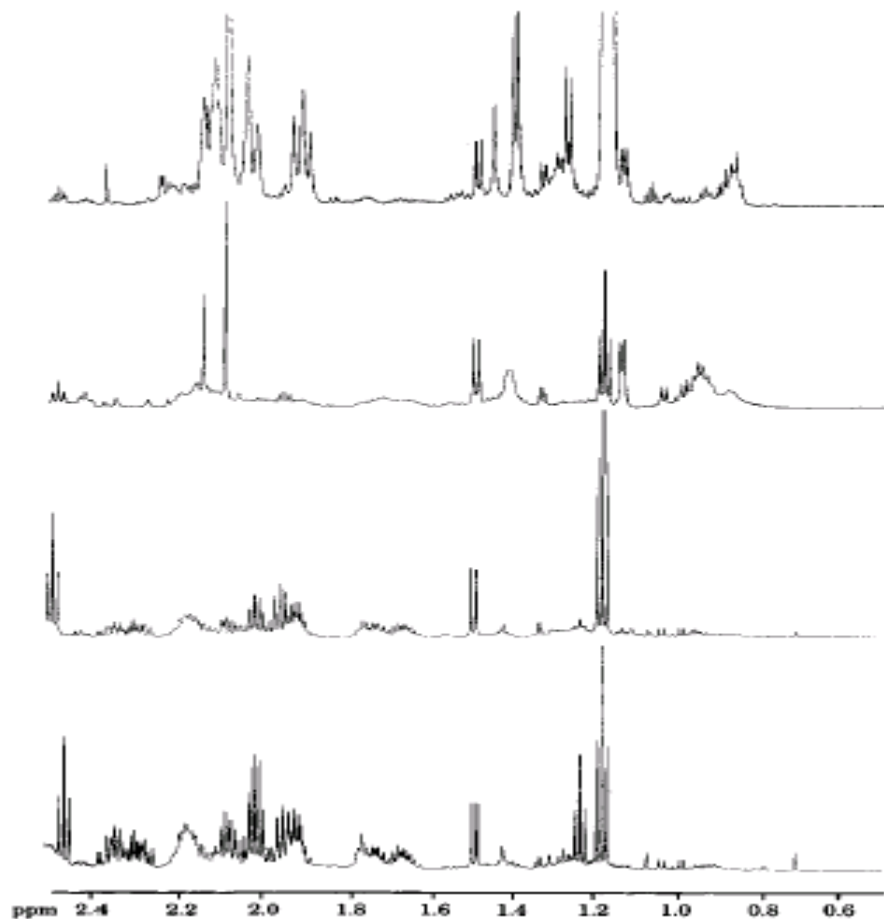


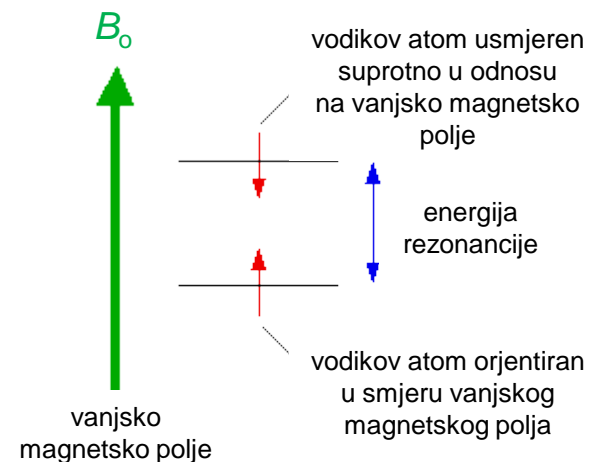
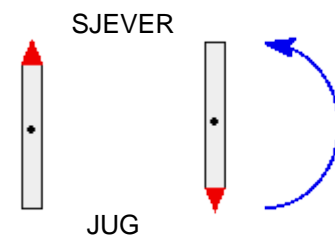
NUKLEARNA MAGNETSKA REZONANCIJA



Literatura:

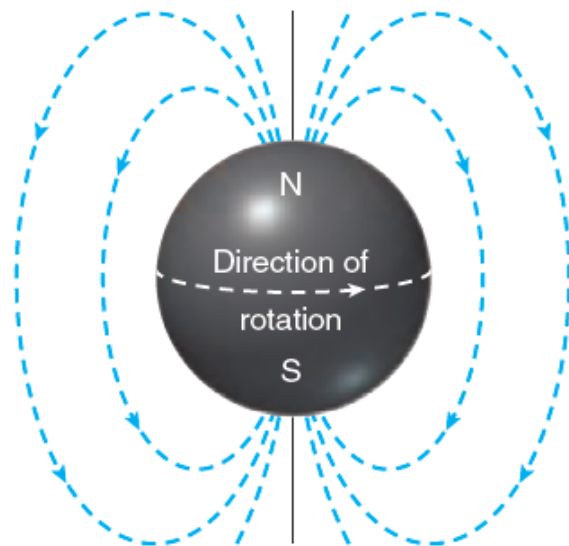
1. D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, Forth Worth, Saunders, 1997.
2. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije* (prijevod: N. Kujundžić, V. Živčić-Alegretti, A. Živković), Školska knjiga, Zagreb 1999.
3. L.G. Wade, *Organic Chemistry*, 6th Ed., Prentice Hall, New Jersey, 2006.
4. M. Silverstein, F. X. Webster, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, NewYork, Wiley, 1998.
5. D. Klein, *Organic Chemistry*, 2nd Ed., John Wiley&Sons, 2012.

- **Nuklearna magnetska rezonancija (NMR):** najmoćnija metoda za određivanje strukture organskih i anorganskih spojeva,
- slično IR-spektroskopiji, NMR-analiza je izvediva s vrlo malom količinom uzorka koji se pri tom ne oštećuje,
- NMR se koristi za analizu različitih jezgri (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F i ^{31}P), a temelji se na njihovim magnetskim svojstvima,
- vodikov atom kao mali magnet \Rightarrow ^1H NMR,
- igla na kompasu usmjerava se prema sjeveru, u smjeru Zemljinog magnetskog polja; prisilno usmjerenje prema jugu je nestabilno te se igla, nakon otpuštanja, brzo izvrće prema sjeveru,
- **vodikova jezgra** (mali magnet), nakon izlaganja **vanjskom mag. polju B_0** \uparrow orijentira se u njegovom smjeru \uparrow (stabilniji položaj), ali je moguće, izlaganjem dodatnom elektromagnetskom zračenju B_{rf} , postići i izvrćanje u suprotnom smjeru \downarrow (nestabilniji položaj),
- **frekvencija zračenja B_{rf}** , potrebna za izvrćanje jezgre ovisi o jakosti vanjskog magnetskog polja, a odgovara frekvenciji radiovalova (*radio frequency, rf*),
- **izvrćanje jezgre iz jednog magnetskog usmjerenja u drugo primjenom radiovalova naziva se rezonancijom.**

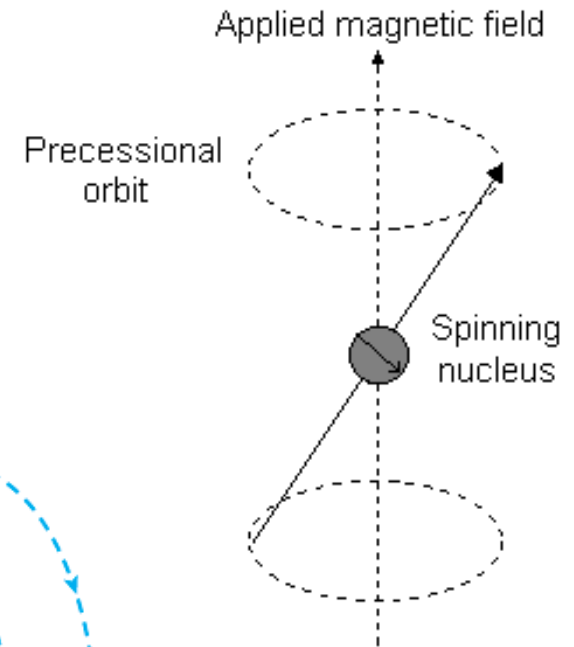
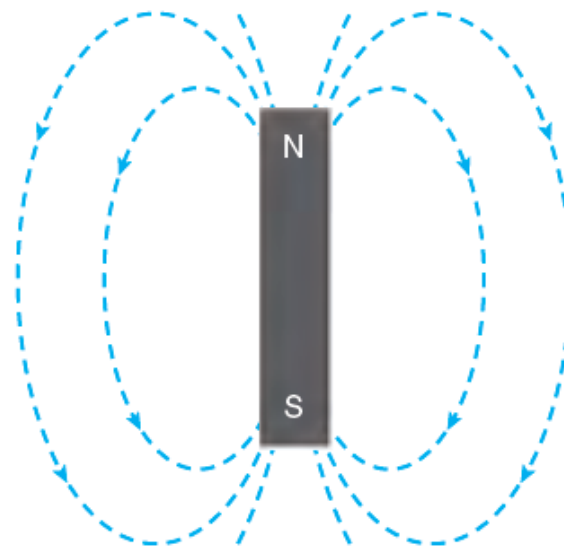


Teorija NMR

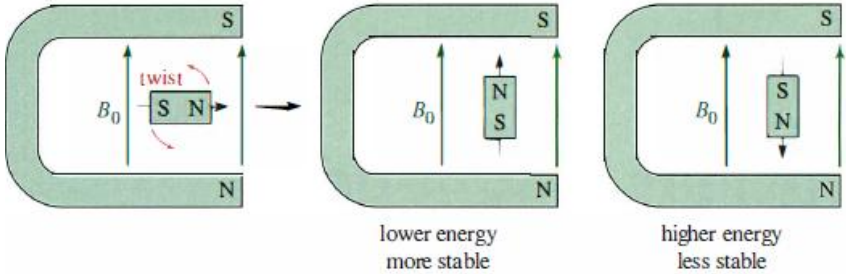
- Jezgre s neparnim atomskim brojem ili neparnim masenim brojem imaju **nuklearni spin** koji se može detektirati NMR-spektrometrom (engl. *spin*, brzo okretanje zvrka, okretanje oko svoje osi),
- spin se može vizualizirati kao rotirajuća lopta pozitivnog naboja (takvo gibanje naboja izgleda kao tok struje u žičanoj petlji),
- spin generira magnetsko polje B (magnetski moment) nalik polju malog šipkastog magneta,



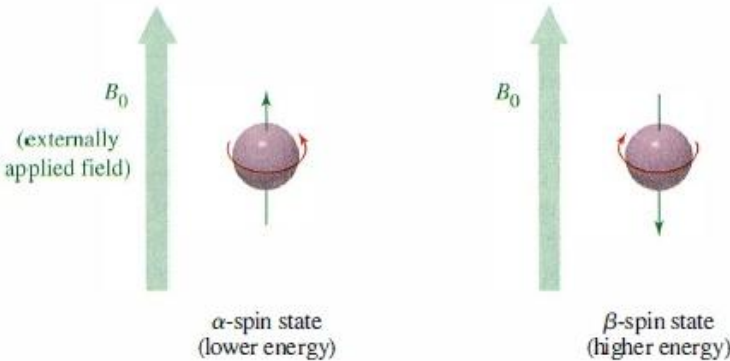
Magnetic lines of force



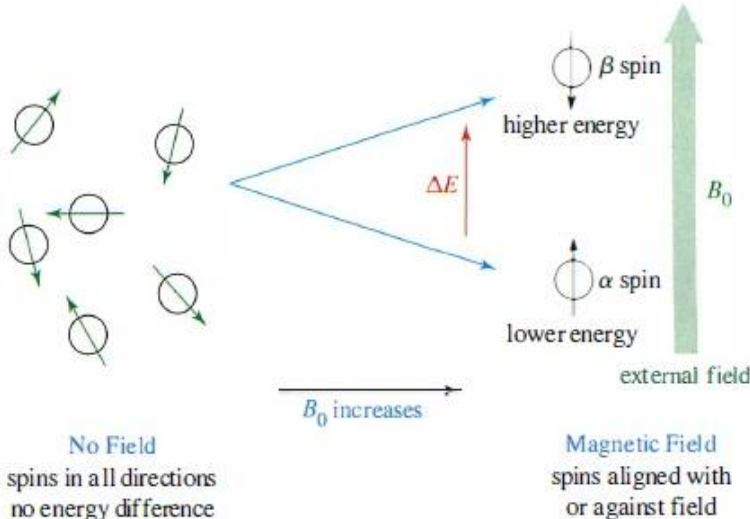
- nakon umetanja u polje većeg vanjskog magneta B_0 , dolazi do izvrtanja malog šipkastog magneta i njegovog izravnavanja u smjeru vanjskog polja (paralelno) – stabilniji položaj,



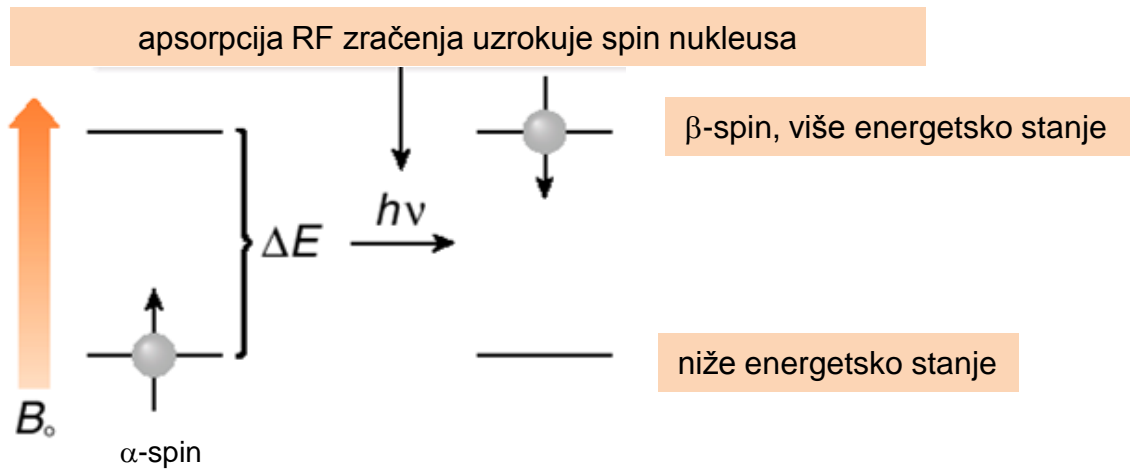
- isti se efekt postiže umetanjem protona u vanjsko magnetsko polje B_0 ; magnetski moment protona usmjerava se paralelno u odnosu na vanjsko polje (α -spin, **stabilniji**) ili antiparalelno (β -spin, **manje stabilan**),



- u odsutnosti vanjskog polja, protonski magnetski moment ima nasumičnu orijentaciju; primjenom vanjskog polja B_0 postiže se α - ili β -spin (više α -spina jer je stabilniji).



- **“rezonancija”**: kada se jezgra usmjerena u pravcu polja B_0 izloži djelovanju elektromagnetskog (radiofrekventnog) zračenja B_{rf} čija frekvencija odgovara maloj energetskej razlici između α - i β -spina, dolazi do izvrtnanja jezgre iz α - u β -spin; slijedi relaksacija i ponovno usmjeravanje u pravcu polja pri čemu se emitira elektromagnetski signal kojeg bilježi NMR-spektrometar,
- energetska razlika između spinova proporcionalna je jakosti vanjskog mag. polja B_0 ,

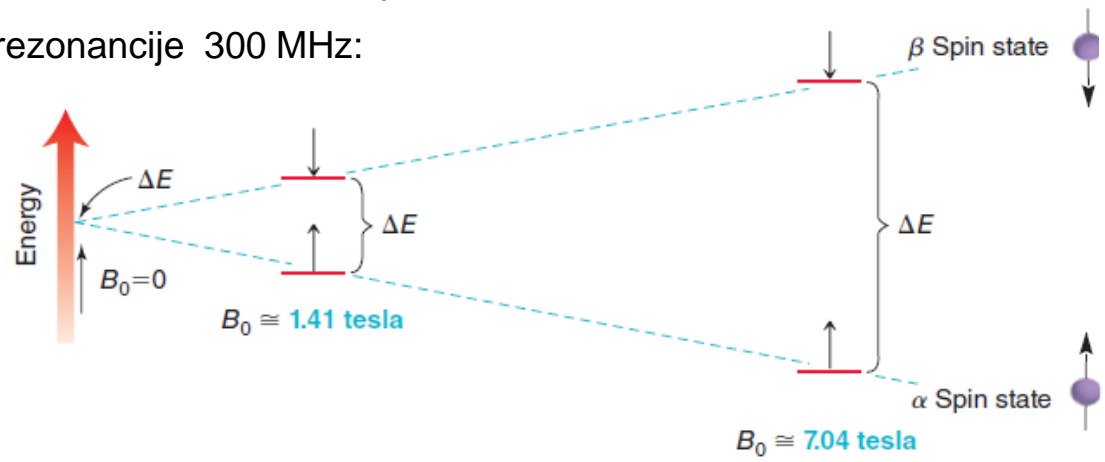


$$\Delta E = h\nu = h \frac{\gamma}{2\pi} B_0$$

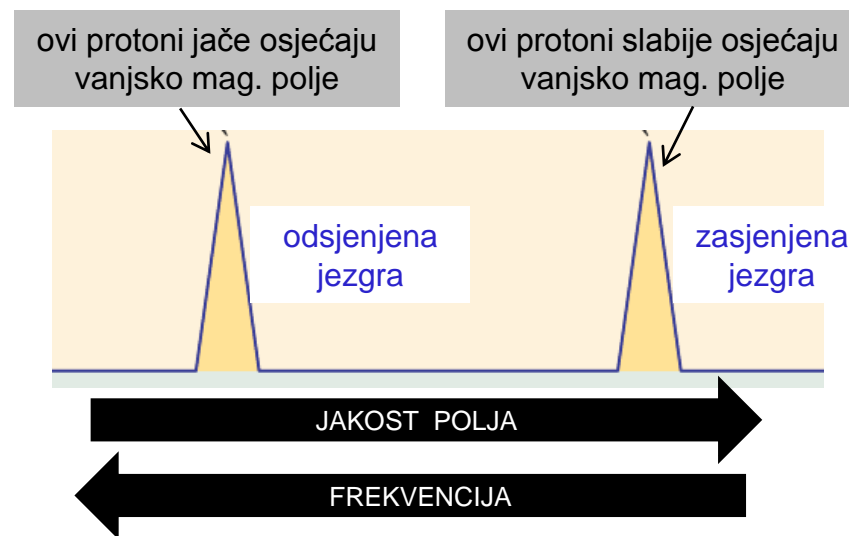
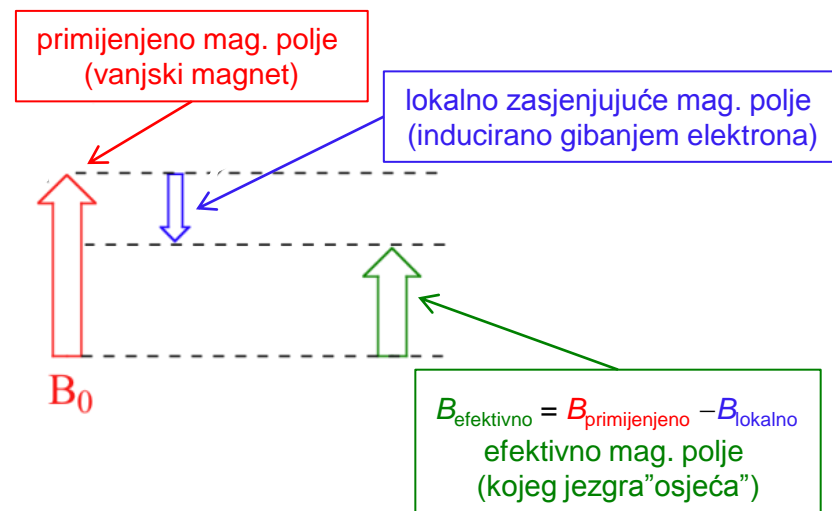
ΔE = razlika u energiji između α - i β -spina,
 h = Planckova konstanta
 ν = frekvencija polja B_{rf} (frekvencija rezonancije)
 γ = žiromagnetski omjer, konstanta ovisna o magnetskom momentu ispitivane jezgre

- NMR-spektrometar opremljen magnetom čije je mag. polje B_0 jakosti 7.046 T, podrazumijeva frekvenciju rezonancije 300 MHz:

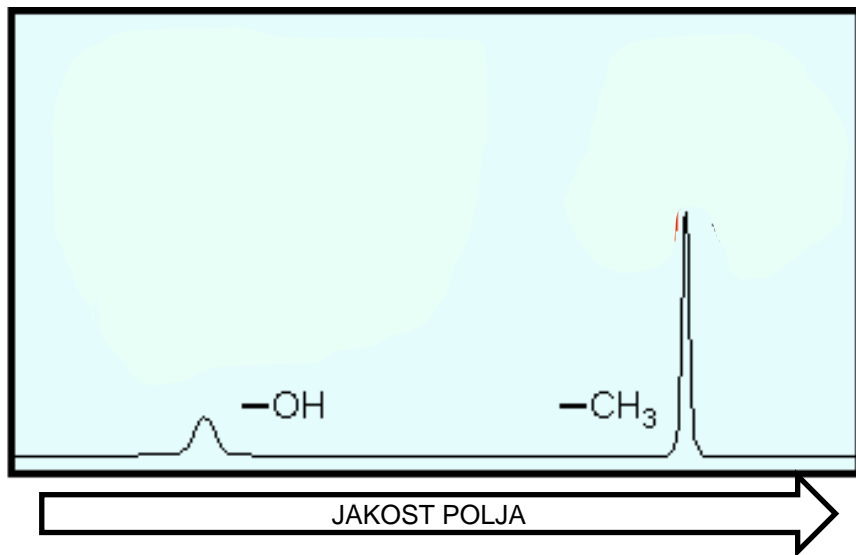
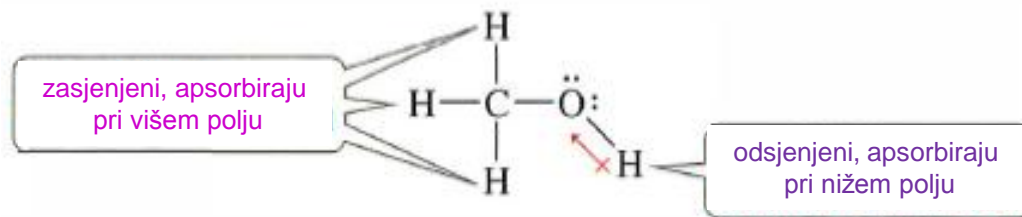
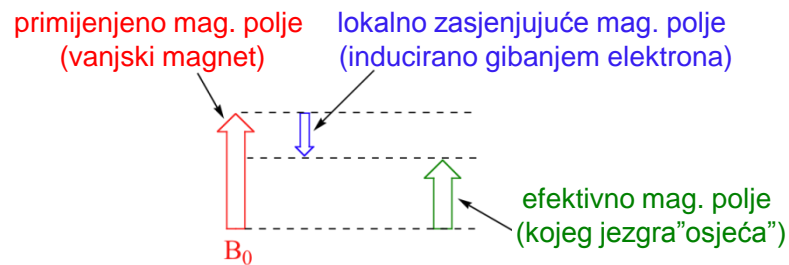
$$\begin{aligned} \nu &= \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \\ &= \frac{2.675 \times 10^8}{2(3.1416)} \text{T}^{-1} \text{s}^{-1} \times 7.046 \text{T} \\ &= 300 \times 10^6 \text{Hz} = 300 \text{MHz} \end{aligned}$$



- do sada su razmatrani ogoljeni protoni; u organskim molekulama protoni nisu ogoljeni, već su okruženi elektronima koji ih djelomično zaklanjaju od utjecaja vanjskog magnetskog polja,
- elektroni se gibaju, generirajući mala lokalna (inducirana) magnetska polja \Downarrow koja se orijentiraju suprotno u odnosu na primijenjeno vanjsko polje \Uparrow (ako se dva magneta postave u neposrednu blizinu, sjeverni pol jednog magneta usmjerava se prema južnom polu drugog magneta!),
- na taj se način lokalno mag. polje \Downarrow inducirano gibanjem elektrona suprotstavlja vanjskom mag. polju B_0 \Uparrow , odnosno štiti ili zaklanja jezgru od utjecaja jakog vanjskog polja (što je veća elektronska gustoća oko protona jače je lokalno polje, a smanjen je utjecaj vanjskog primijenjenog polja, odnosno proton osjeća slabije efektivno mag. polje \Uparrow),
- zbog slabijeg polja kojeg zaklonjeni proton stvarno osjeća ($\Uparrow B_{\text{efektivno}}$), primijenjeno vanjsko polje mora se pojačati da bi se kompenzirao inducirani efekt zaklanjanja,



- kad bi svi protoni u molekuli bili jednako zaklonjeni, njihova rezonancija bi se događala pri istoj frekvenciji i jakosti magnetskog polja i vidjeli bismo samo jedan signal,
- protoni su u različitom kemijskom okruženju različito zaklonjeni, te se i njihove rezonancije razlikuju,
- u MeOH elektronegativni atom kisika odvlači elektrone iz veze s hidroksilnim protonom, zbog čega su protoni iz metilne skupine jače zaklonjeni u odnosu na hidroksilni proton,

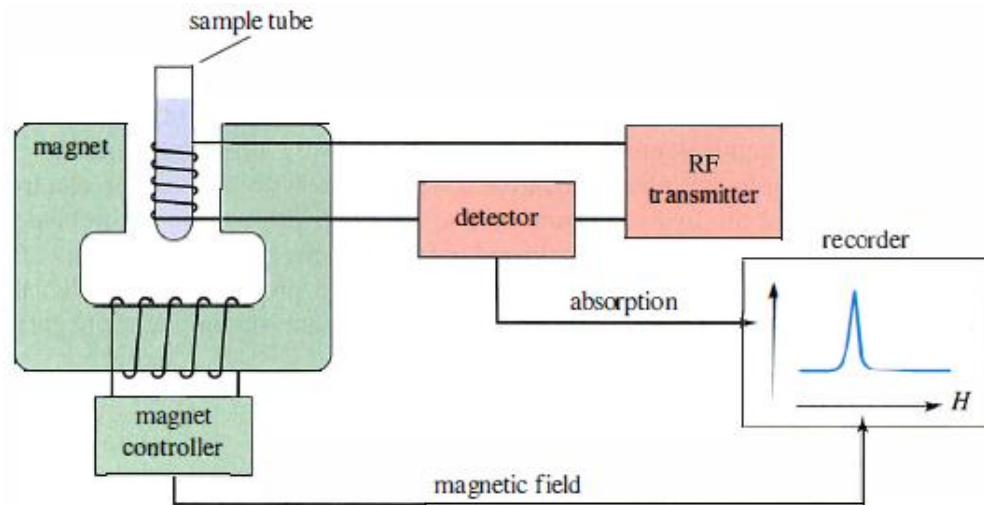
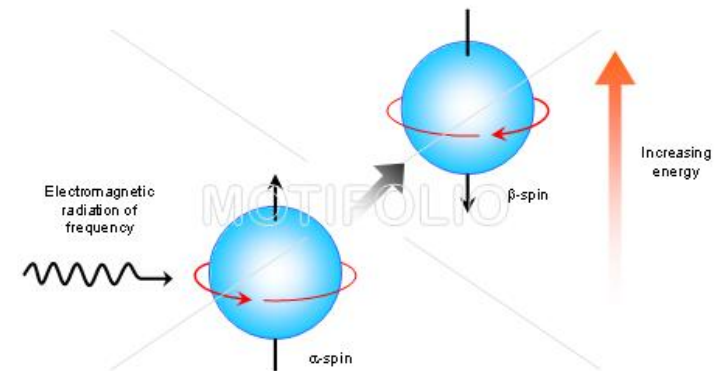


- zbog slabije zaklonjenosti (zasjenjenosti), hidroksilni proton apsorbira pri slabijem polju u odnosu na metilne protone (kažemo da je hidroksilni proton odsjenjen),

NMR-spektrometar

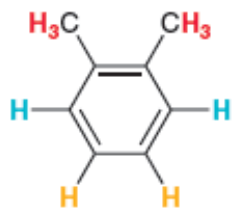
• Sastoji se iz četiri glavna dijela:

1. **magnet** koji stvara magnetsko polje,
2. **odašiljač elektromagnetskog zračenja** (RF-transmitter) koji emitira radiozračenje frekvencije dostatne za izvrtnanje spinova,
3. **detektor**: zajedničkim djelovanjem vanjskog magnetskog polja i radiozračenja jezgre se perturbiraju, odnosno prelaze iz paralelnog u antiparalelno stanje; nakon što se energija koju jezgra apsorbira izjednači s razlikom energija α - i β -spina, postignut je uvjet za NMR. Energija se apsorbira zakretanjem jezgre iz jednog stanja spina u drugo; apsorpciju i potom emisiju energije bilježi detektor,
4. **pisač**: NMR-spektrometar mora varirati jakost magnetskog polja i iscrtavati graf koji prikazuje ovisnost apsorbirane energije o jakosti vanjskog magnetskog polja – **spektar**.

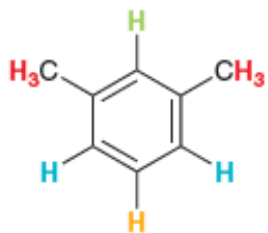


• ^1H NMR-spektar pruža sljedeće informacije:

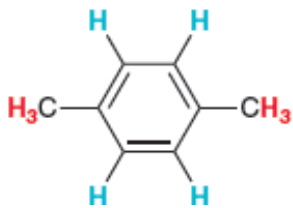
1. Broj signala odgovara broju različitih vrsta vodikovih atoma u molekuli.
2. Položaj signala (kemijski pomak) ukazuje o kojoj se vrsti vodikovih atoma radi.
3. Površina ispod signala odgovara broju vodikovih atoma odgovarajuće vrste.
4. Cijepanje signala upućuje na broj susjednih vodikovih atoma.



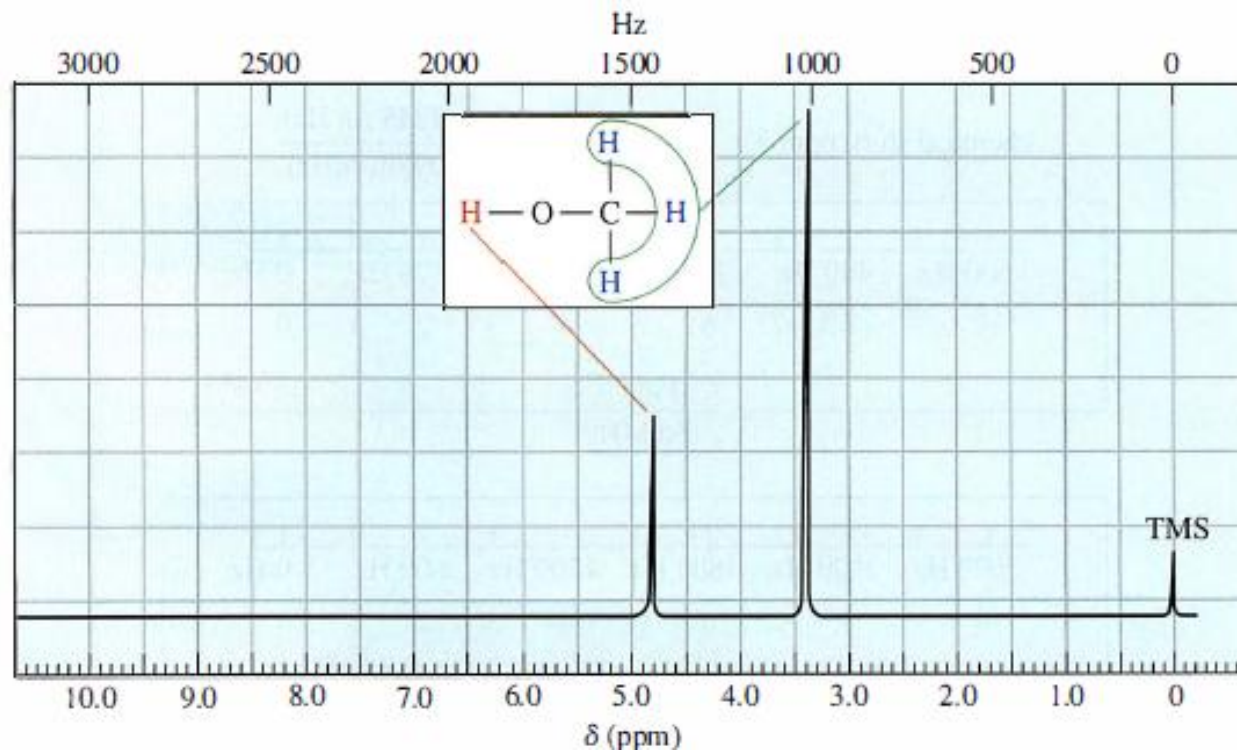
tri signala



četiri signala



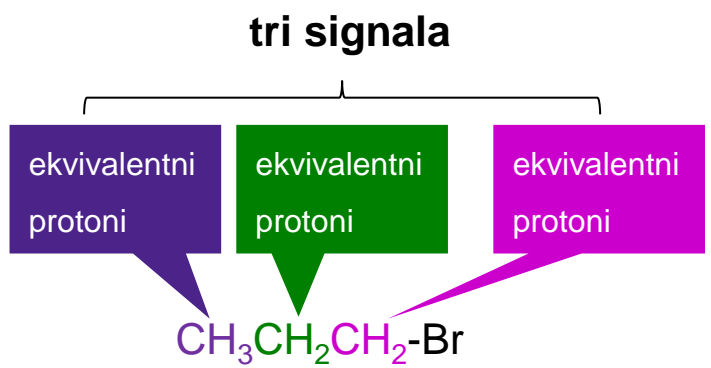
dva signala



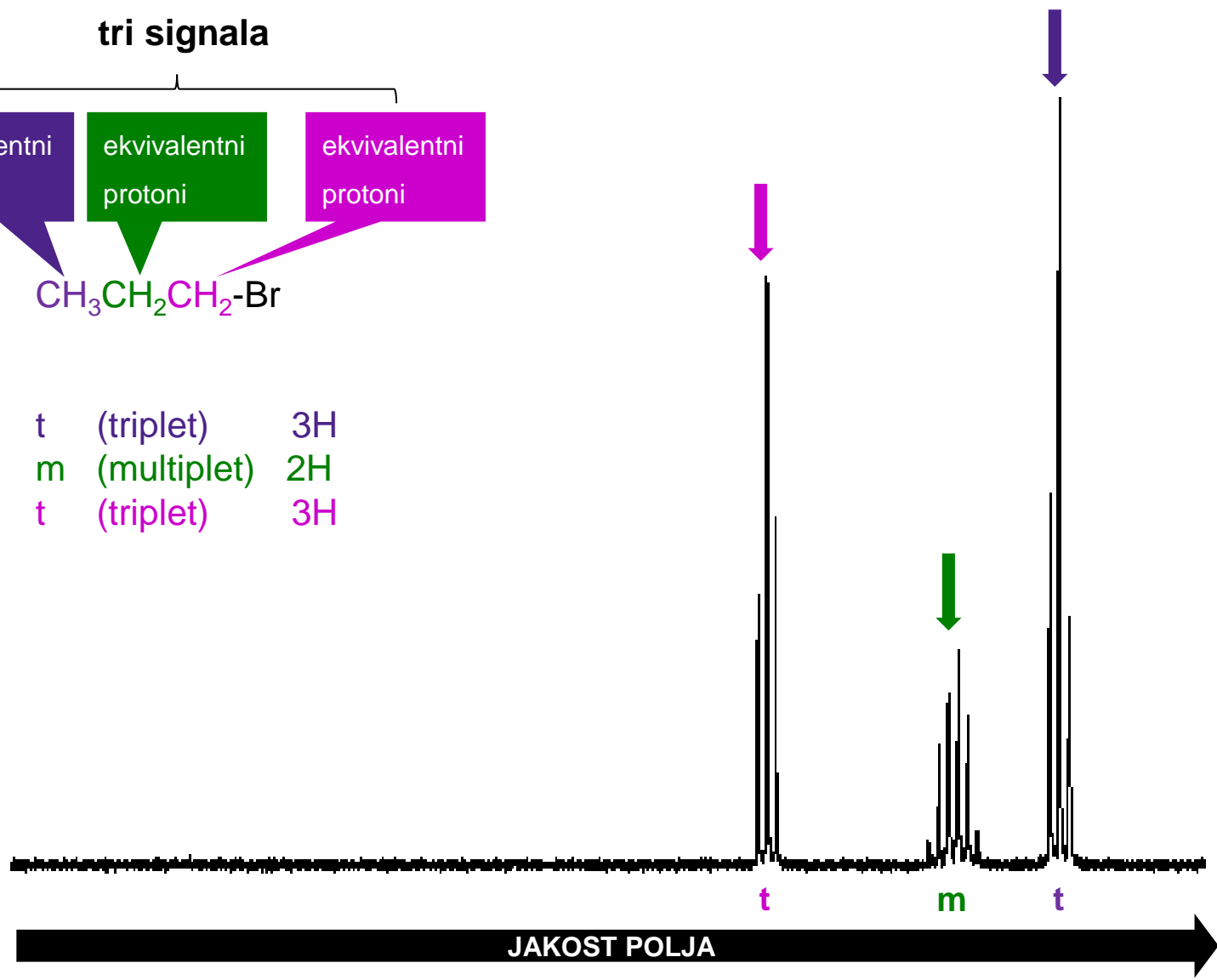
← KEMIJSKI POMAK

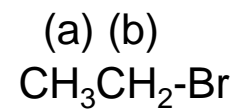
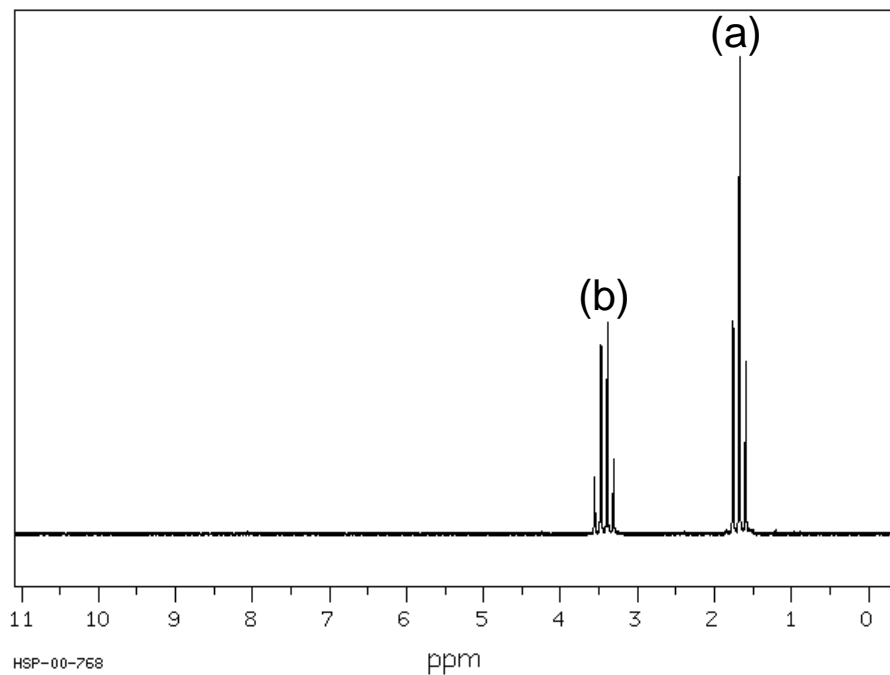
JAKOST POLJA →

- protoni u identičnom kemijskom okruženju s jednakim zasjenjenjem imaju isti kemijski pomak – kemijski ekvivalentni protoni,

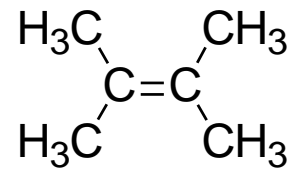
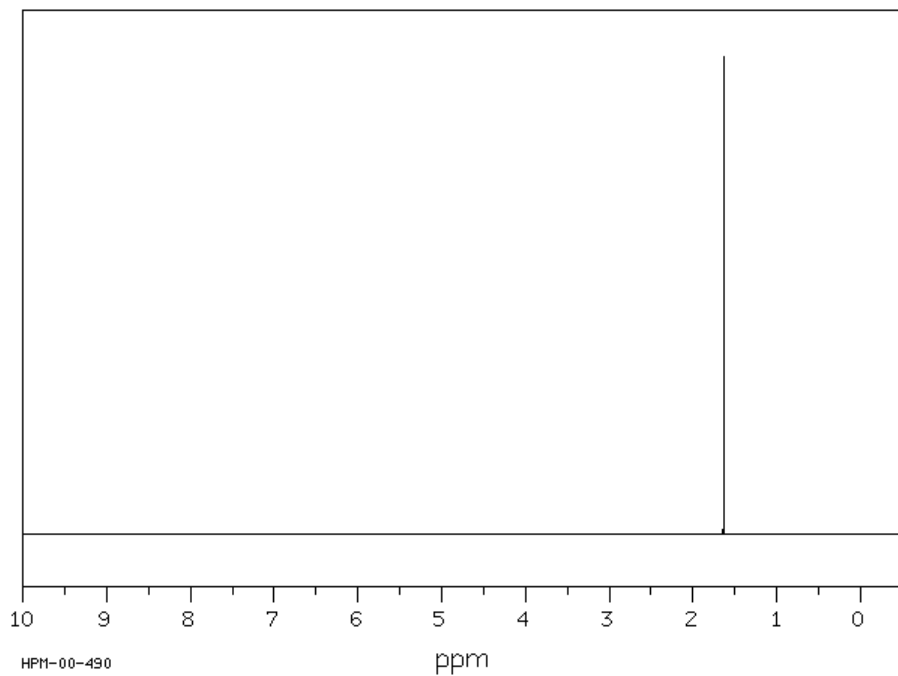


t	(triplet)	3H
m	(multiplet)	2H
t	(triplet)	3H



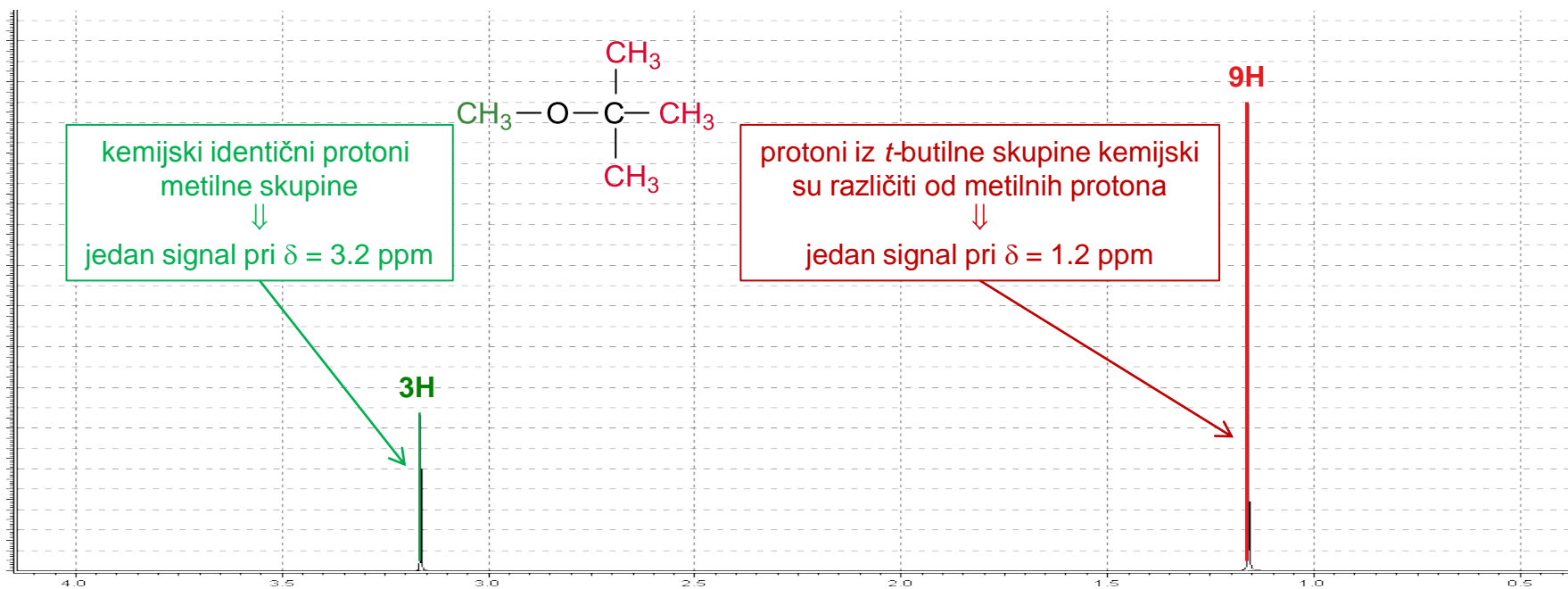


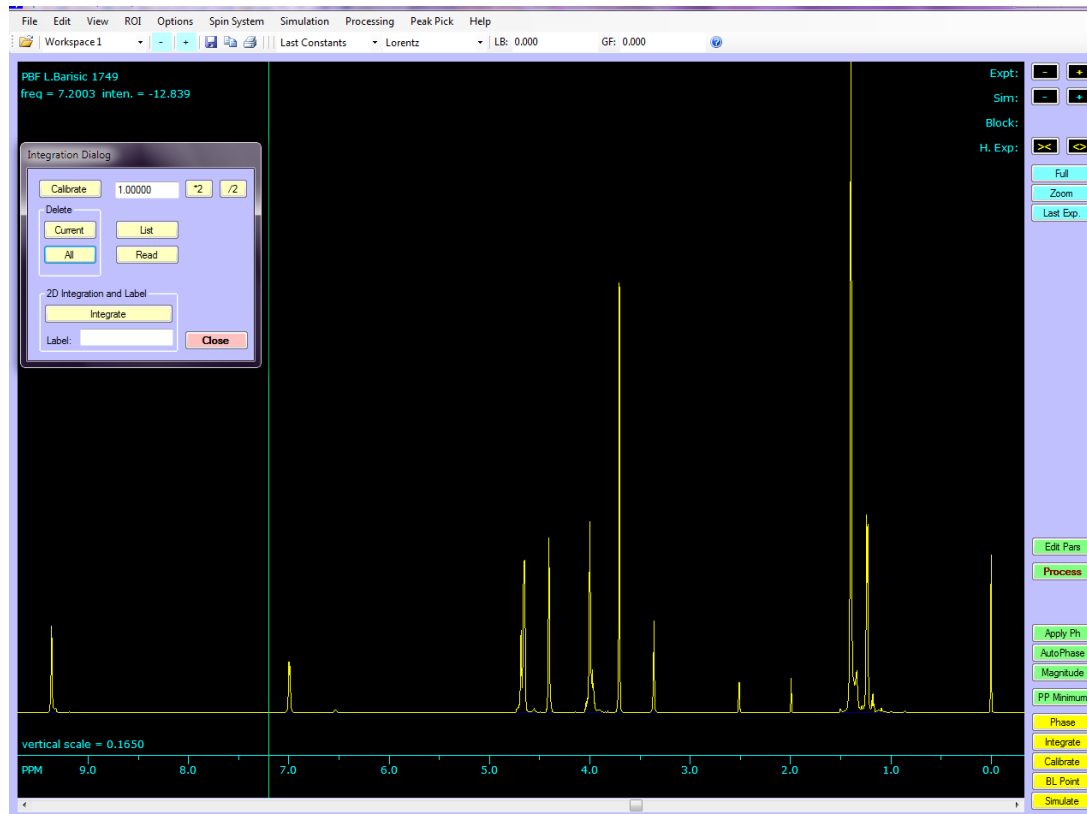
(a) t (triplet) 3H
 (b) q (kvartet) 2H



s (singlet) 12H

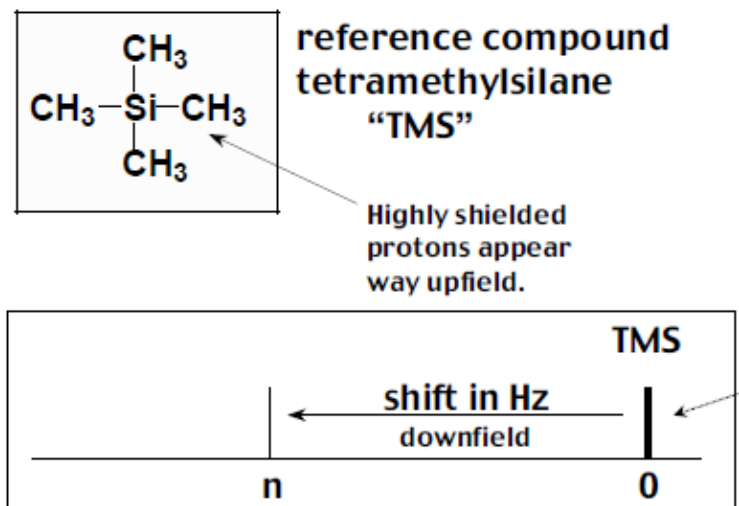
- površina ispod signala proporcionalna je broju vodikovih atoma na koje se taj signal odnosi,
- signal *t*-butilnih protona jači je od signala metilnih protona (ima ih 3× više!),





- **Kemijski pomak: položaj u NMR-spektru pri kojem nastupa rezonancija pojedine jezgre, ovisno o njezinoj okolini (zasjenjenosti),**
- uvijek se definira u odnosu na neki standardni rezonancijski signal čiji se položaj označava nulom (TMS, tetrametilsilan),

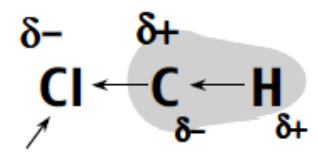
- u molekuli TMS-a $[(CH_3)_4Si]$, metilne skupine su bogatije elektronima te su njihovi protoni zasjenjeni (Si manje elektronegativan od C); apsorbiraju pri višem polju u odnosu na većinu protona vezanih za ugljikov ili druge atome, pa se većina NMR signala javlja pri nižem polju (lijevo) u odnosu na signal TMS,



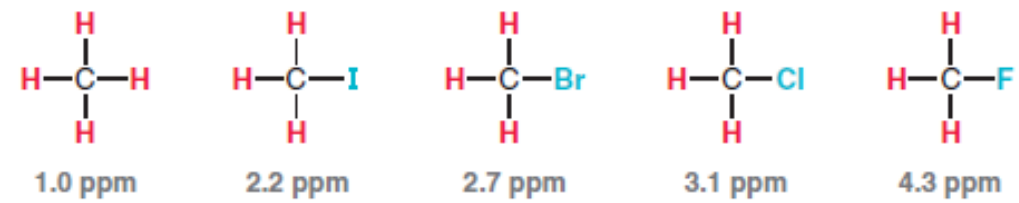
- **kemijski pomak pojedinog protona: udaljenost njegova signala od signala TMS-a,**
- **izražava se u ppm (parts per million)**

$$\text{kemijski pomak (ppm)} = \frac{\text{pomak ulijevo od TMS-a (Hz)}}{\text{ukupna frekvencija spektrometra (MHz)}}$$

- **Utjecaj elektronegativnosti na kemijski pomak:** klor odsjenjuje proton privlačeći elektrone; **odsjenjeni protoni rezoniraju pri nižem polju, odn. imaju viši kemijski pomak,**



- **s porastom elektronegativnosti atoma vezanog na metilnu skupinu smanjuje se njezina zasjenjenost, odn. raste kemijski pomak,**

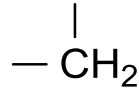
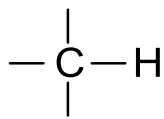


- **utjecaj elektronegativnog atoma na kemijski pomak raste s povećanjem broja elektronegativnih atoma, a opada s povećanjem udaljenosti od promatranih protona,**

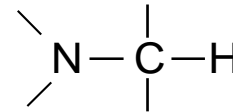
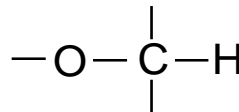
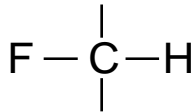
CHCl_3	CH_2Cl_2	CH_3Cl	
7.27	5.30	3.05	ppm

$-\text{CH}_2-\text{Br}$	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{Br}$	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$	
3.30	1.69	1.25	ppm

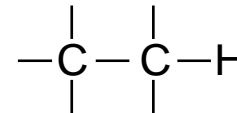
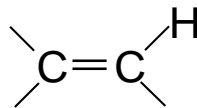
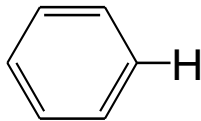
Kemijski pomak i molekulska struktura



← broj H-atoma vezanih za isti C-atom



← elektronakceptorski utjecaj elektronegativnog atoma

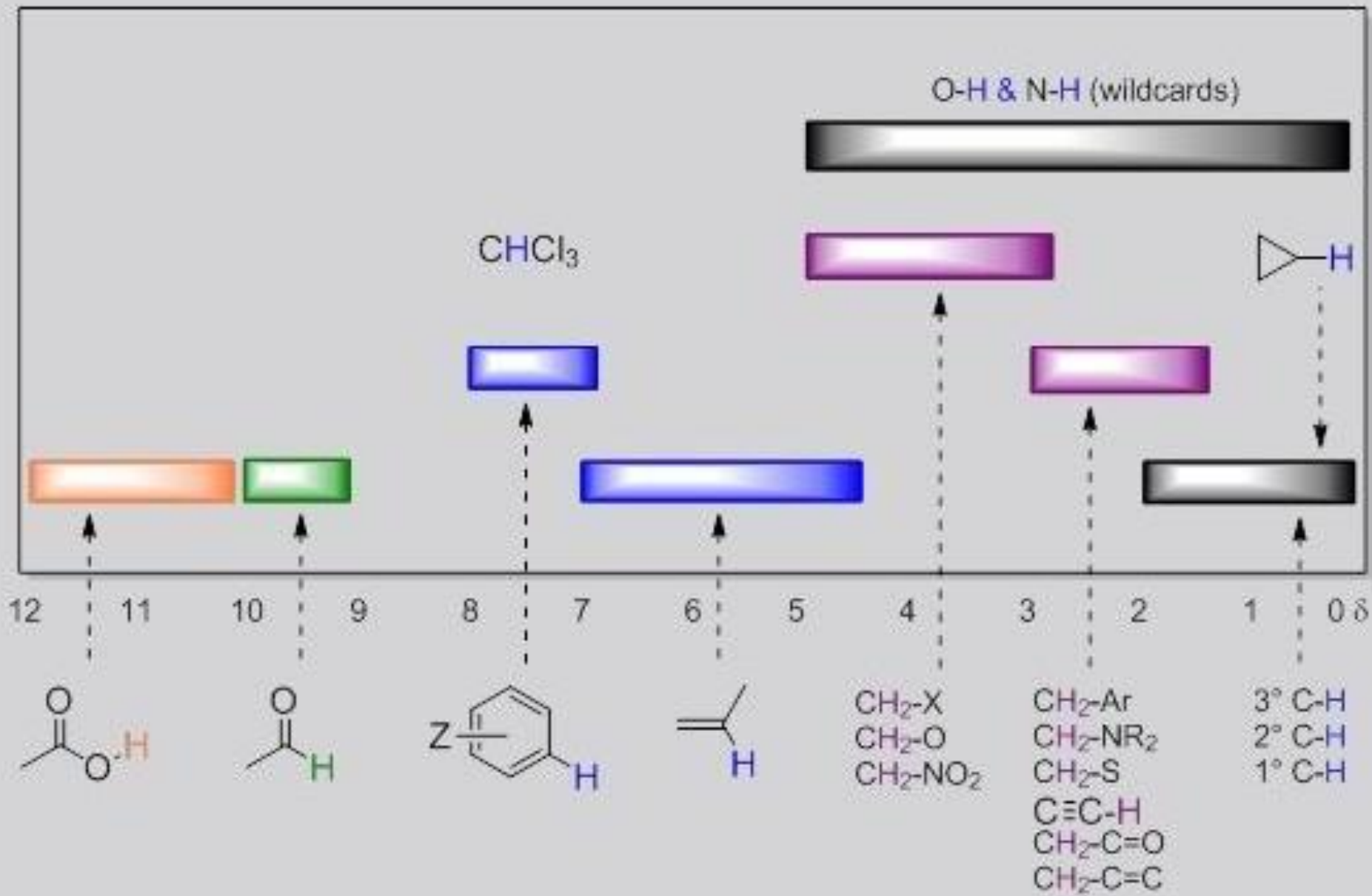


← stupanj nezasićenosti

← kemijski pomak

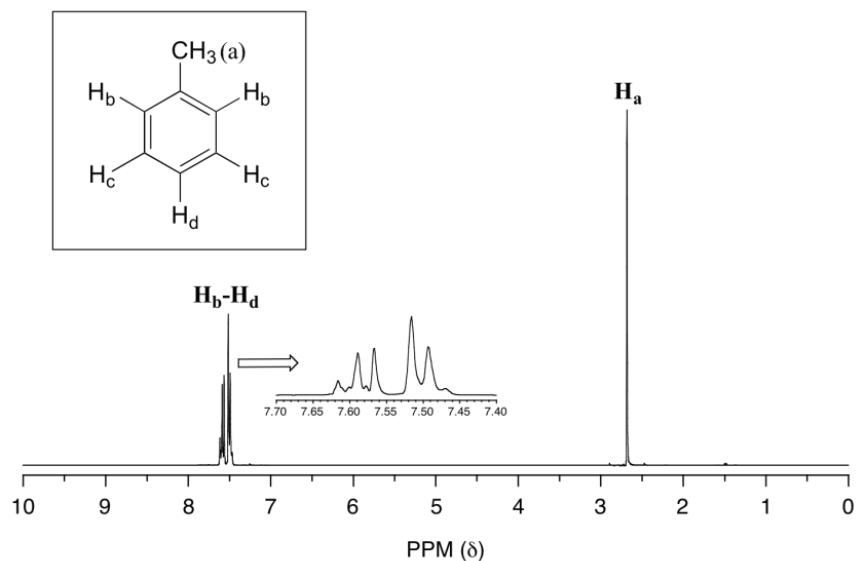
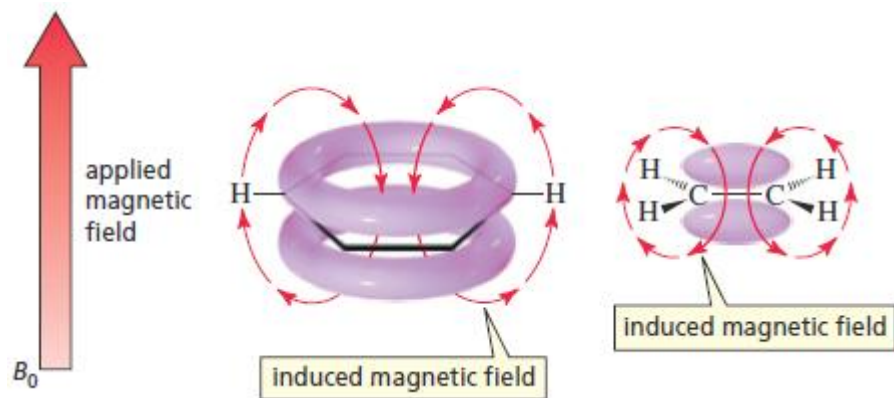
→ jakost polja

Karakteristični kemijski pomaci



Dijamagnetska anizotropija

- Neuobičajeni kemijski pomaci vodikovih atoma vezanih s sp^2 -hibridiziranim C-atomima tumače se dijamagnetskom anizotropijom,
- π -elektroni se pod utjecajem vanjskog mag. polja gibaju kruženjem, inducirajući mag. polje koje utječe na kemijski pomak protona,
- mag. polje, inducirano kruženjem π -elektrona u benzenskom prstenu, usmjereno je u području gdje su locirani protoni jednako kao i vanjsko mag. polje \Rightarrow protoni osjećaju pojačano polje,
- mag. polje, inducirano kruženjem π -elektrona u molekuli alkena, u području gdje su locirani protoni vezani za sp^2 -hibridizirani C-atom, usmjereno je jednako kao i vanjsko mag. polje \Rightarrow protoni osjećaju pojačano polje,
- kako je frekvencija rezonancije proporcionalna jakosti efektivnog mag. polja, ovi protoni koji osjećaju pojačano polje rezoniraju pri višim frekvencijama, odnosno imaju viši kemijski pomak,

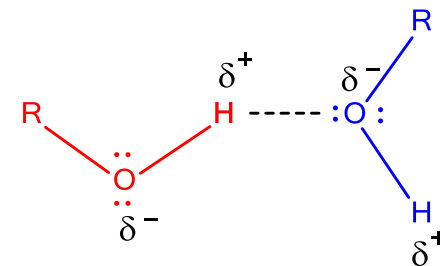


Utjecaj vodikove veze na kemijski pomak

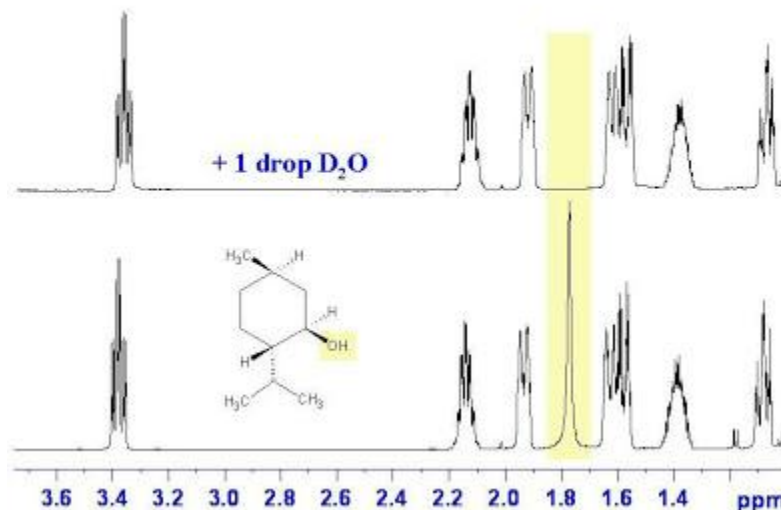
- Kemijski pomak O–H protona u alkoholima i N–H protona u aminima ovisi o koncentraciji,
- u koncentriranim otopinama, ovi su **protoni odsjenjeni vodikovim vezama, te apsorbiraju pri nižem polju** (vodikova veza izdužuje vezu O–H i reducira gustoću valentnih elektrona oko protona, odn. odsjenjuje ga i pomiče njegov signal u niže polje),
- ukoliko se alkoholi ili amini razrijede otapalom s kojim ne mogu uspostavljati vodikove veze, kidaju se postojeće intermolekulske veze, te njihovi protoni apsorbiraju pri višem polju,
- zbog ovisnosti kemijskog pomaka o koncentraciji i otapalu, ponekad je teško zaključiti odnosi li se postojeći signal u NMR spektru na O–H odn. N–H protone,
- nakon dodatka deuterirane vode dolazi do izmjene protona:



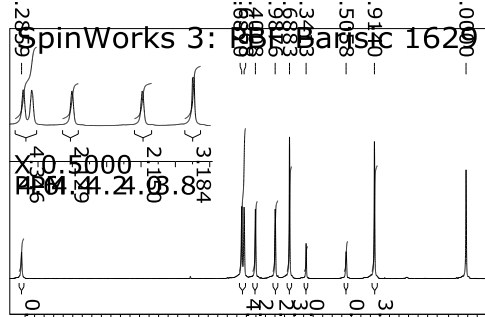
- u naknadno snimljenom spektru signal **izmjenjivog protona** se gubi ili se jako smanjuje njegov intenzitet (atom deuterija nije vidljiv u ^1H NMR spektru!),



Partial ^1H NMR Spectrum of Menthol in CDCl_3



Integriranje signala



File: D:\ser\Documents\16290012\20090914\16290012\16290012.f2
Date: 2009-09-14 16:20:19
Number of scans: 16

COOCH₃

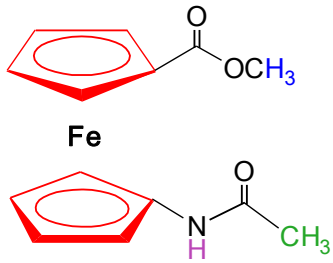
NHCOCH₃

ferocenski protoni



NH

Fe

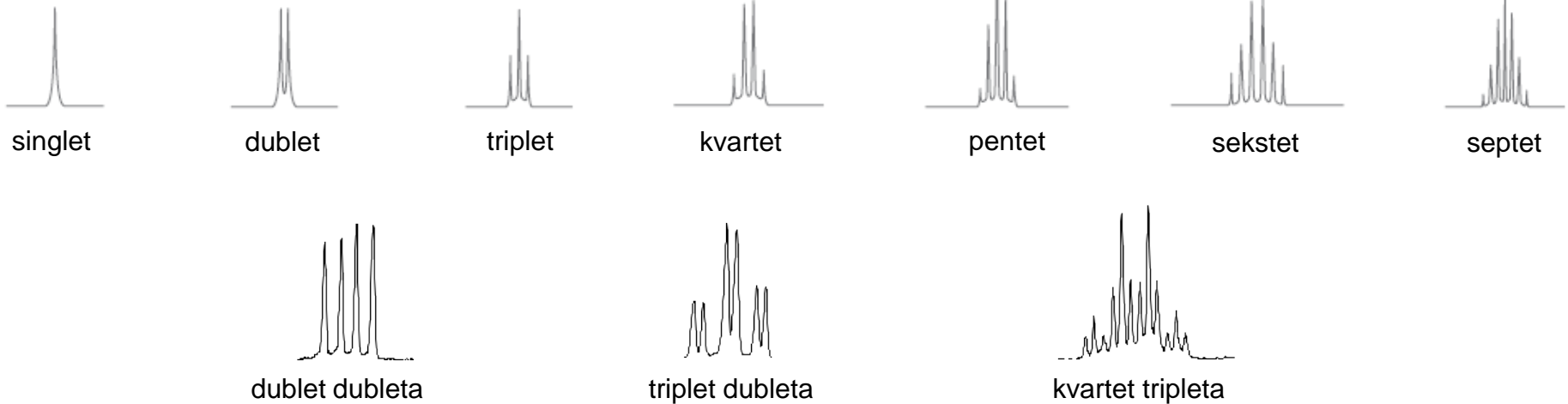


H₂O

DMSO

Cijepanje signala spregom spinova

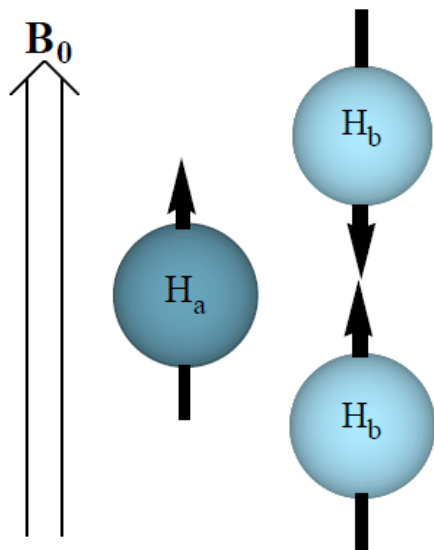
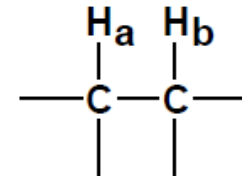
- NMR-spektri ne sadrže samo pojedinačne signale; najčešće su u spektru prisutni višestruki signali - multipleti,
- multipleti su izvor važnih informacija o strukturi spoja.



