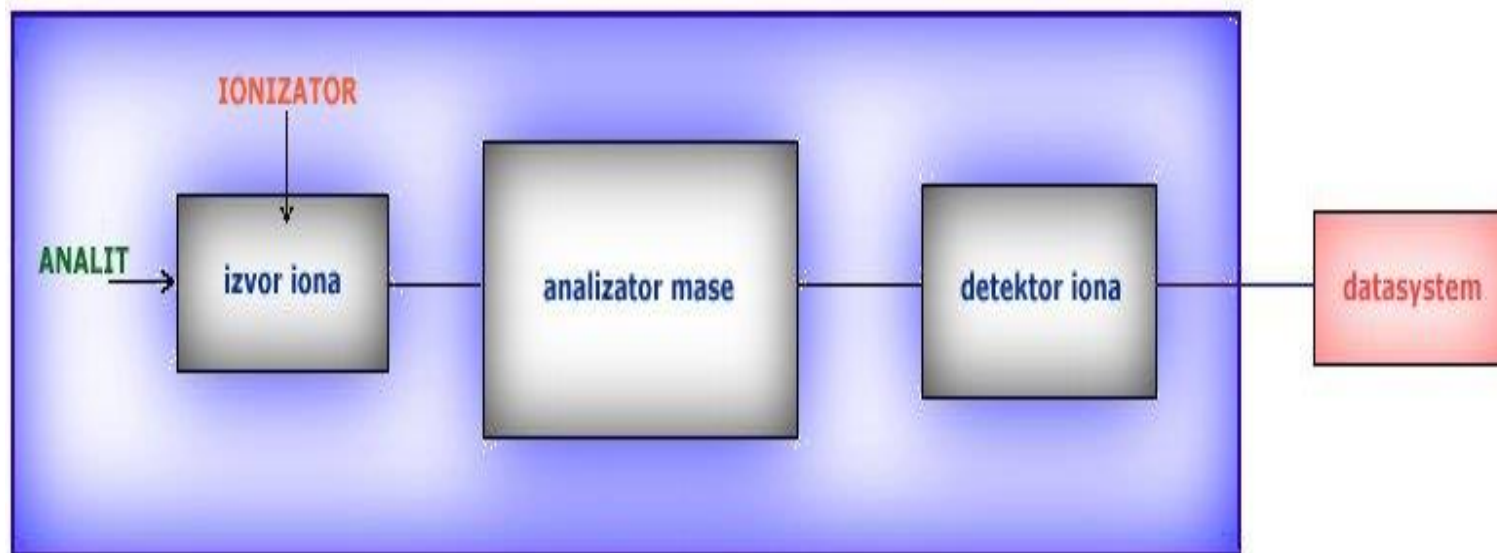


Spektrometrija masa (MS)

Primjena spektrometrije masa

- 1) molekulska masa M^+ , $(M+1)^+$, $(M-1)^-$
- 2) elementna analiza
- 3) izotopni omjeri (^{35}Cl , ^{37}Cl , ^{79}Br , ^{81}Br)
- 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, MS^n)



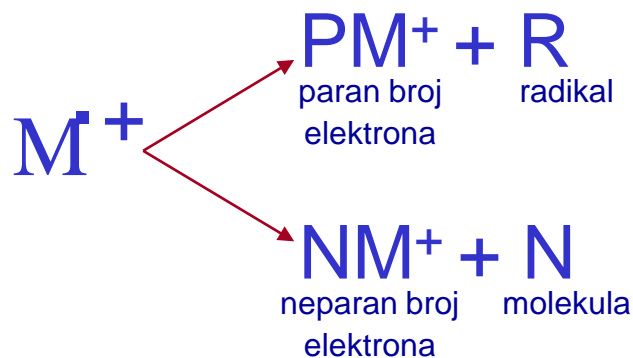
Spektrometrija masa (MS)

Ionizacija brzim elektronima, EI

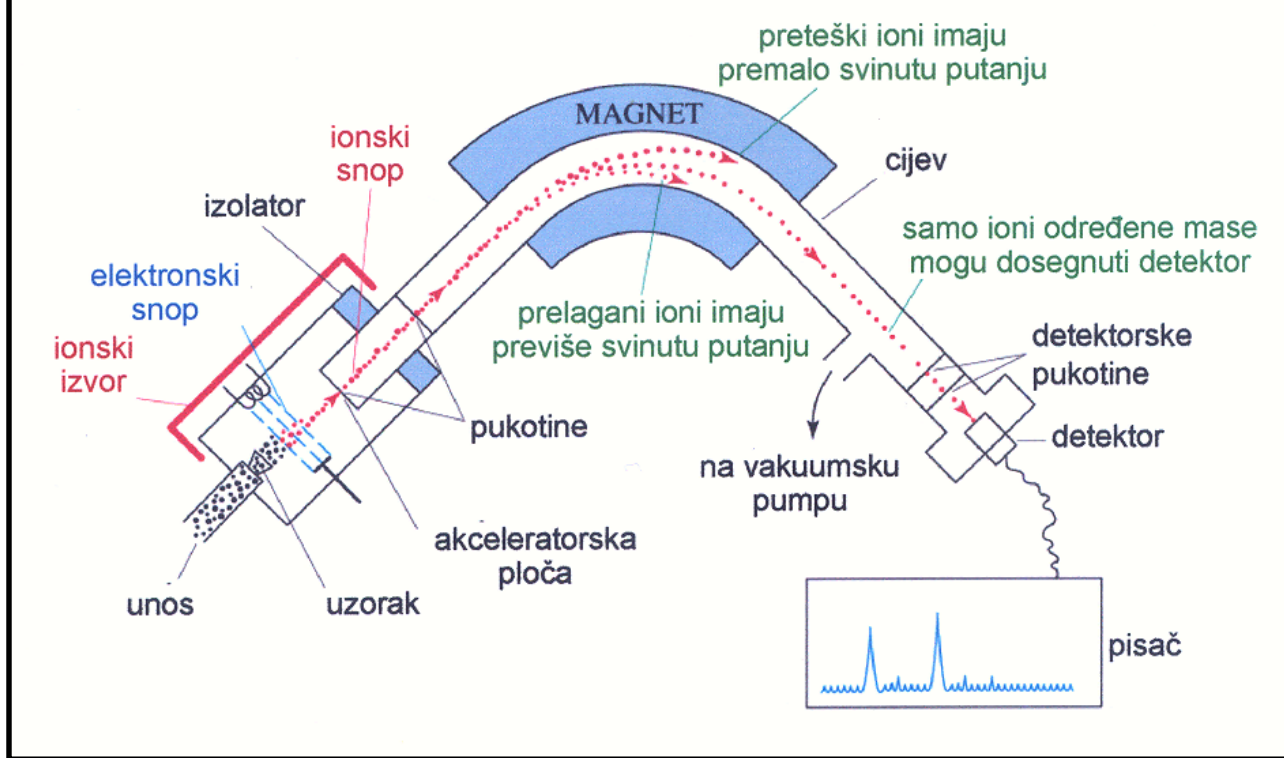
Prvi korak: nastanak molekuskog iona: prekursor ion



Molekulski ion podliježe fragmentaciji: produktni ioni



Ioni se razdvajaju na temelju njihovih m/z i detektiraju

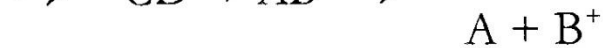
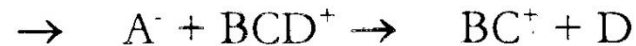
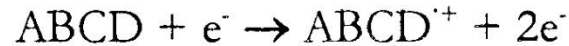


1. **ionizacija brzim elektronima** – upareni uzorak se ionizira (obično se ukloni jedan elektron, ponekad dva; moderne metode i više elektrona) – pozitivno nabijene vrste ulaze u akceleracijsku komoru;
2. **akceleracija** – ioni se podvrgnu djelovanju električnog polja radi ubrzanja;
3. **otklon** (deflekcija) – teži ioni se manje otklanjaju od lakših – odvajanje prema atomskim (molekulskim) masama tj. m/z ;
4. **detekcija** – samo ioni određene mase dolaze do detektora – za detekciju svih iona treba mijenjati akceleracijsko polje ili jakost magnetnog polja – detektor bilježi svaku vrstu kao zaseban vršak (“peak”).

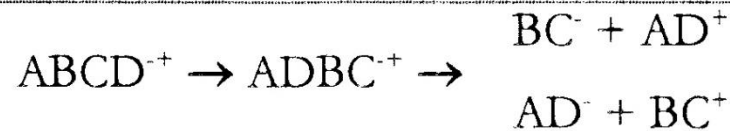
Tipične reakcije u izvoru s ionizacijom brzim elektronima

Tvorba molekuskog iona

Fragmentacija

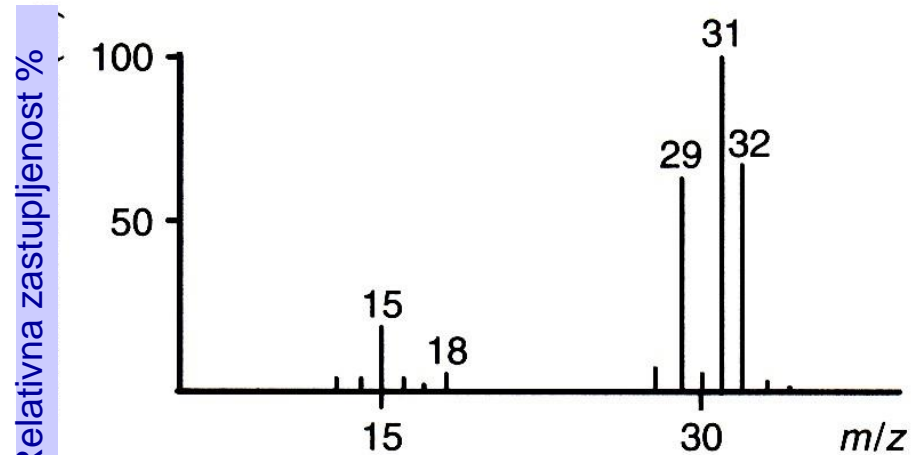


Pregradnja i fragmentacija

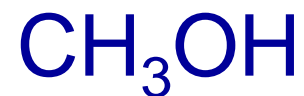


Sudar i fragmentacija



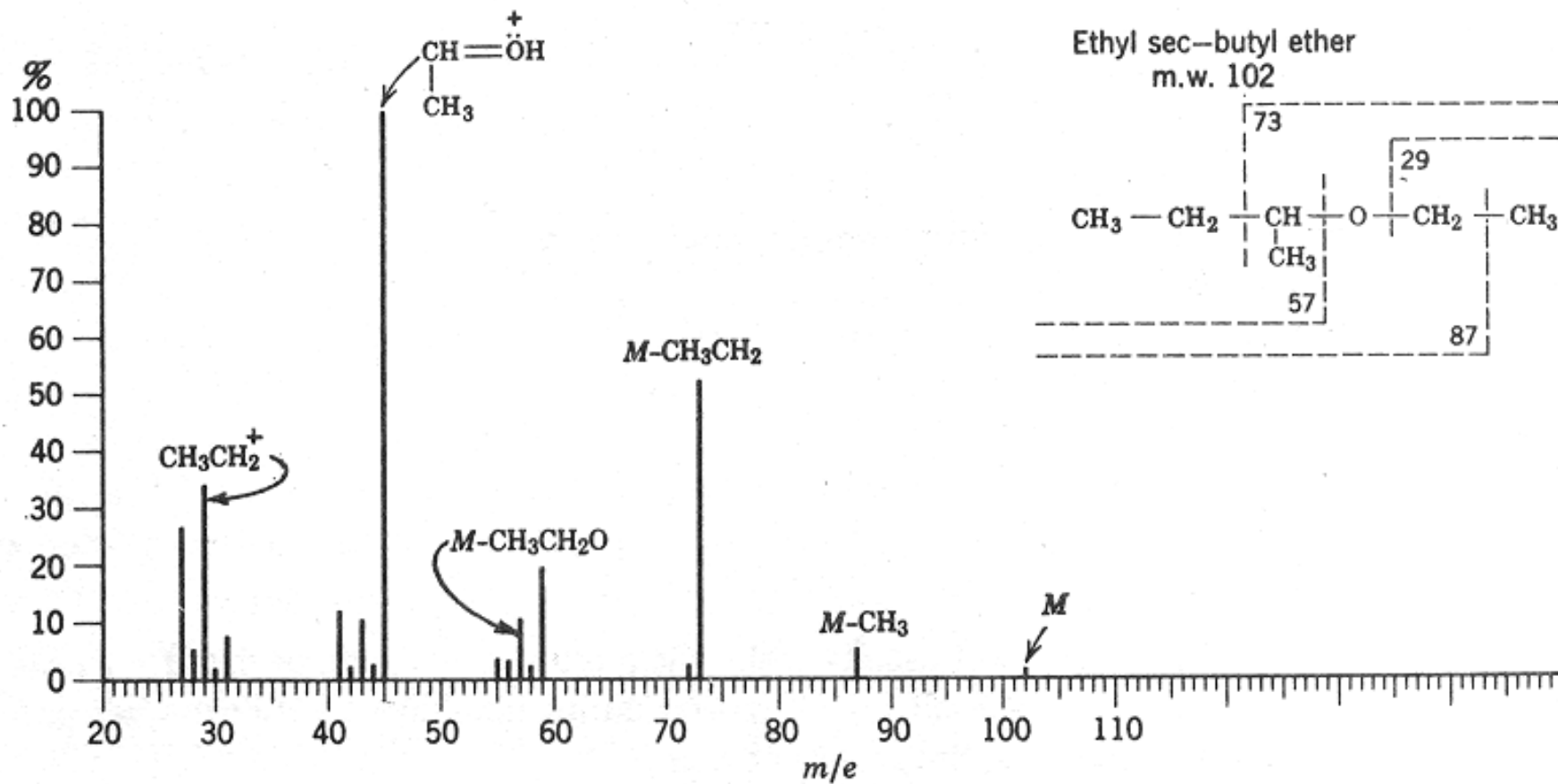


Spektar EI-MS metanola



m/z	Relativna zastupljenost %	m/z	Relativna zastupljenost %
12	0.33	28	6.3
13	0.72	29	64.0
14	2.4	30	3.8
15	13.0	31	100.0
16	0.21	32	66.0
17	1.0	33	0.73
18	0.9	34	~0.1

Spektar masa i pregradnja etil sec-butiletera



atomska i molekulska masa općenito se izražava u atomskim jedinicama mase, amu (“atomic mass unit”) → prema ugljikovom izotopu $^{12}_6\text{C}$ kojemu je pripisana masa točno 12 amu

$$1 \text{ amu} = 1 \text{ dalton} = 1 \text{ u}$$

$$= \frac{1}{12} \left(\frac{12 \text{ g } ^{12}\text{C/mol } ^{12}\text{C}}{6,0221 \times 10^{-23} \text{ atoma } ^{12}\text{C/mol } ^{12}\text{C}} \right)$$

$$= 1,66054 \times 10^{-24} \text{ g/atom } ^{12}\text{C}$$

$$= 1,66054 \times 10^{-27} \text{ kg/atom } ^{12}\text{C}$$

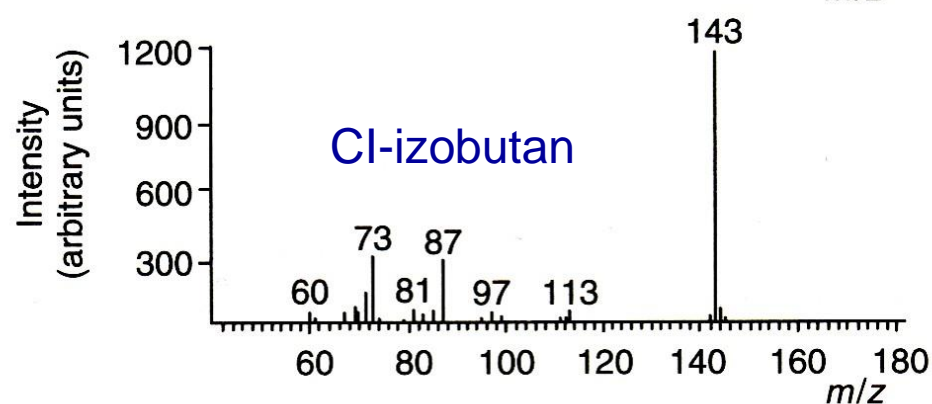
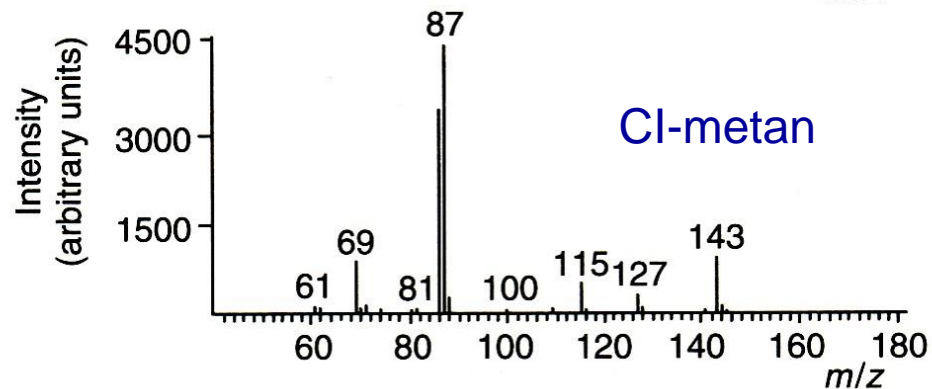
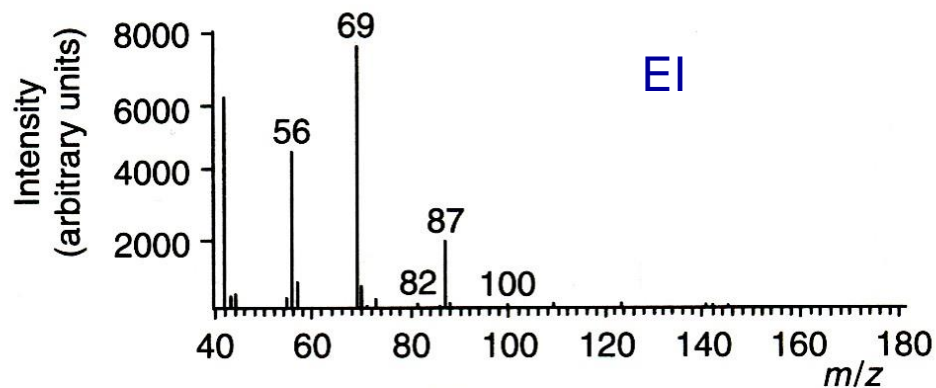
- MS ne mjeri masu, nego m/z !
- Atomic mass unit = Dalton = $1/12$ ^{12}C -mase izotopa nisu cijelobrojne vrijednosti!
- Molekulski ion daje masu molekule s isključivo najzastupljenijim izotopima (Formula Mass) - masu molekule dobivamo izračunavanjem po zastupljenosti

Tehnike ionizacije

- Ionizacija elektronima, “Electron ionization” (EI)
- Kemijska ionizacija (CI)
- FAB (Fast atom bombardment)
- MALDI (Matrix assisted laser desorption/ionisation)
- Termoraspršenje (TS-Thermospray)
- Ionizacija pri atmosferskom tlaku (API-Atmospheric pressure ionisation):
 - Elektroraspršenje (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- molekularni 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 MH^+ molekulski ion



