

# Analiza kompleksnih spojeva lijekova u otopini

---

Čirjak, Matilda

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:492839>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Matilda Čirjak

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **ANALIZA KOMPLEKSNIH SPOJEVA LIJEKOVA U OTOPINI**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Nives Galić

Zagreb, 2021. godina.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

7. rujna 2021.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

28. rujna 2021.

Mentor rada: prof. dr. sc. Nives Galić

Potpis:



# Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VI</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. KROMATOGRAFIJA .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Kromatografske metode .....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Podjela kolonske kromatografije .....	2
<b>2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....</b>	<b>3</b>
2.2.1. Mobilna i stacionarna faza u HPLC-u.....	3
2.2.2. HPLC instrument .....	4
<b>§ 3. KAPILARNA ELEKTROFOREZA .....</b>	<b>6</b>
<b>3.1. Načelo kapilarane elektroforeze .....</b>	<b>6</b>
3.1.1. Elektroosmotski tok.....	8
<b>3.2. Vrste kapilarne elektroforeze.....</b>	<b>10</b>
3.2.1. Kapilarna zonska elektroforeza .....	11
<b>§ 4. MOLEKULSKA SPEKTROSKOPIJA .....</b>	<b>12</b>
<b>4.1. Elektromagnetsko zračenje .....</b>	<b>12</b>
4.1.1. Spektar elektromagnetskog zračenja.....	13
<b>4.2. UV/VIS SPEKTROSKOPIJA.....</b>	<b>13</b>
4.2.1. Elektonski prijelazi.....	14
4.2.2. Beer-Lambertov zakon .....	15
4.2.3. Instrumentacija i otapala .....	16
<b>4.3. NMR SPEKTROSKOPIJA.....</b>	<b>18</b>
4.3.1. Spinska interakcija.....	18
4.3.2. Pulsevi.....	20
4.3.3. Nuklearni Overhauserov efekt (NOE).....	21
4.3.4. Jednodimenzijske tehnike NMR.....	21
<b>§ 5. LITERATURA.....</b>	<b>24</b>



## § Sažetak

Inkluzijski kompleksi lijekova i ciklodekstrina pripravlja se kako bi poboljšali topljivost, a time i djelotvornost lijeka. Analiza takvih kompleksa provodi se u otopinama različitim analitičkim tehnikama, od kojih su neke kromatografske i spektroskopske tehnike opisane u ovom radu.

Kromatografija je separacijska tehnika kod koje se odvajanje sastojaka smjese temelji na različitoj razdiobi između pokretne i nepokretne faze. Najviše korištena kromatografska tehnika je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, HPLC (engl. *High Performance Liquid Chromatography*) koja se odlikuje visokom selektivnošću. Djelotvornost je povećana u odnosu na klasičnu tekućinsku kromatografiju primjenom manjih čestica punila (nepokretne faze), što uzrokuje i primjenu većih tlakova (nekoliko milijuna bara). Sljedeća separacijska tehnika koja se često koristi je kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary Electrophoresis*) u kojoj se razdvajanje molekula temelji na različitoj pokretljivosti iona u otopini elektrolita na koje je primijenjeno električno polje.

Spektroskopske metode temelje se na interakcijama zračenja i tvari, odnosno na apsorpciji elektromagnetnog zračenja. UV/Vis spektroskopija pokriva područje od 190 do 800 nm, a pri apsorpciji zračenja dolazi do prijelaza vanjskih elektrona. Da bi se prijelaz dogodio, razlika između dvaju elektronskih stanja mora odgovarati energiji zračenja. UV/Vis spektroskopija ima veliku primjenu u kvantitativnoj analizi zato što je apsorpcija, prema Beer-Lambertovu zakonu proporcionalna koncentraciji tvari koja apsorbira zračenje

Spektroskopija nuklearne magnetne rezonancije, NMR (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*) temelji se na spinskim prijelazima uzrokovanim apsorpcijom u radiovalnom području. Tehnika se koristi za određivanje strukture različitih molekula. Analiza se provodi na temelju NMR spektra kojim su signali prikazani u ovisnosti o kemijskom pomaku. Spektri jednodimenzijskih tehnika  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  prikazuju signale koji odgovaraju neekvivalentnim protonima i ugljikovim atomima, a definirani su položajem, intenzitetom i multiplicitetom signala.



## § 1. UVOD

Suzbijanje i liječenje raznih bolesti postizemo korištenjem lijekova čime je životni vijek ljudi i životinja znatno produžen. Da bi njihova primjena bila što sigurnija provode se detaljne analize koje ukazuju na prisutnost nepoželjnih onečišćenja koja bi mogla uzrokovati nuspojave ili promijeniti učinkovitost i stabilnost lijeka. Poboljšanje topljivosti, stabilnosti ili same bioaktivnosti lijeka postiže se kompleksiranjem lijeka s ciklodekstrinima (CD).<sup>1</sup>

Ciklodekstrini su prirodni spojevi koji nastaju bakterijskom razgradnjom škroba. Njihova specifična struktura krnjeg stošca hidrofobne unutrašnjosti i hidrofilne površine omogućuje inkluziju različitih molekula pa tako i lipofilnih lijekova. U vodenim otopinama mnogi lijekovi tvore komplekse s ciklodekstrinima pri čemu se zamjenjuju s molekulama vode koje ispunjavaju šupljinu. Zamjena je moguća samo ukoliko je polarnost nove molekule gosta manja od polarnosti molekule vode. Budući da je geometrija bitan faktor u nastajanju inkluzijskih spojeva, ponekad je molekula lijeka prevelika da bi se cijela smjestila u unutrašnjost molekule ciklodekstrina. U takvim se slučajevima lijek može kompleksirati sa CD samo s jednim svojim dijelom ili pak s dvije CD-a.<sup>2</sup>

Analiza kompleksa lijek-CD zahtjevan je proces. Potrebno je provesti nekoliko analiza različitim analitičkim tehnikama i dobivene rezultate usporediti kako se bi donijeli konačni zaključci.<sup>1</sup> Svrha ovog rada je predstaviti najčešće korištene analitičke tehnike u analizi inkluzijskih kompleksa lijek-ciklodekstrin u vodenoj otopini.

## § 2. KROMATOGRAFIJA

### 2.1. Kromatografske metode

Kromatografija je separacijska tehnika kod koje se odvajanje sastojaka smjese temelji na različitoj razdiobi između pokretne (eluens) i nepokretne faze (sorbens). Komponente uzorka različito se dugo zadržavaju na sorbensu, odnosno imaju različitu brzinu elucije. Faze se ne miješaju, a sorbens u obliku gela, krutine ili tekućine može biti nanesen na ravnu plohu ili ispunjavati usku kolonu. Prema tome, postoje dvije osnovne kromatografske metode. Plošna kromatografija koja se najčešće koristi u brzjoj analizi reakcijskih smjesa te kromatografija na koloni koja ima veliku ulogu u pročišćivanju spojeva i analizi smjesa složenog sastava.<sup>3</sup>

Plošnu kromatografiju opisuje tanki sloj sorbensa, fino usitnjen i nanesen na staklenu, metalnu ili plastičnu podlogu. Kretanje mobilne faze duž podloge omogućuju prvenstveno kapilarne sile, a rjeđe gravitacija ili električni potencijal. Tankoslojna kromatografija ima mnogo veću primjenu za razliku od papirne zbog brzine, osjetljivosti i razlučivanja te je nezaobilazna tehnika kada se govori o analizi lijekova.