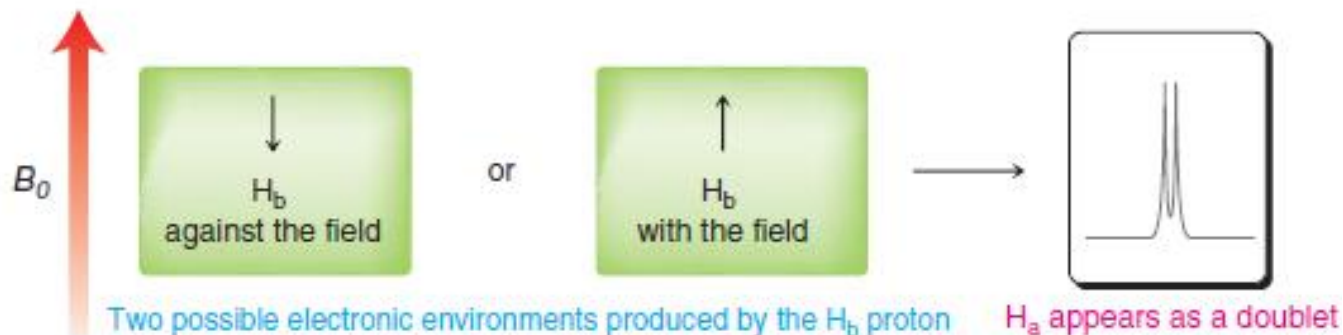
- Kako dolazi do nastanka multipleta?
- Proton je u NMR-spektrometru istovremeno izložen utjecaju vanjskog magnetskog polja i induciranog polja elektrona koji ga zasjenjuju,
- ako u blizini ima drugih protona, njihova mala magnetska polja također utječu na apsorpcijsku frekvenciju promatranog protona,
- **signali se cijepaju u multiplete kada su dvije različite vrste protona dovoljno blizu da mogu osigurati interakciju njihovih magnetskih polja; za takve protone kažemo da su magnetski spregnuti.**

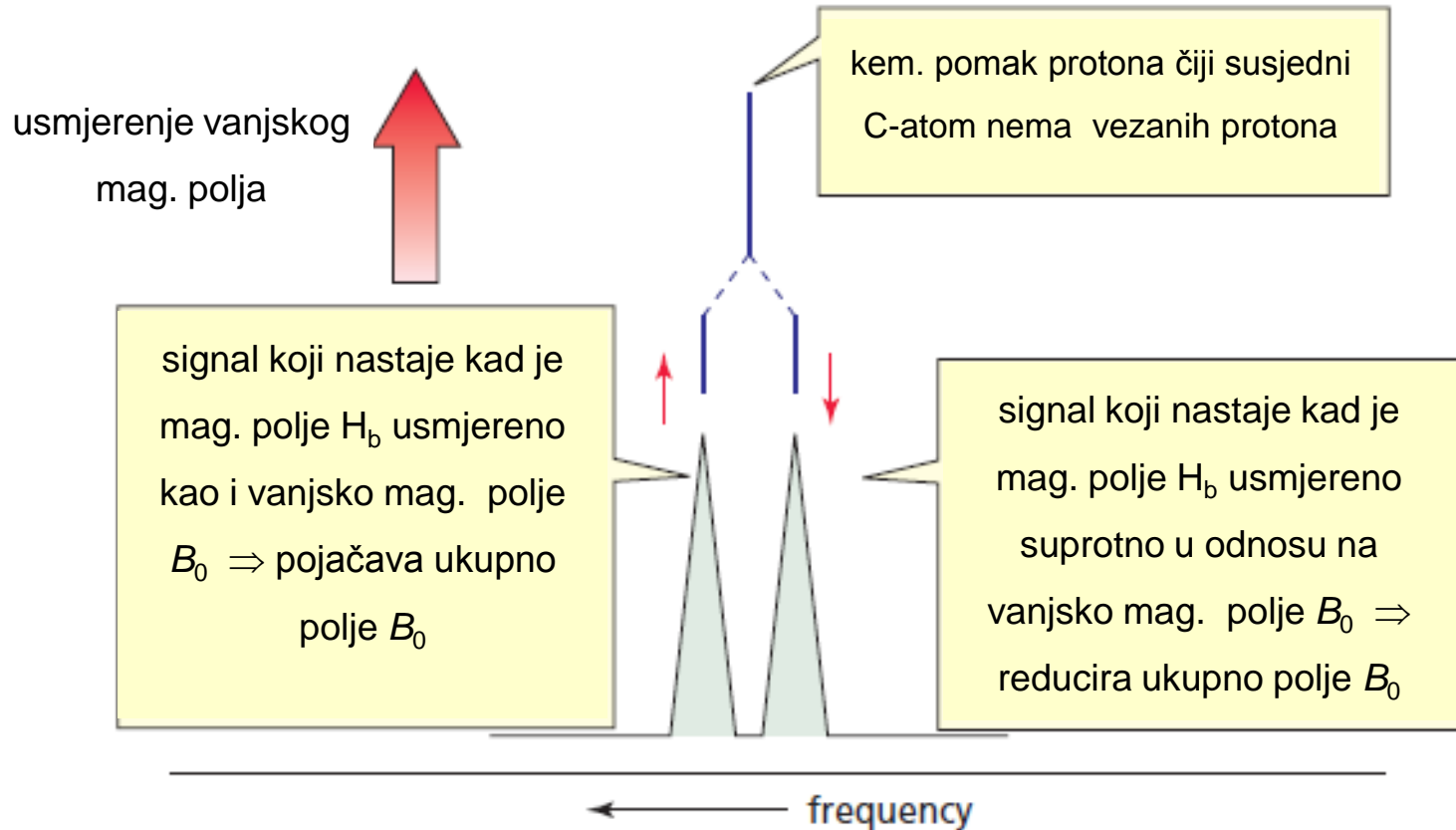
Uzrok cijepanja signala?

- Spinovi dviju jezgri sprežu se kad je kemijski pomak jedne jezgre pod utjecajem spina druge jezgre,
- razmatramo neekvivalentne protone (protone s različitim kemijskim okruženjem) H_a i H_b na susjednim C-atomima,
- H_a je pod utjecajem slabog magnetskog polja H_b ; orijentacija polja jezgre H_b može biti u smjeru polja H_a ili suprotna smjeru polja $H_a \Rightarrow$ **DUBLET!**



- magnetsko polje jezgre H_b usmjereno je suprotno vanjskom polju \Rightarrow jezgra H_b zasjenjuje jezgru $H_a \Rightarrow H_a$ apsorbira pri višem polju,
- magnetsko polje jezgre H_b usmjereno je kao i vanjsko polje \Rightarrow jezgra H_a osjeća blago pojačano ukupno polje \Rightarrow odsjenjenje jezgre H_a i pomak njezinog signala u niže polje,

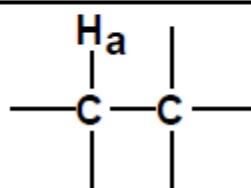

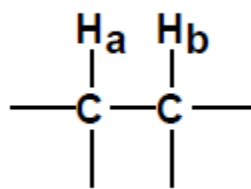

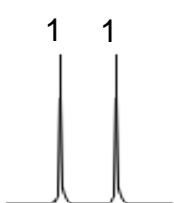
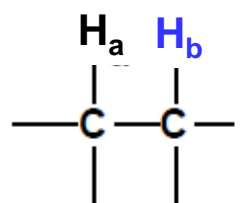
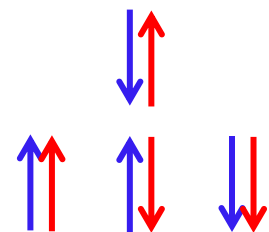
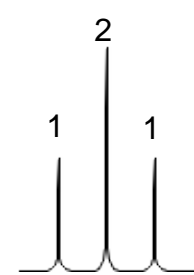
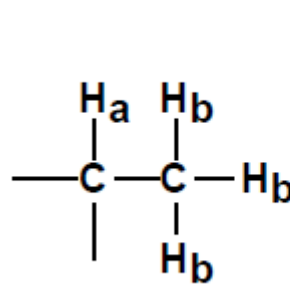
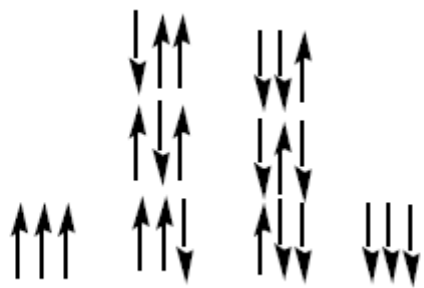
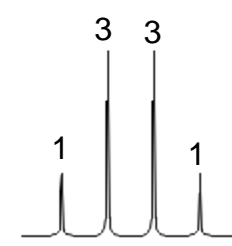




- cijepanje signala spregom spinova je recipročno svojstvo: ako H_b cijepa H_a , onda i H_a cijepa H_b .

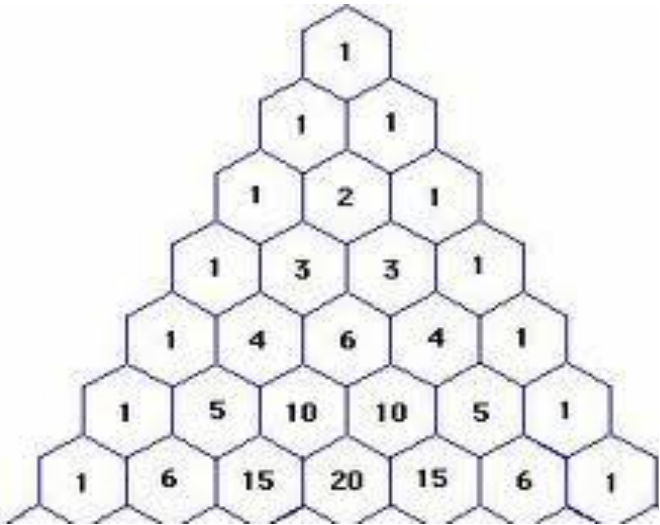
Obrasci cijepanja signala jezgre H_a pod utjecajem 0, 1, 2 ili 3 ekvivalenta susjedna H_b atoma

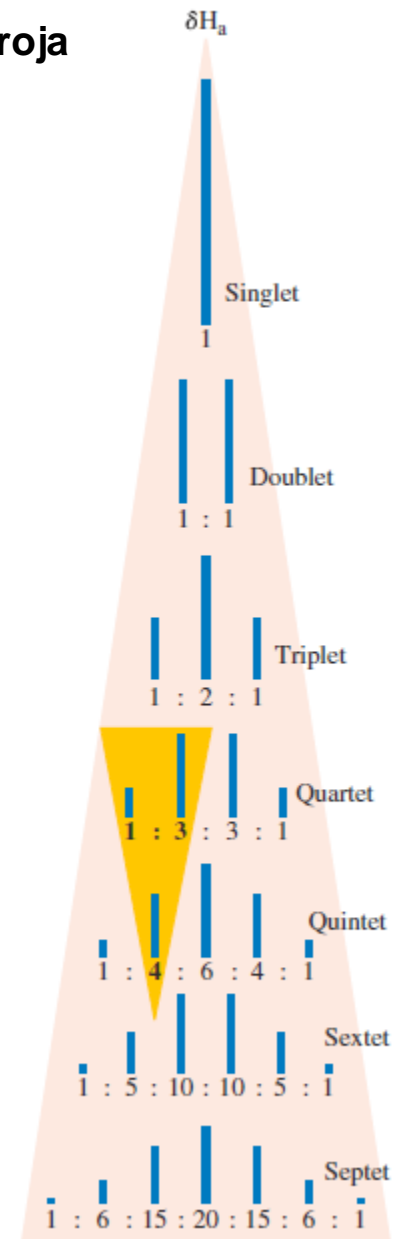
B_0 ↑

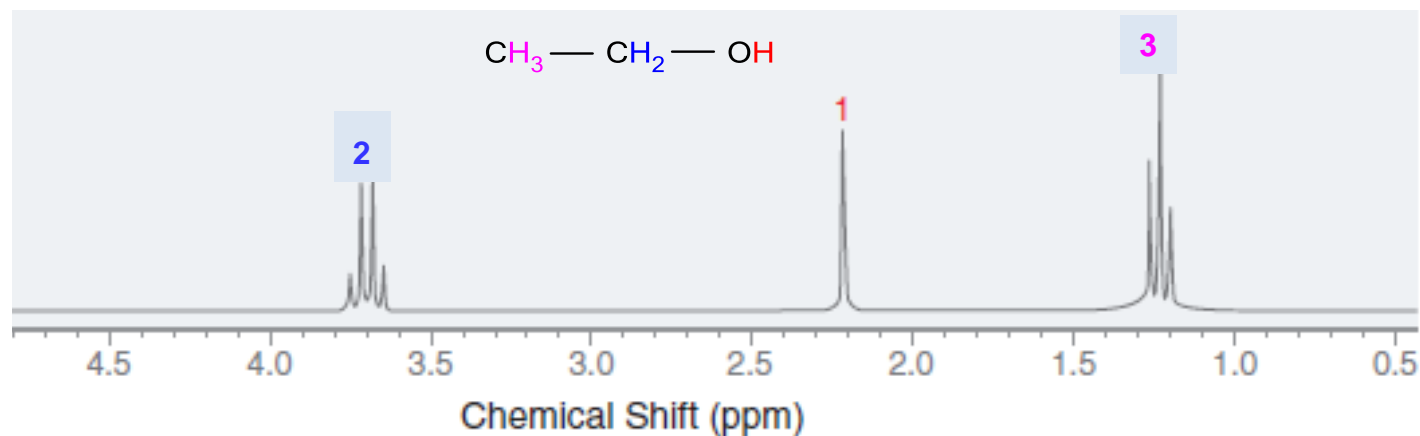
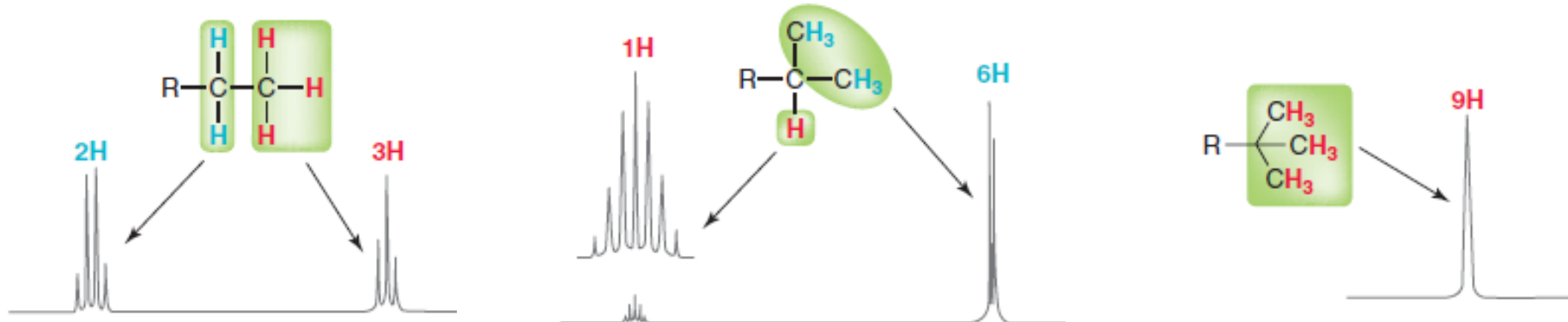
struktura	stanje spina H_b	signal H_a	
			singlet
			dublet
			triplet
			kvartet

$N + 1$ pravilo

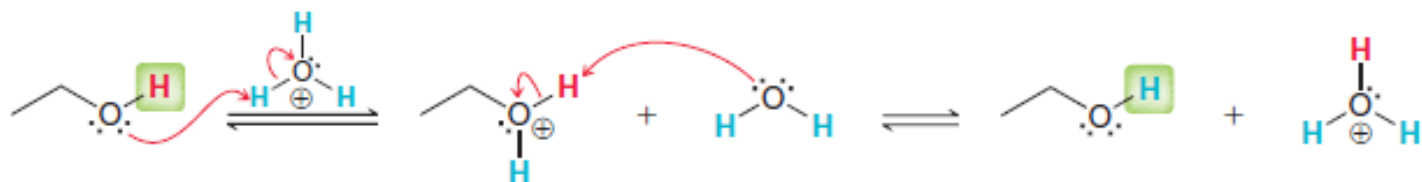
- Signal protona cijepa se tako da je broj vrhova za jedan veći od broja ekvivalentnih susjednih protona (M),
- relativni odnos intenziteta signala u multipletu dan je Pascalovim trokutom:

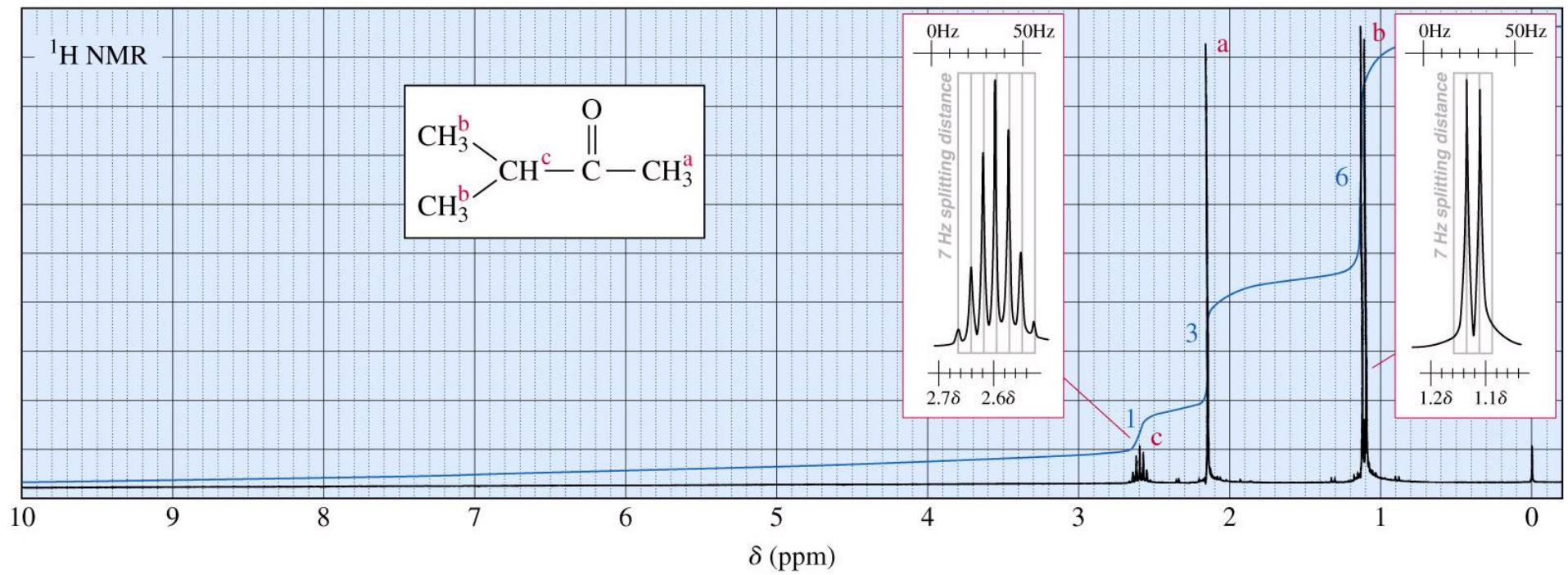
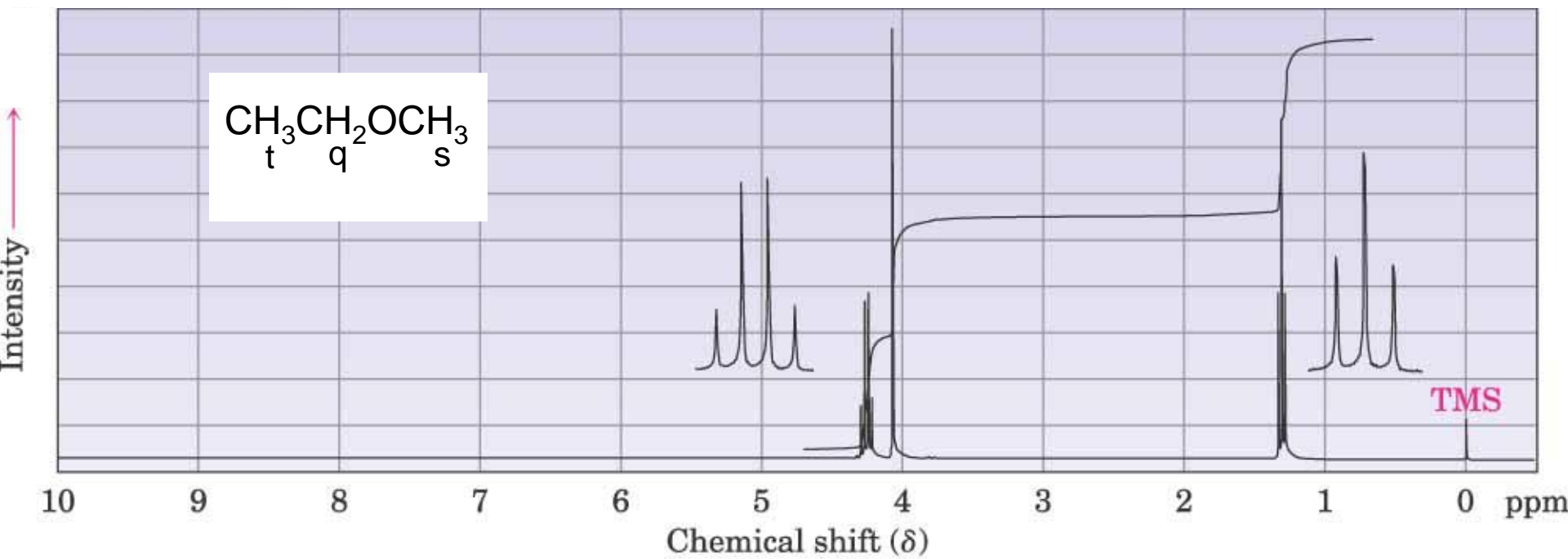
Broj ekvivalentnih protona koji uzrokuju cijepanje	Broj signala	Pascalov trokut (omjer intenziteta signala)
0	1 (singlet)	
1	2 (dublet)	
2	3 (triplet)	
3	4 (kvartet)	
4	5 (kvintet)	
5	6 (sekstet)	
6	7 (septet)	



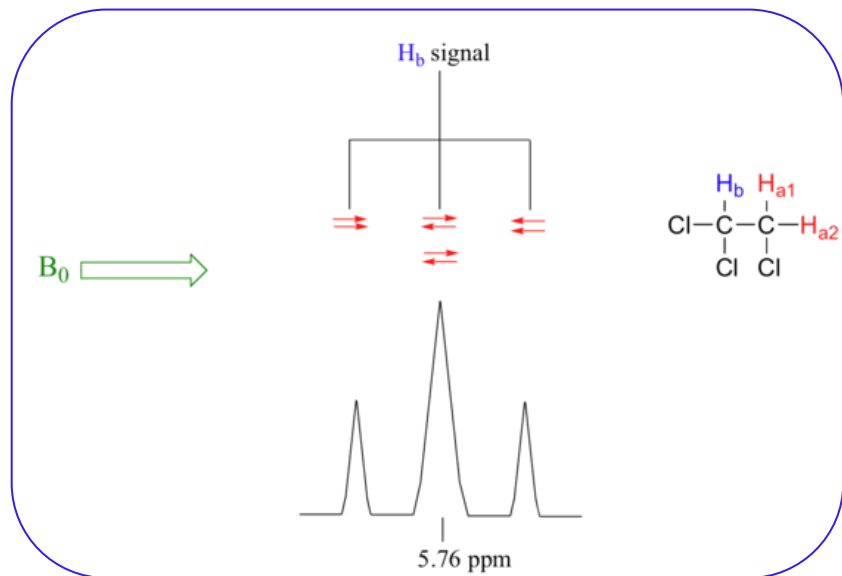
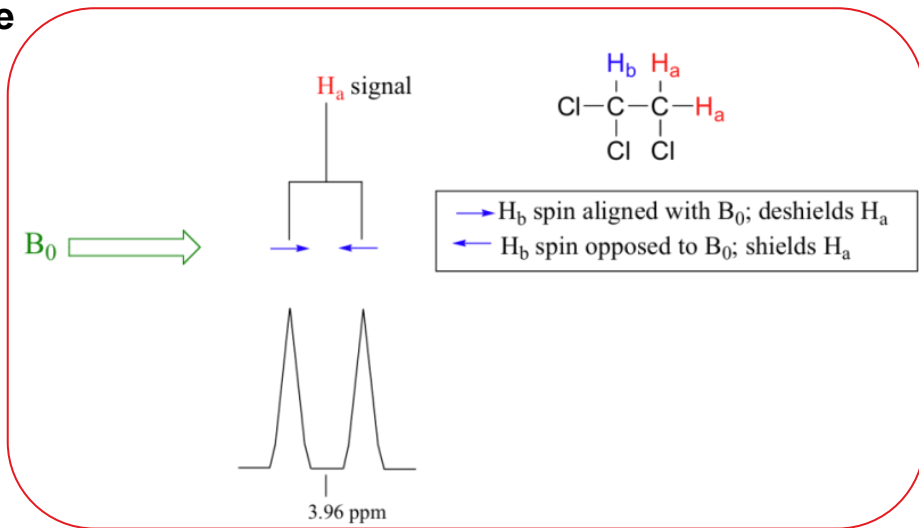
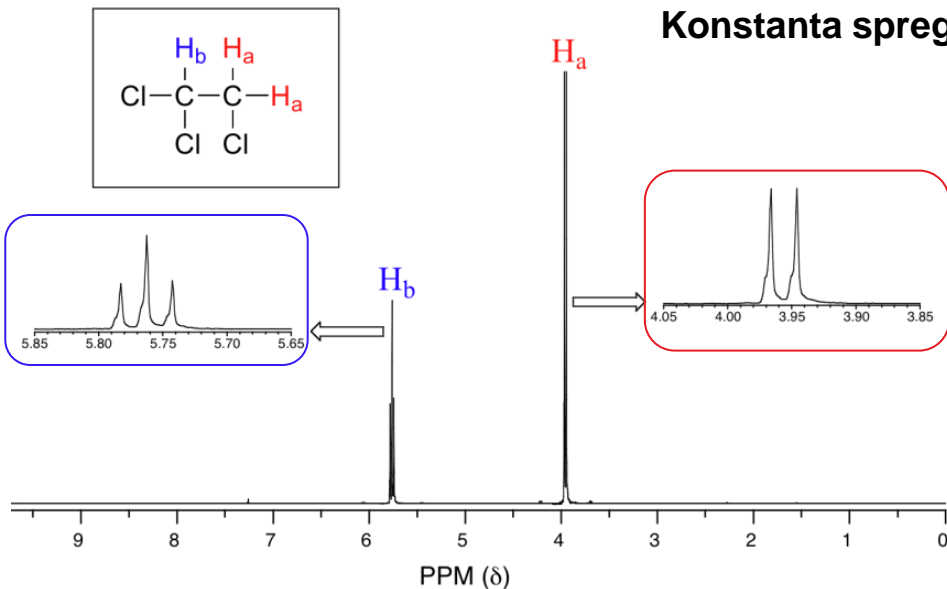


- Hidroksilni proton javlja se u području 2-5 ppm, kao singlet umjesto očekivanog tripleta?!
- brza izmjena protona katalizirana tragovima kiseline ili baze: hidroksilni protoni su labilni i njihov transfer je toliko brz da se ne opaža cijepanje signala:

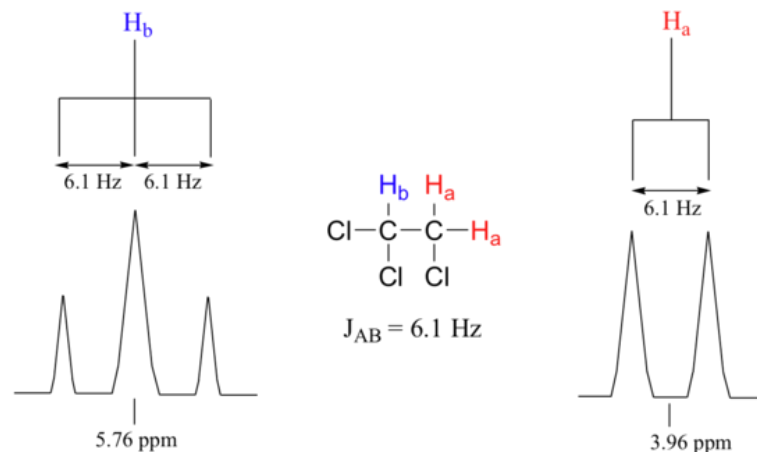




Konstanta sprege

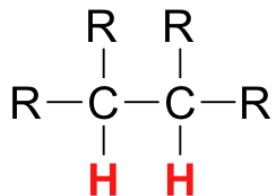


- **Konstanta sprege (J), udaljenost između vrhova istog signala i izražava se u Hz,**
- u vicinalnim sustavima tipa $H_a-C-C-H_b$, sprege H_a s H_b (J_{ab}) mora biti jednaka sprezi H_b s H_a (J_{ba}) \Rightarrow razmaci između vrhova su jednaki,

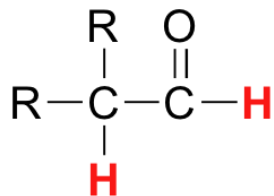


- signali protona koji cijepaju jedni druge uvijek imaju jednake konstante sprege, što nam pomaže u određivanju protona pozicioniranih na susjednim položajima.

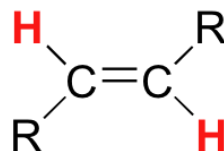
Uobičajene vrijednosti konstanti sprega



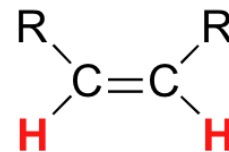
6-8 Hz



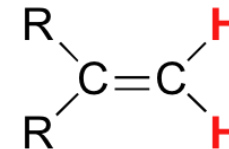
2-3 Hz



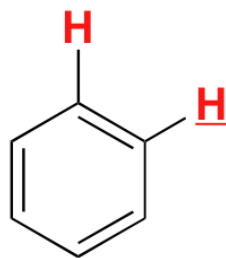
12-18 Hz



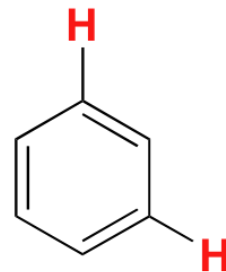
6-12 Hz



0-2 Hz



6-10 Hz

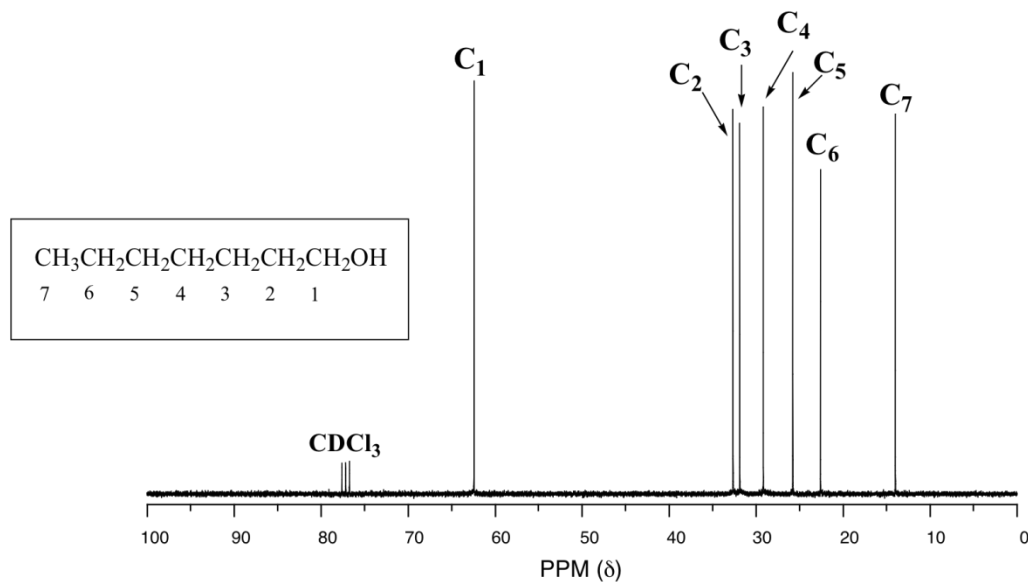
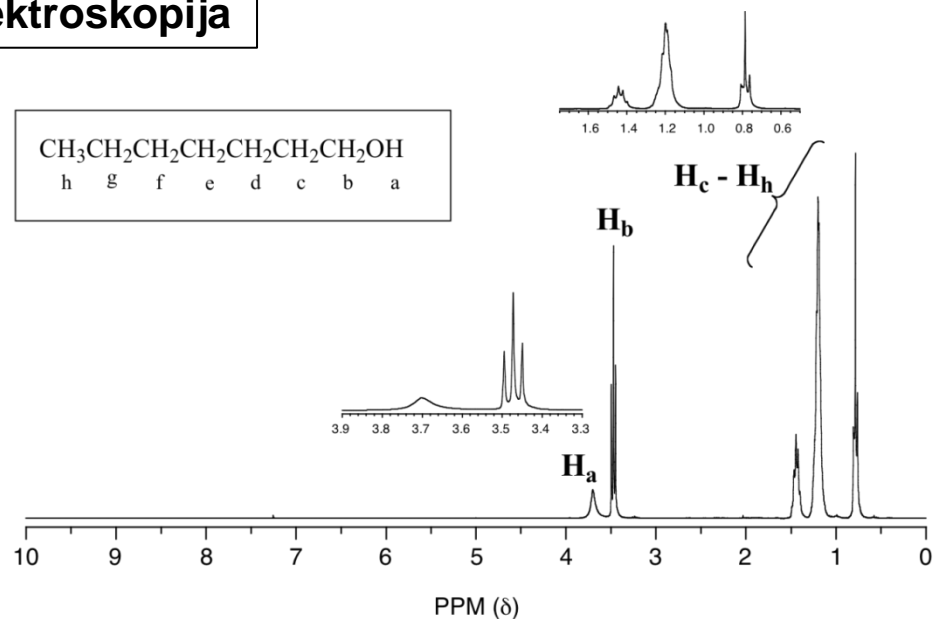


1-3 Hz

(4-bond coupling)

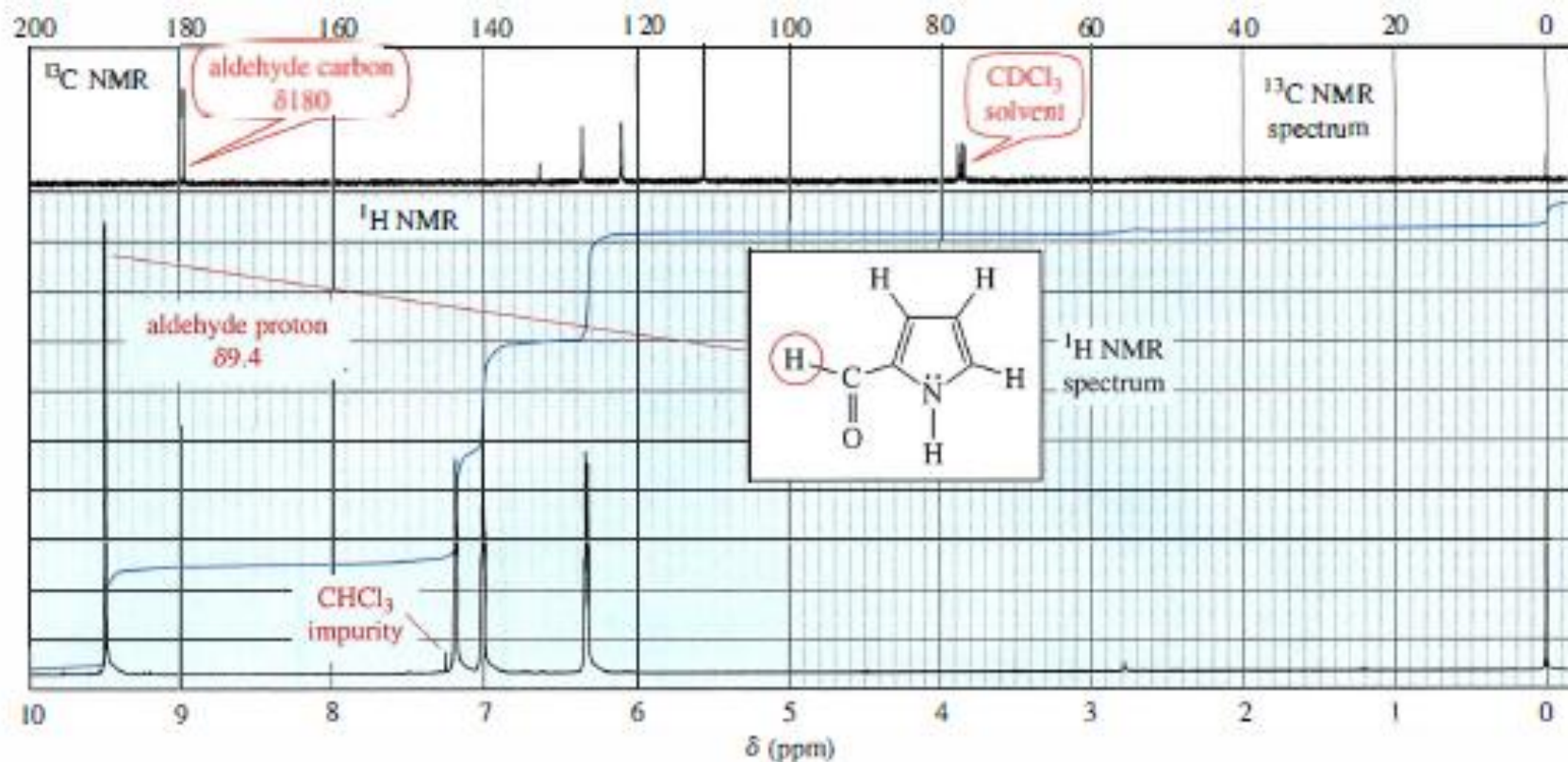
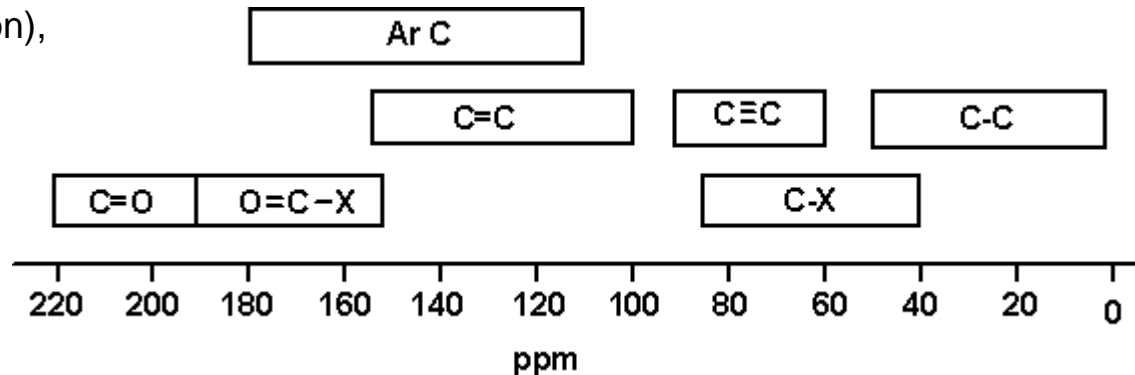
¹³C NMR-spektroskopija

- Omogućuje detekciju ugljikovih atoma,
- ¹³C NMR-spektroskopija manje je osjetljiva od ¹H NMR-spektroskopije (samo je 1% ugljikovih atoma u uzorku u stanju ¹³C izotopa; žiromagnetski omjer za ¹³C iznosi tek 1/4 žiromagnetskog omjera za proton), stoga su signali ugljikovih atoma slabiji od signala protona, te ¹³C NMR-spektroskopija zahtijeva dulje vrijeme snimanja uzorka,
- ¹²C ima paran broj neutrona i protona (nema magnetski spin i ne može dati NMR-signal),
- ¹³C izotop ima neparan broj neutrona (ima magnetski spin!),

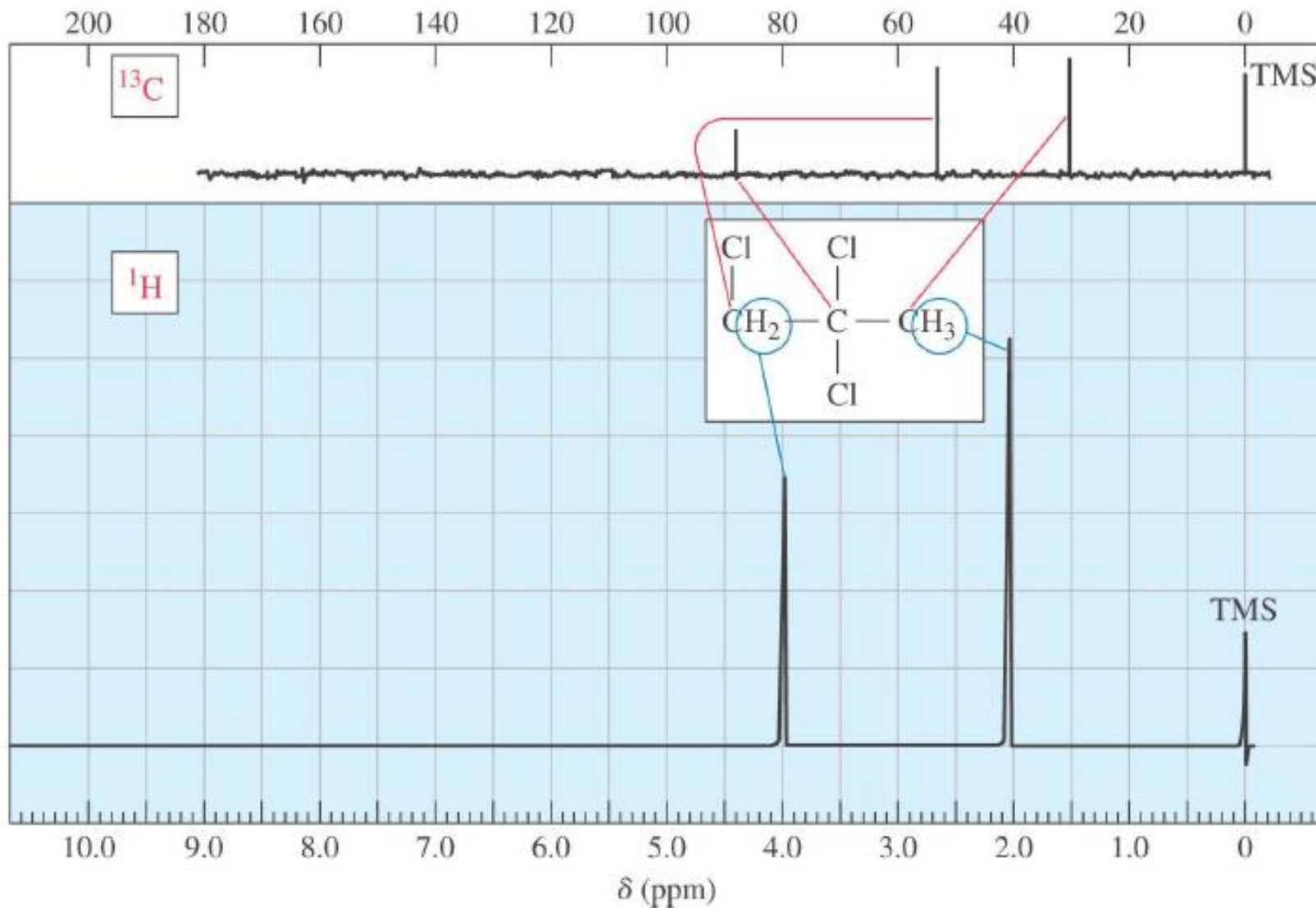


Kemijski pomaci ugljikovih atoma

- Obično su 15-20 puta veći u odnosu na pripadajući proton (ugljik je bliži zasjenjujućoj odnosno odsjenjujućoj skupini nego proton),

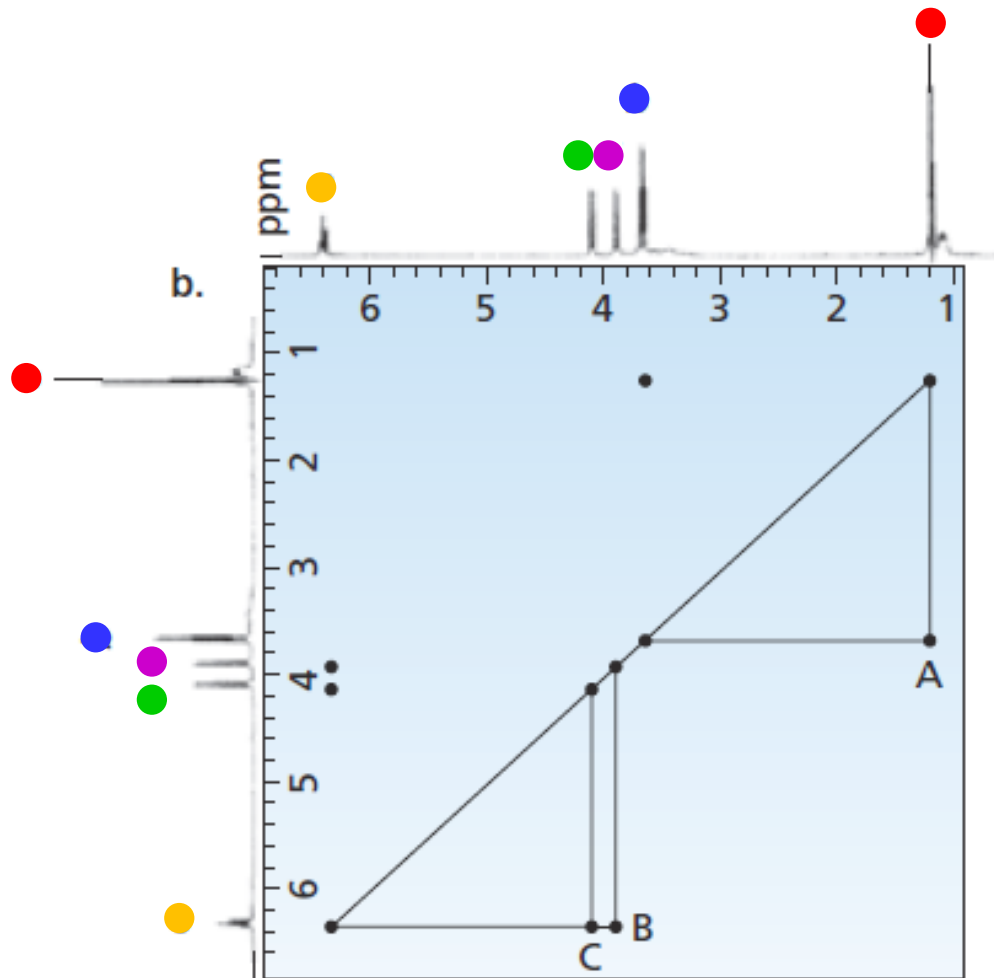
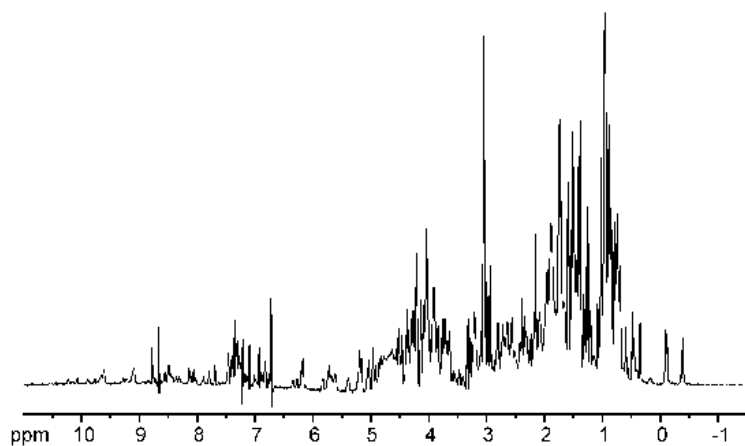
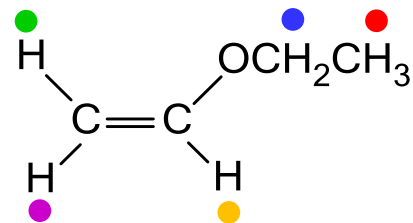


- površina signala u ^{13}C NMR-spektru ne mora biti proporcionalna broju C-atoma,
- signali C-atoma iz metilnih i metilenskih skupina jačeg su intenziteta nego signali kvaternih C-atoma,



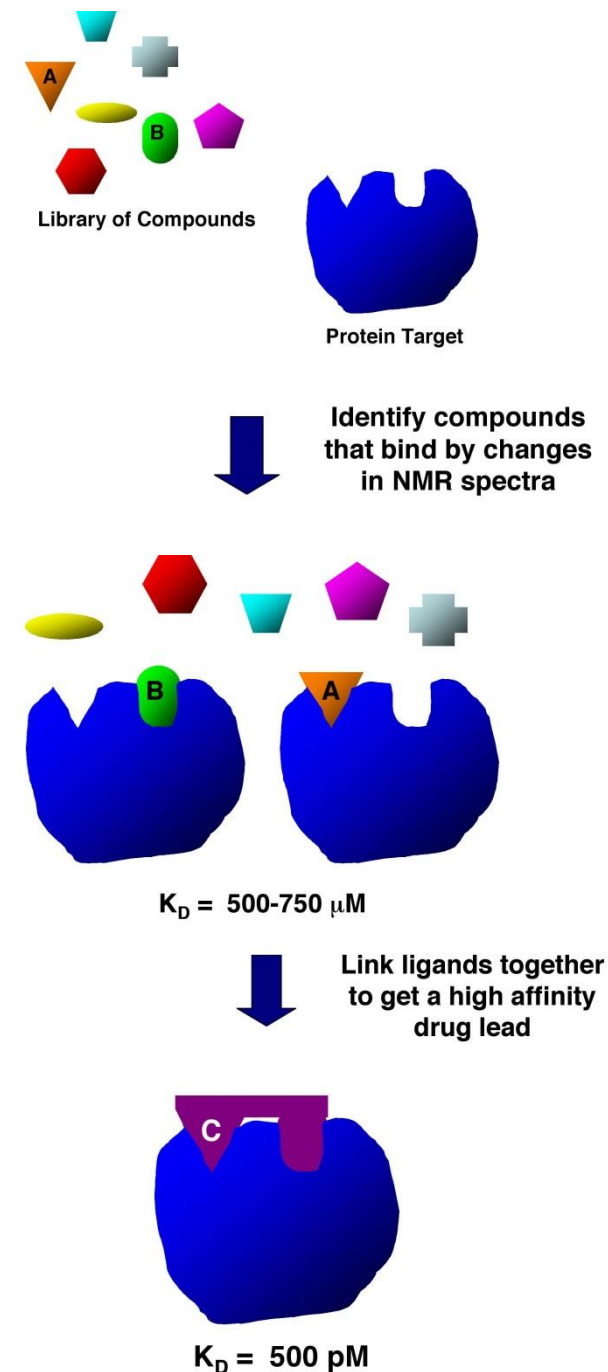
2D NMR-spektroskopija

- ^1H NMR-spektri kompleksnijih molekula često sadrže preklopljenje signale koje je teško asignirati,
- 2D NMR-spektri pružaju informacije o vezama i odnosima atoma u molekuli,
- COSY (Correlation Spectroscopy): metoda za otkrivanje homonuklearnih korelacija kroz susjedne veze,

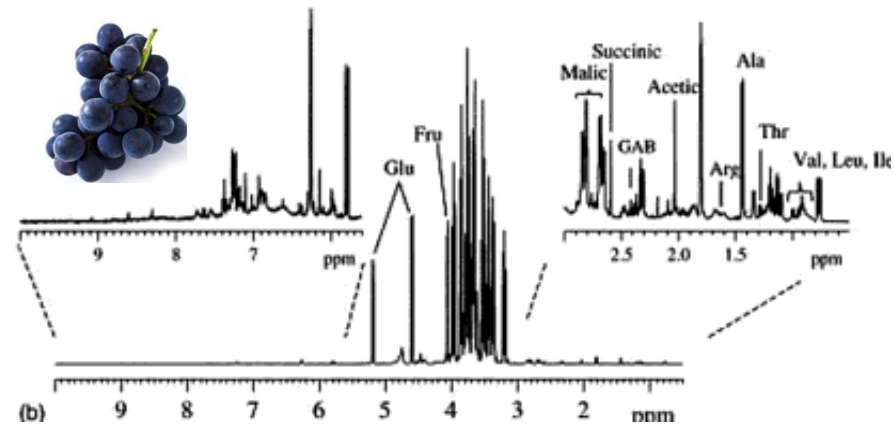
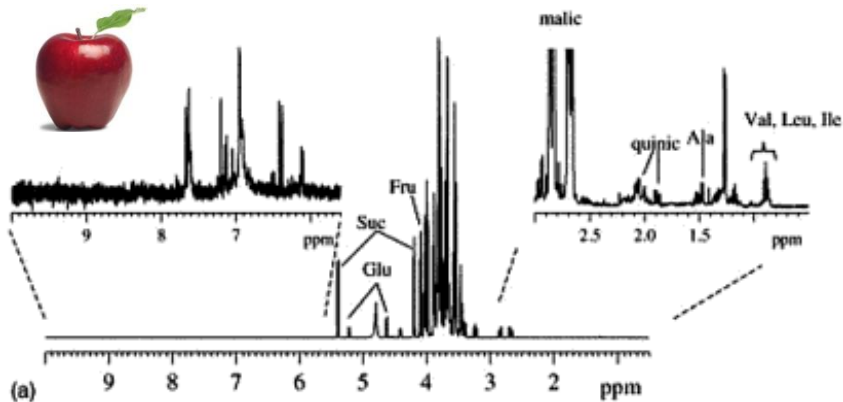


NMR u prehrambenoj tehnologiji, biotehnologiji i nutricionizmu

- Okus, miris i izgled hrane (kriteriji važni potrošačima) u vezi su s fizikalno-kemijskim svojstvima hrane,
- NMR korišten u kvantifikaciji fizikalnih i kemijskih svojstava hrane predstavlja moćno oruđe za unapređenje kvalitete hrane,
- primjena NMR u prehrambenoj tehnologiji i znanosti o hrani:
 - određivanje masti, vlage i šećera u prirodnim proizvodima (zrelost i kvaliteta voća i povrća),
 - sadržaj ulja i vlage u žitaricama,
 - određivanje masti i vlage u prerađenoj hrani (pekarskim proizvodima), utvrđivanje autentičnosti voćnih sokova i vina, kontrola kvalitete biljnih ulja, karakterizacija proteina i šećera, ...
- primjena NMR u biotehnologiji omogućuje istraživanje faktora ključnih za biološku aktivnost (struktura biomakromolekula, dinamika reakcija i molekulsko prepoznavanje), te razvoj lijekova.