MALDI

(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization

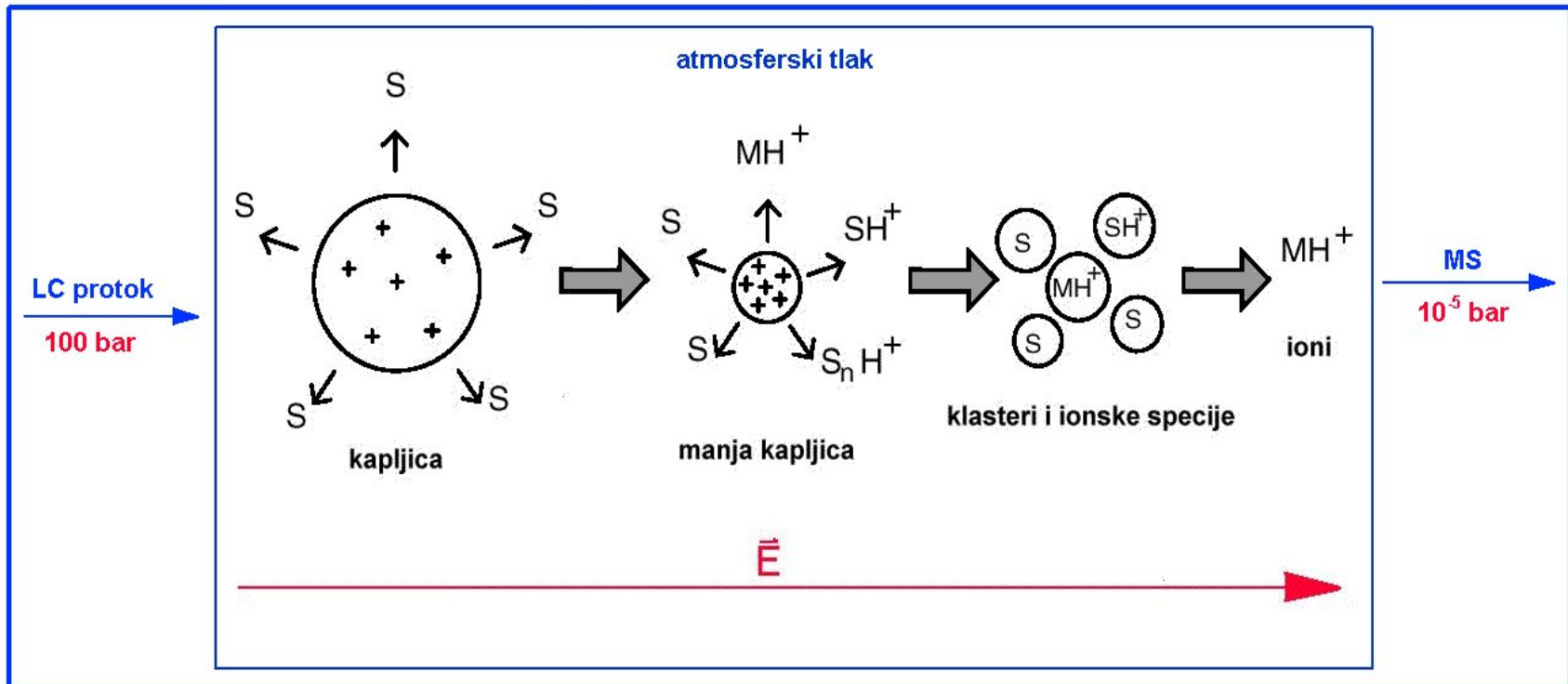
- a) Uzorak se pomješa s matricom (otopina organske molekule)
 - Sušenje smjese
 - Nastaje “solid solution” (čvrsta otopina)
- b) Kratki laserski puls jakog intenziteta
 - Brzo zagrijavanje kristala matrice
 - Prelazak u plinovito stanje
 - ionizacija

Molekulski ion: $(M+H)^+$ i $(M-H)^-$

Ionizacija elektroaspršenjem

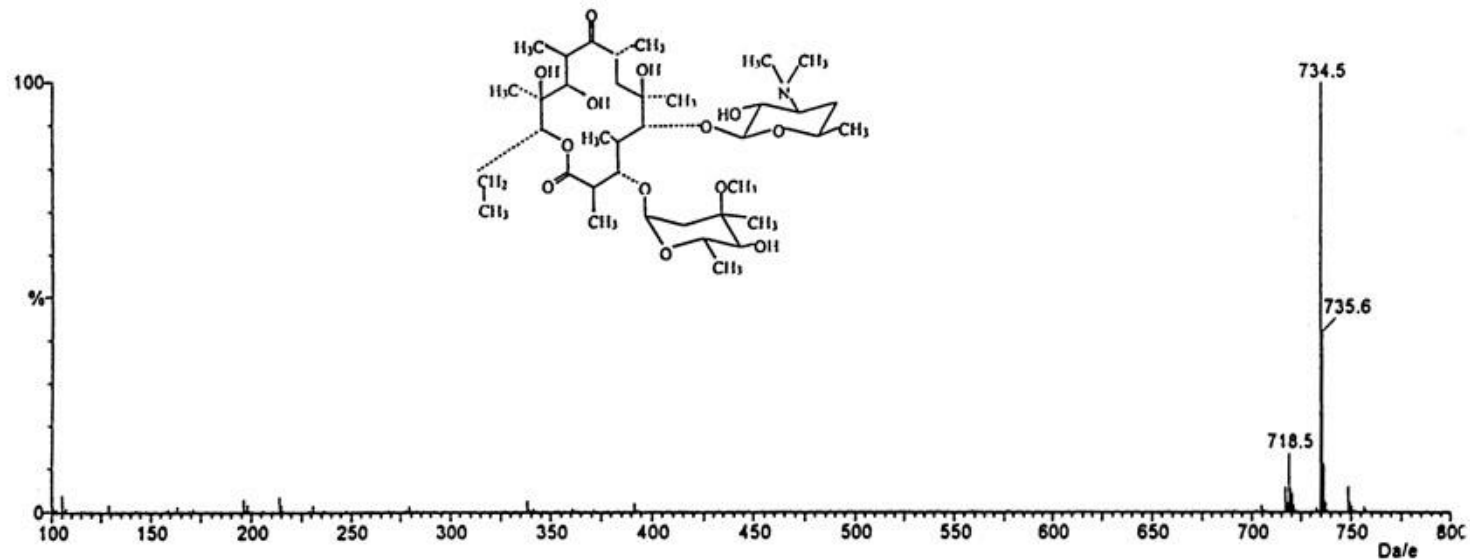
- jedna od najblažih tehnika ionizacije
- proces desolvatacije iona (“evaporacija iona”)

eluat je raspršen u sićušne kapljice u električnom polju; površinska distribucija iona kod određenih dimenzija kapljica postaje prevelika i zbog elektrostatske repulzije ioni su “izbačeni” s površine kapljice

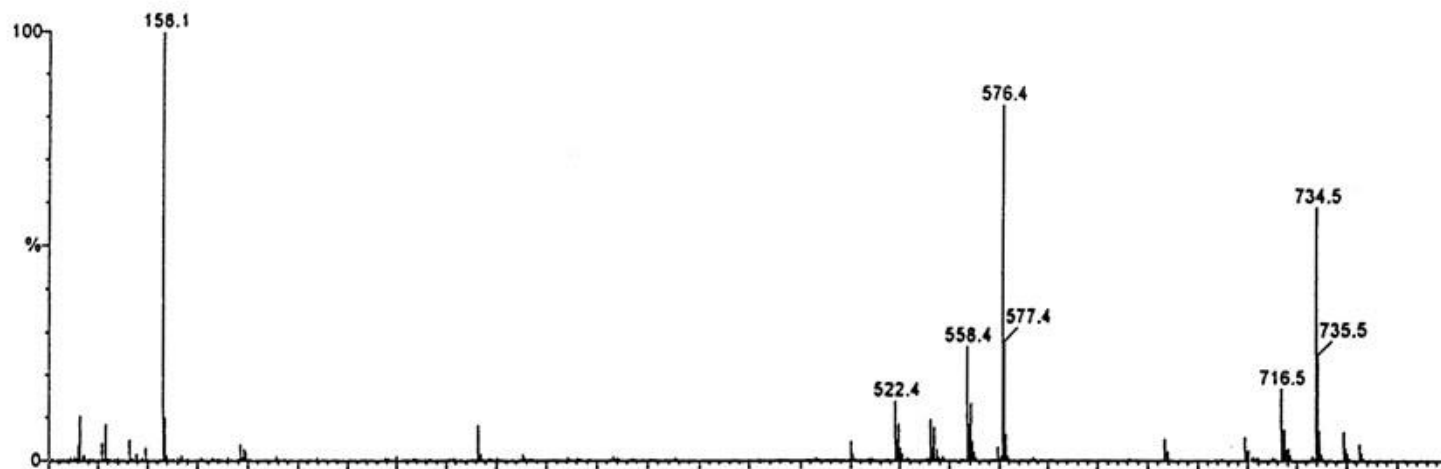


- fragmentaciju je moguće postići tako da se molekulama malo poveća kinetička energija na njihovom putu kroz izvor iona - fragmentacija je tada posljedica sudara među molekulama (tzv. in-source collision induced dissociation, CID)
- fragmentacija je ograničena na najlabilnije veze

Spektar MS eritromicina dobiven tehnikom elektroraspršenja (mol. Masa 733.46 da



Spektar MS eritromicina dobiven tehnikom „in-source” elektroraspršenja



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

.....

- osjetljivost značajno

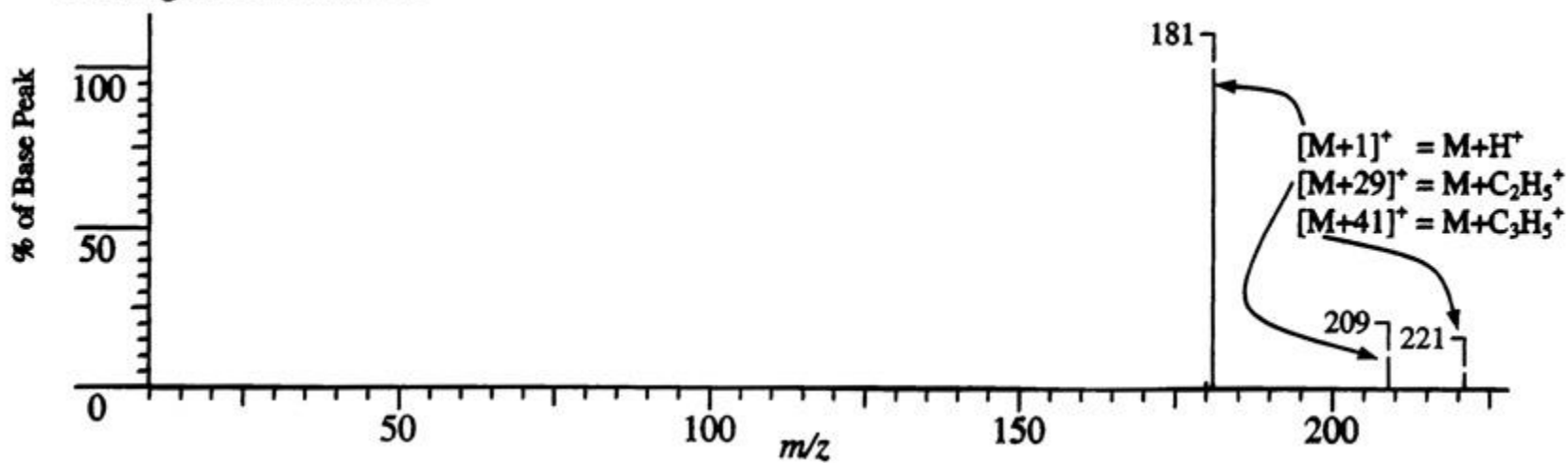
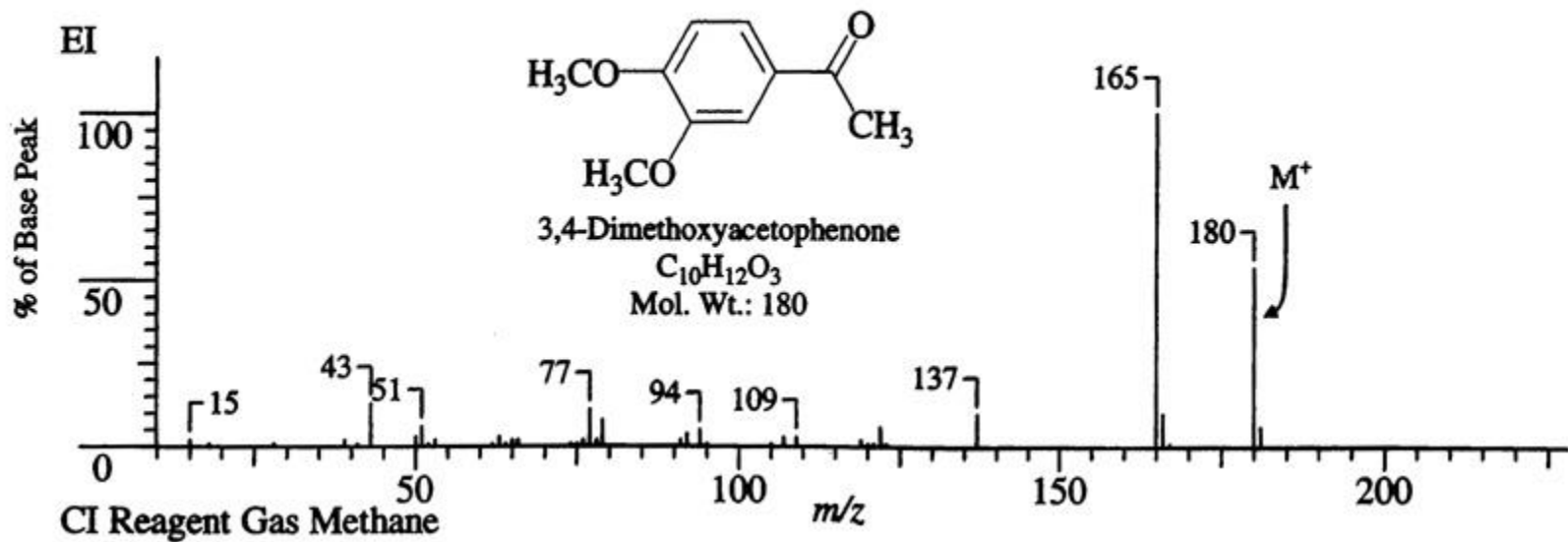
.....

.....

.....

.....

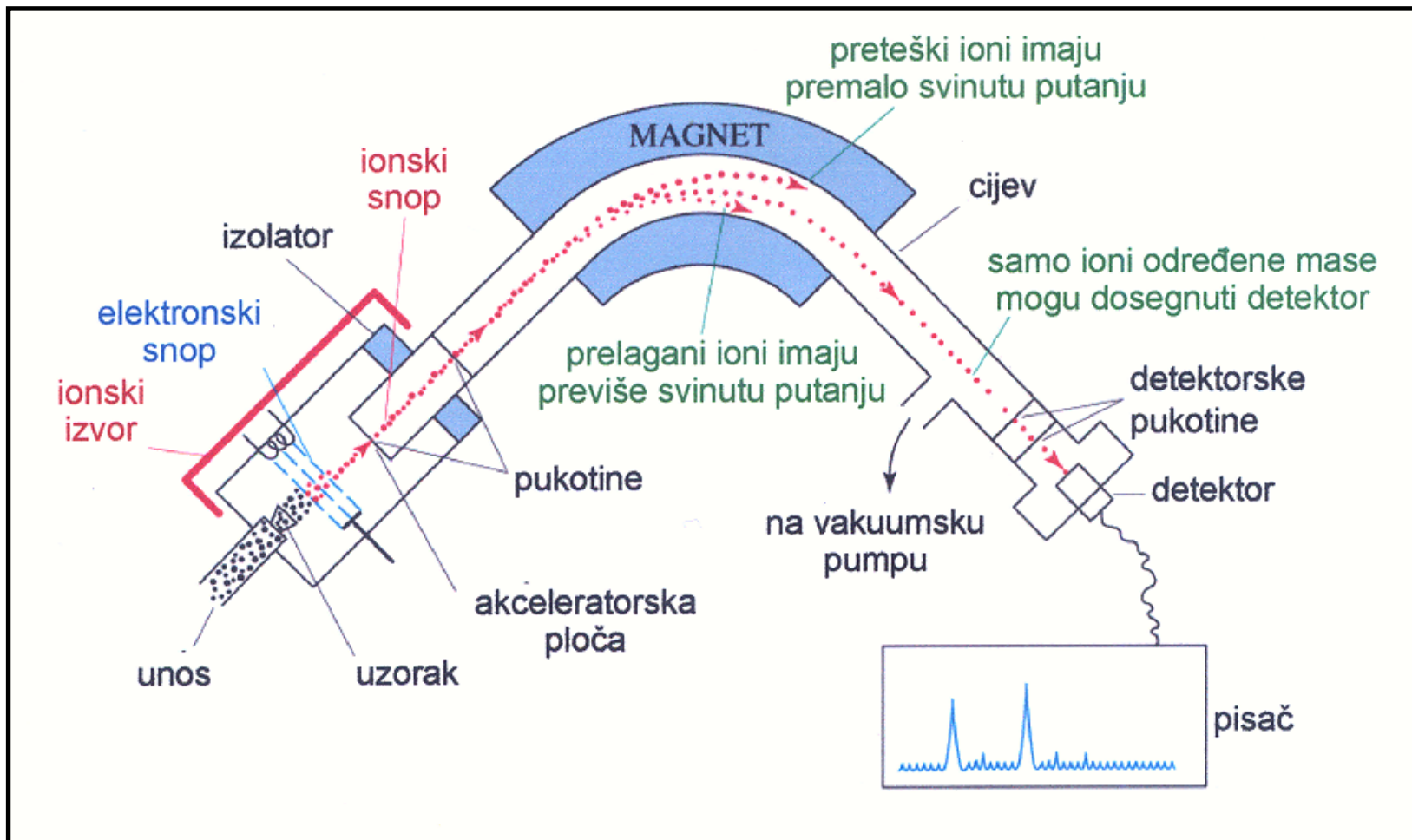
- stabilnost analita na povišenim temp
- limit od ~1000 Da (hlapljivost)



Analizatori mase

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

Magnetni sektor



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

Magnetni sektor

$$E_K = zeV = \frac{1}{2}mv^2$$

E_K = kinetička energija iona
 m = masa iona
 z = nabojni broj
 V = napon između ulazne i izlazne pukotine
 v = brzina iona poslije ubrzavanja
 e = naboj iona ($e = 1,60 \times 10^{-19}$ C)

F_M = Lorentzova (magnetna) sila
 B = jakost magnetnog polja

$$F_M = Bzev$$

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

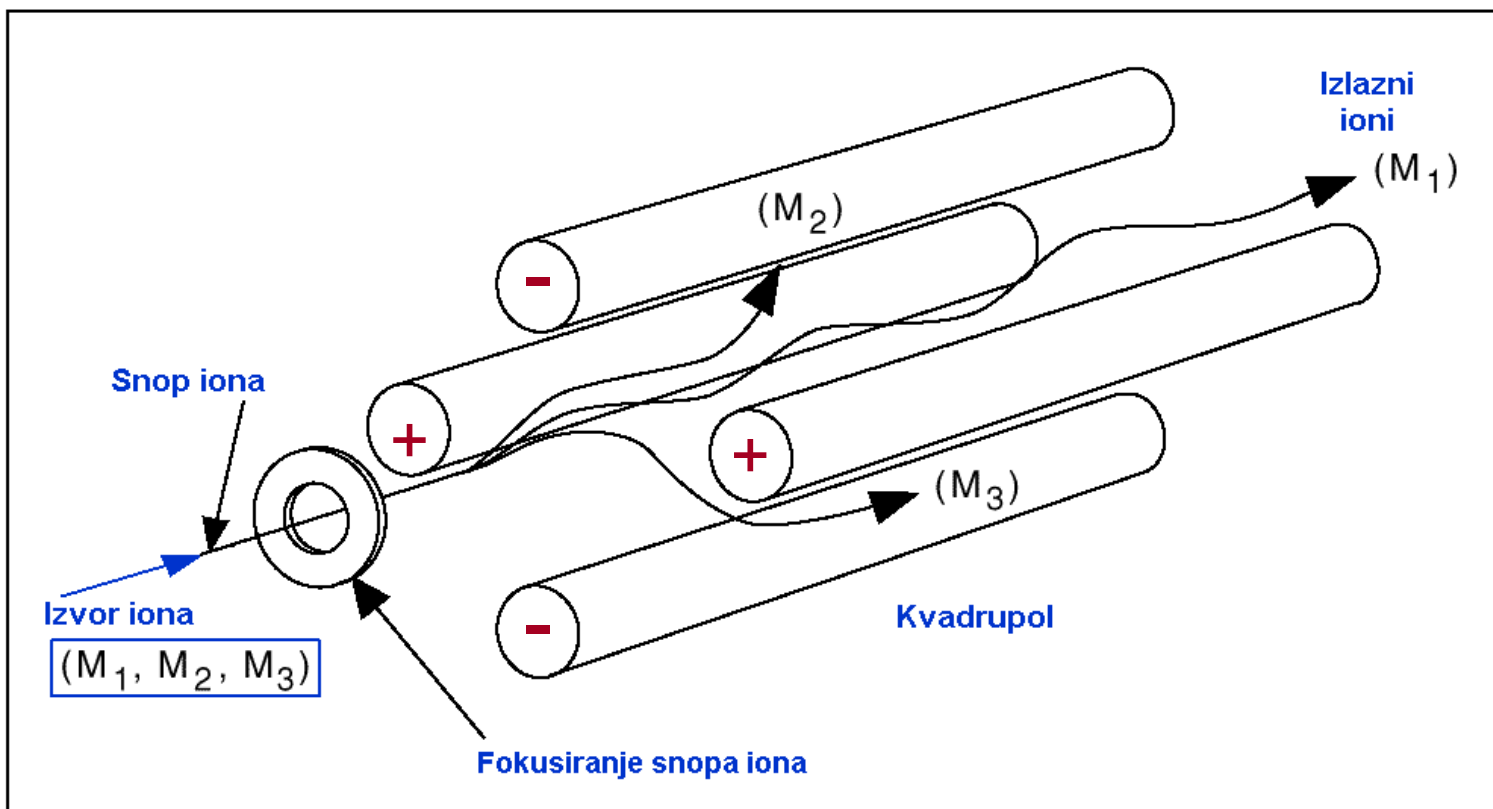
F_C = centripetalna sila (ravnotežna)
 r = polumjer zakrivljenja magnetnog sektora