U kolonskoj kromatografiji stacionarna faza nalazi se u uskoj koloni, a primijenjeni tlak ili gravitacija pokretači su eluensa. Kako je elucija različita za različite sastojke, ispis kromatograma pokazuje odaziv detektora ovisno o koncentraciji komponente uzorka kao funkcije vremena. Položaj pika služi identifikaciji, a površina ispod istog omogućava izračun količine tvari.<sup>4</sup>

#### 2.1.1. Podjela kolonske kromatografije

Eluens korišten u kromatografiji na stupcu postoji kao slabo viskozna tekućina, inertni plin ili tekućina pri superkritičnim uvjetima.<sup>5</sup> Iz toga slijedi podjela kromatografije na tekućinsku (LC), plinsku (GC) i fluidnu kromatografiju pri suprekritičnim uvjetima (SFC). Jedino je LC moguća osim u koloni i na ravnoj plohi, a najčešće za sorbens koristi silicijev ili aluminijev dioksid.<sup>3</sup>

Ravnoteža između dviju faza biti će različito uspostavljena mijenjanjem agregatnog stanja sorbensa. Sorbens može biti čvrsta tvar, tekućina ili organski spoj koji je adsorbiran na čvrstoj

tvari ili ionski izmjenjivač. Sastojci smjese otopljeni u tekućoj mobilnoj fazi se propuštanjem kroz različite vrste sorbensa međusobno odjeljuju na različite načine te se prema mehanizmu odvajanja tekućinska kromatografija dijeli na sljedećih pet podvrsta: adsorpcijsku, razdjelnu, afinitetnu, kromatografiju ionske izmjene te kromatografiju isključenjem.

## 2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Staklene kolone koje su se koristile za prve kromatografske bile su promjera od 1 do 5 cm te su korištena punila veličine čestica od 150 do 200  $\mu\text{m}$ . Protok je bio vrlo spor stoga se upotrebom pumpi i vakuuma pokušalo ubrzati odjeljivanje. Međutim, tada je djelotvornost odjeljivanja bila smanjena. Kasnih 60-ih uočena je proporcionalnost između smanjenja veličine čestica punila i djelotvornosti kromatografskog odjeljivanja na koloni. Počela su se koristiti punila veličine čestica do 10  $\mu\text{m}$ . Za dovoljnu brzinu protoka nužno je bilo primijenjeniti tlak od nekoliko stotina bara. Tako se razvila napredna verzija tekućinske kromatografije poznata kao HPLC (engl. *High Performance Liquid Chromatography*) odnosno tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.

HPLC se odlikuje visokom selektivnošću, malom količinom uzorka, jednostavnoj kvantitativnoj analizi te primjeni u analizi nehlapivih i termički nestabilnih uzoraka zbog čega je postala najčešće korištena analitička metoda posebice u farmaceutskoj industriji. Uzorak čiji se sastojak ili sastojci kvantitativno određuju, nužno je otopiti u eluensu. Uspješnost analize određivat će razlika u polarnost faza te sličnost analita sa stacionarnom fazom. Većina HPLC analiza koristi kromatografiju obrnutih faza u kojoj je mobilna faza polarna, a stacionarna faza nepolarna zbog čega će najmanje polaran sastojak posljednji eluirati.<sup>4</sup> Nedostatak metode je pak potreba za strogom kontrolom eksperimentalnih uvjeta i ponekad, zahtjevnom obradom uzorka, visoka cijena, velika potrošnja otapala te nepostojanje univerzalnog detektora.<sup>1</sup>

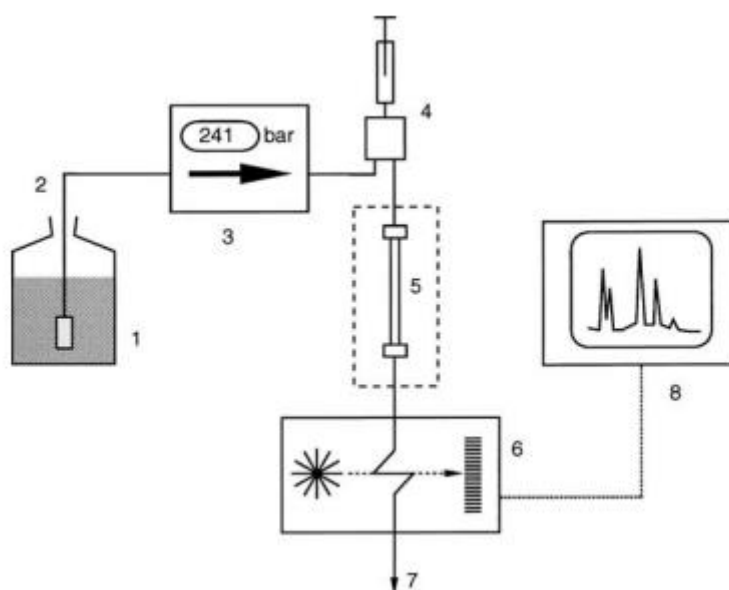
### 2.2.1. Mobilna i stacionarna faza u HPLC-u

Odabir mobilne i stacionarne faze bitan je faktor kako bi separacija komponenti bila kvalitetna. Za različite vrste HPLC-a koriste se različita otapala pri čemu treba odabrati ona prikladna za analizu i s najvećom čistoćom.<sup>6</sup> Ponekad nije dovoljno koristiti samo jedno

otapalo već za djelotvorno odvajanje sastojaka smjese treba koristiti smjesu otapala, a i to ponekad nije dovoljno ukoliko uzorak sadrži spojeve velikog spektra polarности.<sup>7</sup> Otapala korištena u HPLC metodi odabiru se obzirom na propusnost u UV području, toksičnost, cijenu, vrelište, indeks refrakcije i viskoznost.<sup>8</sup> U slučaju kromatografije obrnutih faza, vodena otopina metanola, acetonitrila ili tetrahidrofurana je najčešće korištena pokretna faza, a stacionarna faza C4, C8, C18 ili C30, tj. ugljikovodici različite dužine lanca vezani na silikagel.<sup>4</sup> Čestice silikagela se koriste radi njihove velike površine, različite veličine i poroznosti. Odabir dimenzija kolone također je jedan od faktora koji utječu na analizu.

### 2.2.2. HPLC instrument

Instrument za HPLC naziva se tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti i sastoji se od spremnika mobilne faze, crpke, pumpe, injektora, kolone i detektora.



Slika 1. Shematski prikaz dijelova HPLC uređaja: spremnik mobilne faze (1), otplinjač (2), pumpa (3), injektor (4), kolona (5), detektor (6), otpadni spremnik (7), računalo (8)<sup>8</sup>

Mobilna faza prolazi kroz filter i otplinjač te se pomoću pumpe prenosi dalje sustavom. Pumpa kontrolira protok primjenom različitih tlakova, a jedan od uvjeta da bi bila korištena kao dio HPLC uređaja jest da mora moći ostvariti tlak do 350 ili čak 500 bara. Protok eluensa

može biti izokratan gdje se sastav mobilne faze ne mijenja ili gradijentan, kad se sastav pokretne faze mijenja tijekom kromatografskog postupka. Jedan od najzahtjevnijih dijelova instrumenta je injektor. Naime, ručnim unosom uzorka na kolonu vrlo lako dolazi do pogreške, stoga prednost imaju automatski injektori. Uzorak se zatim mobilnom fazom prenosi do kolone koja je najvažniji dio uređaja. Na koloni odvija separacija sastojaka smjese. Odvojeni sastojci se po izlasku s kolone detektiraju odgovarajućim detektorom koji pretvara zabilježene podatke u električni signal koji se pomoću računala pretvara u kromatogram.