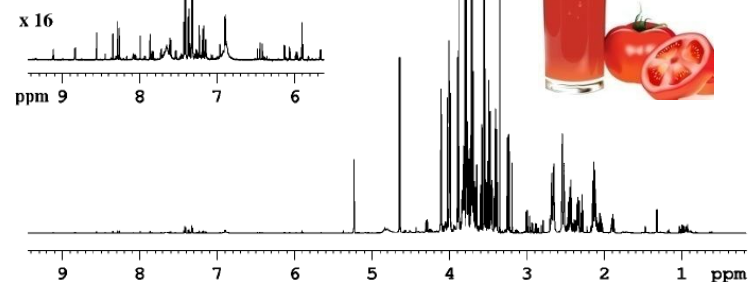
- Voćni sokovi i pića: NMR spektri soka od jabuke razlikuju se ovisno o sorti (mogućnost utvrđivanja podrijetla soka na tržištu), mikrobiološkoj i enzimskoj aktivnosti (analiza biokemijskih promjena do kojih dolazi tijekom skladištenja),

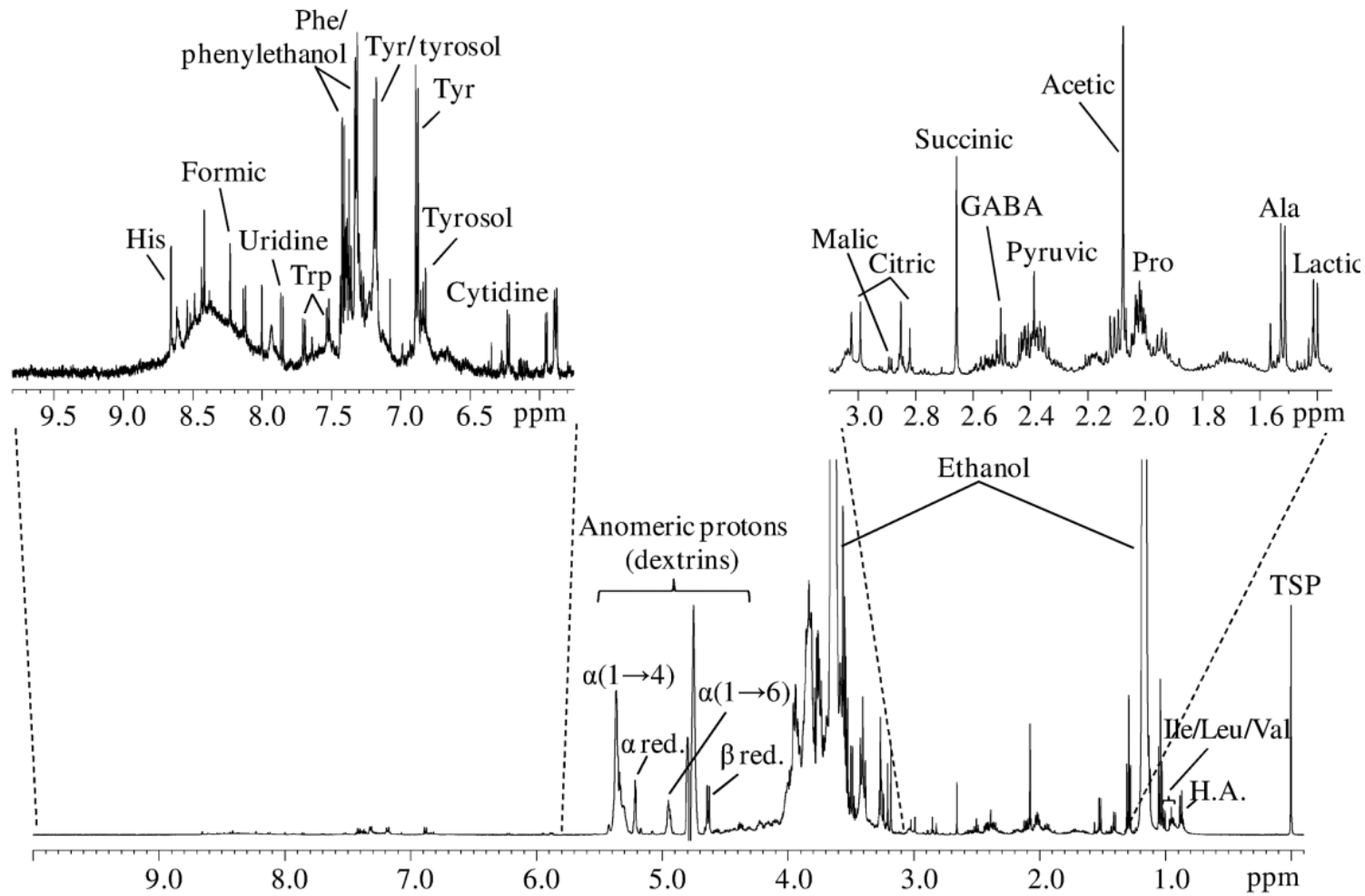


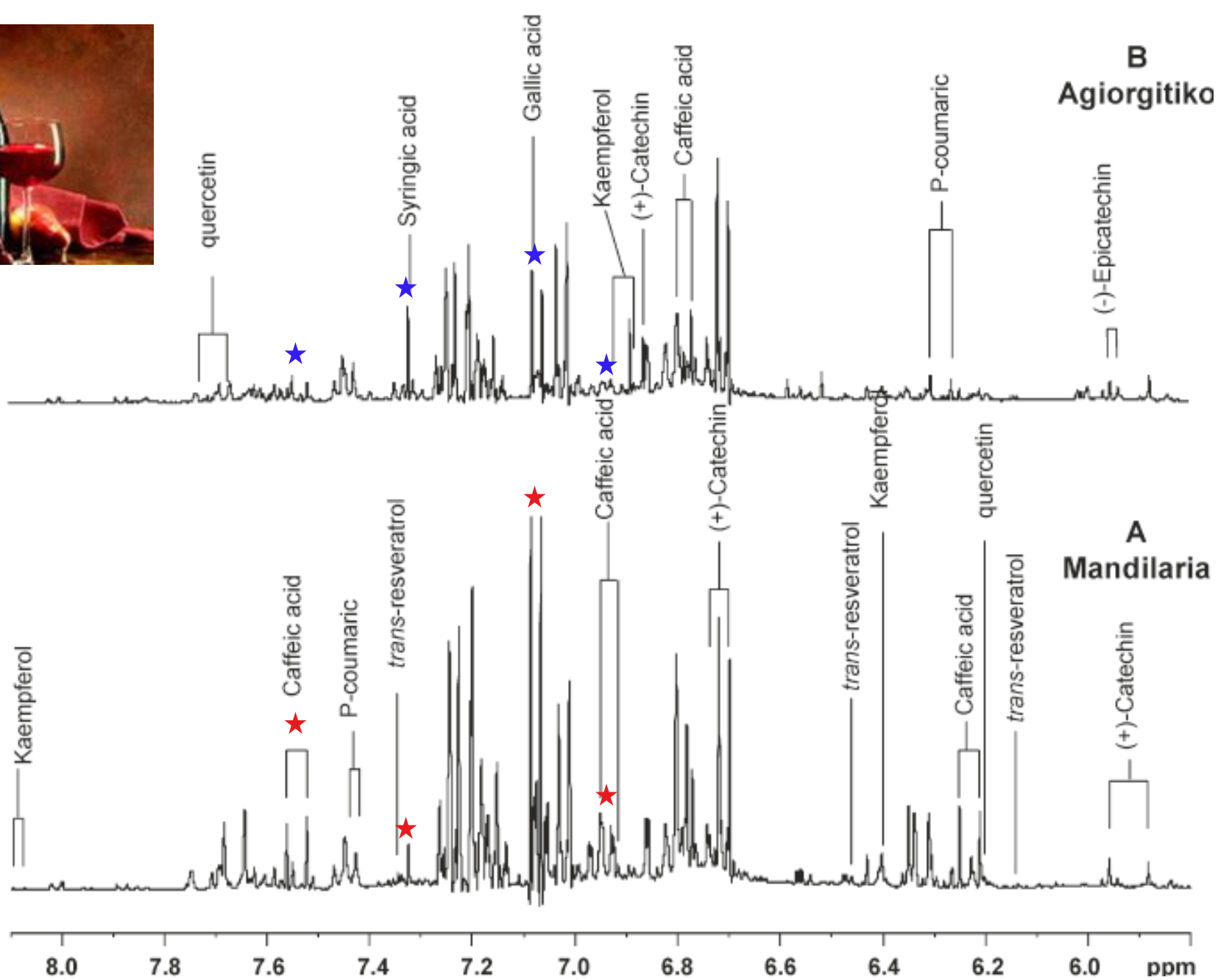
- alifatsko područje sadrži signale različitih aminokiselinskih ostataka kao i organskih kiselina,
- u području ugljikohidrata, u NMR spektru soka od grožđa dominiraju signali glukoze i fruktoze,
- brojni signali u aromatskom području omogućuju identifikaciju fenolnih spojeva (važnih nutrijenata).

Table 1. Resonance assignments with chemical shifts and spin-spin coupling patterns of metabolites identified in 600 MHz ^1H and ^1H - ^{13}C spectra of tomato juice^a

^1H shift	Multiplicity	Molecule	Assignment	^{13}C shift				
0.93	t	Isoleucine	δ -CH ₃		3.68		α -D-Fructofuranose	Half CH ₂ -C6
0.98	d	Valine	CH ₃		3.70	dd	β -D-Fructopyranose	Half CH ₂ -C6
1.00	d	Isoleucine	β -CH ₃		3.71	td	α -D-Glucose	H3
1.03	d	Valine	CH ₃		3.71	d	β -D-Fructopyranose	Half CH ₂ -C1
1.17	t	Ethanol	CH ₃		3.72	dd	β -D-Glucose	Half CH ₂ -C6
1.26	m	Isoleucine	Half γ -CH ₂		3.75	dd	Glutamate	α -CH
1.32	d	Threonine	γ -CH ₃	20.5	3.76	dd	α -D-Glucose	Half CH ₂ -C6
1.46	m	Isoleucine	Half γ -CH ₂		3.78	t	Glutamine	α -CH
1.47	d	Alanine	CH ₃		3.78		Alanine	α -CH
1.89	m	γ -Aminobutyrate	β -CH ₂	24.7	3.79	dd	β -D-Fructopyranose	H3
1.91	s	Acetate	CH ₃		3.79	dd	β -D-Fructofuranose	Half CH ₂ -C6
1.98	m	Isoleucine	β -CH		3.80	m	α -D-Fructofuranose	Half CH ₂ -C6
2.05	m	Glutamate	Half β -CH ₂	28.0	3.82	m	α -D-Glucose	H5
2.12	m	Glutamate	Half β -CH ₂	28.0	3.82	m	α -D-Glucose	Half CH ₂ -C6
2.14	m	Glutamine	β -CH ₂	27.3	3.82	m	β -D-Fructofuranose	H5
2.26	m	Valine	β -CH		3.89	dd	Aspartate	α -CH
2.29	t	γ -Aminobutyrate	α -CH ₂	35.4	3.89	dd	β -D-Glucose	Half CH ₂ -C6
2.34	m	Glutamate	γ -CH ₂	34.4	3.89	dd	β -D-Fructopyranose	H4
2.37	dd	Malate	Half β -CH ₂	43.7	3.94		Tyrosine	α -CH
2.45	m	Glutamine	γ -CH ₂	31.9	3.99	dd	Phenylalanine	α -CH
2.53	d	Citrate	Half CH ₂	46.6	3.99	ddd	β -D-Fructopyranose	H5
2.66	dd	Malate	Half β -CH ₂	43.7	4.00	dd	α -D-Fructofuranose	H4
2.66	d	Citrate	Half CH ₂	46.6	4.02	dd	Asparagine	α -CH
2.68	dd	Aspartate	Half β -CH ₂	37.6	4.05	dd	β -D-Fructopyranose	Half CH ₂ -C6
2.80	dd	Aspartate	Half β -CH ₂	37.6	4.11	m	α -D-Fructofuranose	H5
2.87	dd	Asparagine	Half β -CH ₂	35.7	4.11	d	β -D-Fructofuranose	H3,H4
2.95	dd	Asparagine	Half β -CH ₂	35.7	4.25		α -D-Fructofuranose	H3
3.00	t	γ -Aminobutyrate	γ -CH ₂	40.4	4.29	dd	Threonine	β -CH
3.06	dd	Tyrosine	Half β -CH ₂		4.64	d	Malate	α -CH
3.13	dd	Phenylalanine	Half β -CH ₂		5.23	d	β -D-Glucose	H1
3.18	dd	Tyrosine	Half β -CH ₂		6.90	d	α -D-Glucose	H1
3.19	s	Choline	N(CH ₃) ₃	54.9	7.18	d	Tyrosine	H3, H5
3.24	dd	β -D-Glucose	H2	75.2	7.19	d	Tyrosine	H2,H6
3.27	dd	Phenylalanine	Half β -CH ₂		7.27	t	Tryptophan	H5
3.35	s	Methanol	CH ₃	50.0	7.32	t	Tryptophan	H6
3.40	dd	β -D-Glucose	H4	70.7	7.37	dd	Phenylalanine	H2,H6
3.41	dd	α -D-Glucose	H4	70.7	7.42	t	Phenylalanine	H4
3.46	ddd	β -D-Glucose	H5	76.9	7.42	td	Phenylalanine	H3,H5
3.49	t	β -D-Glucose	H3	76.8	7.54	d	Tryptophan	H7
3.53	dd	α -D-Glucose	H2	72.5	7.72	d	Tryptophan	H4
3.54	d	β -D-Fructofuranose	Half CH ₂ -C1	63.8	8.45	s	Formate	HCOO ⁻
3.55	d	β -D-Fructopyranose	Half CH ₂ -C1	64.9				
3.59	m	Threonine	α -CH	61.5				
3.59	d	β -D-Fructofuranose	Half CH ₂ -C1	63.8				
3.61	m	Valine	α -CH					
3.65		α -D-Fructofuranose	CH ₂ -C1	64.0				
3.65		Ethanol	CH ₂					
3.65		α -D-Fructofuranose	CH ₂ -C6	62.4				
3.67		Isoleucine	α -CH					
3.67	dd	β -D-Fructofuranose	Half CH ₂ -C6	63.4				







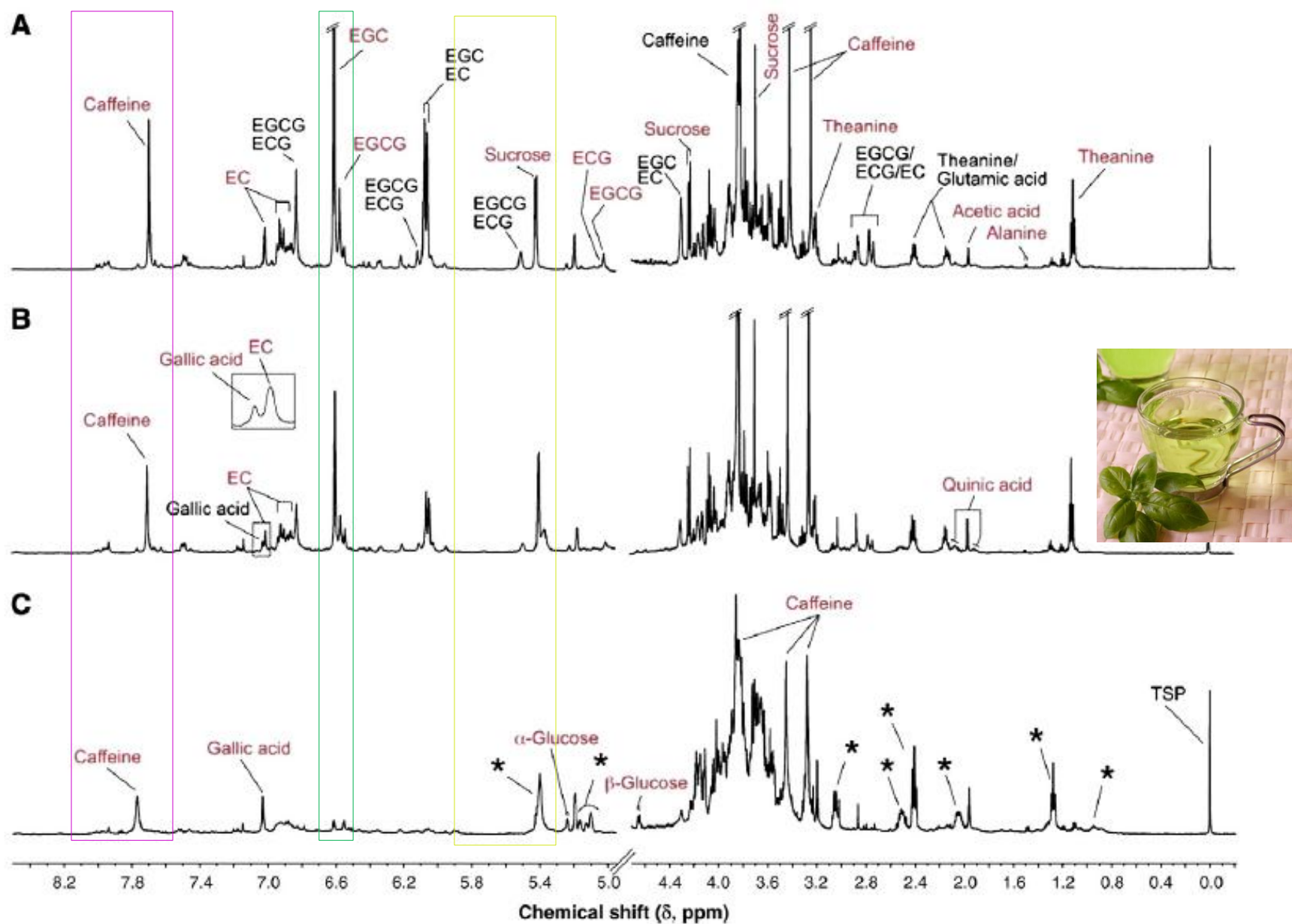
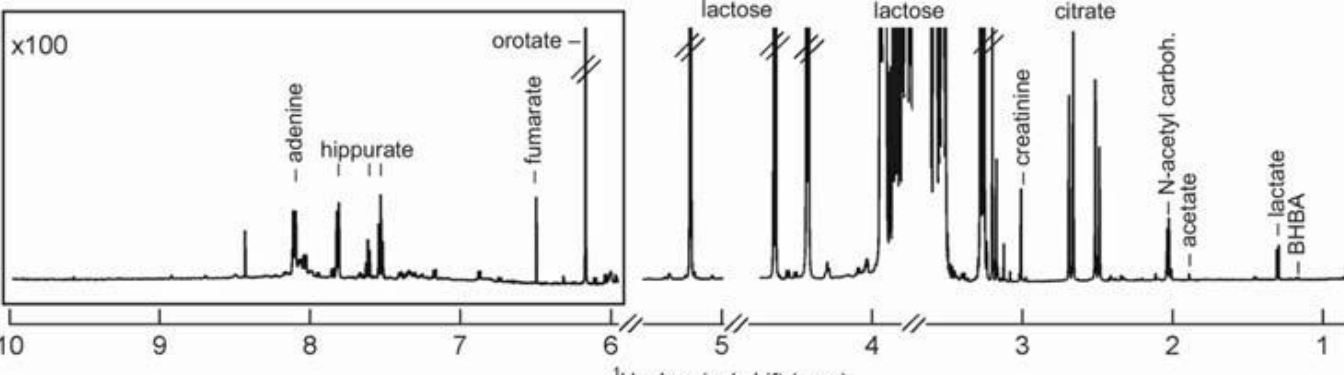


Fig. 1. Representative ¹H NMR spectra of green tea (A), partially fermented tea (B) and fully fermented tea (C) extracts. EC, (–)-epicatechin; EGC, (–)-epigallocatechin; ECG (–)-epicatechin-3-gallate; EGCG, (–)-epigallocatechin-3-gallate. Metabolites with red letters represent NMR peaks that did not overlap with other metabolites, allowing better visualization of their changes. Stars denote unknown compounds produced during tea fermentation.



Metabolite	Assignment	¹ H Chemical Shift (ppm)	Metabolite	Assignment	¹ H Chemical Shift (ppm)	Metabolite	Assignment	¹ H Chemical Shift (ppm)
Acetate	CH ₃	1.92	Galactose β	CH	3.49	Lactose β	½ CH ₂ -6	3.81
Acetone	CH ₃	2.24	Galactose-1-phosphate	CH-1	5.38	Lactose β	CH-5	3.84
cis-aconitate	CH ₂	3.15	Glucose	CH ₂	5.1	Lecithin	3 × CH ₃	3.12
Adenine	CH-8	8.12	Glucose-1-phosphate	CH-1	5.51	Lecithin	CH ₂ -4	4.22
Adenine	CH-2	8.13	Glutamate	γ-CH ₂	2.36	Lecithin	CH ₂ -3	4.18
Alanine	CH	3.79	Glycerophosphocholine	O-CH ₂	4.32	Lecithin	CH ₂ -5	3.75
Alanine	CH ₃	1.48	Glycerophosphocholine	N-CH ₂	3.65	Lecithin	CH ₂ -5	3.83
β-hydroxybutyrate	CH ₃	1.20	Glycine	CH ₂	3.57	Malonic acid	CH ₂	3.11
Betaine	3 × CH ₃	3.26	Hippurate	CH ₂ -2,6	7.84	3-Methylhistidine	α-CH	3.97
Butyrate	CH ₃	0.90	Hippurate	CH-4	7.64	3-Methylhistidine	β-CH	3.30 / 2.25
Carnitine	3 × CH ₃	3.21	Hippurate	CH ₂ -3,5	7.54	3-Methylhistidine	CH ₃	3.74
Carnitine	CH ₂	2.44	Isobutyrate	CH ₃	1.16	3-Methylhistidine	δ-CH	7.14
Carnitine	N-CH ₂	3.43	Isoleucine	δ-CH ₃	0.93	3-Methylhistidine	ε-CH	8.09
Carnitine	CH	4.57	Lactate	CH ₃	1.32	Methionine	γ-CH ₂ , S-CH ₃	2.15
Choline	3 × CH ₃	3.18	Lactate	CH	4.11	N-acetylcarbohydrates	CH ₃	2.06
Choline	O-CH ₂	4.06	Lactose (total)	CH-1'	4.45	Ornithine	γ-CH ₂	1.80
Choline	N-CH ₂	3.51	Lactose (total)	CH-5'	3.73	Orotate	CH	6.20
Citrate	CH	2.52	Lactose (total)	CH-2	3.94	Phosphocholine	O-CH ₂	4.16
Citrate	CH ₂	2.72	Lactose (total)	CH-2'	3.54	Phosphocholine	N-CH ₂	3.58
Creatine	CH ₃	3.79	Lactose (total)	CH ₂ -6	3.67	Phosphocholine	3*CH ₃	3.18
Creatine	CH ₂	2.88	Lactose (total)	CH ₂ -6'	3.78	Phosphocreatine	CH ₃	3.03
Creatinine	CH ₂	4.06	Lactose α	CH-1	5.23	Phosphocreatine	CH ₂	3.93
Creatinine	CH ₃	3.05	Lactose α	CH ₂ -6	3.88	Taurine	S-CH ₂	3.43
Ethanolamine	O-CH ₂	3.83	Lactose α	CH-3	3.59	Taurine	N-CH ₂	3.27
Ethanolamine	N-CH ₂	3.15	Lactose α	CH-4'	3.96	Triethylamine-N-oxide	CH ₃	3.27
Formate	CH	8.45	Lactose α	CH-4	3.66	Urea	NH ₂	5.79
Fucose	CH ₃	1.25	Lactose α	CH-5'	3.84	Valine	CH ₃	1.05
Fumarate	CH	6.52	Lactose β	CH-1	4.67			
Galactose α	CH	4.07	Lactose β	CH-4	3.66			
Galactose α	CH	3.81	Lactose β	CH-2	3.29			
Galactose β	CH	4.57	Lactose β	½ CH ₂ -6	3.96			
			Lactose β	CH-3	3.6			

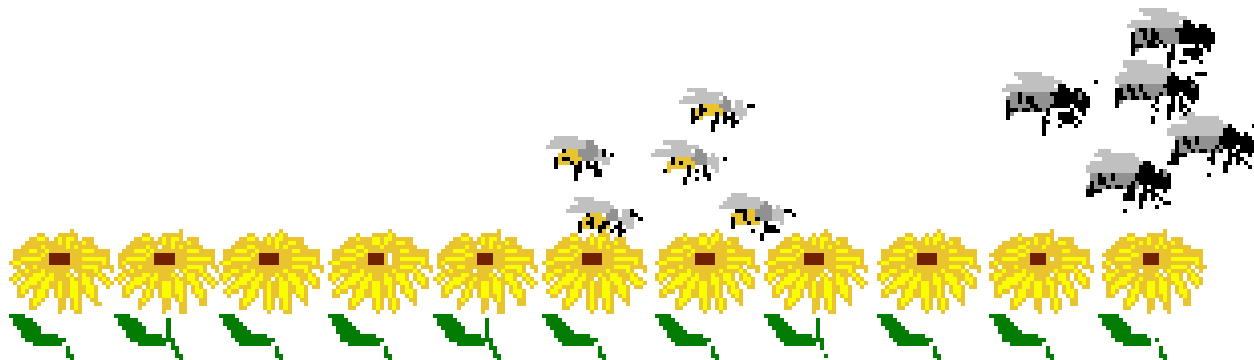
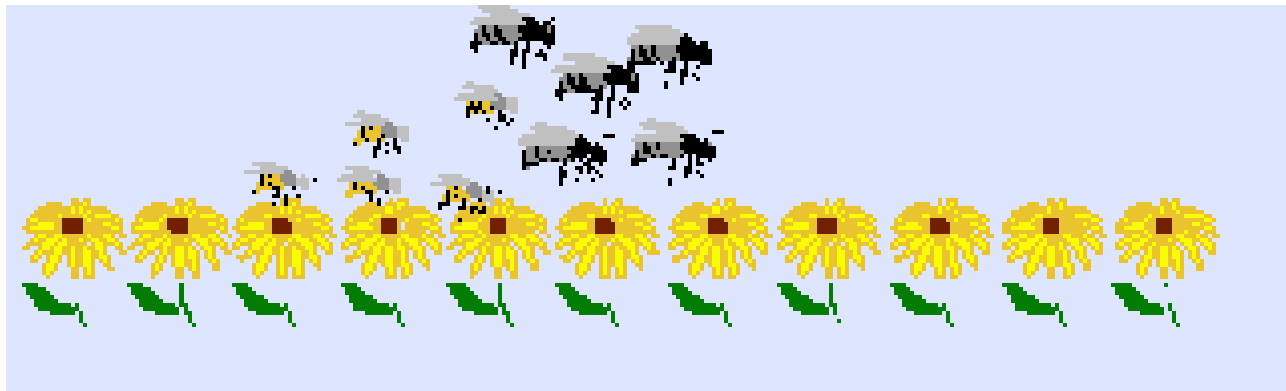
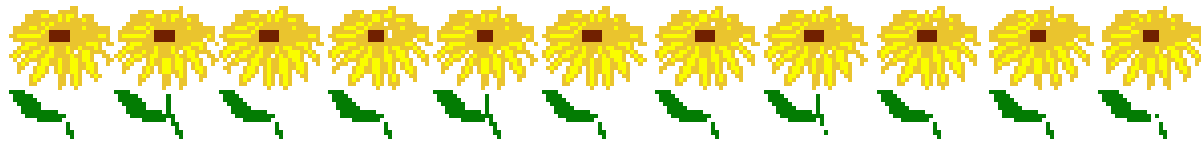
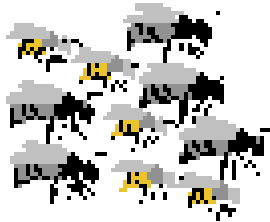
Magnetsko rezonancijsko oslikavanje (MRI, engl. *Magnetic Resonance Imaging*)

- 1981., neinvazivna metoda za oslikavanje unutrašnjosti tijela,
- razlikuje meka i masna tkiva, kosti, šupljine, krv, ...
- oko $\frac{2}{3}$ atoma u našem tijelu čine protoni iz vode; različiti načini vezivanja vode u tkivima uzrokuju različite signale različitih organa, kao i zdravih i bolesnih tkiva,
- ovisno o pripadajućem tkivu, protoni su izloženi različitim lokalnim magnetskim poljima. Razlika u okolnom tkivu očituje se različitim nuklearnim rezonancijskim frekvencijama uslijed izlaganja jakom vanjskom magnetskom polju,
- rezonancijska frekvencija protona, osjetljiva na lokalno magnetsko polje, lako se može izmjeriti te se pomoću računala određuje položaj protona odnosno rekonstruira oblik tkiva.



[Beating heart MRI](#)

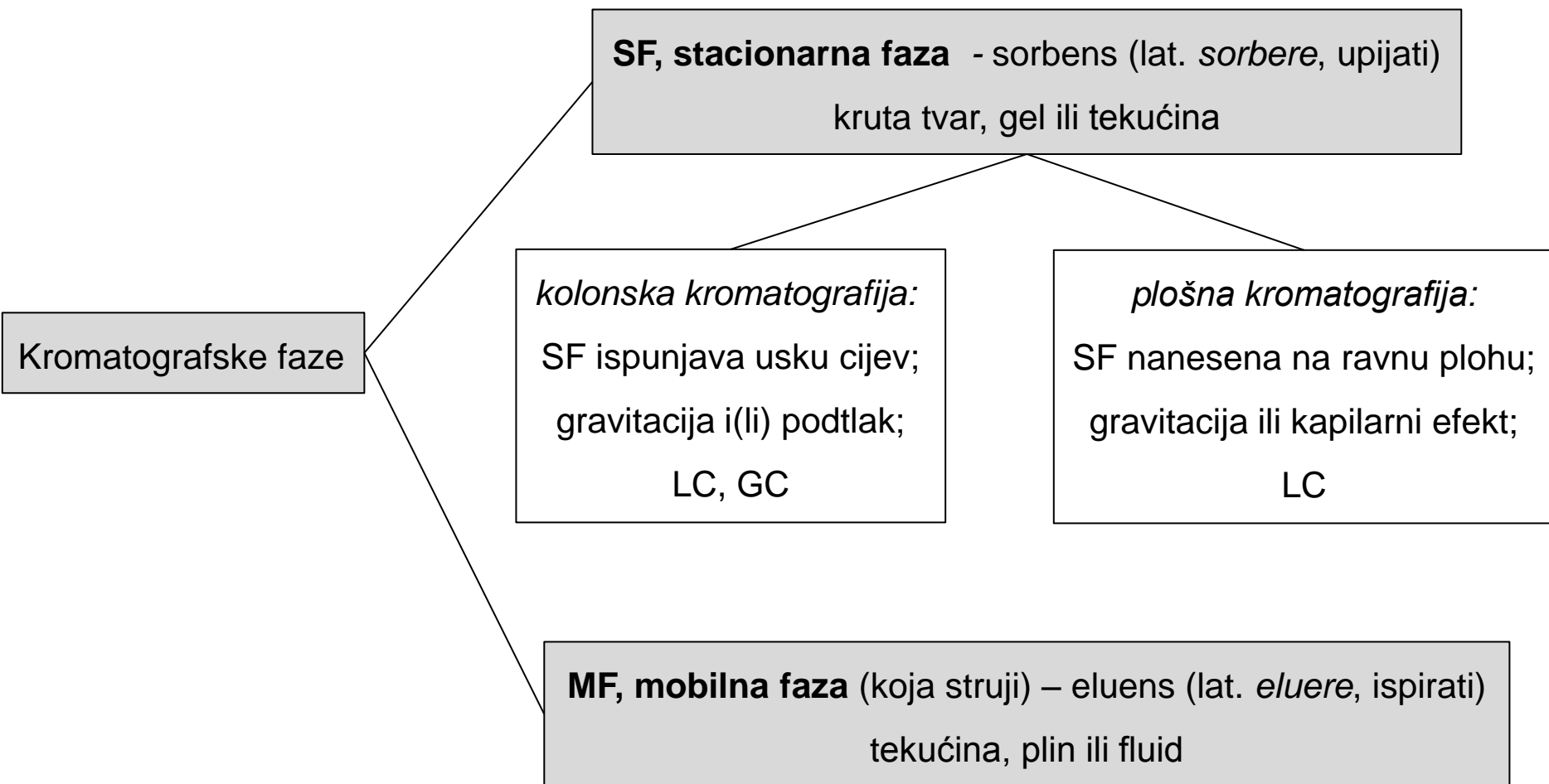
KROMATOGRAFIJA



Literatura:

1. D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, Forth Worth, Saunders, 1997.
2. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije* (prijevod: N. Kujundžić, V. Živčić-Alegretti, A. Živković), Školska knjiga, Zagreb 1999.
3. F. Rouessac, A. Rouessac, A. *Chemical Analysis, Modern Instrumental Methods and Techniques*, 2nd Ed., Willey&Sons, New York, 2007.
4. J. R. J. Paré, J. M. R. Belanger, *Instrumental Methods in Food Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 1997.
5. M. M. Mossoba, *Spectral Methods in Food Analysis*, Marcel Dekker Inc., New York, 1999.
6. S. Ahuja, N. Jespersen, *Modern Instrumental Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2006.
7. <http://chemwiki.ucdavis.edu/>

- **Kromatografija** (grčki, *chroma*, boja; *graphein*, pisati): tehnika kojom se komponente smjese razdjeljuju između dvije faze (stacionarna i mobilna) koje se međusobno ne miješaju,
- osim **odjeljivanja**, kromatografska analiza omogućuje **identifikaciju** i **kvantifikaciju** kemijskih spojeva prisutnih u složenim smjesama,



I. Agregatno stanje faza

Podjela kromatografskih postupaka

MF	SF	postupak
tekućina, <i>liquid</i> , L	krutina, <i>solid</i> , S	LSC
	tekućina, <i>liquid</i> , L	LLC
plin, <i>gas</i> , G	krutina, <i>solid</i> , S	GSC
	tekućina, <i>liquid</i> , L	GLC

II. Fizičko-kemijska svojstva i procesi koji dominiraju pri razdjeljivanju

III. Izvedbena tehnika

II. Fizičko-kemijska svojstva i procesi koji dominiraju pri razdjeljivanju

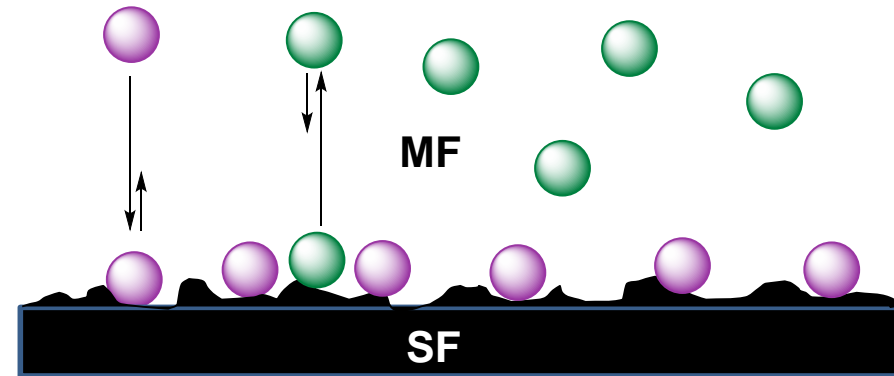
<i>Fizičko-kemijsko svojstvo</i>	<i>MF plin (GC)</i>	<i>MF tekućina (LC)</i>
vrelište	Sve vrste GC	/
adsorpcija	GSC	LSC
topljivost	GLC	LLC
oblik molekule	GSC s molekulskim sitima	gelna kromatografija afinitetna kromatografija
reverzibilna kemijska reakcija	GLC uz tvorbu kompleksa	ionsko-izmjenjivačka kromatografija

III. Izvedbena tehnika

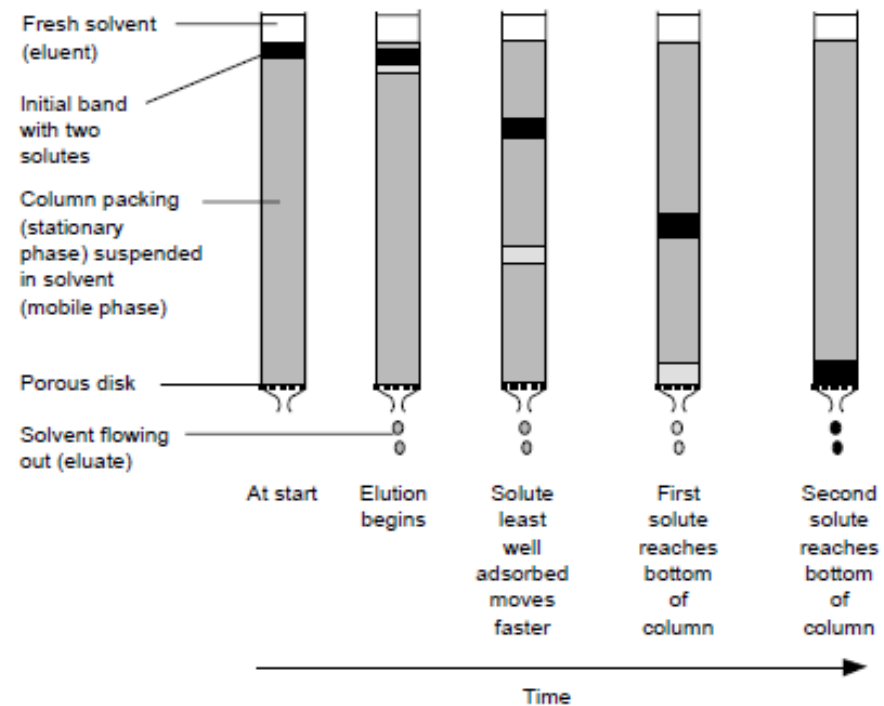
kromatografija na stupcu (kolonska)	
tankoslojna kromatografija	TLC
papirna kromatografija	PC
plinska kromatografija	GC

- Kromatografske metode bazirane su na jednom od sljedećih fenomena: adsorpcija, particija (razdioba), ionska izmjena te isključenje veličinom i oblikom molekula.

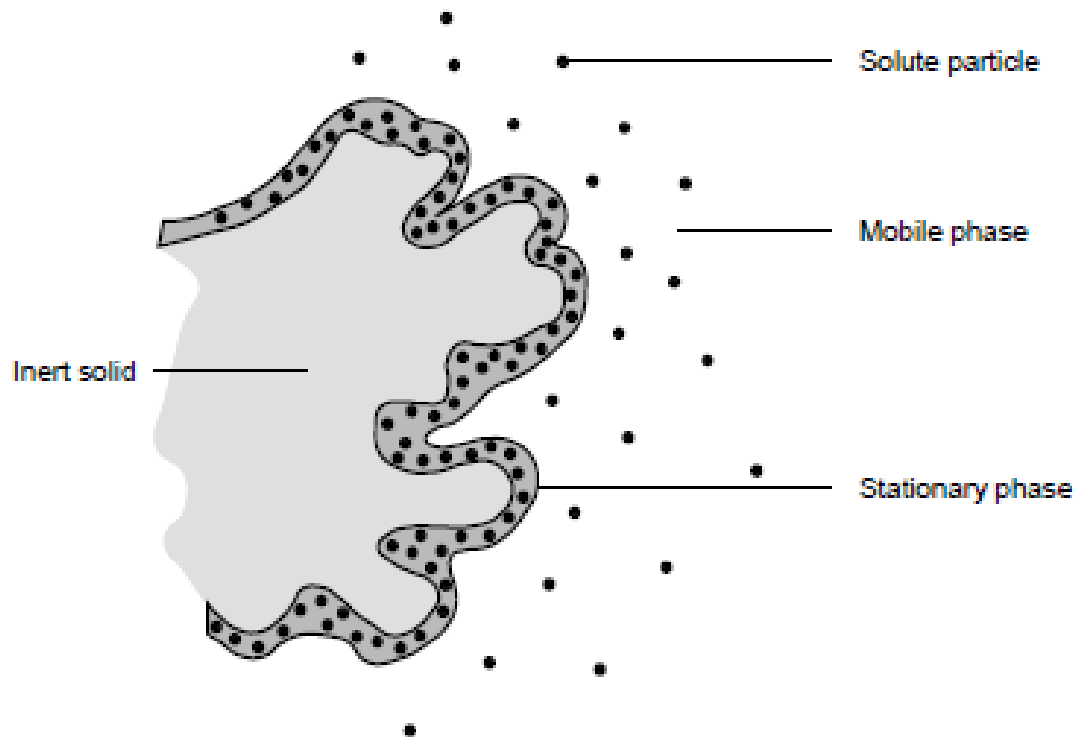
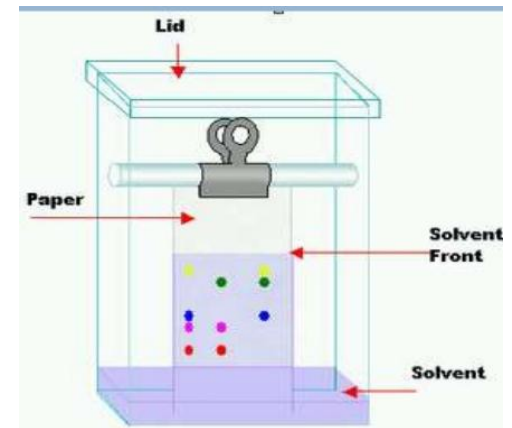
- **adsorpcijska kromatografija:** sastojci smjese uspostavljaju različite ravnoteže između adsorpcije na površini SF (krutina) i topljivosti u MF (tekućina ili plin); **najmanje topljiv, odn. najčvršće adsorbiran sastojak najsporije putuje,**



- različite komponente smjese pokazuju različit afinitet za SF, ovisno o polarnosti, strukturnim svojstvima i interakcijama s MF; komponente s većim afinitetom za SF gibat će se sporije od onih komponenti koje imaju veći afinitet za MF,
- stacionarna faza (SF) imobilizirana je u koloni ili učvršćena na čvrstoj podlozi, dok se mobilna faza (MF) giba kroz SF noseći komponente smjese (kolonska kromatografija primjer je adsorpcijske kromatografije),



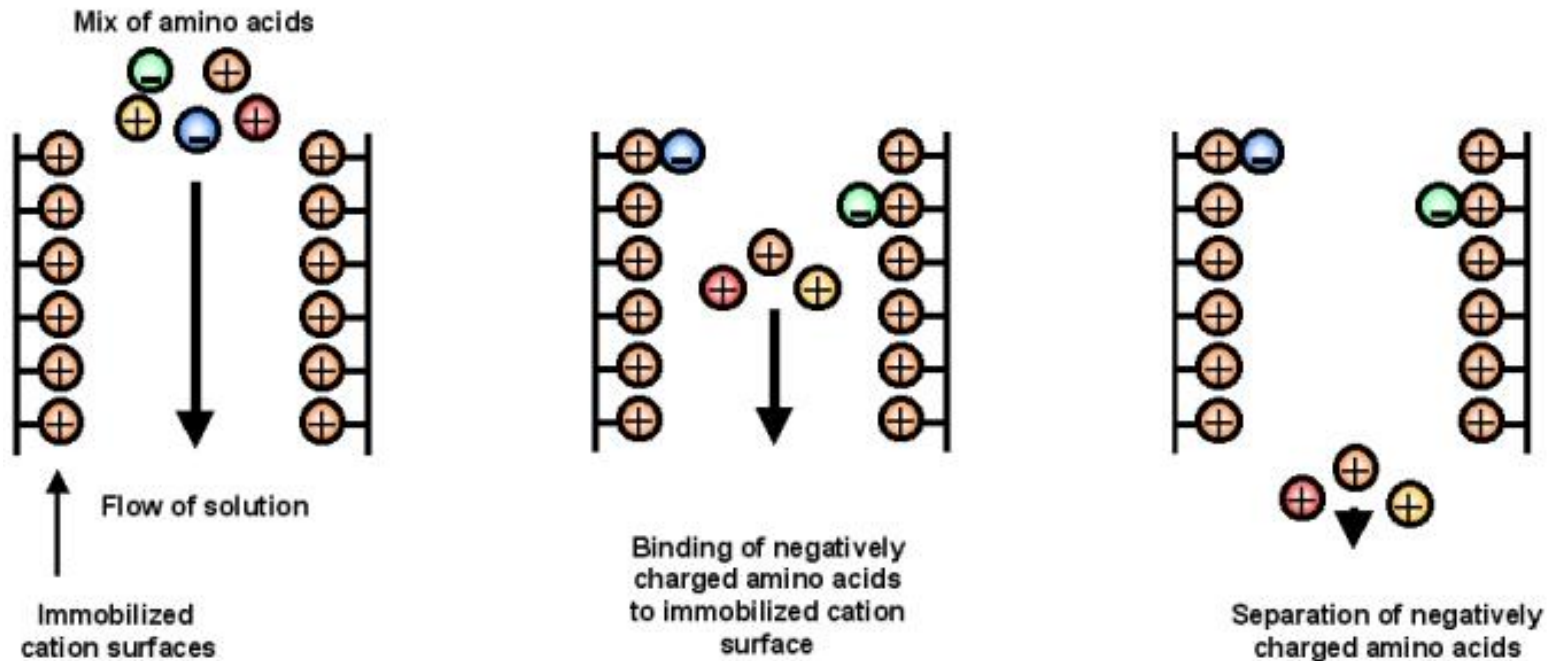
- o **razdjelna (particijska) kromatografija:** SF je nehlapljiva tekućina koja je u tankom sloju ili filmu nanosena na površinu inertne krutine. MF je tekućina ili plin; komponente smjese razdjeljuju se između MF i SF, te se komponenta topljivija u MF brže giba,
- o papirna kromatografija primjer je razdjelne kromatografije.



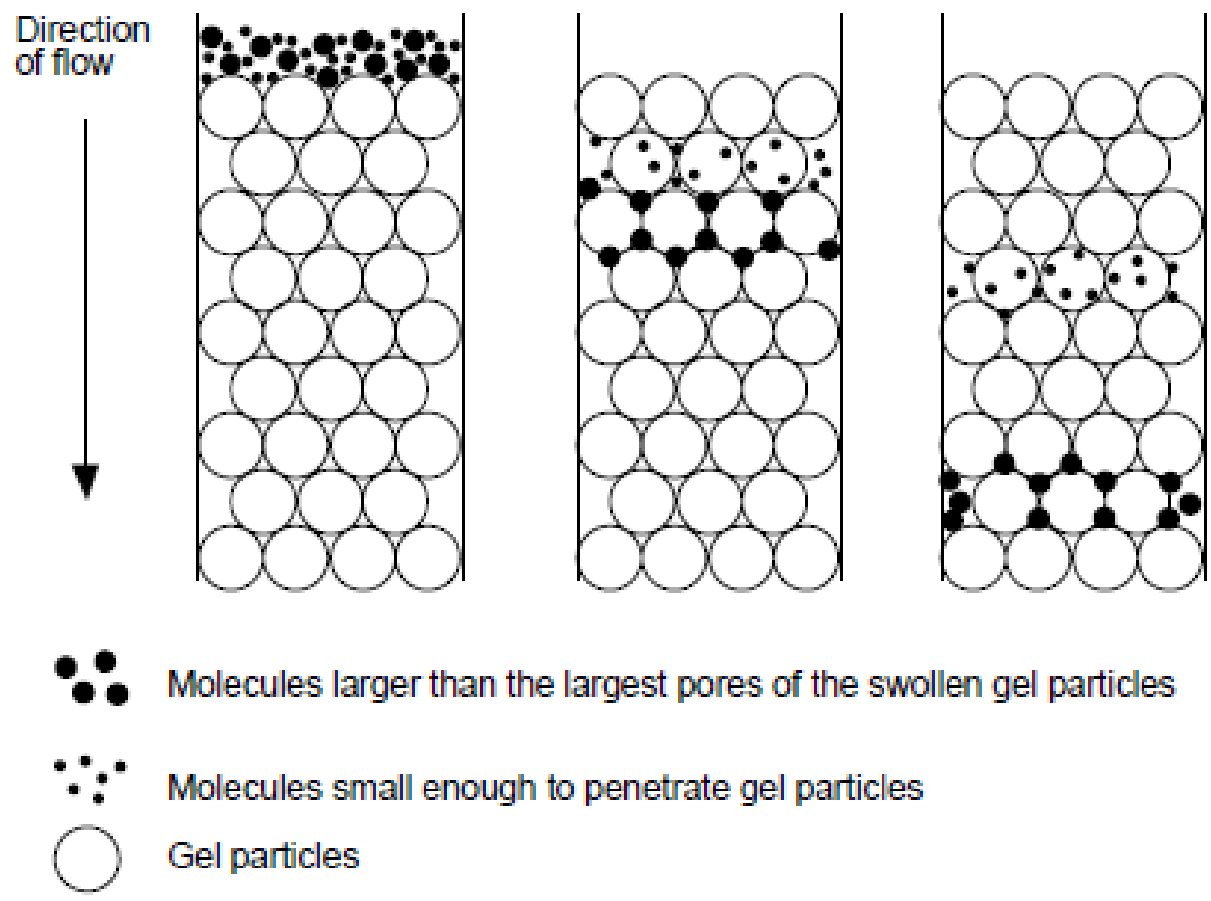
Each solute partitions itself between the stationary phase and the mobile phase

- **ionsko-izmjenjivačka kromatografija:** SF je umreženi polimerni nosač s kovalentno vezanim funkcijskim skupinama. Ukoliko je površina cijevi obložena s imobiliziranim kationima, ostvarivat će se elektrostatske interakcije s anionima. Prolaskom smjese pozitivno i negativno nabijenih skupina kroz cijev s pozitivno nabijenom SF, anioni će se vezati, dok će kationi neometano proći kroz cijev anionska izmjena. Kationska izmjena – pozitivno nabijene molekule zadržavaju se na negativno nabijenoj SF.

Ion-exchange chromatography (anion exchange)



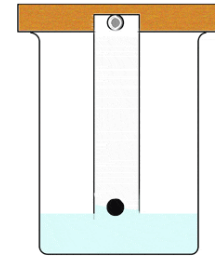
- **isključenje veličinom i oblikom molekula:** za razliku od ostalih kromatografskih metoda, ne uspostavlja se ravnoteža između MF i SF. Smjesa kao plin ili tekućina prolazi kroz porozni gel čije su pore dizajnirane tako da zadržavaju manje molekule koje ulaze u pore gela, dok veće molekule neometano prolaze kroz kolonu.



ADSORPCIJSKA KROMATOGRAFIJA

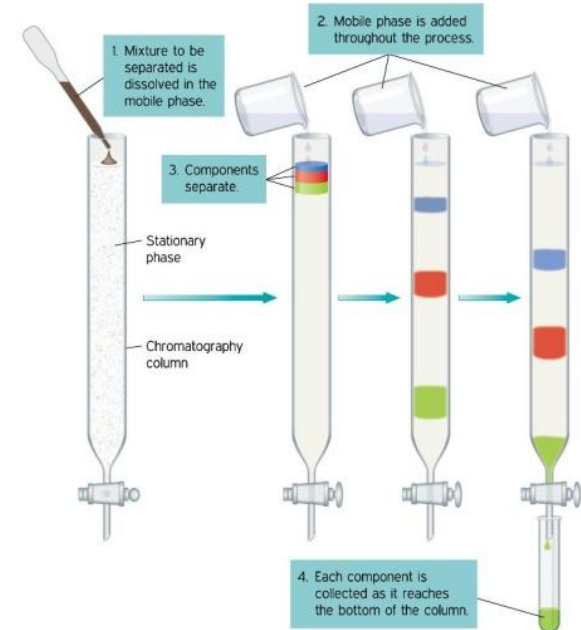
TANKOSLOJNA KROMATOGRAFIJA (TLC)

MF tekućina



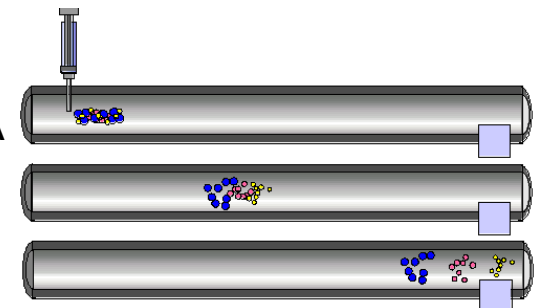
KOLONSKA KROMATOGRAFIJA

MF tekućina

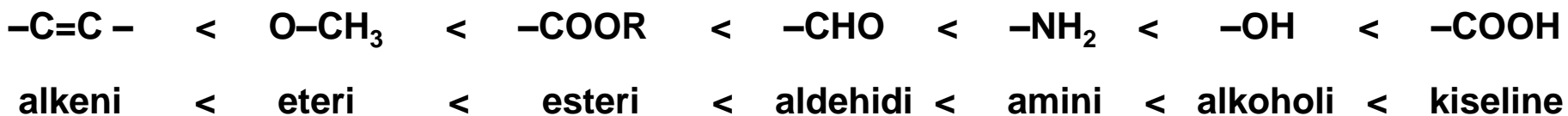


PLINSKA KROMATOGRAFIJA

MF plin



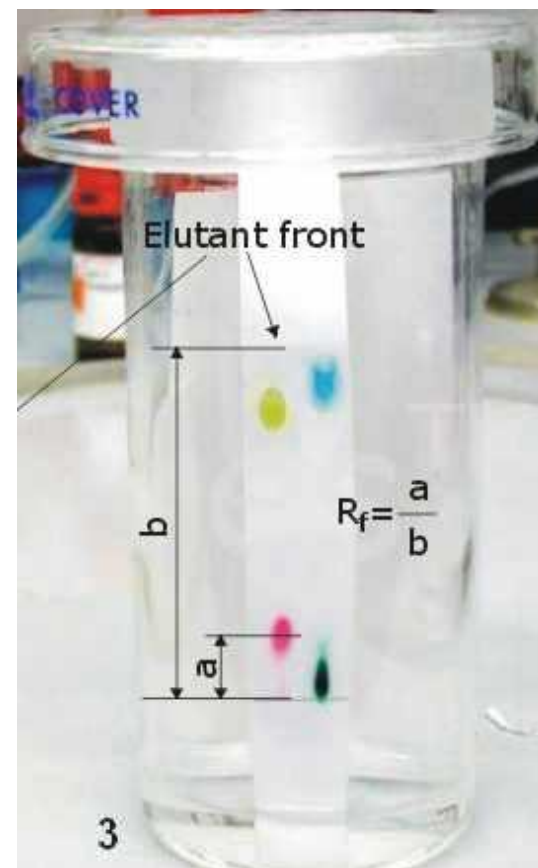
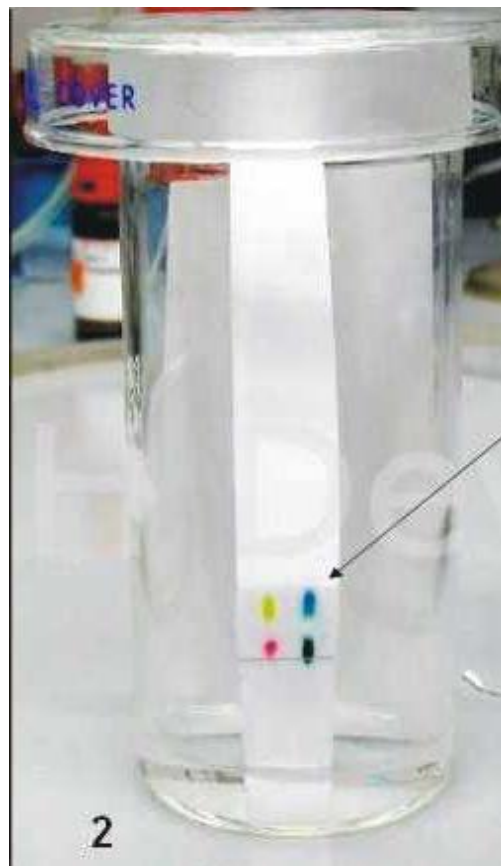
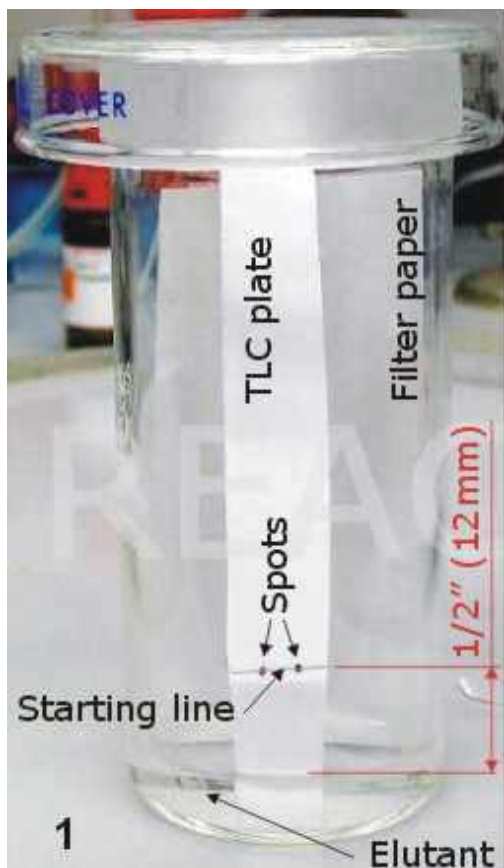
- Adsorbensi koji se najčešće koriste kao SF u tekućinskoj kromatografiji su polarni silikagel (SiO_2) i Al_2O_3 ,
- silikagel je slabo kiseo i adsorbira bazične analite, dok je Al_2O_3 slabo bazičan te adsorbira kisele analite,
- **izbor eluensa (MF) temelji se na njegovoj polarnosti u odnosu na SF i uzorak,**
- ako se kao SF koristi polarniji Al_2O_3 , elucija započinje s otapalom manje polarnosti (slabije se adsorbira na SF od polarnijeg otapala) koje eluira komponente slabije adsorbirane na SF; njegovom zamjenom s polarnijim otapalom eluirat će se i komponente većeg afiniteta za SF,
- **uslijed različite polarnosti komponente smjese pokazuju različit afinitet za MF; različita polarnost komponenti smjese ima za posljedicu njihovu različitu topljivost u MF \Rightarrow različite komponente putuju različitim brzinama uslijed čega dolazi do njihovog razdjeljivanja,**
- što su molekule polarnije, to su jače adsorbirane na SF i eluiraju se sporije:

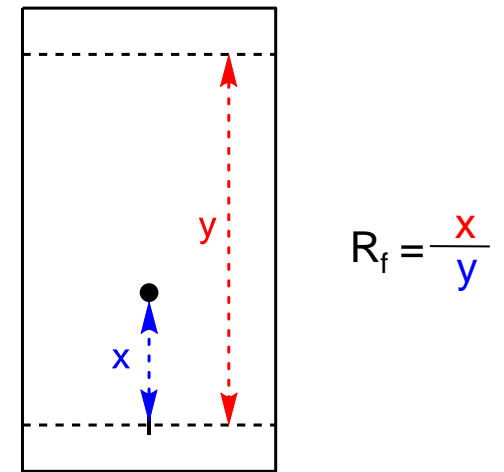
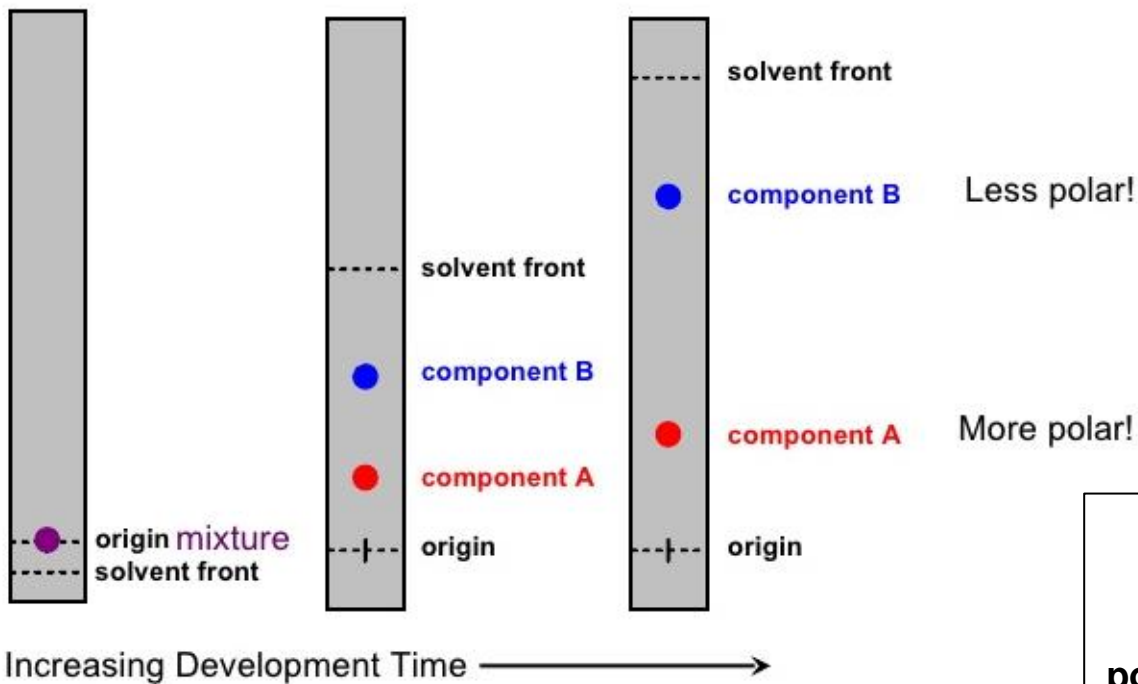


Solvent strength		
Solvent	Eluotropic value [E°]	Polarity [P°]
Pentane, Hexane, Heptane	0	0.1
Xylene	0.22	2.5
Toluene	0.22	2.4
Diethyl ether	0.29	2.8
Dichloromethane	0.30	3.1
Chloroform	0.31	4.1
Acetone	0.43	5.1
Dioxane	0.43	4.8
THF	0.48	4.0
MTBE	0.48	2.5
Ethyl acetate	0.48	4.4
DMSO	0.50	7.2
Acetonitrile	0.52	5.8
Isopropanol	0.60	3.9
Ethanol	0.68	4.3
Methanol	0.73	5.1
Water		10.2

Tankoslojna kromatografija (*Thin Layer Chromatography, TLC*)

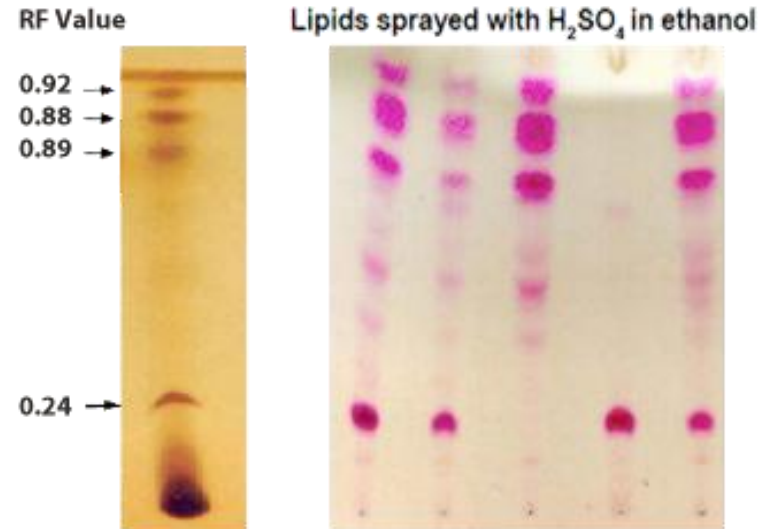
- Jednostavna i jeftina separacijska tehnika koja se koristi u biokemiji, toksikologiji, farmakologiji, znanosti o okolišu, znanosti o hrani, kemiji,...
- najčešće se koristi se za identifikaciju i kvantifikaciju komponenti u smjesi,
- TLC je slična PC, s tim da je SF tanak sloj adsorbensa (silikagela ili Al_2O_3) presvučen preko stakla, Alu-folije ili netopljive plastike; separacija pomoću TLC brža je od PC zbog manje veličine čestica SF.