Da bi ion prošao do detektora: $F_M = F_C$

..... preuređenje za $v = \dots$, uvrštavanje v u E_K, konačan izraz:

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

Kvadrupolni analizator mase



Kvadrupolni analizator mase

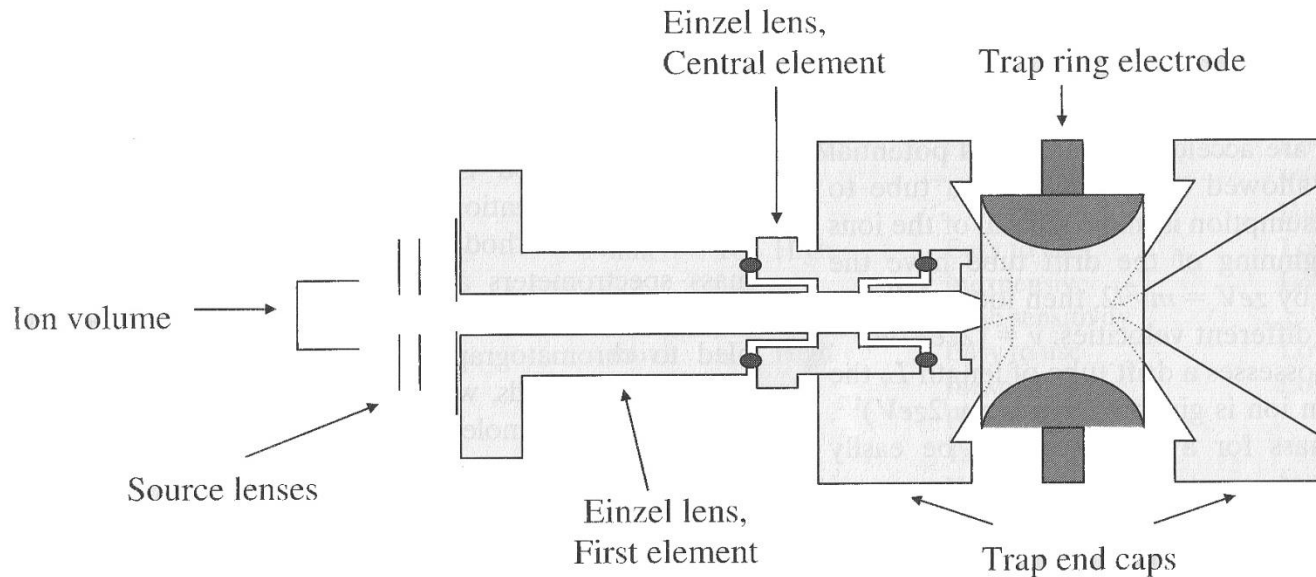
- Primjenom izmjeničnog i istosmjernog napona duž zajedničke osi šipki kvadrupola moguće je filtrirati ione ovisno o vrijednosti omjera mase i naboja iona (m/z)
- kvadrupol je “filter” mase, jer za određenu vrijednost električnog polja propušta ione samo jedne vrijednosti m/z

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 MSⁿ
- najčešće 3 elektrode: središnja 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 μ s)
- Slabija rezolucija, velike mase

Fourier transformirana MS

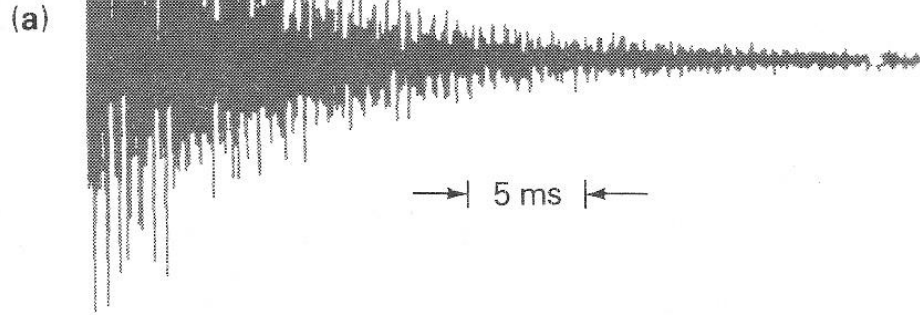
“stupica za ione”

- 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

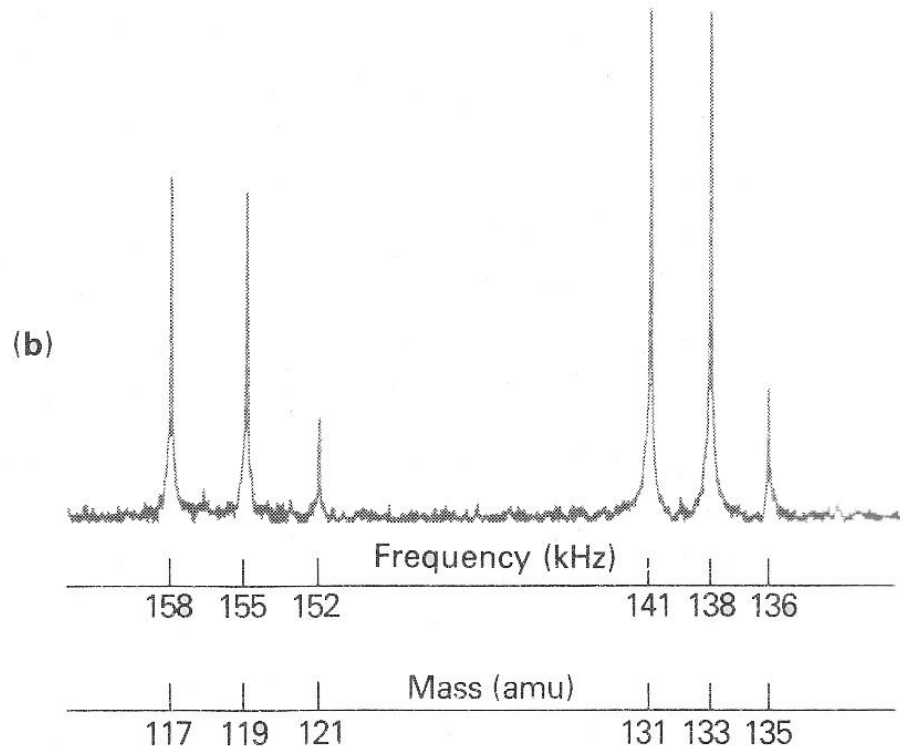
$$\omega_c = v/r = zeB/m$$

- Visoka osjetljivost i rezolucija, velike mase

FT-MS spektar



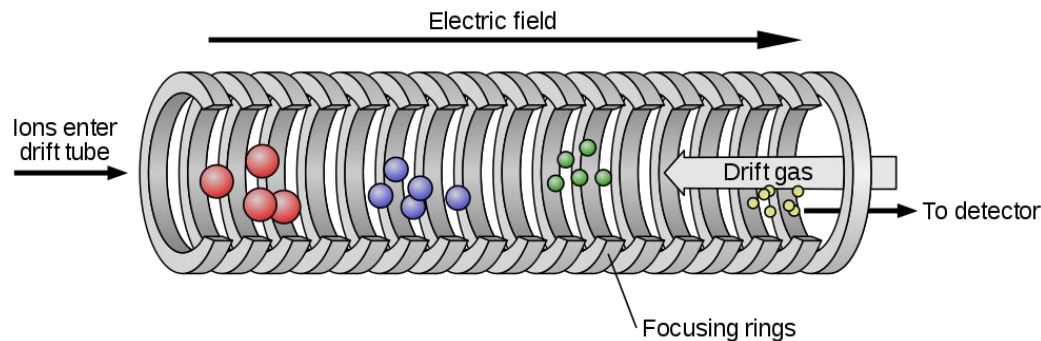
a) vremenska domena



b) frekvencijska i
masena domena

Spektrometrija masa pokretljivosti iona

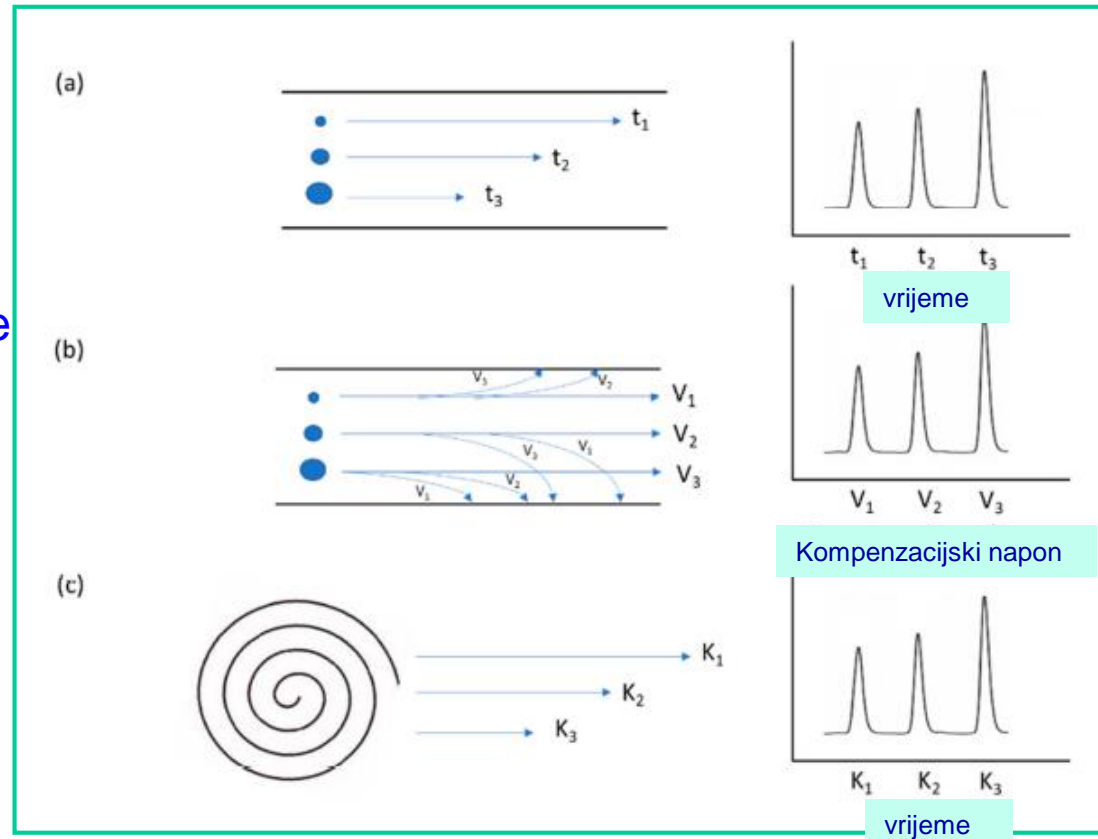
- Spektrometrija masa pokretljivosti iona (eng. *Ion Mobility Spectrometry*; IMS) je analitička kemijska metoda koja razdvaja ionske čestice u plinskoj fazi na temelju njihove interakcije s plinom i njihovih masa



- Postoje različite vrste analizatora pokretljivosti iona

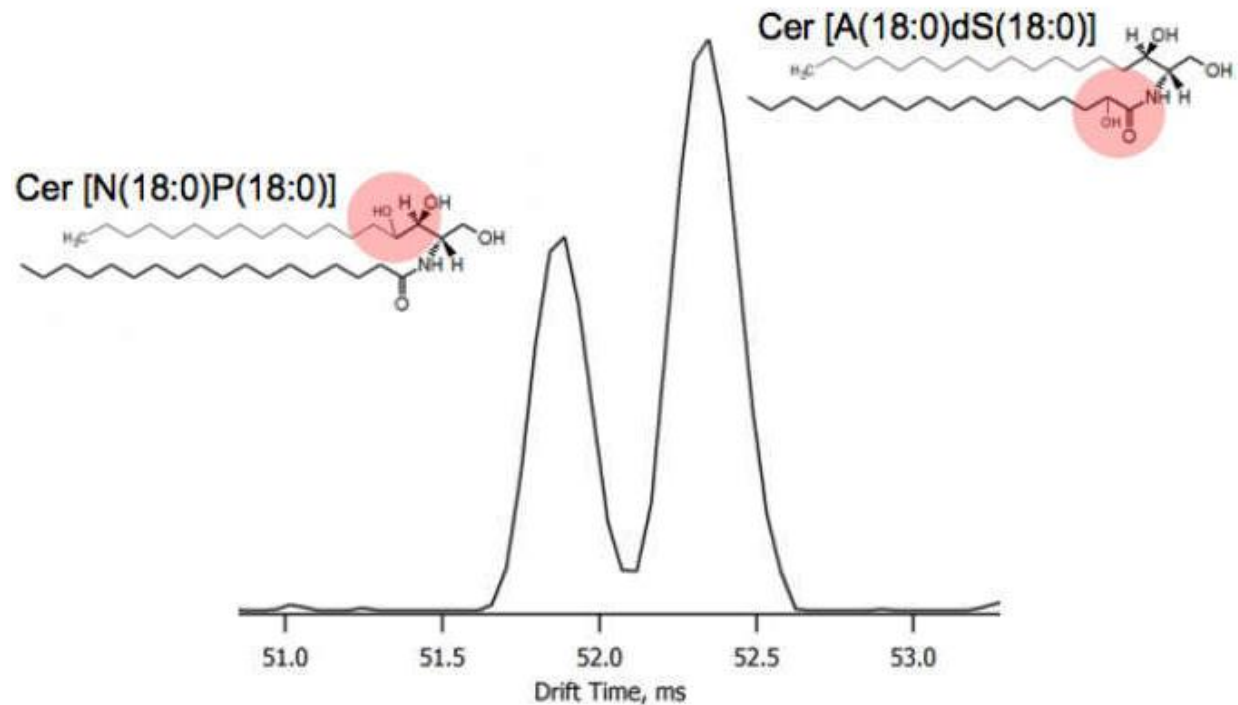
Mehanizmi odvajanje u analizatoru IMS

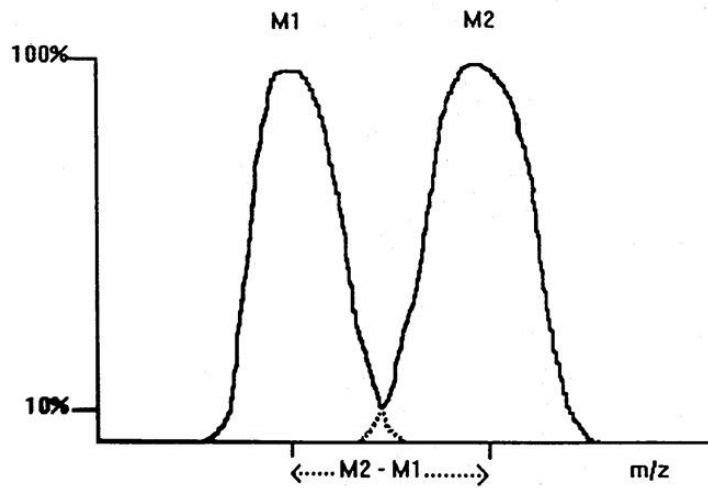
- (a) Vremenski disperzivne metode
- (b) Prostorno disperzivne metode
- (c) Metode zadržavanja iona s selektivnim otpuštanjem



Primjena IMS

- Analiza izomera
- Konformacijske promijene
- Interakcije protein-ligand
- Interakcije protein-protein





Razlučivanje analizatora masa

<i>Nominal mass loss occurring (mass units)</i>	<i>Functional group possibly associated with mass loss</i>
-15	-CH ₃
-16	-O -NH ₂
-17	-OH -NH ₃
-18	-H ₂ O
-28	-CO -C ₂ H ₄
-29	-CHO -C ₂ H ₅
-31	-OCH ₃
-32	-CH ₃ OH -S
-42	-CH ₂ CO -C ₃ H ₆
-43	-C ₃ H ₇ -CH ₃ CO
-44	-CO ₂
-45	-CO ₂ H -OC ₂ H ₅
-60	-CH ₃ CO ₂ H
-80	-SO ₃
-162	-hexose
-176	-glucuronic acid

Razlučivanje

$$R = m / \Delta m$$

Δm = razlika masa dva susjedna signala koji su upravo razlučeni

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

smatra se da su dva signala 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

Detektori u spektrometriji masa

- Elektronski pojačivači (electron multipliers)
- Faradejev kavez
- Fotomultiplikatori
- Fotografske ploče
- Detektor s mikrokanalnom pločom
- Detektori u nizu
- Detektor s induktivno spojenim plazmom

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)

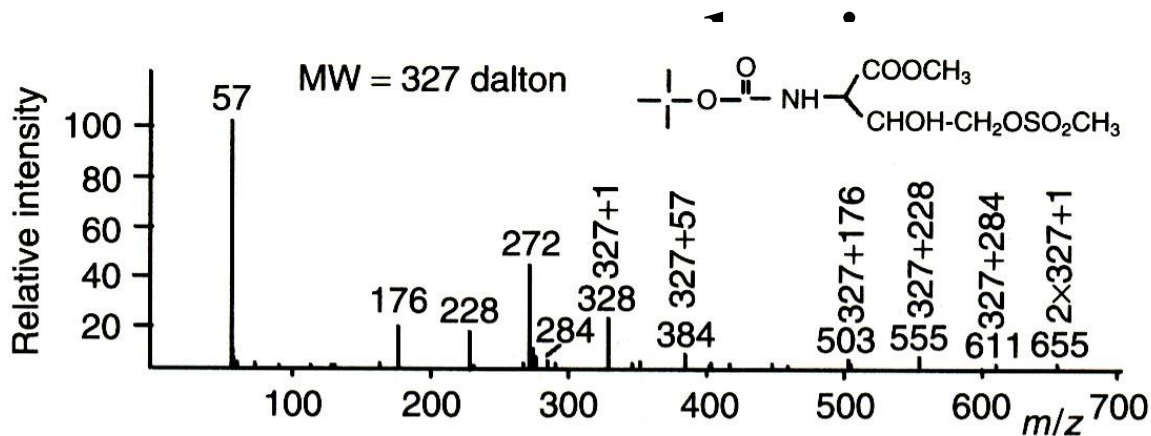
SPEKTRI MASA

Ionske serije – indikator tipa strukture

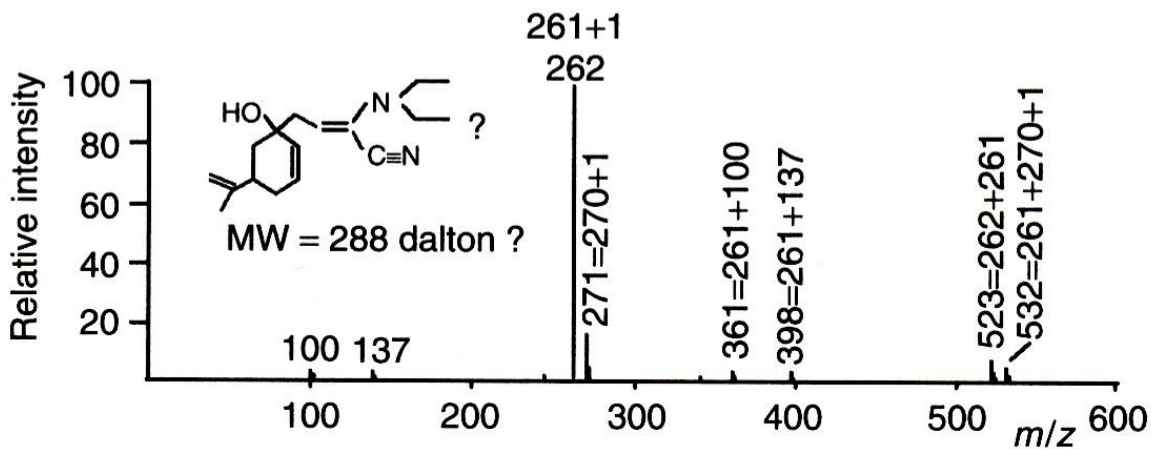
- alkilna: $15 + (14)n$ (m/z 29, 43, 57, 71...)
zasićeni alifatski ugljikovodici, ketoni,
aldehidi
- alkenilna: $13 + (14)n$ (m/z 27, 41, 55, 69...)
alkeni, cikloalkani, cikloalkanoni
- aromatska:
(m/z 39, 51 ± 1 , 64 ± 1 , 78 ± 1)
- kisikova: (m/z 31, 45, 59, 73)
- dušikova: (m/z 30, 44, 58, 72)