Detektori prepoznaju kada se tvar eluira iz kolone, a idealan detektor čini nekoliko elemenata od koji su neki od njih:

- osjetljivost i reproducibilnost
- robusnost i jednostavno korištenje
- cijena
- mogućnost detekcije male količine sastojka
- brza i točna detekcija

Univerzalni detektor ne postoji te primjena određenog detektora ovisi o prirodi uzorka. Najčešće primijenjeni detektori u HPLC metodi jesu UV detektori koji detektiraju komponente koje apsorbiraju ultraljubičasto ili vidljivo zračenje. Najbolji od njih jesu detektori s nizom foto-osjetljivih dioda. Osim UV detektora, poznati su i detektori koji prate promjenu indeksa loma, elektrokemijski, fluorescencijski te detektori koji mjere raspršenja svjetlosti.<sup>5,8</sup>

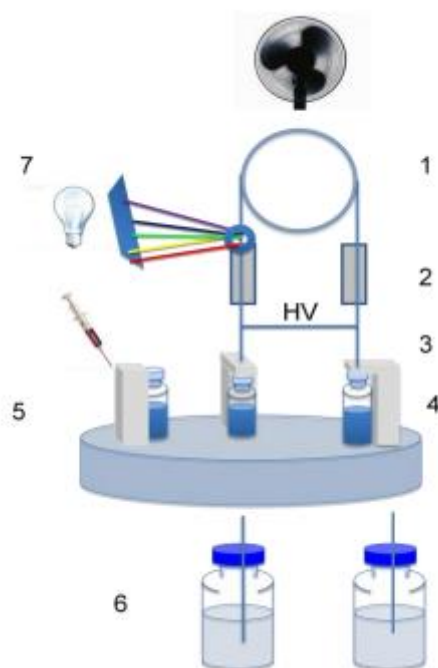
## § 3. KAPILARNA ELEKTROFOREZA

Elektroforeza je separacijska tehnika koja razdvajanje molekula temelji na primjeni električnog polja i kretanja nabijenih čestica pod njegovim utjecajem. Molekule različite veličine i naboja migriraju različitim brzinama. Ukupna brzina ovisit će o nabojima, obliku i veličini molekule, svojstvu nosača u interakciji sa uzorkom i veličini pora koje posjeduje, jačini električnog polja, temperaturi i endosmotskom efektu. Primjenom polja svaki ion putuje prema elektrodi suprotnog naboja, a brzina je obrnuto proporcionalna veličini molekula.<sup>9</sup>

Kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary Electrophoresis*, CE) podrazumijeva zajednički naziv za sve elektroforetske metode koje su izvedene pomoću kapilare. Nadopunjuje HPLC metodu ili ju čak zamjenjuje. Veliku primjenu nalazi u analizi organskih i anorganskih iona različitih veličina. Metoda se odlikuje visokom učinkovitosti, kratkim vremenom analize, jednostavnošću, cijenom, različitim mehanizmom razdvajanja i mogućnošću analize svih vrsta analita.<sup>10</sup> Najveća prednost CE metode je u analizi peptidnih lijekova i proteina te se koristi i za razdvajanje enantiomera i određivanje enantiomerne čistoće.

### 3.1. Načelo kapilarane elektroforeze

Osnovno načelo CE je kretanje nabijenih čestica u otopini elektrolita pod djelovanjem električnog polja, napona do 30 kV, u uskoj kapilari prema jednoj od elektroda. Kapilare mogu biti različitog promjera i duljine, a najčešće su izrađene od kvarca. Ispunjene su puferom i uronjene jednim krajem u elektrolitnu otopinu što omogućava protjecanje električnog naboja kroz kapilaru nakon uspostave napona. Elektroforetska mobilnost će ovisiti o radijusu, naboju i viskoznosti molekula.



Slika 2. Shema uređaja za kapilarnu elektroforezu: kapilara (1), elektrode (2), izvor struje (3), spremnik za pufer (4), sustav za unošenje uzorka (5), sustav za promjenu pufera (6), detektor (7)<sup>11</sup>

Različite brzine čestica opisuju se izrazom (1)

$$v_{ep} = \mu_{ep}E \quad (1)$$

gdje je  $v_{ep}$  brzina putovanja iona,  $\mu_{ep}$  elektroforetska pokretljivost čestice, a  $E$  jakost primijenjenog električnog polja.

Elektroforetska pokretljivost ( $\mu_{ep}$ ) opisana je izrazom (2)

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (2)$$

u kojem je izražena ovisnost o naboju čestice ( $q$ ), viskoznosti ( $\eta$ ) otopine elektrolita i polumjeru ( $r$ ).

Jakost primijenjenog polja opisana je izrazom (3)

$$E = \frac{V}{L} \quad (3)$$

Gdje je  $V$  primijenjeni napon, a  $L$  duljine kapilare.

Kombiniranjem jednadžbi (1), (2) i (3) dobije se izraz koji opisuje brzinu putovanja analita (4).

$$v_{\text{ep}} = \mu_{\text{ep}} E = \frac{q}{6\pi\eta r} \frac{V}{L} \quad (4)$$

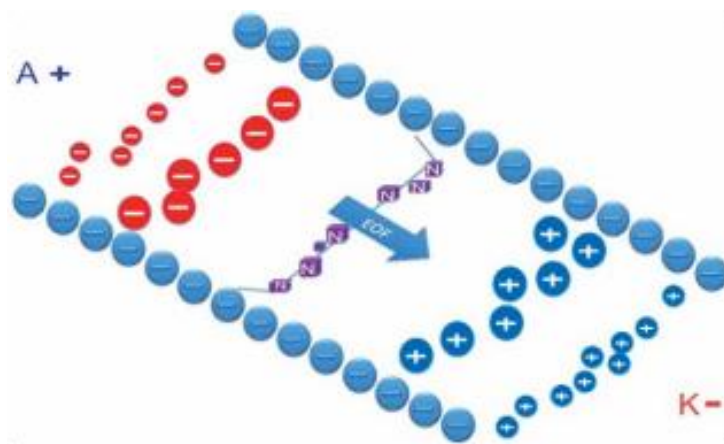
Iz jednadžbe (4) je vidljivo da će putovanje čestica analita biti različite brzine za različite čestice. Brzina je proporcionalna naboju i jakosti električnog polja, a obrnuto proporcionalna duljini kapilare i radijusu.

Navedeni izrazi ukazuju na to da je kapilarna elektroforeza primjenjiva isključivo na molekule koje su nabijene. Međutim, moguće je analizirati i neutralne molekule. Razlog tomu je elektroosmotski (elektroendoosomotski) tok (engl. *electroosmotic flow*, EOF).