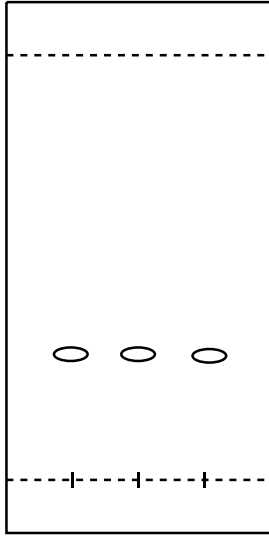


R_f (retencijski faktor):
vrijednost karakteristična za svaki
pojedini spoj pod istim uvjetima (SF, MF)

- Ukoliko mrlje na kromatogramu nisu vidljive, pristupa se “izazivanju” kromatograma, odnosno vizualizaciji:
 - izlaganjem UV-svjetlosti.
 - izlaganjem KMnO_4 (organske molekule), jodu (ugljikohidrati), ninhidrin, (amino-kiseline i proteini), ...

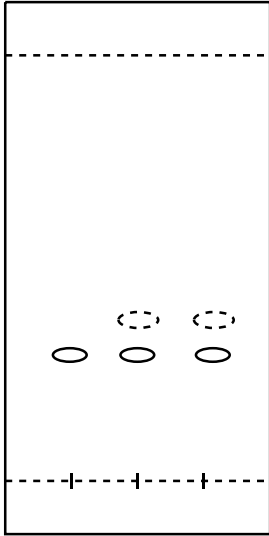


• praćenje napredovanja kemijske reakcije:



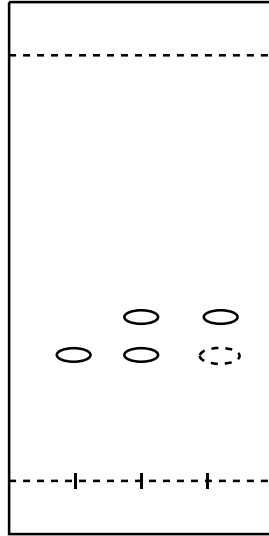
R R RS
+
RS

0 h



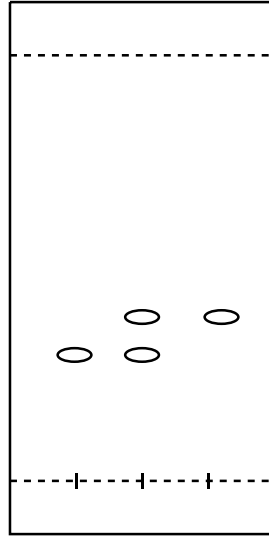
R R RS
+
RS

1 h



R R RS
+
RS

2 h



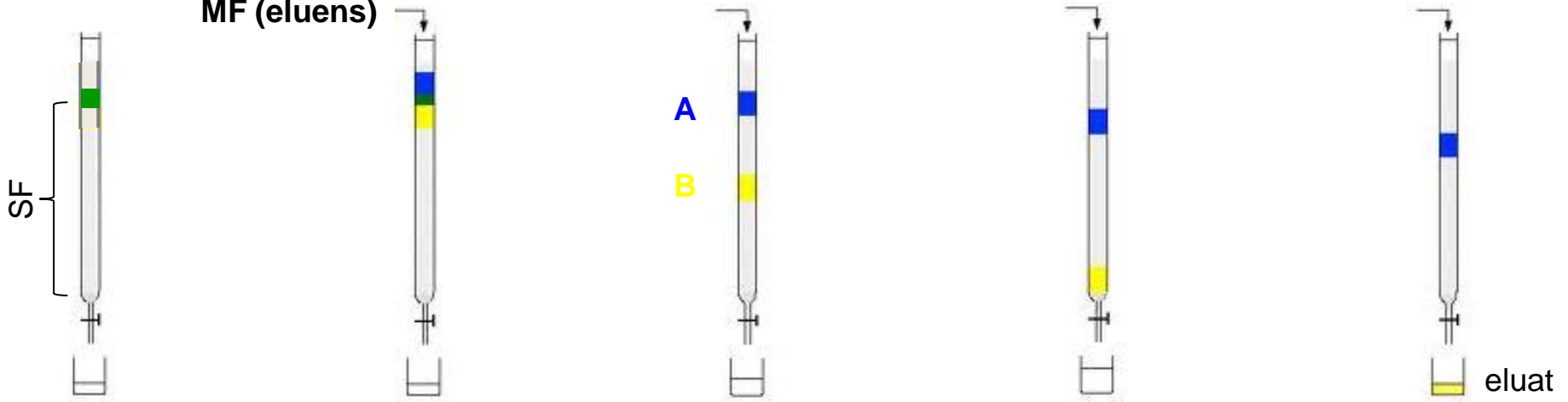
R R RS
+
RS

2,5 h

Kolonska kromatografija (Eluacijska kromatografija, Kromatografija ispiranjem)

- **Eluiranje:** postupak kojim MF ispire analizirane sastojke (analite) sa SF,
- **eluens:** otapalo (MF) koje nosi analite kroz SF,
- **analit:** sastojak koji se mjeri ili ispituje u uzorku analitičkim postupkom,
- zahvaljujući različitim afinitetima za SF, različiti analiti imaju različito vrijeme zadržavanja na SF, odnosno eluiraju se iz kolone različitim brzinama; uslijed različitih brzina gibanja analitâ duž kolone nastaju vrpce ili zone.

MF (eluens)



na vrh kolone nanosi se smjesa A+B otopljena u MF

prolaskom kroz kolonu sastojci A i B raspodjeljuju se između SF i MF

dodavanjem MF (eluensa) molekule uzorka putuju niz kolonu (uspostavlja se ravnoteža između MF i SF)

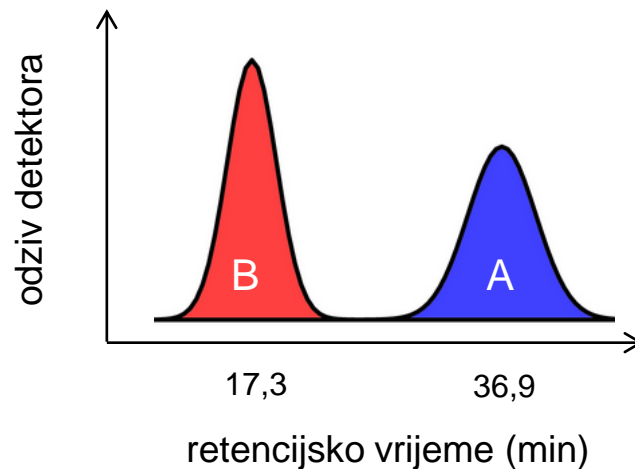
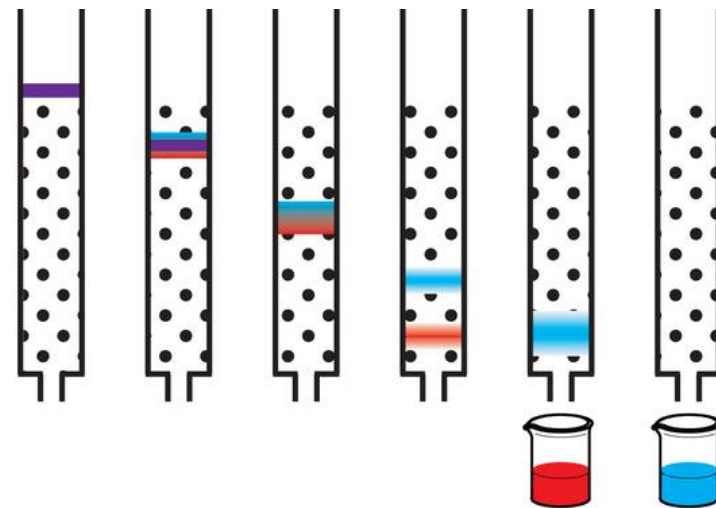
sastojak A jače je vezan za SF, a sastojak B za MF; sastojak B brže putuje, te se duž kolone stvaraju vrpce ili zone

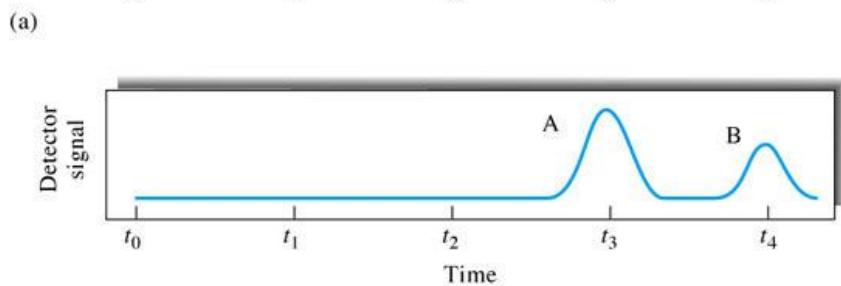
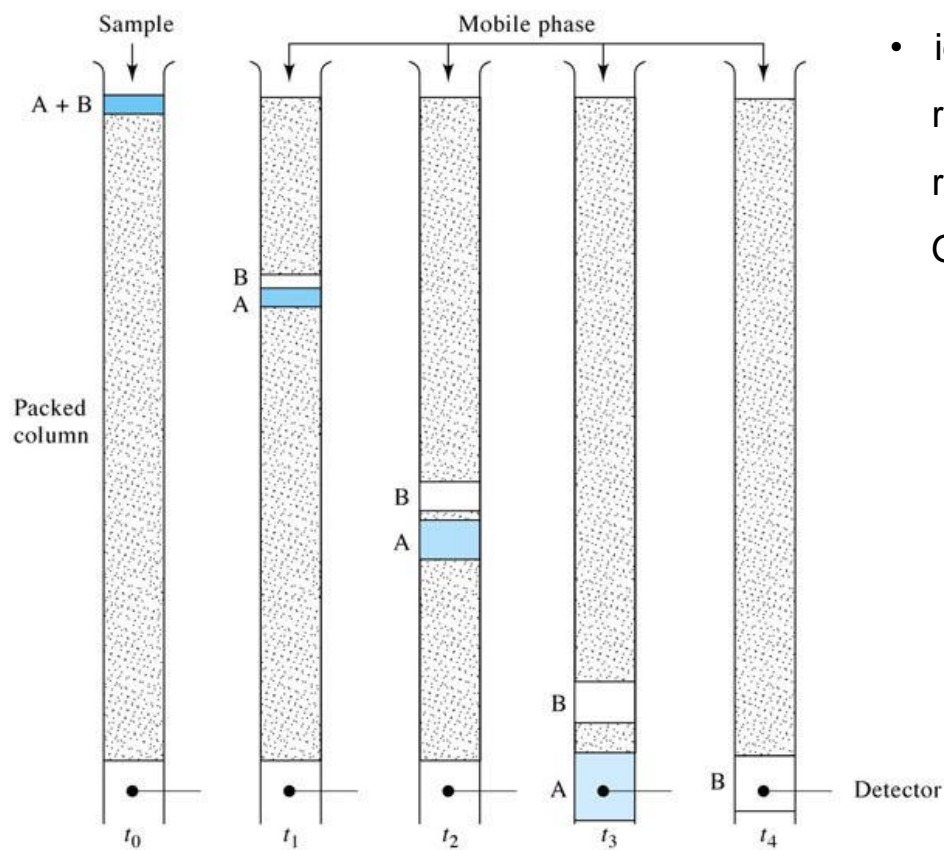
protjecanjem dostatne količine MF sastojci A i B se potpuno odjeljuju i eluiraju iz kolone



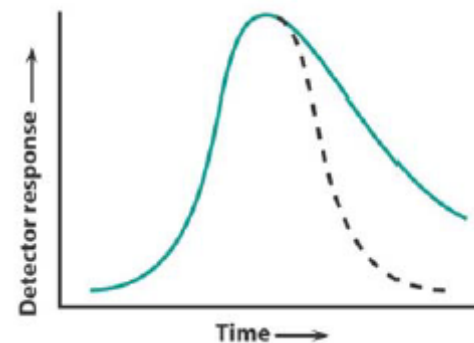
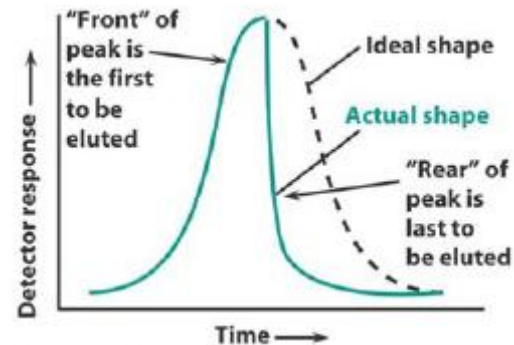
Teorija kromatografije

- **Kromatogram:** niz simetričnih elucijskih krivulja odn. pikova koji se dobiva kad se na izlaz iz kolone postavi detektor čiji odziv ovisi o koncentraciji sastojaka u uzorku, a koji se bilježi kao funkcija vremena (ili volumena dodane MF),
- **kromatogram omogućava kvalitativnu i kvantitativnu analizu,**
- **položaj pika na vremenskoj osi (retencijsko vrijeme) pomaže u identifikaciji sastojaka, a iz površine ispod pika izračunava se količina svakog odijeljenog sastojka,**
- SF jače veže sastojak **A** te sastojak **B** brže putuje; udaljenost između njih se povećava gibanjem niz kolonu, a njihove se zone istovremeno šire čime se smanjuje djelotvornost odjeljivanja,
- **odjeljivanje sastojaka ovisi o njihovim relativnim brzinama istjecanja iz kolone, a poboljšava se kontrolom veličina koje povećavaju brzinu razdvajanja zona ili smanjuju brzinu njihova širenja,**
- odjeljivanje je potpuno ako kromatogram pokazuje onoliko pikova koliko analizirana smjesa ima sastojaka.





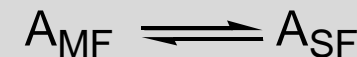
- idealan oblik kromatografskog pika odgovara normalnoj raspodjeli slučajne pogreške (Gaussova raspodjela); u realnoj kromatografiji pikovi često imaju izgled ne-Gaussove raspodjele.



- **separacija (odjeljivanje) analita A i B ovisi o dvama faktorima: (i) razlici u retencijskim vremenima i (ii) širini pikova,**
- **djelotvornost kolone određuju relativna brzina eluiranja sastojaka i širenje zona eluiranih sastojaka.**

Brzina eluiranja [zadržavanje (retencija) analita]

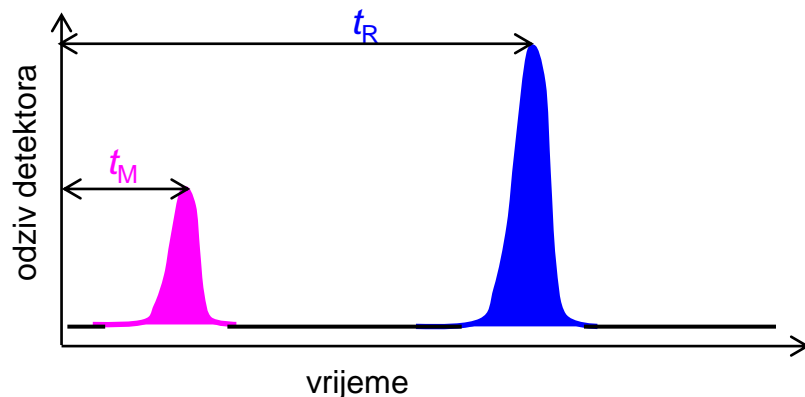
- izravno ovisi o interakciji analita s MF i SF,
- **konstanta razdjeljenja K** (engl. *Partition Coefficients*, koeficijent ili omjer razdiobe)



- kromatografska odjeljivanja temelje se na različitoj raspodjeli analiziranog sastojka A između MF i SF,
 - **konstanta razdjeljenja K: odnos koncentracija odjeljivanog analita u SF i MF, pri ravnotežnom stanju,**
 - u idealnim uvjetima, omjer razdiobe K konstantan je pri širokom rasponu koncentracija (c_{SF} proporcionalan je c_{MF}),
 - u uvjetima približno konstantnog K govorimo o linearnoj kromatografiji.
- **vrijeme zadržavanja t_R** (*Retention Time*, retencijsko vrijeme)

$$K = \frac{c_{SF}}{c_{MF}}$$

- **vrijeme od unošenja uzorka u kolonu do pojave sastojka u detektoru (t_R),**
- **vrijeme potrebno da tvar koju kolona ne zadržava stigne u detektor – mrtvo vrijeme (t_M),**



- prosječna linearna brzina gibanja analita \bar{v}
(L , duljina punila u koloni)

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R}$$

- prosječna linearna brzina gibanja MF u

$$u = \frac{L}{t_M}$$

- **brzina gibanja analita \bar{v}** : ovisi o omjeru raspodjele K te volumenu MF i SF

$$\bar{v} = u \times \frac{1}{1 + KV_{SF} / V_{MF}}$$

- **faktor kapaciteta k'_A** : važan parametar kojim se opisuje brzina gibanja analita u koloni

$$k'_A = \frac{K_A V_{SF}}{V_{MF}}$$

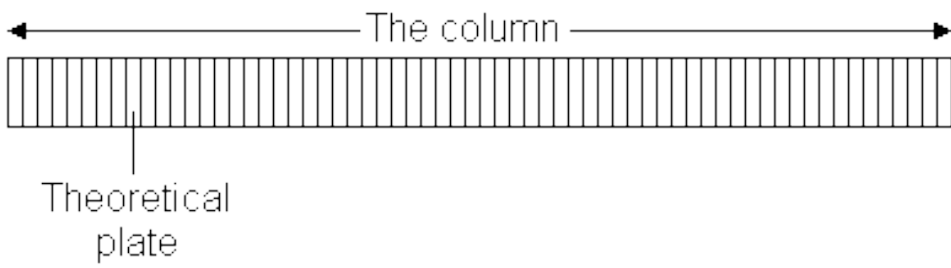
$$k'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

- t_R i t_M očitavaju se iz kromatograma,
- $k'_A \ll 1$ prebrza elucija,
- $k'_A > 20$ predugo vrijeme elucije,
- idealni faktori kapaciteta $k'_A = 1 - 5$

- **koeficijent selektivnosti α** : mjera je selektivnosti kromatografskog sustava za dva različita analita A i B, ovisi o interakciji sa SF, a pokazuje moć odjeljivanja tih analita na koloni

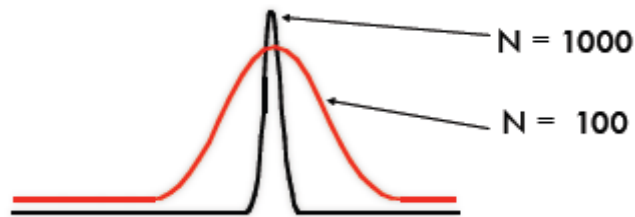
$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

- proizvođači izražavaju djelotvornost kromatografske kolone (i) visinom tavana H i (ii) brojem teorijskih tavana N ,
- teorija tavana: možemo zamisliti da kromatografska kolona sadrži velik broj odijeljenih slojeva (diskova ili tavana) u kojima se uspostavljaju ravnoteže između SF i MF; smjesa ulazi u jedan tavan i razdjeljuje se na temelju koeficijenta razdiobe između SF i MF te se potom prenosi na sljedeći tavan. Analit s manjim afinitetom za SF gibat će se niz seriju tavana većom brzinom. Razdvajanje dvaju analita osigurava se dovoljnim brojem tavana,



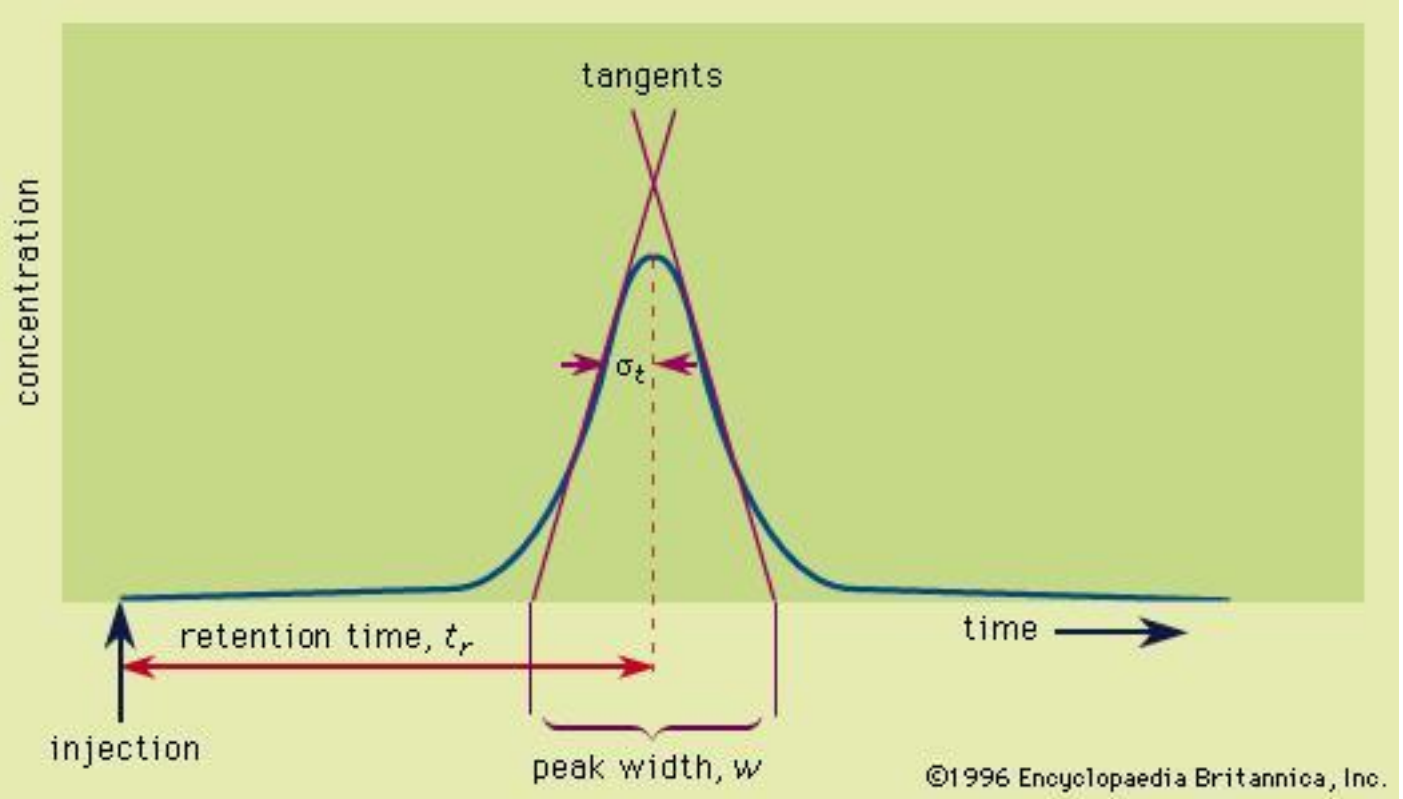
- kolona je djelotvornija što su H -vrijednosti niže, a N -vrijednosti više!

$$N = \frac{L}{H}$$



- **poželjan je što veći broj tavana N , te što manja visina tavana (HEPT, Height Equivalent to a Theoretical Plate)**

- N se može izračunati iz mjerenja dvaju vremena, t_R i W (W je duljina osnovice trokuta kojeg čine tangente u točkama infleksije s obje strane pika produžene do osnovice kromatograma – širina pika, $W_{1/2}$ je širina na polovici maksimalne visine pika),

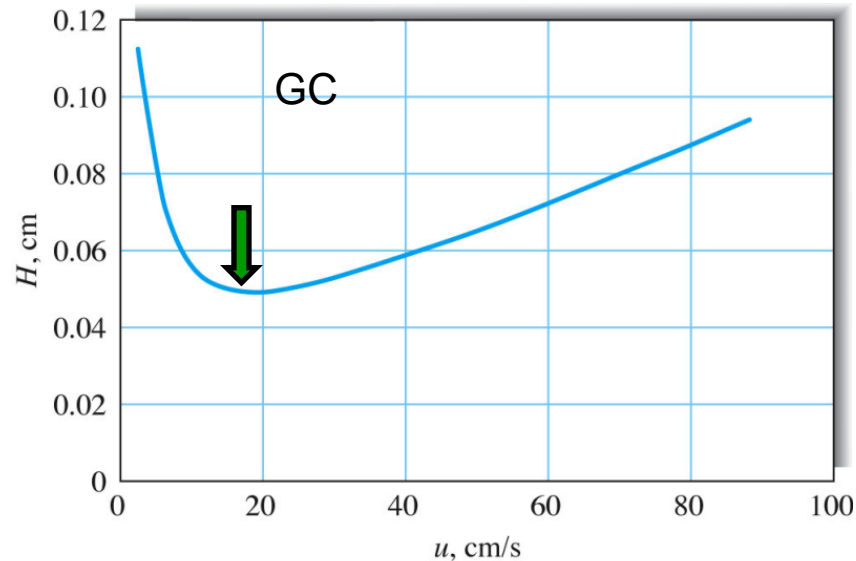
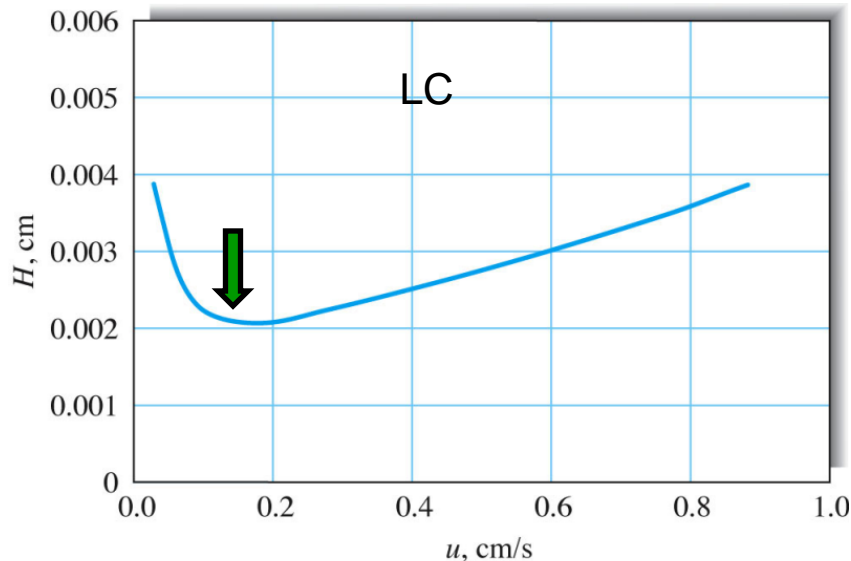


$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

- proizvođači opreme parametrima N i H izražavaju djelotvornost svojih kolona; uspoređivanje dviju kolona na temelju tih parametara moguće je samo ukoliko se izračunati podaci odnose na isti spoj.

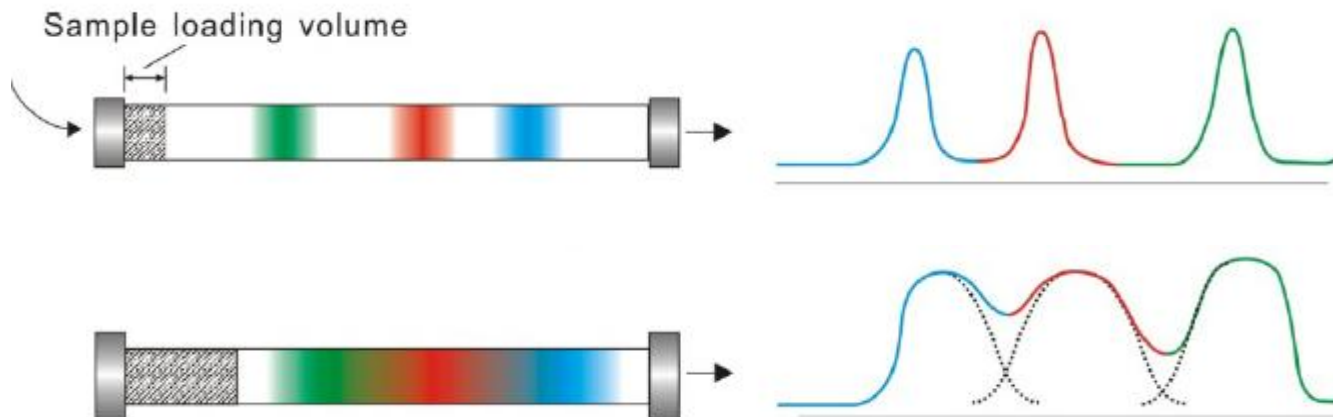
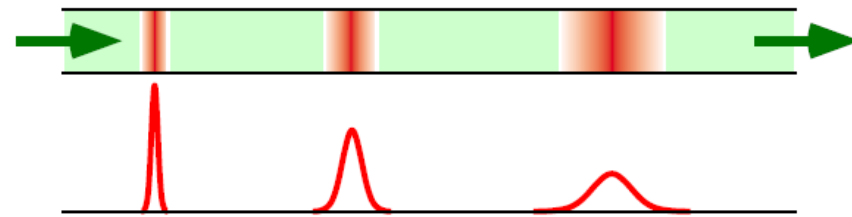
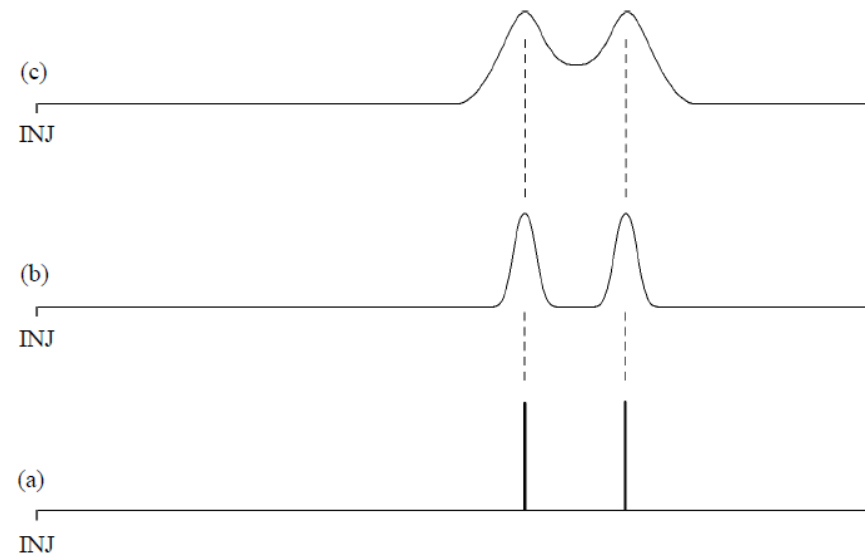
- veličina kinetičkog utjecaja na djelotvornost kromatografske kolone ovisi o vremenu kojeg MF provede u kontaktu sa SF (odnosno o brzini protoka MF); kako brzina MF direktno utječe na vrijednosti H (visine tavana), upravo se H koristi u utvrđivanju djelotvornosti kolone,



- **minimum** za krivulju visine tavana (ili maksimum djelotvornosti) u tekućinskoj se kromatografiji (LC) ostvaruje se uz daleko manje protoke u odnosu na one dobivene plinskom kromatografijom (GC),
- visine tavana za kolone u LC su 10-ak puta manje od kolona u GC \Rightarrow kolone za LC ne bi trebale biti dulje od 50 cm, dok GC kolone mogu biti duge i preko 50 m \Rightarrow ukupan broj tavana i posljedična djelotvornost kolone uglavnom su veći za GC,
- zadnjih se tridesetak godina ulaže veliki napor u pronalaženju kvantitativnih odnosa kojima se izražava utjecaj eksperimentalnih veličina na visinu tavana za različite vrste kromatografskih kolona.

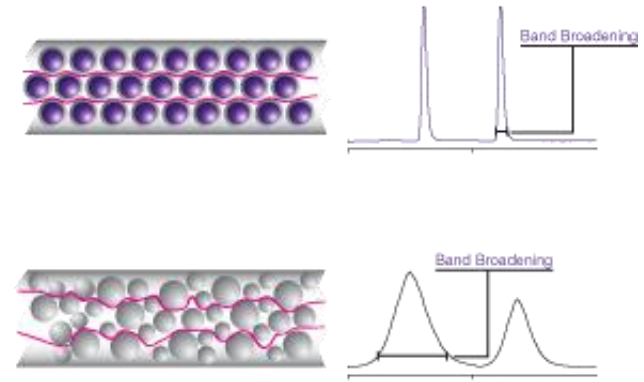
Širenje zone eluiranog sastojka

- Gibanjem smjese kroz kromatografsku kolonu opaža se širenje pikova, odnosno zona eluiranog sastojka,
- pri različitim kromatografskim uvjetima, ista se smjesa razdvaja na dva sastojka s istim retencijskim vremenima [kromatogrami (a), (b) i (c)]
- što su pikovi uži, to je bolje njihovo razdvajanje (kromatografski postupak je učinkovitiji); idealan kromatografski sustav odgovara kromatogramu (a),
- **zona širenja izravno je razmjerna vremenu zadržavanja u koloni, a obrnuto razmjerna brzini MF,**



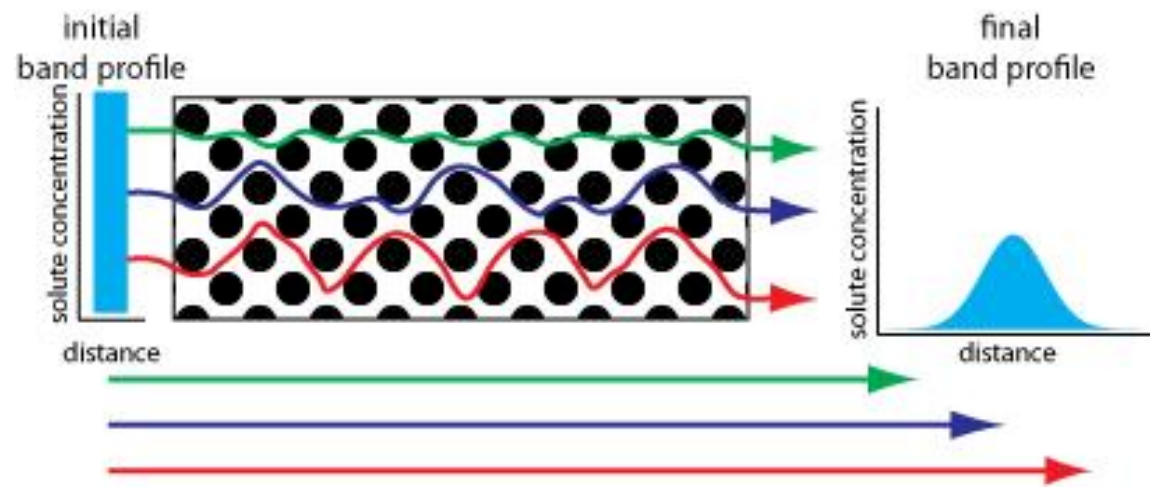
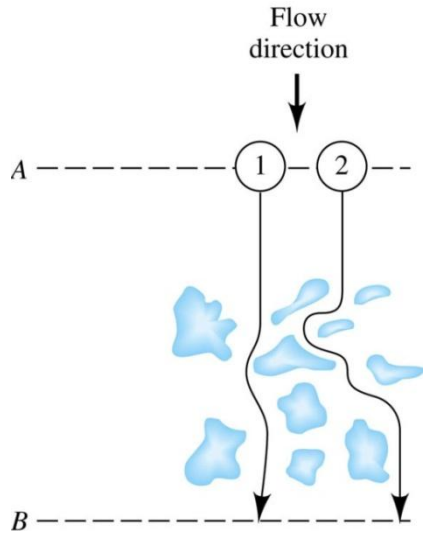
• Širenje zone eluiranog sastojka uzrokovano je:

- I. Vrtložnom difuzijom (*Eddy Diffusion*)
- II. Longitudinalnom difuzijom (*Longitudinal Diffusion*)
- III. Prijenosom mase (*Mass Transport*).



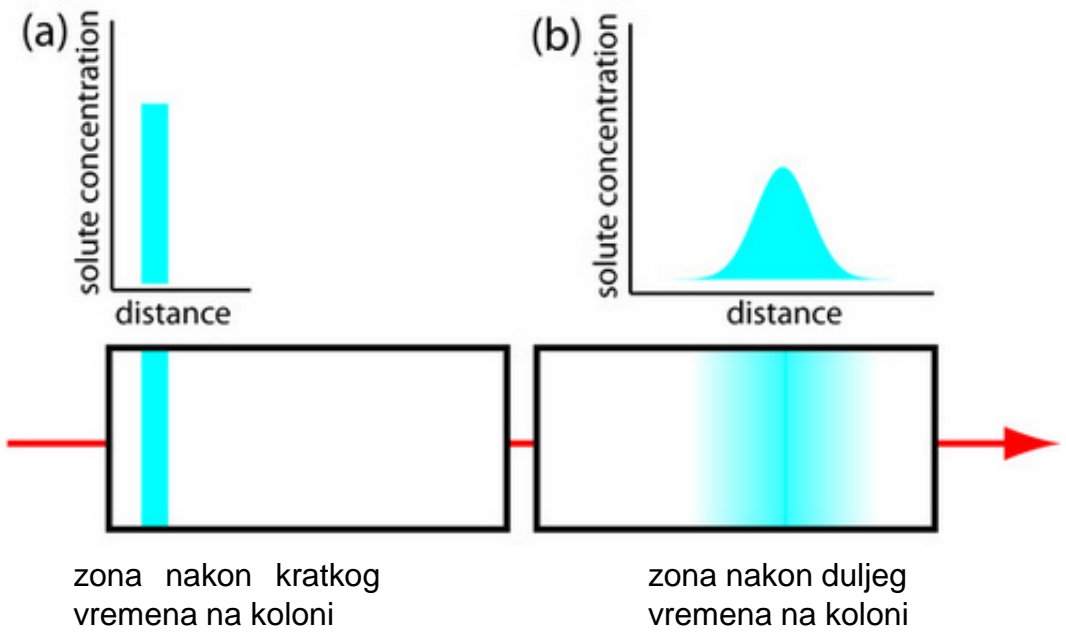
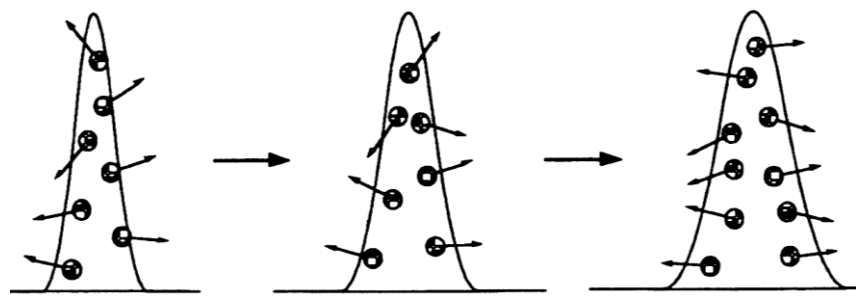
I. Vrtložna difuzija

- Molekule uzorka gibaju se niz kolonu ispunjenu SF (čije su čestice različitih dimenzija i oblika) putevima različitih duljina uslijed čega molekule koje u kolonu ulaze istovremeno, izlaze iz kolone u različitim vremenima,
- posljedično dolazi do širenja pika (**putevi kojima se giba analit različitih su duljina**).



II. Longitudinalna difuzija B/u

- Proces u kojem čestice analita migriraju iz koncentriranog središta zone prema razrijeđenim područjima,



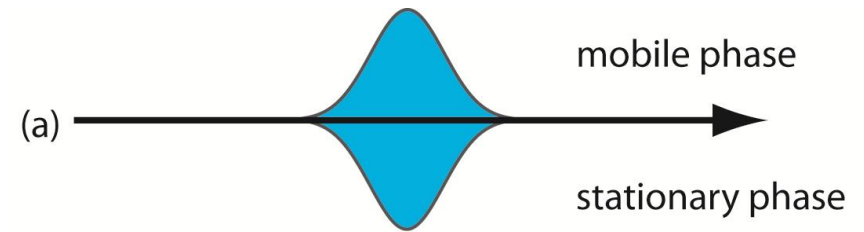
- doprinos longitudinalne difuzije visini tavana obrnuto je proporcionalan linearnoj brzini eluensa u ,

$$H = B/u + C_S u + C_M u$$

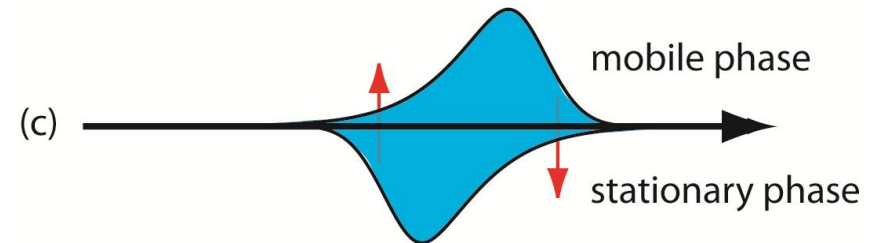
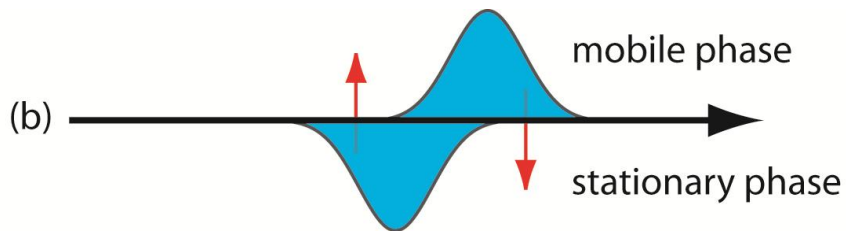
- H , visina tavana (cm)
- u , linearna brzina (cm s^{-1})
- B , koeficijent longitudinalne difuzije
- C_S i C_M , koeficijenti prijenosa mase u SF i MF

III. Prijenos mase

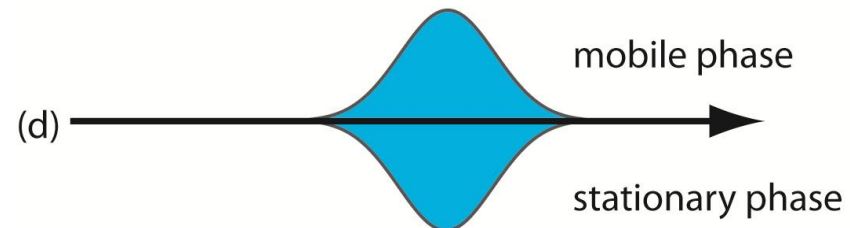
- Gibanje analita kroz kolonu podrazumijeva njegovu razdiobu između SF i MF [na slici (a) prikazana je idealna raspodjela analita između MF i SF],



- do širenja zone dolazi ukoliko gibanje analita kroz te dvije faze nije dovoljno brzo za održavanje njegove ravnotežne razdiobe između SF i MF [molekule analita u MF gibaju se kroz kolonu prije uspostavljanja ravnoteže sa SF koja bi ih mogla zadržati [slika (b)]; molekule analita u SF sporo se vraćaju u MF [slika (c)],



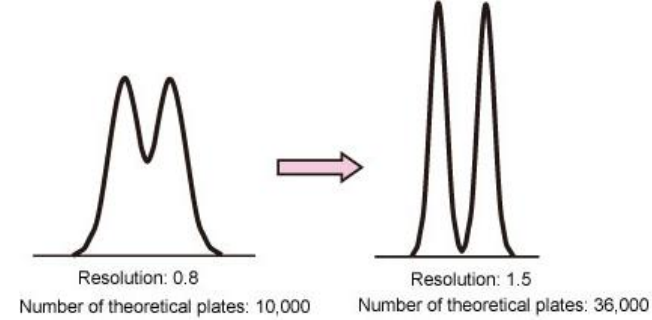
- ponovno uspostavljanje ravnoteže analita između MF i SF [slika (d)] dovodi do širenja pika,



- Zaključno, širenje zona eluiranog sastojka može se kontrolirati podešavanjem sljedećih eksperimentalnih varijabli:

VELIČINE KOJE UTJEČU NA DJELOTVORNOST KOLONE		
Veličina	Oznaka	Uobičajene jedinice
Linearna brzina MF	u	cm s^{-1}
Koeficijent difuzije u MF	D_M	$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
Koeficijent difuzije u SF	D_S	$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
Faktor kapaciteta	k'	nema jedinice
Promjer zrna punila	d_p	cm

- **Optimizacija rada kolone** postiže se (i) smanjenjem širenja zone eluiranog sastojka te (ii) promjenom relativnih brzina gibanja komponenti.

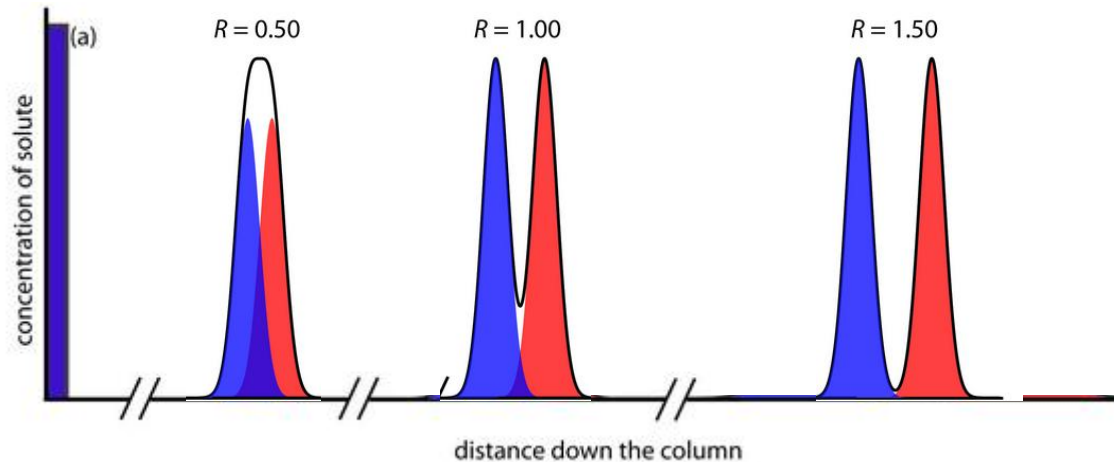


- **Razlučivanje kolone R_S** : kvantitativna mjera kojom se izražava sposobnost odjeljivanja dvaju analita,

$$R_S = \frac{2 [(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_B}{1 + k'_B} \right)$$

- potpuno odjeljivanje analita moguće je tek uz razlučivanje $R = 1,5$



- produljenjem kolone moguće je postići bolje razlučivanje (povećava se N), ali se i produljuje vrijeme potrebno za postizanje boljeg razlučivanja.

- odnos između razlučivanja, svojstava kolone i svojstava analita definiran je jednačbom iz koje se može izračunati broj tavana potrebnih za realizaciju traženog razlučivanja,

$$N = 16 R_S^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right)^2 \left(\frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)^2$$

- odnos između razlučivanja i vremena elucije: poželjno je postići što bolje razlučivanje u što kraćem roku,

$$(t_R)_B = \frac{16 R_S^2 H}{u} \left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right) \frac{(1 + k'_B)^3}{(k'_B)^2}$$

- Primjer: vremena zadržavanja spojeva A i B iznose 16,40 i 17,63 minute na koloni duljine 30 cm. Nezadržavana supstanca prolazi kroz kolonu za 1,30 minuta. Širina pika u bazi za A iznosi 1,11, min a za B 1,21 min. Izračunajte: (a) razlučivanje kolone, (b) prosječni broj tavana, (c) visinu tavana, (d) duljinu kolone potrebnu za postizanje razlučivanja od 1,5 te (e) vrijeme potrebno za eluciju sastojka B na dužoj koloni.

$$(a) \quad R_S = \frac{2 [(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B} \Rightarrow R_s = 2(17.63 - 16.40)/(1.11 + 1.21) = 1.06$$

$$(b) \quad N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \Rightarrow N = 16 \left(\frac{16.40}{1.11} \right)^2 = 3493 \quad \text{and} \quad N = 16 \left(\frac{17.63}{1.21} \right)^2 = 3397$$

$$N_{av} = (3493 + 3397)/2 = 3445 = 3.4 \times 10^3$$

$$(c) \quad H = L/N = 30.0/3445 = 8.7 \times 10^{-3} \text{ cm}$$

(d) k i α se ne mijenjaju s povećanjem N i L

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_B}{1 + k'_B} \right) \Rightarrow \frac{(R_s)_1}{(R_s)_2} = \frac{\sqrt{N_1}}{\sqrt{N_2}} \quad (\text{indeksi 1 i 2 odnose se na kraću i duđu kolonu})$$

$$\frac{1.06}{1.5} = \frac{\sqrt{3445}}{\sqrt{N_2}}$$

$$N_2 = 3445 \left(\frac{1.5}{1.06} \right)^2 = 6.9 \times 10^3 \quad L = NH = 6.9 \times 10^3 \times 8.7 \times 10^{-3} = 60 \text{ cm}$$

$$(e) \quad (t_R)_B = \frac{16 R_S^2 H}{u} \left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right) \frac{(1 + k'_B)^3}{(k'_B)^2}$$

⇓

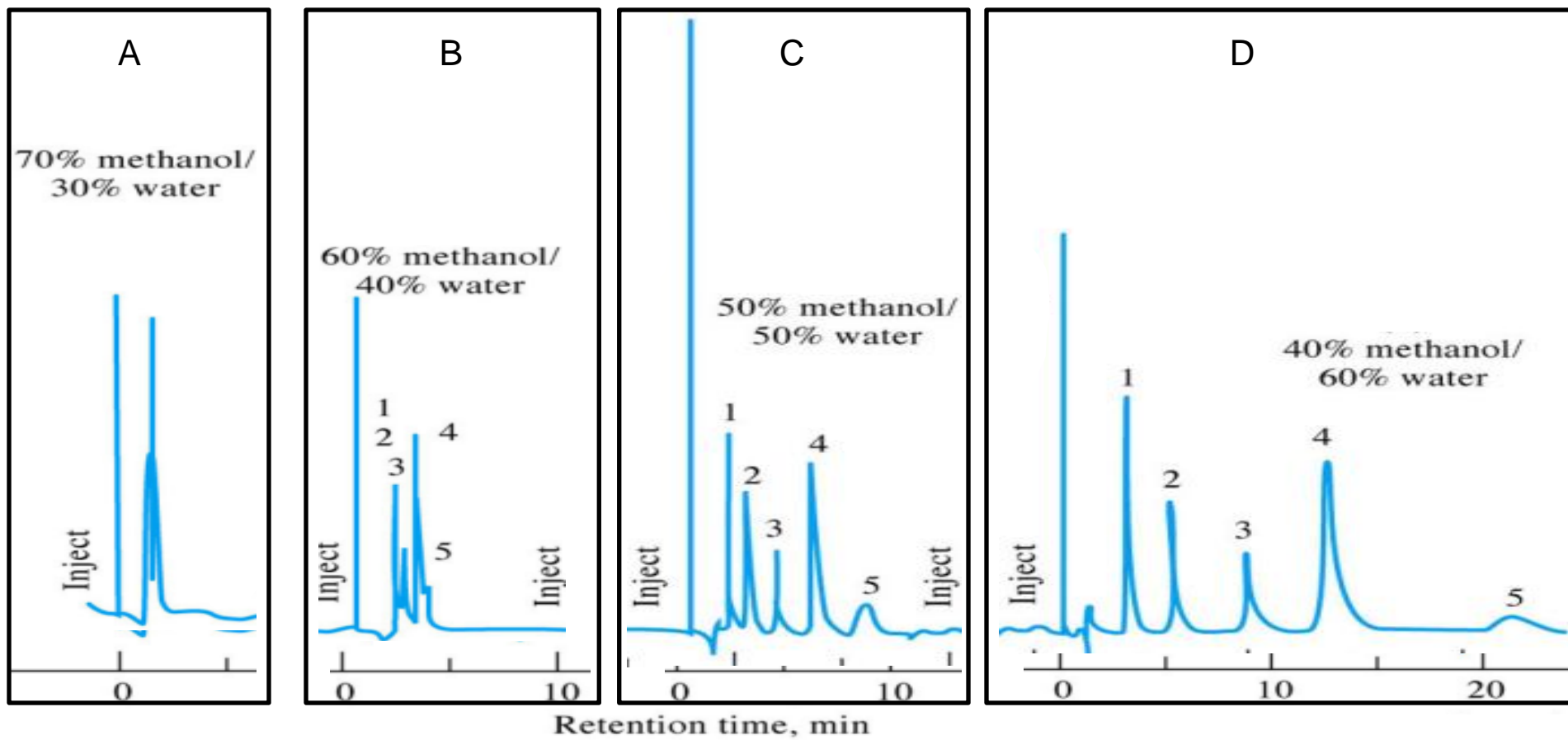
$$\frac{(t_R)_1}{(t_R)_2} = \frac{(R_s)_1^2}{(R_s)_2^2} = \frac{17.63}{(t_R)_2} = \frac{(1.06)^2}{(1.5)^2}$$

$$(t_R)_2 = 35 \text{ min}$$

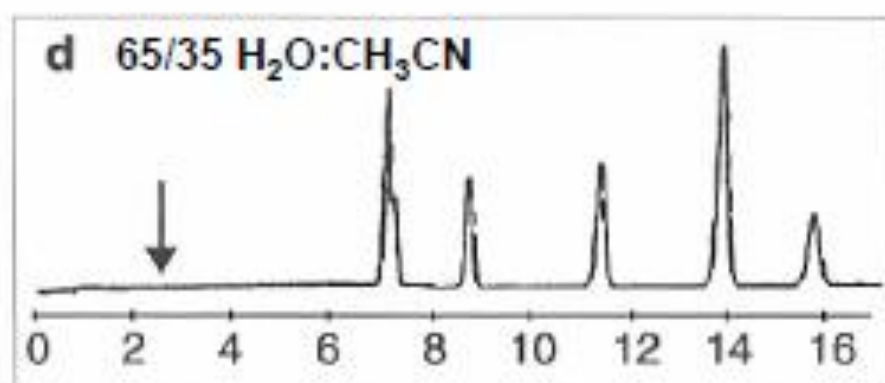
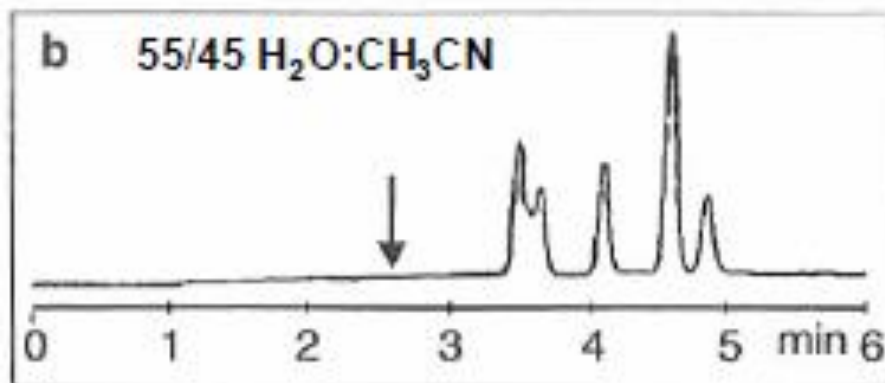
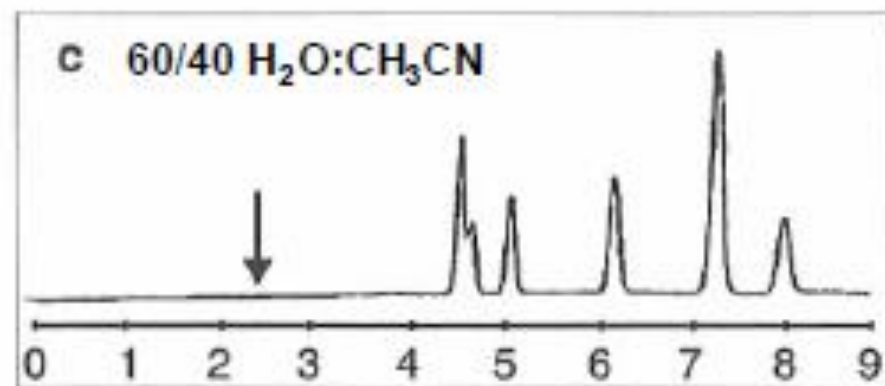
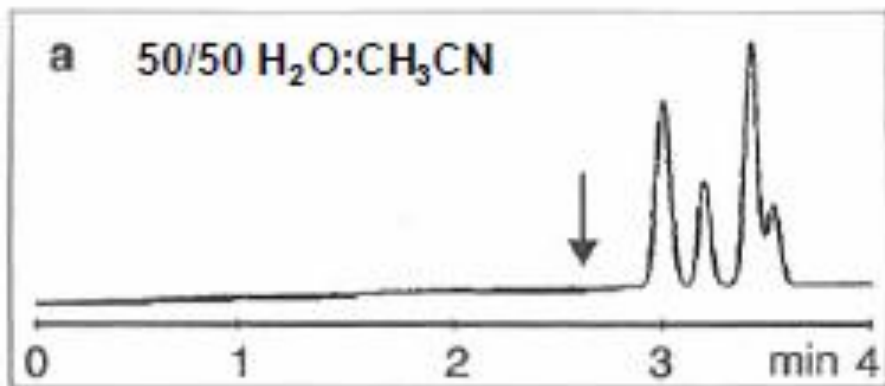
Za poboljšano razlučivanje potrebno je udvostručiti vrijeme odjeljivanja!

Tehnike optimizacije rada kolone

- **Smanjenje visine tavana:** postiže se smanjenjem dimenzija zrna punila, promjera kolone, debljine tekućeg sloja u LC, te sniženjem temperature kolone u GC.
- **Povećanje faktora kapaciteta k'_B** može se postići promjenom temperature, kao i promjenom sastava otapala [male promjene u omjeru MeOH/H₂O pretvaraju nezadovoljavajuće kromatograme (A i B) u kromatograme s dobro odijeljenim pikovima (C i D); optimalan je kromatogram (C) jer je odjeljivanje postignuto u minimalnom vremenu],



- poboljšano razdjeljivanje smjese aromatskih ugljikovodika postiže se povećanjem udjela H₂O u smjesi H₂O/CH₃CN

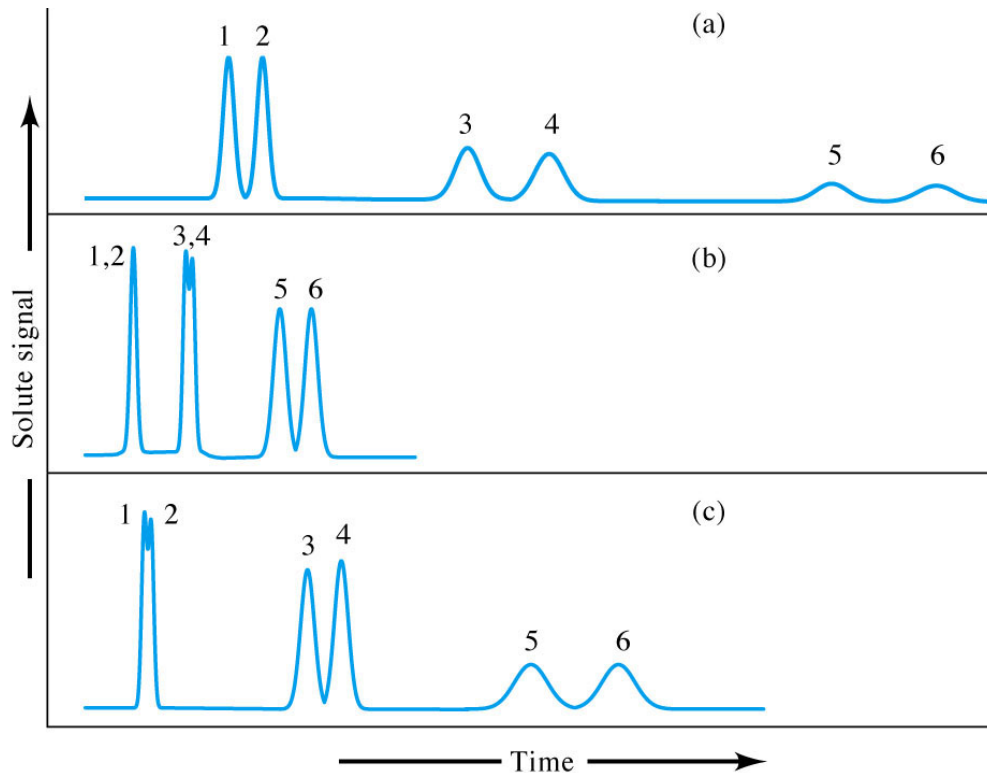


- povećanje koeficijenta selektivnosti α uz istovremeno zadržavanje faktora kapaciteta k' između 1 i 10 može se postići: (i) promjenom sastava MF, (ii) mijenjanjem temperature kolone, (iii) mijenjanjem sastava SF te (iv) primjenom posebnih kemijskih reakcija kojima se u SF ugrađuju spojevi koji kompleksiraju sa sastojcima uzorka,

Opći problemi eluiranja

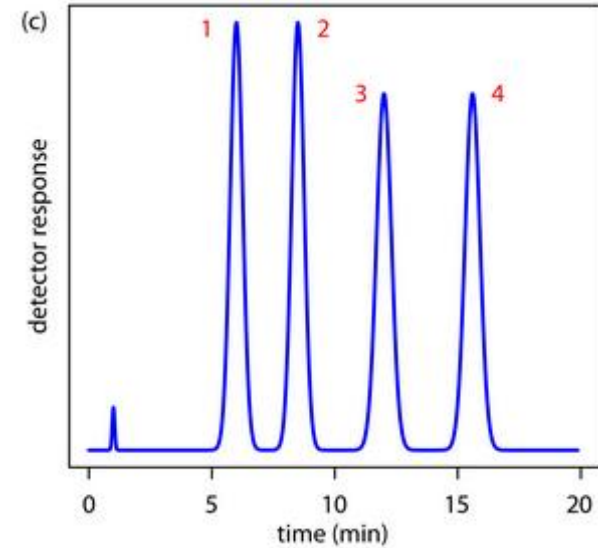
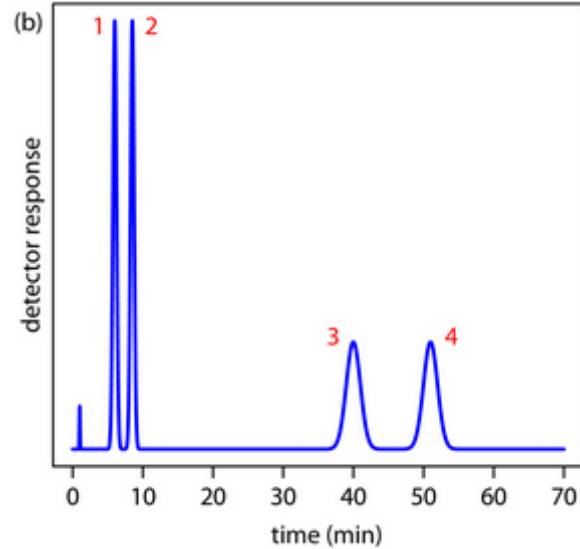
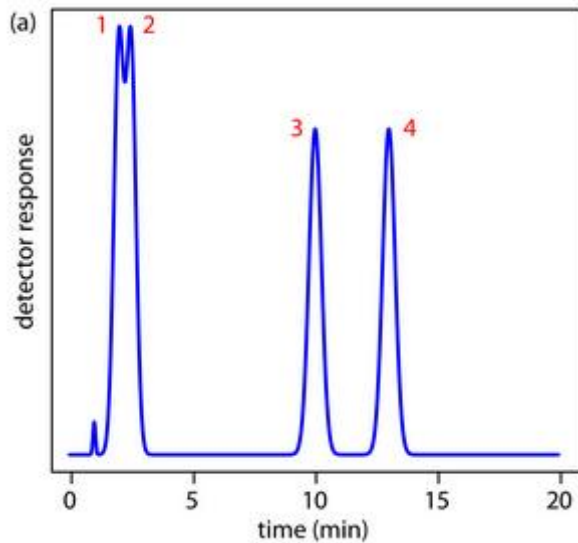
- 1. primjer:

- a) pikovi sastojaka 5 i 6 pojavljuju se nakon dosta vremena i ne mogu se identificirati jer su preširoki,
- b) ukupno vrijeme elucije je bolje nego na kromatogramima (a) i (c), ali je razdvajanje pikova 1-4 nezadovoljavajuće,
- c) podešeni uvjeti optimalni su za sastojke 3 i 4, dok za preostale sastojke nisu zadovoljavajući



- **rješenje:** na početku elucije podesiti uvjete pod (a), nakon elucije sastojaka 1 i 2 primijeniti uvjete s kromatograma (c) i razdvojiti 3 i 4, te pod istim uvjetima dovršiti ispiranje s kolone
- u LC se promjene k' postižu mijenjanjem sastava MF tokom elucije – gradijentna elucija ili programiranje otapala,
- u GC optimalni se uvjeti postižu povišenjem temperature – temperaturno programiranje.