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

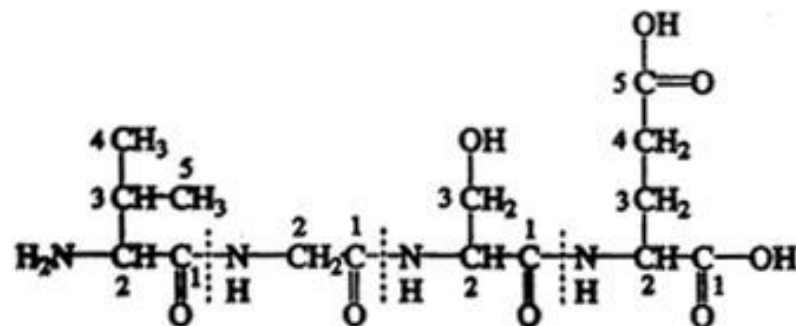
Spektri CI: izobutan



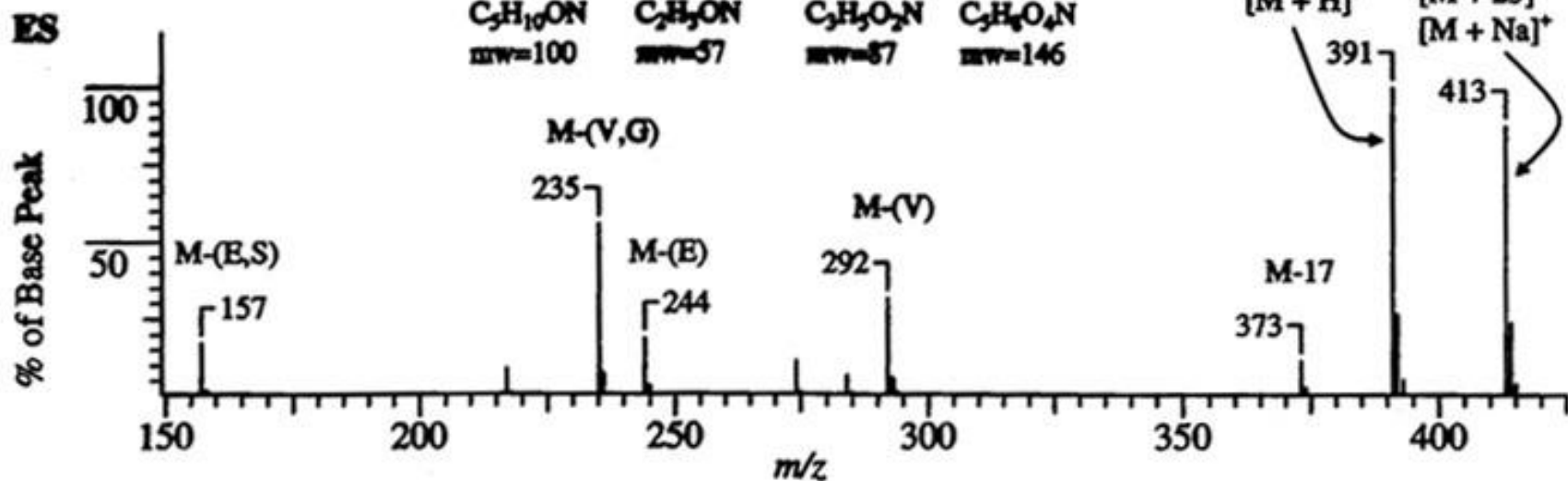
Čisti spoj

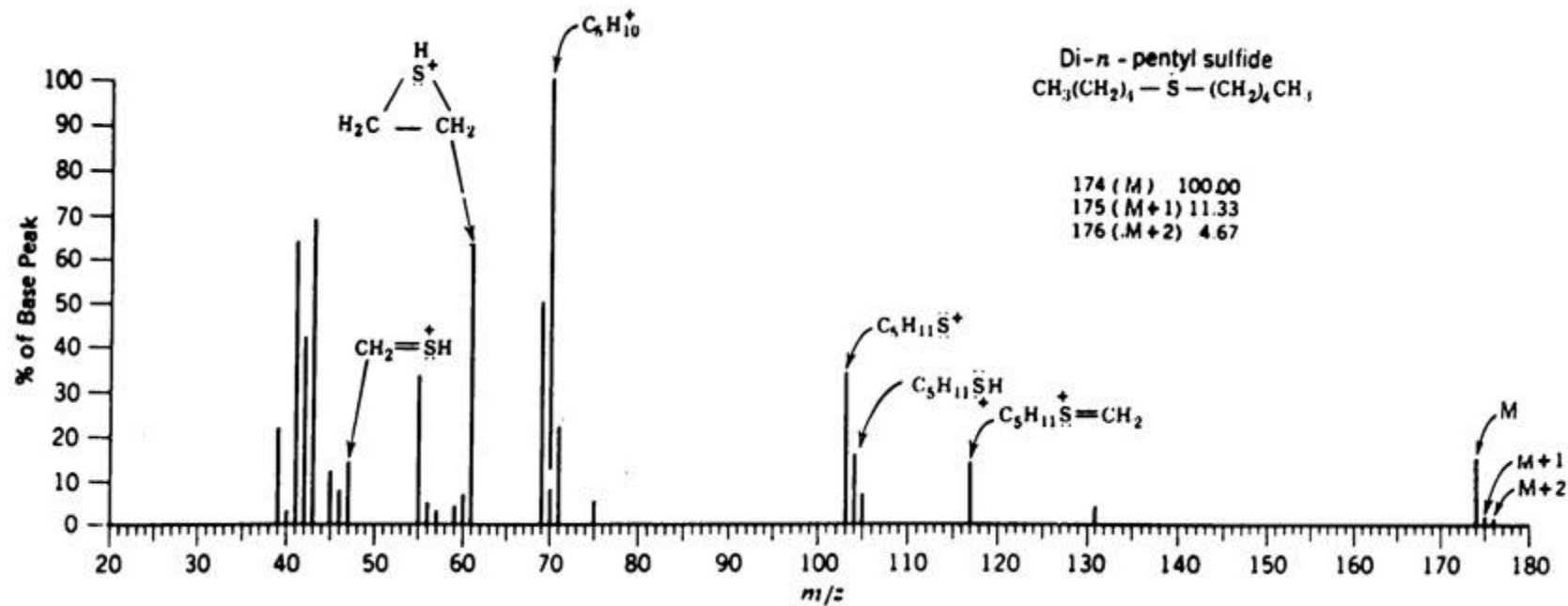


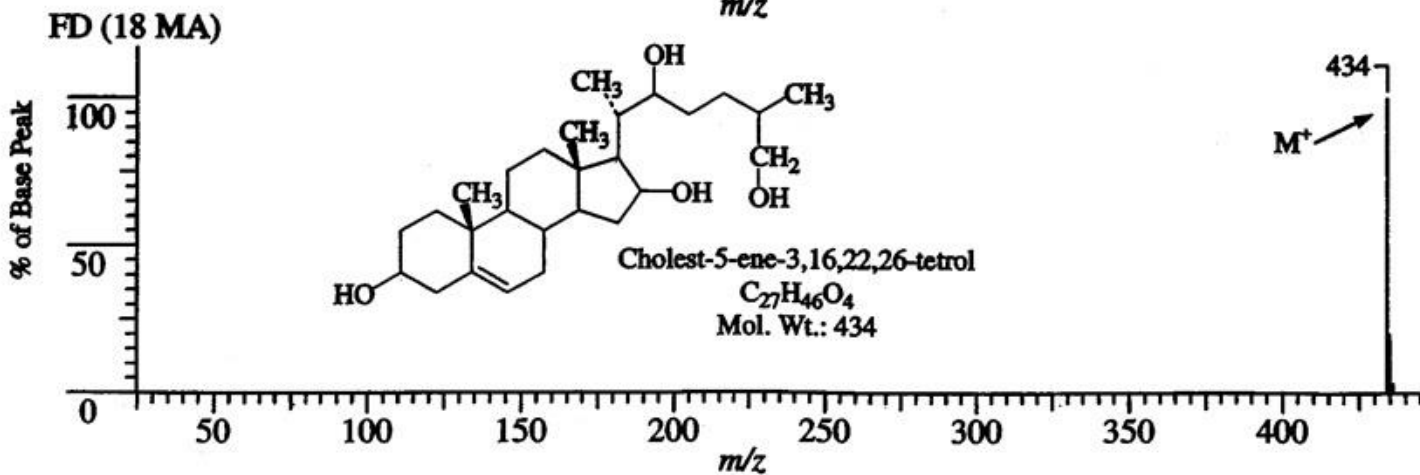
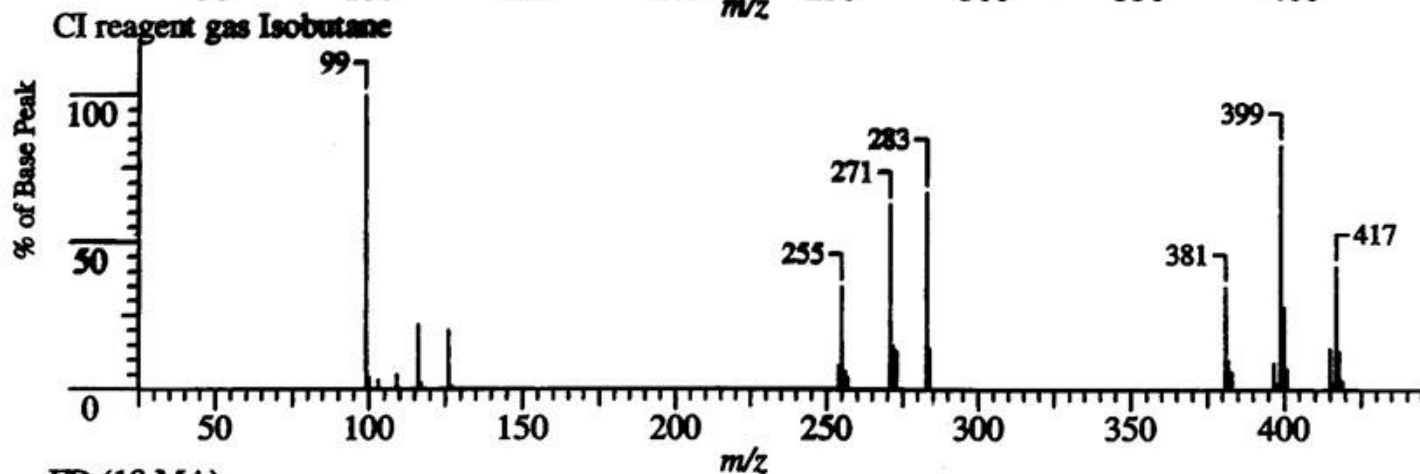
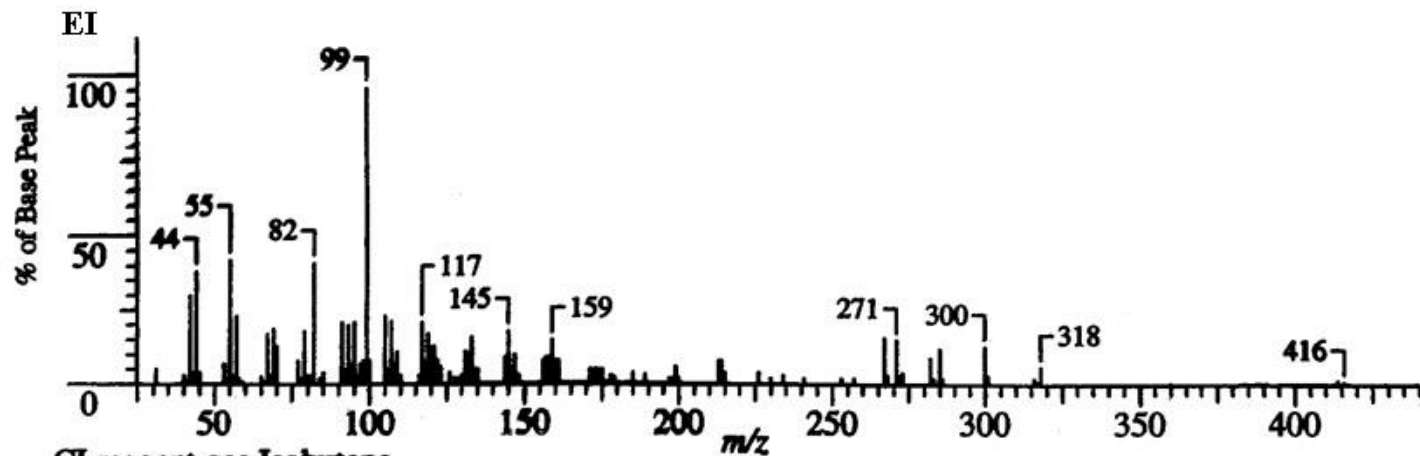
smjesa

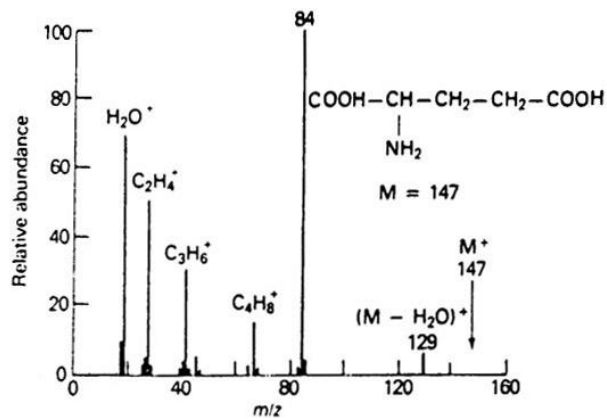


Valine (V)	Glycine (G)	Serine (S)	Glutamate (E)
$C_5H_{10}ON$	C_2H_3ON	$C_3H_5O_2N$	$C_5H_8O_4N$
mw=100	mw=57	mw=87	mw=146

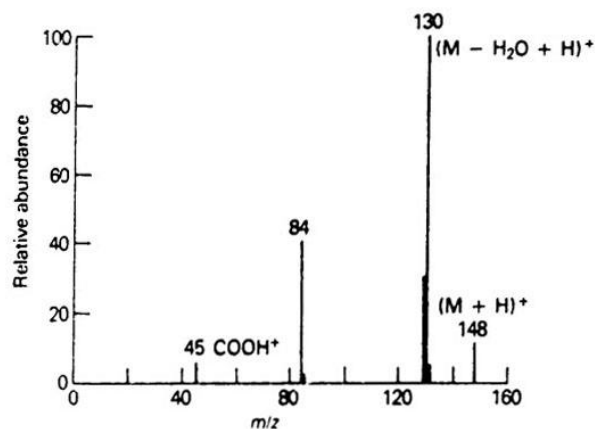




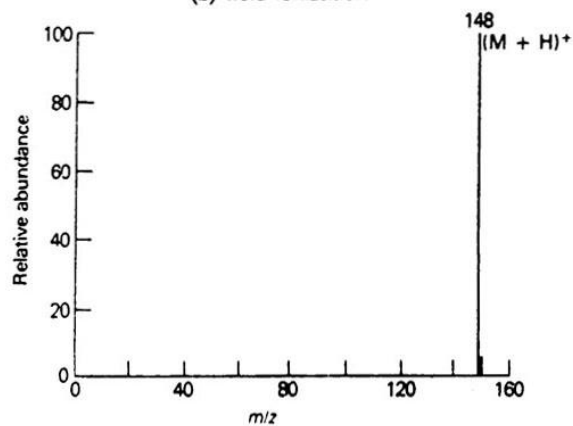




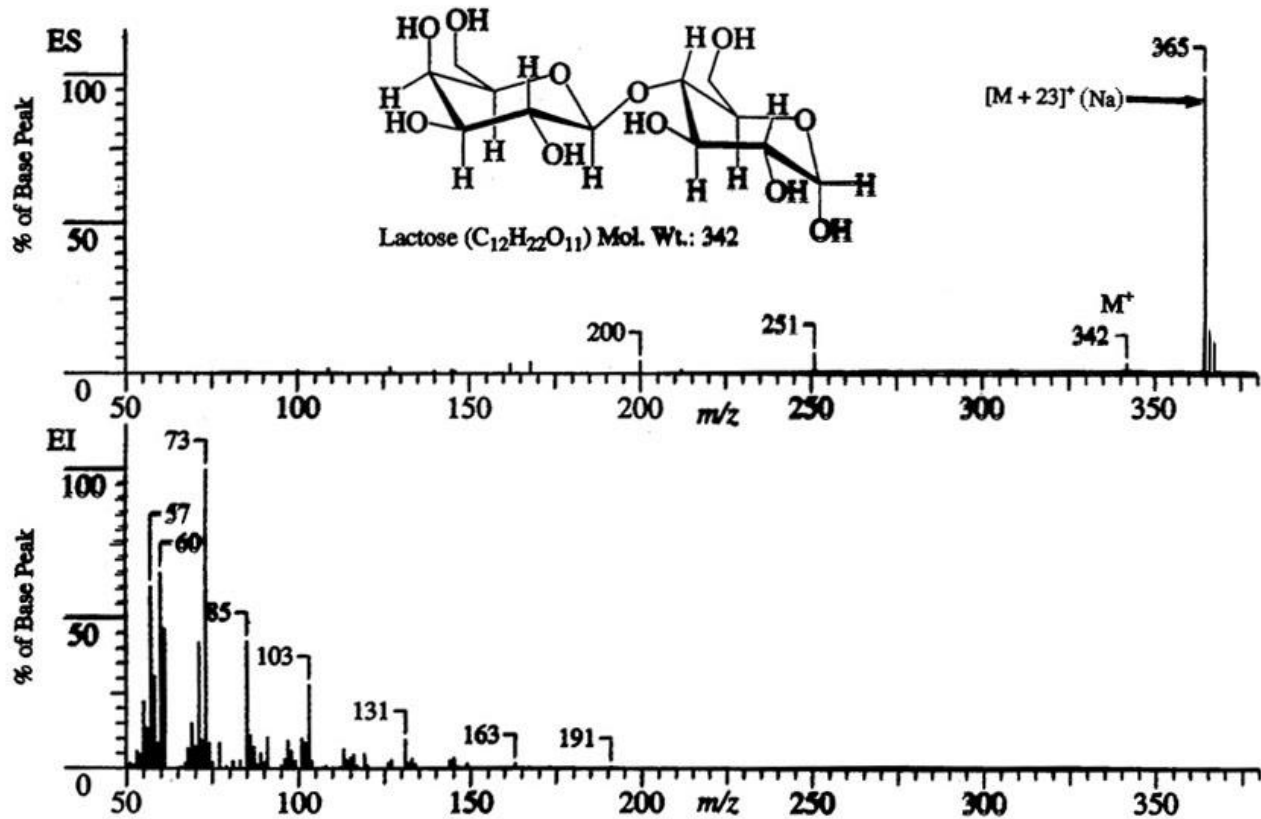
(a) electron impact ionization



(b) field ionization



(c) field desorption



Vrste ionizacijskih metoda i njihova kompatibilnost sa različitim tipovima masenih spektrometara