### 3.1.1. Elektroosmotski tok

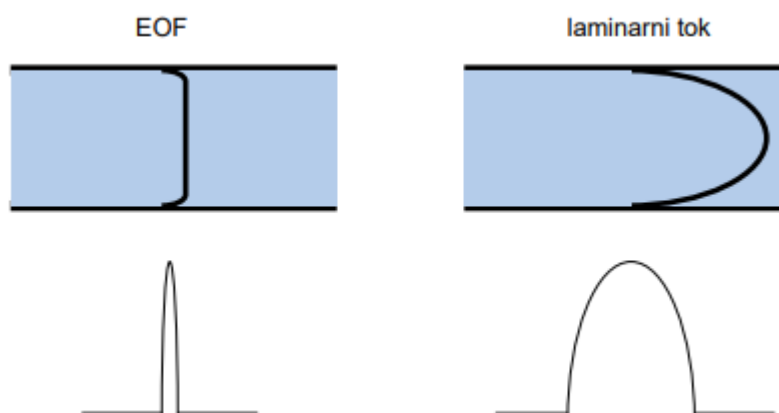
Kapilara u kapilarnoj elektroforezi je najčešće izrađena od kvarca i kao takva sadrži mnogo silanolnih grupa na unutarnjoj površini. Vrijednost pH elektrolita utječe na različitu ioniziranost tih skupina te se one mogu nalaziti u anionskom obliku. Ispunjavanjem kapilare elektrolitom stvara se električni dvosloj jer su uz negativno nabijene silanolne grupe privučeni kationi iz elektrolita. Dvosloj razlikuje čvrsti ili nepomični dio koji čine kationi i difuzijski dio u kojem su prisutni i kationi i anioni. Primjenom napona na krajeve kapilare, kationi u difuznom dijelu dvosloja migriraju prema katodi povlačeći za sobom okolnu tekućinu. Ostvaren je protok cijele otopine prema negativnoj elektrodi koji nazivamo elektroosmotskim tokom (slika 3.).



Slika 3. Elektrosomotski tok<sup>10</sup>

Jakost električnog polja i elektroosmotska pokretljivost pufera definiraju brzinu toka. Pokretljivost pufera je ovisna o dielektričnoj konstanti pufera, viskoznosti i zeta potencijalu na površini kapilare, a jakost polja, kao i u slučaju elektroforetske mobilnosti čestica, ovisi o duljini kapilare i primijenjenom naponu. Sila koja pokreće tok jednoliko se raspoređuje duž kapilarnih stjenki te zbog toga nema pada tlaka i tok ostaje gotovo uniforman. Takav profil nazivamo ravnim profilom i jedinstvena je odlika EOF-a.

Ravni profil je povoljan profil toka jer smanjuje disperziju analita što rezultira uskim i oštrim pikovima, odnosno boljom učinkovitošću metode. Suprotno tome u tekućinskoj kromatografiji se javlja laminalni ili parabolni tok kao posljedica trenja stjenke zbog primjene vanjske pumpe koja pokreće mobilnu fazu. U tom slučaju pikovi će biti širi jer se ioni iste vrste kreću različitom brzinom obzirom na udaljenost od stjenki (slika 4.). Ta činjenica govori o prednosti CE nad tekućinskom kromatografijom.



Slika 4. Ravni profil toka u CE i laminalni profil u kromatografiji s pripadajućim prikazom pikova<sup>11</sup>

Pod normalnih uvjetima kada se radi o negativno nabijenoj površini kapilare i kada se katoda nalazi na detektorskom kraju, smjer elektrosomotskog toka je od pozitivne elektrode prema negativnoj odnosno od anode prema katodi. Anioni kao negativno nabijene čestice trebali bi se kretati prema pozitivnom kraju, ali zbog razlike u veličini elektrosomotskog toka i elektroforetske pokretljivosti čestica od više od jednog reda, kretanje svih analita je u istom smjeru, neovisno o naboju. Kationi se kreću najbrže budući da je smjer kretanja prema negativnom kraju i smjer EOF-a u istom pravcu. Anioni i neutralne molekule pak sporije jer su anioni privučeni anodi, a neutralne molekule se ne razdvajaju jedna od druge.

### 3.2. Vrste kapilarne elektroforeze

Različite vrste analita povlače različit mehanizam separacije iz čega slijedi podjela kapilarne elektroforeze na više tehnika (tablica 1.)

Tablica 1. Vrste kapilarne elektroforeze

Vrste kapilarne elektroforeze	Vrsta analita
Kapilarna zonska elektroforeza	Nabijeni analiti
Kapilarna gel elektroforeza	DNA, RNA, proteini
Micelarna elektrokinetička kromatografija	Neutralni i nabijeni analiti
Kapilarno izoelektrično fokusiranje	Proteini i peptidi
Kapilarna izotahoforeza	Ioni
Kiralna kapilarna elektroforeza	Kiralne molekule
Kapilarna elektrokromatografija	Male molekule
Mikroemulzijska elektrokinetička kromatografija	Analiti slabo topljivi u vodi
Nevodena kapilarna elektroforeza	Analiti netopljivi u vodi

### 3.2.1. Kapilarna zonska elektroforeza

Najjednostavniji oblik kapilarne elektroforeze u kojem je kapilara ispunjena samo puferom naziva se kapilarna zonska elektroforeza (engl. *Capillary zone electrophoresis*, CZE). Metoda je poznata i kao kapilarna elektroforeza slobodne otopine. Uspješnost razdvajanja analita ovom metodom zahtjeva nekoliko preduvjeta. Najvažniji je razlika u njihovoj elektroforetskoj pokretljivosti zbog čega se analiti razdvajaju u različite zone i u tim zonama putuju različitim brzinama. Nadalje, pufer koji ispunjava kapilaru treba biti homogen i njegova vodljivost mora biti veća od ukupne električne vodljivosti analita. Stjenka kapilare pak ne smije reagirati ni s analitom ni matriksom, a jakost električnog polja mora biti jednoliko raspoređena duž kapilare. Ovom metodom moguće je razdvojiti kationske i anionske tvari, ali ne i neutralne molekule. Razlog tomu je što su neutralne molekule koelirane i tako putuju kapilarom nošene elektroosomotskim tokom.<sup>10,11</sup>

## § 4. MOLEKULSKA SPEKTROSKOPIJA

### 4.1. Elektromagnetsko zračenje

Spektroskopija je povijesno gledajući grana znanosti koja se bavila svjetlošću razlučenom u komponente. Do danas je postala znanost koja dobiva informacije o sustavu preko elektromagnetskog zračenja s kojim sustav reagira ili ga samostalno proizvodi.<sup>12</sup> Elektromagnetsko zračenje (EZ) je vrsta energije koja se u vakuumu širi brzinom svjetlosti u obliku vala. Valnu prirodu zračenja opisuje amplituda, valna duljina i frekvencija, a zračenje promatramo kao klasični valni model u kojem su električno i magnetsko polje okomiti jedno na drugo i na smjer širenja. Takvim modelom moguće je objasniti lom, interferenciju, zrcaljenje i difrakciju, ali ne apsorpciju i emisiju. Čestični model objašnjava te dvije pojave i temelji se na diskretnim česticama koje nazivamo fotonima.

Energija fotona opisana je izrazom (5) iz kojeg slijedi proporcionalnost s frekvencijom i obrnuta proporcionalnost s valnom duljinom zračenja.