- 2. primjer:

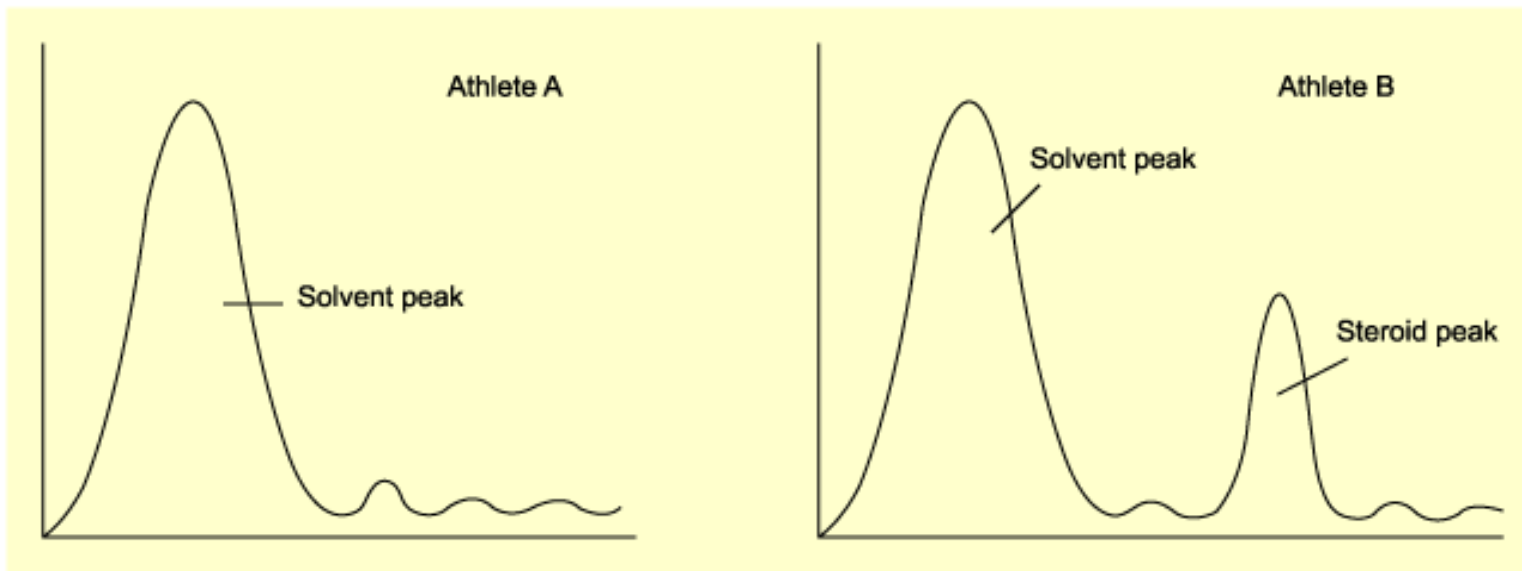


- u uvjetima primijenjenima pod (a) uspješno su, unutar 15 minuta, razdvojene komponente 3 i 4, komponentne 1 i 2 su nerazdvojene!,
- promjenom uvjeta [kromatogram (b)] sve četiri komponente su razdvojene, ali retencijsko vrijeme je predugo,
- **rješenje:** uz početne kromatografske uvjete (b) razdvojiti komponente 1 i 2, a potom smanjiti koeficijente kapaciteta povećanjem elucijske moći otapala čime se omogućava razdvajanje komponenti 3 i 4 u kraćem retencijskom vremenu [kromatogram (c)],

Primjena kromatografije

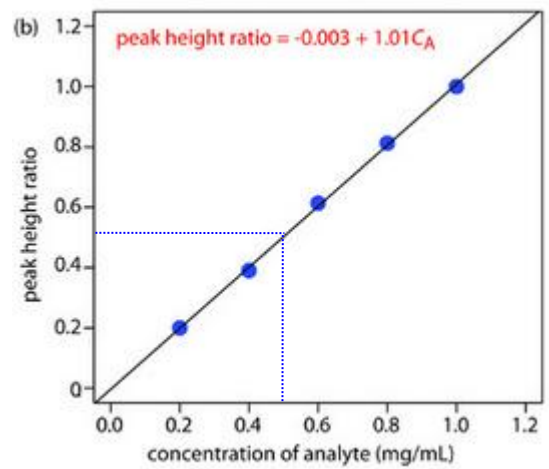
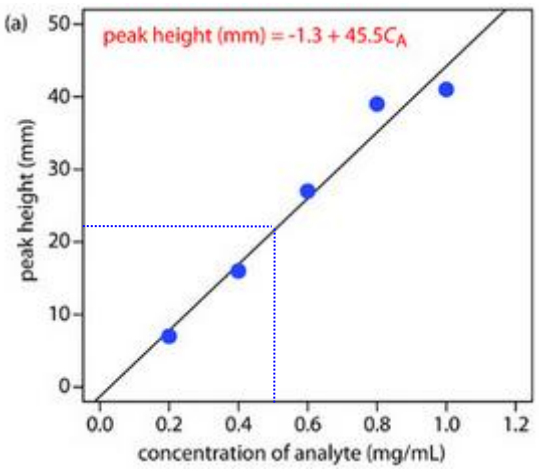
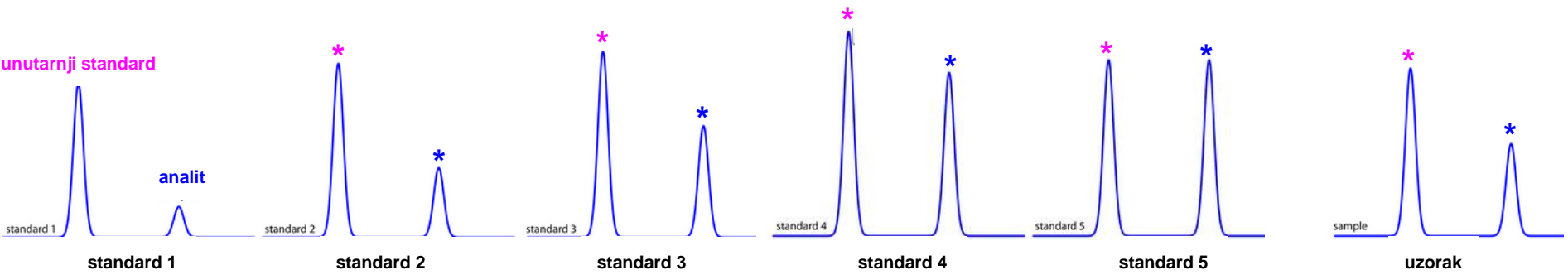
- 1) **Kvalitativna analiza:** na temelju očitnog vremena zadržavanja, a u usporedbi sa standardom moguće je utvrditi prisutnost ili odsutnost nekog sastojka u smjesi poznatog sastava,
- uobičajeno se kromatografske tehnike kombiniraju s nekom drugom tehnikom veće identifikacijske sposobnosti u cilju što preciznijeg utvrđivanja sastava smjese (GC-MS, HPLC-MS, GC-IR, ...)

* doping kontrola (prisutnost steroida u urinu)



- 2) **kvantitativna analiza:** temelji se na usporedbi visine ili površine analiziranog pika s visinom ili površinom pika standarda,
- analize koje se temelje na visini pika: visina pika je duljina okomice povučene od maksimuma pika do osnovne crte pika; izračunata količina sastojaka u uzorku je točna pod uvjetom da nije došlo do promjene širine pika u vremenu potrebnom za dobivanje kromatograma uzorka i standarda,
 - analize koje se temelje na površini pika: u modernim uređajima površina se mjeri elektroničkim integratorima,
 - **baždarenje primjenom standarda:** pripravi se niz standardnih baždarnih otopina koje su po sastavu slične ispitivanom uzorku; standardnim se otopinama snime kromatogrami, a visine pikova ili njihove površine prikažu se u ovisnosti o koncentraciji \Rightarrow dobiveni pravac predstavlja temelj za kvantitativnu analizu ispitivanih uzoraka,
 - **metoda unutrašnjeg standarda:** u standardnu otopinu i uzorak dodaje se pažljivo izvagana količina unutrašnjeg standarda; analitički parametar dobiva se omjerom površine (visine) pika analiziranog sastojka i površine (visine) pika unutrašnjeg standarda. Pik unutrašnjeg standarda mora biti dobro odijeljen od pikova ostalih sastojaka i mora se nalaziti u blizini pika analiziranog sastojka.

- Primjer: prikazani su kromatogrami pet standardâ poznatih koncentracija **analita** ($c_{analita} = 0,2 - 1 \text{ mg/ml}$) i jednog uzorka nepoznate koncentracije **analita**. Svi standardi i uzorak sadrže **istu koncentraciju unutarnjeg standarda koja iznosi 2,5 mg/ml**:

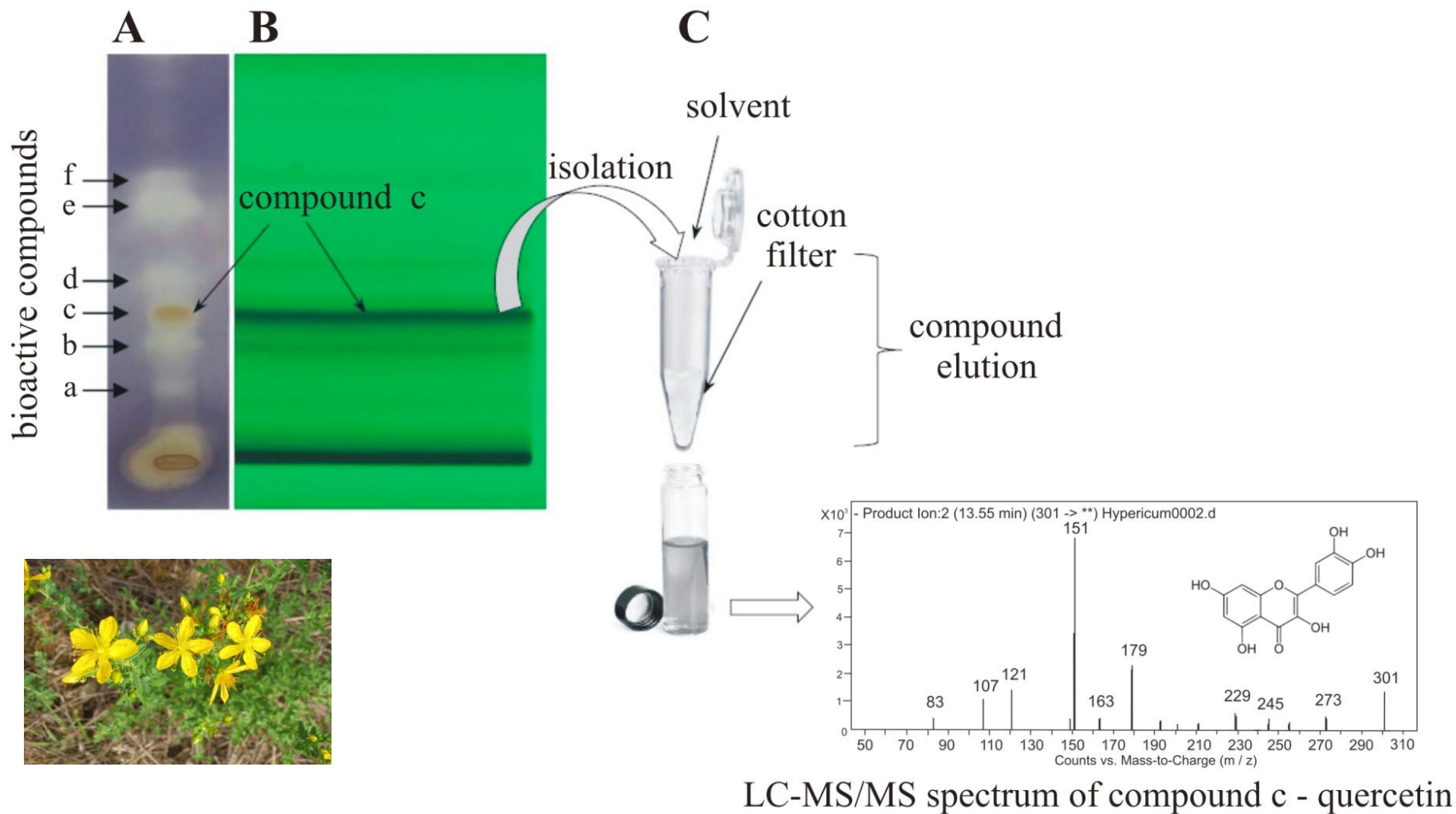


[standard] (mg/mL)	peak heights (mm)		
	internal standard	analyte	peak height ratio
0.20	35	7	0.20
0.40	41	16	0.39
0.60	44	27	0.61
0.80	48	39	0.81
1.00	41	41	1.00
sample	39	21	0.54

- (a) kalibracijski pravac i jednađžba pravca dobiveni bez primjene unutarnjeg standarda; iz visine pika analita iz uzorka dobiva se njegova koncentracija $\Rightarrow 0,49 \text{ mg/ml}$,
- (b) kalibracijski pravac i jednađžba pravca dobiveni uvrštavanjem podataka internog standarda; iz omjera visina pikova analita i unutarnjeg standarda izračunava se koncentracija analita u uzorku $\Rightarrow 0,54 \text{ mg/ml}$.

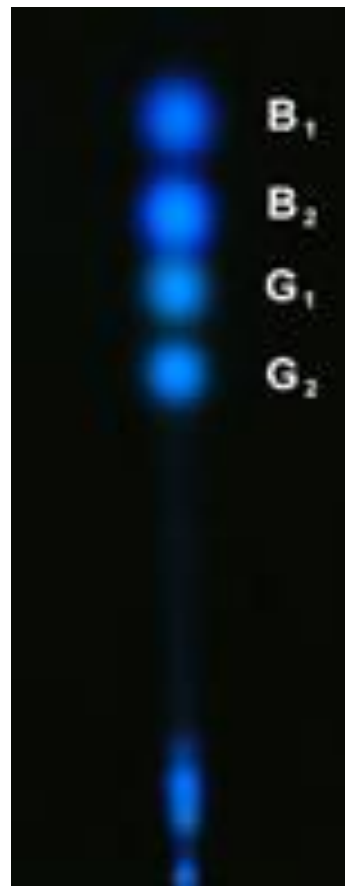
TLC u prehrambenoj tehnologiji, biotehnologiji i nutricionizmu

1. Pet bioaktivnih spojeva izolirano je iz Gospine trave (*Hypericum perforatum*) primjenom TLC, a njihova je strukturna karakterizacija provedena LC-MS analizom,



2. Plijesan prisutna u stočnoj hrani može dovesti do pojave aflatoksina, kancerogenih tvari, u mlijeku, mesu i jajima,

<http://www.fao.org/docrep/X5036E/x5036E0j.htm>

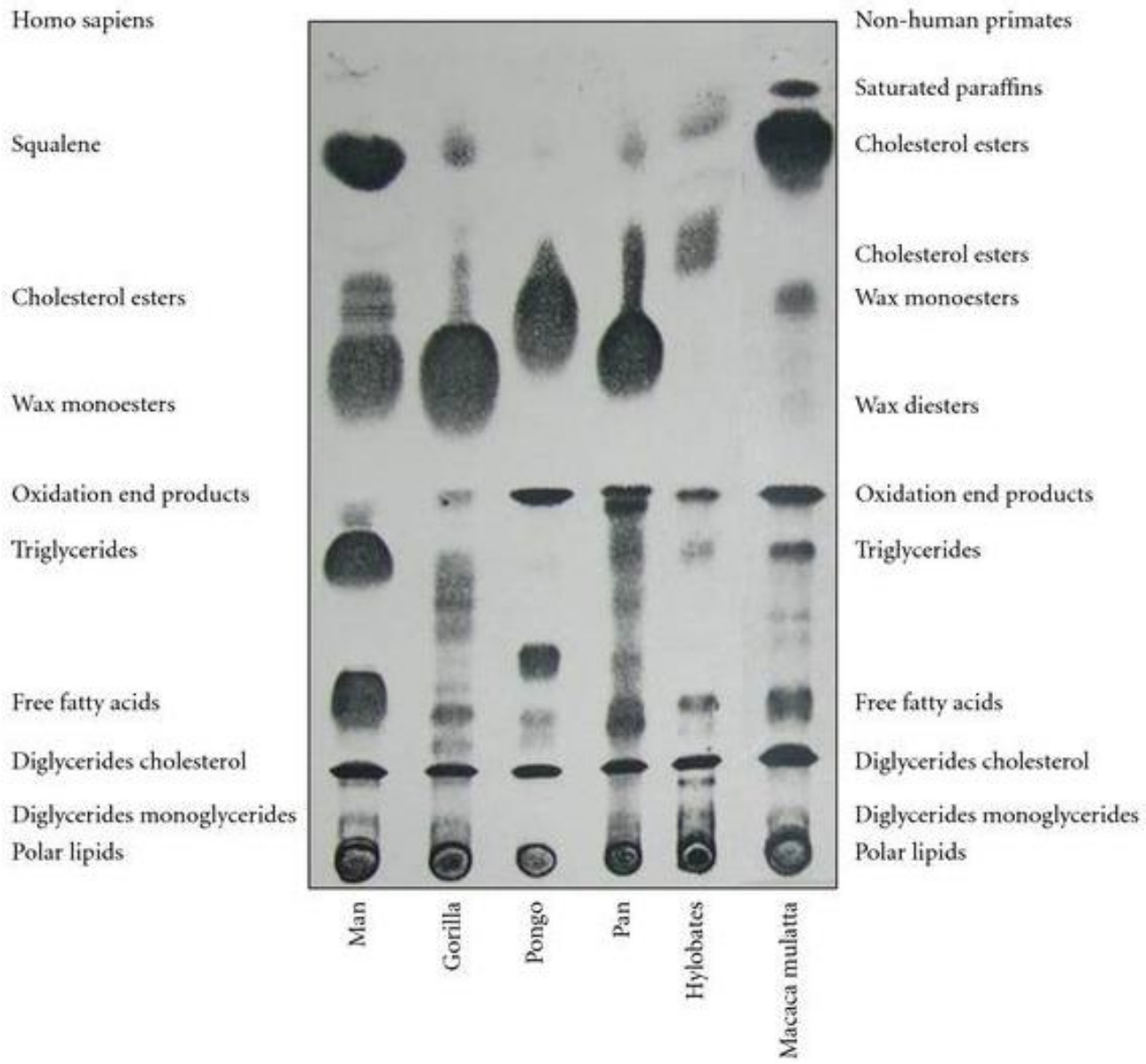


Mycotoxin

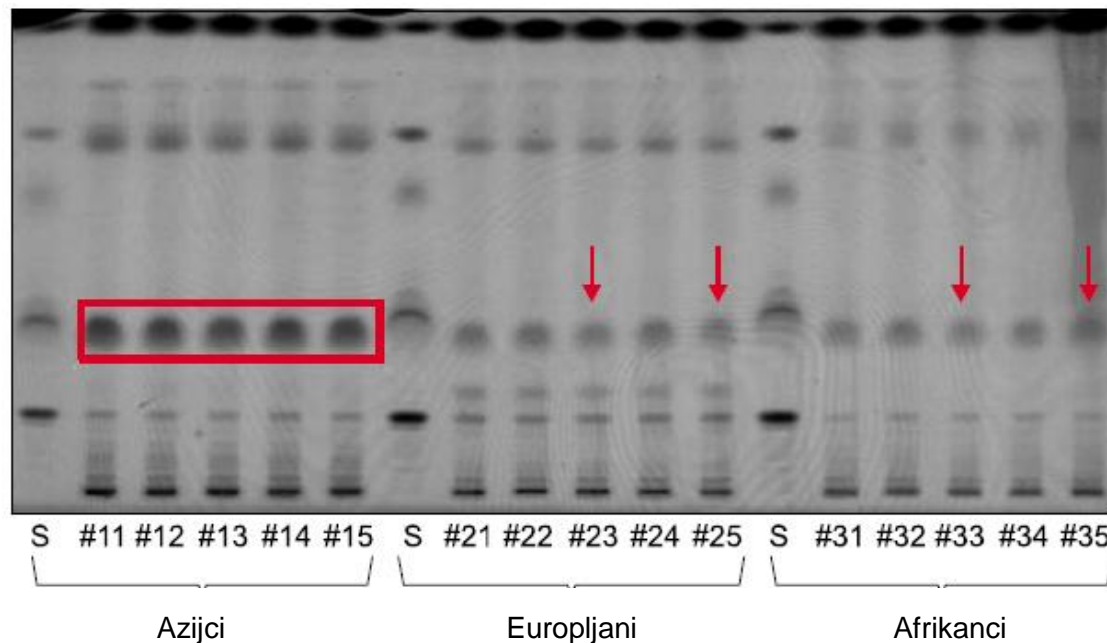
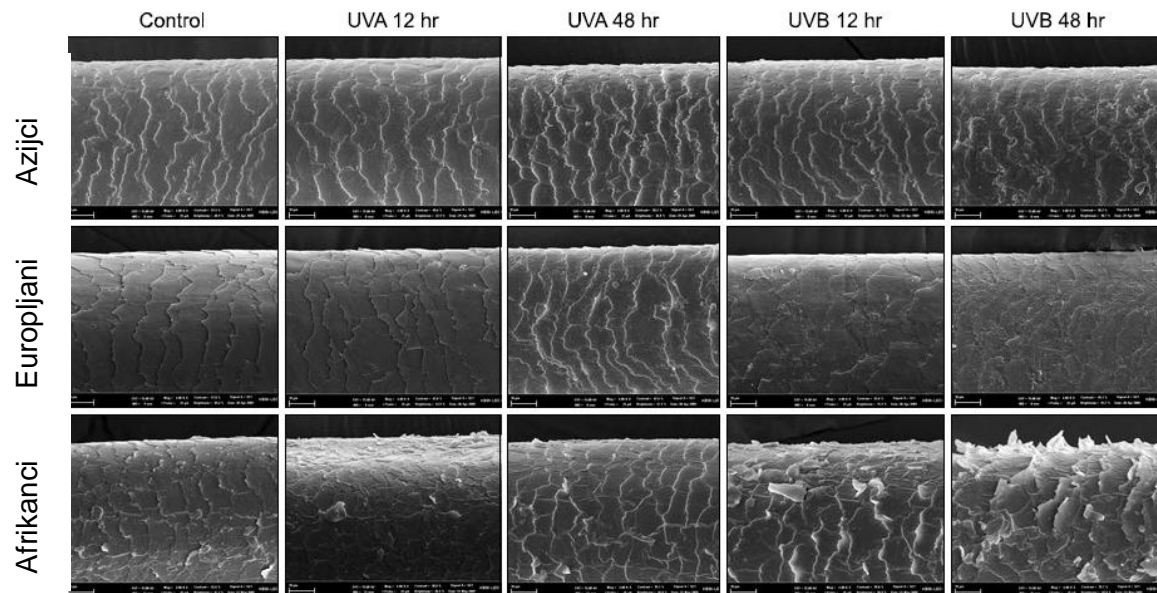
Aflatoxin B₁
Aflatoxin B₂
Aflatoxin G₁
Aflatoxin G₂

Benzene : acetonitrile (98 : 2)

3. TLC-analiza sastava lipida s površine kože (SSL, *skin surface lipid*, štite kožu od vanjskih utjecaja) ljudi i primata

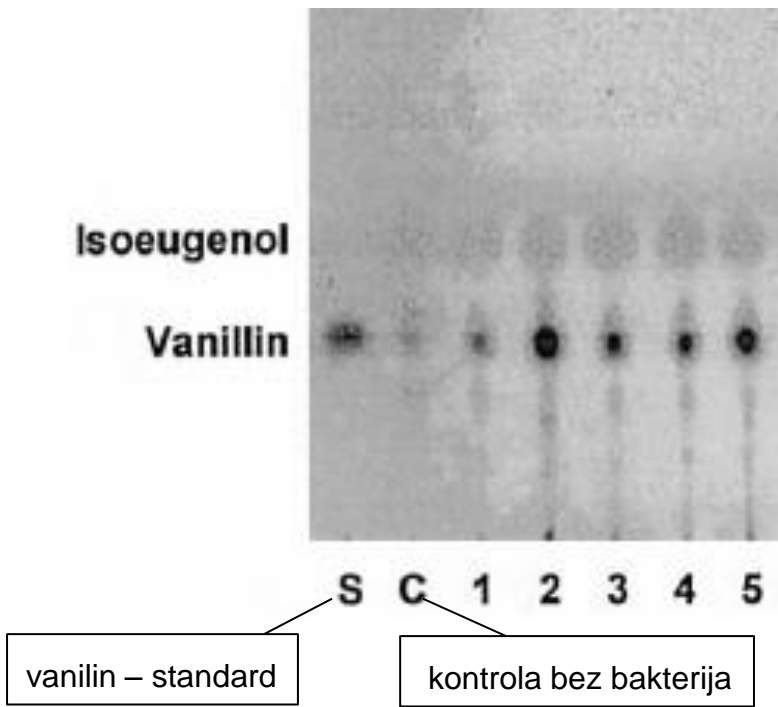


4. TLC-analiza integralnih lipida iz kose Azijaca, Afrikanaca i Europljana ukazuje na morfološke promjene uslijed izlaganja UV-zrakama,
- utvrđeno je da se u kosi Azijaca nalazi više lipida \Rightarrow UV-zrake više oštećuju kosu Afrikanaca i Europljana; lipidi u kosi Azijaca djelotvorno štite od UV-zraka,

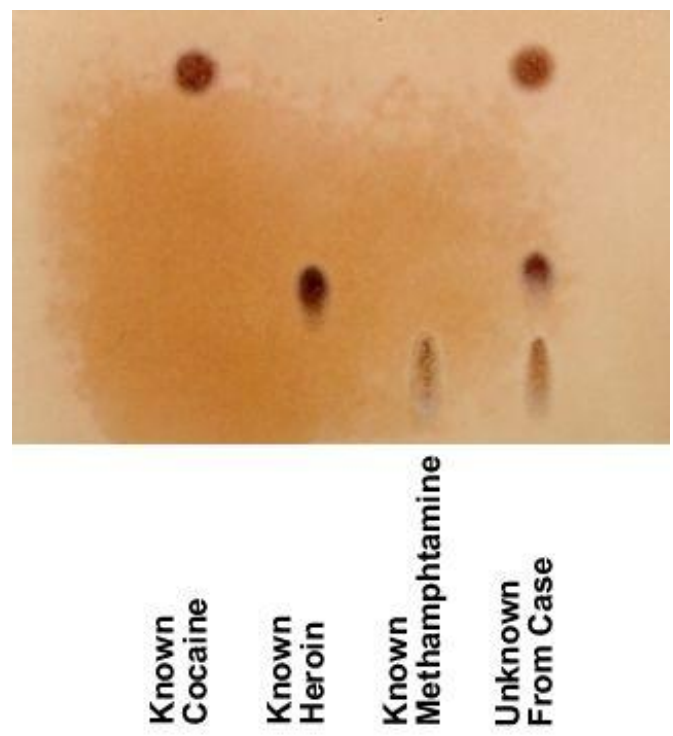


Jae Hong Ji et al, The Ethnic Differences of the Damage of Hair and Integral Hair Lipid after Ultra Violet Radiation, *Ann Dermatol.* **2013**, 25, 54-60.

5. Prirodne arome od velikog su značaja u industriji aroma i mirisa,
- izolirani su mikrobnii sojevi koji proizvode vanilin biokonverzijom izoeugenola; soj B2 koji je proizveo najviše vanilina identificiran je kao *Bacillus subtilis* sp.

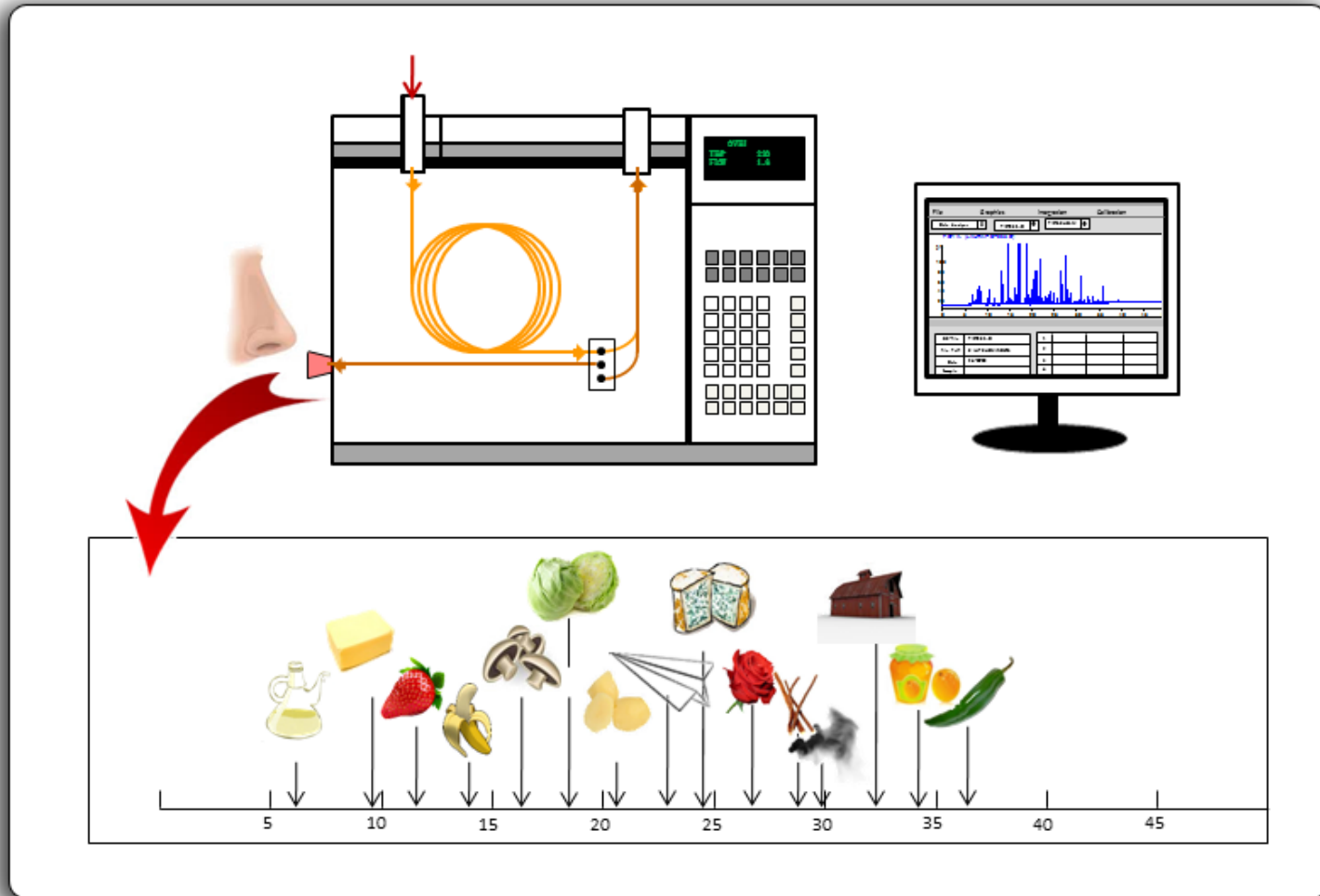


6. TLC u forenzici: prisutnost narkotikâ u uzorku izuzetom na mjestu zločina indicirana je rezultatima tankoslojne kromatografije.



E. Shimoni et al, Isolation of a *Bacillus* sp. capable of transforming isoeugenol to vanillin, *Journal of Biotechnology* 78 (2000) 1.

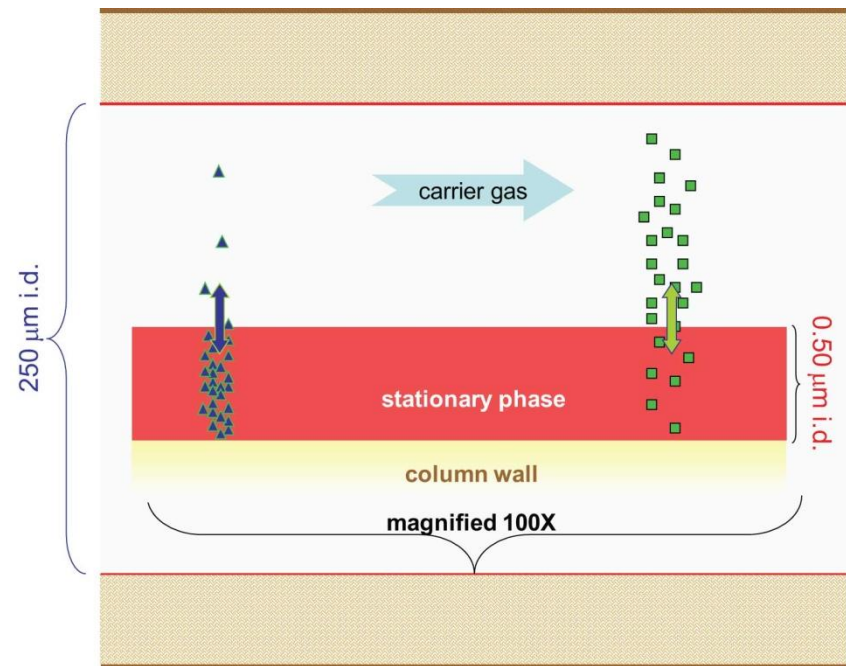
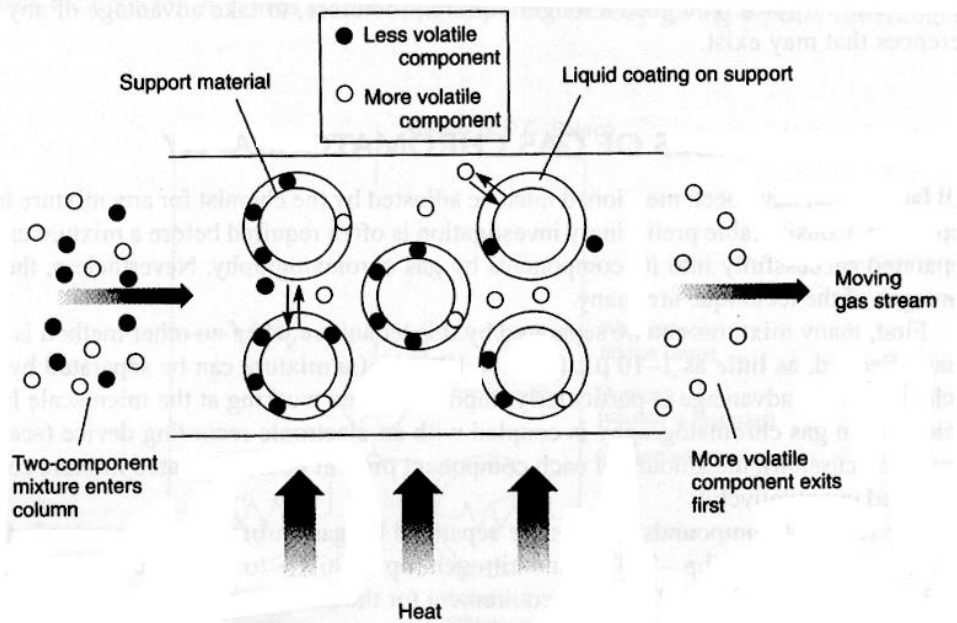
Plinska kromatografija



Literatura:

1. D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, Forth Worth, Saunders, 1997.
2. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije* (prijevod: N. Kujundžić, V. Živčić-Alegretti, A. Živković), Školska knjiga, Zagreb 1999.
3. F. Rouessac, A. Rouessac, A. *Chemical Analysis, Modern Instrumental Methods and Techniques*, 2nd Ed., Willey&Sons, New York, 2007.
4. J. R. J. Paré, J. M. R. Belanger, *Instrumental Methods in Food Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 1997.
5. M. M. Mossoba, *Spectral Methods in Food Analysis*, Marcel Dekker Inc., New York, 1999.
6. S. Ahuja, N. Jespersen, *Modern Instrumental Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2006.
7. <http://chemwiki.ucdavis.edu/>

- **Plinsko-tekućinska kromatografija (GLC):** najprimjenjivija tehnika za odjeljivanje i kvantitativno određivanje **hlapljivih spojeva** (u plinovitoj fazi),
- **sastojci smjese se, nakon otapanja, prevode u plinovito stanje (rasplinu se) i raspodjeljuju između SF i MF,**
- **SF je kruti adsorbens (GSC, gas-solid chromatography) ili tekućina (GLC, gas-liquid chromatography) vezana za čvrsti nosač adsorpcijom ili kemijskom vezom,**
- **MF je kemijski inertni plin (carrier gas, plin nositelj, ne reagira s molekulama analita);** njegova je funkcija transportirati analit kroz zagrijanu kolonu,
- **brzinu prolaska analita kroz kolonu određuje omjer njegove raspodjele između plinovite MF i imobilizirane SF,**



- Faktori koji utječu na djelotvornost odjeljivanja plinskom kromatografijom:
 - **hlapljivost analita:** hlapljivije komponente (komponente nižih temperatura vrelišta) gibaju se brže kroz kolonu u odnosu na manje hlapljive komponente,
 - **polarnost analitâ i kolone:** svi sastojci u smjesi gibaju se sporije kroz polarniju kolonu; pri tom polarniji sastojci u smjesi putuju sporije; najpolarniji sastojak giba se najsporije,
 - **temperatura kolone:** povećanjem temperature povećava se brzina gibanja svih komponenti u uzorku,
 - **brzina protoka plina nositelja:** povećanjem protoka plina nositelja ubrzava se putovanje svih komponenti kroz kolonu,
 - **duljina kolone:** dulje kolone zahtijevaju dulje vrijeme elucije; omogućavaju bolje razdjeljivanje.

- **Prednosti plinske kromatografije:**

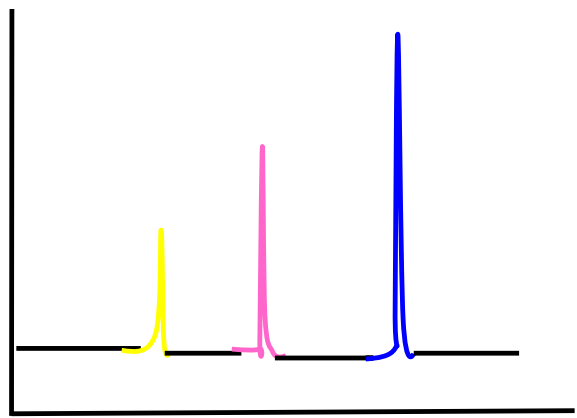
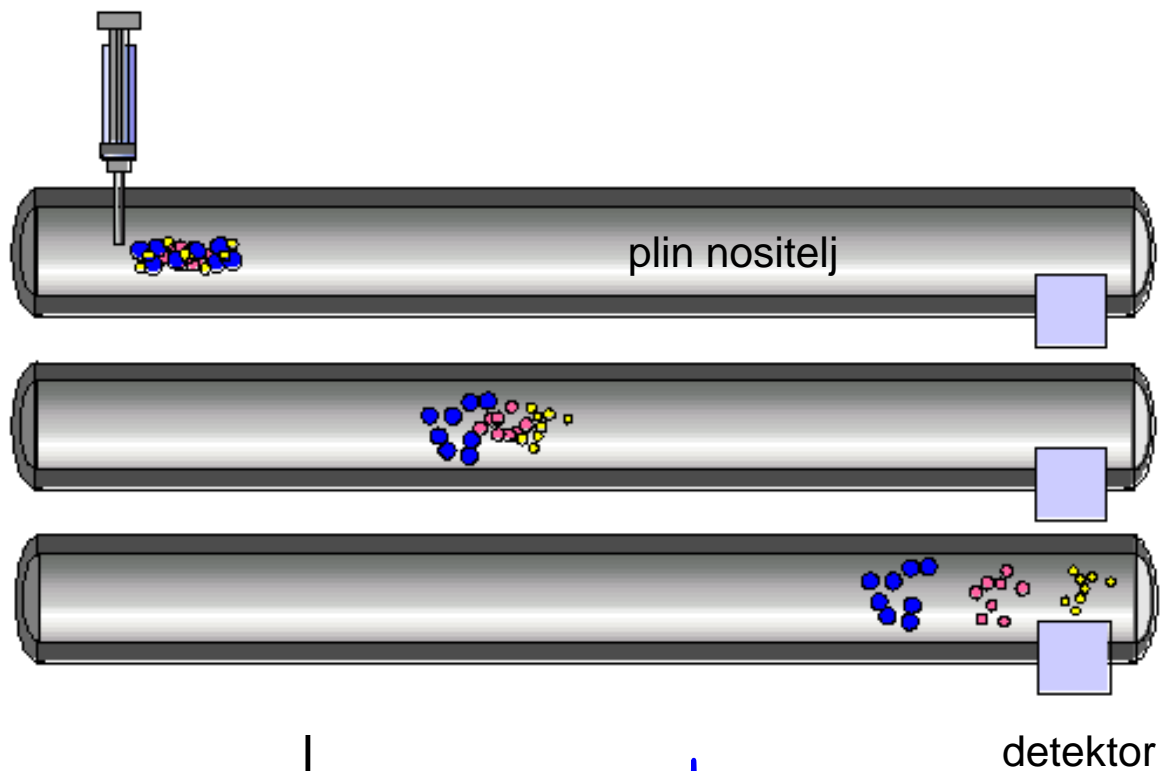
- zahtijeva vrlo **male količine** uzorka (μl ili μg),
- **učinkovito razdjeljivanje** smjese,
- **preciznost**,
- **osjetljivost** (detekcija organskih spojeva već pri vrlo niskim koncentracijama),
- **jednostavna izvedba instrumenta**,
- **brza analiza**,
- **visoka djelotvornost** ($N \sim 1,3 \times 10^6$),
- **jeftina metoda**,
- uglavnom **nedestruktivna analiza**,
- **mogućnost on-line sprezanja sa spektroskopskim instrumentima (GC-MS)**,

- **nedostaci:**

- ograničena na hlapljive uzorke s temperaturama vrelišta nižim od $500\text{ }^\circ\text{C}$,
- temperatura kolone ograničena na $\sim 380\text{ }^\circ\text{C}$,
- nepogodna za termolabilne uzorke,
- uzorci moraju biti topljivi i ne smiju reagirati s kolonom,
- zahtijeva spektroskopsku identifikaciju (MS) pika.

Načela GLC

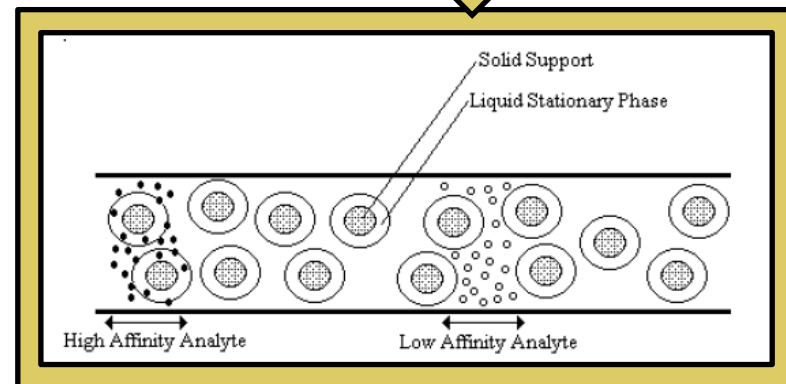
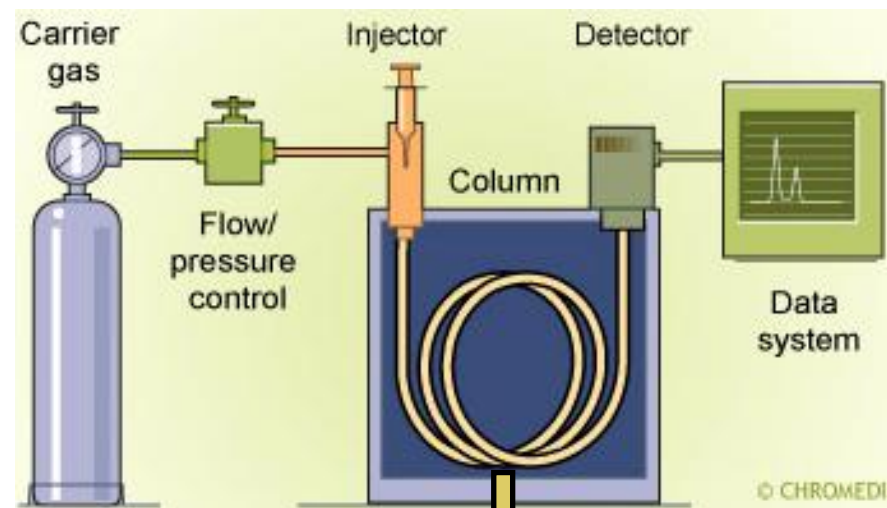
- Osnovna načela kromatografije vrijede i za [GC](#).



t (min)

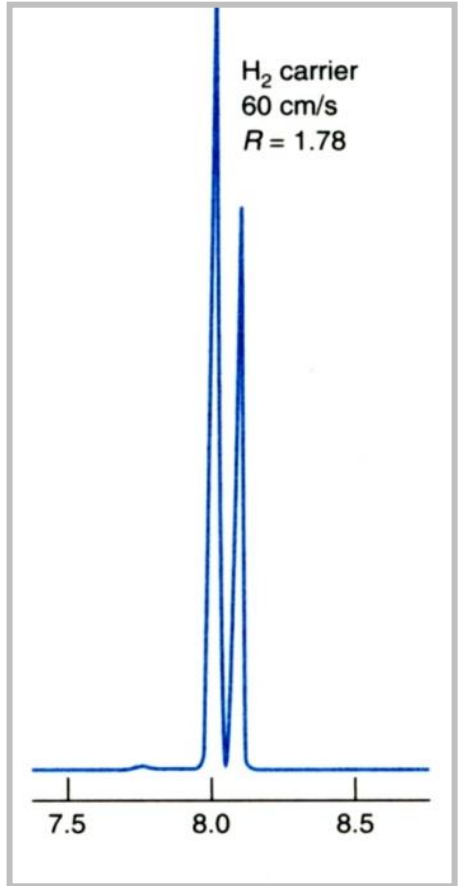
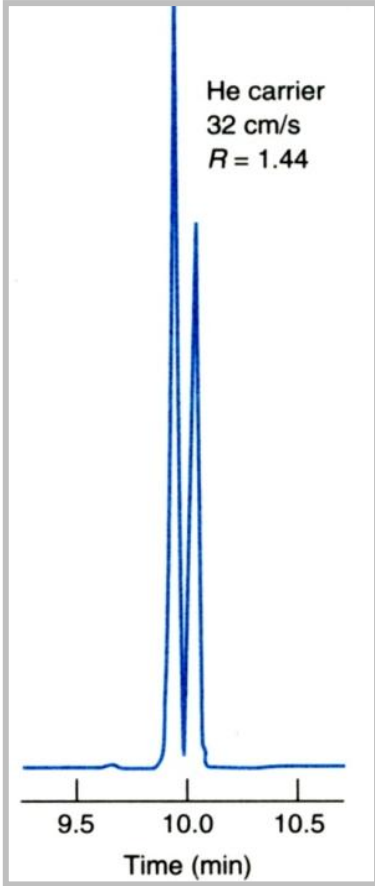
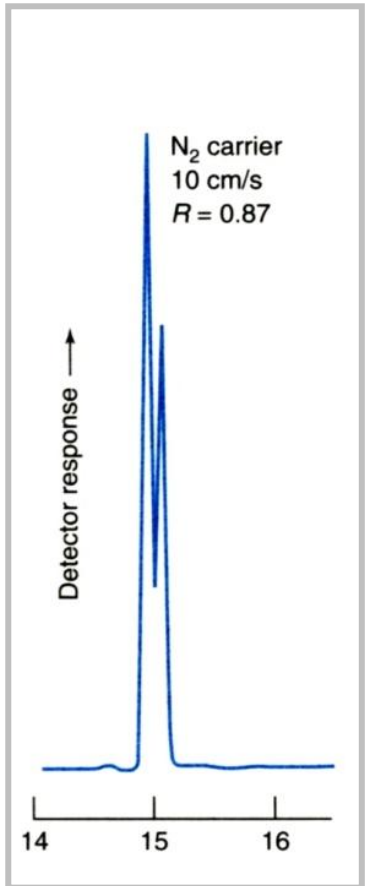
Uređaji za GLC

- Princip rada - organski se spojevi razdvajaju na temelju različite raspodjele između MF i SF:
 - rasplinuti uzorak injektira se u kromatografsku kolonu,
 - uzorak se giba kroz kolonu nošen plinom nositeljem (MF),
 - komponente iz uzorka, nakon izlaska iz kolone, detektiraju se pikovima na kromatogramu.
- Sastoje se iz nekoliko glavnih komponenti: **injektora** (za unošenje uzorka), **kolone**, **detektora** i **termostata** (koji sprječava pregrijavanje kolone),
- MF** koja prenosi uzorak kroz kolonu naziva se **plin nositelj**, a reguliranjem njegovog tlaka omogućava se reproducibilnost vremena zadržavanja,
- analiza započinje unosom male količine uzorka (tekućeg ili plinovitog) u injektor koji raspline uzorak i miješa ga s MF na početku kolone postavljene u termostatirani prostor; na kraju kolone MF s odijeljenim analitom prolazi kroz detektor,
- polarnost **SF** mora odgovarati polarnosti sastojaka u uzorku, te u tom slučaju redoslijed elucije ovisi o vrelištu sastojaka,



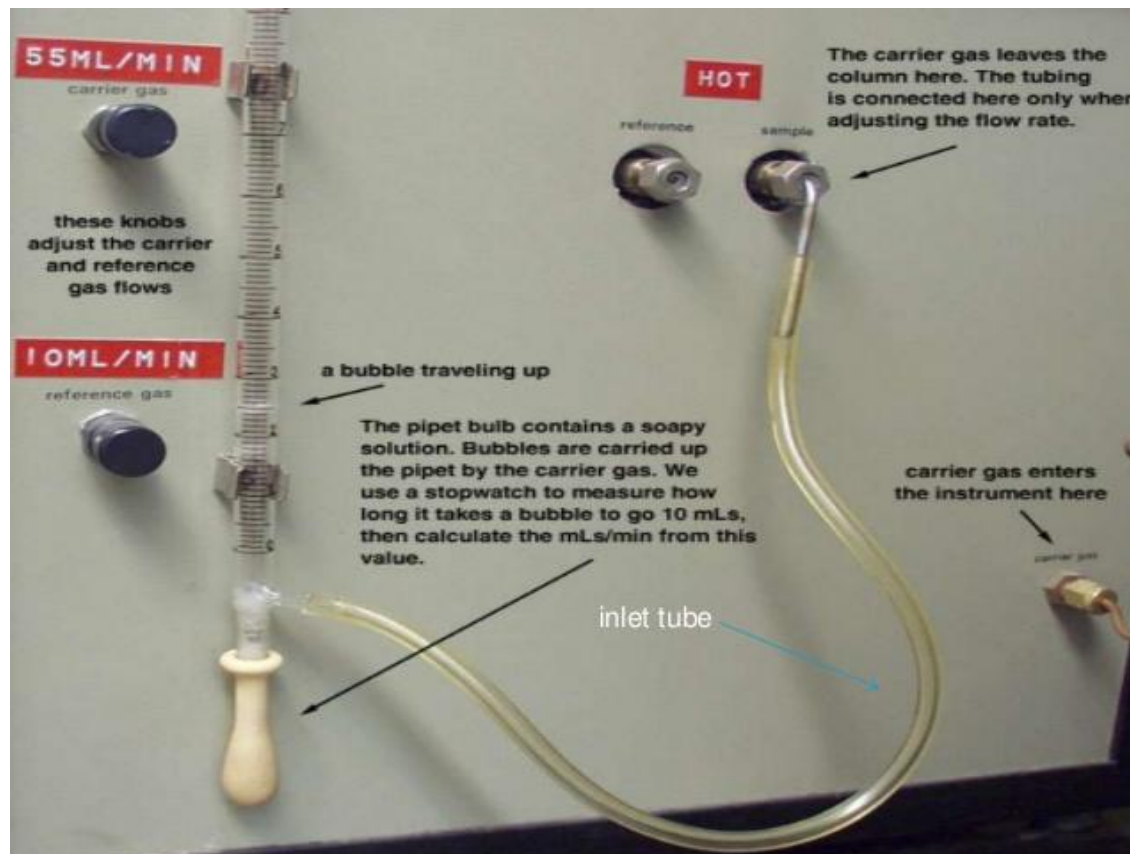
1) **Plin nositelj (MF):** mora biti kemijski inertan (He, Ar, N₂ ili H₂), a izbor ovisi o detektoru:

Plin nositelj	Prednosti	Nedostaci
N ₂	jeftin, vrlo inertan, nezapaljiv	dugotrajno i slabije razdjeljivanje
He	v vrlo inertan, kompatibilan s većinom detektora, nezapaljiv, dobro razdjeljivanje	skup
H ₂	jeftin, brzo razdjeljivanje	reaktivan (adicija na dvostruku vezu!), sa zrakom tvori eksplozivnu smjesu



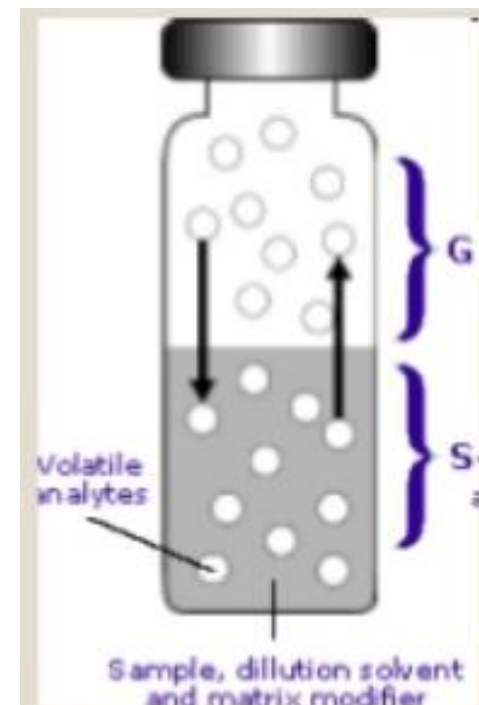
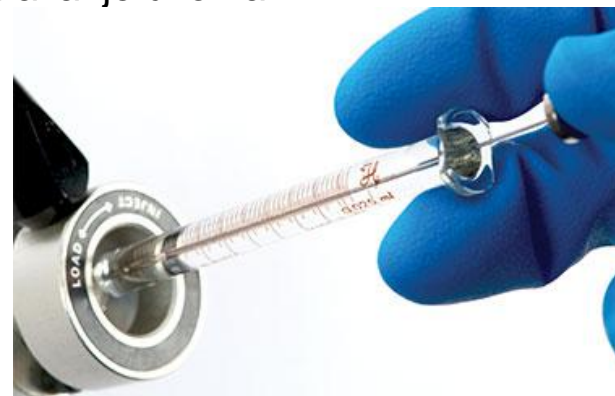
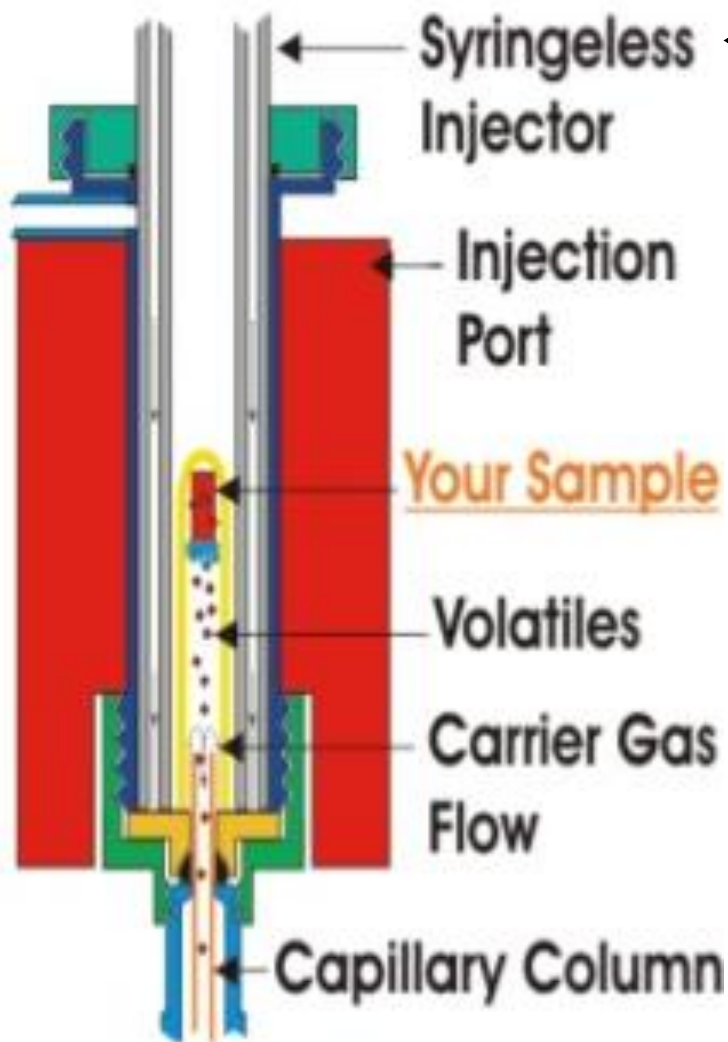
Regulacija protoka plina nositelja

- Na dovod plina nositelja postavljaju se regulatori tlaka, ventili i mjerači protoka,
- regulatorima tlaka regulira se brzina protoka MF; brzina protoka može se izmjeriti jednostavnim mjeracem protoka s mjehurićem sapunice (na putu plina nositelja stvori se mjehurić sapunice; vrijeme tokom kojeg se mjehurić pomakne između dviju oznaka u bireti preračuna se u brzinu protoka).



2) Sustav za uštrcavanje (injektiranje) uzorka

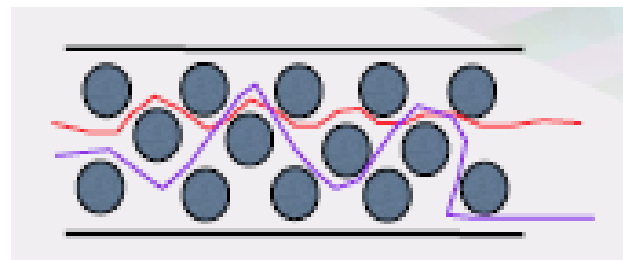
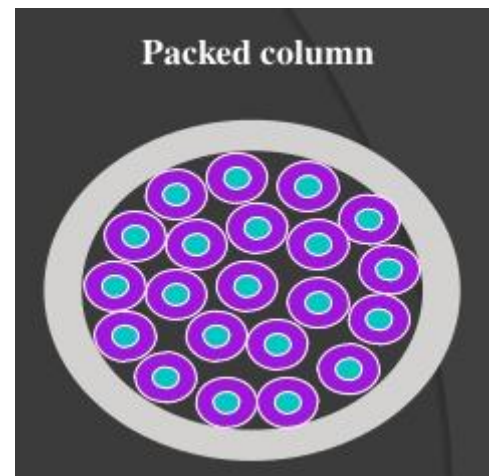
- Mala količina tekućeg uzorka mikrolitarskom se štrcaljkom unese kroz membranu (septum) u zagrijani dio uređaja smješten na vrhu kolone; temperatura mora biti bar 50 °C viša od vrelišta najmanje hlapljivog sastojka čime se osigurava trenutačno isparavanje uzorka.