<i>Ionization method</i>	<i>Principal ions detected (+/-)^a</i>	<i>Mass spectrometer^b</i>	<i>Sample classes (approx. MW limit)</i>
electron impact EI	M ^{+•} and some fragment ions	M, Q	non-polar and some polar organic compounds, ≤ ca. 1000 da
chemical ionization CI	MH ⁺ M ⁻ , (M-H) ⁻ , M ^{-•}	M, Q	non-polar and some polar organic compounds, ≤ ca. 1000 da
electrospray ES	MH ⁺ , (M+nH) ⁿ⁺ (M-H) ⁻ , (M-nH) ⁿ⁻	M, Q, TOF	polar organics, proteins, biopolymers, organometallics, ≤ ca. 200 000 da
atmospheric pressure chemical ionization APCI	MH ⁺ (M-H) ⁻	M, Q	polar and some non-polar organic compounds, ≤ ca. 1000 da
fast atom/ion bombardment FAB/FIB/LSIMS	MH ⁺ (M-H) ⁻	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 ⁺ (M-H) ⁻	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 ⁺ , MNH ₄ ⁺ (M-H) ⁻	M, Q	polar and some non-polar organic compounds, ≤ ca. 1000 da
matrix assisted laser desorption ionization MALDI	MH ⁺ (M-H) ⁻	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}
z dvostrukih veza	izostanak 2z vodika
trostruka veza	2 ekvivalenta dvostruke veze
halogeni (F, Cl, Br, I)	ekvivalenti 1 vodiku
Si, Ge, Sn, Pb	ekvivalenti ugljiku
Ciklička struktura	1 ekvivalent dvostruke veze

- $F (IDV) = (2n + 2 + m) - X / 2$

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

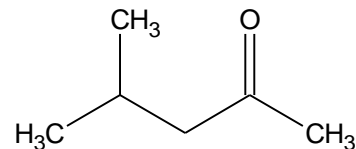
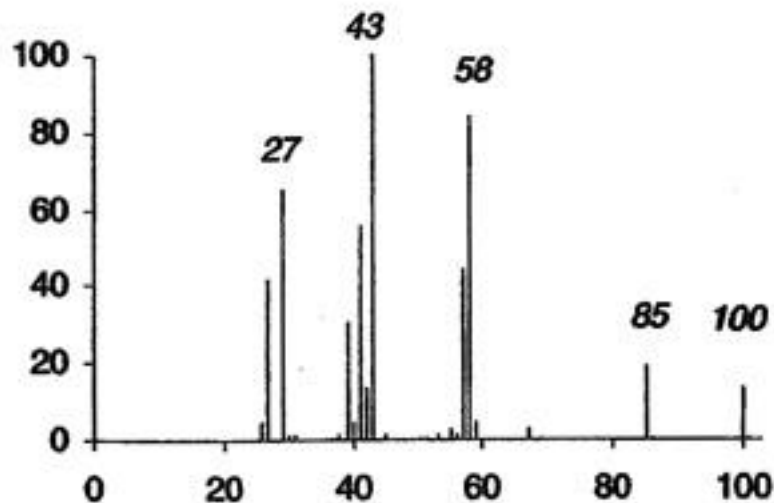
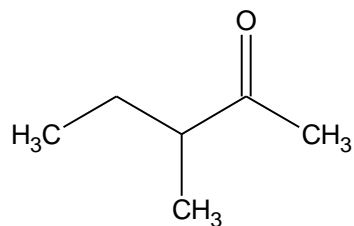
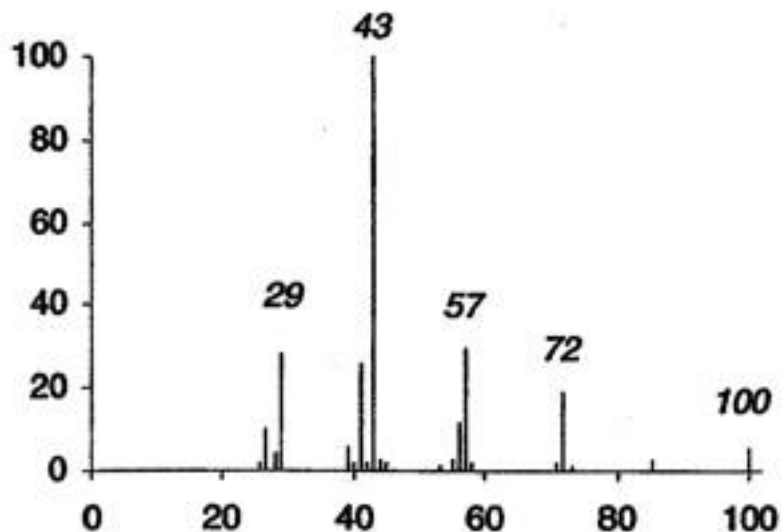
2) zamjeni halogen vodikom

3) zamjeni dušik skupinom CH

4) usporedi hipotetski ugljikovodik C_nH_x sa sastavom zasićenog ugljikovodika C_nH_{2n+2}

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

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



Spregnute 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

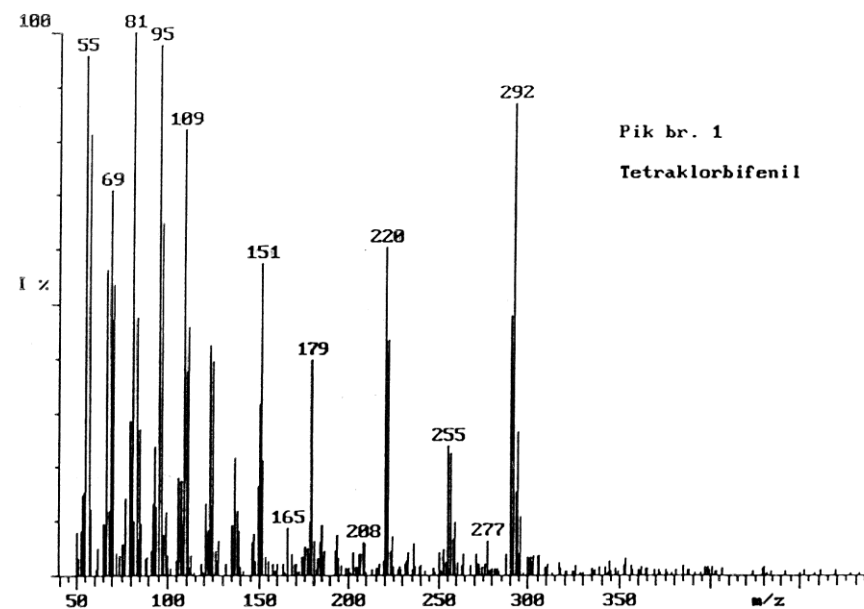
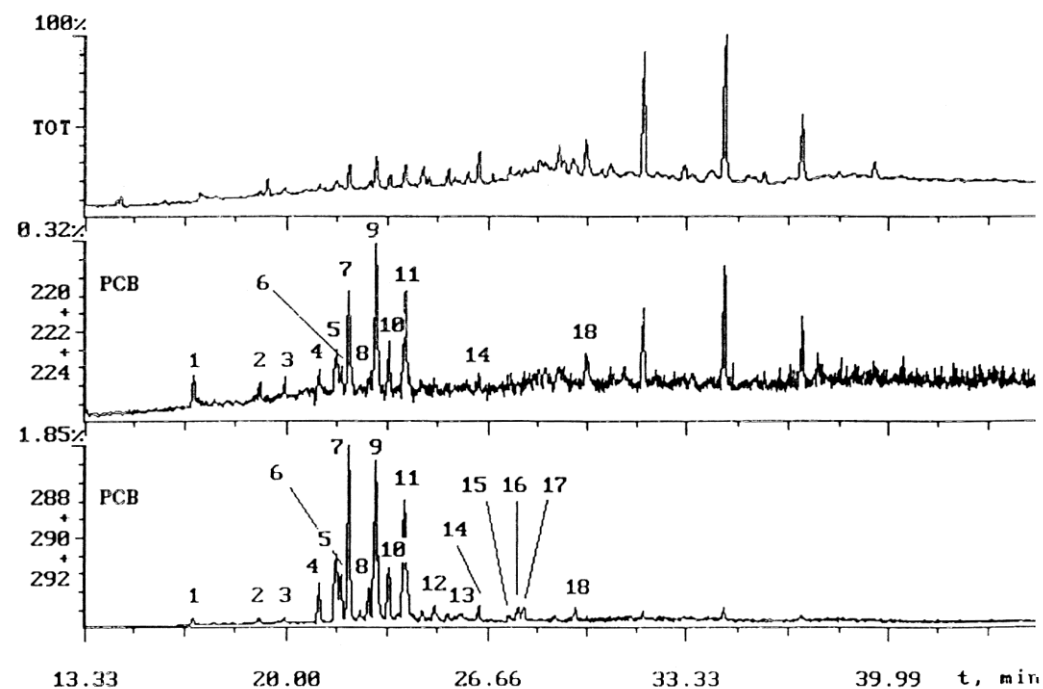
<i>Sample classes</i>	<i>Chromatographic interfaces</i>	<i>Ionization methods</i>	<i>Mass spectrometer^a</i>
proteins, peptides, oligonucleotides, oligosaccharides	LC, CE	ES	M, Q, TOF
	low flow LC, CE	FAB/FIB/LSIMS	M, Q
	none	MALDI	TOF
polar organic compounds	GC	CI	M, Q
	LC, CE	ES	M, Q
	LC	APCI	M, Q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

M = magnetni sektor

Q = kvadrupol

TOF = vrijeme leta (time-of-flight)

Primjena GC-MS



Spektar MS tetraklorbifenila

Kromatogram ukupne ionske struje i fragmentogrami polikloriranih bifenila ekstrahiranih iz tla

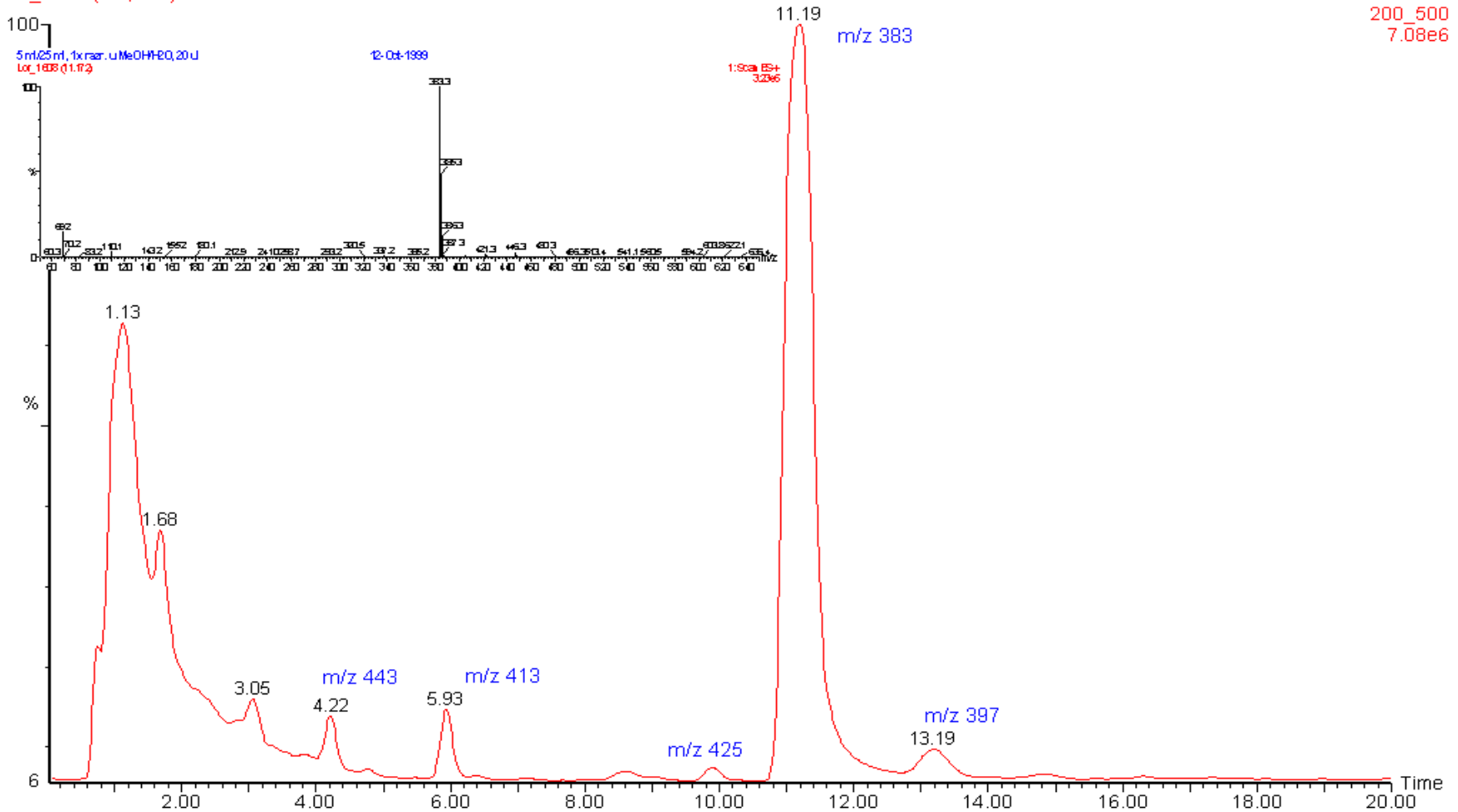
Primjena LC/MS

5 ml/25 ml, 1x razr. u MeOH/H2O, 20 ul

12-Oct-1999

Lor_1 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+
200_500
7.08e6



Sprega tekućinske kromatografije i NMR-a

LC-NMR

HPLC

pumpa

detektor

Otapalo
(deuterirano)

kolona

NMR

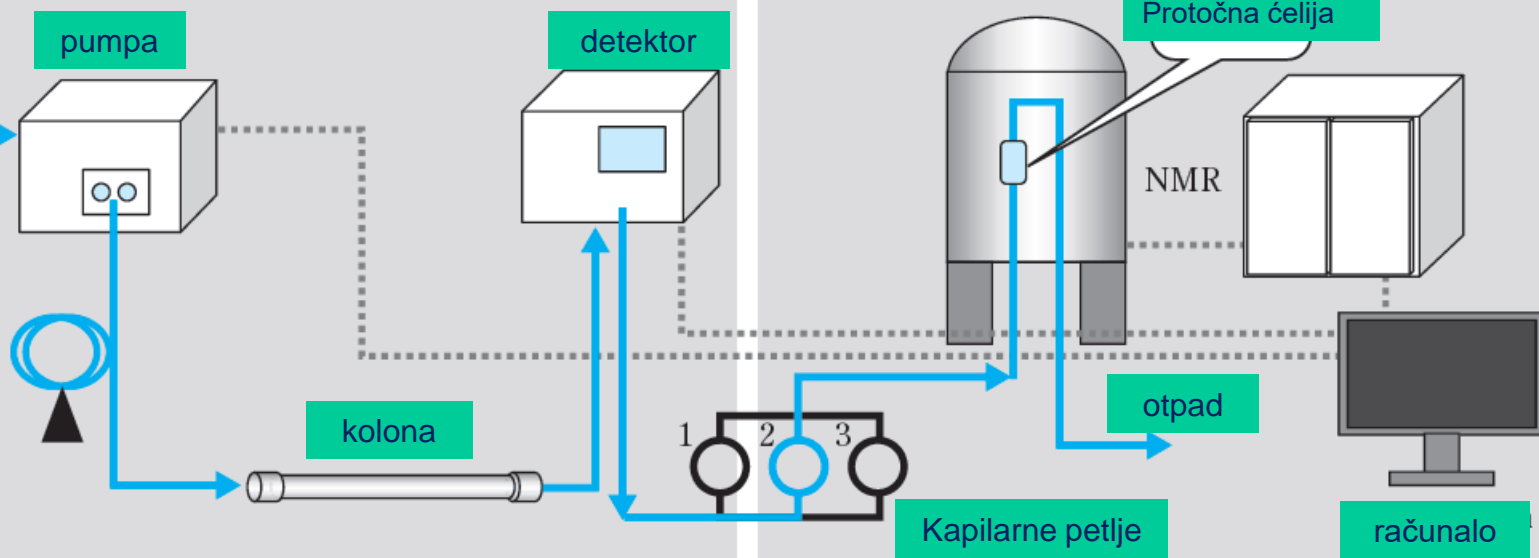
Protočna ćelija

NMR

otpad

Kapilarne petlje

računalo



Načini izvedbe LC-NMR-a

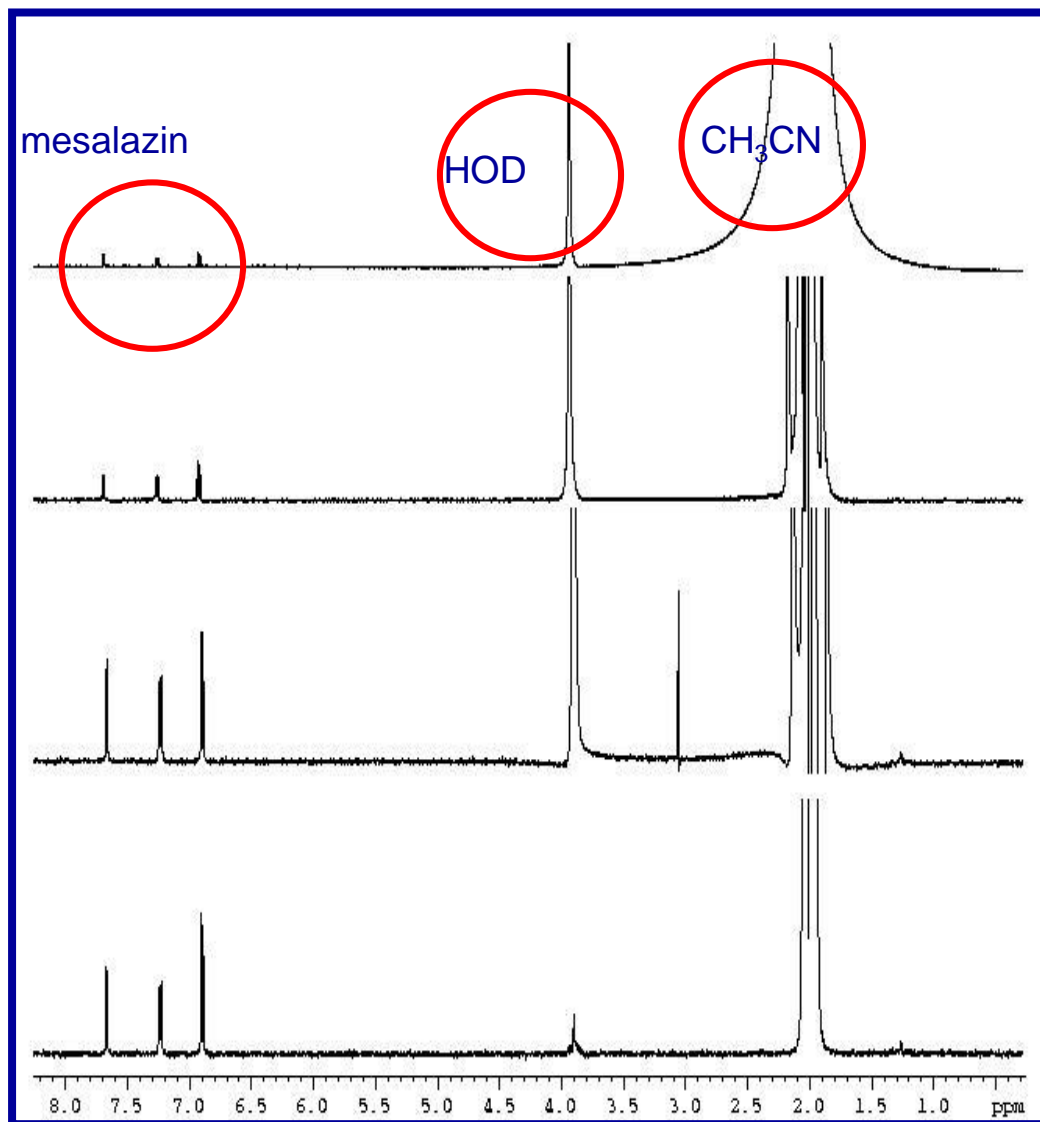
- Kontinuirani protok (on-flow)
 - Izvedivo za ^1H i ^{19}F (osjetljivost)
 - Za uzorke nepoznatih kromatografskih svojstava
 - Labilni spojevi (razgradnja, izomerizacija)
- Zaustavljeni protok u vremenskim intervalima (time-slice)
 - Loše odvojive komponente u smjesi
 - Slaba ili nikakva UV kromofora
 - Slabo definirana retencijska vremena
- Zaustavljeni protok (stopped-flow)
 - Poznata retencijska vremena komponenata u smjesi
 - Poznate UV kromofore
- Skladištenje u kapilarnim petljama (loop transfer)
 - LC pikovi se skladište u kapilarne petlje
- LC-SPE-NMR
 - LC pikovi se skladište u SPE (solid phase extraction) patronama (cartridge)