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (5)$$

Da bi se određeni prijelazi u spektru dogodili, energija zračenja mora biti jednaka energiji prijelaza ( $\Delta E$ ) između konačnog i početnog stanja, odnosno između  $E_1$  i  $E_2$  (6).

$$E_2 - E_1 = \Delta E = \frac{hc}{\lambda} = h\nu \quad (6)$$

$h$ - Planckova konstanta

$\lambda$ - valna duljina

$c$ - brzina svjetlosti u vakuumu

## 4.1.1. Spektar elektromagnetskog zračenja

Ovisno o energiji, spektar elektromagnetnog zračenja dijeli se na nekoliko područja (slika 5.).

$10^5$		$10^3$		$10^1$		$10^{-1}$		$10^{-3}$		$10^{-5}$		$10^{-7}$		$E/\text{kJmol}^{-1}$
$\gamma$ -zrake	rentgenske zrake	ultraljubičasto zračenje	vidljiva svjetlost	infracrveno zračenje	mikrovalovi	radiovalovi								
nuklearni prijelazi	prijelazi unutarnjih elektrona		prijelazi vanjskih elektrona	vibracije	rotacije	prijelazi među spinskim stanjima								
$10^{-8}$	$10^{-6}$		$10^{-4}$	$10^{-2}$	1	$10^2$	$10^4$	$\lambda/\text{cm}$						
$10^{16}$	$10^{14}$		$10^{12}$	$10^{10}$	$10^8$	$10^6$	$10^4$	$\nu/\text{Hz}$						

Slika 5. spektar elektromagnetnog zračenja<sup>13</sup>

Područja velike energije posjeduju malu valnu duljinu i obrnuto. Najmanja valna duljina odgovara  $\gamma$ -zrakama i u tom području se mijenja konfiguracija jezgre. Prijelaz unutarnjih elektrona događa se u rentgenskom području, a vanjskih elektrona u UV/Vis području. Rotacije i vibracije molekula događaju se zbog apsorpcije ili emisije infracrvenog zračenja, a radiovalovi s najmanjom energijom odgovorni su za spinske prijelaze.<sup>13</sup>

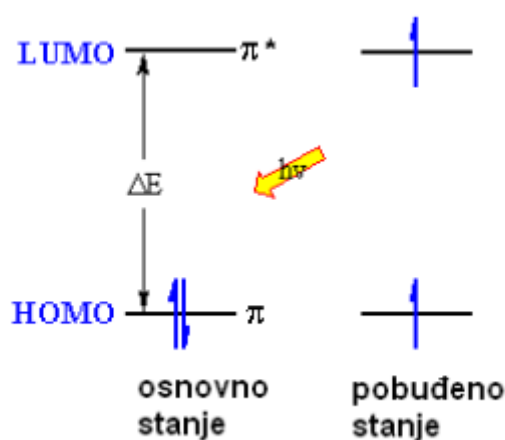
## 4.2. UV/VIS SPEKTROSKOPIJA

Molekulska UV/Vis spektroskopija veliku primjenu pronalazi u kvantitativnoj analizi i među najčešće je korištenim tehnikama u kliničkim laboratorijima.<sup>5</sup> Koncentracija analita dobiva se mjerenjem apsorpcije uzorka pri određenoj valnoj duljini.<sup>14</sup> Dio spektra elektromagnetnog zračenja koji obuhvaća ova metoda je u rasponu valne duljine od 190 do 800 nm.

Kada uzorkom prolazi elektromagnetno zračenje, dio zračenja se apsorbira. Energija koja je apsorbirana uzrokuje prijelaz atoma ili molekula iz stanja niže energije u stanje više energije. Molekulska UV/ Vis spektroskopija bavi se prijelazima u konjugiranim sustavima odnosno u organskim molekulama koje sadrže funkcionalne skupine koje dobro apsorbiraju u tom području spektra. Takve skupine nazivaju se kromoforima, a budući da su nezasićene, elektroni su slabo vezani i imaju malu energiju pobude što omogućuje elektronski prijelaz pri danim valnim duljinama.<sup>5</sup>

## 4.2.1. Elektronski prijelazi

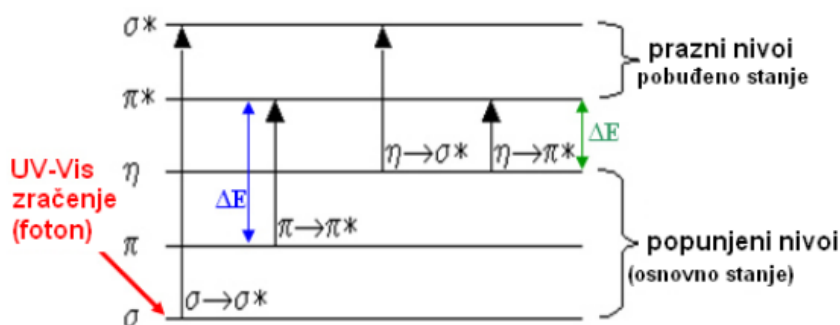
U UV/Vis spektroskopiji, apsorpcija uzrokuje prijelaz između elektronskih nivoa, a apsorbirana energija točno odgovara energijskoj razlici dvaju elektronskih stanja. Za većinu molekula ta razlika iznosi od 125 do 650 kJ mol<sup>-1</sup>. Najvjerojatniji prijelaz elektrona koji se može dogoditi jest prijelaz iz najviše popunjene orbitale zvane HOMO u najnižu nepopunjenu orbitalu zvanu LUMO (slika 6.).<sup>15</sup> HOMO orbitale jesu vezne orbitale, a LUMO protuvezne.



Slika 6. Prijelaz elektrona između HOMO i LUMO orbitala<sup>16</sup>

Postoje tri vrste elektronskih prijelaza od kojih su najvažniji prijelazi s, p i n elektrona. Ti prijelazi prikazani su slikom 7. Druge dvije vrste prijelaza su oni koji uključuju d i f elektrone te elektronski prijenos naboja. Ukoliko je razlika između dvaju elektronskih nivoa mala, da bi se elektroni pobudili potrebna je niža frekvencija i dulja valna duljina. Slijedi da je apsorbirana energija obrnuto proporcionalna valnoj duljini (7).

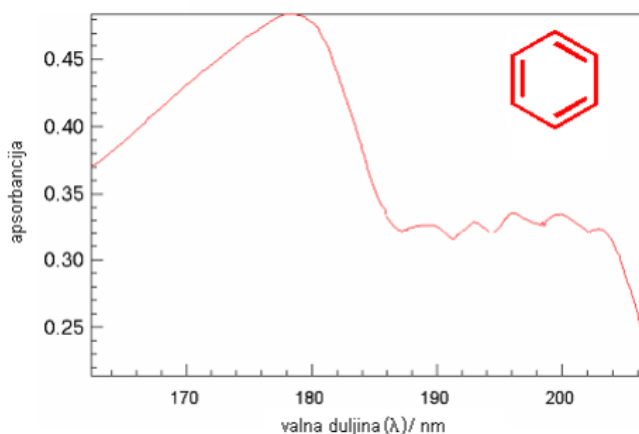
$$\Delta E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (7)$$

Slika 7. Mogući prijelazi s, p i n elektrona<sup>16</sup>

Najčešće, prijelazi najniže energije su ujedno i najvažniji. Molekule sa  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  prijelazom ne posjeduju slobodne elektronske parove i takav prijelaz zahtjeva najveću energiju. Molekule sa slobodnim parom ostvaruju  $n \rightarrow \sigma^*$  prijelaz i niže su energije potrebne nego u  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  prijelazu. Najveći broj prijelaza ostvaruju molekule koje posjeduju nezasićenu skupinu s  $\pi$  elektronima i taj prijelaz odgovara  $n \rightarrow \pi^*$ .<sup>16</sup>

#### 4.2.2. Beer-Lambertov zakon

Molekule različito apsorbiraju svjetlo zbog različite orbitalne strukture. Dio svjetlosti koji biva propušten kroz uzorak bilježi se odgovarajućim detektorom kao funkcija valne duljine. Rezultat toga je UV/Vis spektar.