3) Kolone

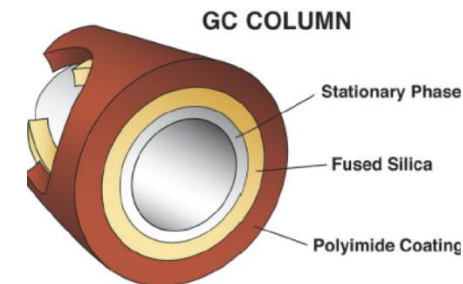
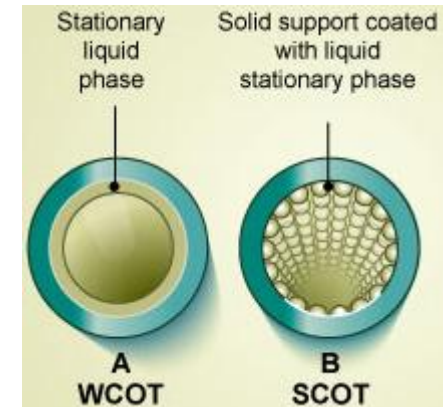
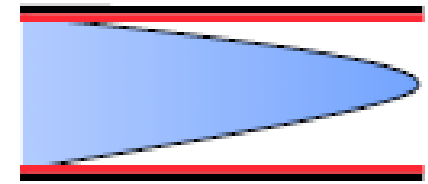
3.1. Punjene kolone (Packed column)

- Izrađene su od staklenih, metalnih ili teflonskih cijevi,
- napunjene su **sitnozrnatim punilom ili čvrstim nosačem** na koji je nanesen tanki sloj stacionarne tekuće faze,
- čvrsti nosač u punjenoj koloni nosi tekuću SF koja je nanesena tako da osigura što veću dodirnu površinu s MF; izrađuje se iz posebno obrađene prirodne dijatomejske zemlje,
- savijene su u svitke promjera ~ 15 cm da bi se mogle postaviti u termostatirani prostor kromatografa,
- **djelotvornost kolone povećava se sa smanjenjem promjera zrna punila.**



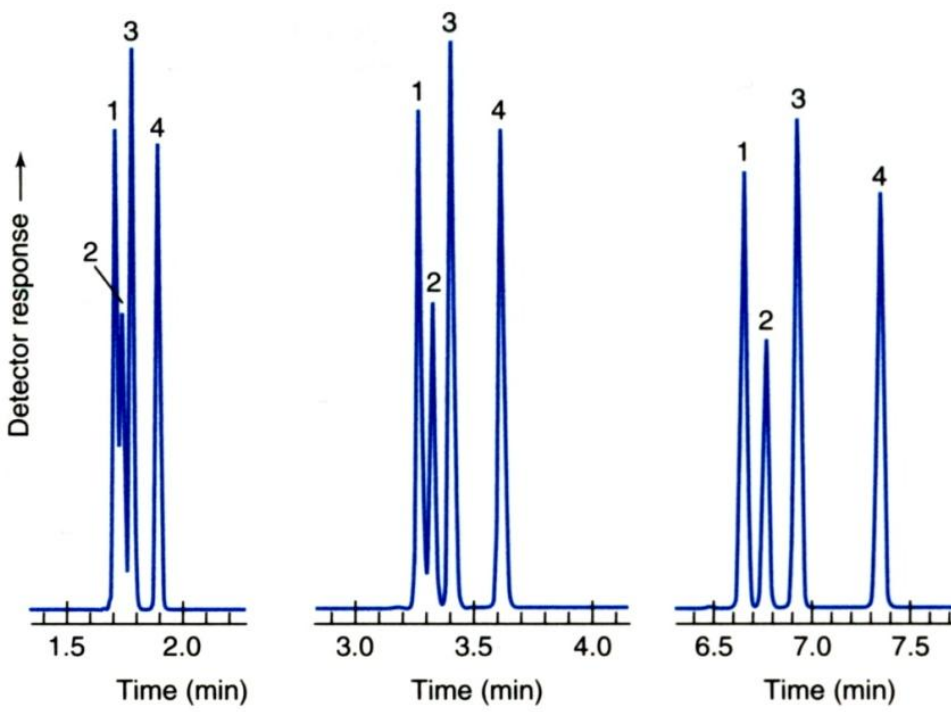
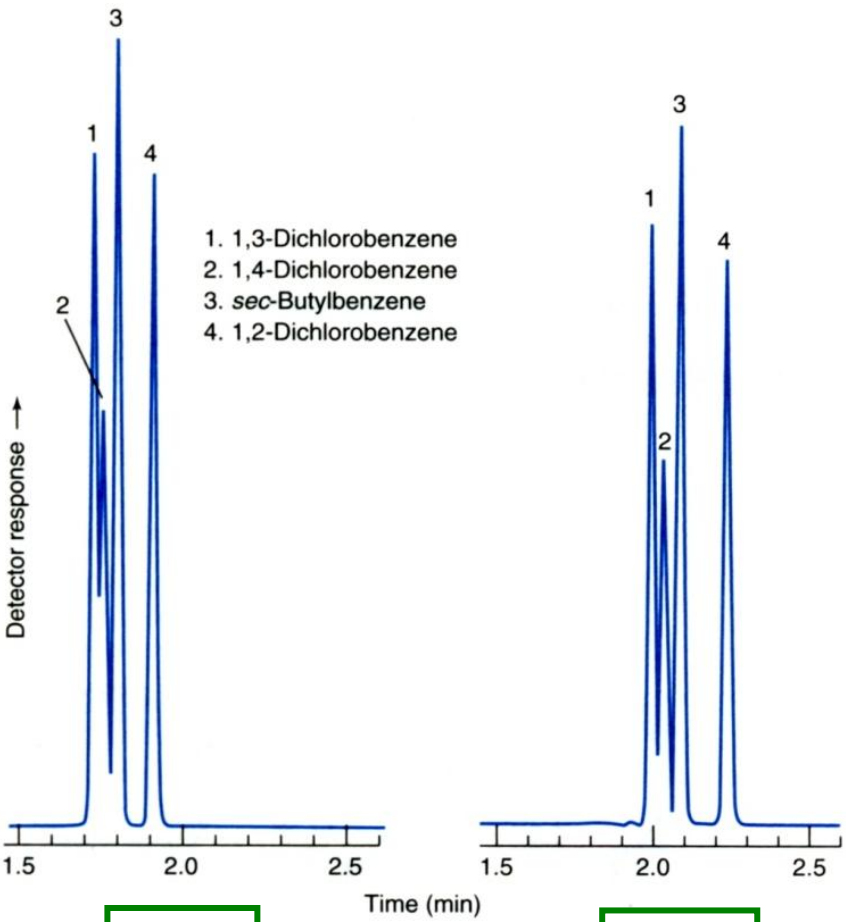
3.2. Kapilarne kolone (Open tubular column)

- Unutarnja stijenka kapilare presvučena je, izravno ili preko tankog sloja poroznog čvrstog nosača, tankim slojem tekuće SF,
- izrađuju se iz stakla (stijenka staklene cijevi nagrižena je jakim kiselinom kako bi se dobila gruba površina na koju će se SF jače vezati), čelika, aluminijska, bakra i plastike,
- WCOT (kapilarne kolone s obloženom stijenkom, **wall-coated open tubular**): cijevi s unutrašnjom stijenkom presvučenom tankim slojem SF,
- FSWC (kapilarne kolone izvučene iz kvarca, **fused-silica wall-coated**: izvlače se iz posebno pročišćenog kvarca, njihove su stijenke puno uže od stijenki staklenih kapilara; vanjska stijenka je presvučena zaštitnim poliamidnim slojem; odlikuju se čvrstoćom, fleksibilnošću i manjom reaktivnošću prema sastojcima uzorka,
- SCOT (kapilarne kolone obložene nosačem, **support-coated open tubular**): mikropunjene kolone čije su unutrašnje stijenke presvučene dijatomejskom zemljom na koju je nanescena SF,
- “megabore” kolone: odnedavno na tržištu, kapilarne kolone promjera 530 μm ; djelotvornije od punjenih kolona.



	Vrsta kolone			
	FSWC	WCOT	SCOT	punjena
Duljina (m)	10 - 1000	10 - 1000	10 - 100	1 - 6
Unutarnji promjer (mm)	0.1 – 0.3	0.25 – 0.75	0.5	2 – 4
Efikasnost (broj tavana/ m)	2000 - 4000	1000 - 4000	600 - 1200	500 - 1000
Količina uzorka (ng)	10 -75	10 - 10 ³	10 - 10 ³	10 - 10 ⁶
Tlak	nizak	nizak	nizak	visok
Brzina	brzo	brzo	brzo	sporo
Inertnost	najveća	dobra	prosječna	slaba

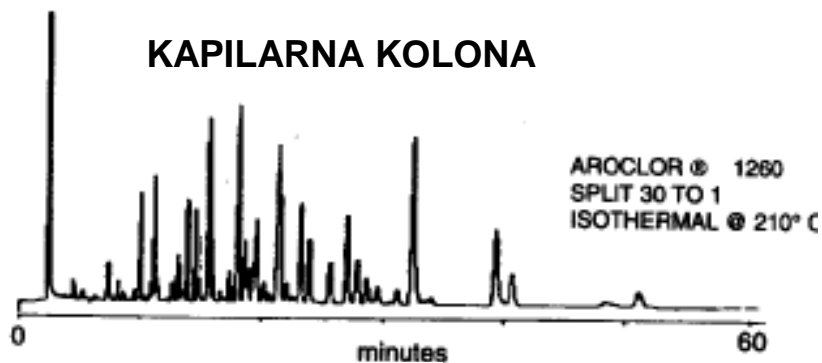
• smanjenjem unutarnjeg promjera i produljenjem kolone postiže se bolje razdjeljivanje,



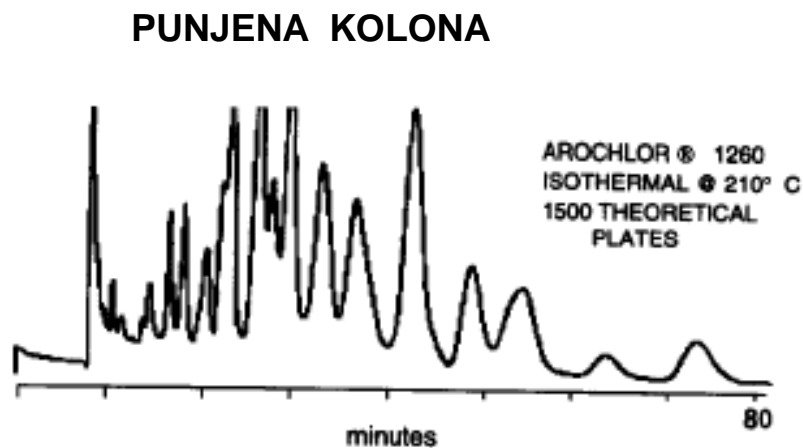
Smanjenje unutarnjeg promjera
Razdjeljivanje

Duljina kolone
Razdjeljivanje

- usporedba kapilarnih i punjenih kolona:



- ✓ potrebno manje uzorka,
- ✓ bolje odjeljivanje,
- ✓ više pikova,
- ✓ brža analiza



- slabije odjeljivanje,
- manje pikova, širi pikovi,
- dulja retencijska vremena,
- niža cijena



50m/0.3 mm OV-1

Calmus Oil

60°

progr. 4°/min

KAPILARNA KOLONA

200

4m/3mm 5% OV-1

Gaschrom Q 60/80

80°

progr. 5°/min

PUNJENA KOLONA

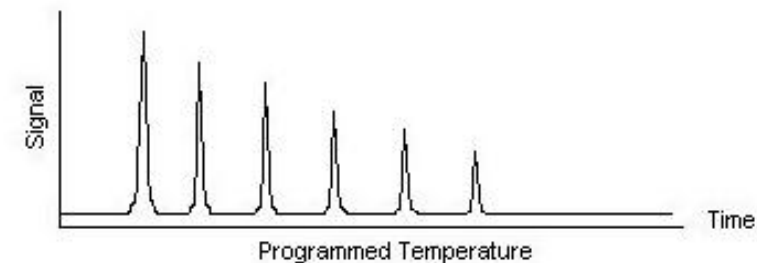
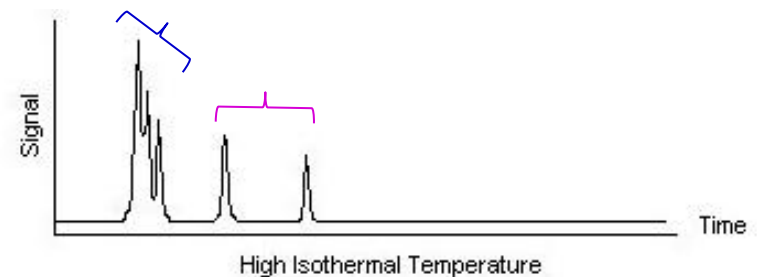
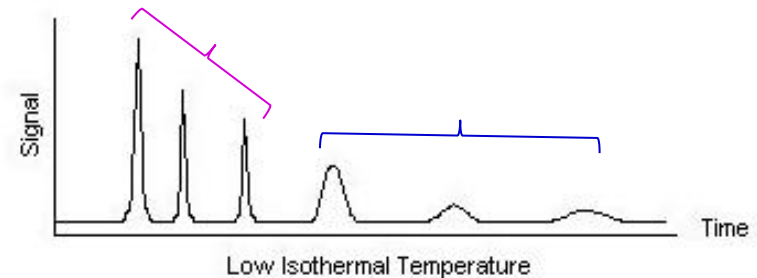
220

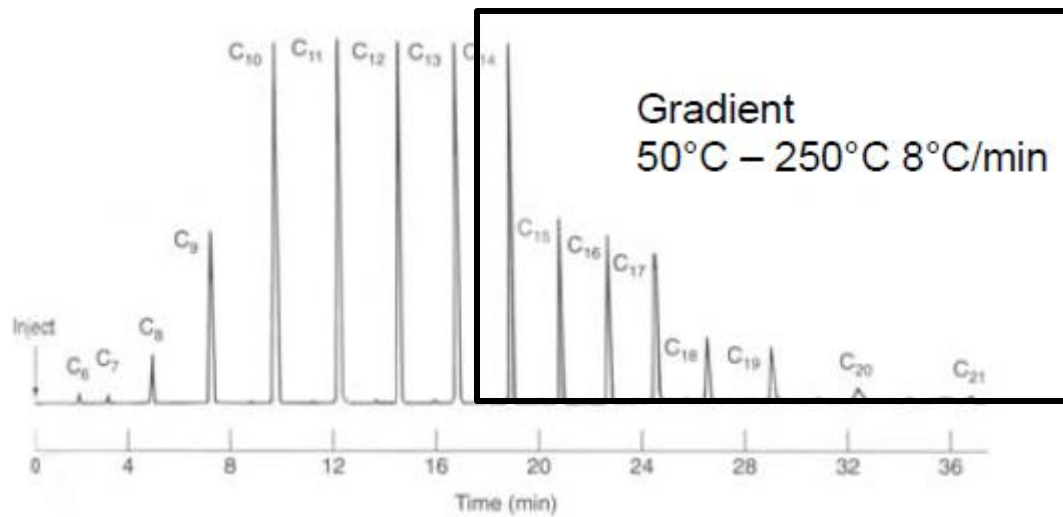
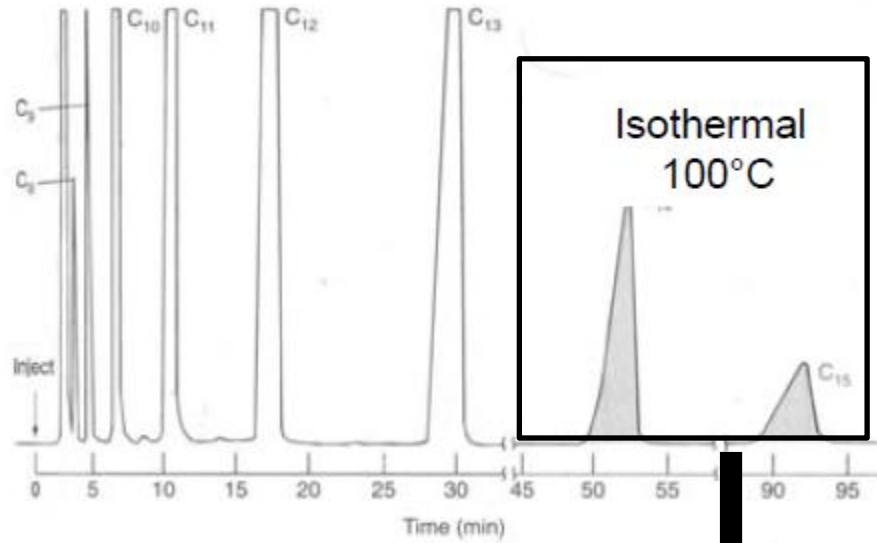


© - Josef Hlasek
www.hlasek.com
Acorus calamus a207

4) Termostatiranje kolone

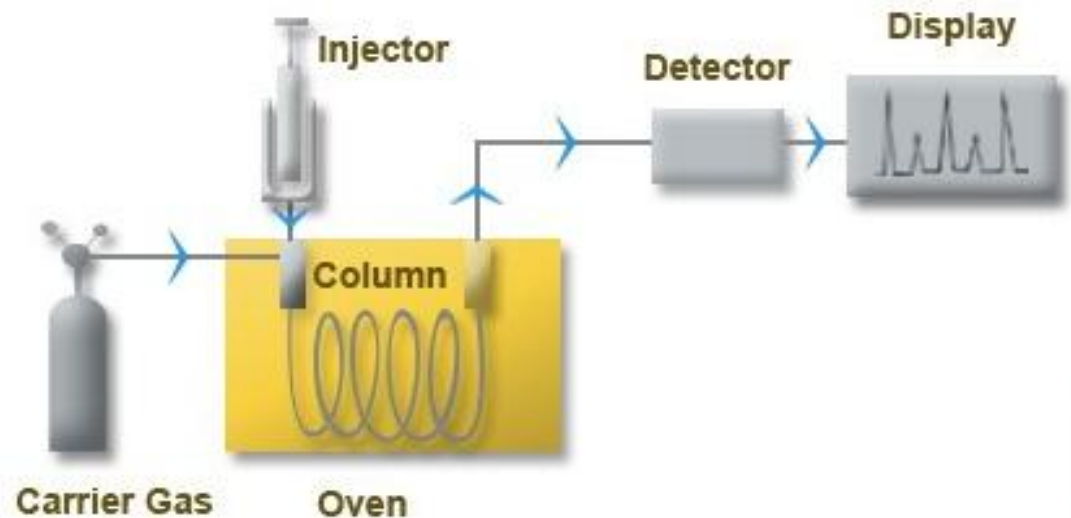
- Kolona je smještena u termostatiranom prostoru kromatografa radi održavanja temperature u granicama nekoliko desetinki stupnja, a u cilju postizanja preciznosti,
- pri **izotermnom programiranju** termostata, **temperatura kolone je konstantna** tokom cijelog procesa odjeljivanja; optimalna temperatura bliska je prosječnom vrelištu uzorka,
- ako se za uzorke širokog raspona vrelišta koristi niska temperatura, **dobro odjeljivanje postiže se za frakcije nižeg vrelišta** dok se **frakcije višeg vrelišta sporije eluiraju** (njihove se vrpce znatno proširuju),
- ako je temperatura kolone bliska vrelištu **frakcije s najvišim vrelištem**, ta se frakcija **izdvaja kao oštar pik**, dok se **frakcije nižeg vrelišta eluiraju bez separacije**,
- pri **programiranom termostatiranju** kolone, **temperatura se povisuje kontinuirano** ili skokovito kako napreduje separacija; ova je metoda pogodna za smjese čiji sastojci imaju širok raspon temperatura vrelišta; odjeljivanje sastojaka nižeg vrelišta započinje pri nižoj temperaturi, a s porastom temperature odjeljuju se manje hlapljivi sastojci.





5) Detektori

- Smješteni na kraju kolone, **pokazuju brz odziv na male promjene koncentracije sastojaka tokom njihovog eluiranja iz kolone,**
- konvertiraju detektirane promjene u električni signal koji se ispisuje kao kromatogram,



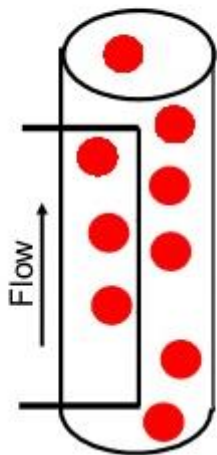
- **svojstva idealnog detektora:**

- **osjetljivost** kao preduvjet za visoku rezoluciju signala svih komponenti u smjesi (10^{-8} do 10^{-15} g analita/s),
- **primjenjivost do minimalno 400 °C,**
- odgovor neovisan o protoku,
- **ne uništava analizirani uzorak.**

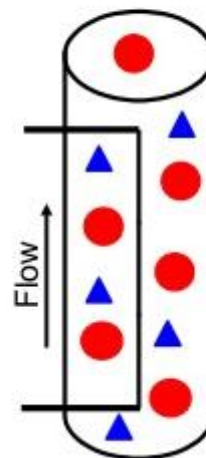
5.1. Detektor toplinske vodljivosti [(katarometar), *engl.* Thermal Conductivity Detector, TCD]

- Jedan od najranije korištenih detektora u GC,
- mjeri promjene u toplinskoj provodljivosti **plina nositelja** u ovisnosti o sastavu ispitivane **smjese**,
- sastoji se iz izvora topline (tanke platinaste ili zlatne žice) čija temperatura ovisi o termalnoj provodljivosti okolnih plinova te dvaju detektora od kojih se jedan koristi kao referentni za **plin nositelj**, dok drugi prati promjene toplinske vodljivosti do kojih dolazi tokom eluacije **analita** (tokom eluacije dolazi do promjene u sastavu MF čime se mijenja i toplinska vodljivost; posljedično dolazi do promjene otpora žice proporcionalno koncentraciji analita u plinu nositelju),

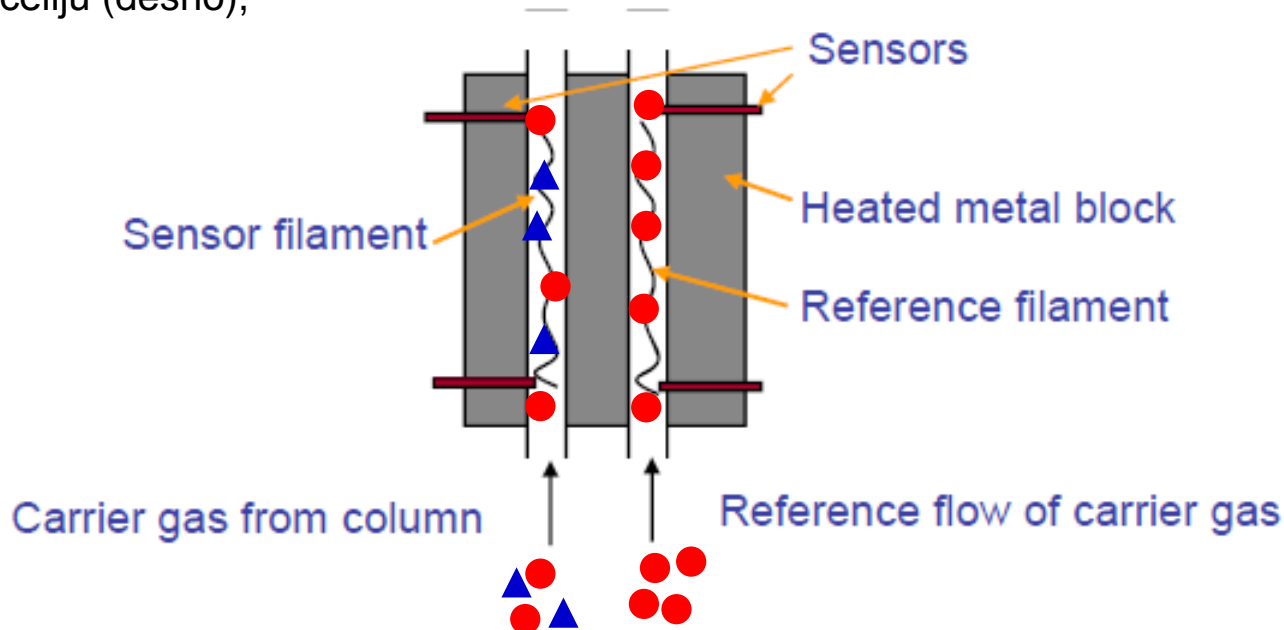
The TCD is a nondestructive, concentration sensing detector. A heated filament is cooled by the flow of carrier gas. ●



When the carrier gas is contaminated by sample ▲, the cooling effect of the gas changes. The difference in cooling is used to generate the detector signal.



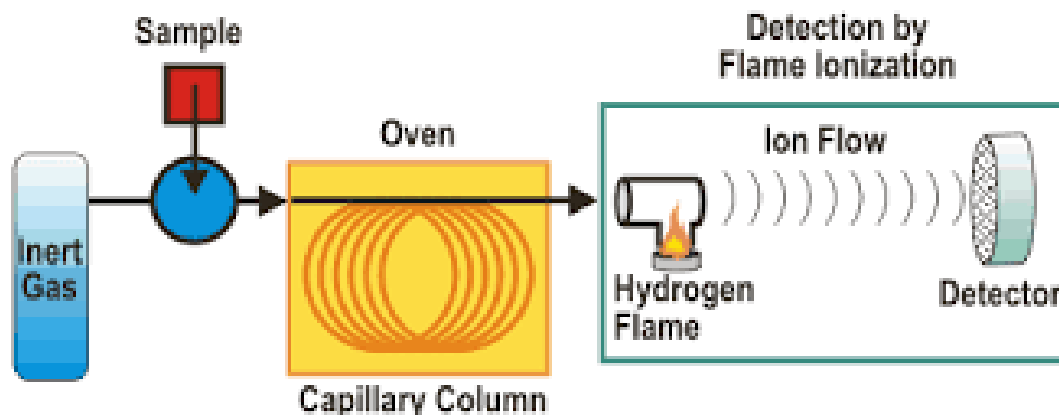
- prolaskom plina preko izvora toplote (žice) dolazi do apsorpcije toplote te se žica hladi,
- **plin nositelj** s **rasplinutim uzorkom** prolazi kroz jednu ćeliju (lijevo), dok **plin nositelj** bez uzorka prolazi kroz referentnu ćeliju (desno),



- prolaskom plina nositelja preko žice gubitak toplote je konstantan, dok gubitak toplote izazvan prolaskom plina nositelja s rasplinutim uzorkom ovisi o sastavu uzorka,
- razlika u količini izgubljenje toplote za plin nositelj i plin nositelj s uzorkom odgovara izmjenom signalu,
- **prednosti: jednostavna uporaba, široka primjenjivost odn. univerzalnost (organski i anorganski uzorci), ne uništava analizirani uzorak,**
- **nedostaci: slaba osjetljivost u odnosu na druge detektore, spor protok i ovisnost o koncentraciji uzorka.**

5.2. Plameno-ionizacijski detektor (engl. Flame Ionization Detector, FID)

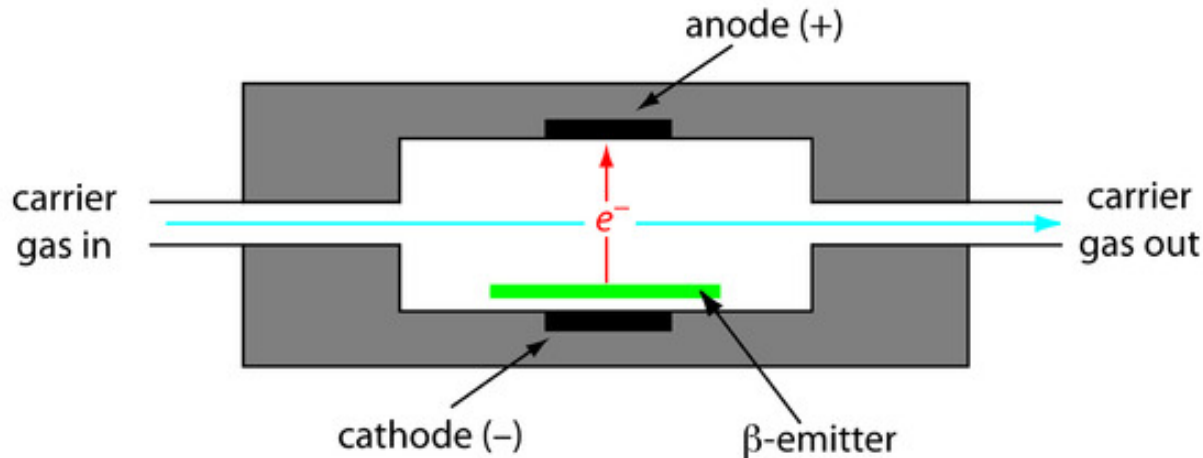
- Najšira uporaba u odnosu na ostale detektore,
- uzorak se, nakon izlaska iz kolone, miješa sa smjesom zraka i vodika i zapali pri čemu dolazi do pirolize (kemijske razgradnje) uzorka,



- većina C-atoma (izuzev onih u karboksilnim i karbonilnim skupinama) sagorijevanjem stvaraju radikale $\text{CH}\cdot$ iz kojih nastaju CHO^+ ioni i elektroni,
- elektroni se skupljaju na sabirnoj elektrodi, a njihova se struja, proporcionalna broju C-atoma u plamenu, mjeri ampermetrom,
- **prednosti: primjenjiv je za brojne organske spojeve zahvaljujući velikoj osjetljivosti, odzivu, malom šumu, te jednostavnoj izvedbi i rukovanju,**
- **nedostaci: uništava uzorak.**

5.3. Detektor apsorpcije elektrona

- Plin nositelj prolazi preko radioaktivnog izvora koji emitira elektrone; emitirani elektroni ioniziraju plin nositelj koji oslobađa elektrone, a nastali elektronski snop privlači anoda čime se generira struja,
- ako u plinu nositelju nema organskih spojeva, između elektroda se pojavljuje stalna struja kao posljedica ionizacije,
- organski spojevi prisutni u plinu nositelju “hvataju” elektrone (npr. molekule s halogenim atomom koji ima 7 elektrona u vanjskoj ljusci ili organske molekule s elektronegativnim funkcijskim skupinama), što rezultira redukcijom struje između sabirne anode i katode,



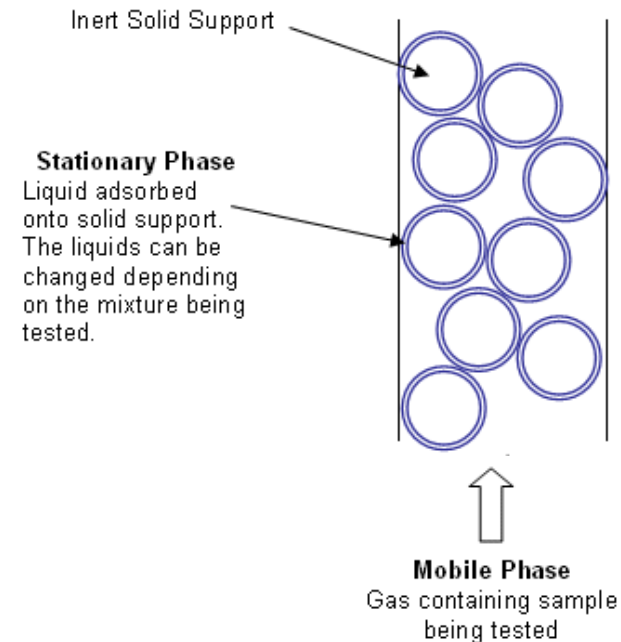
- prednosti: visoka selektivnost i osjetljivost prema organskim molekulama s elektronegativnim funkcijskim skupinama, pogodan za određivanje kloriranih pesticida,
- nedostaci: ne može se primijenjivati za detekciju amina, alkohola i ugljikovodika, potencijalno štetan (radioaktivan).

6) Tekuće stacionarne faze u GLC

- Tekuća SF vezana je ili adsorbirana na površini kapilarne kolone ili na čvrstom nosaču unutar punjene kolone,

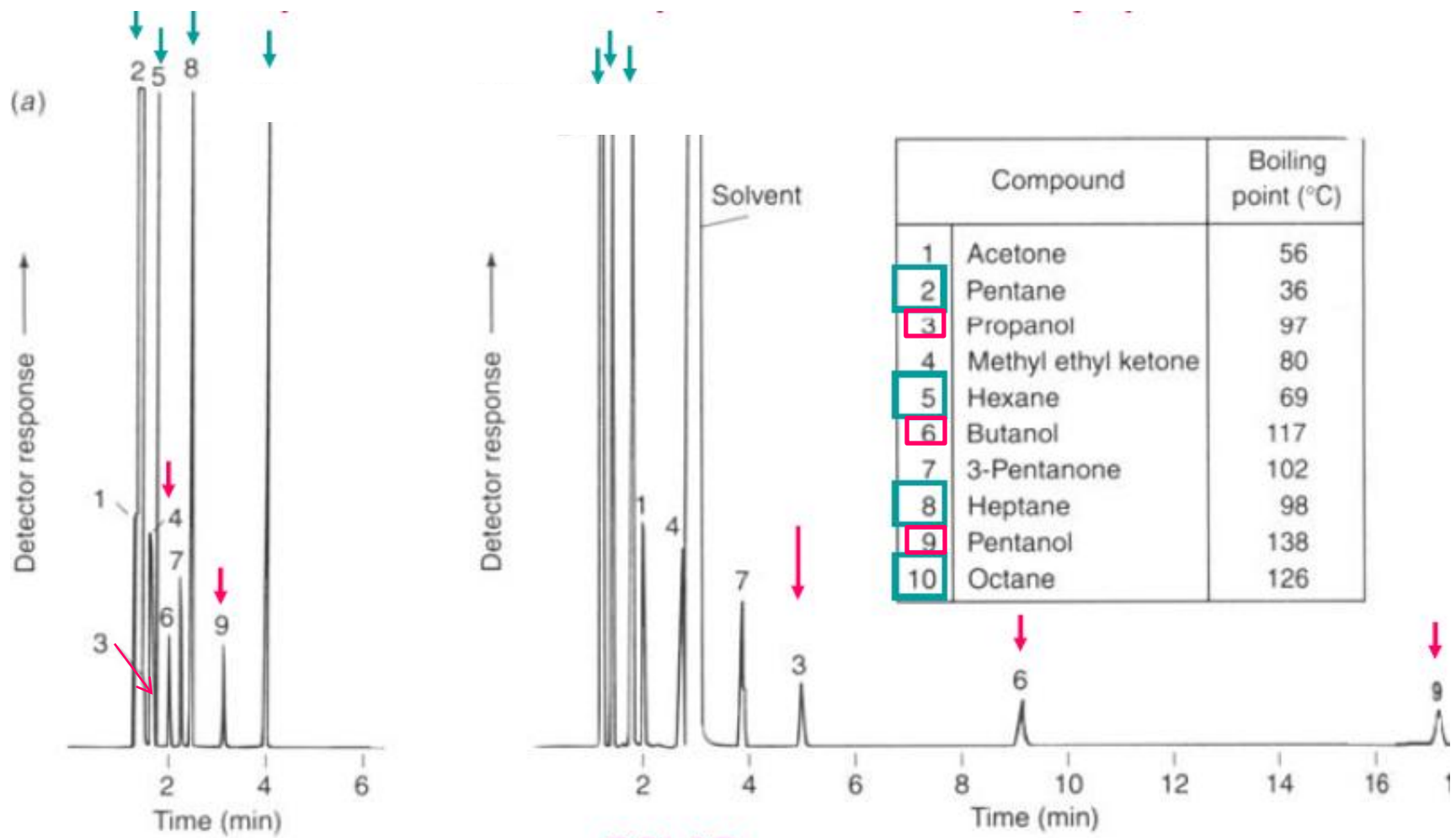
- **poželjna svojstva tekućih SF:**

- **niska hlapljivost (vrelište tekućine moralo bi biti barem 100 °C više od radne temperature kolone),**
- **termalna stabilnost,**
- **kemijska inertnost,**
- **faktor kapaciteta i diferencijalna brzina gibanja za sastojak koji se odjeljuje mora biti u pogodnom području,**



- GLC je uspješna samo ako izabrana SF daje različite omjere raspodjele za različite analizirane sastojke,
- preveliki omjeri raspodjele su nepovoljni jer se troši previše vremena za analizu, a uz premale omjere raspodjele ne dolazi do potpunog odjeljivanja sastojaka,
- optimalno vrijeme zadržavanja u koloni podrazumijeva da analizirani sastojci pokazuju određeni stupanj sličnosti (topljivosti) sa SF po principu „slično otapa slično”,
- **polarnost SF mora odgovarati polarnosti sastojaka uzoraka, te u tom slučaju redoslijed elucije ovisi o vrelištu sastojaka,**
- polarne SF sadrže –CN, –CO i –OH i poliesterske skupine, a polarni spojevi su eteri, ketoni i aldehidi,
- nepolarne SF su bazirane na ugljikovodicima i dialkil-siloksanima, a nepolarni spojevi su zasićeni ugljikovodici.

- ovisnost retencijskih vremena spojeva različite polarnosti o polarnosti SF: **polarniji sastojci smjese (3, 6 i 9) jače se vežu za polarnu SF** usljed čega se produljuje njihovo vrijeme zadržavanja na koloni (desni kromatogram); polarni se sastojci smjese brže eluiraju s kolone s nepolarnom SF:



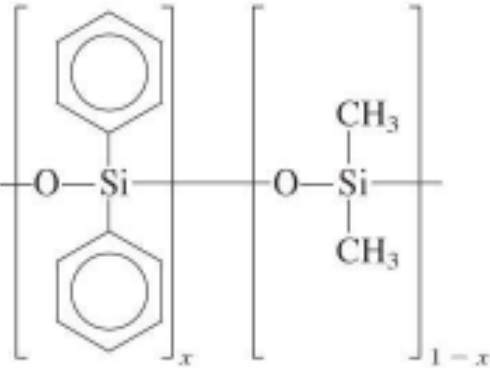
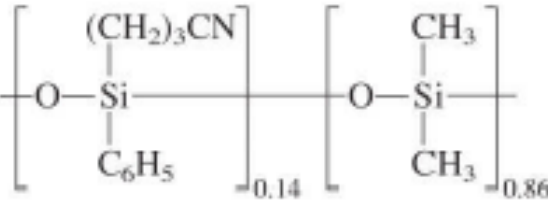
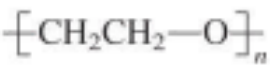
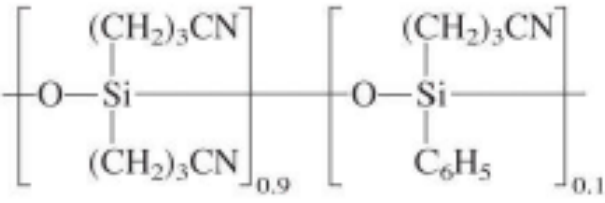
NONPOLAR

POLAR

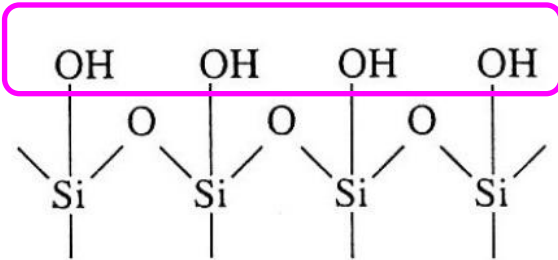
alkanes (nonpolar) are better separated on the nonpolar column – depending on boiling point

alcohols (polar) are more retained on the polar st. phase

- SF koje se najčešće koriste u GLC

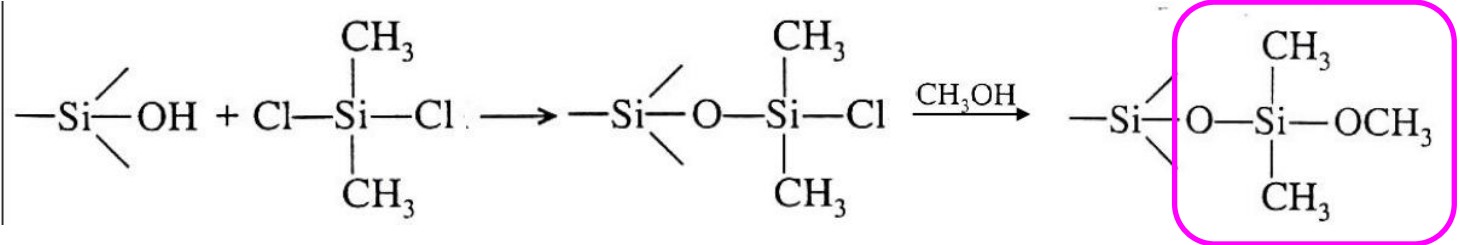
Structure	Polarity	Temperature range
 <p>(Diphenyl)_x(dimethyl)_{1-x} polysiloxane</p>	<p>$x = 0$ Nonpolar</p> <p>$x = 0.05$ Nonpolar</p> <p>$x = 0.35$ Intermediate polarity</p> <p>$x = 0.65$ Intermediate polarity</p>	<p>-60° to 360°C</p> <p>-60° to 360°C</p> <p>0° to 300°C</p> <p>50° to 370°C</p>
 <p>(Cyanopropylphenyl)_{0.14}(dimethyl)_{0.86} polysiloxane</p>	Intermediate polarity	-20° to 280°C
 <p>Carbowax (polyethylene glycol)</p>	Strongly polar	40° to 250°C
 <p>(Biscyanopropyl)_{0.9}(cyanopropylphenyl)_{0.1} polysiloxane</p>	Strongly polar	0° to 275°C

- Nepoželjna adsorpcija analita na nosač: tokom plinsko-kromatografske analize polarni ili polarizabilni sastojci adsorbiraju se na površini čvrstog nosača uzrokujući javljanje nepravilnih pikova; za adsorpciju su odgovorne silanske skupine na površini dijatomejskog silikata koje jako privlače polarne organske molekule i nastoje ih zadržati adsorpcijom,



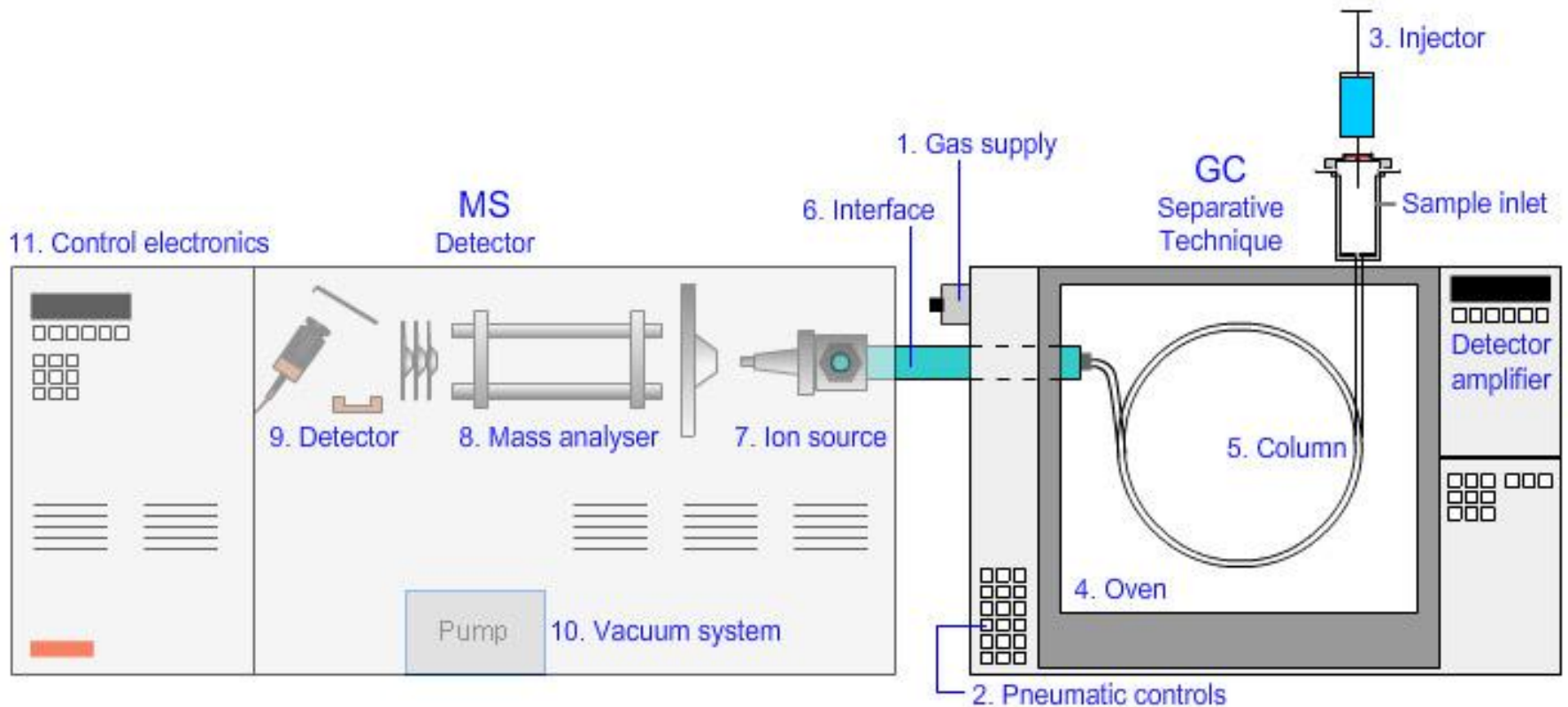
hidrolizirana površina silikata

- čvrsti se nosač može deaktivirati silanizacijom s dimetilklorsilanom; ispiranjem s MeOH klorid se zamijeni s metoksi-skupinom

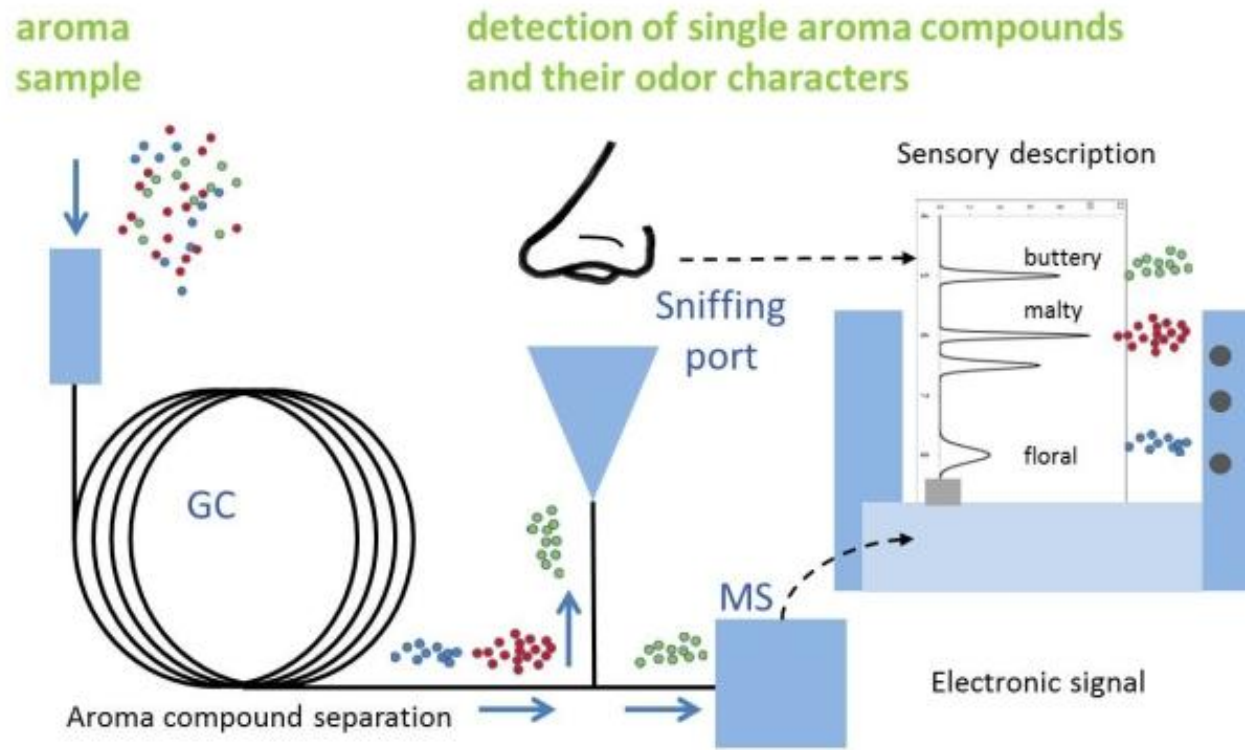


7) Primjena plinsko-tekućinske kromatografije

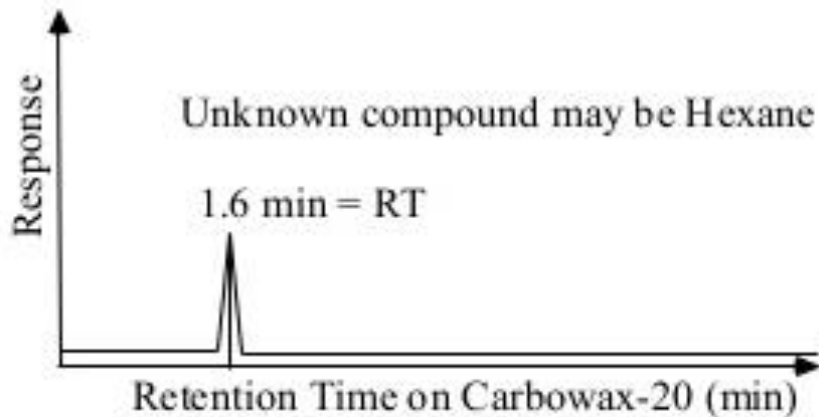
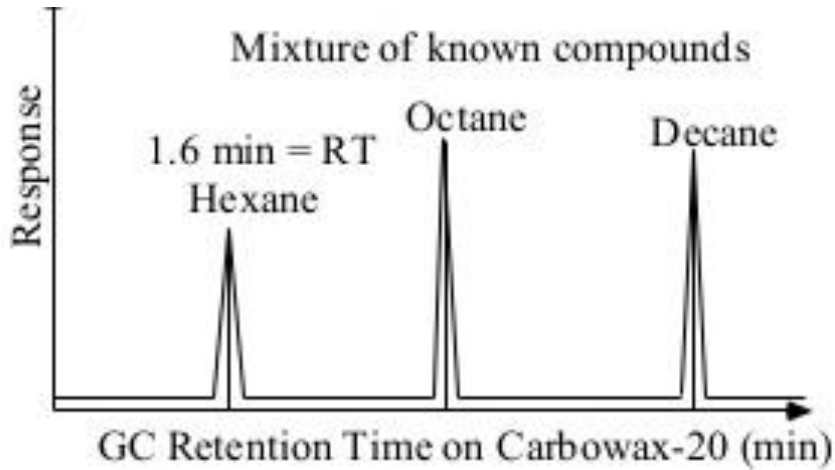
- Dvostruka funkcija: **odjeljivanje sastojaka smjese i kvalitativna identifikacija,**
- GLC, u odnosu na većinu spektroskopskih metoda, prilično je ograničena u smislu kvalitativne analize (koristi se za određivanje nečistoća u organskim spojevima - onečišćenja se pojavljuju kao dodatni pikovi),
- taj se nedostatak nastoji prevladati kombiniranjem GLC s IR, NMR ili MS (spregnute metode).



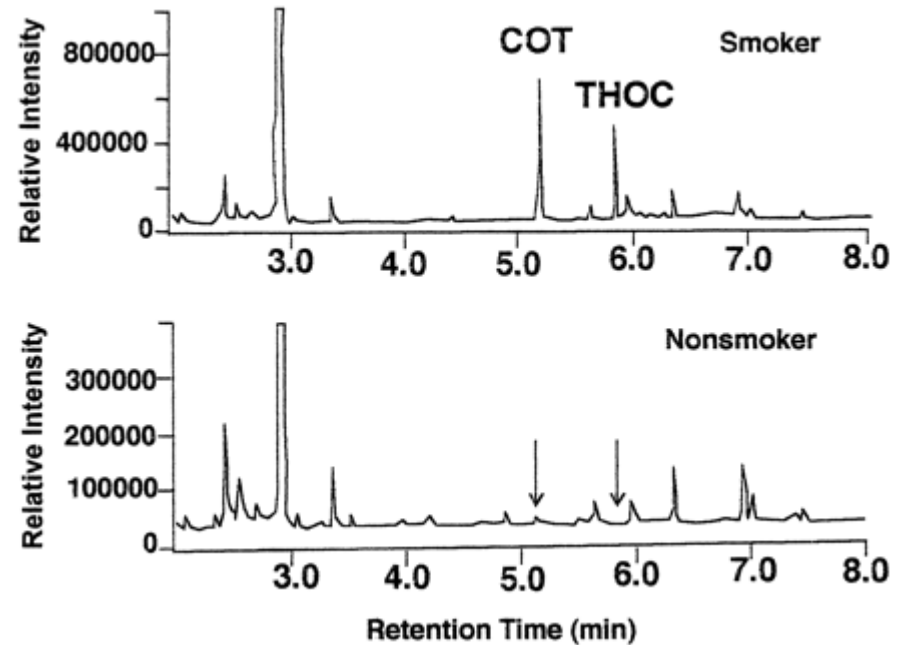
- GCO (sprega plinske kromatografije i olfaktometrije, *gas chromatography-olfactometry*): analitička metoda koja uz standardni detektor koristi i ljudski nos kao detektor; kombinacija instrumentalne i senzorske analize,



- tentativna identifikacija nepoznatih spojeva:



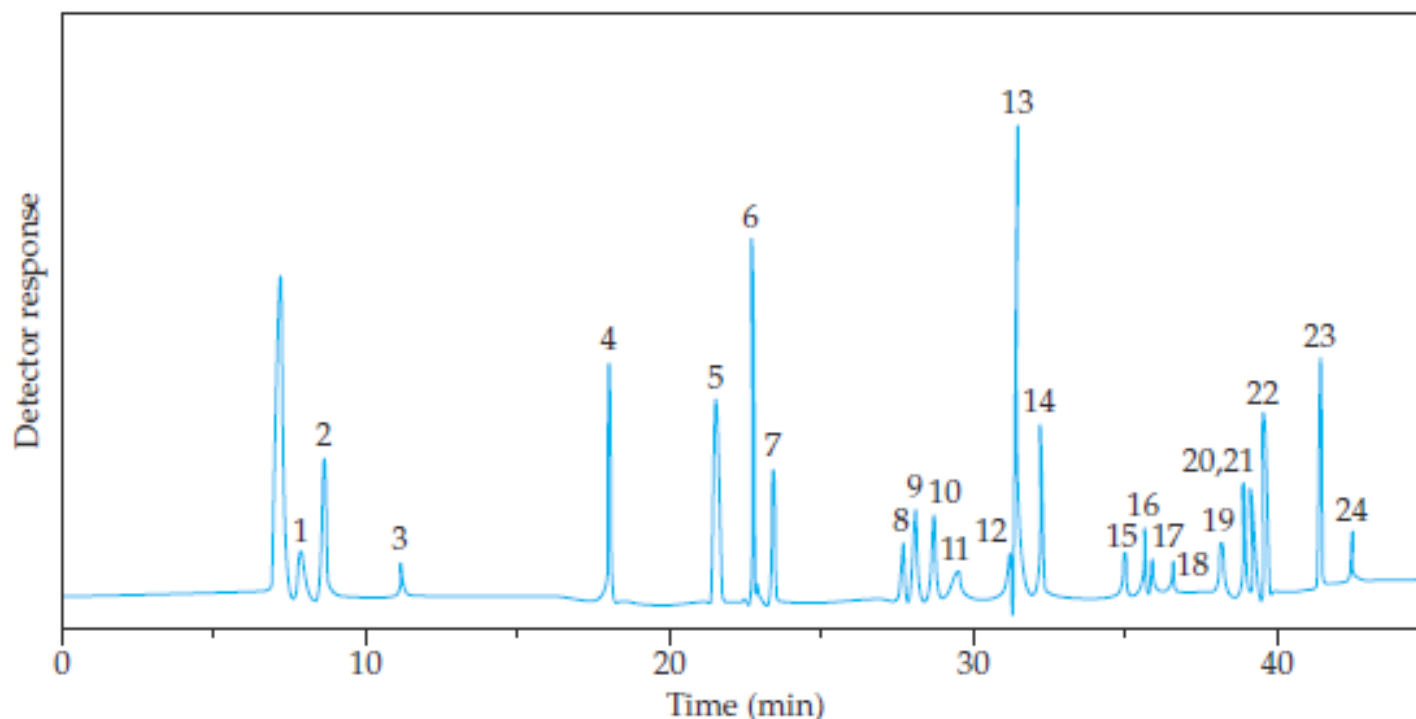
- kotinin (COT), metabolit nikotina, koristi se kao biomarker za izloženost pasivnih pušača duhanskom dimu,



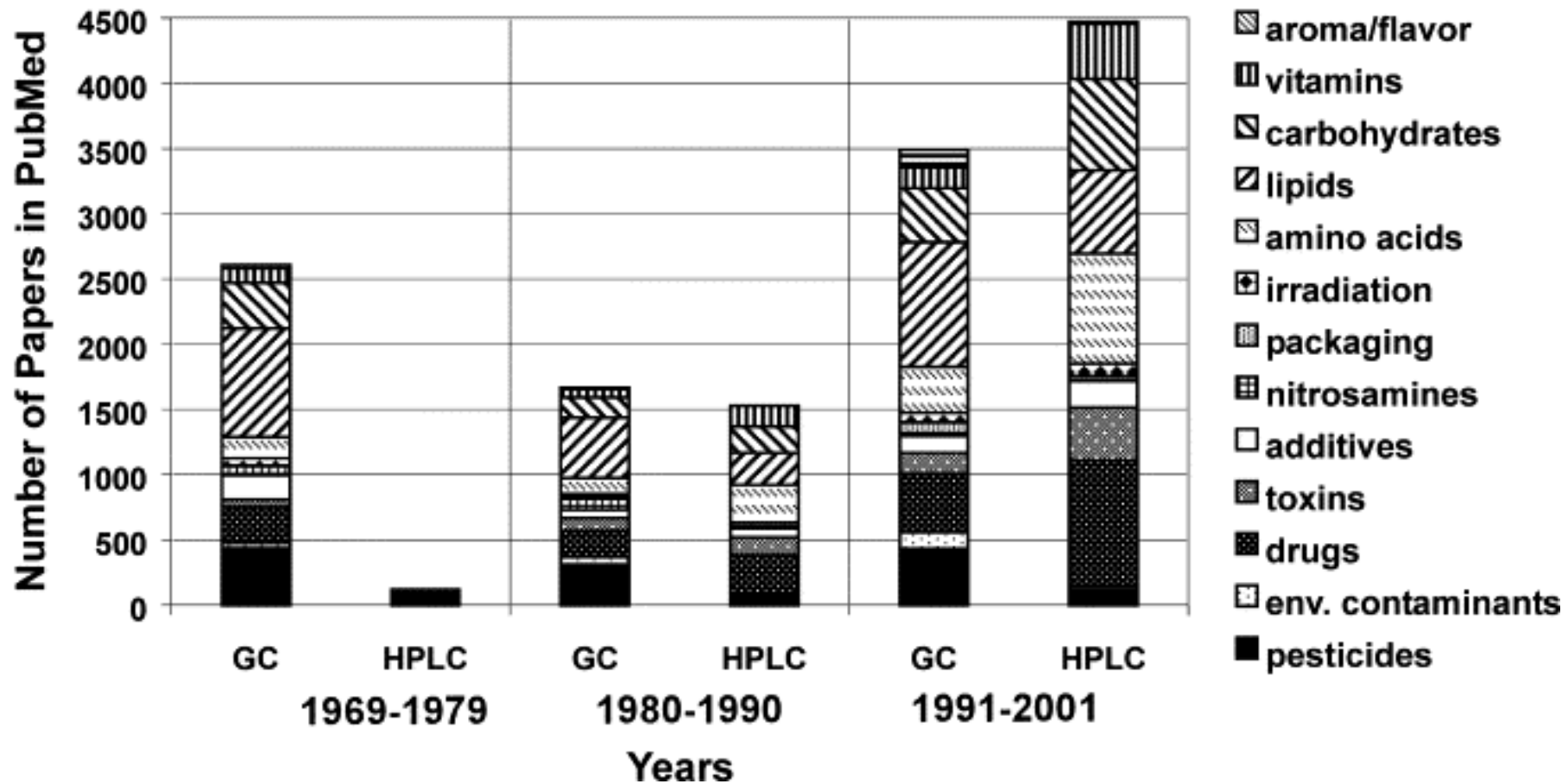
Allena J. Ji et al, A New Gas Chromatography–Mass Spectrometry Method for Simultaneous Determination of Total and Free *trans*-3'-Hydroxycotinine and Cotinine in the Urine of Subjects Receiving Transdermal Nicotine, *Clinical Chemistry* 1999, 45, 85–91.