Tehnike supresije signala otapala

- Prezasićenje (NOESY tip, “shaped” pulsevi)
 - Jednostruka, dvostruka, i višestruka supresija signala
- WET (water suppression enhanced through T_1 effects)
- WATERGATE (water suppression by gradient-tailored excitation)
- Excitation sculpting (dvostruka spinska-jeka pfg)

Protonski spektri mesalazina u 71% CH₃CN i 29% D₂O

a) običan spektar



b) prezasićenje CH₃CN

c) dvostruko prezasićenje CH₃CN
i HDO

d) Dvostruko prezasićenje
CH₃CN i HDO uz ¹³C
rasprezanje

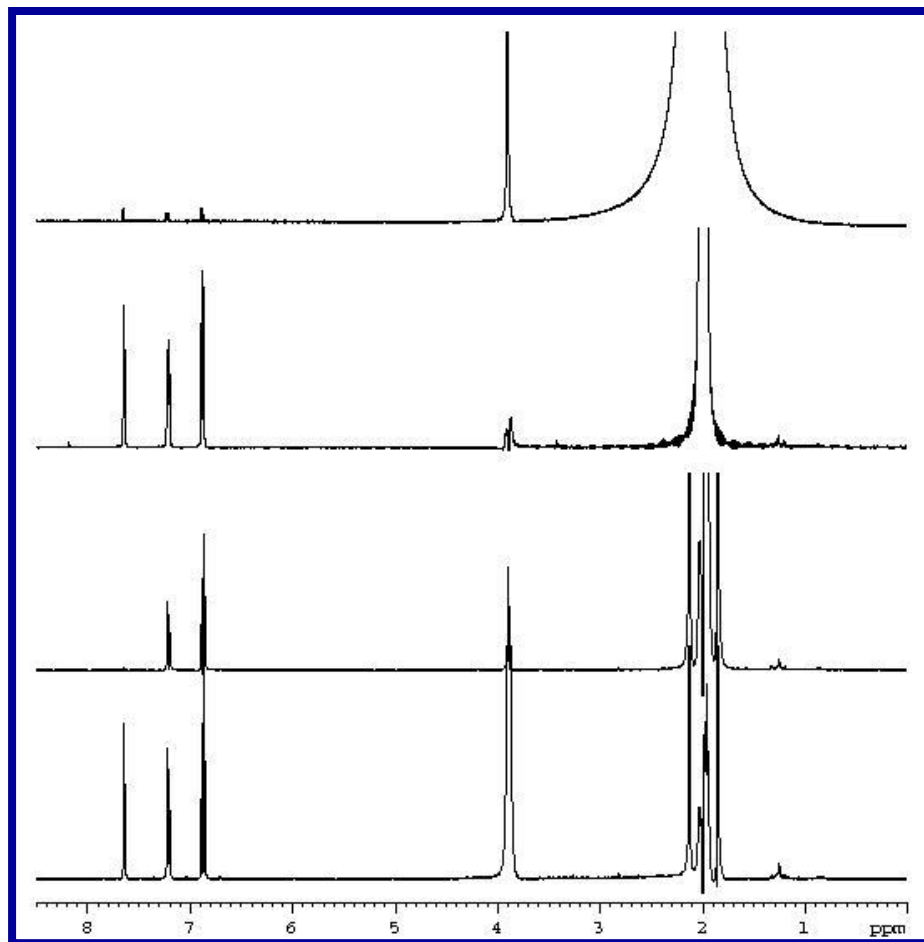
Protonski spektri mesalazina u 71% CH₃CN i 29% D₂O

a) Običan spektar

b) WET višestruka supresija otapala

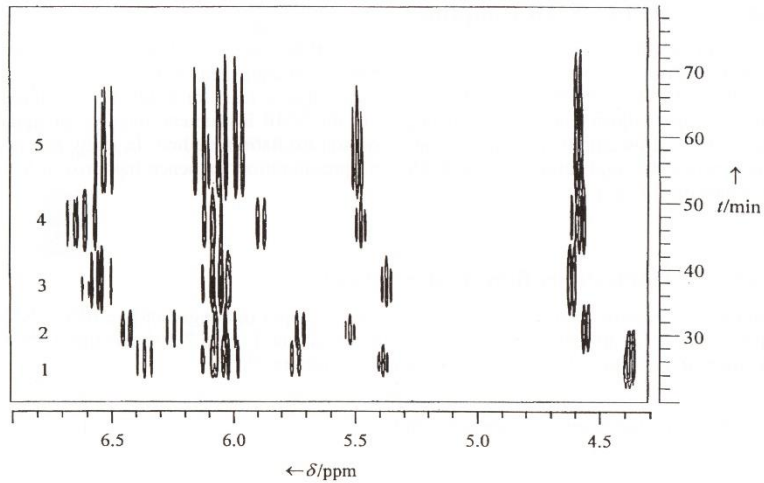
c) 3-9-19 WATERGATE (W3)

d) 3-9-19 WATERGATE (W3)

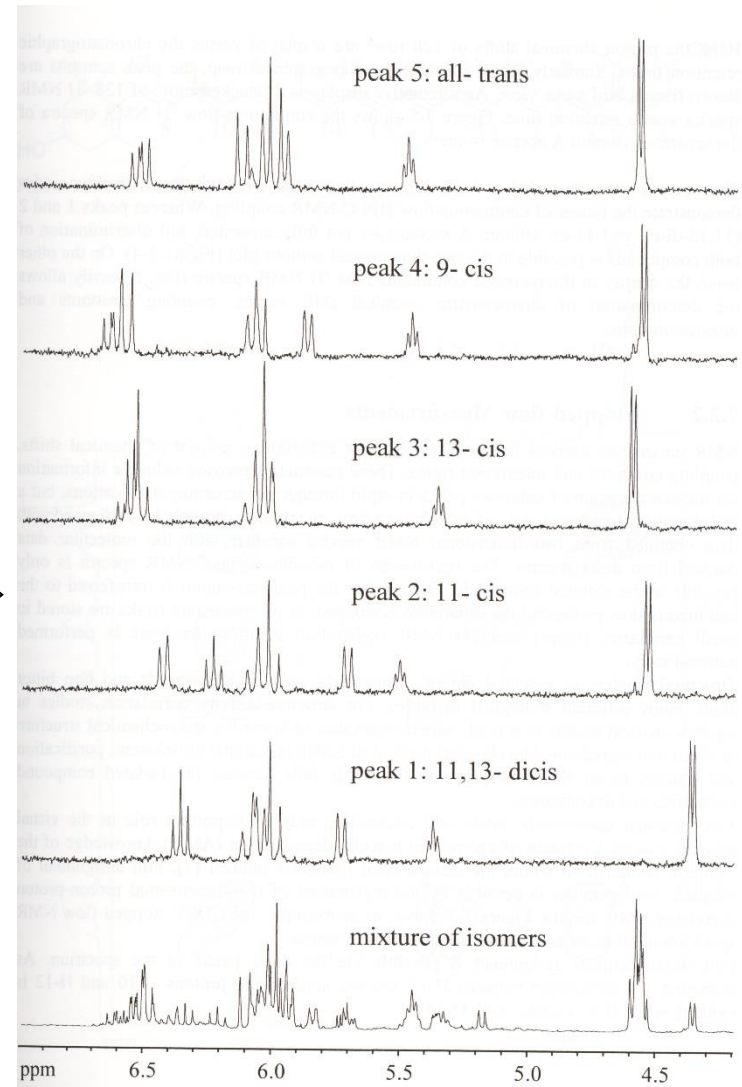


Tipični LC-NMR spektri kontinuiranoga protoka

^1H LC-NMR spektri kontinuiranog protoka



Odvajanje izomera vitamina A



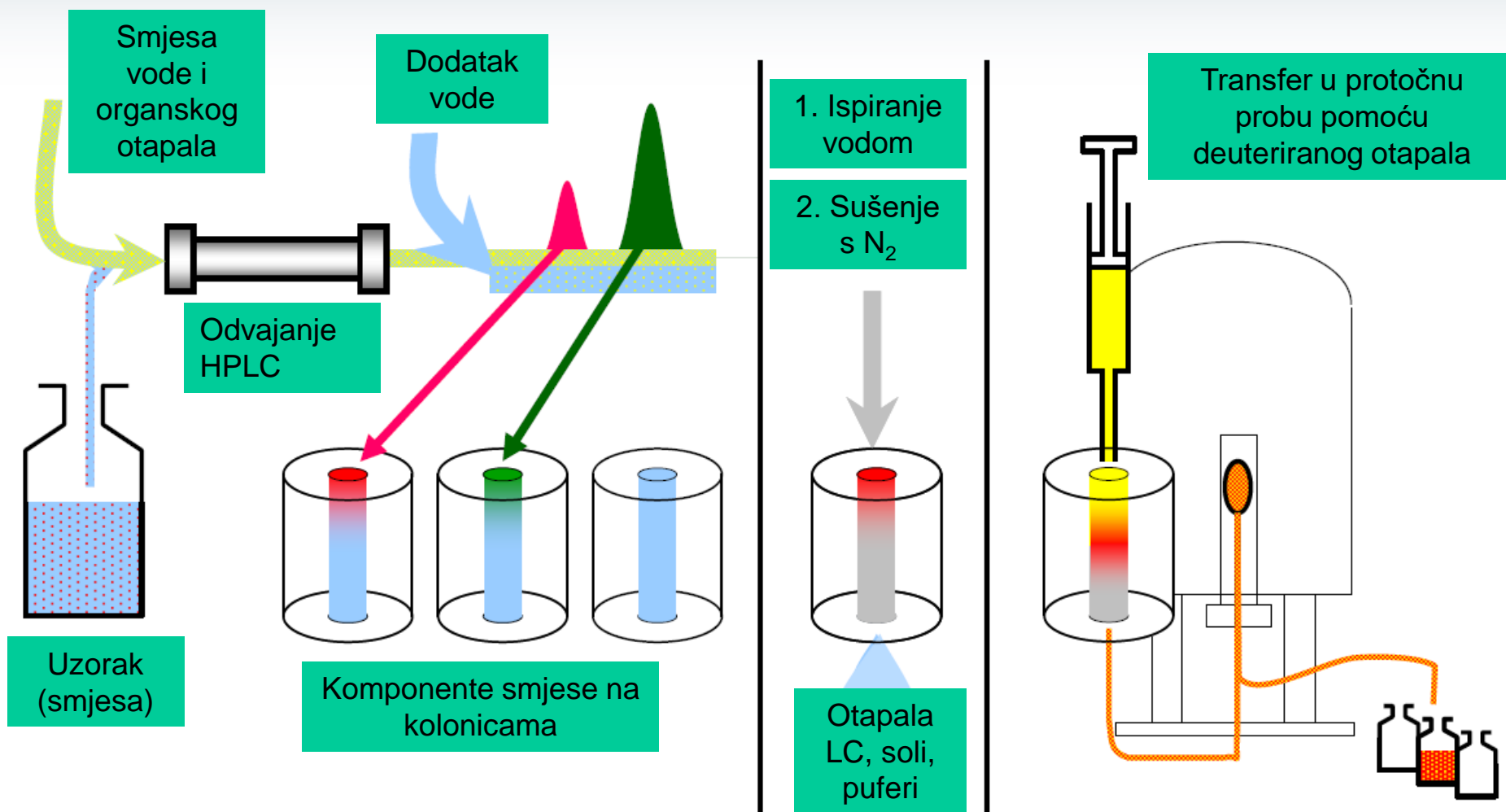
Ograničenja LC-NMR-a

- Količina uzorka za NMR limitirana je kromatografijom
- Samo dio LC signala nalazi se unutar protočne NMR probe
- Količina od samo jednog injektiranja je dostupna za NMR
- Nedeuterirana otapala daju jake pozadinske signale
- Deuterirana otapala (obično D_2O) preskupa su za kromatografiju i onemogućuju opažanje izmjenjivih protona

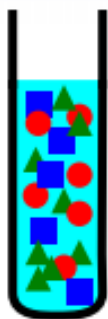
Rješenje: sprega ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE)

- Nakon kromatografskog odvajanja za skladištenja pikova u SPE patronama (kolonicama)
- Patrone se suše u struji dušika za otklanjanje otapala
- Nedeuterirana otapala se mogu koristiti za odvajanje komponenti smjese u LC-u
- Oblik LC pika nije bitan za NMR
- Deuterirana otapala se mogu koristiti za ispiranje uzoraka s patrona i uvođenje u NMR protočnu probu
- Nije potrebna supresija signala otapala
- Mogu se opažati izmjenjivi protoni
- Manji volumen eluiranja, povećanje S/N
- Mogućnost višestrukog skladištenja (trapping) LC pikova za povećanje koncentracije za NMR

SPE- ukoncentriravanje za NMR



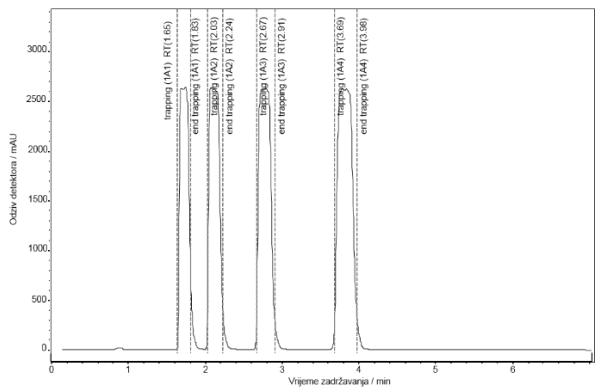
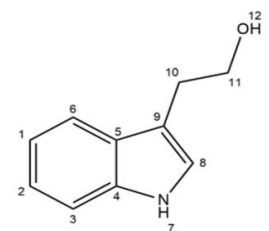
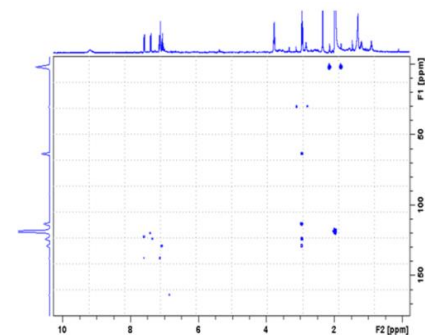
Sustav LC-SPE / krio NMR



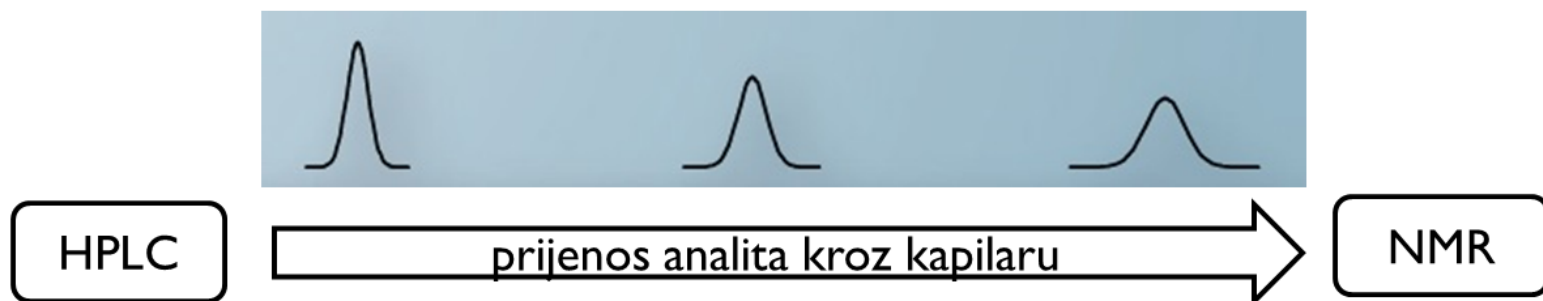
Odjeljivanje

Izdvajanje (ekstrakcija)

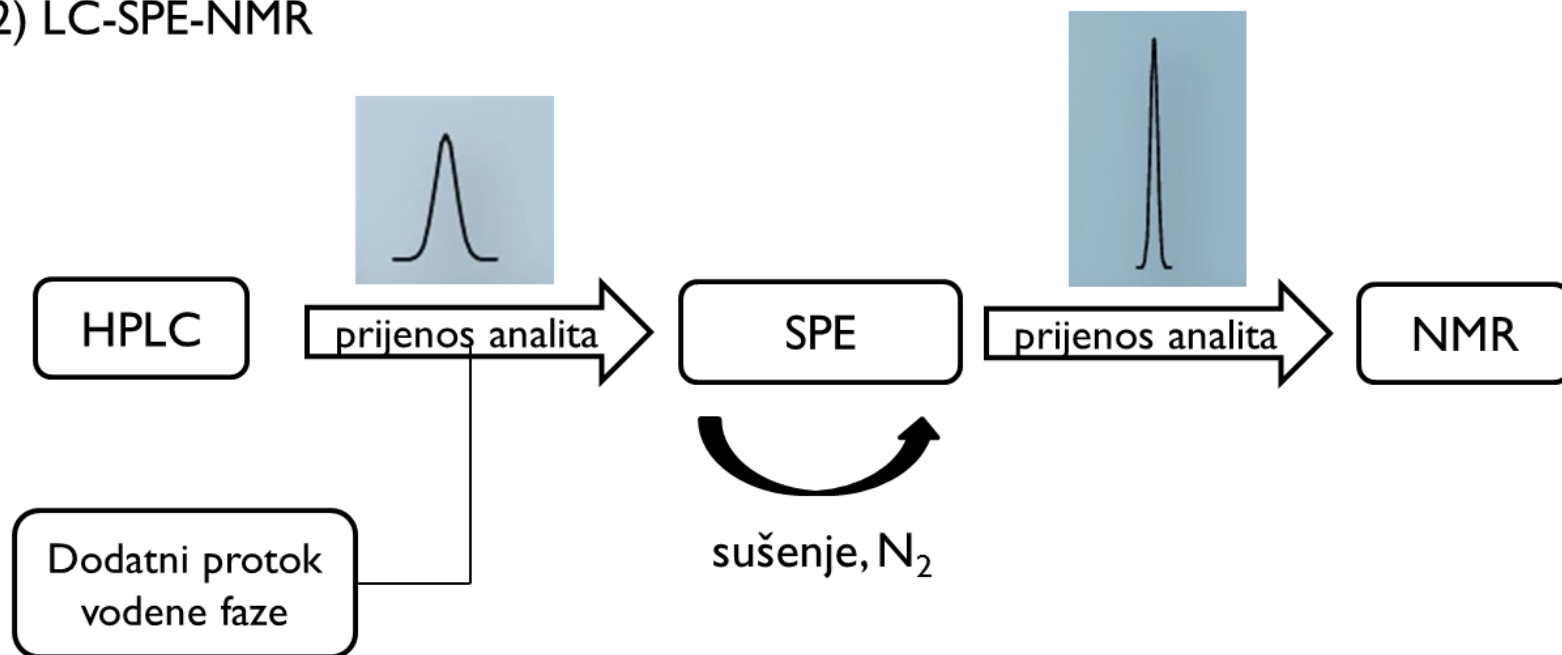
Detekcija



1) LC-NMR



2) LC-SPE-NMR



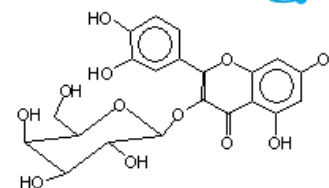
Oblik kromatografskog pika u 1) tehnici LC-NMR i 2) tehnici LC-SPE-NMR

LC-SPE-NMR

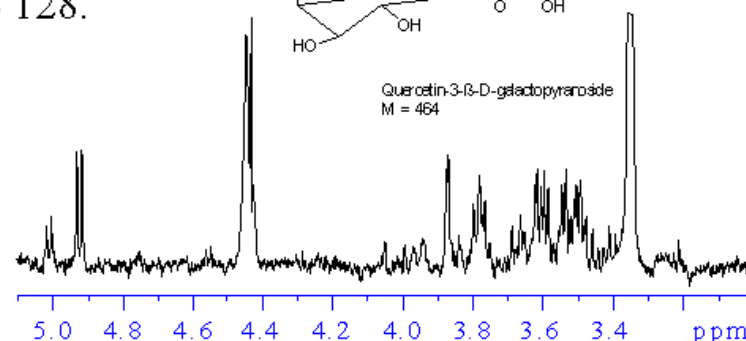
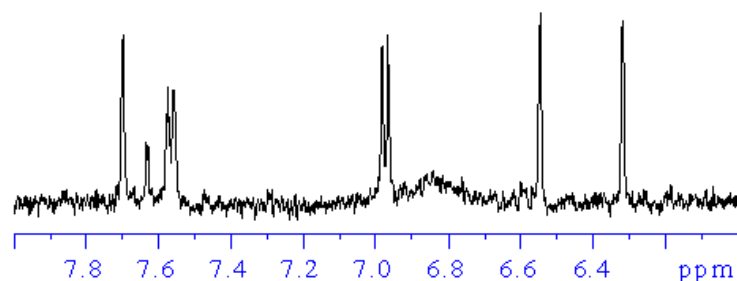


LC-NMR vs. LC-SPE-NMR

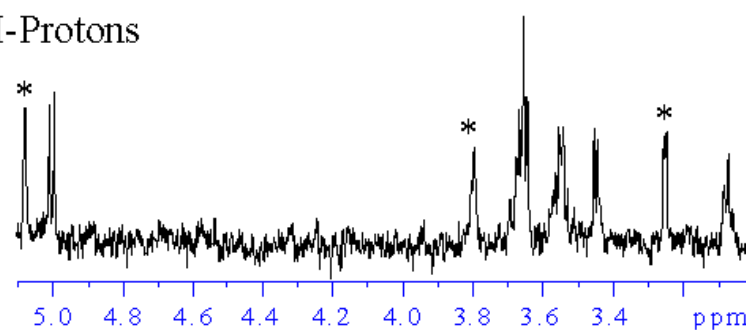
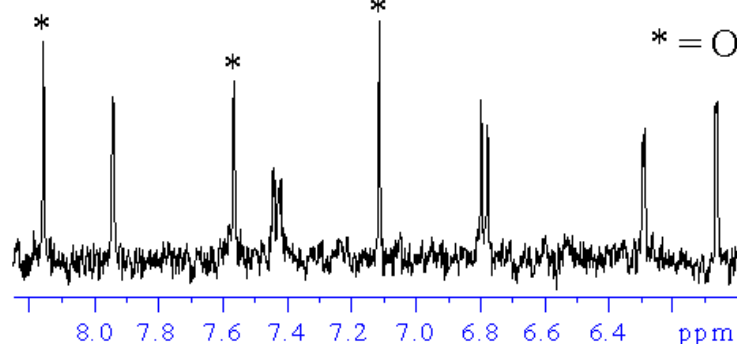
- LC-NMR with 100 μ l injection, NS 128.
- LC-SPE-NMR with 20 μ l injection, NS 128.