Slika 8. UV/Vis spektar benzena<sup>16</sup>

UV/Vis spektar je grafički prikaz ovisnosti apsorbancije tvari o valnoj duljini zračenja. Apsorbancija ovisi o molarnom apsorpcijskom koeficijentu  $\epsilon$ , koncentraciji tvari i duljini puta zračenja, što je iskazano Beer-Lambertovim zakonom. Zbog linearne ovisnosti apsorbancije o koncentraciji moguće je korištenje UV/Vis spektroskopije za kvantitativnu analizu. Beerov zakon se temelji na činjenici da je apsorbancija proporcionalna koncentraciji sastojka koji apsorbira svjetlost i opisan je izrazom (8).<sup>17</sup>

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon lc \quad (8)$$

$A$  - apsorbancija

$\epsilon$  - molarni apsorpcijski koeficijent

$I_0$  - intenzitet upadne svjetlosti

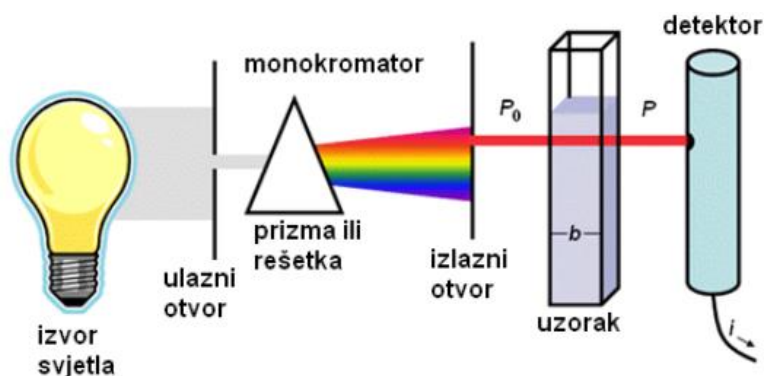
$I$  - intenzitet propuštene svjetlosti

$l$  - duljina puta (kivete)

$c$  - koncentracija

#### 4.2.3. Instrumentacija i otapala

Instrument koji se koristi u UV/Vis spektroskopiji se naziva UV/Vis spektrofotometar. Osnovni dijelovi uređaja su izvor zračenja, monokromator i detektor te su prikazani slikom 9.

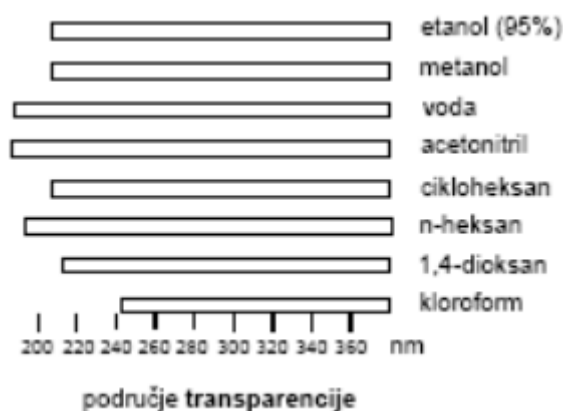


Slika 9. Shematski prikaz spektrofotometra<sup>16</sup>



U apsorpcijskim spektrofotometrima snop zračenja dolazi na uzorak tek nakon što prođe kroz selektor valnih duljina. Zračenje prolaskom kroz taj dio uređaja disperzijom prelazi iz snopa u pojedinačne valne duljine, a iz monokromatora i na uzorak dolazi zračenje točno određene valne duljine. Detektor na kraju očitava intenzitet propuštenog zračenja.

Kada bi otapalo, u kojem je otopljen uzorak, apsorbiralo zračenje u istom području kao analit, dobiveni spektar ne bi mogao dati točne podatke za kvantitativni izračun. Zato se koriste otapala koja su prozirna u području u kojem analit apsorbira i otapala koja mogu otopiti dovoljnu količinu uzorka za dobivanje dobrih maksimuma. Polarnost otapala je isto tako jedan od kriterija jer uzrokuje pomak apsorpcijskog maksimuma prema većim ili kraćim valnim duljinama ovisno o stvaranju vodikovih veza.<sup>15</sup> Hipsokromni pomak je pomak prema kraćim valnim duljinama, a batokromni prema duljim valnim duljinama. Slika 10. prikazuje najčešće korištena otapala u UV/Vis spektroskopiji i njihovo područje transparentije.



Slika 10. Područje transparentije najčešće korištenih otapala u UV/Vis spektroskopiji<sup>16</sup>

### 4.3. NMR SPEKTROSKOPIJA

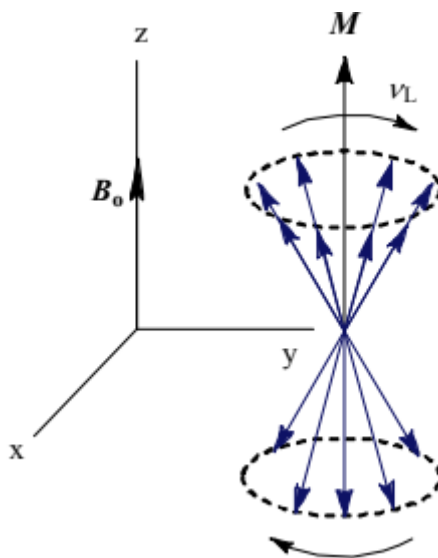
NMR spektroskopija, punim imenom spektroskopija nuklearne magnetne rezonancije, analitička je tehnika za određivanje strukture bioloških, organskih i anorganskih molekula. Predmet proučavanja su jezgre koje posjeduju svojstvo spina različitog od nule poput  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ .

#### 4.3.1. Spinska interakcija

Dva kvantna broja opisuju jezgru: kvantni broj nuklearnog spina  $I$  i nuklearni magnetni spinski kvantni broj  $m_I$  koji opisuje orijentaciju spina u magnetnom polju maksimalnog broja orijentacija  $2I + 1$ . Da bi se ostvario prijelaz iz stanja  $m_I$  u stanje  $m_{I+1}$ , potrebna je energija koja odgovara razlici između ta dva spinska stanja (9).

$$\Delta E = E(m_I+1) - E(m_I) = h\nu_L = h\nu_{\text{fotona}} = E_{\text{fotona}} \quad (9)$$

Frekvencija fotona odgovara Larmontovoj frekvenciji kojom spinovi precesiraju oko vektora magnetnog polja smjera +z osi. Takav vektorski prikaz opisuje vektorski model i shematski je prikazan slikom 11.



