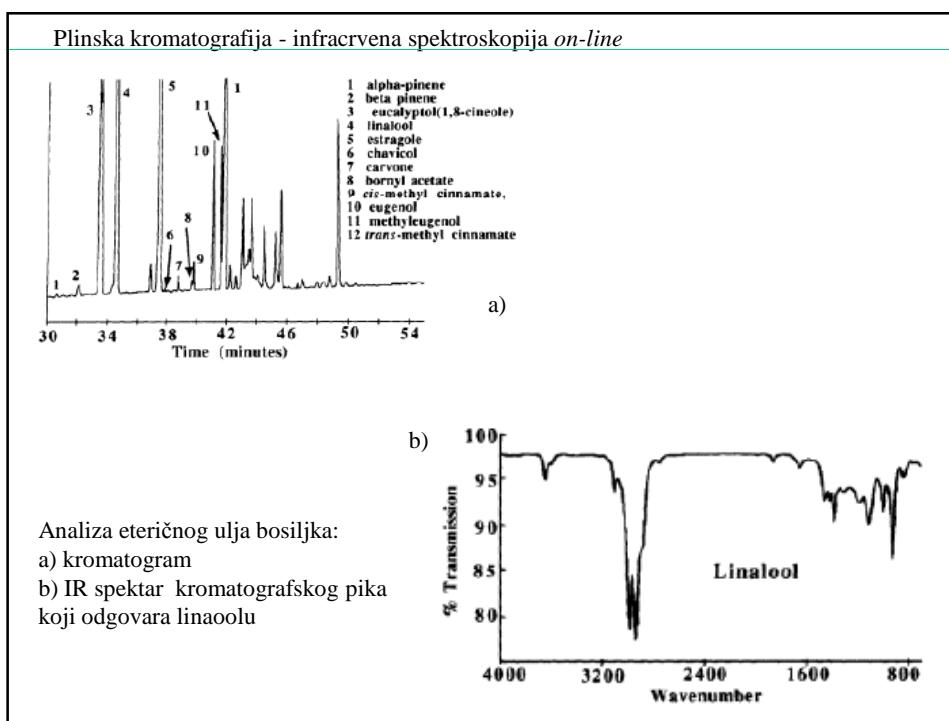
#### Primjena GC-IR

- kvalitativna i kvantitativna analiza:

- farmaceutskih proizvoda
- fosilnih goriva (Slika)
- eteričnih ulja
- ispušnih plinova
- produkata pirolize



IR spektri snimljeni tijekom kromatografske separacije sastojaka benzina



## Literatura

1. J. Kuligowski, G. Quintás, S. Garrigues, B. Lendl, M. de la Guardia, *Trends Anal. Chem.* **29** (2010) 544-552
2. R. P. W. Scott, *Tandem Techniques*, John Wiley & Sons, Chichester, 1997.
3. B. Stuart, *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Chichester, 1997.