Guarosin-3- β -D-galactopyranoside
M = 464



* = OH-Protons



Primjena tehnike LC-SPE-NMR

analiza biljnih ekstrakata

analiza maslinovog ulja

analiza tropskog voća

analiza metabolita *in vitro*

analiza organskog sastava tla i sedimenata

analiza onečišćenja i razgradnih produkata u aktivnim farmaceutskim pripravcima

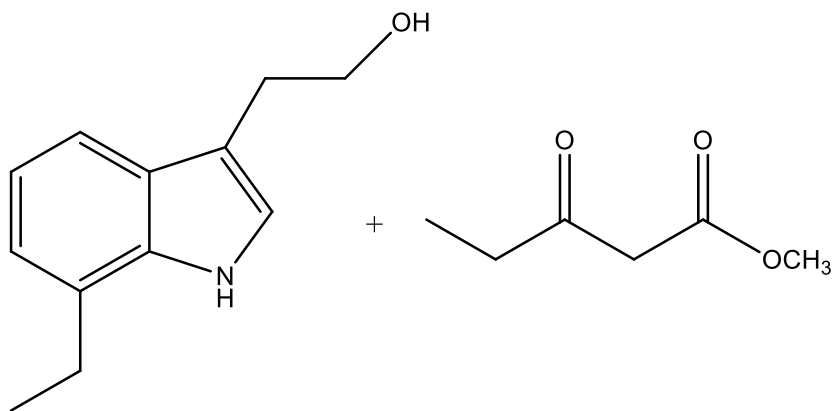
LC²-SPE-NMR za analizu složenih smjesa i onečišćenja s udjelom oko 0,1 %

LC-NMR u farmaceutskim istraživanjima

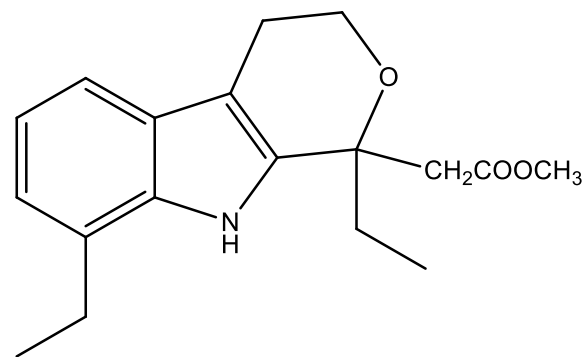
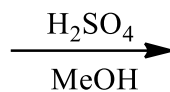
- Određivanje strukture bioaktivnih molekula
- Brza analiza smjesa
 - Nečistoće u lijekovima (>0.1%)
 - Degradacijski produkti
- Analiza prirodnih spojeva
 - Komponente ekstrakata
- Kombinatorijska kemija
- Praćenje kemijskih reakcija
- Metabolizam lijekova
 - NMR-metabonomika

Primjer: analiza LC-SPE krio-NMR 7-etiltriptofola

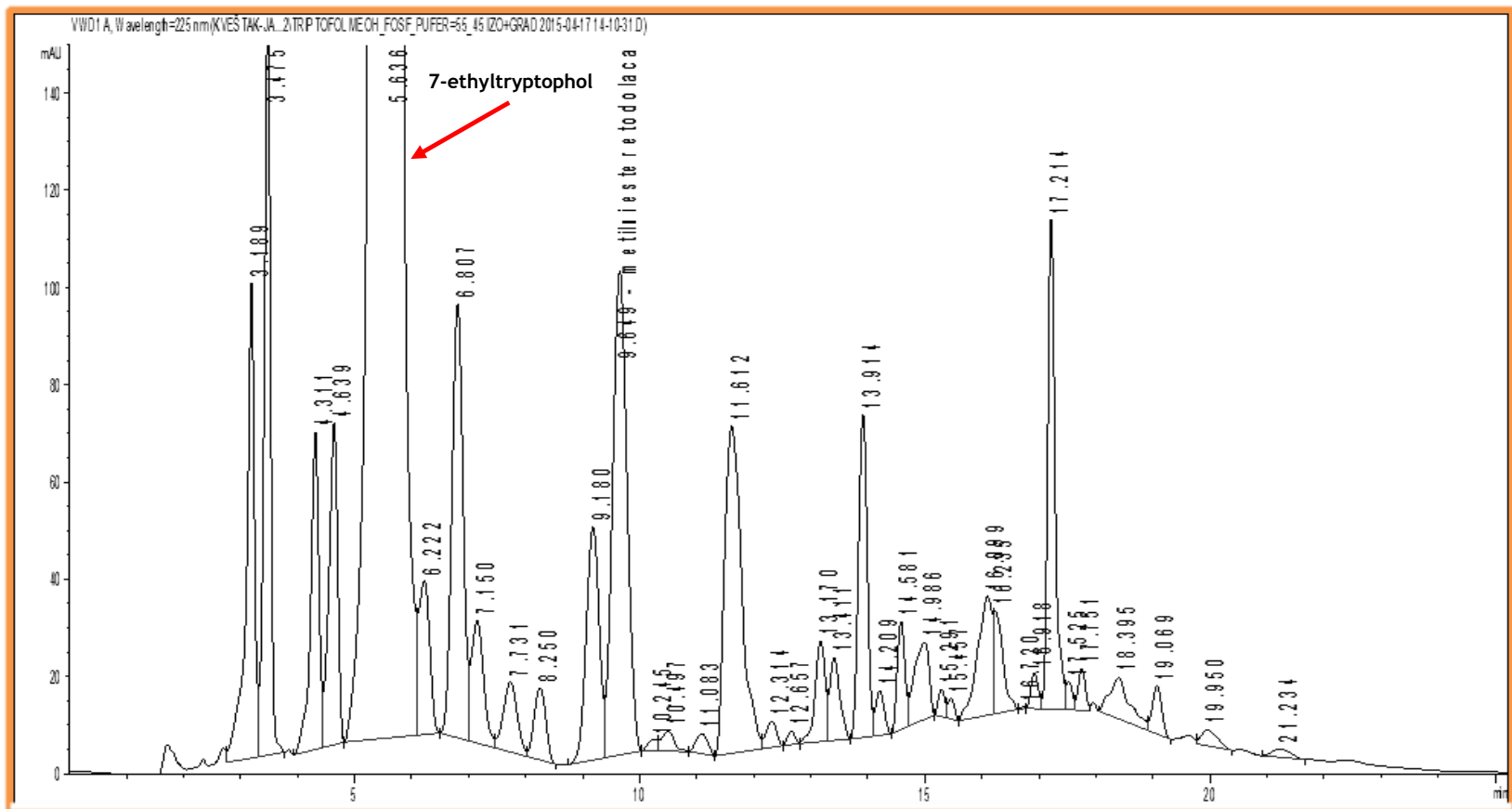
- Prekursor u sintezi etodolaka
- Lječenje reumatoidnog artritisa



7-ethyltryptophol + Methyl 3-oxopentanoate



Methyl ester of Etodolac



LC-kromatogram uzorka 7-etiltriptofola

Optimal uvjeti

kolona: Waters XBridge Phenyl (150 mm × 4.6 mm; 3.5 μm)

mobilna faza: metanol-fosfatni pufer (pH 7), gradientna metoda

protok: 1 ml/min

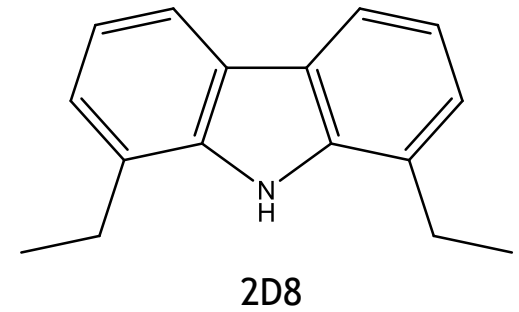
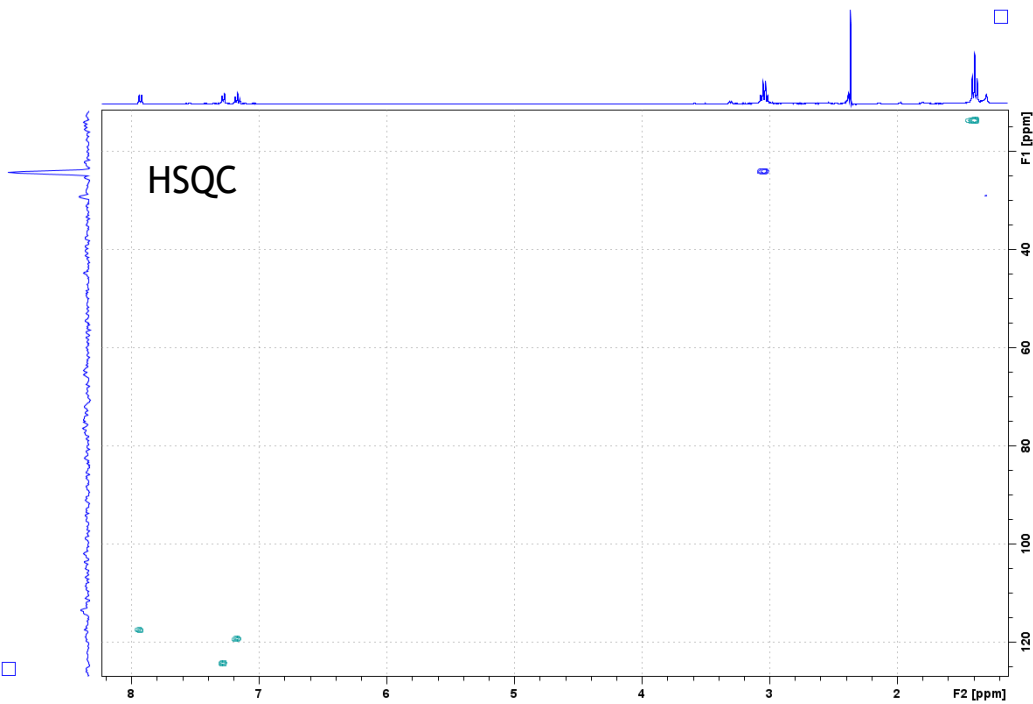
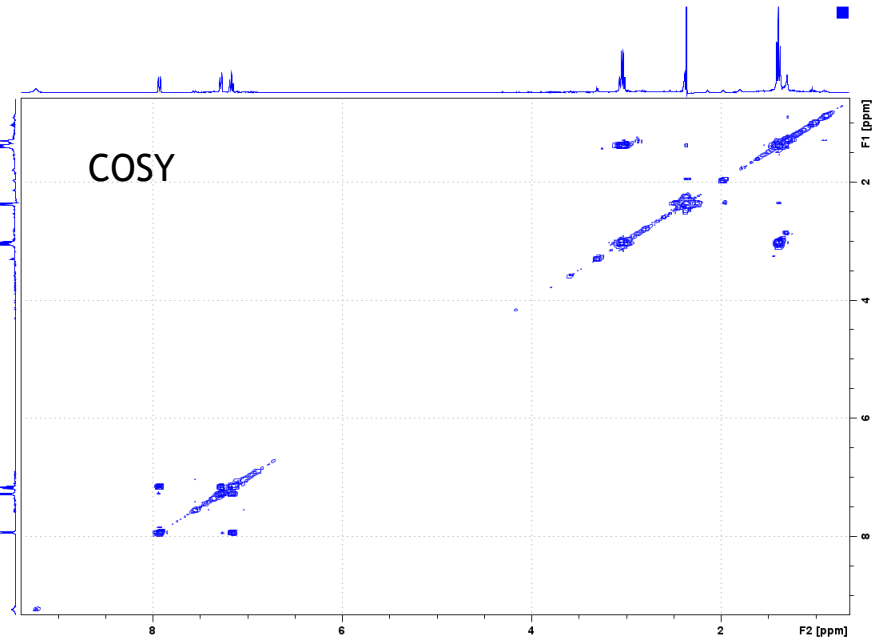
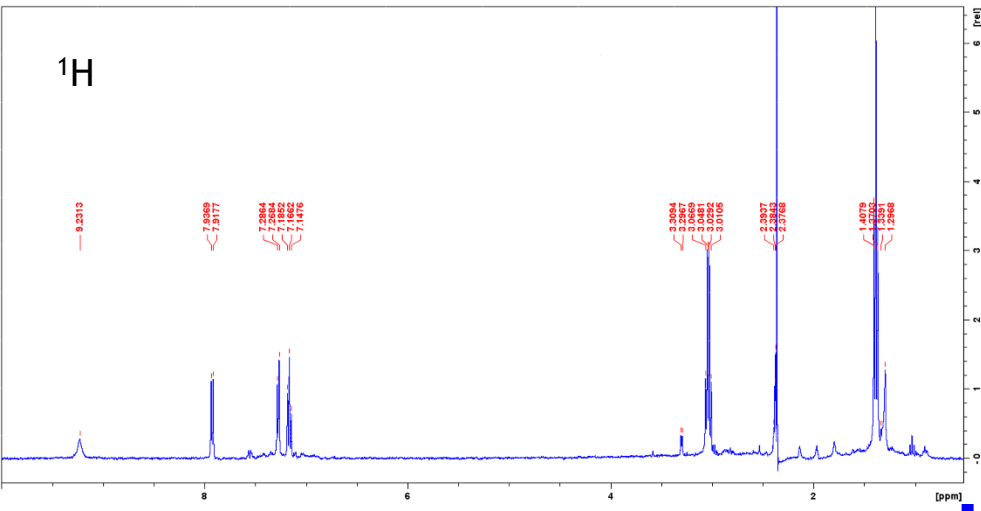
temperatura: 25 °C

injektirani volumen: 20 μl

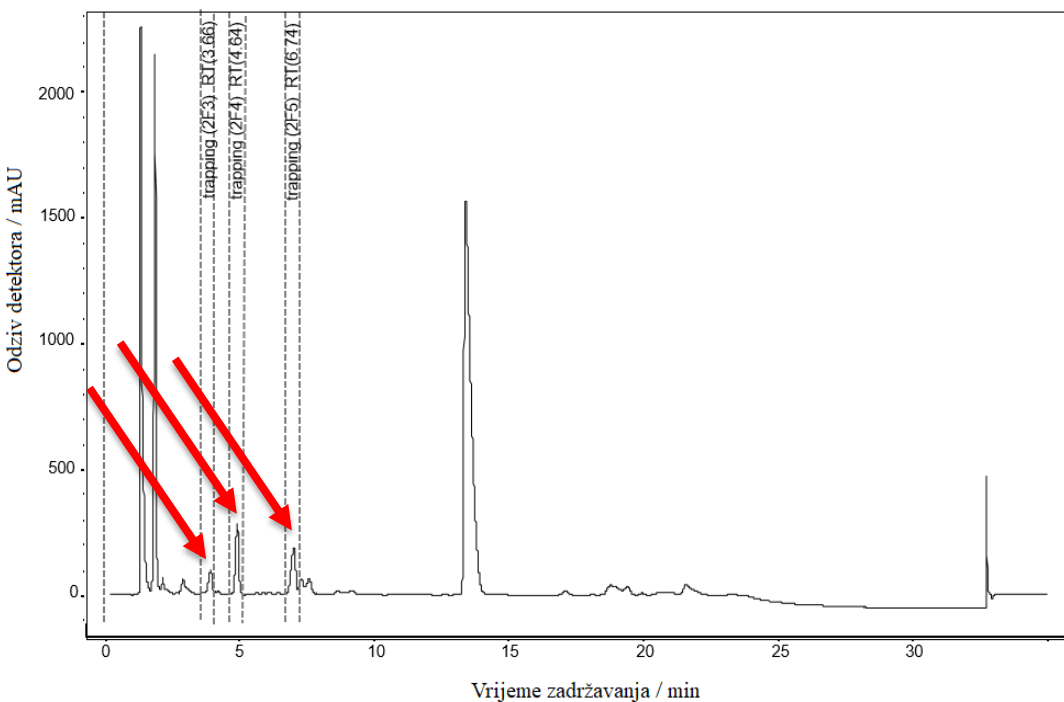
UV detekcija: 225 nm, 273 nm

početna masa: 10 mg

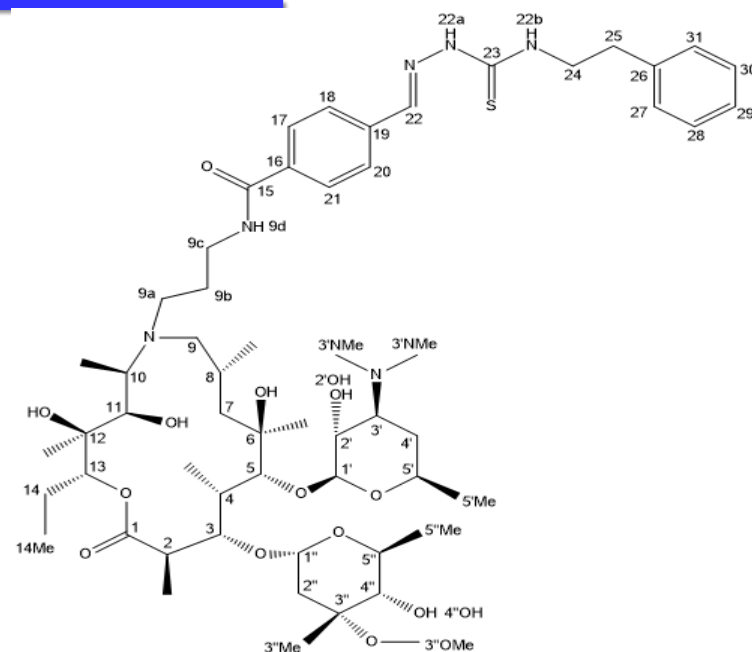
onečišćenje 2D8



Izolacija i identifikacija nepoznatih onečišćenja u reakcijskoj smjesi priprave makrozona

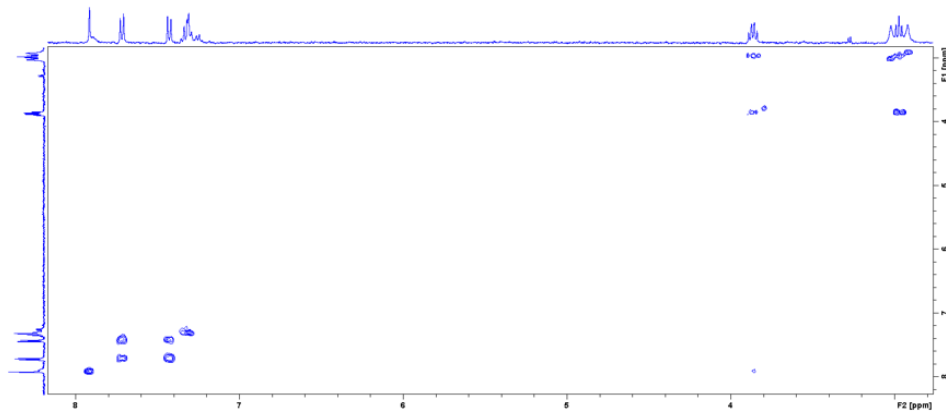


LC-UV kromatogram reakcijske smjese



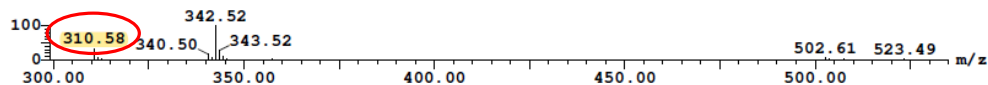
Imp RRT 0,286

Spektar LC-SPE COSY

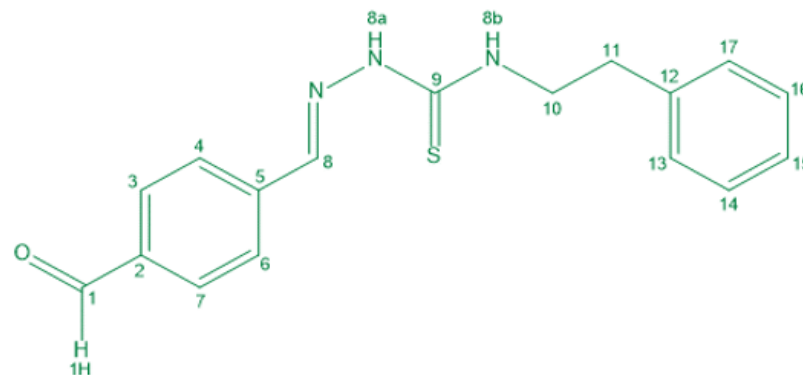


Slika 14. Spektar COSY onečišćenja Imp RRT 0,286 snimljen u acetonitrilu-*d*3 pri 25 °C.