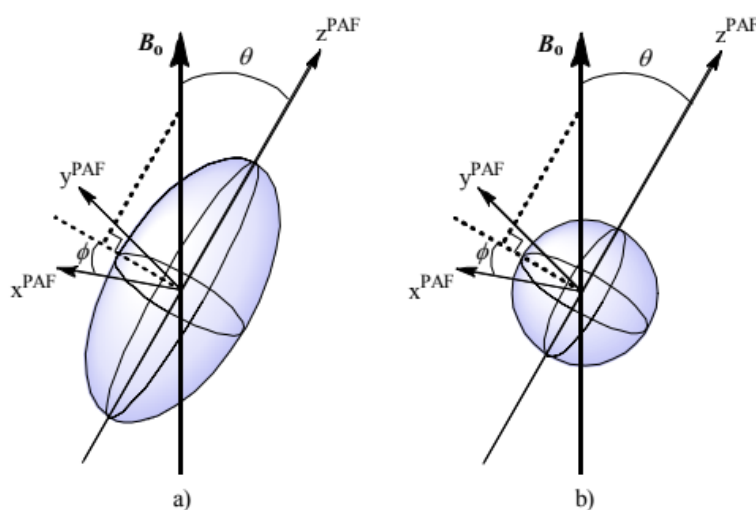
Slika 11. Precesija spinova u vektorskom modelu<sup>13</sup>

Izorno pravilo aktivnosti jezgre uvjetuje da kvantni broj nuklearnog spina bude pozitivan. NMR spektroskopiju najviše zanimaju jezgre koje imaju spin jednak  $I = \frac{1}{2}$ . Ukoliko je takav orijentiran u smjeru magnetnog polja, energija će biti manja od onog koji je orijentiran u suprotnom smjeru. Kvantni broj nuklearnog spina ovisi o atomskom (Z) i masenom (A) broju jezgre na način prikazan tablicom 2.

Tablica 2. Kvantni broj  $I$  za različite kombinacije atomskog i masenog broja

A	Z	$I$
paran	neparan	n
neparan	ne(paran)	n/2
paran	paran	0

Između jezgara sa spinom  $I = \frac{1}{2}$ , djeluju samo magnetne interakcije koje uključuju kemijski pomak i spin-spin sprezanje. Drugi tip interakcija su električne. Kemijski pomak može biti izotropnog i anizotropnog karaktera koji je posljedica nesferne raspodjele elektrona oko jezgre. U otopinama govorimo samo o izotropnom doprinosu jer su translacijska i rotacijska gibanja molekula jako brza. Izotropni doprinos se u koordinatnom sustavu prikazuje kuglom (slika 12.).

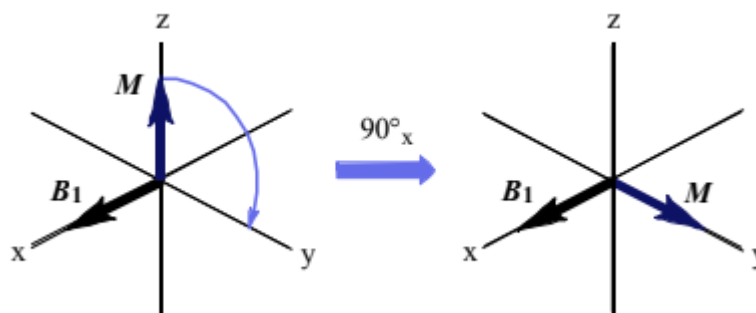


Slika 12. Spinske interakcije a) anizotropnog karaktera i b) izotropnog karaktera<sup>13</sup>

## 4.3.2. Pulsevi

Spinovi jezgri u NMR spektroskopiji se pobuđuju dvjema tehnikama: tehnikom kontinuiranog vala i pulsnom tehnikom. Suvremena spektroskopija se temelji na primjeni pulseva kod kojih razlikujemo radiofrekvencijske i gradijentne pulseve. Svaki puls obilježava njegova pulsna širina i pulsni kut za koji će se zarotirati vektor ukupne magnetizacije. Izraz (10) prikazuje ovisnost pulsno g kuta ( $\vartheta$ ) o pulsnoj širini ( $\Delta t$ ), magnetožirnom omjeru  $\gamma$  i jakosti magnetnog polja ( $B_1$ ), a slika 13. primjer rotacije vektora primjernom pulsa od  $90^\circ$ .

$$\vartheta = \gamma B_1 \Delta t \quad (10)$$



Slika 13. Rotacija vektora magnetizacije za  $90^\circ$  sa x na y os primjerom pulsa od  $90^\circ$ <sup>13</sup>

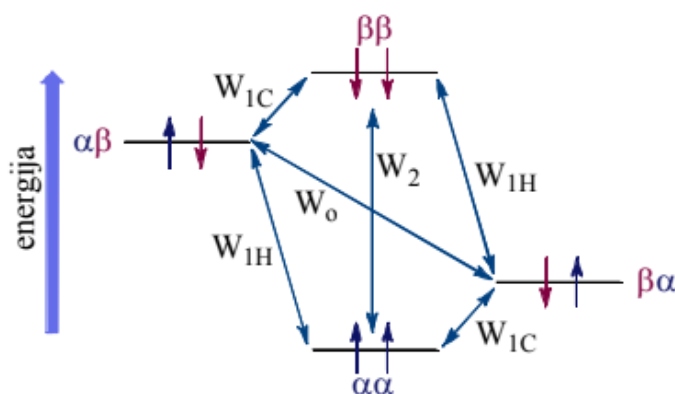
Radiofrekvencijski pulsevi se dijele na meke i tvrde pulseve. Odabir ovisi o tome je li je potrebna pobuda svih jezgri ili samo nekih. Prema Heisnebergovom načelu, raspon vrijednosti frekvencije na koju utječe pulsna širina je  $1/\Delta t$ . Prema tome, kratki pulsevi se koriste za pobudu što više jezgara, dok se dugi pulsevi manje snage mogu koristiti za selektivnu pobudu.

Gradijentni pulsevi imaju primjenu u brzom i jednostavnoj NMR analizi. Pomoću njih je moguće odabrati željeni signal samo jednim pulsom. Tehnika se temelji na primjeni dodatnog magnetnog polja i gradijenta koji defokusira i refokusira magnetizaciju. Spektar će biti vidljiv samo ako spinovi imaju koherenciju u fazi.<sup>13</sup>

## 4.3.3. Nuklearni Overhauserov efekt (NOE)

NOE je značajan efekt u NMR spektroskopiji jer omogućuje bolji uvid u 3D strukturu molekule. Opisuje se kao promjena intenziteta rezonancije određenog spina zbog promjena u ravnotežnoj napućenosti spinova druge jezgre. Efekt vrijedi ukoliko su procesi povezani mehanizmom križne relaksacije.