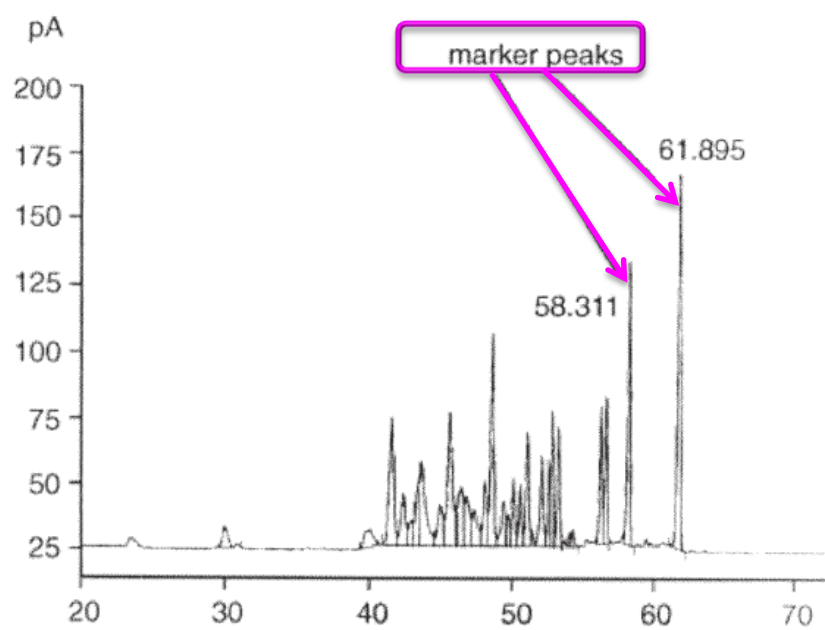
- GC-analiza hlapivih spojeva u gradskom zraku

Peak label	Name	Mass	Boiling point (°C)	Peak label	Name	Mass	Boiling point (°C)
1	Ethane	30.0694	-88.6	13	Isopentane	72.1498	30
2	Ethylene	28.0536	-103.7	14	<i>n</i> -Pentane	72.1498	36.1
3	Propane	44.0962	-42.06	15	<i>trans</i> -2-Pentene	70.134	37
4	Propylene	42.0804	-47.4	16	3-Methyl-1-Butene	70.134	20
5	Isobutane	58.123	-11.7	17	1-Pentene	70.134	30
6	<i>n</i> -Butane	58.123	-0.45	18	<i>cis</i> -2-Pentene	70.134	37
7	Acetylene	26.0378	-28.1 (sublimes)	19	2,2-Dimethylbutane	86.1766	49.7
8	<i>trans</i> -2-Butene	56.1072	0.88	20	2-Methylpentane	86.1766	62
9	1-Butene	56.1072	-6.1	21	2,3-Dimethylbutane	86.1766	58
10	Isobutene	56.1072	-6.9	22	Isoprene	68.1182	34
11	<i>cis</i> -2-Butene	56.1072	3.7	23	4-Methyl-1-Pentene	84.1608	54
12	Cyclopentane	70.134	49	24	2-Methyl-1-Pentene	84.1608	62

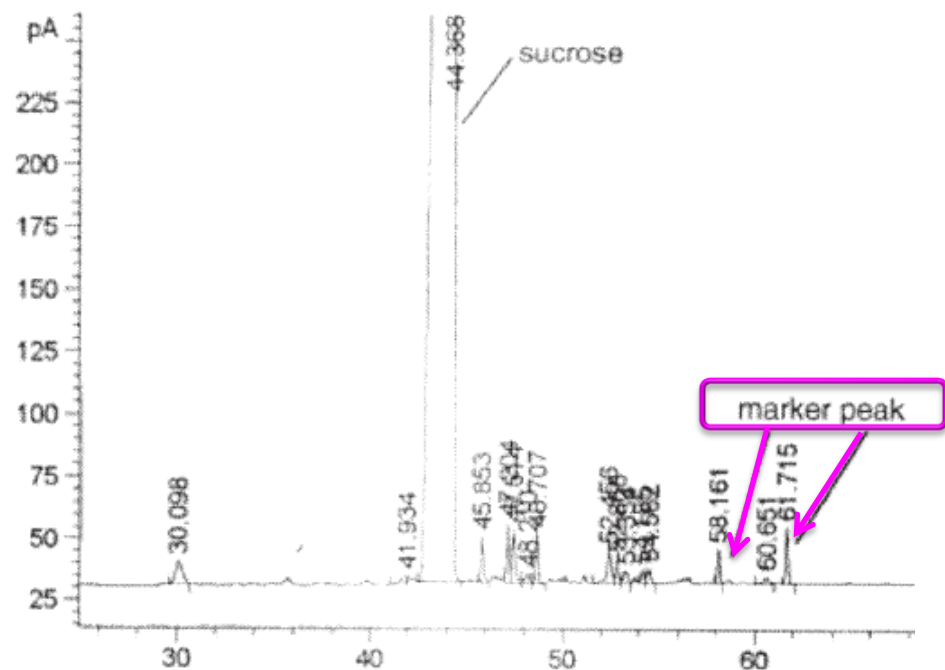


Primjena plinske kromatografije u analizi hrane





Kromatogram visokofruktoznog sirupa



Kromatogram soka od jabuke s dodanim visokofruktoznim sirupom

N. H. Low et al, Identification of Hydrolyzed Inulin Syrup and High-Fructose Corn Syrup in Apple Juice by Capillary Gas Chromatography, *Journal of AOAC International* 2001, 84, 486.

- prema direktivama EU neke tvari arome biljnog podrijetla podliježu ograničenjima zbog moguće toksičnosti (estragol, safrol i eugenol-metil-eter),

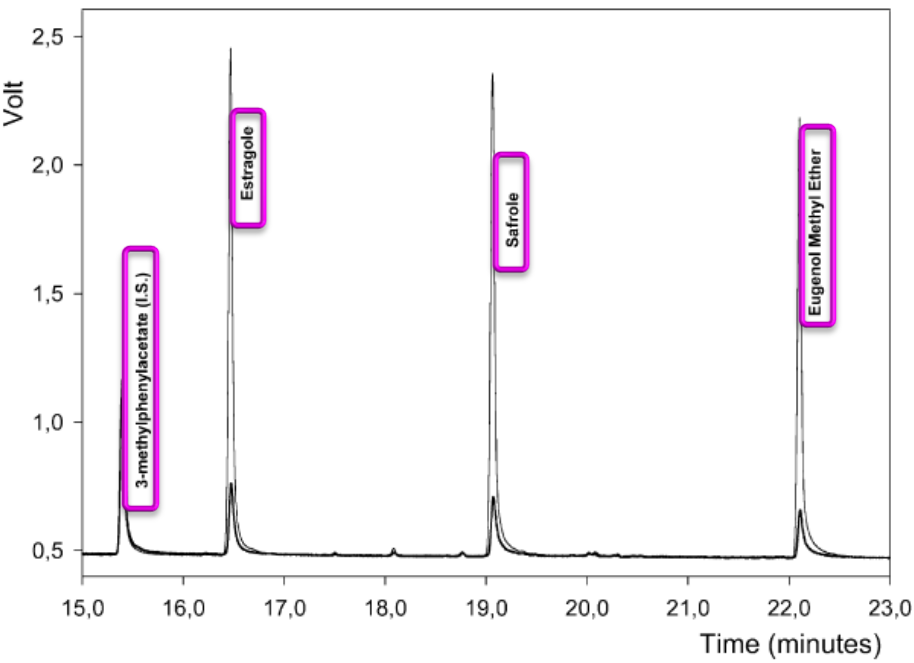


Fig. 3. Gas-chromatogram (GC-FID) of the standard solutions.

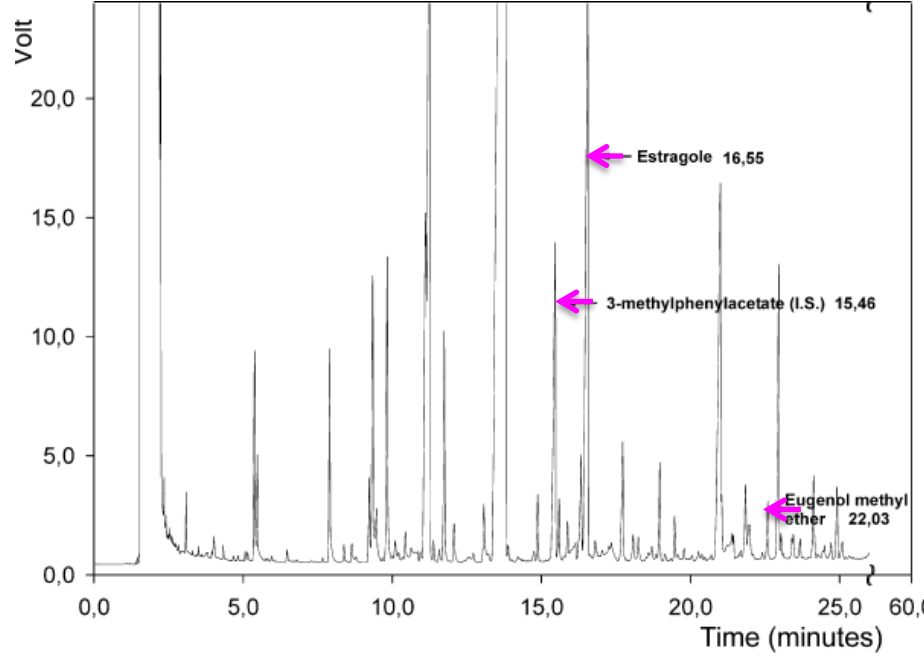


Fig. 4. Gas-chromatogram (GC-FID) of a "Pesto" sauce SDE extract.

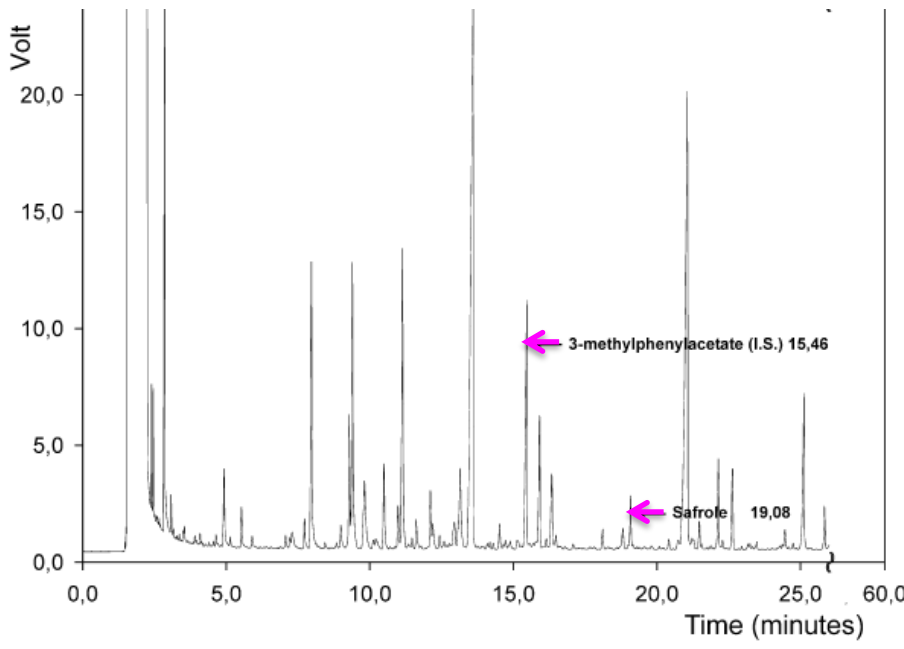
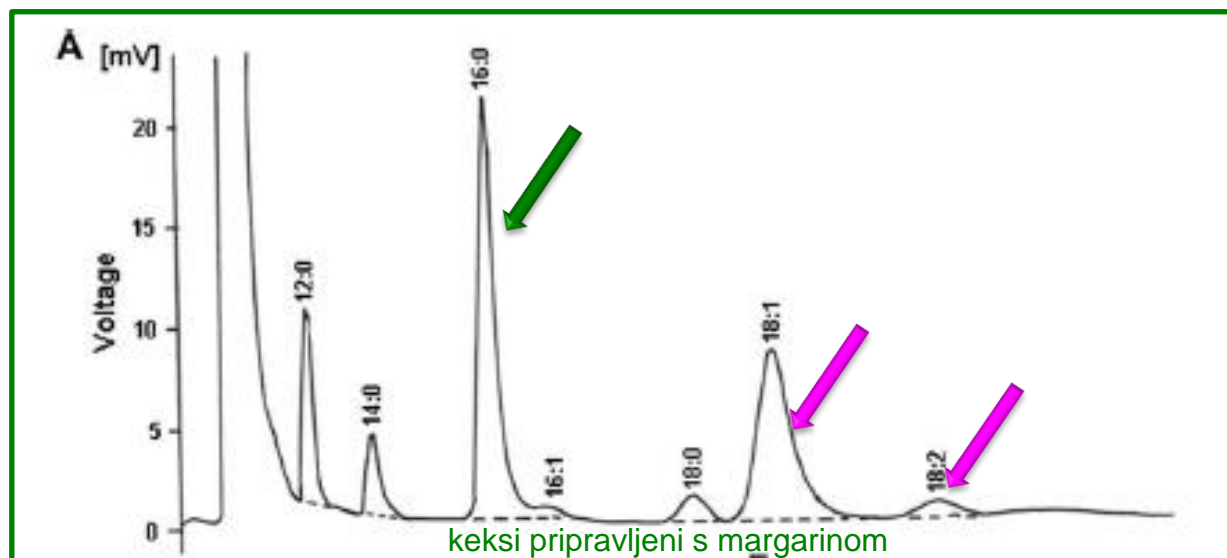


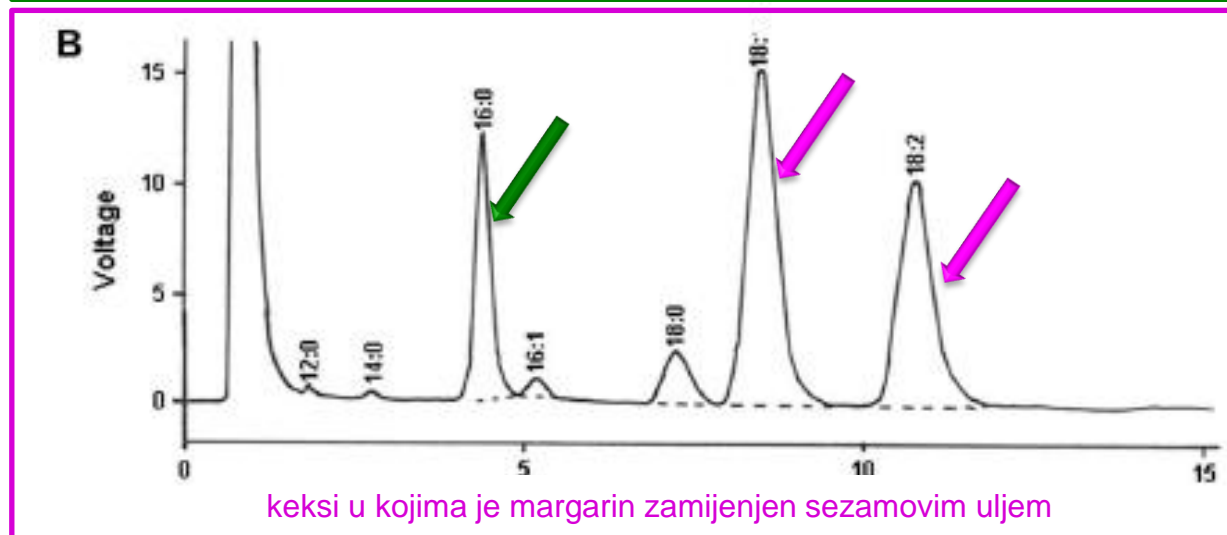
Fig. 5. Gas-chromatogram (GC-FID) of a "Vienna" sausage SDE extract.

F. Siano et al, Determination of estragole, safrole and eugenol methyl ether in food products, *Food Chemistry* 2003, 81, 469.

- zamjenom masnoća sa sezamovim uljem utječe se na okus i kvalitetu keksa,
- masno-kiselinski profil keksa s 50% sezamovog ulja je poboljšán; 2,4 puta smanjen je udio palmitinske kiseline i 5,9 puta povećán je udio esencijalnih masnih kiselina,



- 12' laurinska kiselina,
- 14' miristinska kiselina,
- 16' palmitinska kiselina,
- 16.1' palmitoleinska kiselina,
- 18' stearinska kiselina,
- 18.1' oleinska kiselina,
- 18.2' linoleinska kiselina



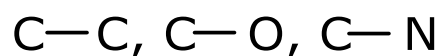
- Prenosivi plinski kromatograf (mini GC):
 - koristi zrak kao plin nositelj,
 - brza analiza,
 - jednostavno korištenje,
 - analiza alkohola, aldehida, aromatskih ugljikovodika, karboksilnih kiselina, ketona, estera, etera i nitrila.



INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA

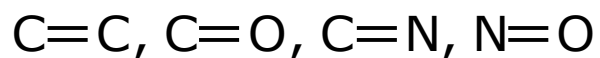
(1. seminar)

- Položaj apsorpcijskih maksimuma određen je jakošću veza i masom vezanih atoma
- Jača veza i manja masa vezanih atoma uzrokuju višu frekvenciju apsorpcije, odn. signal je pomaknut u više polje



$$1300 - 800 \text{ cm}^{-1}$$

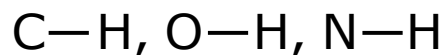
} područje otiska prsta



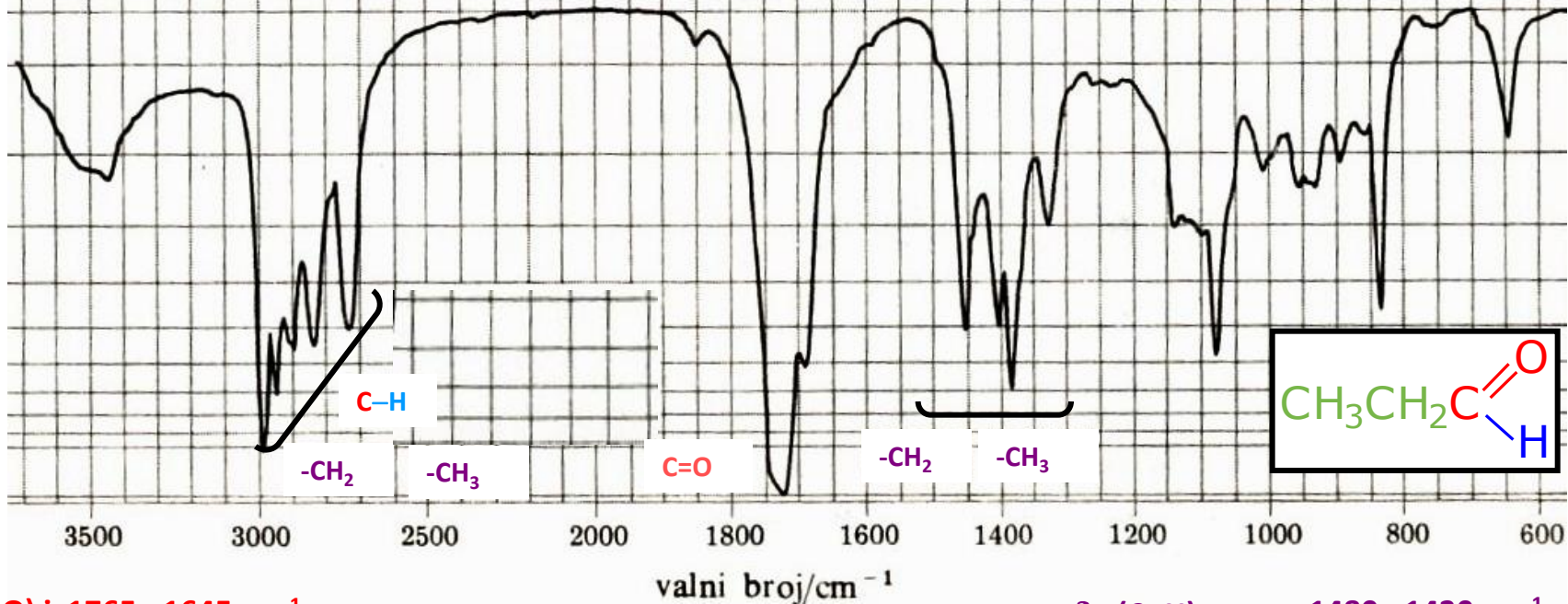
$$1900 - 1500 \text{ cm}^{-1}$$


$$2300 - 2000 \text{ cm}^{-1}$$

} područje funkcijskih skupina



$$3800 - 2700 \text{ cm}^{-1}$$



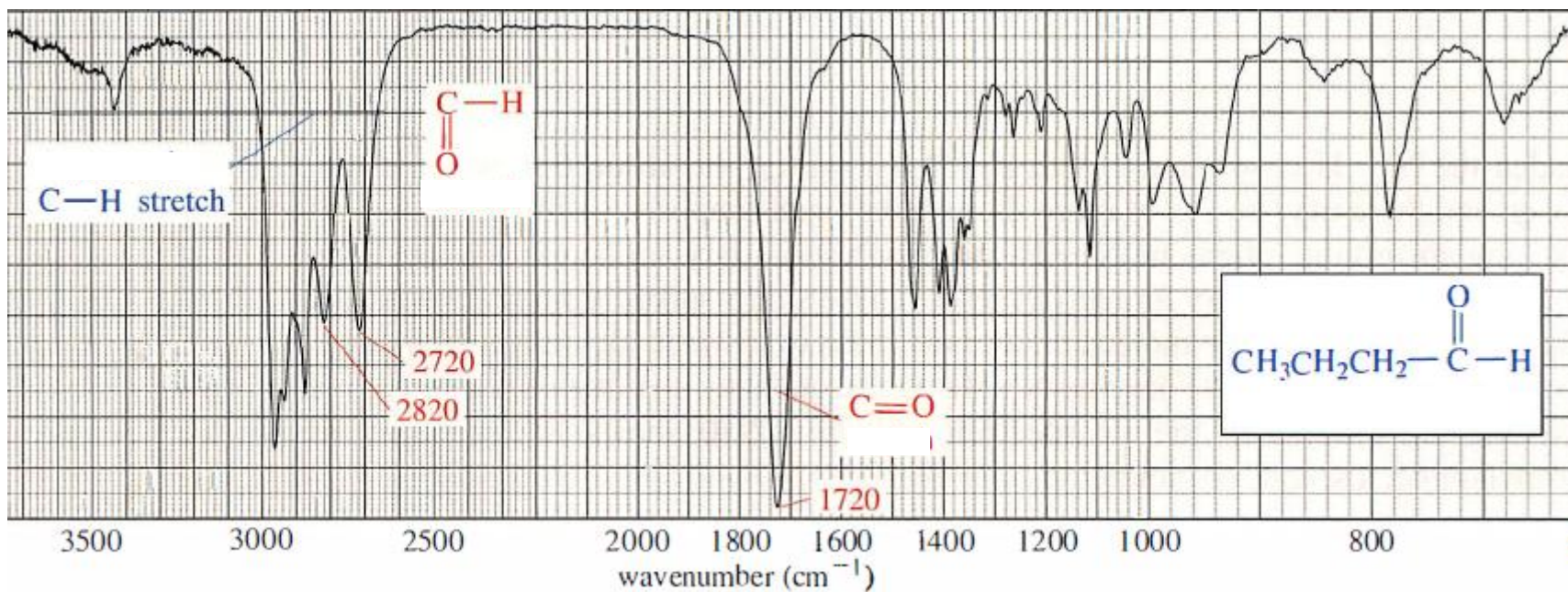
$\nu(\text{C=O})$ j 1765 - 1645 cm⁻¹

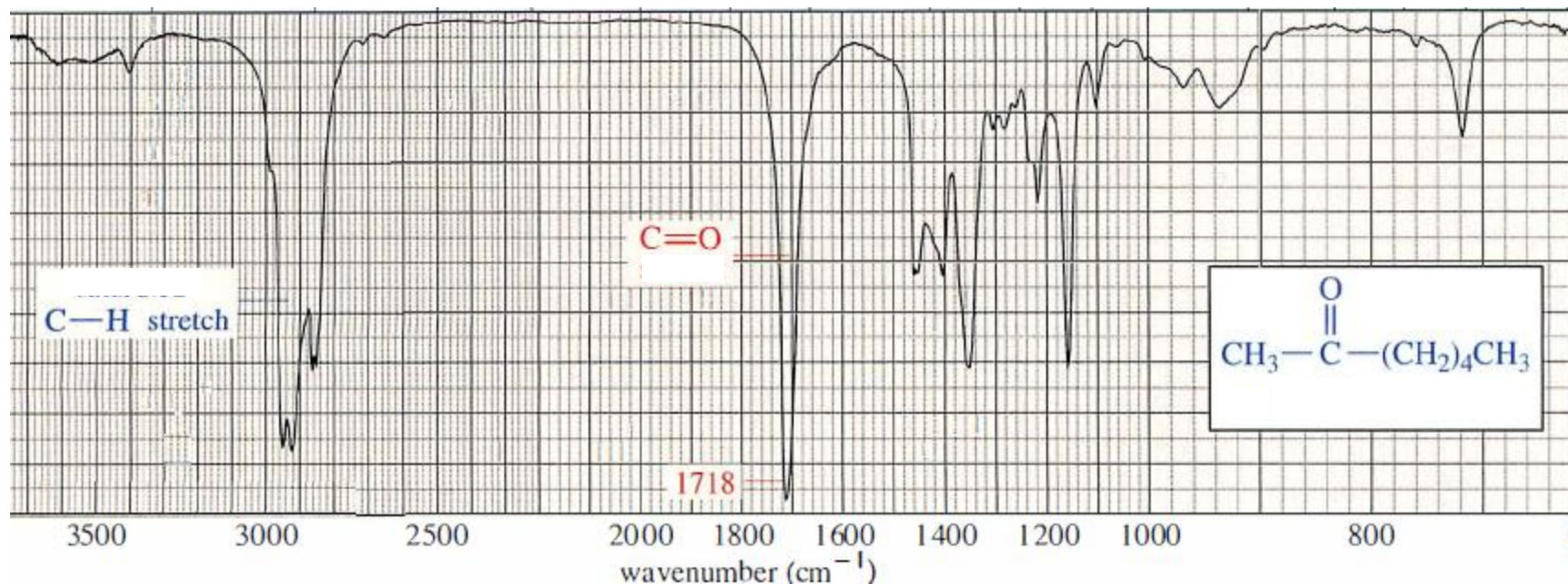
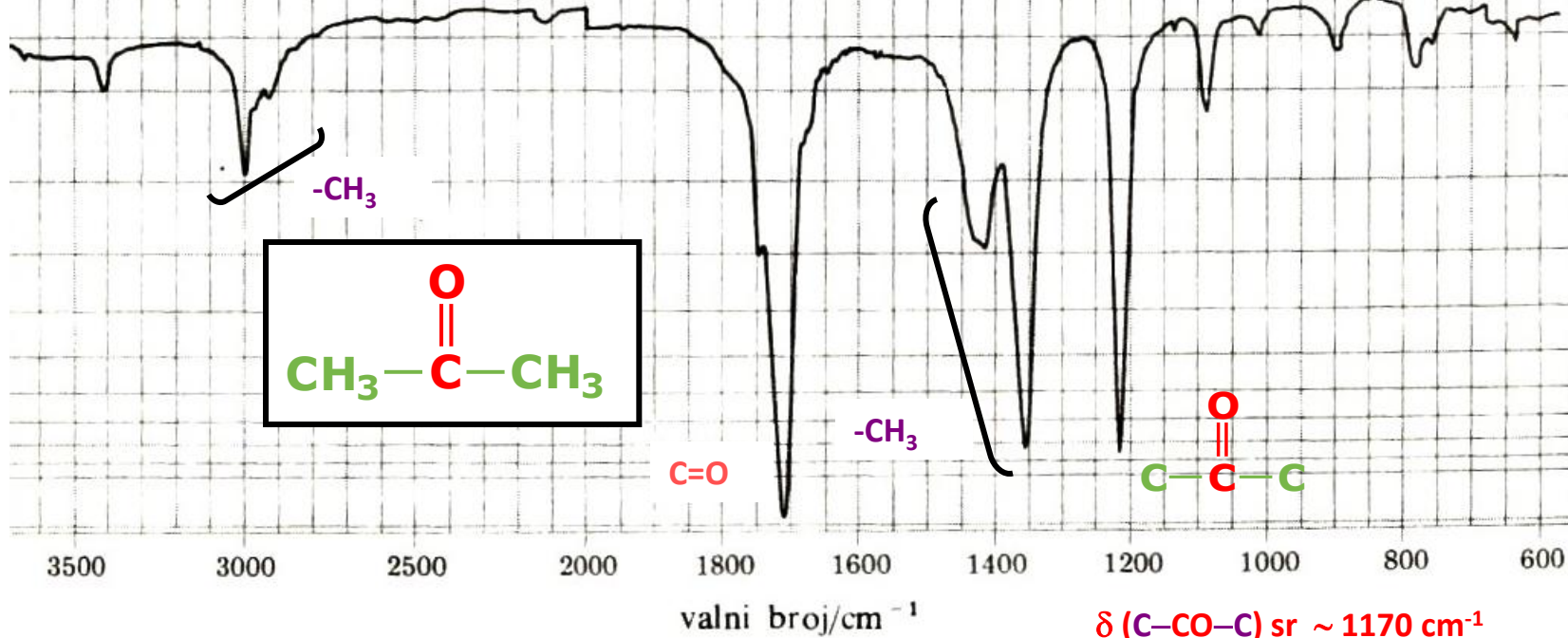
$\nu(\text{C-H})$ sr 3000 - 2850 cm⁻¹

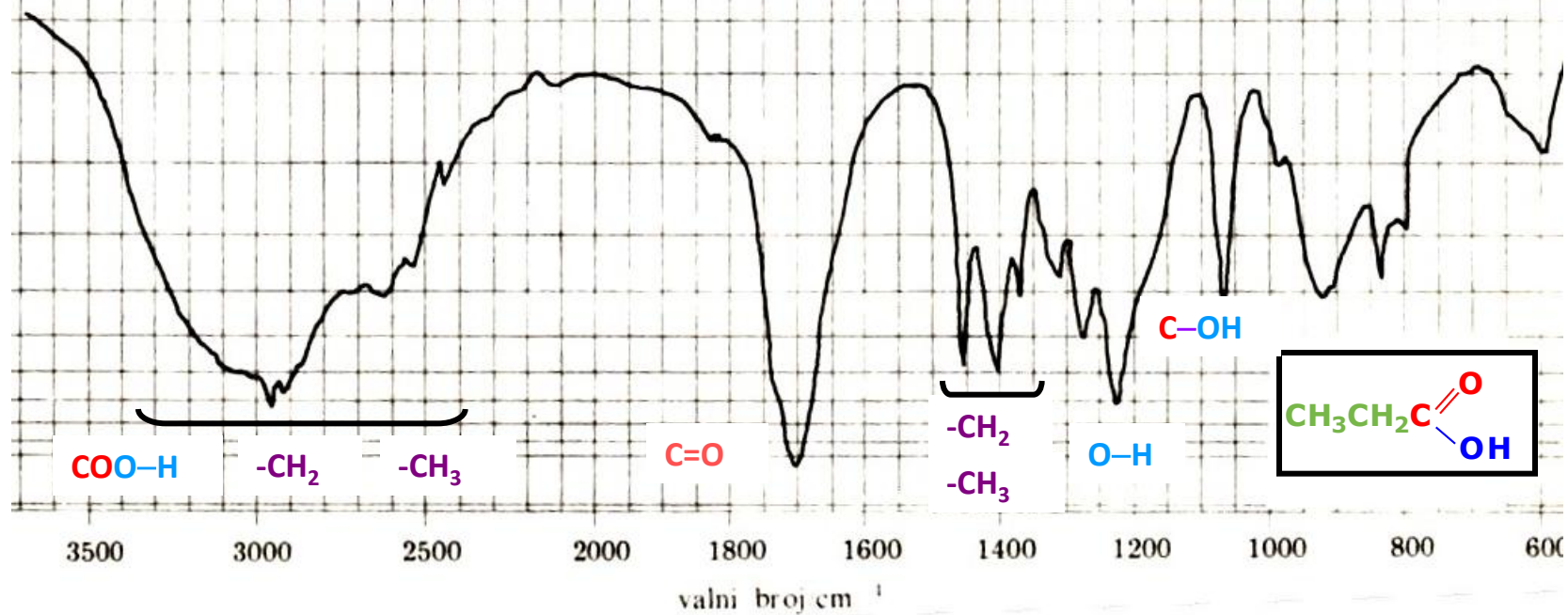
$\delta_{\text{as}}(\text{C-H})$ sr 1480 - 1430 cm⁻¹

$\nu(\text{C-H})$ sr 2850 - 2720 cm⁻¹

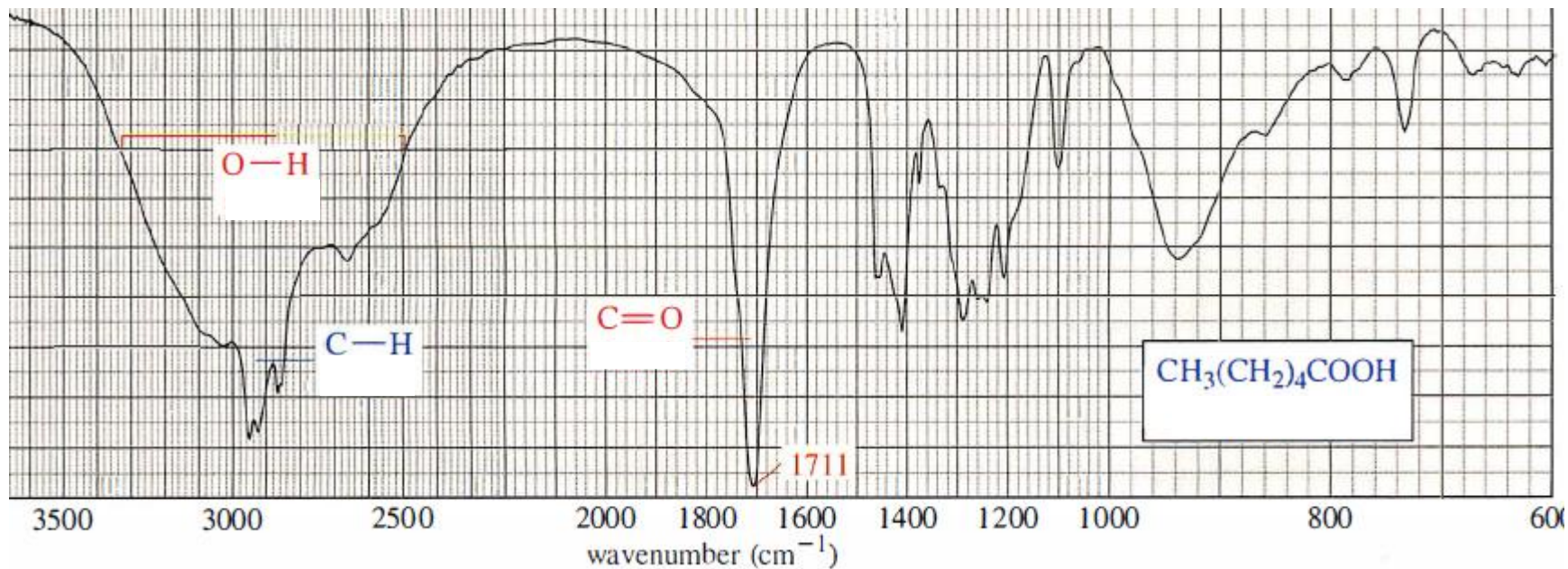
$\delta_{\text{s}}(\text{C-H})$ sr 1395 - 1350 cm⁻¹

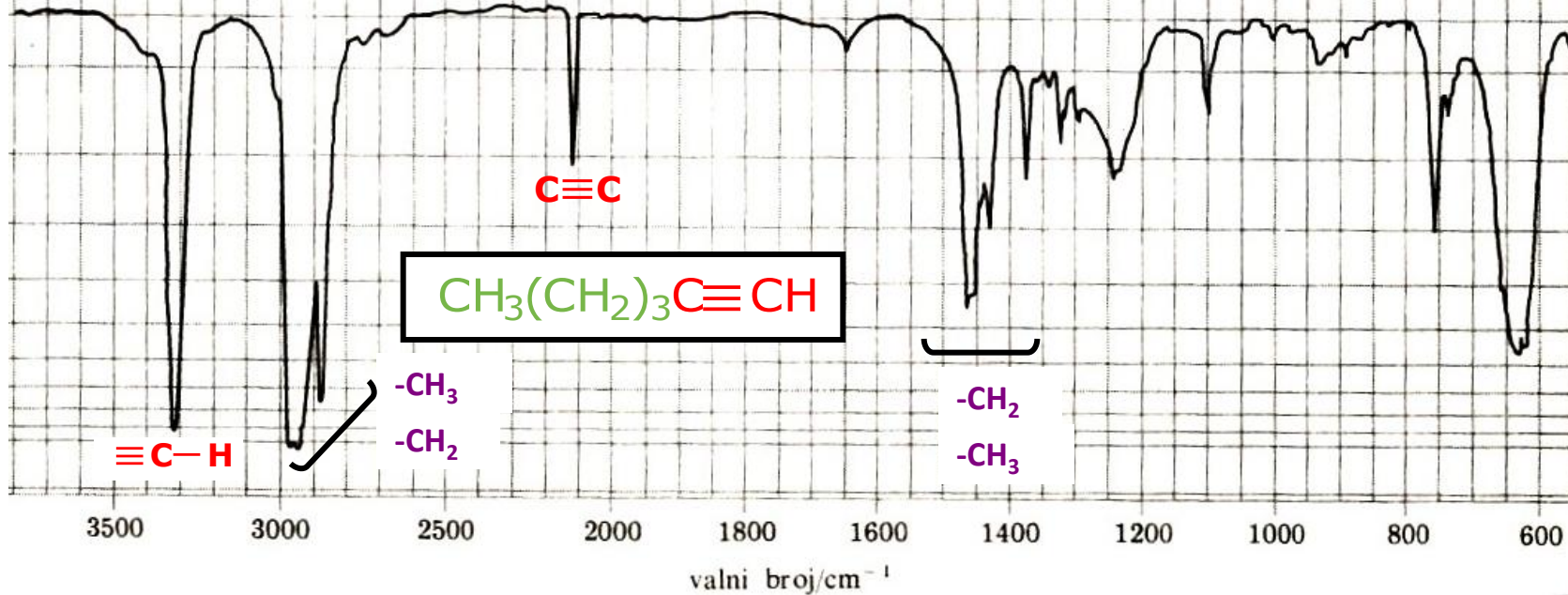






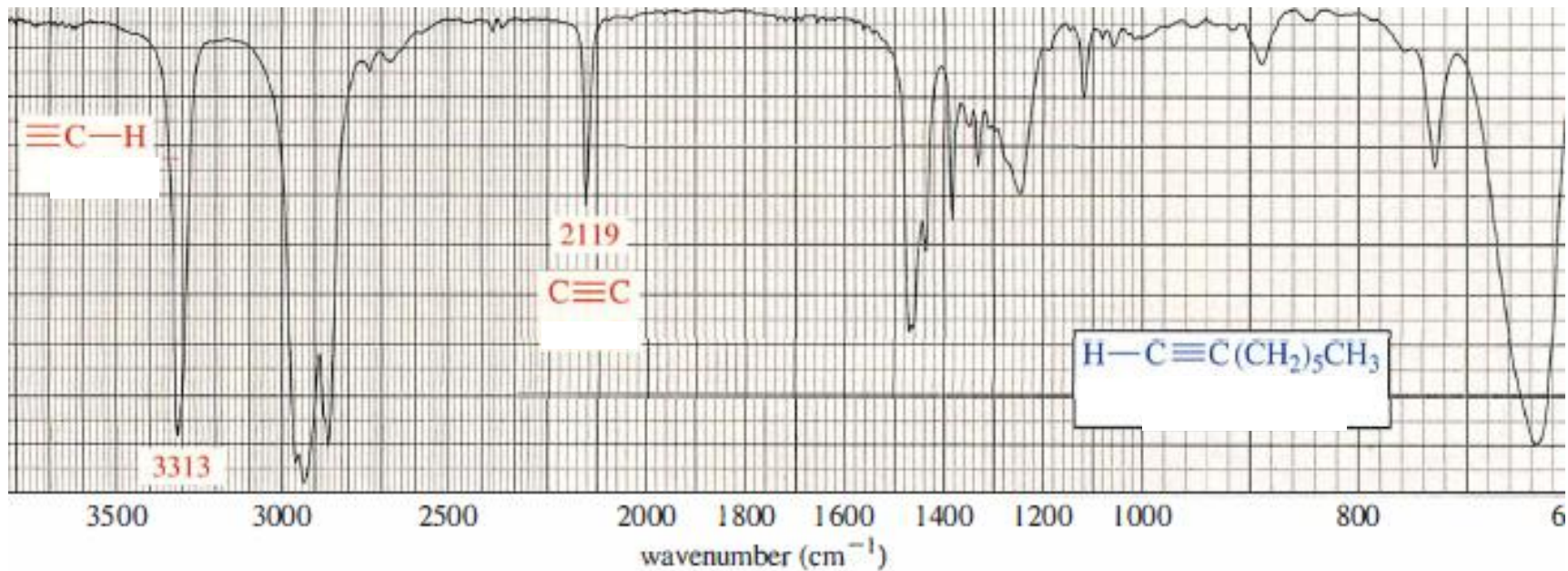
$\nu(\text{COO-H})$ š 3550 – 2500 cm^{-1}

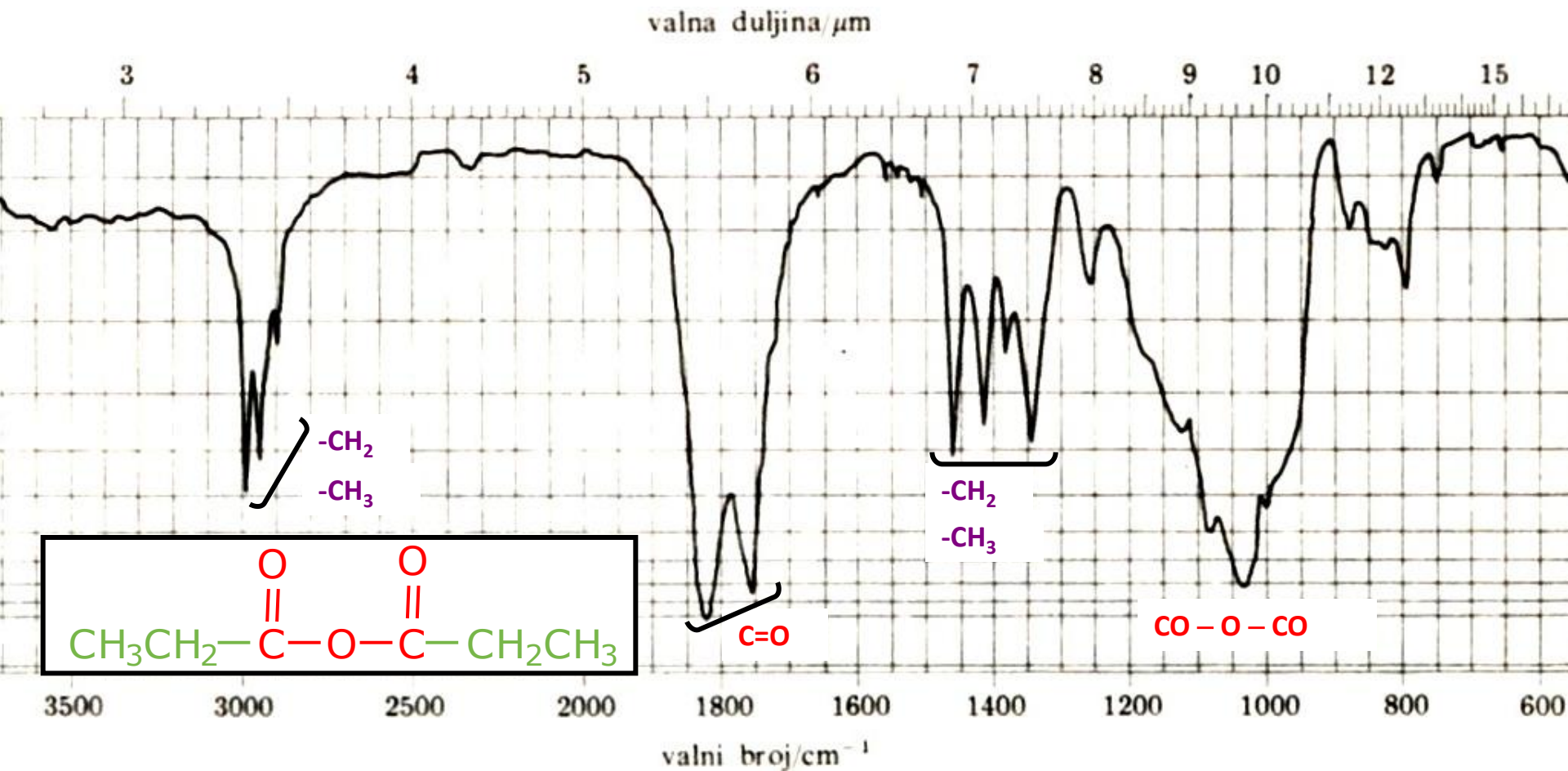




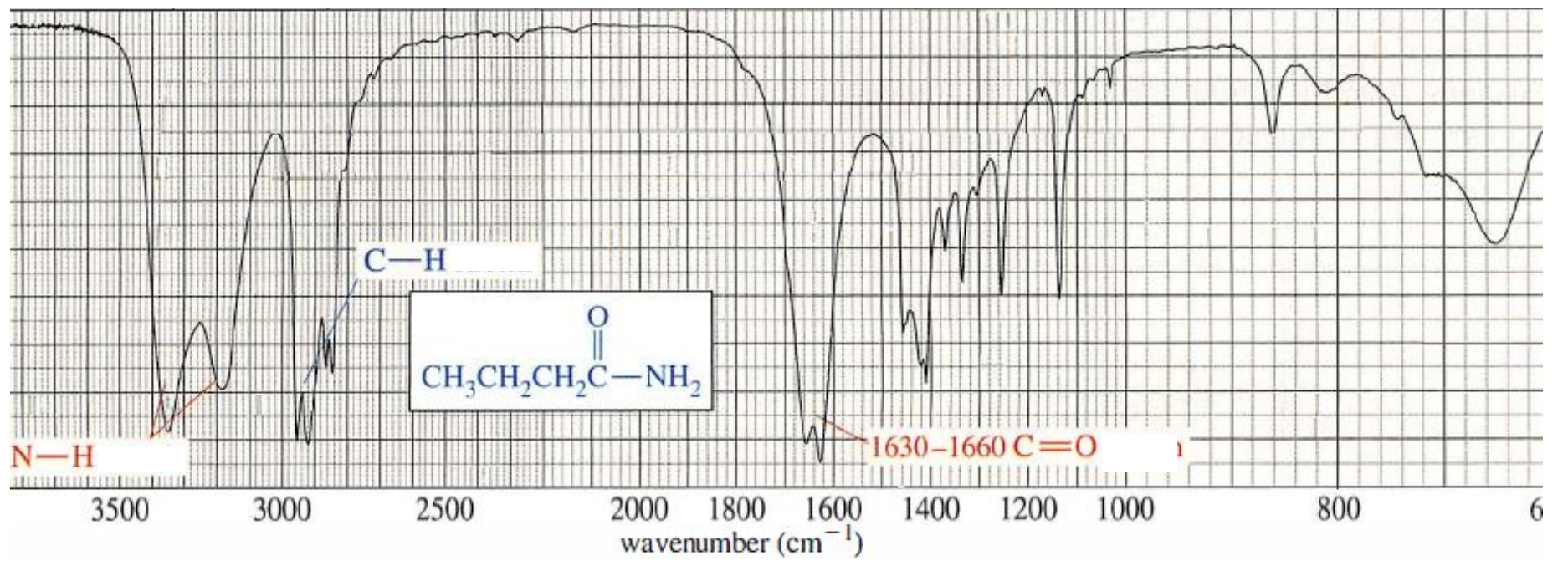
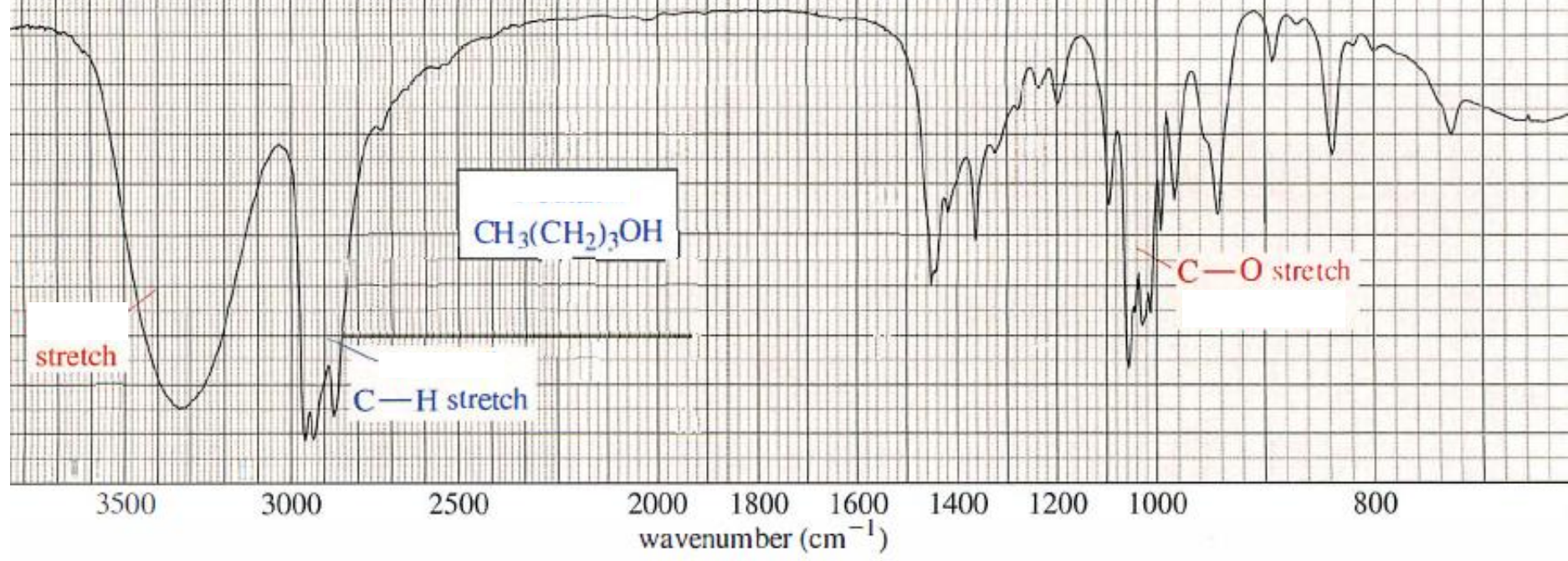
$\nu(\equiv\text{C}-\text{H})$ 3400 - 3250 cm⁻¹

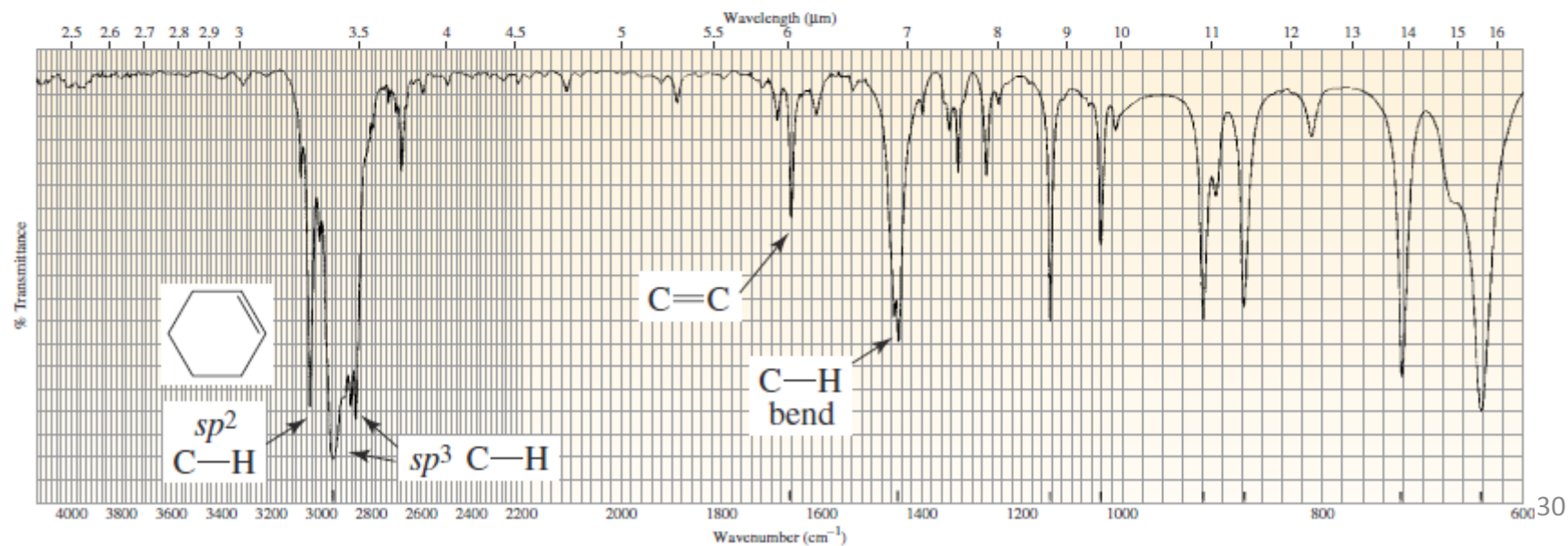
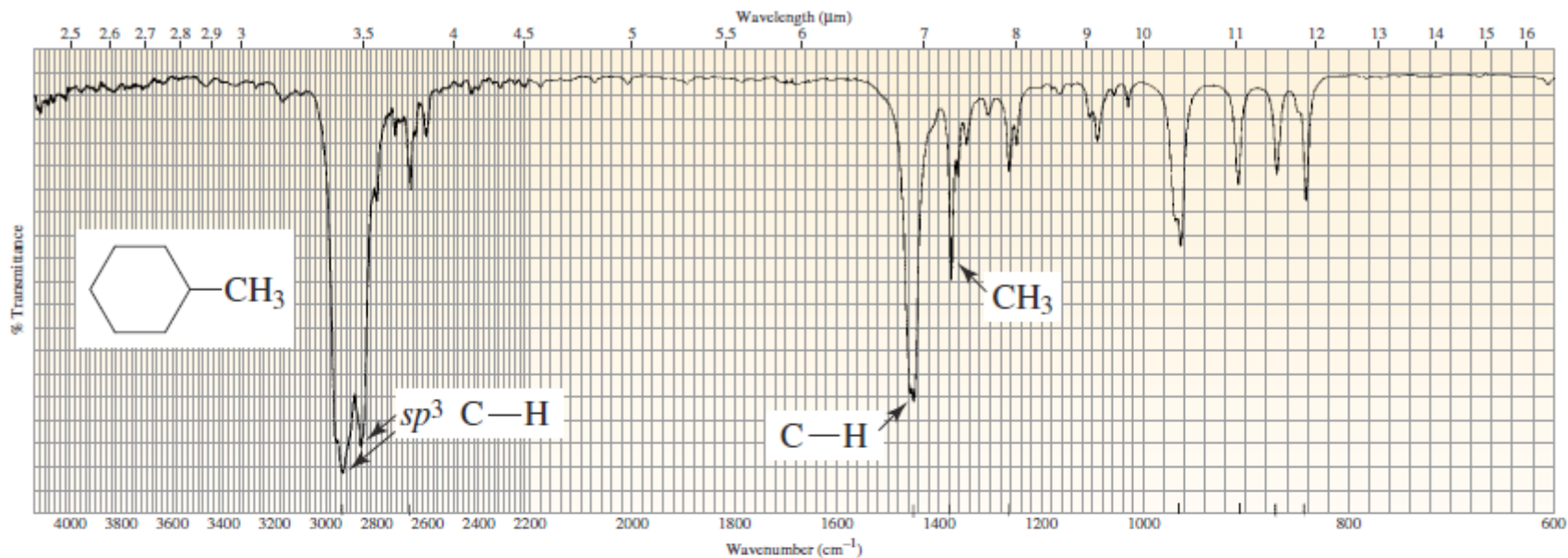
$\nu(\text{C}\equiv\text{C})$ 2260 - 2100 cm⁻¹

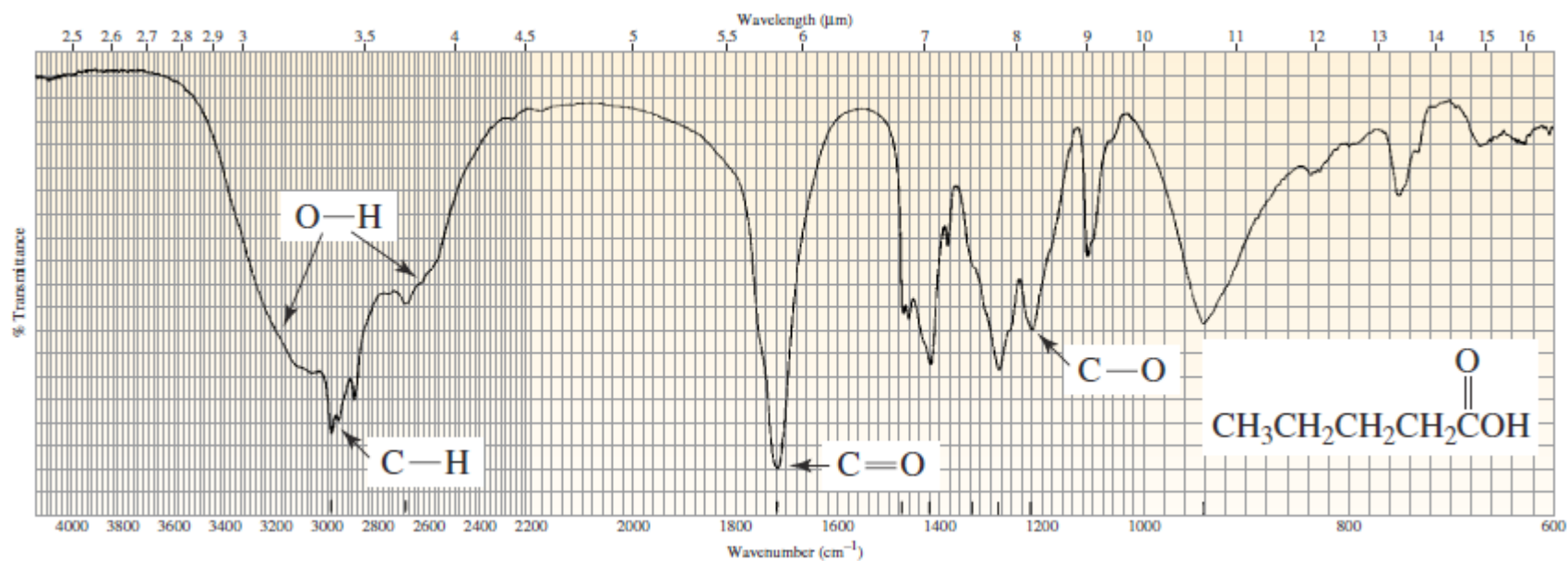
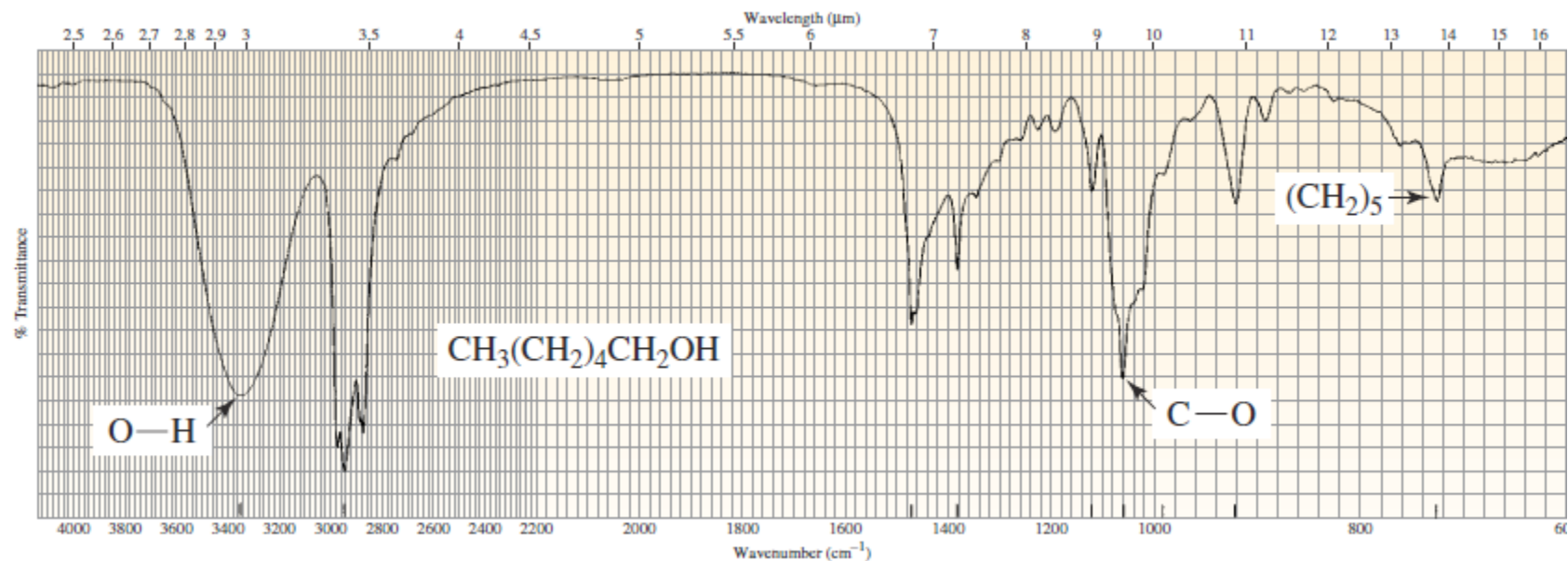


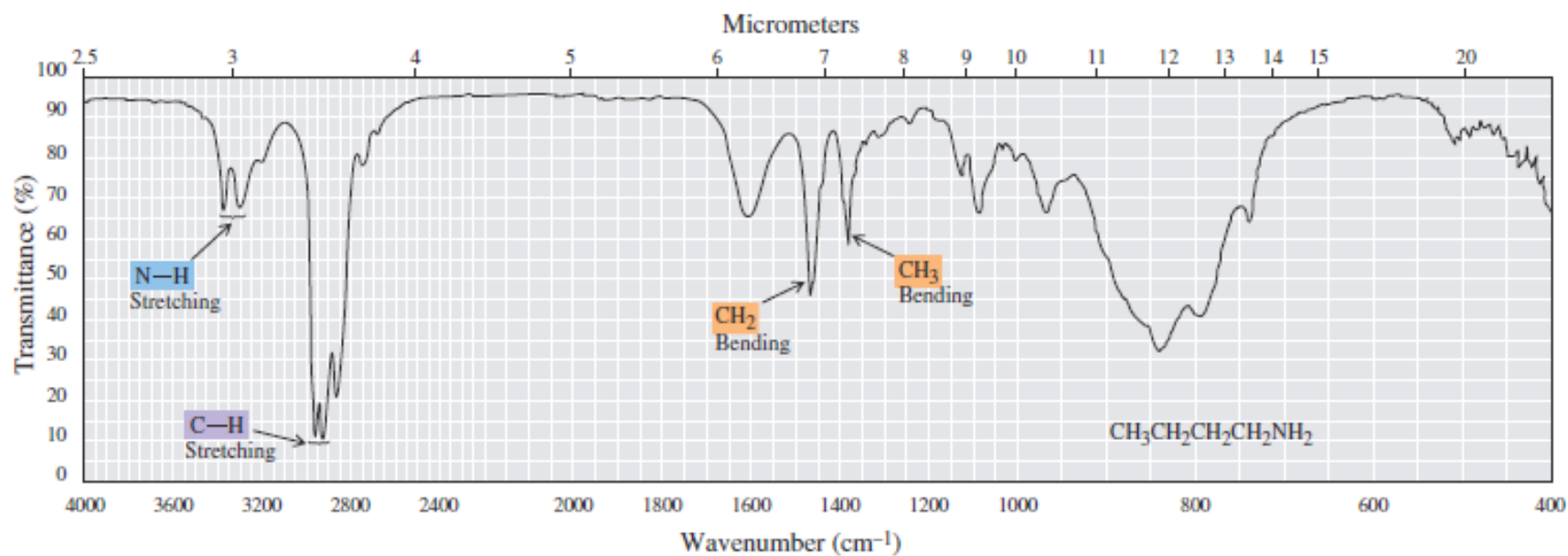
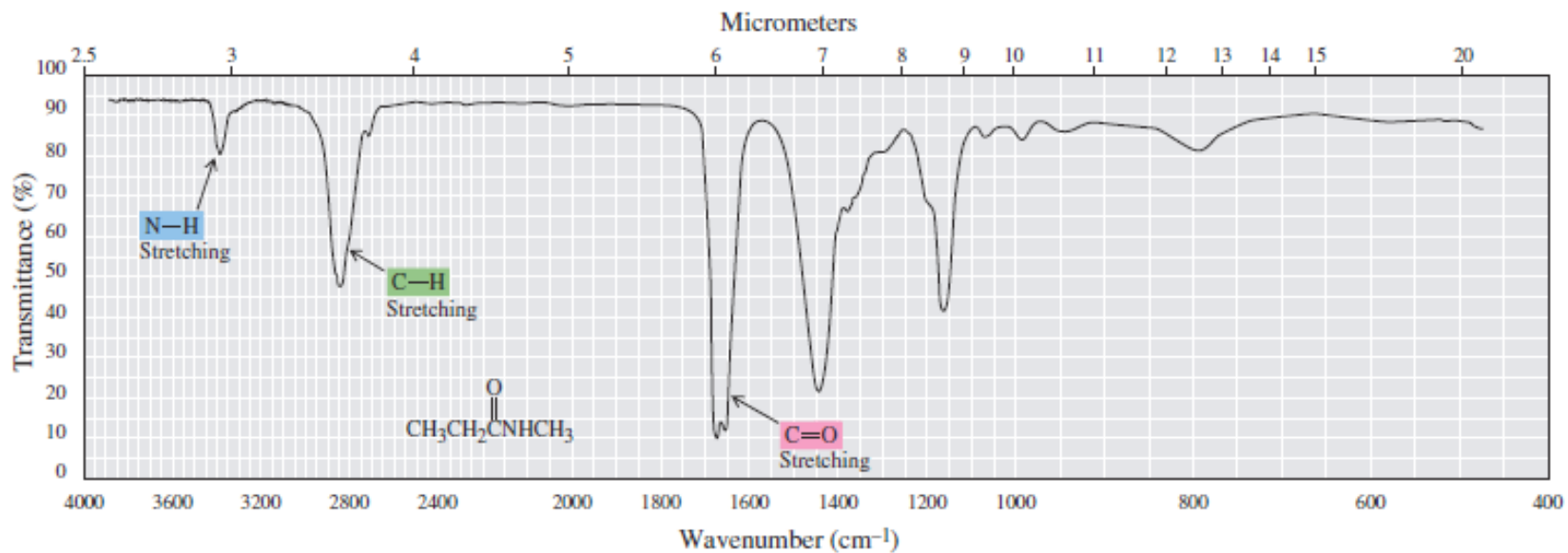


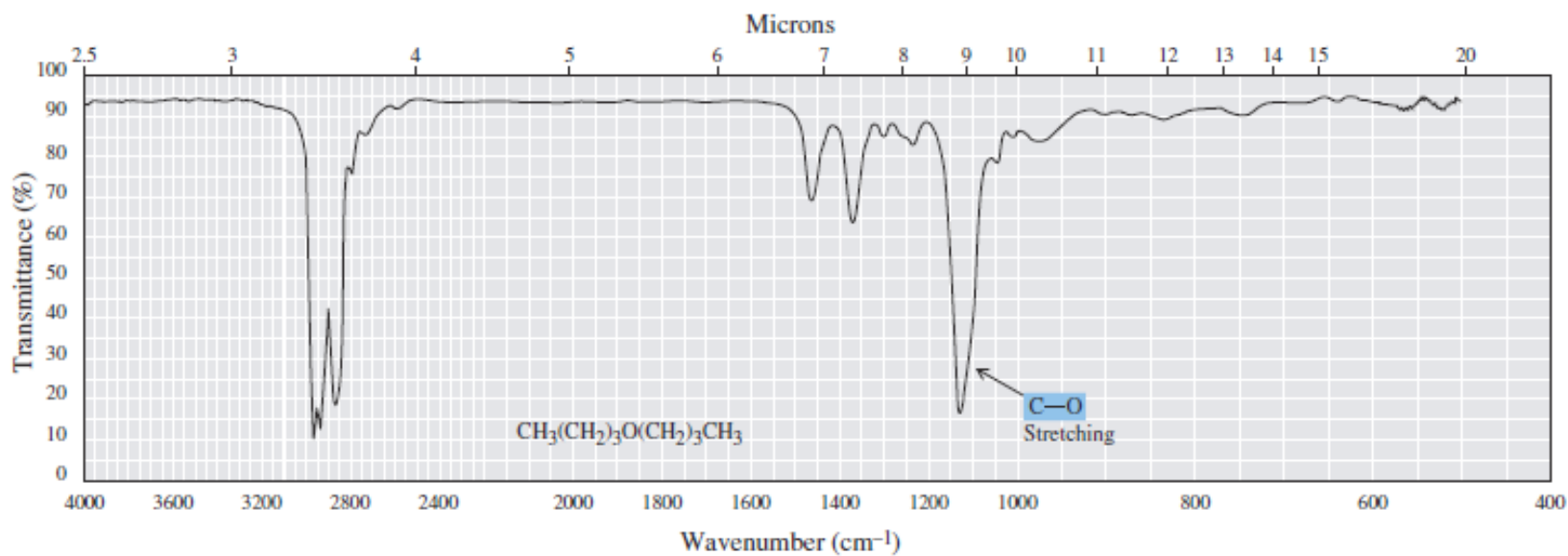
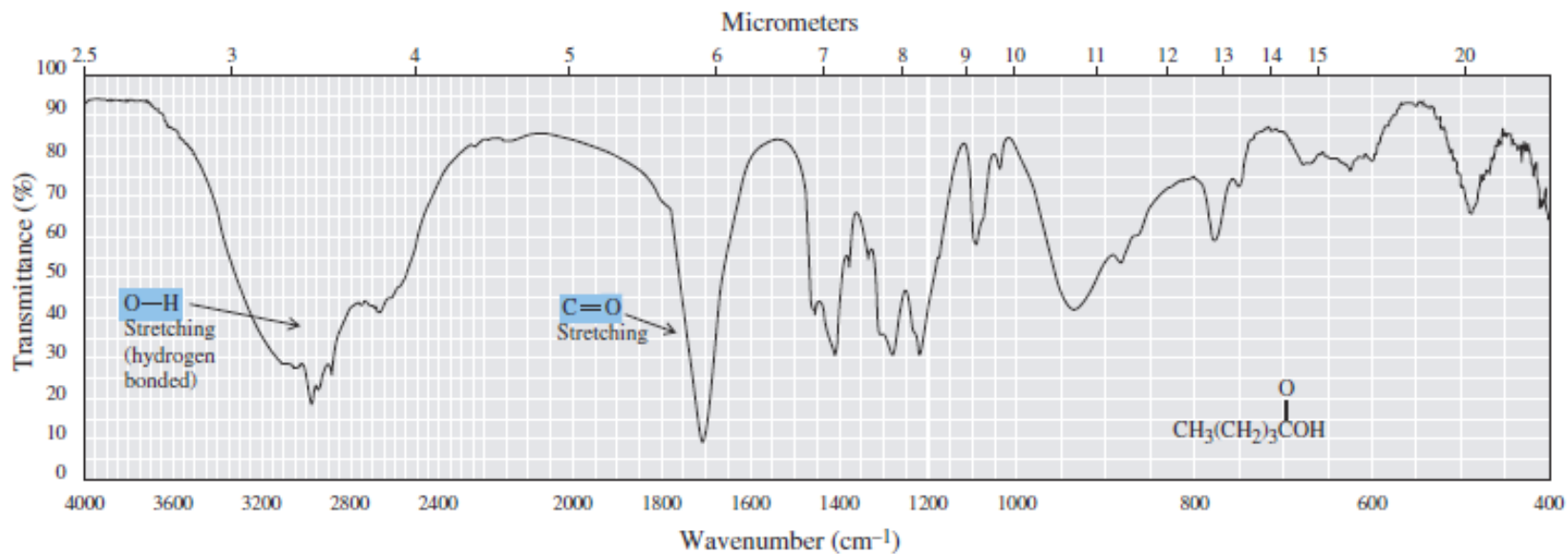
δ (CO - O - CO) 1047 cm⁻¹





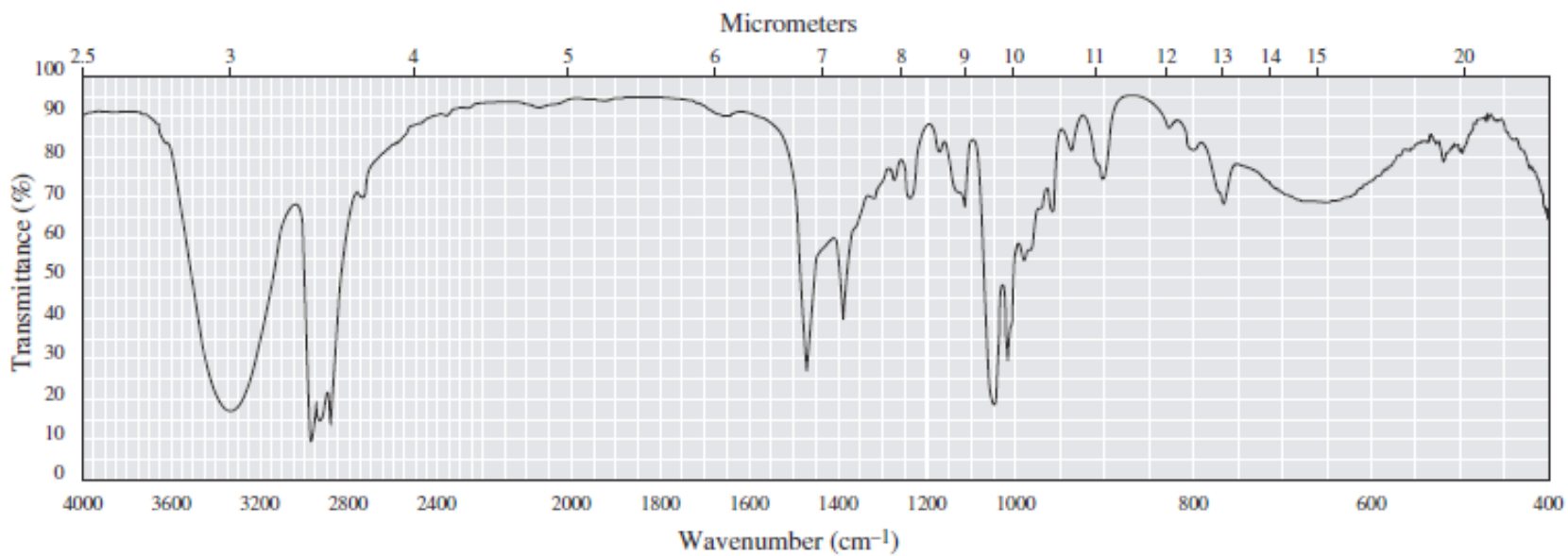
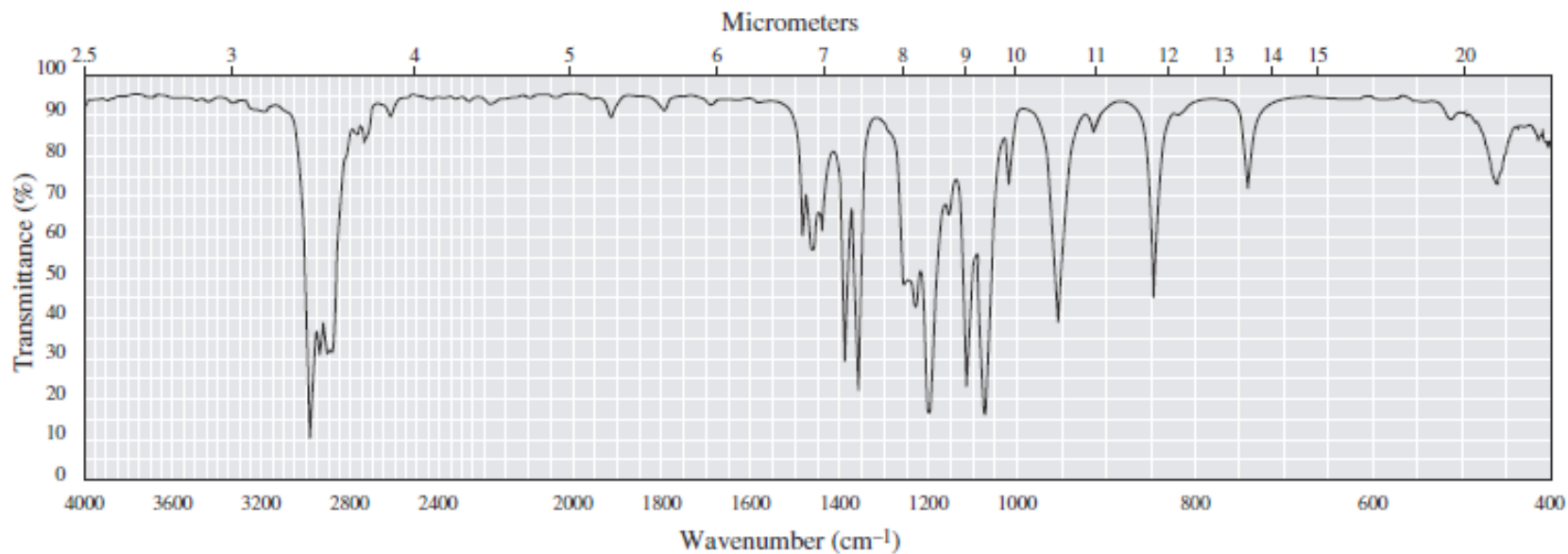






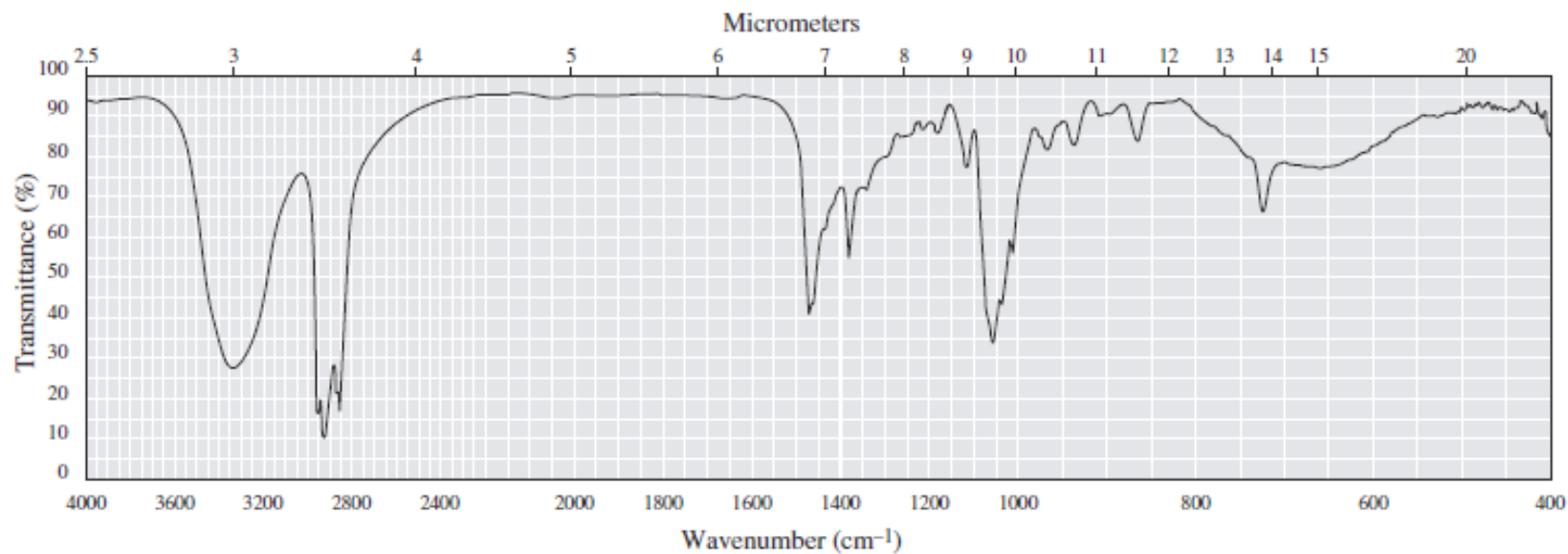
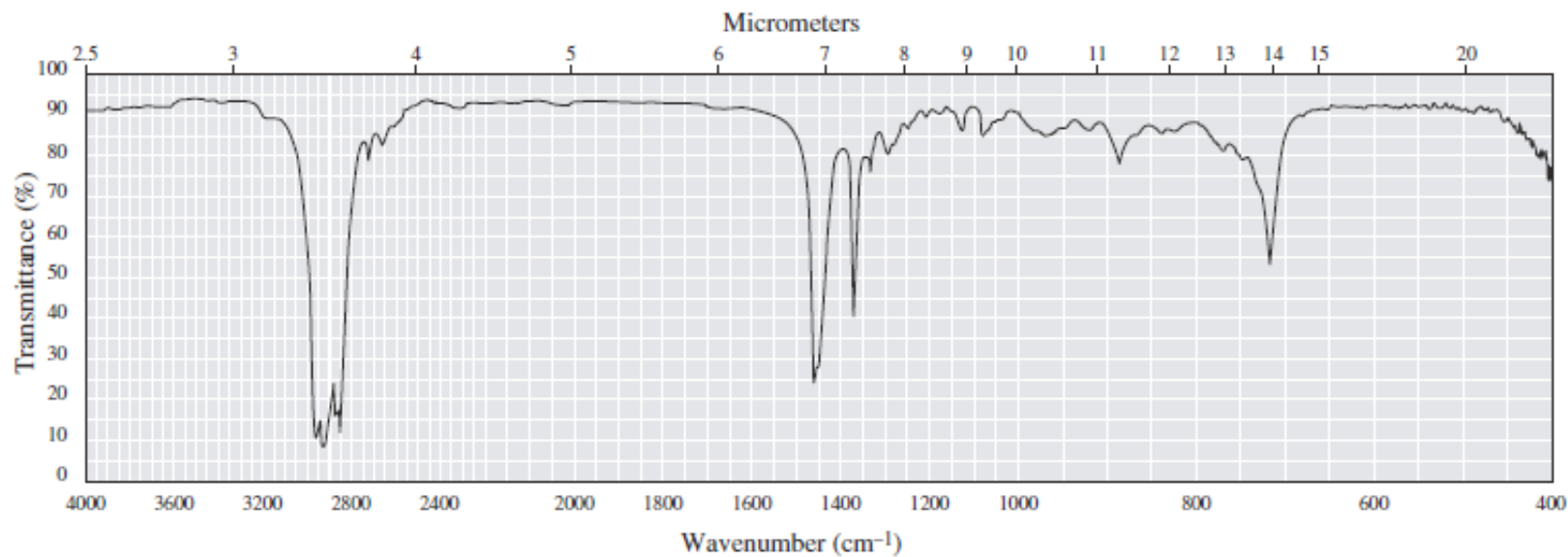
2-metilbutan-1-ol?

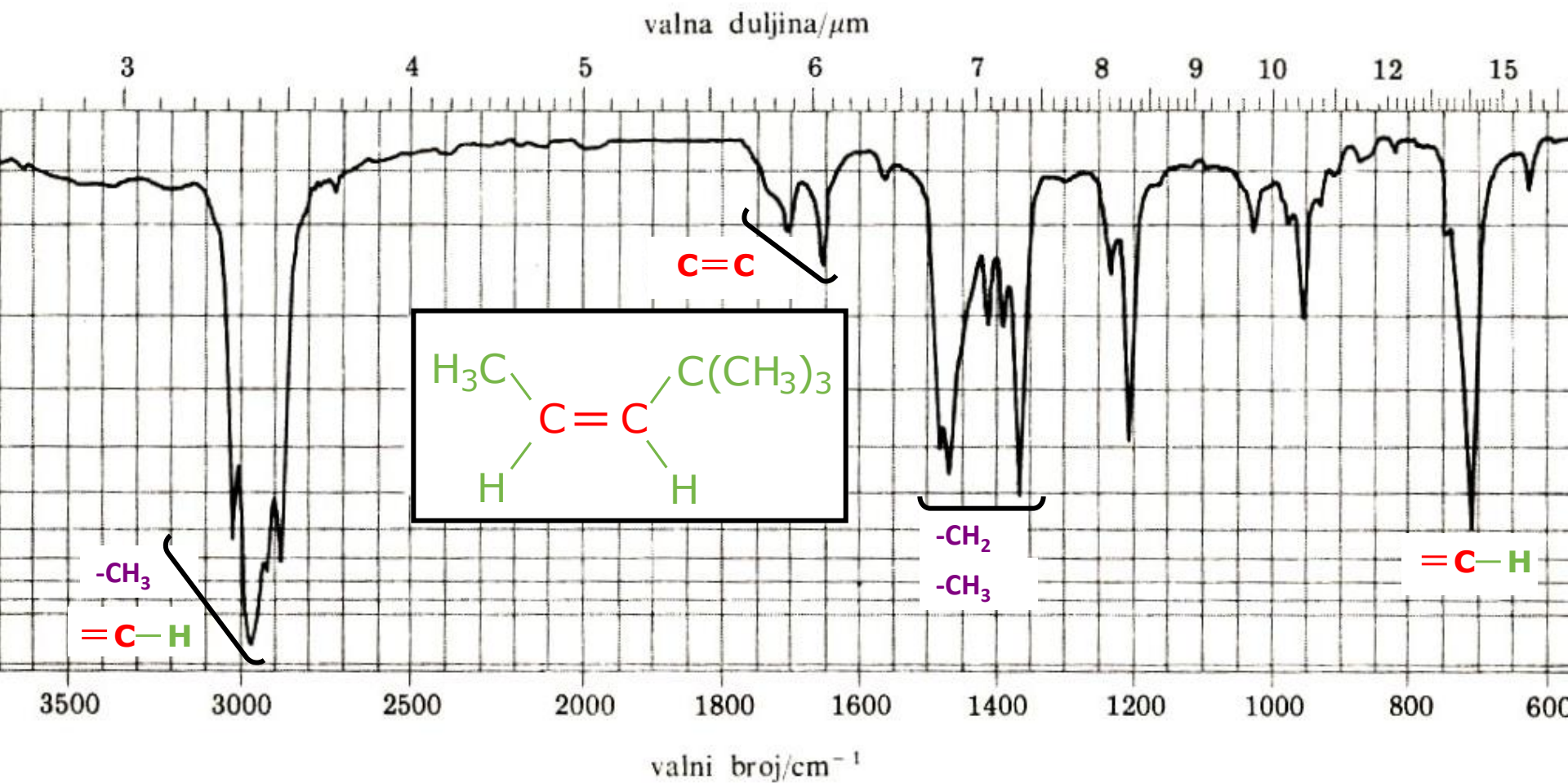
tert-butil-metil-eter?



nonan?

heksan-1-ol?





$\nu (\text{C}=\text{C}_{\text{alifatski}})$ sl $1690 - 1635 \text{ cm}^{-1}$

$\delta (= \text{C}-\text{H}) \sim 710 \text{ cm}^{-1} \rightarrow Z (\text{cis}) \text{ izomer!}$

valna duljina/ μm

3

4

5

6

7

8

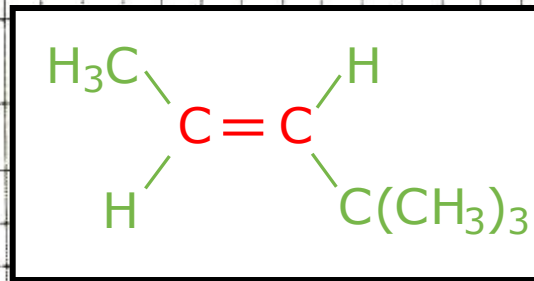
9

10

12

15

C=C



-CH₃

=C-H

-CH₃

=C-H

3500

3000

2500

2000

1800

1600

1400

1200

1000

800

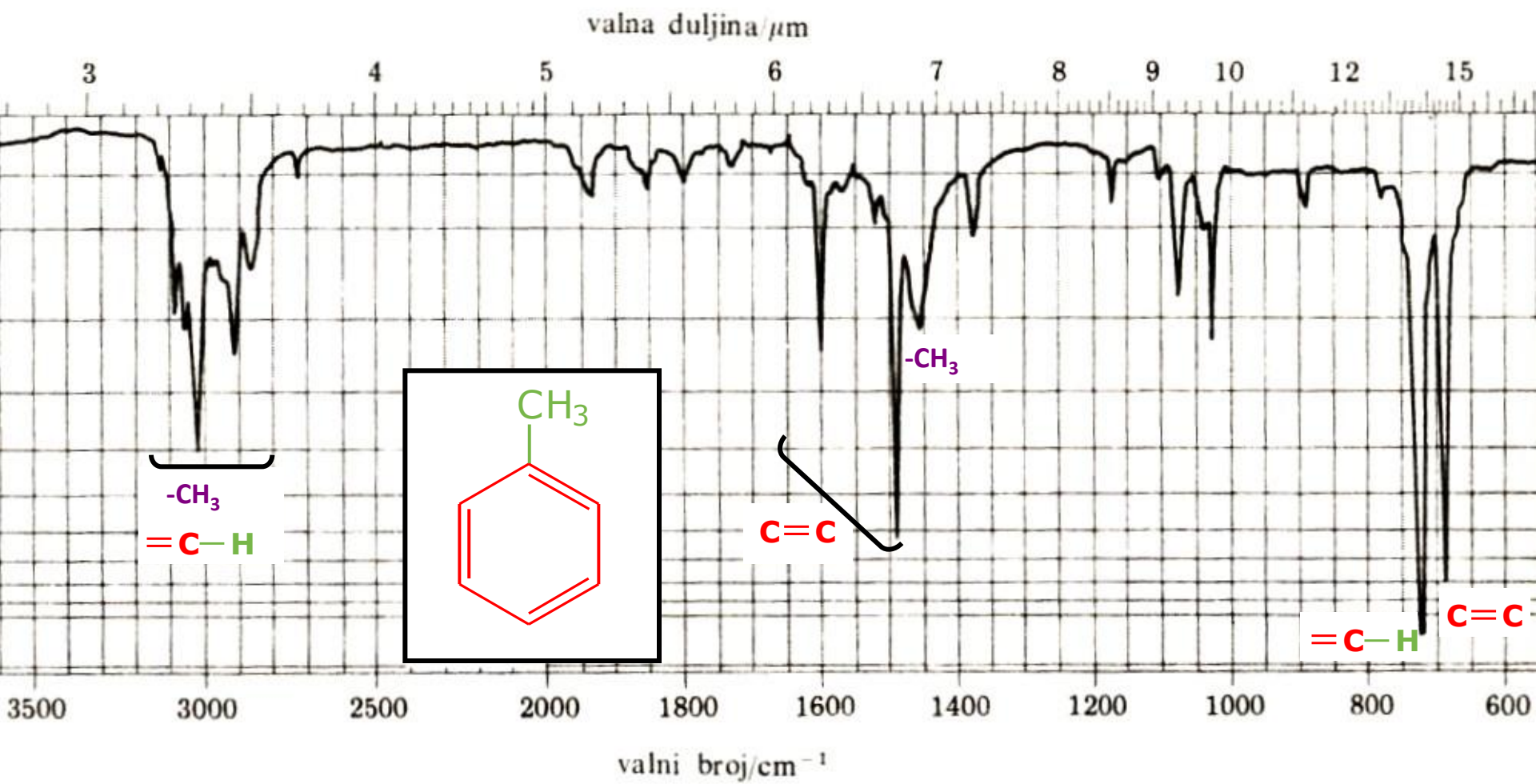
600

valni broj/ cm^{-1}

ν (C=C_{alifatski}) sl 1690 - 1635 cm^{-1}

δ (=C-H) \sim 970 cm^{-1}

→ E (trans) izomer!



ν ($=\text{C}-\text{H}_{\text{aromatski}}$) j $3100 - 3000 \text{ cm}^{-1}$

ν ($\text{C}=\text{C}_{\text{aromatski}}$) sr $\sim 1600 - 1450 \text{ cm}^{-1}$

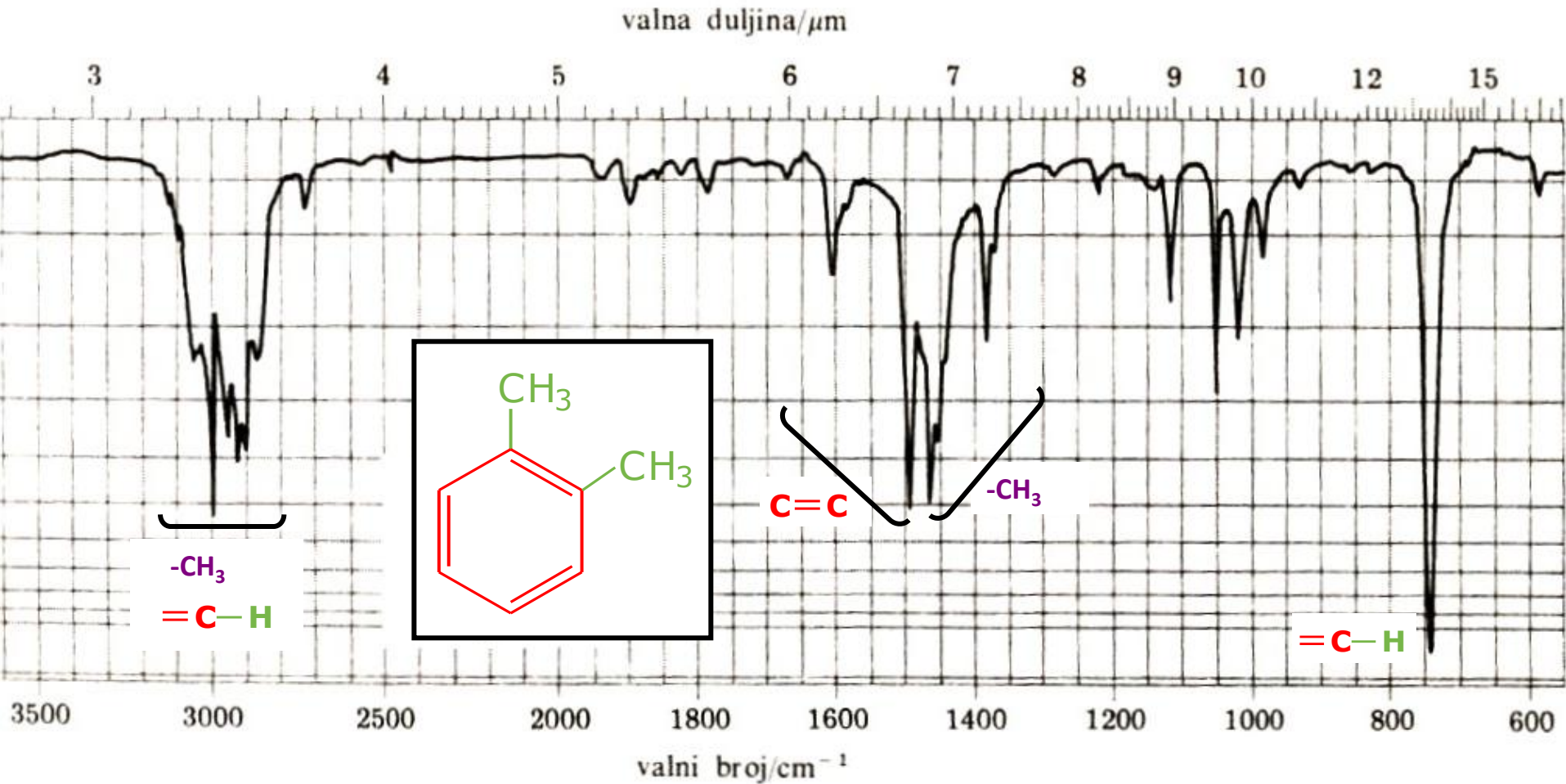
δ ($=\text{C}-\text{H}$) $\sim 750 \text{ cm}^{-1}$

δ ($\text{C}=\text{C}$) $\sim 700 \text{ cm}^{-1}$

dva signala



monosupstitucija!



ν ($=\text{C}-\text{H}_{\text{aromatski}}$) j $3100 - 3000 \text{ cm}^{-1}$

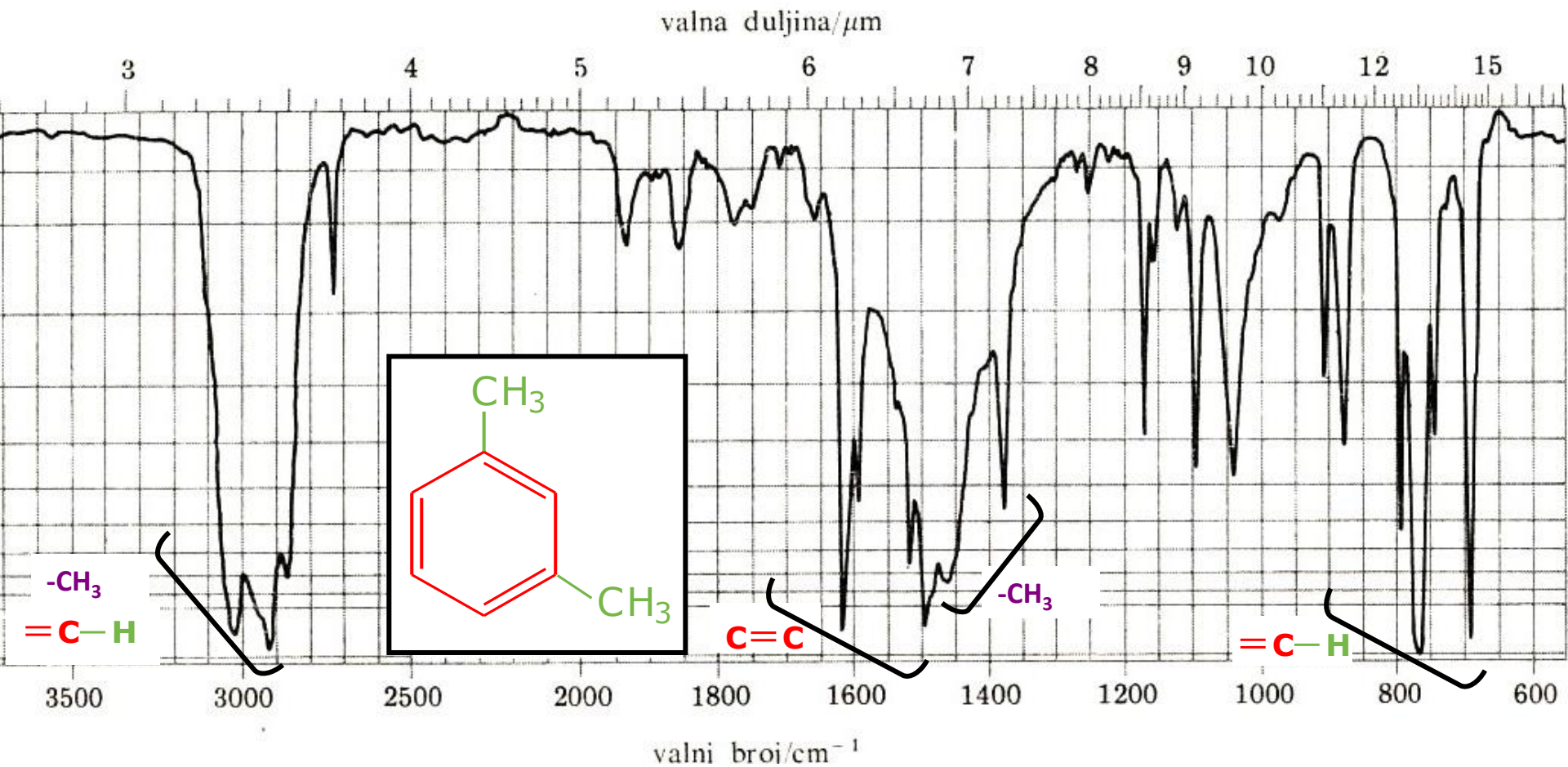
ν ($\text{C}=\text{C}_{\text{aromatski}}$) sr $\sim 1600 - 1450 \text{ cm}^{-1}$

δ ($=\text{C}-\text{H}$) $\sim 770 - 735 \text{ cm}^{-1}$

(jedan signal)



o-disupstitucija!

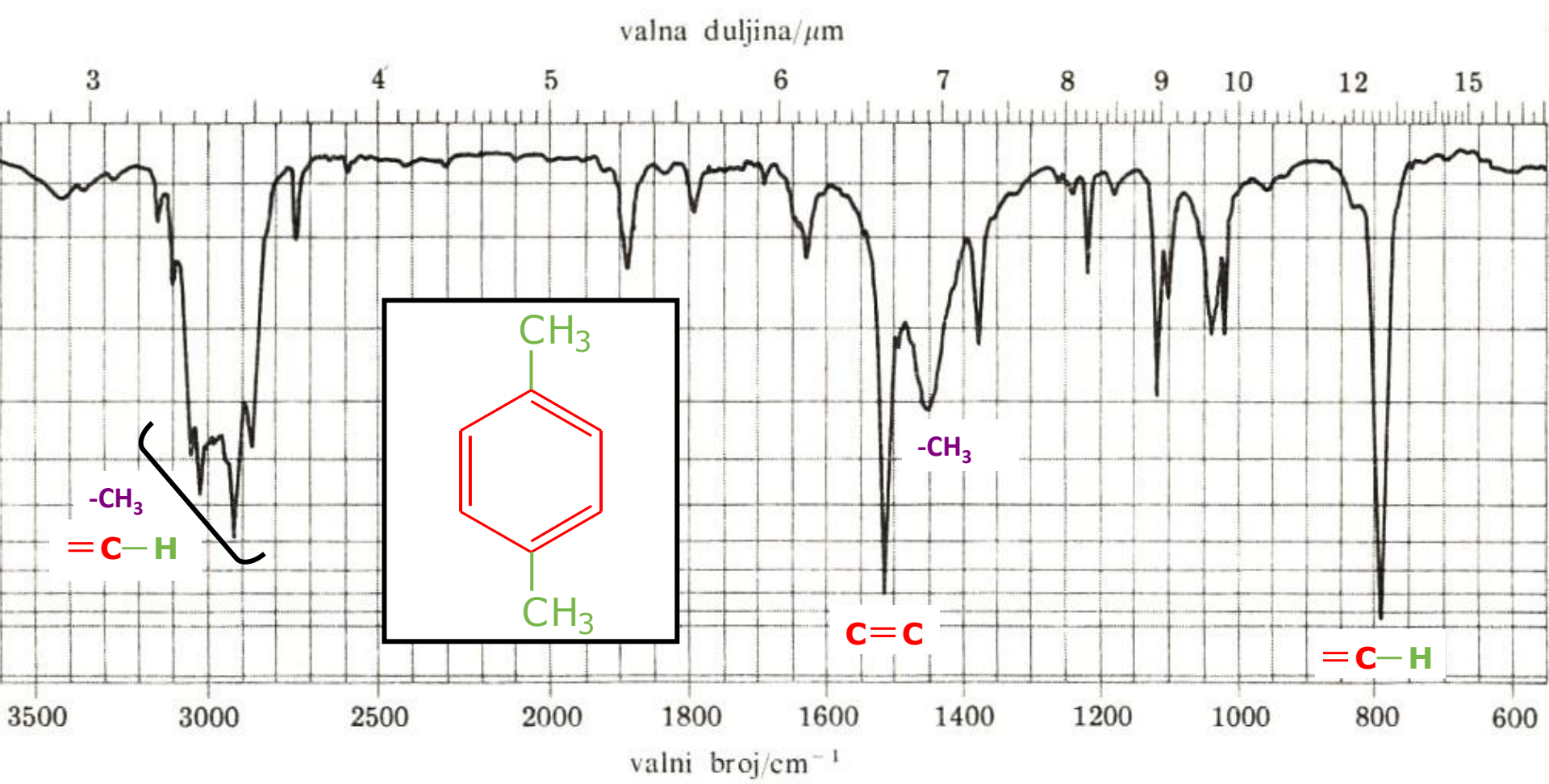


$\delta (= \text{C}-\text{H}) \sim 900 - 860, 865 - 810, 810 - 750, 725 - 680\text{ cm}^{-1}$

(četiri signala)



m-disupstitucija!



$\delta (\text{=C-H}) \sim 860 - 780 \text{ cm}^{-1}$

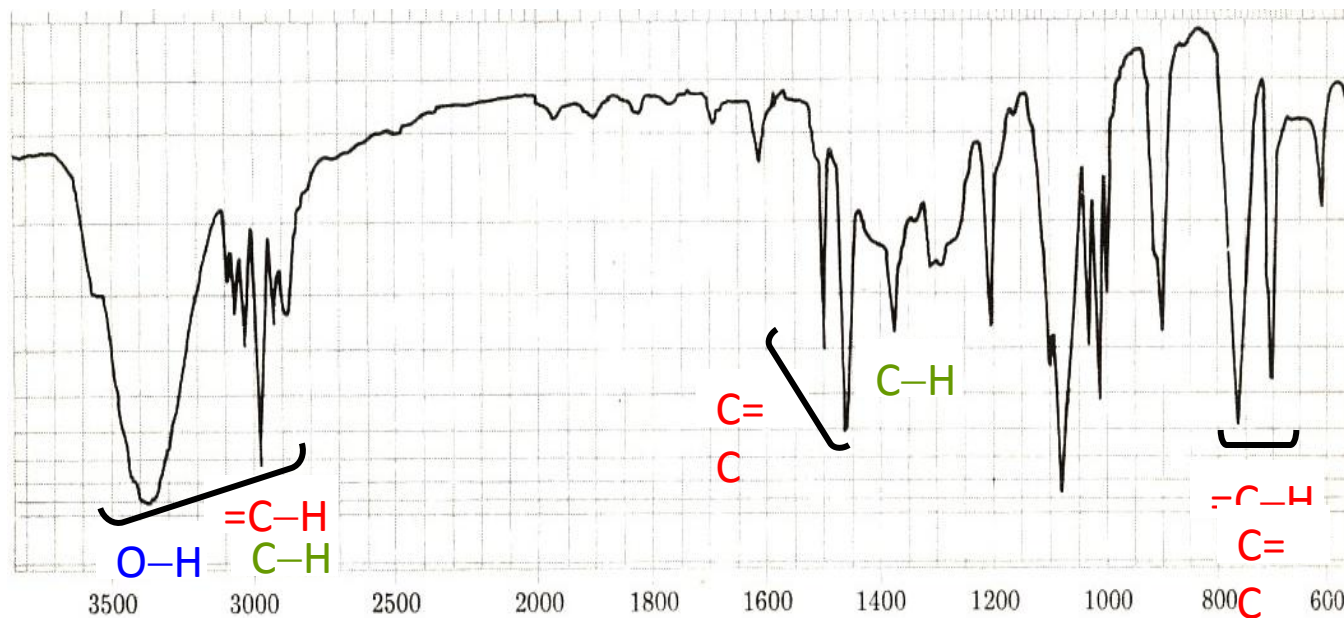
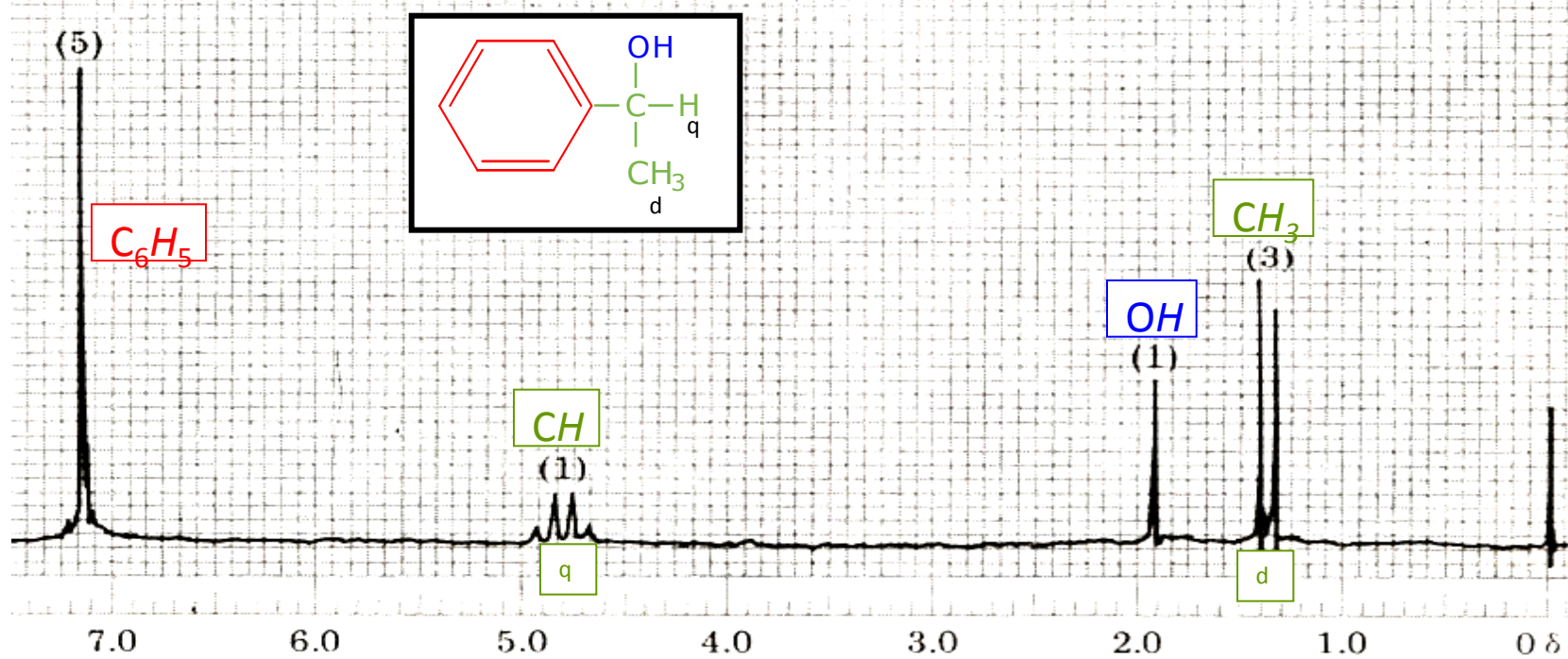
(jedan signal)



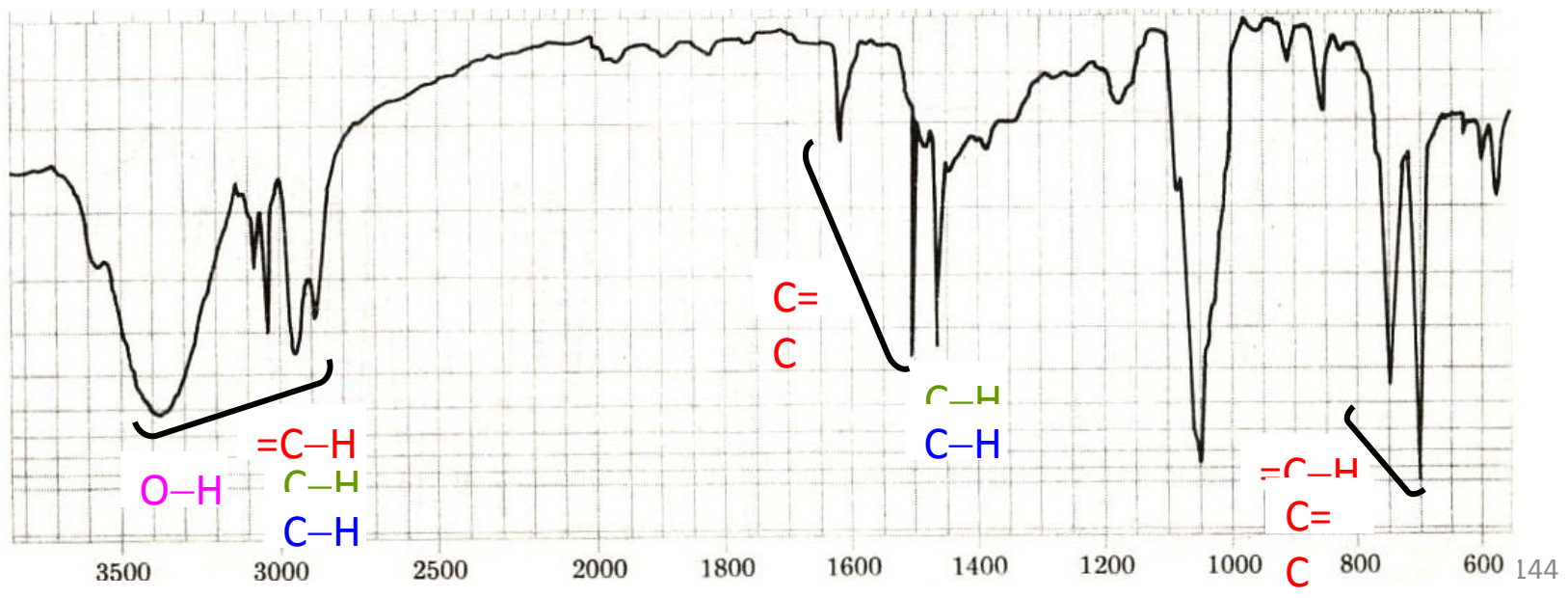
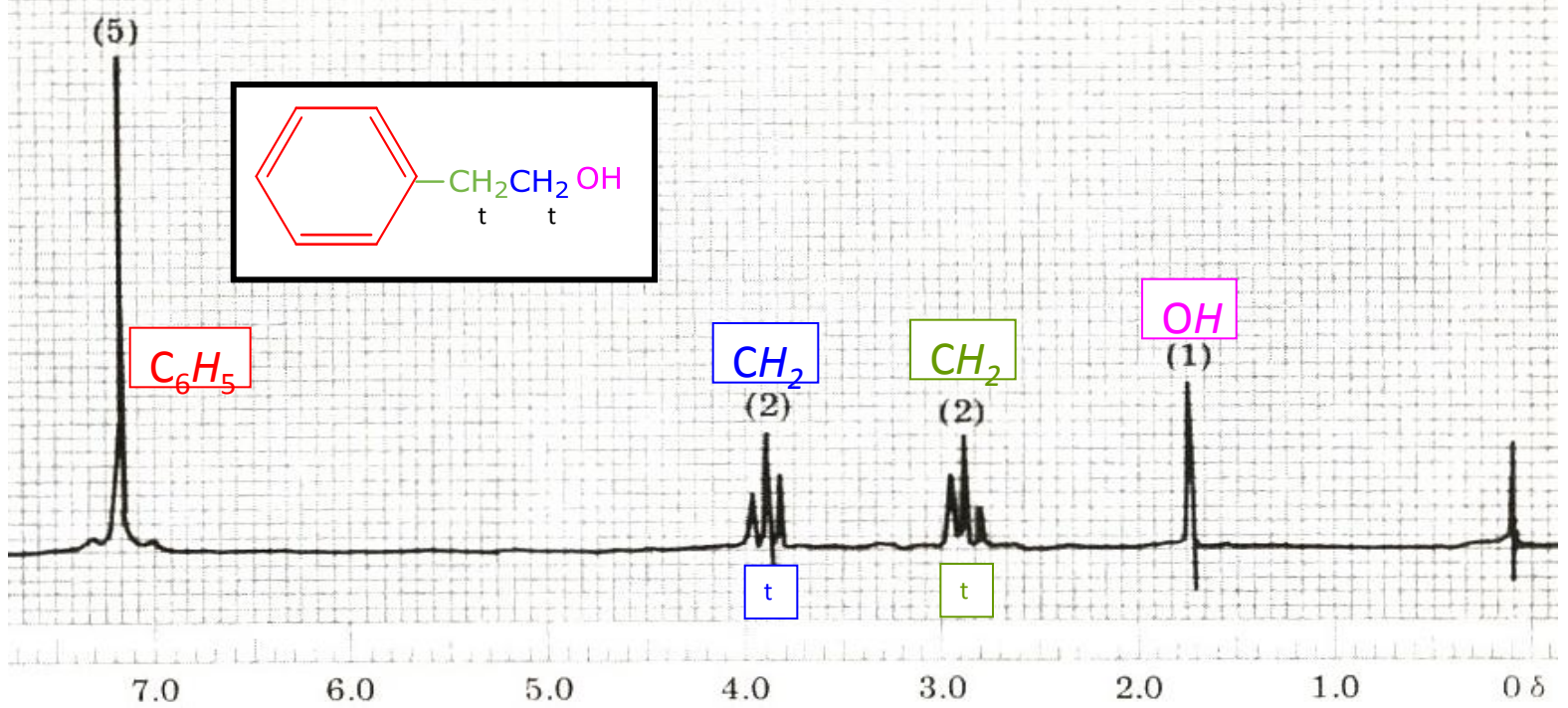
***p*-disupstitucija!**

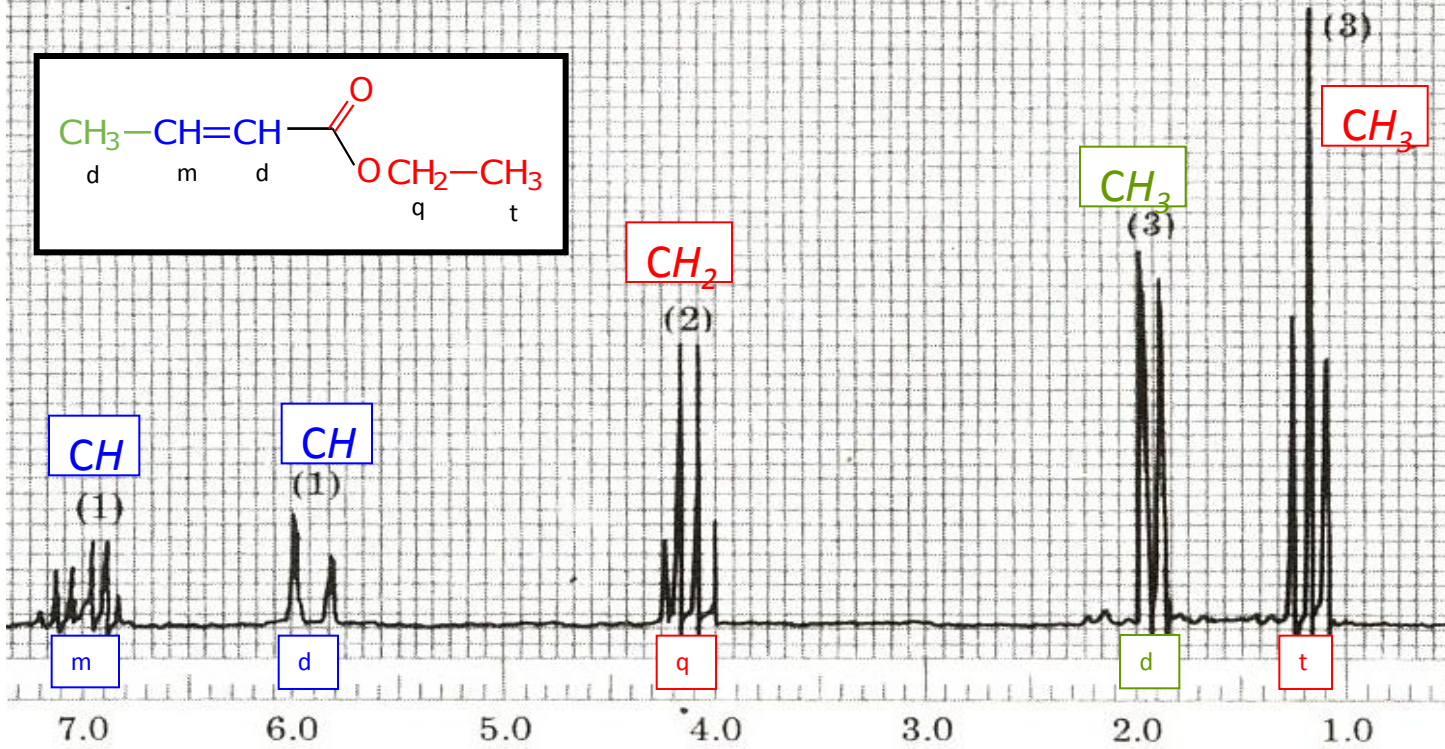
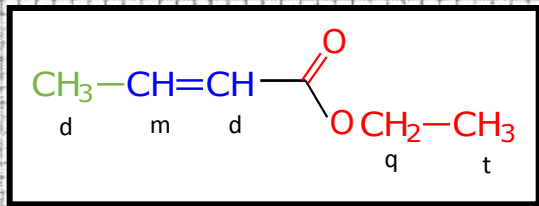
IR- I NMR- SPEKTROSKOPIJA (1. seminar)

[Primjeri IR- i NMR-spektara](#)



ν (O-H) 3700-3200
 ν (C-H) 3000-2850
 ν (C=C_{aromatski}) 1600 - 1450
 δ (C-H) 1480-1350
 δ (C-H) $\sim 750 \text{ cm}^{-1}$
 δ (C=C) $\sim 700 \text{ cm}^{-1}$
 monosupstitucija!



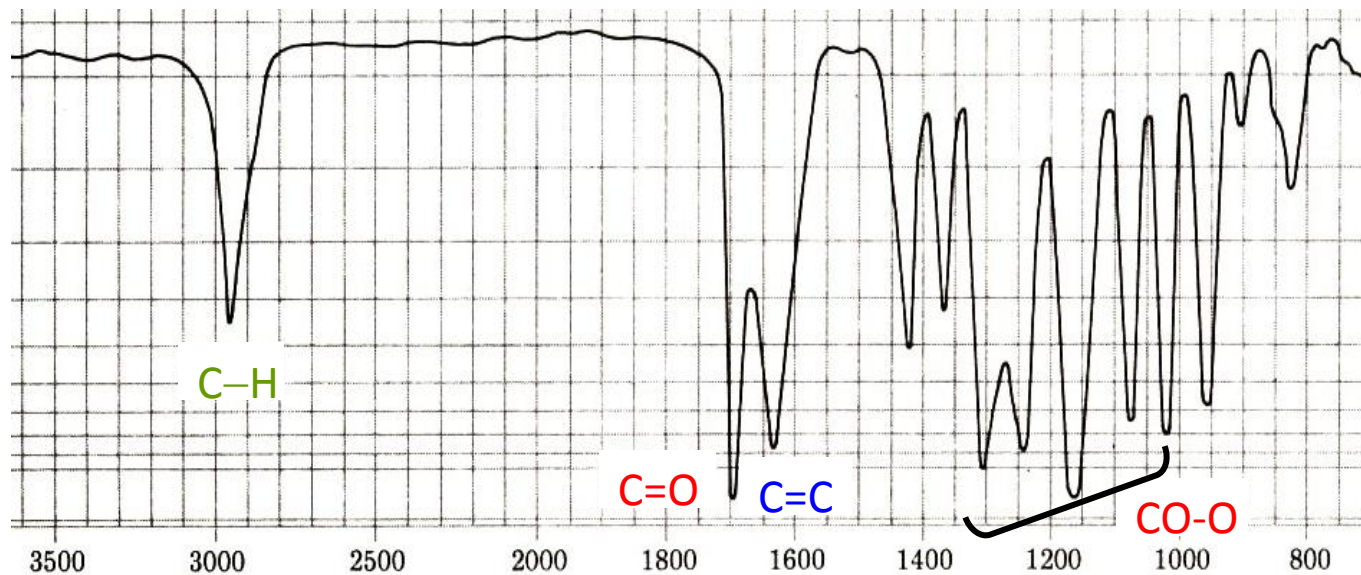


$\text{CH}=\text{CH}$

CH_3-CH

CH_2-CH_3

CH_3-CH_2



ν (C=O) 1800-1630

ν (C=C_{alifatski}) 1690-1635

δ (CO-O) 1330-1050