Spektar MS



Slika 15. Spektar ESI-MS onečišćenja Imp RRT 0,286.



Slika 16. Predložena struktura onečišćenja Imp RRT 0,286

LC-IR i GC-IR

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

odvajanje 

kromatografija

detekcija 

infracrvena spektroskopija

Prednosti

- mjerenje u realnom vremenu
- visoko razlučivanje
- kombinacija spektroskopskih i kromatografskih informacija o analitu
- manja mogućnost kontaminacije, oksidacije i kristalizacije analita¹

Nedostaci

- poteškoće prilikom korekcije pozadinskog zračenja
- loša osjetljivost

- podaci dobiveni vezanim tehnikama kromatografije i infracrvene spektroskopije zahtijevaju statističku obradu
- najznačajnije multivarijatne 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

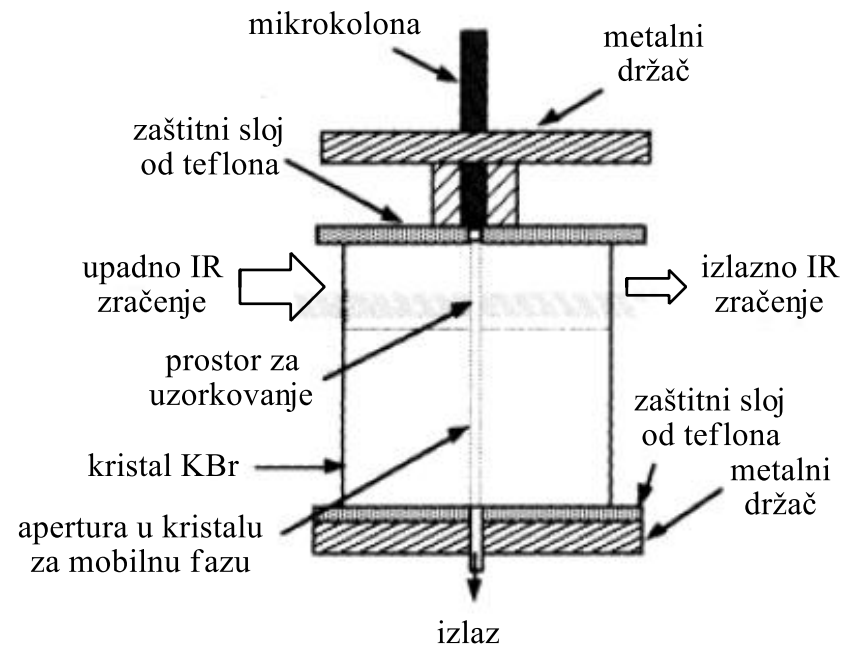
Vežane tehnike kromatografije i infracrvene spektroskopije *on-line*:

- 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* (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

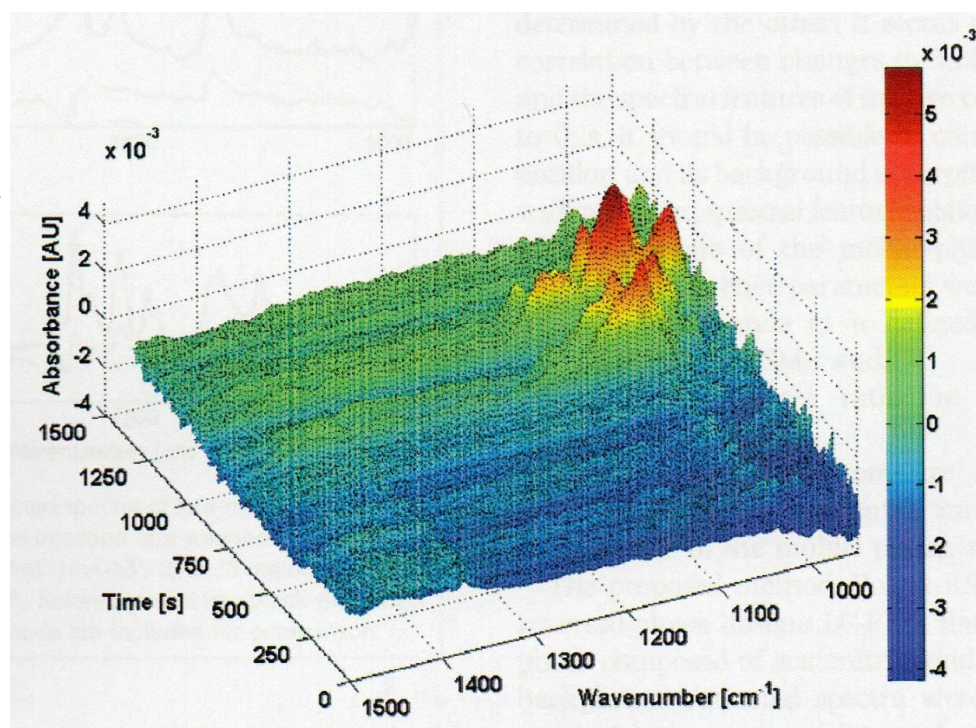


Schema IR protočne mikroćelije

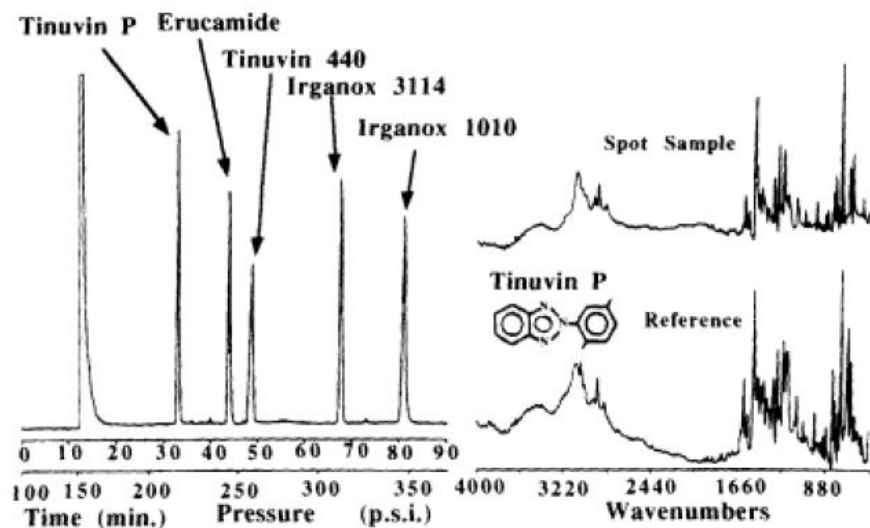
Primjena LC-IR

- kvalitativna i kvantitativna analiza:

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

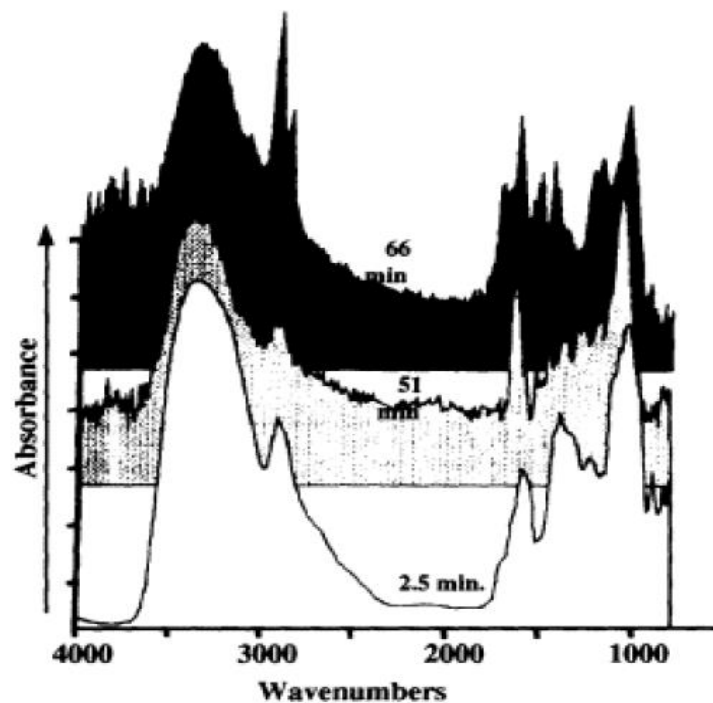


Analiza smjese fruktoze, glukoze, saharoze i maltoze¹



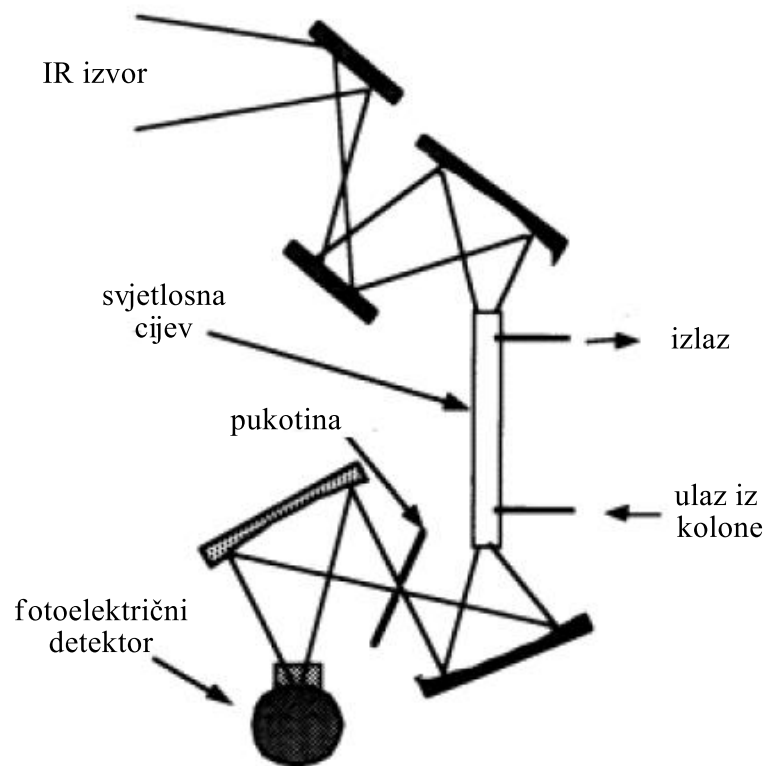
Određivanje polimernih dodataka pomoću LC-IR

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



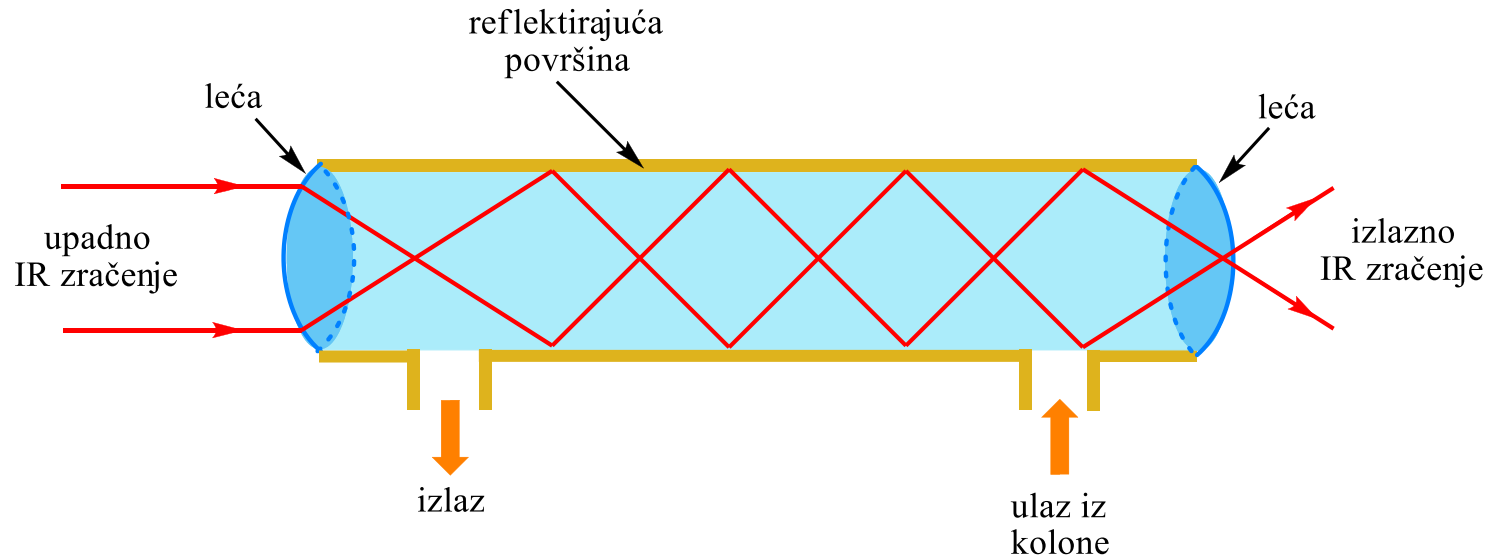
Plinska kromatografija - infracrvena spektroskopija *on-line* (engl. *Gas Chromatography - Infrared Spectroscopy on-line, GC-IR*)

- 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



Optički sustav GC-IR instrumenta

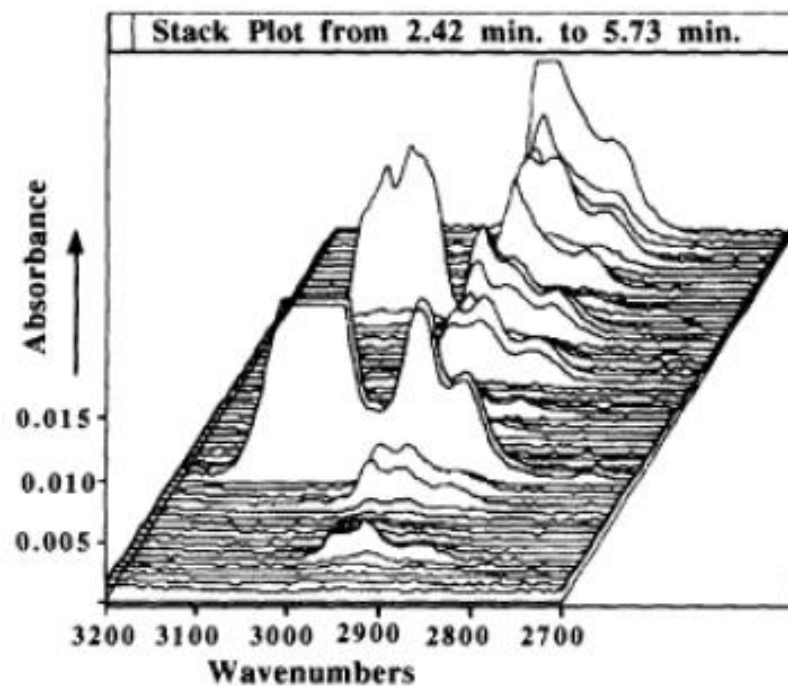
- višestrukom refleksijom IR zračenja u svjetlosnoj cijevi povećava se duljina puta zrake kroz uzorak
- detekcija uzoraka u plinovitom stanju pri **niskim koncentracijama**



Prolazak infracrvenog zračenja kroz svjetlosnu cijev

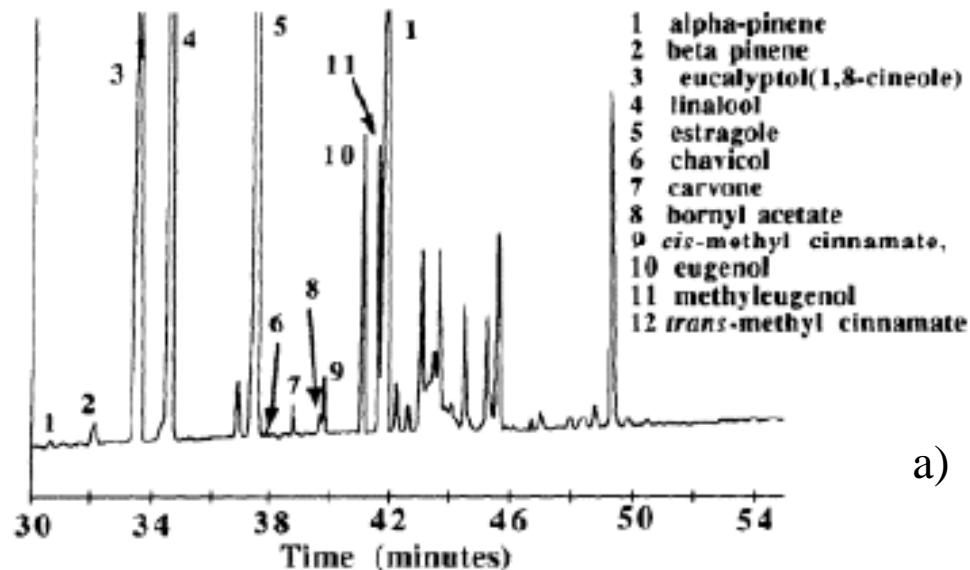
Primjena GC-IR

- kvalitativna i kvantitativna analiza:
 - farmaceutskih proizvoda
 - fosilnih goriva (Slika)
 - eteričnih ulja
 - ispušnih plinova
 - produkata pirolize



IR spektri snimljeni tijekom kromatografske separacije sastojaka benzina

Plinska kromatografija - infracrvena spektroskopija *on-line*



a)

Analiza eteričnog ulja bosiljka:

a) kromatogram

b) IR spektar kromatografskog pika koji odgovara linaoolu

b)