Mehanizam križne relaksacije prikazan je slikom 14. kao mehanizam  $W_0$  i  $W_2$ . Takav prijelaz je zabranjen izbornim pravilom prema kojem je dopuštena promjena orijentacije samo jednog spina i mehanizmi koji to prikazuju su  $W_{1H}$  i  $W_{1C}$ . Križna relaksacija opisana  $W_0$  mehanizmom, dovodi do pozitivnog efekta i povećanja intenziteta signala, dok za  $W_2$  vrijedi obrnuto, smanjenje intenziteta i negativni NOE.<sup>13</sup>

Slika 14. Mogući prijelazi spinova<sup>13</sup>

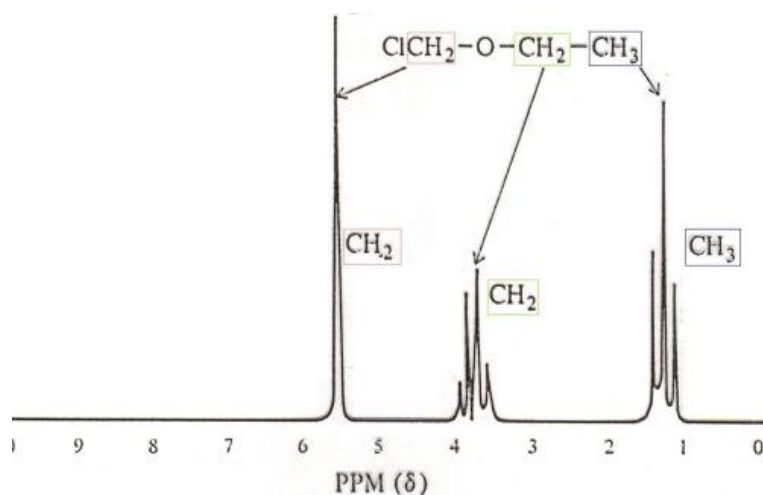
## 4.3.4. Jednodimenzijske tehnike NMR

Postoje jednodimenzijske i dvodimenzijske NMR tehnike. Primjer jednodimenzijskih su:  $^1\text{H}$ , *off resonance*  $^{13}\text{C}$ , INEPT i APT, dok u dvodimenzijske tehnike ubrajamo: COSY, HMQC, HSQC, ROESY, NOESY i druge.<sup>13</sup> U jednodimenzijskoj NMR spektroskopiji, signali su najčešće funkcija kemijskog pomaka i ovisno o položaju i intenzitetu se određuje prisutnost pojedinih skupina.

Kemijski pomak odražava elektronsku okolinu jezgre i posljedica je činjenice da jezgre nisu pod utjecajem primijenjenog magnetskog polja  $B_0$  već polja koje nastaje kao superpozicija primijenjenog i induciranog polja  $B_{\text{ind}}$ . Inducirano polje nastaje gibanjem elektrona u smjeru suprotnom od smjera primijenjenog polja. Kemijski pomak je kompleksan

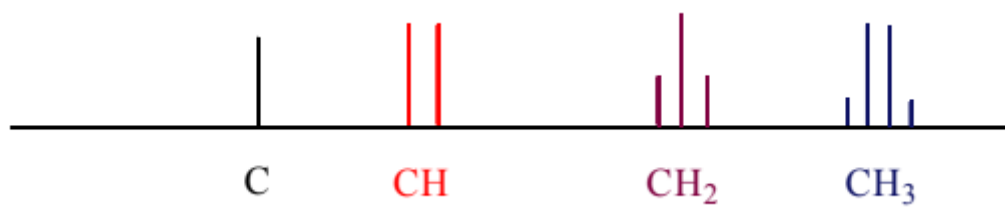
i ovisi o nekoliko doprinosa: dijamagnetnom, paramagnetnom i anizotropiji susjedni atoma, a izražava se kao pomak signala u odnosu na referentni signal. Referentni signali su različiti za različite jezgre i otapala, a u jednodimenzijskim  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR tehnikama kao referentni uzorak se koristi tetrametilsilan (TMS). Ono što prikazuje  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  spektar jesu signali kemijski neekvivalentnih protona i ugljika spoja.

$^1\text{H}$  spektar daje prve informacije o molekulskoj strukturi. Svaki spektar opisan je brojem signala, intenzitetom i cijepanjem. Protoni koji su odsjenjeni, imaju veći kemijski pomak i nalaze se pri većim frekvencijama u spektru. Zasjenjeni pak, imaju manji pomak i nalaze se pri nižim frekvencijama. Broj signala u spektru ovisi o broju neekvivalentnih protona. Ekvivalentni protoni će imati isti pomak i istu kemijsku okolinu stoga se u spektru javlja samo jedan signal. Područje ispod signala proporcionalno je broju protona, a multiplicitet ovisi o sprezanju sa susjednim protonima.



Slika 15.  $^1\text{H}$  NMR spektar etoksiklormetana<sup>16</sup>

Intenzitet signala  $^{13}\text{C}$  jezgre je oko 6400 puta slabiji od  $^1\text{H}$  signala. Raspon kemijskog pomaka je od 1 do 200 ppm, a sprezanja  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  nisu vidljiva. Broj signala jednak je broju različitih ugljikovih atoma. Multiplicitet ugljikovih atoma određuje se tehnikom *off resonance*  $^{13}\text{C}$  NMR kojom se dobiva spektar u kojem je signal svakog ugljika spregnut s protonom vezanim na njega. Sprega je ostvarena preko jedne veze, a cijepanje je po pravilu  $n+1$ , gdje je  $n$  broj protona vezanih na ugljik (slika 16).<sup>16</sup>



Slika 16. NMR signali ugljikovih atoma različitog multipliciteta <sup>13</sup>

## § 5. LITERATURA

1. P. Mura, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **101** (2014) 238–250.
2. M. Jug, M. Bećirević-Laćan, *Farm. Glas.* **58**, (2007) 227–243.
3. <http://eskola.chem.pmf.hr/odgovori/odgovor.php3?sif=16601> (datum pristupa 13. kolovoza 2021.)
4. D. A. Skoog, D. M. West, J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb 1999, str. 516–619., 645–716.
5. T. Marković, *Kvalitativno i kvantitativno određivanje zolmitriptana u tabletama uporabom kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezane sa spektrometrom masa*, Diplomski rad, Medicinski fakultet i kemijsko tehnološki fakultet, Split, 2019. str. 3–6.
6. T. Kupiec, *Int. J. Pharm. Comp.* **8** (2004) 223–227.
7. R. E. Ardrey, *Liquid Chromatography –Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley & Sons, Huddersfield, 2003, str.12–16.
8. V. R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, 5<sup>th</sup> edition, St. Gallen, 2010, str. 8, 91–96.
9. [https://www.hkmb.hr/clanovi/tecajevi/2018/Analiticke%20tehnike/prezentacije/02\\_Jasna%20Pavela%20-%20Elektroforeza%20serumskih%20proteina.pdf](https://www.hkmb.hr/clanovi/tecajevi/2018/Analiticke%20tehnike/prezentacije/02_Jasna%20Pavela%20-%20Elektroforeza%20serumskih%20proteina.pdf) (datum pristupa 15. kolovoza 2021.)
10. M. Damić, B. Nigović, *Farm. Glas.* **66** (2010) 195–207.
11. M. Sertić, *Određivanje onečišćenja u lijekovima kapilarnom elektroforezom*, Specijalistički rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016, str. 16–38.
12. IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology ("Gold Book")*, 2<sup>nd</sup> edition (sastavili A. D. McNaught i A. Wilkinson), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.
13. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA, Varaždin, 2013, 1–30.
14. C. De Caro, C. Haller, *UV/VIS Spectrophotometry - Fundamentals and Applications*, 2015, str. 4–9.
15. D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz, *Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry*, 3<sup>rd</sup> edition. Washington, 2001., str. 353–361.



16. T. G. Kraljević, *Određivanje struktura organskih spojeva*, Nastavni tekst, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu.