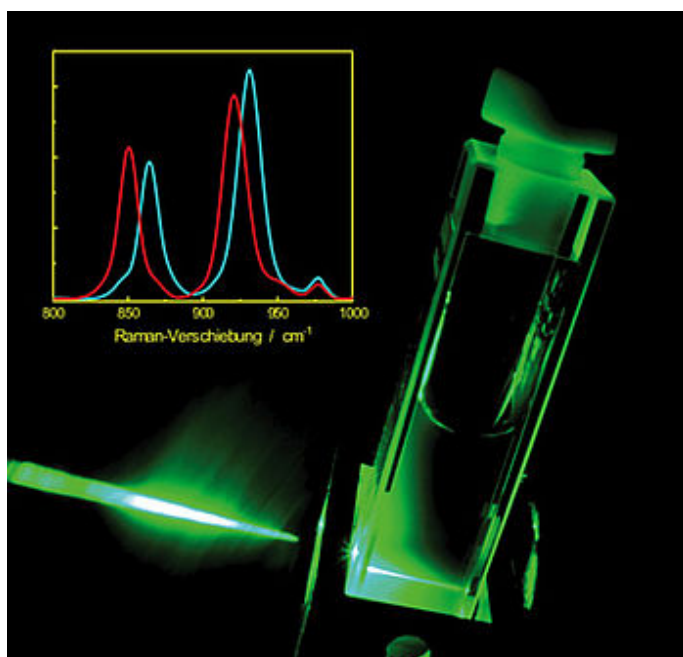


ИНСТРУМЕНТАЛНИ МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗА



интерна скрипта за студентите од УГД Штип

Рубин Гулабоски
Виолета Иванова Петропулос
Универзитет Гоце Делчев-Штип,
Штип, 2014 година

Вовед

Инструменталните методи за анализа на даден примерок се техники овозможуваат развој на аналитички постапки за карактеризирање на својствата на различни примероци за анализата и нивните составни делови. Овие аналитички процедури се користат за да се обезбеди широк спектар на информации за различни карактеристики на примерок за анализата (крв, плазма, урина...) и сл, вклучувајќи го нивниот состав, структура, физичко-хемиските својства и нивните сензорни карактеристики. Овие информации се од клучно значење за разбирање на факторите од кои зависат својствата на примерок за анализата, како и на нашата способност да се анализира примерок што може да го менува својот состав, за кратко време. Целта на овој курс е да се разгледаат основните принципи на аналитичките постапки што најчесто се користат при анализа на примероци од крв, плазма, урина, при што ќе се дискутира за примената на некои аналитички методи за определување на специфични компоненти во примерок за анализата, на пример, липиди, протеини, вода, јаглени хидрати, минерали, хемоглобин и сл.

Некои од критериумите што се важни при селектирањето на соодветна аналитичка техника се:

Прецизност-претставува мерка за способноста за репродуцирање на инструменталниот одговор при определувањата направени од аналитичарот со употреба на истата инструментација и истата инструментална постапка.

Репродуцибилност-е мерка за способноста да се репродуцира еден инструментален одговор од аналитичари што работат со иста инструментација и иста експериментална постапка, но, во различни лаборатории.

Точност-е мерка за тоа колку блиску аналитичарот може да дојде до точната вредност на мереното својство кај анализираниот примерок.

Цена на чинење-вкупната цена на чинење на анализата што ги вклучува потрошените реагенси, употребената инструментација и приходите на работниците што ги изработуваат анализите.

Брзина-е времето што е неопходно за да се направат анализите на бараната компонента во примерокот за анализа.

Сензитивност-е мерка за најниската концентрација на дадена компонента што може да се определи со дадена постапка.

Специфичност-е мерка за способноста да се детектира и квантифицира специфична компонента во присуство на други слични компоненти. Пр: определување на фруктоза во присуство на глукоза и сахароза и сл.

Безбедност-е мерка за употреба на реагенси што не се токсични или запаливи.

Природа на матриксот од примерок за анализата-составот, структурата и физичките својства на компонентите што се содржат во матриксот на примерокот за анализа многу често влијаат на изборот на метод за анализа на даден аналит. Доколку постојат повеќе алтернативни методи за мерење на дадено својство на примерок за анализата, тогаш изборот на дадена метода ќе зависи од тоа кој од горе наведените критериуми е најважен. Така на пример, многу често ќе се избере методата што дава најточни податоци а при некои анализи ќе се избере и најбрзата метода.

Некои дефиниции што се употребуваат во Инструменталните анализи:

АНАЛИТ - примерок што се анализира

КВАЛИТАТИВНА АНАЛИЗА – анализа на квалитативниот состав (јаглехидрати, масти, минерални материи...) што се присутни во аналитот

КВАНТИТАТИВНА АНАЛИЗА – анализа на СОДРЖИНАТА (количината) на одредни сусптанци што се определуваат во аналитот

2. Земање на примероци и анализа на податоци

2.1 Вовед

Анализата на својствата на примероци за анализа во медицината (крв, крвна плазма, урина и сл.) зависи од успешното комплетирање на повеќе различни чекори: планирање (определување на најсоодветната аналитичка постапка), избор на примерок, подготовка на примерок, изведување на аналитичката постапка, статистичка анализа на податоците и презентација на податоците. Сите овие сегменти ќе бидат подетално елаборирани во поглавјата што следат.

2.2. Селекција на примерок

Аналитичарите што го обработуваат примерокот за анализа многу често треба да ги определат својствата на голем број на компоненти што се наоѓаат во различна форма во примерокот. За да се добие точна вредност на мерените својства што се од интерес, во идеален случај би требало да се анализира целокупниот материјал (примерок) што стои на располагање. Но, со цел да се заштеди на време и материјал, нормално е да се избере репрезентативен примерок од целиот материјал (дел од крвта дадена од пациентот, дел од урината и сл) за анализа и да се претпостави дека својствата на земениот примерок ќе важат за целиот материјал. Селектирањето на соодветна фракција од целокупниот материјал е еден од најважните чекори при анализата на примерок за анализата и тоа може да доведе до големи грешки доколку се изведе на несоодветен начин.

Популација, примерок и лабораториски примерок

На ова место ќе дефинираме некои термини што треба да се употребуваат при карактеризацијата на примерок за анализата чии својства треба да се анализираат.

Популација: со овој термин се дефинира целокупниот материјал чии својства треба да бидат анализирани.

Примерок: од популацијата ние земаме само една фракција за анализа. Таа фракција се нарекува – примерок (аналит).

Лабораториски примерок: делот од примерокот што е неопходен за експериментите во аналитичката постапка.

Примарна цел при селекцијата на примерок за анализа е да се обезбеди примерок чии својства ќе бидат репрезентативни за својствата на целокупната популација. За да се обезбеди репрезентативен примерок најчесто се анализираат повеќе лабораториски примероци и притоа се земаат средните вредности од измерените својства.

Планирање на земање примероци

Со цел да сме сигурни дека лабораторискиот примерок земен за анализа ќе биде репрезентативен примерок за својствата на целокупната популација, неопходно е аналитичарот да направи план за земање на примерокот. Овој план треба да биде јасно напишан документ што содржи прецизни детали каде што аналитичарот ги опишува големината на примерокот, локацијата од каде примерокот е земен, методот што е употребен за собирање на примерокот како и методите што се користени за чување на примерокот до неговата анализа. Изборот на планот за земање примерок зависи од целта на анализата, од својствата што треба да бидат мерени, од природата на популацијата, како и од типот на аналитичката техника што треба да се користи. Некои од најважните сегменти при изборот на план за земање примероци, се дискутирани во наредните секции.

2.2.1. Цел на анализата

Примарен сегмент при одлучувањето за соодветен план за земање примероци е целта на анализата. Примероците може да се анализираат поради различни причини и тоа влијае и врз видот на планот на земање примероци.

Официјални примероци - можат да бидат селектирани при официјални барања од владини лаборатории. Овие примероци се анализираат со цел да се провери дали производителите произведуваат примерок за анализа со карактеристики и својства што се пропишани со легислатива. За ваквите анализи обично се применува пропишан аналитички протокол за земање на примероци за анализа.

Примероци за анализа земени во текот на процес на лечење - многу често примерок за анализата се анализира во текот на процесот на лечење на пациентот, со цел да се утврди дали процесот соодветно функционира. На тој начин, доколку се утврди некој проблем, можно е да се направат соодветни промени уште во текот на процесот на лечење со цел да се постигне бараниот ефект на лекот што се применува на пациентите.

Природа на мерените својства

Откако ќе биде утврдена причината поради што се врши анализата на даден примерок за анализата, неопходно е јасно да се специфицира даденото својство што ќе биде мерено, на пр: тежината, присуството на надворешни материи, содржината на масти, содржината на микроорганизми и сл. Својствата на примероците за анализата можат да се класифицираат како: *постојани и променливи*.

Постојано својство е нешто што анализот или го има или го нема. На пр. примерок за анализата или содржи тешки метали, жива кадмиум, или не содржи. Како варијабилни својства најчесто се оние што можат да бидат измерени како на пр. масата, содржината на масти или содржината на влага во анализот. Природата на мереното својство ја определува сериозноста на мерениот резултат, доколку својствата на лабораторискиот примерок не се репрезентативни за целата популација. Така на пример, доколку мереното својство е присуство на штетни супстанции (бактерии, токсини и сл.), тогаш сериозноста во грешката при земањето на примерокот би била многу поголема отколку кога мереното својство би било некој квалитативен параметар како што е бојата, составот и сл. Тоа значи дека планот за земање примерок мора да е многу поригорозен при детекција на потенцијално штетни супстанции, отколку при определување на квалитативни параметри.

Природа на популацијата

При одлучувањето за типот на планот за земање примерок што треба да биде употребен многу е важно јасно да се дефинира природата на популацијата од која што ќе бидат земени примероци. Некои од главните чекори се дадени подолу.

Популацијата може да биде конечна или бесконечна.

Конечна популација е онаа што има дефинирана големина, како на пр. Примерок од крв, примерок од урина и сл.

Бесконечна популација е карактеристична за прехранбената индустрија, а ја нема во медицината. Анализата на конечната популација обично дава информации за својствата на популацијата додека при анализата на бесконечна популација се добиваат информации за карактеристиките на процесот.

Популацијата може да биде континуирана и сегментирана.

Континуирана популација е онаа каде не постои физичка сепарација помеѓу различните делови од примерокот. Пр. Хомогенизирана крв.

Сегментирана популација е онаа што може да биде поделена во повеќе сегменти, како на пр. Крвта може да се сепарира на повеќе делови-крвна плазма, крвен серум и сл.

Популацијата може да биде хомогена или хетерогена.

Хомогена популација е онаа чии што својства на индивидуалните примероци се идентични на секоја локација од материјалот (пр. Воедначен состав на добро измешана крв), додека пак *хетерогена популација* е онаа во којашто својствата на поединечните примероци варираат со локацијата (неизмешан примерок на крв што стои подолго време). Во пракса најголем број од популациите се хетерогени па секогаш мора внимателно да се селектираат индивидуални примероци земени од различни локации на популацијата. На тој начин ќе добиеме релевантни информации за својствата на целокупната популација.

2.2.4 Природа на постапката за тестирање

Природата на постапката што се употребува за анализа на примерок за анализата исто така може да влијае врз изборот на планот за земањето примерок за анализа. На пример, важни параметри при овој избор се брзината на анализата, точноста, прецизноста, трошоците, како и тоа дали техниката што се употребува е деструктивна или не.

2.2.5. Разработка на план за земање примерок

Откако ќе бидат земени во предвид горенаведените фактори, потребно е да се изработи план за земање примерок што ќе биде најсоодветен за бараната апликација.

Некои од карактеристиките што најчесто се специфицираат во официјалниот план за земање примероци се дадени во наредната дискусија.

Големина на примерокот. Големината на примерокот што се селектира за анализа зависи од очекуваните варијации на својството што треба да се мери во рамките на популацијата, од природата на крајниот резултат, од цената на чинење на анализата, како и од видот на аналитичката техника што ќе се применува за анализа. Така на пример, може да се разработи статистичка метода која ќе ни овозможи планирање на земањето примерок, со цел постапката да биде репрезентативна и веродостојна. Многу често, големината на примерокот е доста голема, и при ваквите случаи се користи метода на т.н. *секвенционално земање на примерок*. На овој начин, примероците селектирани од популацијата се испитуваат секвенционално се додека резултатите што се добиваат се погодни за статистичка обработка (да има добра повторливост и репродуцибилност во мерењата). Така на пример, примероците се анализираат се додека односот на добрите и лошите својства не падне во дадена статистичка граница што ќе ни покаже дали дадената популација може да биде прифатена или одбиена.

Локација на примерокот. Кај хомогените популации не е важно од каде е земен примерокот за анализа, бидејќи сите примероци земени од било кое место на популацијата имаат исти својства. Кај хетерогените популации, пак, локацијата од каде што се земаат примероците е многу битен фактор. Така, при земањето на примероци по *случаен избор* примероците се бираат случајно од било која локација на популацијата што треба да биде анализирана. Овој начин на земање на примероци е доста згоден поради тоа што се избегнува субјективноста на човечкиот фактор што го прави земањето на примерокот. Тоа во голема мера го олеснува статистичкиот апарат што се применува при анализата на податоците.

Во систематското земање на примерок, примероците се земаат систематски на дефиниран начин при дефинирано време. Така на пример, може да се земаат

примероци за крв за анализа примероци на секои 2 часа или на секои 6 часа или на секои 12 часа и да се следат параметрите во тие примероци, со цел да се осознае како се развива некоја болест или дали дадена терапија има ефект. Овој начин на земање на примероци е многу лесен да се имплементира, меѓутоа многу е битно да бидеме сигурни дека при ваквиот начин не постои корелација помеѓу брзината на земање на примероците и својствата на земените примероци за анализа. Во т.н. *земање на примерок од експерт*, примероците за анализа ги зема аналитичар кој има големо искуство во својата работа и тоа го прави по своја проценка.

Многу често, кај овој тип на земање на примерок статистичкиот апарат може да биде неприменлив доколку аналитичарот не ги земе примероците на начин што би бил репрезентативен за целата популација.

Начин на селекција на примероци. Селектирањето на примероци за анализа може да се врши мануално или механички со посебни уреди наменети за таа функција. Начинот на кој се врши селектирањето на примероците обично е пропишан и дефиниран во планот за земање на примероци.

2.3 Подготовка на лабораториските примероци

Откако ќе го селектираме примерокот што треба да ги претставува својствата на целата популација, потоа мораме истиот примерок да го подготвиме за анализа во лабораторија. Подготовката на примерокот за анализа мора да се одвива на многу внимателен начин со цел да имаме прецизни и веродостојни резултати од експерименталните мерења.

2.3.1 Хомогенизирање на примерокот за анализа

Материјалот од примерок за анализата внатре во *примерокот* што е селектиран од *популацијата* обично е хетероген, т.е. неговите својства варираат од една до друга точка (локација) во примерокот. Хетерогеноста внатре во примерокот за анализа може да биде предизвикана од варијациите во својствата на различните делови внатре во примерокот. Бидејќи хетерогеноста на примерокот би довела до својства што не би биле репрезентативни за целиот примерок, потребно е да се изврши хомогенизирање

на примерокот пред тој да биде анализиран. Постојат голем број на механички алатки што се дизајнирани за хомогенизација на примерок за анализа од најразличен вид и употребата на овие машини зависи пред се од природата на примерокот за анализа (дали примерокот е во течна или цврста агрегатна состојба). Хомогенизирањето, освен по механички пат може да се изврши и по хемиски или биолошки пат, со употреба на ензими, емулгатори, дисперзирачки супстанции, детергенти и сл.

2.3.2. Редукација на големината на примерокот

Откако примерокот ќе биде хомогенизиран, се селектира мала количина од таквиот хомогенизиран примерок за да биде анализиран. Тој фрагмент од примерокот што е одбран да биде анализиран се нарекува *лабораториски примерок*. Во идеален случај, лабораторискиот примерок треба да има својства што ќе бидат репрезентативни за целата популација. Плановите за земање примерок многу често подразбираат и методи за намалување на големината на примерокот со цел да се добијат веродостојни и повторливи резултати.

2.3.3. Превенција на примерокот од промени

Откако примерокот за анализа ќе биде селектиран, мораме да бидеме сигурни дека неговите својства нема да претрпат значителни промени од моментот на земањето на примерокот до моментот на почетокот на хемиската или микробиолошката анализа.

Постојат голем број на начини на кој овие промени во својствата на примерокот може да бидат спречени.

Ензиматска деактивација. Голем број на компоненти од аналитите содржат активни ензими што можат да предизвикаат промени во својствата на примерок за анализата. Такви се на пример: протеазите, целулазите, липазите и слични други ензими. Доколку некој од овие ензими е активен и може да предизвика промена во својствата на примерокот земен за анализа, тоа ќе доведе до грешни податоци при постапката на анализа. Тоа значи дека активноста на присутните ензими во примерок за анализата треба да биде намалена или елиминирана. Замрзнувањето, сушењето, термичкиот третман, употребата на хемиски конзерванси, или комбинација на овие техники се најчесто применуваните методи за контрола на активноста на ензимите.

Заштита на липидите. Својствата на незаситените масни киселини во составот на липидите може да бидат променети со различни реакции на оксидација. Изложеноста на светлина, зголемените температури и присуството на кислород или оксиданти (рекативни честички на кислородот) најчесто доведуваат до забрзување на брзината на оксидација на липидите. Со цел да се спречи појавата на оксидација на липидите, потребно е да се изврши соодветно складирање на примероците што во својот состав содржат поголема количина на незаситени масни киселини. Најчесто ваквите примероци се чуваат во атмосфера на азот или на некој друг инертен гас, и истите се складираат во мрачни простории и на ладни места. Многу често во ваквите примероци се додаваат и антиоксиданти, односно супстанции што ја спречуваат оксидацијата на липидите.

Микробиолошко загадување. Микроорганизмите обично се присутни во голем број на аналити (крв, урина), и доколку нивната концентрација не се контролира на стриктен начин, може да предизвикаат промена на составот на примерок за анализата. Ладењето, термичкиот и хемискиот третман на примероците за анализа се најчесто употребувани методи за да се спречи растењето и размножувањето на микроорганизмите присутни во примероците за анализа.

Физички промени. Во примероците што се земаат за анализа може да се случат голем број на физички промени како што се губење на вода, кристализација на вода и сл. што може да доведе до промени во структурата на примерокот. Физичките промени може да се минимизираат најчесто преку контрола на температурата на која што се чува примерокот.

2.3.4. Идентификација на примерокот

Лабораториските примероци за анализа секогаш мора да бидат внимателно означени и обележани. На тој начин, доколку се појави некој проблем од било каква природа, потеклото на тој проблем може релативно лесно да биде детектирано.

Информациите што се користат за идентификација на примероците се:

- а) опис на примерокот
- б) времето кога е земен примерокот
- в) локацијата од која што е земен примерокот

г) име на лицето што го зело примерокот

д) методот што е користен за селектирање на примерокот.

Аналитичарот секогаш треба да си води забелешки во својот лабораториски дневник, каде што јасно ќе ги забележува и документира методите за селекција на примерокот за анализа и постапките применети за подготовка на примерокот за анализа.

Секој примерок за анализа треба да биде означен со код или *баркод* на неговата етикета и истиот тој код мора да стои и во дневникот на аналитичарот. Така, доколку се појават некои проблеми истите може лесно да бидат идентификувани.

2.4. *Анализа на податоците*

При анализата на примерок за анализа обично се прават поголем број на мерења врз селектираниот примерок за анализа и истите се повторуваат неколку пати. Тоа се прави за да се обезбеди веродостојност на добиените резултати на мерените својства. Постојат голем број на статистички методи што се користат за обработка на добиените податоци од повеќекратните анализи на примероците за анализа.

2.4.1. *Мерка за централната тенденција на податоците*

Статистичкиот параметар што најчесто се употребува за опишување на сите својства добиени од повеќе експериментални мерења е **средната вредност**:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (1)$$

овде n е вкупниот број на мерењата, x_i се индивидуалните измерени величини на својството што се мери а $\bar{x}$ е симбол за средната вредност.

Средната вредност е најдобрата експериментална пресметка за вистинската вредност на мереното својство што може да се определи од мерењата. Средната вредност не мора да кореспондира со вистинската вредност на мереното својство. Тоа е така поради систематски грешки што секогаш се појавуваат при процесот, и тие доведуваат до тоа да не можеме со точност да ја измериме вистинската вредност на бараното својство.

Прецизността е термин што се однесува на тоа колку мерените вредности на бараното својство се блиску до *вистинската* вредност на тоа својство. Проблемот со определувањето на прецизността лежи во тоа што вистинската вредност на мереното својство во голем број случаи не е позната. За да се надмине овој проблем, најчесто се купуваат и употребуваат стандарди со познати својства. Притоа, овие стандарди се анализираат на ист начин како и примерок за анализата што е предмет на испитување. Апсолутната грешка E_{abs} , што е дефинирана како разлика помеѓу вистинската (x_{true}) и измерената вредност на мереното својство (x_i), може да се определи од следниот израз: $E_{\text{abs}} = (x_i - x_{\text{true}})$. Поради овие причини, аналитичките инструменти што се употребуваат за анализа на примерок за анализата мора да бидат внимателно одржувани и калибрирани со цел да се обезбеди дека тие прописно функционираат и даваат веродостојни резултати од мерењата.

2.4.2. Мерка за расејувањето на податоците

Расејувањето на податоците е мерка за тоа колку близу еден до друг се податоците од последователните мерења на мереното својство. Најчесто, **мерка за расејувањето на податоците** од последователните мерења е **стандардната девијација SD**.

Стандардната девијација определена за сет од последователни мерења е дадена со следната равенка:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Друг параметар што често се употребува за да ни даде информации за релативното расејување на податоците околу средната вредност е *коефициентот на корелација CV* што е дефиниран со следниот израз $CV = [SD / \bar{x}] \times 100\%$.

2.4.3. Извори на грешки при анализите

Најчесто постојат три извори на грешки во секоја аналитичка техника:

Персонални грешки. Овие грешки се случуваат кога даден аналитички тест не се спроведува коректно: можно е да се употребуваат погрешни хемиски реагенси или погрешна инструментација, можно е да има грешки во пресметките кај волуменот и масата, можно е примерокот земен за анализа да претрпел промени и сл. Поради овие причини, потребно е мерењата да се вршат повеќе пати и тоа на свежо припремени лабораториски примероци. Овие грешки најчесто брзо се забележуваат и може да се избегнат со повторување на постапката за анализа од почеток.

Случајни грешки. Овие грешки произведуваат податоци што може да варираат во нелогичен ред од едно до друго мерење. Овој тип на грешки ја определува и стандардната девијација од мерењата. Постојат голем број на вакви грешки и тие се дадени во поглавјето “Пропагација на грешките” во понатамошниот дел од скриптата.

Систематски грешки. Систематските грешки продуцираат резултати што конзистентно се разликуваат од вистинските вредности на мереното својство. Овие грешки се случуваат на пример кога пипетираме и кога волуменот на употребената пипета е различен од тој што стои на етикетата. 100 cm^3 , да речеме дека при пипетирање секогаш земаме 101 cm^3 . На тој начин правиме систематска грешка земајќи поголем волумен за анализа.

За да направиме точни и прецизни мерења, неопходно е при разработката на метода за анализа да се идентификуваат можните извори на грешки и истите да бидат минимизирани. Најчесто потребно е да се идентификува изворот на најголема грешка во секој поодделен чекор од постапката и да се отстрани тој извор на грешка.

2.4.4. Пропагација на грешките при анализата на примерок за анализа

Кај најголем дел од аналитичките процедури што се употребуваат при анализата на примерок за анализа постојат голем број на постапки (пр. вагање, мерење на волумен, и сл.), така што секогаш постои веројатност за грешки поврзани со секој чекор во постапката. Овие индивидуални грешки ја определуваат и големината на крајната целокупна грешка во крајниот резултат. За случајните грешки постојат голем број на едноставни правила од кои може да се пресмета грешката во крајниот резултат:

Собирање ($Z = X + Y$) и одземање ($Z = X - Y$):
$$\Delta Z = \sqrt{\Delta X^2 + \Delta Y^2} \quad (3)$$

Множење ($Z = X \times Y$) и делење ($Z = X/Y$):
$$\frac{\Delta Z}{Z} = \sqrt{\left(\frac{\Delta X}{X}\right)^2 + \left(\frac{\Delta Y}{Y}\right)^2} \quad (4)$$

Во горниот израз, ΔX е стандардната девијација од средната вредност X , ΔY е стандардна девијација на средната вредност од Y , и ΔZ е стандардната девијација од средната вредност од Z . Овие едноставни правила треба да се научат и да се употребуваат кога се пресметува вкупната грешка во крајниот резултат.

Да претпоставиме еден практичен пример каде сакаме да ја определиме содржината на МАСТИ во примерок за анализа. Да претпоставиме дека сме ја измериле масата на екстрахирани масти од примерок за анализата (M_E) и почетната маса на примерок за анализата (M_I):

$$M_E = 3.1 \pm 0.3 \text{ g}$$

$$M_I = 10.5 \pm 0.7 \text{ g}$$

$$\% \text{ масти} = 100 \times M_E / M_I$$

За да ја пресметаме средната вредност и стандардната девијација на содржината на масти во примерок за анализата, треба да го употребиме правилото дадено со равенката 4, т.е. ($Z = X/Y$).

На почеток препишуваме бројни вредности на различните параметри во соодветниот израз за пропагација на грешката:

$$X = 3.1; \Delta X = 0.3$$

$$Y = 10.5; \Delta Y = 0.7$$

$$\% \text{ масти} = Z = 100 \times X/Y = 100 \times 3.1/10.5 = 29.5\%$$

$$\Delta Z = Z \sqrt{[(\Delta X/X)^2 + (\Delta Y/Y)^2]} = 29.5\% \sqrt{[(0.3/3.1)^2 + (0.7/10.5)^2]} = 3.5\%$$

На овој начин, содржината на масти во примерок за анализата ќе биде $29.5 \pm 3.5\%$.

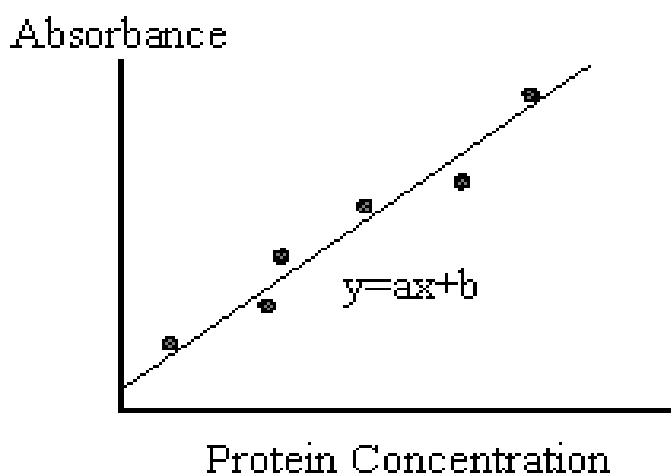
2.4.5. Значајни цифри и заокружување

Бројот на значајни цифри при прикажувањето на крајниот резултат зависи од стандардната девијација од мерењата. Крајниот резултат од мереното својство се прикажува со толку цифри за колку што се знае дека се точни заедно со последната цифра за која се знае дека не е точна. Така на пример, доколку претставиме некој резултат со бројна вредност од 12.13, тогаш знаеме дека бројот со цифрите 12.1 е точен, но последната цифра 3 од бројот 12.13 е несигурна, и таа би можела да биде или 2 или 4.

Кај операциите на множење ($Z = X \times Y$) и делење ($Z = X/Y$), значајните цифри во крајниот резултат (Z) треба да бидат еднакви со значајните цифри со бројот кој што има најмалку значајни цифри од броевите од кои крајниот резултат е добиен. Пример, 12.312 (5 значајни цифри) $\times$ 31.1 (3 значајни цифри) = 383 (3 значајни цифри). Кај операциите на собирање ($Z = X + Y$) и одземање ($Z = X - Y$), бројот на значајни цифри во крајниот резултат (Z) е определен од бројот од кој што бројната вредност на Z е добиена (X или Y) кој има помалку значајни цифри после децималната запирка. Така на пример, 123.4567 (последната значајна цифра е во "0.0001" децимална колона) + 0.31 (последната значајна цифра е во "0.01" децималната колона) = 123.77 (последната цифра е во "0.01" децималната колона). При заокружувањето на броевите, важи правилото дека кога последната значајна цифра после децималната запирка е помала од 5, тогаш таа цифра се заокружува на „0,,,“, додека кога таа цифра е „5,,“ или поголема од 5, тогаш се заокружува на следен цел број. Пример 23.453 ќе биде 23.45; 23.455 ќе биде 23.46; 23.458 ќе биде 23.46.

2.4.6. Стандардни „криви“: Регресиона анализа

При изведувањето на дадена аналитичка процедура за анализа на примерок за анализата, неопходно е да се подготват т.н. „стандардни криви,, што помагаат да се определи дадено својство на некој непознат материјал. Овие стандардни криви се конструираат со мерење на својствата на стандарди со позната концентрација, и со прикажување на големината на мереното својство во зависност од концентрацијата или масата на употребените стандарди. Така на пример, може да се мерат серија на идентични протеини со различна концентрација при што се добиваат податоци за апсорбцијата на електромагнетното зрачење што поминува низ тие стандардни раствори од протеините. Тоа може да се направи со примена на UV-видлив спектрофотометар. За раствори на протеини со ниска (микро или милимоларна) концентрација постои линеарна зависност помеѓу вредноста на апсорбанцата A и концентрацијата на протеините како што е прикажано на сликата:



Линијата што најдобро се вклопува при поврзувањето на сите точки добиени од мерењата се добива со т.н. регресиона анализа. Правата добиена на ваков начин има нагиб дефиниран како „ a ,, и отсечок на y -оската дефиниран како „ b ,,. И „ a ,, и „ b ,, се во суштина некои бројни вредности што ги добиваме од програмот што го користиме при регресионата анализа. Така, доколку ги знаеме вредностите на нагибот и отсечокот, кога вредноста на мереното својство „ y “ (апсорбанцата во нашиот случај) на примерокот со непозната концентрација на протеин ќе ја измериме експериментално, тогаш концентрацијата (масата) на непознатиот протеин можеме да ја добиеме

употребувајќи го изразот: $x = (y-b)/a$, каде x е означена концентрацијата на протеинот, а со y е означена апсорбанцата, додека „ a “ и „ b “ се вредностите на нагибот и отсечокот добиени од стандардната крива. Податок за тоа колку добро правата линија е во согласност со експерименталните податоци ни дава коефициентот на корелација r^2 , кој има вредности помеѓу 0 и 1. Колку вредноста на r^2 е поблиску до 1, толку „фитувањето“ (согласноста) на правата линија со експерименталните точки е подобро и обратно. Кога $r^2 = 1$ тогаш имаме идеално фитување. Сите комерцијални математички компјутерски програми имаат сопствен апарат од кој вредностите на нагибот, отсечокот и коефициентот на корелација се добиваат на многу едноставен начин.

2.4.7. Отфрлање на вредности

При изведувањето на експерименталните аналитички постапки често се појавува случај во кој една мерена точка драстично се разликува од останатите измерени точки. Тоа е резултат на одреден погрешен чекор при аналитичката постапка. Најчесто ваквите нелогични вредности се третираат како неточни и тие се отфрлаат. Постои математичка постапка која што може да ни каже дали една измерена вредност може да биде отфрлена или не. Тестот што се применува при вакви случаи се нарекува *Q-test*:

$$Q = \frac{X_{BAD} - X_{NEXT}}{X_{HIGH} - X_{LOW}}$$

Со X_{BAD} е означена вредноста што е сомнителна, X_{NEXT} е следната вредност што е најблиска до сомнителната вредност X_{BAD} , X_{HIGH} е највисоката измерена вредност, додека X_{LOW} е најниската измерена вредност. Доколку вредноста на Q е поголема отколку вредноста дадена во табелата за *Q-test* за бројот на примероци што се анализирани, тогаш сомнителната вредност може да биде отфрлена:

Број на мерења	Q-вредност за отфрлање на мерената вредност (90% ниво на веродостојност)
3	0.94
4	0.76
5	0.64
6	0.56
7	0.51
8	0.47
9	0.44

Пример, доколку имаме направено 5 мерења и притоа едно мерење било многу различно од другите (пример 20, 22, 25, 50, 21), и ако пресметаме (според дадената формула) дека Q-вредноста од овие мерења е 0.84, тогаш сомнителната вредност може да биде отфрлена, бидејќи пресметаната Q-вредност е поголема од 0.64, т.е. од Q-вредноста што е предвидена во Q-test табелата за пет мерења.

Вовед во инструменталните методи за анализа

Инструменталните методи за анализа заземаат доминантно место во современата контрола на квалитет на примерок за анализа, на природни, хемиски, фармацевтски и друг вид на производи, како и на контрола на животната средина и технолошките процеси. За правилна примена на инструменталните методи за анализа потребен е добро образован и обучен кадар, соодветен простор, опрема и организација на работата.

Најзначајните инструментални техники кои се применуваат за анализа на примероци од различна природа се: хроматографија (течна и гасна) поврзани со различни детектори, масена спектрометрија, ултра виолетова (УВ-ВИС) спектроскопија, електрохемиски техники, електрофореза, спектроскопски техники и сл. Во овој дел ќе посветиме внимание на техниките што најчесто се употребуваат за анализа на примероци од крв и урина и што служат за определување на релевантни параметри при биохемиските анализи.

Атомска спектроскопија

Определувањето на типот и содржината на минералите (метални јони) присутни во примероците за анализа е многу едноставно и брзо со помош на методите на атомска спектроскопија. Оваа метода скоро целосно ги истиснува традиционалните (класичните) волуметриски и гравиметриски методи за анализа на минерални материи.

Принципи на атомската спектроскопија

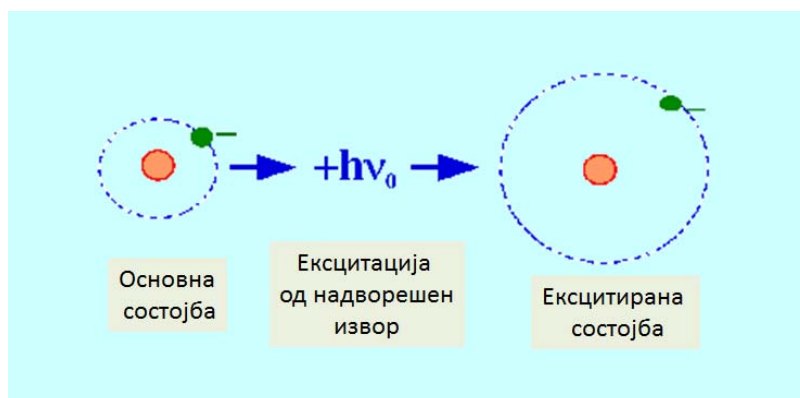
Примарна причина за апсорпција или емисија на зрачење во атомската спектроскопија се *електронските трансфери* во надворешните електронски слоеви на атомите. Примероците што се користат во атомската спектроскопија се елементарни атоми од хемиските елементи. Енергетските промени со премин на електрони помеѓу две енергетски нивоа, се поврзани со брановата должина на апсорбираното зрачење преку изразот: $\Delta E = hc / \lambda$ каде, h = Планкова константа, c = брзина на светлината, а λ бранова должина. На тој начин, за даден премин помеѓу две енергетски нивоа секогаш се апсорбира или емитира зрачење со точно определена бранова должина.

Секој хемиски елемент има уникатна (единствена) електронска структура, а со тоа има и уникатни енергетски нивоа во кои може да се наоѓаат електроните. Според тоа, секој елемент може да апсорбира само зрачење со специфични и точно определени бранови должини. Тоа значи дека секој елемент има свој сопствен електромагнетен спектар и тој спектар е сличен како отисоците на прстите. Овој феномен на специфични електронски спектри на атомите може да се примени за идентификација на секој поединечен елемент, бидејќи не постојат два идентични спектри од кои било елементи што се различни по природа. Бидејќи секој елемент апсорбира зрачење што има карактеристична бранова должина, ние можеме да избереме зрачење со точно дефинирана бранова должина и со тоа да извршиме точна идентификација само на еден хемиски елемент. Притоа, апсорпцијата на зрачењето се случува кога електрон од даден атом ќе премине од основната енергетска состојба во состојба со повисока енергија.

Емисијата на зрачењето се случува кога електронот што е во ексцитирана состојба се враќа назад во основната состојба. Бидејќи атомите можат да постојат во повеќе ексцитирани енергетски состојби, кај емисионите спектри на атомите постојат повеќе линии отколку кај апсорпционите спектри на атомите. Атомската спектроскопија е техника што дава податоци и за природата и за концентрацијата на голем број минерали присутни во примерокот за анализата. Природата на минералите се определува со мерење на положбата на пиковите во емисионите или апсорпционите спектри, додека пак концентрацијата на даден елемент се определува од интензитетот на линиите во спектрите. Редукцијата во интензитетот на еден електромагнетен бран, што поминува низ примерок за анализа е дадена со изразот: $A = -\log(I/I_0)$. Ова е познатиот Beer-Lambert закон кој може да се употреби за да се поврзе апсорбанцата со концентрацијата на непознат елемент во храната: $A = a \times b \times c$. Во овие изрази A е симбол за апсорбанца, a е т.н. екстинкционен коефициент, b е должина на киветата во којашто е сместен примерокот, а c е концентрацијата на мерениот хемиски елемент во растворот. Во пракса секогаш има отстапувања од горниот израз, па затоа секогаш се прават калибрациони криви со помош на стандарди. Во принцип, секогаш при анализите се пушта и слепа проба.

Атомска апсорпциона спектроскопија

Атомската апсорпциона спектроскопија (AAS) е аналитичка техника што се базира на апсорпција на UV-видливото зрачење од страна на слободни атоми што се наоѓаат во гасна состојба. Примерокот од примерок за анализа за анализа најпрво се минерализира, а потоа се преведува во воден раствор. Ваквиот раствор потоа се става во инструментот каде што се загрева и испарува, при што доаѓа до атомизација на минералите. Потоа, низ вака атомизираниот примерок се пушта зрачење, при што се мери апсорбираното зрачење на точно определена бранова должина. Избраната бранова должина треба да кореспондира со разликите во енергетските дозволени електронски премини на елементот што ни е од интерес. Информации за природата и за содржината на елементите што се определуваат се добиваат со мерење на позицијата и на интензитетот на линиите во апсорпционите спектри што се добиваат при експериментите со овие инструменти.



Слика. При апсорпција на квант од електромагнетно зрачење, електроните од атомот примаат енергија и атомите поминуваат од основна во екситирана состојба

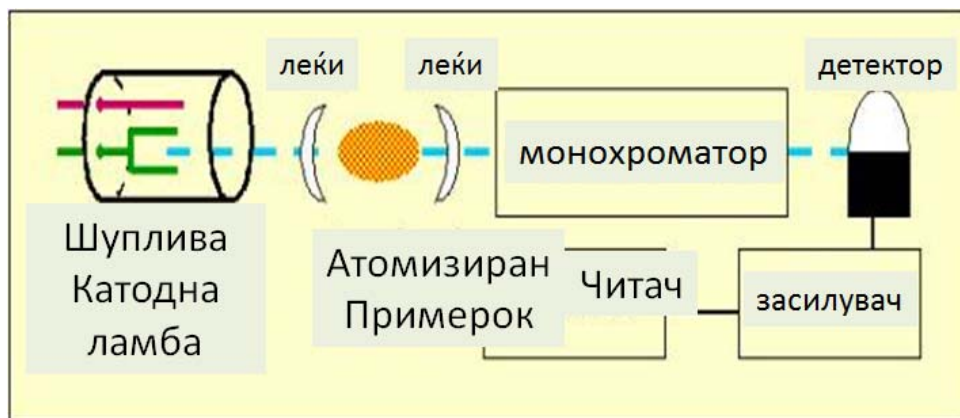
Инструментација

Извор на зрачење. Најчест извор на зрачење во AAS е т.н. шуплива катодна ламба. Тоа е цевка наполнета со аргон или неон низ која е спроведена една катодна жичка изработена од елементот што треба да биде анализиран во примерокот и уште една жичка што игра улога на анода. Кога помеѓу електродите ќе се нанесе потенцијална разлика (волтажа) од надвор, тогаш катодната жичка почнува да емитира карактеристично зрачење. Така на пример, ако катодата е направена од натриум, тогаш ќе биде емитиран карактеристичен спектар на натриум итн. Кога ова зрачење поминува низ примерок од примерок за анализа што содржи натриумови атоми, дел од зрачењето емитирано од ламбата ќе биде апсорбирано од атомите на натриум присутни во примерокот од примерок за анализата земено за анализа [23]. Доколку сакаме да анализираме елемент калциум, тогаш треба да употребиме ламба за зрачење во чијшто состав катодата ќе биде направена од калциум и сл.

Атомизер. Атомизерите се елементи од атомските апсорпциони спектроскопи што имаат намена да го претворат анализираниот примерок во индивидуални атоми.

Процесот на атомизација се постигнува со примена на многу високи температури врз примерокот, и тој процес се состои од три фази: (i) отстранување на молекулите на вода во кои се растворени честичките (молекулите или јоните) од примерокот; (ii) конверзија на молекулите од состојките од храната во гасови; (iii) атомизација на молекулите. На многу високи температури атомите може да преминат во јони (атоми

или атомски групи што содржат полнеж). Овој феномен е штетен бидејќи спектрите на јоните се различни од спектрите на неутралните атоми. Според тоа, потребно е да се употребуваат температури што се доволно високи за да ги преведат молекулите од состојките на примерок за анализата во атоми, но да не бидат многу високи за да произведат јони од атомите. Во AAS се употребуваат два типа на атомизери: пламени и електротермички.



Слика. Шематски принцип на процесите во атомска апсорпциона спектроскопија

Пламените атомизери се состојат од распрскувач и пламеник. Распрскувачот има функција да го претвора течниот раствор во аеросол. Примерокот се пушта (под притисок) да поминува низ тесна дупка во една комора наполнета со оксиданс и некој носач на гас (или горивен гас). Оксидантот и носачот на гас го носат примерокот во пламенот. Пламеникот обично е долг 5-10 cm, доволно долг за низ него да помине зрачењето од изворот на радијацијата. Карактеристиките на пламенот може да се променат со промена на односот на оксидантот и на горивото што се користи за добивање на пламенот. Воздух-acetylene и азотен оксид-acetylene се најчесто употребуваните смеси од оксиданс и горивен гас. Со промена на односот на овие параметри може да добиеме пламени кои ќе имаат различни температури. Тоа е многу битно за да добиеме температури кои ќе предизвикаат атомизација, но не и јонизација на атомите.

Во т.н. *електротермичката атомска апсорпциона спектроскопија* (EAAS) примерокот се внесува во мала графитна печка што се загрева со електрична енергија до температура помеѓу 2000 - 3000 °C. Оваа температура е доволно висока за да предизвика испарување и атомизација на примерокот. Печката така е позиционирана за

зрачењето да поминува точно низ атомизираниот примерок. Предноста на електротермичките атомизери е во тоа што се потребни помали количини на примерок, така што имаат и пониски граници на детекција. Главниот недостаток на овие атомизери е нивната висока цена и се потешки за ракување од другите слични инструменти.

Филтер за зрачење со точна бранова должина. Филтерот за селектирање на бранови должини е уред што е позициониран помеѓу пламеникот и детекторот. Неговата функција е да ги изолира спектралните линии што се од интерес и да ги издвои од спектралните линии на другите елементи присутни во примерокот.

Детектор/читач. Детекторот во суштина е фотомултипликациона туба што има функција да го претвори електромагнетното зрачење во електричен сигнал што ќе може да го прочита. Најчесто крајниот резултат компјутерски се отчитува во форма на бројки.

8.2. Атомска емисиона спектроскопија

Атомската емисиона спектроскопија (AES) се разликува од AAS по тоа што кај AES се користи емисијата на зрачење од примерокот за анализа [24]. Поради овие причини, примероците обично треба да бидат загреани на многу повисоки температури со цел атомите да апсорбираат зрачење, а при враќањето во основната состојба да го емитуваат вишокот на примена енергија. Проблемите кај оваа техника се во фактот што повисоките температури може да доведат до јонизирање на примерокот и до појава на нови спектри кои се разликуваат од спектрите на нејонизирани атоми во основната состојба.

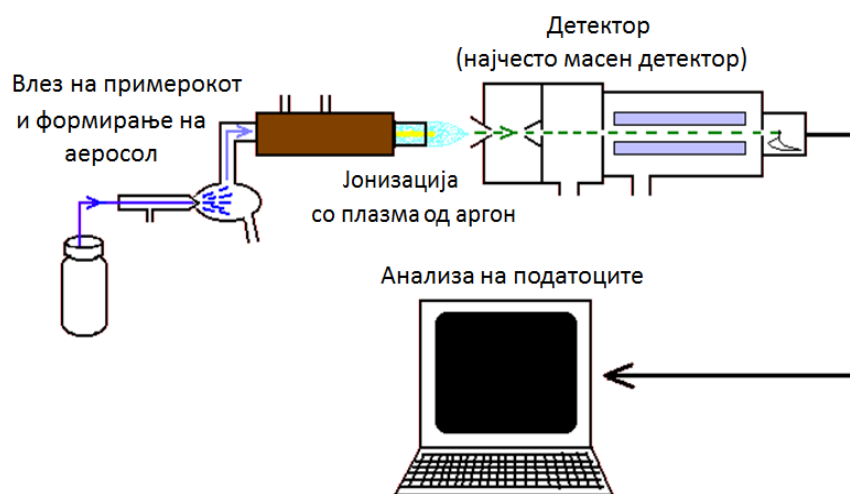
8.2.1. Инструментација во AES

Во AES самиот примерок за анализа се однесува како детектор за зрачење и не е потребно да има посебен извор на зрачење [24]. Примерокот за анализа се загрева до температура каде што се атомизира, и притоа голем дел од атомите поминуваат во ексцитирана состојба. Потоа, при преминот на електроните од атомите што примиле вишок на енергија се врши емисија на зрачење кога тие ќе се вратат во нивната основна состојба. Бидејќи дозволените енергетски нивоа за различни атоми се различни, различните атоми ќе продуцираат различни емисиони спектри. Бидејќи примерок за

анализата може да содржат повеќе различни минерални материи, спектарот што при оваа техника се добива содржи голем број на пикови. Поради тоа, емитираното зрачење од страна на атомите во примерокот поминува низ голем број на филтри за бранови должини со цел да бидат изолирани линиите што ни се од интерес за даден хемиски елемент.

Извор на атомизација и експитација. Целта на овој извор на атомизација-експитација е да го атомизира примерокот и да ги експитира атомите при што тие примаат голем дел од радијационото зрачење. Најчест извор на атомизација и експитација се пламенот и *индуктивно спрегната плазма (ICP)*.

- Во пламената AES системот е составен од распрскувач и пламеник што ги атомизира минералите присутни во примерокот и притоа експитира голем дел од атомите.
- Во AES со индуктивно спрегната плазма се употребува посебен уред за загревање на примероците за анализа што развива температура од 6000 до 10000 К (келвини) во присуство на јонизиран аргон. При овие температури, атомите од минералите присутни во примерокот не се јонизираат поради големата концентрација на аргонски јони што се произведуваат. Имено, при реакцијата на јонизација на аргонот ($\text{Ar} \rightleftharpoons \text{Ar}^+ + \text{e}^-$) се ослободува голема количина на електрони кои ја поместуваат рамнотежата на јонизација на атомите кон страната на неутралните атоми, т.е. реакцијата $\text{M}^+ + \text{e}^- \rightleftharpoons \text{M}$ се поместува кон формата М.



Слика. Шематски приказ на систем за атомската емисиона спектроскопија

Филтри за бранови должини. Филтрите за бранови должини се употребуваат за да ги изолираат и сепарираат линиите што се карактеристични за материјалот (т.е. хемискиот елемент) што е од интерес во анализата од другите спектрални линии на атомите присутни во примерокот.

Практични забелешки

Пред да се почне со мерењето (т.е. со анализите) со атомска апсорпциона (или емисиона) спектроскопија, потребно е да се раствори примерокот што треба да се анализира. Во некои случаи на течни примероци за анализа можно е да се анализираат примероци и без да бидат разредени. Концентрацијата на минералите (неорганските материји) присутни во примерок за анализата обично е многу ниска, па поради тоа многу е важно да се употребуваат реагенси со многу висока чистота со што би се избегнало добивање на резултати со повисоки концентрации на минерални материји кои би дошле од употребуваните реагенси. И стакларијата што се употребува при анализите мора да биде екстремно чиста и сува. Притоа, потребно е секогаш да бидеме сигурни дека во примерокот нема супстанции што може да интерферираат или да пречат при определувањето на бараниот елемент. Постојат голем број на различни методи за отстранување на ваквите интерференти и во овој дел нема да се задржуваме на сите нив.

ICP-AES и ICP-MS

Определувањето на метали во примерок за анализа е од голема важност поради тоа што некои метали се есенцијални, но некои се токсични, па потребно е да се знае во колкави концентрации тие се присутни. Од друга страна, потребно е да врши карактеризација на метали во пијалоци бидејќи нивната концентрација влијае на нивниот квалитет, вклучувајќи ја стабилноста и сензорните својства.

За анализа на метали се применува индуктивно спрегната плазма–масена спектрометрија (inductively coupled plasma–mass spectrometry, ICP-MS), техника која е сензитивна и специфична за анализа на многу елементи (multi-element detector) која овозможува анализа на изотопи, со ниска граница на детекција за повеќето елементи, од ppb (дел од билиот) до ppt (дел од

трилион). Овие граници на детекција се 100-1000 пати пониски во споредба со оние кои се постигнуваат со рутинската техника индуктивно спрегната плазма-атомска емисија (inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy, ICP-AES).

Пред ICP-AES и ICP-MS анализата потребно е да се изврши подготовка на примероците. Најчесто применувана техника е растворање на цврстиот примерок со киселина или други оксидациони агенси. За добра подготовка потребни се силни оксидациони агенси или смеса од различни киселини, како и висок притисок и температура за да се изврши целосна дигестија на примерокот. Дигестија со микробранова печка е техника која, исто така широко се применува, и особено е прифатена како брз метод за разградување на неоргански примероци. При определување на елементи во примероци може да се јави проблем, кој главно се однесува на онечистување на примерокот, со оглед на фактот дека металите кои се определуваат се приступни во многу ниски концентрации.

➤ *Принцип на работа*

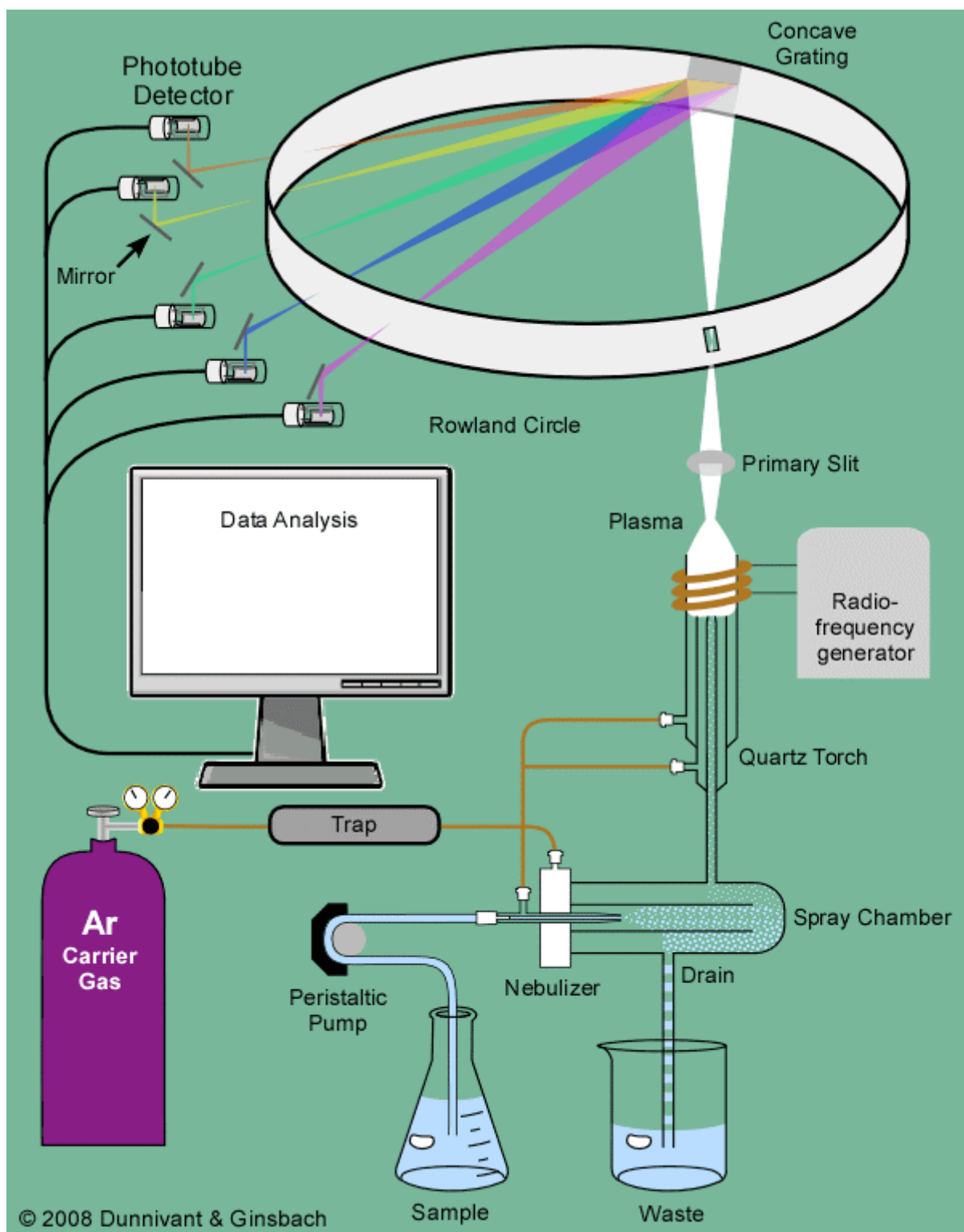
ICP-AES (индуктивно спрегната плазма-атомска емисија) може да се подели на два дела: извор за индуктивно спрегната плазма и спектрометар за атомска емисија. На Сл. XX се прикажани компонентите кои го сочинуваат ICP-AES системот.

Пред ICP-AES анализата, примероците се подготвуваат со закиселување до 2-3 % со HNO_3 , за да се спречи адсорпција на металите на полипропиленското шише или стаклениот прибор. Потоа, примерот се внесува во комората на небулајзерот со перистатична пумпа или автосемплер. Заедно со примерокот, во малиот отвор на небулајзерот се внесува и гас аргон, при што се формираат мали капки. Поголемите капки од примерокот се собираат на сидот од комората, а потоа тие се отстрануваат. Малите честички патуваат заедно со гасот аргон и влегуваат во пламенот на плазмата (quartz torch), каде што настанува испарување, атомизација и екситација/јонизација, на температура од 10 000 K. Овде и аргонот се јонизира и ексцитира бидејќи овој

гас ја носи аеросолта од примерокот, но и ја ограничува локацијата на плазмата каде се врши испарувањето, а со тоа се спречува оштетување на другите делови од инструментот. Кога јонизирани атоми ја напуштат плазмата, ексцитирани електрони емитираат протон карактеристичен на електронски трансфер. Овој протон е карактеристичен за секој елемент, но не дава никаква информација за изотопската состојба на елементот. UV и Vis светлина емитирана од компонентите на примерокот влегуваат во монохроматорот преку мал отвор, а потоа таа се разделува на делови и се детектира со соодветен детектор.

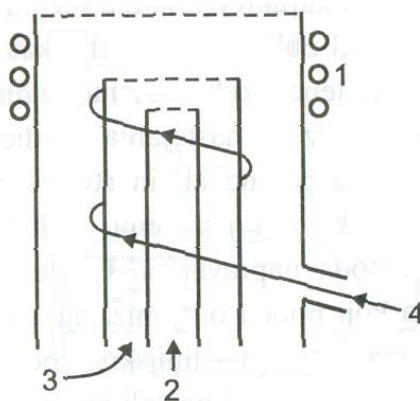
➤ *ICP*

ICP (индуктивно спрегната плазма) е стандарден јонски извор со висока температура, кој најчесто се користи во инструментите поврзани со MS. Тој претставува безелектродна аргонска плазма која работи на атмосферски притисок, а се одржува со индуктивна спрега со радиочестотно електромагнетно поле.



Слика. Компоненти на ICP-AES системот

Горилникот на плазмата се состои од три концентрични цевки, како што е прикажано на Сл. XX, во кои се внесува аргонот со или без примерокот.



Слика. Горилник на плазмата 1–навои, 2 – Аргон со примерокот, 3 – аргон за образување на плазма, 4- аргон за ладење

Низ внатрешната цевка се внесува примерокот (2), најчесто во форма на раствор, кој се преведува во аеросол со помош на струја од аргон. Аргонот за формирање на плазмата се внесува низ цевката 3, а термичка изолација (неопходна за да се избегне топење на кварцната цевка) се постигнува со тангенционално воведување на струја од аргон преку надворешна цевка од горилникот (4). Оваа струја од гас ги лади ѕидовите од кварцната цевка и ја стабилизира плазмата.

ICP изворите имаат неколку предности:

- Атомизацијата настанува во хемиски инертна средина со што се продолжува времето на живот на примерокот
- Температурниот пресек на плазмата е релативно едноличен
- Се добиваат линеарни калибрациони криви.

ICP-MS е често користена техника за анализа на елементи во крв и урина. Оваа техника успешно е применета за анализа на тешки метали во мед, при што определени се As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn Ni, Pb, Sn, V и Zn. Исто така, ICP-MS се применува за определување на тешки метали во разни примероци од органско и неорганско потекло, ткиво, кожа и сл., при што, главните елементи кои се определуваат со оваа техника се Pb, Cd, Zn, Cu и Fe, кои се токсични метали и неопходно е следење на нивната концентрација.

ХРОМАТОГРАФИЈА

Хроматографијата претставува физички метод на разделување кој се постигнува со распределба на супстанците меѓу две фази, стационарна и мобилна. Оние компоненти кои се распределуваат претежно во мобилната фаза ќе се движат побрзо низ системот од оние распределени претежно во стационарната фаза. Така, компонентите од примерокот ќе се елуираат во колоната по ред на растечки коефициент на распределба во однос на стационарната фаза.

Оваа дефиниција за хроматографијата, сепак е премногу општа, и основата на процесот на задржување ја сведува на поимот за распределба. Една супстанца се распределува меѓу двете фази како резултат на интеракциите кои постојат меѓу молекулите од таа супстанца и молекулите од двете фази (Scott 1992). Колку поголеми се тие интеракции меѓу молекулите од супстанцата и стационарната фаза, толку посилно супстанцата ќе биде задржана во колоната. И обратно, колку посилни се интеракциите на молекулите од една компонента со оние на мобилната фаза, толку побрзо таа ќе минува низ колоната. Задржувањето на една компонента е контролирано од четири вида на интеракции и тоа јонски, поларни, дисперзивни (неполарни) и хемиски интеракции.

Во било кој систем на распределба, ретко е присутен само еден тип на интеракции, а и во такви случаи се работи само за оние од дисперзивна природа. Поларните интеракции се секогаш придружени од дисперзивни, а јонските од поларни и дисперзивни интеракции.

Под хроматографија, во најопшт случај, се подразбират група методи чија основна цел е раздвојување (**разделување**) на некоја смеса на нејзините компоненти и определување на количеството на секоја од разделените компоненти. Хроматографијата припаѓа на групата методи што имаат важно место во органската хемија, биохемијата, фармакологијата и технологијата (при контрола на на полупроизводите во одделни фази на производството, како и при контролата на финалните производи).

За основоположник на хроматографските методи се смета рускиот ботаничар Михаил Цвет. Тој раздвојувал растителни пигменти со примена на колонска течно-цврста хроматографија користејќи различни цврсти адсорбенти во стаклена колона како стационарна фаза и различни растворувачи како мобилна фаза. Името “хроматографија” потекнува од зборовите “*chromos*” – боја и “*graphien*” – пишува. Иако модерната хроматографија не е врзана за обоени соединенија, името хроматографија и понатаму останува, но денес ги опфаќа сите методи каде се врши разделување на компоненти помеѓу две фази.

Во педесеттите години од дваесеттиот век се развила гасната хроматографија со цел да се забрза процесот на разделување и определување на компонентите. Таа особено нашла примена при карактеризација на нафтата и нејзините деривати. Но, нејзината главна слабост, неможноста да се примени на тешко испарливи и термолабилни супстанции, придонела истражувањата повторно да се вратат на унапредување на хроматографските техники каде мобилната фаза е течна. Забрзување на процесот на разделување и анализа при употреба на течна мобилна фаза се постигнува со внесување на течната фаза под висок притисок. Оттаму и името на современата течна хроматографија – течна хроматографија под висок притисок (*High Pressure Liquid Chromatography*) (во почетокот), а денес заради големата ефикасност – високоефикасна течна хроматографија (*High Performance Liquid Chromatography* – *HPLC*).

11.1. Карактеристични хроматографски величини

Величините карактеристични за хроматографските техники се:

- ❖ *Ретенционо време* (t_R) или време на задржување на компонентата во колоната - е времето кое поминува од моментот на внесување на компонентата во колоната до моментот на нејзино излегување од неа. Ретенционото време е константна величина за одредена компонента, при точно дефинирани услови на работа како што се: состав на мобилната фаза, стационарна фаза, температура и проток на мобилната фаза.

- ❖ *Ретенциони фактори* (k_A , k_B) на компонентите А и В - претставуваат мерка за нивно задржување во колоната. Тие се дадени со изразите:

$$k_A = \frac{(t_R)_A - t_M}{t_M} \quad \text{и} \quad k_B = \frac{(t_R)_B - t_M}{t_M}$$

каде $(t_R)_A$ и $(t_R)_B$ се времиња на задржување на компонентите А и В, а t_M е времето на задржување на компонентата која само минува низ колоната без задржување, најчесто растворувачот.

- ❖ *Селективност на колоната* (α) - претставува способност на колоната да ги раздвои компонентите А и В, што се должи на различната способност за нивно задржување во колоната. Селективноста на колоната е дадена со изразот:

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A}$$

- ❖ *Резолуција на колоната* (R_S) - дава квантитативна оценка за способноста на колоната да раздвои две компоненти А и В. Резолуцијата на секоја колона е дефинирана со следниот израз:

$$R_S = \frac{2 \cdot [(t_R)_B - (t_R)_A]}{w_A + w_B} = \frac{2 \cdot \Delta Z}{w_A + w_B}$$

каде што w_A и w_B се ширините на основите на пиковите од супстанциите А и В, а ΔZ е разликата меѓу ретенционите времиња на супстанциите А и В.

Резолуцијата на една стационарна фаза може да се зголеми со зголемување на должината на колоната (зголемување на бројот на теоретски подови), но тоа ќе доведе и до продолжување на времето потребно за раздвојување.

- ❖ *Ефикасност на колоната* - претставува способност на колоната да даде тесни и остри пикови. Бројот на теоретските подови (N) е мерка за ефикасноста на колоната и е определен со димензијата на честичките (d_p), должината на колоната (L) и протокот (F) на мобилната фаза во mL/min. Се пресметува со изразот:

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

каде што t_R е ретенционо време и w е ширина на пикот во основата.

Висината на еден теоретски под (H), исто така, е мерка за ефикасноста на една колона. Таа се пресметува како однос меѓу должината на колоната (L) и бројот на теоретски подови, т.е. $H = L/N$. Ефикасноста е поголема, колку што висината на еден теоретски под е помала (Skoog et al. 1994).

11.2. Класификација на хроматографските техники

Во литературата можат да се сретнат најразлични шеми за класификација и поделба на хроматографските техники. Најчеста класификација се врши според начинот на кој се врши разделувањето на компонентите и според феноменот на преносот на масата.

Според феноменот на пренос на маса, хроматографијата се дели на: поделбена (партициона), адсорпциона, распределбена, јонско-изменувачка и гелна хроматографија. Според начинот на разделување, хроматографијата се дели на планарна хроматографија и хроматографија во колони. Во планарната хроматографија спаѓаат: хроматографијата на хартија и тенкослојната хроматографија. Во хроматографијата во колони спаѓаат: **течна, гасна, јон-изменувачка и гелна хроматографија.**

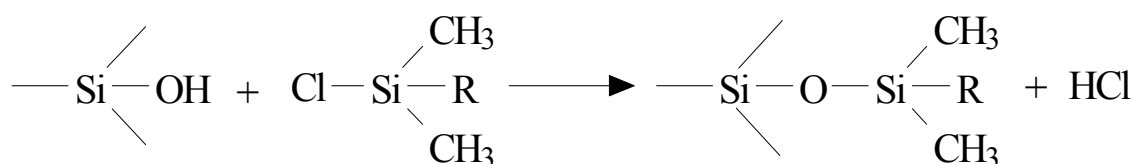
11.3.1. Хроматографија според пренос на маса

Поделбена (партициона) хроматографија

Партиционата хроматографија денес е најшироко употребувана хроматографска техника. Таа може да се подели на течно-течна хроматографија и хроматографија со хемиски врзана стационарна фаза (*chemically bonded phase chromatography*). Разликата меѓу нив е во начинот на кој стационарната фаза се “држи” на пакувањето во колоната. Во течно-течната

хроматографија стационарната фаза се “држи” на пакувањето со физичка адсорпција, додека кај хемиски врзаните фази, како што и името кажува, стационарната фаза е врзана за носачот, најчесто силика гел, со ковалентна врска.

Хемиски врзаните стационарни фази се добиваат со реакција на органохлоросилан со ОН-групите на површината на силика гелот, кои настапуваат со хидролиза во разредена хлороводородна киселина [8, 10]. Производот од оваа реакција е органосилоксан, кој содржи -Si-O-Si- група. Реакцијата на една ОН-група со диметил-алкилхлоросилан може да се претстави на следниот начин:



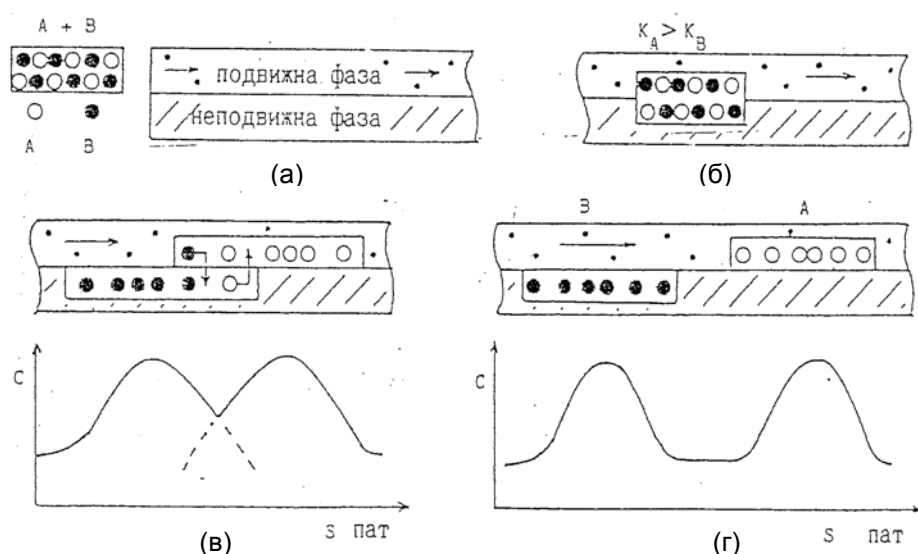
каде што R е обично октил (-C₈H₁₇) или октадецил (-C₁₈H₃₇) група.

Покрај овие неполарни групи, на површината на силика гелот може да се врзат и други органски функционални групи, како што се алифатични амини, етери, нитрили и ароматични јаглеводороди. Така, на располагање денес стојат стационарни фази со широк обем на поларности. Овој тип стационарни фази се многу постабилни од оние со физички адсорбирана стационарна фаза, каде е неопходно повремено повторно нанесување на течната стационарна фаза заради нејзиното постепено растворање во мобилната фаза.

Врз основа на релативните поларности на стационарната и мобилната фаза, партиционата хроматографија е поделена на нормално-фазна хроматографија (normal-phase HPLC) и реверзно-фазна хроматографија (reversed-phase HPLC). Во нормално-фазната хроматографија стационарната фаза е високо поларна (вода, триетилен гликол), а мобилната фаза е неполарен растворувач (хексан, i-пропилетер), при што компонента со најмала поларност од пробата се елуира прва. Спротивно пак, во реверзно-фазната хроматографија, стационарната фаза е неполарна (јаглеводороди), а се користи поларен растворувач како мобилна фаза (вода, метанол, ацетонитрил) при што компонента со најголема поларност се елуира прва од колоната.

Најдобро разделување на компонентите од пробата се постигнува со стационарна фаза со поларност блиска до поларноста на супстанците кои треба да се разделат, додека поларноста на мобилната фаза треба значително да се разликува.

Кај партиционата хроматографија разделувањето на компонентите од испитуваната смеса се врши врз база на нивниот различен коефициент на распределба во однос на подвижната и неподвижната фаза.



Слика. Шематски приказ на создавање хроматографски зони кај распределбена хроматографија: а) хроматографска колоне пред внесувањето на пробата; б) веднаш по внесувањето на пробата; в) снимање на хроматограм во одделни фази на разделување; г) снимање на хроматограм во одделни фази на разделување

На Сликата погоре е прикажан процес на создавање на хроматографски зони при разделување на смеса која се состои од две компоненти **A** (бели кругчиња) и **B** (црни кругчиња).

Ако во колоната на сликата **а** се додаде смеса (**A+B**), таа различно ќе се распредели во двете фази (Сл. 2б) и ќе се воспостави динамичка рамнотежа. Според **Нернстовиот закон за распределба**, во состојба на рамнотежа, коефициентот на распределба на некоја супстанца во две фази кои не се мешаат меѓу себе се дефинира како однос на нејзината концентрација во двете фази:

$$K = \frac{C_P}{C_S}$$

K – коефициент на распределба

C_P – концентрација на испитуваната супстанца во подвижната фаза;

C_S – концентрација на испитуваната супстанца во стационарната фаза

Ако треба да се раздели смеса од две компоненти, тогаш според **Нернстовиот закон**:

$$K_A = \frac{C_{AP}}{C_{AS}} \qquad K_B = \frac{C_{BP}}{C_{BS}}$$

Ако $K_A > K_B$, тогаш постои разлика во коефициентот на распределба што условува разлика во брзината на движењето на компонентите **A** и **B** низ колоната поради што тие ќе се разделат, а нивното разделување создава хроматографски зони (Сл. 2в). Според тоа, вредностите на K_A и K_B ја определуваат брзината со која ќе се движат компонентите **A** и **B**, додека големината на количникот K_A/K_B (што се нарекува фактор на разделување) ја одредува ефикасноста на разделувањето.

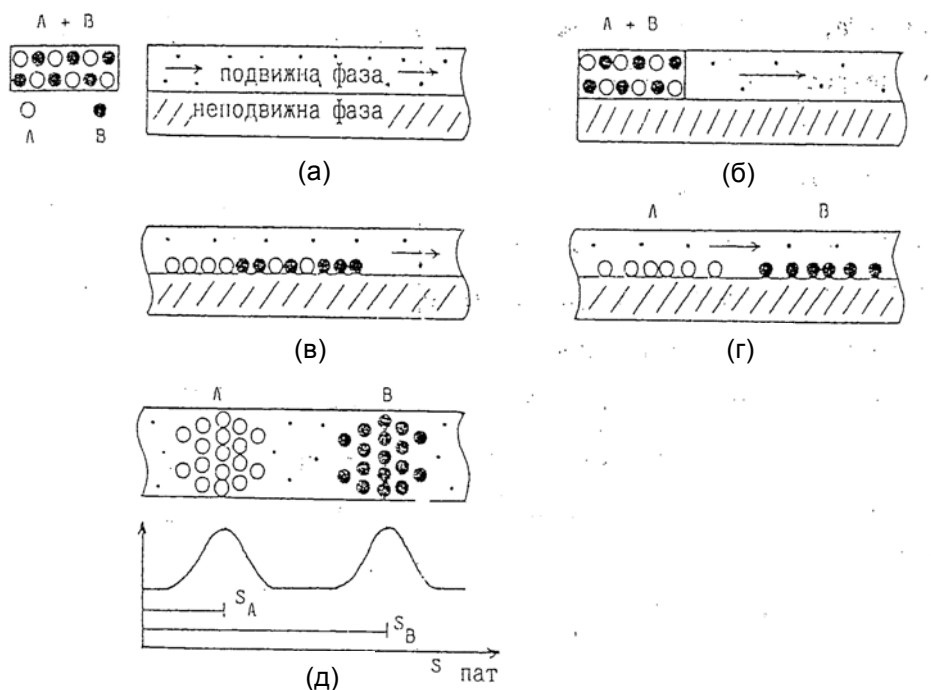
Треба да се нагласи дека коефициентот на распределба нема константна вредност и тој е функција од концентрацијата. Меѓутоа, за идеални раствори, каде нема промена на внатрешната енергија за време на мешањето и не постојат сили на привлекување и одбивање помеѓу компонентите, коефициентот на распределба има константна вредност. Реалните раствори се однесуваат идеално при бескрајно разредување. Во спротивно, кај реалните раствори, наместо концентрацијата, се земаат активитетите.

➤ *Атсорпциона хроматографија*

Најчесто употребувана стационарна фаза во атсорпционата хроматографија, која припаѓа во течно-цврста хроматографија, е силика гел, а поретко алуминиум оксид. Како мобилна фаза се користат неполярни органски растворувачи (хексан, дихлорометан, етил ацетат и др.) и нивни комбинации. Разделувањето на компонентите од испитуваната смеса се врши врз база на

нивните различни адсорпциони својства, односно нивната селективна адсорпција врз даден адсорбенс. Ова разделување на компонентите се врши помеѓу подвижната и површината на неподвижната фаза (**адсорбенсот**). Помеѓу подвижната и неподвижната фаза постои адсорпционо – десорпциона реверзибилна рамнотежа, што пак значи дека еднаш адсорпираната компонента може повторно да се врати во подвижната фаза, односно да се десорбира со дотек на свеж подвижен флуид. Десорпцијата во хроматографијата всушност претставува плакнење на колоната. За време на плакнењето, во адсорбирана состојба подолго време ќе се задржи онаа компонента која е појако адсорбирана (која има поголем афинитет спрема адсорбенсот), бидејќи потешко ќе се десорбира. Спротивно, компонентата која послабо е адсорбирана полесно ќе се десорбира и побрзо ќе се движи со подвижната фаза. Поради овој феномен на селективна адсорпција и различна брзина на движењето на компонентите се врши разделување и формирање на хроматографски зони или создавање хроматограм.

На Сл. 2 е прикажан процес на создавање на еден хроматограм при раздвојување на смеса која се состои од две компоненти: **компонента А** (бели кругчиња) и **компонента В** (црни кругчиња). Компонентата **А** има поголем афинитет спрема адсорбенсот, појако е адсорбирана и поради поголемото дејство на адсорпционите сили за исто време таа изминува пократок пат од компонентата **В**. Концентрациите на компонентите **А** и **В** можат да се мерат со различни физичко – хемиски методи: спектроскопија; радиохемиска анализа; масена спектрометрија; потенциометриски титрации и др.

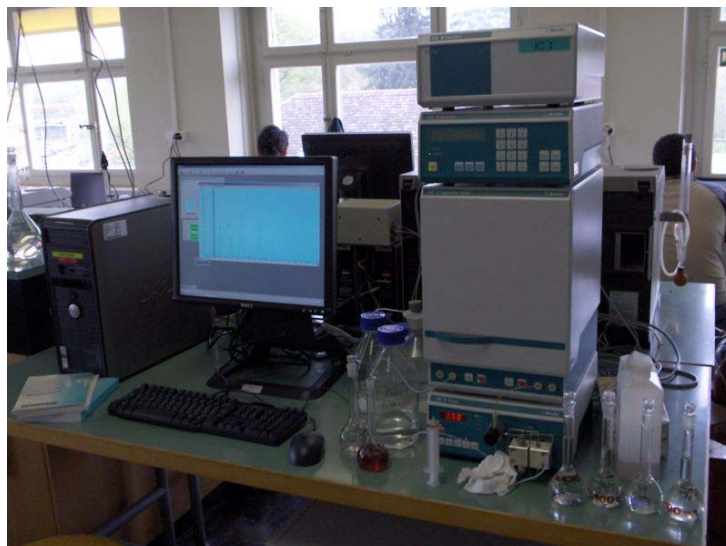


Слика 2. Шематски приказ на создавање хроматографски зони кај атсорпционата хроматографија: а) хроматографска колона пред внесувањето на пробата; б) веднаш по внесувањето на пробата; в) атсорпција на компонентите; г) движење на компонентите д) снимање на хроматограм

➤ Јоноразменувачка хроматографија

Кај јоноразменувачката хроматографија подвижната фаза е течност, а неподвижната фаза е цврста супстанца. Јонските разменувачи се поделени на: смоли, гелови и неоргански разменувачи (Harris, 1995). Јоноразменувачките смоли најчесто се користат за разделување на мали молекули, ($M \leq 500 \text{ g/mol}$), јоноразменувачките гелови се користат за поголеми молекули (протеини, нуклеински киселини), додека неорганските разменувачи се користат при специфични услови (висока температура, силно базна средина, силни оксидациони средства и сл.). Елуирањето се изведува со мобилна фаза, чија јонска сила градиентно се менува, со што постепено се истиснуваат јоните врзани за јонскиот разменувач. На Сл. 3 е прикажан инструмент за јоноразменувачка хроматографија.

Со јоноразменувачката хроматографија се разделуваат јонски видови (катјони и анјони) врз база на различни потенцијали на јонска измена. За да го објаснеме механизмот на јонската измена ќе се послужиме со наједноставен случај, а тоа е кога неподвижната фаза има кристална структура. Како што е познато, во кристалната решетка секој јон е опкружен со спротивно наелектризирани јони. Помеѓу два спротивно наелектризирани јона дејствуваат Кулонови привлечни сили, чија големина зависи од растојанието помеѓу јоните и нивниот релативен полнеж. Според тоа, јоните што се наоѓаат на површината на кристалот се послабо врзани од оние во внатрешноста. Кога кристалот се наоѓа во јак поларен растворувач (на пр. вода), површинските јони што се слабо врзани може да се заменат со други јони од растворот, а притоа да не се уништи кристалната решетка. Јонската измена, всушност претставува измена на јони со ист предзнак помеѓу нерастворливата цврста фаза и растворениот електролит што се во непосреден контакт. Ефектот на јонската измена ќе зависи од природата и јачината на силите со кои е врзан јонот во кристалот, големината на двата јона што се разменуваат, концентрацијата на изменувачките јони во електролитот, поларноста на растворувачот и др.



Слика 3. Инструмент за јоноразменувачка хроматографија

➤ *Гелна (ексклузиона) хроматографија*

Кај гелната *ексклузиона*) хроматографија цврстата фаза претставува мрежа од гелови со широк опсег на големина на порите. Како растворувач обично се користи вода или пуферски водени раствори. Овој метод се користи за раздвојување на молекули со голема молекуларна маса, односно за фракционирање на биолошките макромолекули и полимери. Разделувањето се врши на тој начин што течната фаза (која содржи молекули со различна големина) поминува низ порозниот гел материјал кој може да има пори со различен дијаметар. Помалите молекули влегуваат во порите, додека пак поголемите продолжуваат да се движат со подвижната фаза. При тоа, не настануваат физички и хемиски реакции меѓу компонентите од примерокот и стационарната фаза (Skoog et al. 1994).

11.3.2. Хроматографски методи според начинот на разделување

Планарната хроматографија, хроматографијата на хартија и тенко–слојната хроматографија ќе ги опишеме повеќе информативно (од причина затоа што тие се доста едноставни методи за разделување на одделни компоненти и за нив не се потребни посебни инструментални техники), додека пак хроматографиите во колони (**течната, гасната, јоноразменувачката и гелната**) ќе ги опишеме подетално како модерни инструментални техники.

11.3.2.1. Планарна хроматографска анализа

Кај планарната хроматографија испитуваната супстанца се распоредува помеѓу стационарната водена фаза (која е фиксирана на некој порозен инертен носител) и подвижната органска фаза од погодено избран органски растворувач кој не се меша во водата. Испитуваната супстанца се разделува на своите составни компоненти благодарение на нивниот различен коефициент на распределба во водата и органскиот растворувач. Според тоа, планарната хроматографија претставува тип на распределбена хроматографија. Меѓутоа, не е исклучено ни влијанието на носителот на кој е фиксирана стационарната

фаза, така што покрај феноменот на распределба во вкупниот хроматографски процес учествува и феноменот на адсорпција.

Ако носителот на стационарната фаза е лента или лист од хартија, тогаш се работи за хроматографија на хартија. Ако носителот на стационарната фаза е тенок слој од ситнозрнест прашкест материјал нанесен на стаклена плоча, пластична или метална фолија, станува збор за тенкослојна хроматографија.

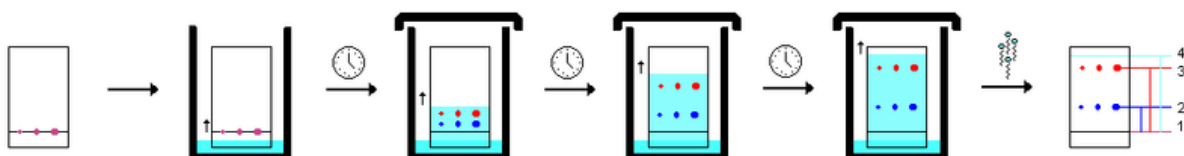
11.3.2.2. Хроматографија на хартија

Овоа метода најчесто се користи за докажување на мали количества од некоја смеса. Предностите при работата со неа се: едноставна изведба, ефтина апаратура, голема моќ на раздвојување, брза детекција и мало количество од примерокот што се анализира. Хроматографијата на хартија наоѓа широка примена во биотехнологијата, биохемијата, фармацијата и медицинската хемија. Во почетокот, оваа техника се користела за анализа на аминокиселини добиени со хидролиза на протеини. Со текот на времето, каде што се развивала, се покажувала како успешен метод за разделување и на други групи на соединенија: аминокиселини, алифатични и ароматични амини, нитросоединенија, хетероциклични соединенија што содржат азот, алкохоли, алдехиди, кетони, феноли, карбоксилни киселини, стероиди, шеќери, пептиди, алкалоиди, сулфурни органски соединенија, ензими, витамини, антибиотици и друго.

11.3.2.3. Тенкослојна хроматографија

Тенкослојната хроматографија (TLC) – претставува хроматографска метода каде се користи тенок слој (**0.10 – 0.25 mm**) апсорбирачки материјал како што е гел силиконот, алуминиум оксид или целулоза што е нанесен на даден носач направен од стакло, алуминиум или пластика. Смесата се раствора во соодветен растворувач и се нанесува во облик на капки на површината на самата плоча. Плочата потоа се носи во комора на чие дно се наоѓа растворувач, растворувачот ги препокрива нанесените примероци, и

поради различната природа на компонентите од смесата тие на различно место биваат распределени на апсорбирачкиот материјал на самата плоча (Сл. 4). Идентификацијата на поединечните компоненти кај оваа техника се врши најчесто со помош на ултравиолетова светлина (UV).



Слика 4. TLC раздвојување

11.3. Методи и техники на хроматографско раздвојување во колони

Според начинот на кој се разделуваат одделни компоненти од некоја проба во колона, постојат три техники на анализа: **а) фронтална анализа; б) анализа со истиснување; в) елуентна анализа**

а) Кај фронталната анализа се врши континуирано додавање на испитуваната проба во колоната. Ако пробата се состои од три компоненти **A**, **B** и **C** чии коефициенти за даден систем атсорбенс-раствор се: $K_A < K_B < K_C$, од колоната најпрво ќе излезе чистата компонента **A**, потоа смеса од компонентите **A** и **B** и на крајот растворот кој ги содржи сите 3 компоненти **A**, **B** и **C**. Со оваа метода се добива само дел од чистата компонента **A**, која всушност најслабо се атсорбира.

б) Кај анализата со истиснување во почетокот на колоната се воведува мало количество проба кое се состои од компонентите **A**, **B** и **C**. Потоа низ колоната се пропушта развивач **D** кој има поголем афинитет кон неподвижната фаза во однос на која и да било од компонентите во пробата; $K_A < K_B < K_C < K_D$. Развивачот **D** ги истиснува сите претходно атсорбирани компоненти. Процесот тече сукцесивно, така што **C** ја истиснува **B**, а **B** компонентата **A**. На овој начин миграционите зони се наоѓаат една покрај друга, често пати тие се преклопуваат, така што нема целосно раздвојување.

Од колоната најпрво излегува компонентата **A**, па **B**, па **C** и, на крајот развивачот **D**.

в) Елуентната анализа е најупотребуван метод во хроматографските колони. Мало количество од проба што се состои од компонентите **A**, **B** и **C** (нека е $K_A < K_B < K_C$) се внесува во едниот крај на колоната, а потоа низ колоната се пропушта подвижната фаза која е инертна во однос на стационарната фаза. Секоја од компонентите по должината на колоната ќе се движи со различна брзина во зависност од нејзиниот афинитет спрема неподвижната фаза. Со овој метод можно е потполно разделување на компонентите **A**, **B** и **C**, а тие од колоната излегуваат по следниов распоред: **A**, па **B**, па **C**.

11.3.1. Високо-ефикасна течна хроматографија

Течната хроматографија или како уште се нарекува „високо ефикасна течна хроматографија“ и скратено се обележува со **HPLC**, според англискиот назив *High performance liquid chromatography*. Овој тип хроматографија порано се изведувал во класични колони. Во овие колони ефектот на разделување на одделни компоненти од испитуваната проба се извршувал при релативно мали брзини на проток на течната фаза. Земајќи предвид дека адсорпцијата и распределбата на испитуваната проба во течната подвижна фаза и цврстата или течната неподвижна фаза се контролирани од брзината на дифузијата (што претставува релативно бавен процес), ефективно разделување било можно само при бавни брзини на подвижната фаза, така што самиот хроматографски процес траел подолго време.

HPLC системот се состои од следните составни делови:

- Резервоари за снабдување со растворувачи,
- Пумпа снабдена со уред за програмирање на составот на мобилната фаза,
- Уред за внесување на пробата (инјектор),
- Колона,
- Детектор,
- Резервоар за отпад, и

- Систем за прикажување на хроматограмите и компјутерска обработка на податоците (Иванова, 2005).



Слика 5. Шематски приказ на инструмент за течна хроматографија

Резервоари за снабдување со растворувачи - Тоа е серија од (најмногу 4) резервоари за растворувачи од кои се избираат еден или повеќе растворувачи. Во нив е вронета цевка низ која протекува мобилната фаза од резервоарот до пумпата. Направени се од челик што не кородира или стакло и имаат волумен од 1 L. Некои се снабдени и со систем за дегазирање, како што е уред за внесување на хелиум (Scott, 1992).

Пумпа со уред за програмирање на составот на мобилната фаза - Пумпите за внесување на растворувачите обично се клипни, со два цилиндри. Тие работат истовремено, но наизменично, за да се избегнат промени на притисокот поради пулсирачката работа на пумпата, што предизвикува шум на детекторот. Обично се направени од челик што не кородира. Максималниот притисок кај повеќето пумпи се движи до 40 MPa. Ова ограничување е, пред сè, поради тоа што при поголеми притисоци (при

кои пумпата може да работи) се ослободува топлина која влијае на ефикасноста на колоната.

Пумпите се снабдени со уред за програмирање на составот на мобилната фаза кој може да се употреби на два начина, и тоа:

- избирање на одреден состав на растворувачи за да се изврши раздвојувањето со константен состав на мобилната фаза, т.н. **изократно елуирање**; и
- дефинирање на составот на мобилната фаза и начинот на изменување на нејзиниот состав во текот на разделувањето, т.н. **градиентно елуирање**.

Уред за внесување на пробата (инјектор) - Примерокот за анализа во течниот хроматограф се внесува автоматски со т.н. автосемплер. Потоа, примерокот се внесува во колоната со протокот на мобилна фаза.

Хроматографска колона - Колоните се направени од обвивка од челик што не кородира [9-11], а се исполнети со стационарни фази од различна природа. Стационарните фази за сите модови на HPLC денес се комерцијално достапни (силика гел, јонски разменувачи, хемиски врзани стационарни фази). Нивните специфични карактеристики, како што се големина на честички, големина на пори, активна површина и сл., придонесуваат нивната цена да биде висока, што од своја страна наметнува и изнаоѓање на начини за продолжување на нивното време на употреба. Тоа, пред сè, е со употребата на т.н. **претколони** (guard columns) со димензии од 0,4 до 2 cm, кои ја содржат истата стационарна фаза како и главната колона. Претколоната ги “врзува” оние супстанции од примерокот и мобилната фаза кои иреверзибилно се адсорбираат на стационарната фаза, со што се продолжува животот и ефикасната работа на колоната.

Хроматографската колона може да се загрева, при што се намалува вискозноста на мобилната фаза, а со тоа се намалува и притисокот и се овозможува поголем проток. Зголемената температура овозможува и подобра резолуција, заради забрзување на дифузијата на компонентите од пробата. Сепак не се препорачува работење на висока температура

поради побрзо разградување на стационарната фаза, со што се скратува животот на колоната. Од друга страна, термостатирањето на колоната е препорачливо и поради зависноста на коефициентот на распределба од температурата (варијациите на времињата на задржување на компонентите од примерокот најчесто се должат на варијации на температурата на колоната со која се работи) (Skoog et al. 1994).

Детектори – Детекторот кој се користи во хроматографските техники треба да биде осетлив на ниски концентрации (и тоа од 10^{-9} до 10^{-5} g/L) за секоја компонента од примерокот, потоа да обезбедува линеарен одговор кој се протега преку три реда на големина на концентрацијата и да не ги проширува елуираните пикови. Покрај тоа, детекторот треба да реагира и на супстанците присутни во мобилната фаза со можност да ја окарактеризира секоја од компонентите. Истовремено, тој треба да е “неосетлив” на мобилната фаза, ниту пак на промените во нејзиниот состав. Исто така, детекторот треба да е “неосетлив” и на промени на притисокот, температурата и протокот. За жал, детектор за течна хроматографија со сите овие карактеристики не постои, но некои од комерцијално достапните детектори со своите карактеристики се доближуваат до овие барања.

Најчесто употребувани детектори во високоефикасната течна хроматографија се **ултравиолетовите (UV) и ултравиолетово-видливите (UV-VIS)** детектори, кои може да бидат со фиксна бранова должина (најчесто 254 nm), со променлива бранова должина, и со низа од диоди (diode-array detector, DAD). Тие се релативно неосетливи на промени на протокот, притисокот и температурата и може да се користат и со градиентно елуирање. Детекторот со низа од диоди овозможува континуирано следење на UV или UV-VIS спектарот на сè што излегува од колоната. Ова дава можност за идентификација на компонентите од примерокот, колку што дозволува спектарот. Исто така, овој детектор може да се употреби за “гледање” на хроматограмот на различни бранови должини, т.е. секоја од

компонентите може да се определи на брановата должина на која покажува максимална апсорпција (Иванова, 2004).

DAD детекторот снима UV-Vis апсорпциони спектри во милисекунди додека компонентите се елуираат од колоната. Овозможува истовремена детекција во широк опсег на бранови должини во UV-Vis подрачјето. Користи деутериумова или ксенонска лампа која емитира светлина во UV спектралното подрачје. Светлината од лампата е фокусирана на ахроматска леќа преку ќелија за примерокот, и во холографска решетка. Дисперзираната светлина од решетката се распоредува врз низата од диоди.

Резолуцијата на детекторот ($\Delta\lambda$) зависи од бројот на диоди (n) во низата, и исто така, од опсегот на опфатени бранови должини ($\lambda_2 - \lambda_1$). Така,

$$\Delta\lambda = \frac{\lambda_2 - \lambda_1}{n}$$

Крајната енергија на детекторот со низа од диоди ќе зависи од полупроводникот и од тоа колку се тенки индивидуалните фотоќелии што може да ги произведе производителот.

Флуоресцентните детектори се едни од најосетливите детектори што се користат во HPLC и поради тоа многу често се користи за анализа на компоненти во траги. Тие не реагираат на промени на температурата, притисокот и протокот, и се користат при градиентно елуирање. Се одликуваат и со висока селективност, заради можноста да издвојат супстанца која флуоресцира, меѓу повеќе други кои не флуоресцираат. Но, иако овој детектор е многу осетлив, неговиот одговор е линеарен само при определен опсег на концентрации. Поголем дел од супстанците природно не флуоресцираат, што претставува сериозен недостаток на овој тип на детектор. Овој недостаток се решава со преведување на компонентите што не флуоресцираат, во форма што флуоресцира, со примена на различни реагенси за дериватизација.

Појавата при која светлината се емитира од молекулите кои се ексцитираат со електромагнетно зрачење, се нарекува фотолуминисценција. Ако ослободувањето на електромагнетното зрачење е многу брзо, за супстанцата се вели дека флуоресцира, а таа се нарекува флуоресцентна. Доколку ослободувањето на енергија е задоцнето, супстанцата се вели дека фосфоресцира и таа се нарекува фосфоресцентна (Raymond и Scott, 2003).

Флуоресценцијата е аналитички многу корисна појава и се користи за детектори кои се базираат на флуоресцентни мерења. Докажано е дека најселективните детектори кои се користат во течната хроматографија се флуоресцентните детектори.

Кога молекулата апсорбира светлина, настанува трансмисија на електрони кон повисоко електронско ниво и оваа апсорпција е многу специфична за молекулите од интерес: радијација на специфична бранова должина или енергија се апсорбира од страна на одделни молекулски структури. Ако бројот на електрони се зголемува во повисокото ексцитационо ниво, при апсорпција на светлина, а вишокот на енергија не се губи веднаш при судир со другите молекули, светлината може да се емитира на пониска фреквенција, при што електронот се враќа во неговата претходна состојба, а за супстанцата се вели дека флуоресцира.

Детекторите на индексот на прекршување се осетливи на речиси сите супстанции, но нивната граница на детекција е за околу 1000 пати повисока од онаа на UV-детекторите. Тие се многу чувствителни на промени на температурата (неопходно е термостатирање), но и на промена на притисокот, протокот и составот на мобилната фаза, што ги прави неупотребливи при градиентно елуирање. И покрај недостатоците, детекторите на индексот на прекршување многу често се користат при определување на супстанции кои воопшто или многу малку апсорбираат во UV подрачјето (пр. јаглехидрати).

Електрохемиските детектори се осетливи на супстанции кои може да се оксидираат или редуцираат (феноли, ароматични амини, пероксиди, алдехиди, кетони, меркаптани итн.). Тие се најчесто триелектродни системи со Ag/AgCl референтна електрода, помошна електрода од челик што не кородира и индикаторска електрода околу која на определен потенцијал минува елуатот. Струјата се мери меѓу индикаторската и помошната електрода. Индикаторските електроди се направени од стаклест графит за супстанции кои се оксидираат, односно капка жива за супстанции кои се редуцираат. Мобилната фаза е вода или други поларни растворувачи. Таа треба да содржи растворен електролит и задолжително да биде ослободена од кислород. Овој тип детектори се осетливи на промени на протокот и температурата.

11.4.2. Масена спектрометрија

Масената спектрометрија (MS) е релативно нова и ефикасна техника која има големо значење во истражувањата на примерок за анализа, вклучувајќи анализи на главно, големи молекули, како што се протени, олигосахариди, танини и сл. Оваа техника е погодна за проучување на структурите на најразлични компоненти **Течната хроматографија со масен детектор е најдобрата аналитичка техника за проучување на големи молекули во примерок за анализа и други примероци и претставува најефикасна алатка за проучување на нивната структура**

MS се базира на создавање јони од аналитот, нивна анализа според вредноста на односот маса/полнеж (m/z) и нивна детекција. MALDI-TOF е погодна техника за определување на присуство на големи молекули, со голема точност, и таа е применета за проучување на процијанидин олигомери до хептамери во рефлектрон мод, и до нонамери во линеарен мод.

Јони. Молекулски јон е наелектризирана честичка која има непарен број на електрони и се формира од молекулата (или од електронски неутрална честичка) преку додавање или отстранување на електрон. Молекулскиот јон може да се формира и со адиција на наелектризирани честички со одредени

маси, како протон, натриумов јон, хлориден јон и др. Исто така, молекулскиот јон не е честичка која настанала од цела молекула со отстранување на протон или хидрид (протон со два електрони). Молекулскиот јон не смее да се нарекува *јон родител* и овој термин не се користи во масената спектрометрија да објасни молекулски јон, прекурсорен јон или било кој друг тип на јон (Watson и Sparkman, 2007).

Фрагментен јон настанува при разложување на друг јон и овој термин обично означува јон кој настанал со фрагментација на молекулски јон или на честичка како протонирана молекула, депротонирана молекула, јон настанат со одделување на водороден јон, молекула која содржи натриум и сл. Фрагментните јони може да се формираат и од фрагментен јон формиран од молекулски јон, при т.н. секундарна фрагментација. Фрагментните јони се формираат преку раскинување на хемиските врски и тие секогаш имаат маса помала од масата на нивниот прекурсор (Watson и Sparkman, 2007).

Пикови. Во масената спектрометрија, пиковите ги претставуваат јоните кои се формираат во масениот спектрометар. Она што е важно е дека пиковите се карактеризираат со интензитет, а јоните се присутни во изобилство. Пикот со најголем интензитет во масениот спектар се нарекува основен пик. Прикажувањето на масените спектри може да биде апсолутно, со интензитет на пик кој ја прикажува актуелната вредност добиена за интензитетот на тековниот јон за јон со истата m/z вредност, или пиковите може да имаат релативен интензитет кој ги прикажува податоците на начин на кој интензитетот на основниот пик е 100 %. Комерцијалните инструментни различно ги прикажуваат масените спектри, некои имаат апсолутен интензитет на прикажување, други покажуваат релативен интензитет (Watson и Sparkman, 2007).

MS инструментот се состои главно од три важни компоненти: јонски извор, масен анализатор и детектор. Перформансите на овие компоненти влијаат на квалитетот на добиените квалитативни и квантитативни резултати (Lavagnini et al., 2006).

Изборот на јонизациона метода зависи од физичко-хемиските својства на анализот од интерес (испарливост, молекулска маса, термолабилност,

комплексност на матриксот кој го содржи анализот). Обично, јонските извори може да се поделат на две групи:

- извори кои бараат примерокот да биде во гасовита фаза пред јонизација, и
- извори за примероци со мала испарливост и високи молекулски маси.

Првата група вклучува извори за електронска јонизација (EI) и хемиска јонизација (CI). Втората група, пак, може да се подели на извори кои оперираат со раствори на примероците (електроспреј јонизација), хемиска јонизација при атмосферски притисок (APCI), фотојонизација со атмосферски притисок (APPI), како и извори базирани на десорпција на примерокот и јонизација од цврст супстрат (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI, ласерска десорпција/јонизација со помош на матрикс).

➤ Електронска јонизација (EI)

Електронска јонизација или јонизација со судир со електрони се базира на интеракција на енергичен електронски зрак (70 eV) со пари од примерокот (на притисок од 10^{-7} - 10^{-5} Torr) (Lavagnini et al., 2006). Оваа интеракција доведува до создавање на серии од јони поврзани со хемиските својства на компонентите кои се предмет на проучување. Така, при електронска јонизација, се формира молекулски јон M^{+} , кој се создава со губење на електрон од неутрална молекула:



како и серија на фрагменти. Некои од нив се формираат со едноставно раскинување на врските, додека други се формираат во процеси на повторно преуредување (раскинување на едни и формирање на други врски). Она што е важно за овој тип на јонизација е дека се добиваат репродуцибилни масени спектри. Со цел да се добијат квантитативни податоци со овој тип на јонски извор, главно влијаат два параметри:

- првиот е поврзан со губиток на примерок (поради проблеми поврзани со инјектирање на примерокот и отворената

конфигурација на изворот, како и термичко деградирање кое настанува во изворот), додека

- вториот параметар е поврзан со намалување на ефикасноста на одделување на јони (не оптимизирано поле за екстракција, можност од модификација поради онечистена внатрешна површина на изворот) (Иванова, 2009).

➤ *Хемиска јонизација*

Хемиската јонизација се базира на создавање на гасовити кисели или базни честички, кои потоа реагираат со неутрална молекула од аналитот формирајќи $[M+H]^+$ или $[M-H]^-$ јони, соодветно (Lavagnini et al., 2006). Почести се реакциите на протонирање на аналитот, при што, одвивањето на овие реакции е поврзано со афинитет кон протон (РА) на М и гасот реактант, а внатрешната енергија на добиените честички е поврзана со разликите помеѓу овие афинитети кон протони. Како пример може да се наведе експеримент изведен на органска молекула со вредност за РА од 189 kcal/mol (РАМ), која се протонира со CH_5^+ ($РАCH_4 = 127$ kcal/mol) и H_3O^+ ($РА H_2O = 165$ kcal/mol), но не со NH_4^+ ($РА NH_3 = 205$ kcal/mol). Овој пример ја покажува важноста на хемиската јонизација, која може ефективно да се примени на селектирани честички од интерес во комплексната матрица. Со други зборови, при соодветна селекција на јонот-реактант $[AH]^+$, може да се создадат $[MH]^+$ јони со РА повисока од таа на А.

➤ *Хемиска јонизација при атмосферски притисок (APCI)*

Овој тип на јонизација е воведен имајќи го предвид фактот дека при внесување на гасната фаза во изворот, реакцијата не зависи само од парцијалните притисоци на двата реактанти, туку зависи и од вкупниот притисок на средината. Поради ова, менувањето на оперативниот притисок од 0,1-1 Torr, присутен во внатрешниот дел на изворот за хемиска јонизација, кон атмосферски притисок, во принцип, доведува до зголемување на бројот на

создадени јони, а ова пак доведува до зголемување на осетливоста (Lavagnini et al., 2006).

При разработката на APCI методата, главниот проблем се однесувал на изборот на уред за јонизација. Најсоодветен и најефикасен уред е оној со електрично празнење (англиски: corona discharge). Важноста на оваа метода на јонизација е нејзината примена за анализа на компонети растворливи во соодветни растворувачи. Така, растворот се инјектира во загреана капилара (обично температурите се 350-400 °C), каде што испарува, излегува од капиларата и оди во делот за електрично празнење (corona discharge) каде владее атмосферски притисок. Обично, испарувањето е помогнато од азот кој протекува коаксијално во капиларата. Механизмот на јонизација е ист со механизмот присутен при хемиска јонизација. Молекулите од растворувачот, присутни во изобилство, стапуваат во интеракција со електроните кои потекнуваат од делот за електрично празнење. Формираните јони реагираат со други молекули од растворувачот доведувајќи до формирање на протонирани (во случај на позитивни јони) или депротонирани (негативни) јони. Еден проблем кој се јавува при овој тип на јонизација е формирањето на солватизирани молекули од анализот, т.е. кластери (групи) од молекулите со различен број на молекули од растворувачот. За да се изврши дегрупирање на молекулите, предложени се различни пристапи, меѓу кои, нереактивен судир со гас (обично тоа е N₂) и термични третмани, за кои се смета дека се најефикасни кои и денеска се применуваат (Иванова, 2009).

➤ *Електроспреј јонизација (ESI)*

Електроспреј јонизација се врши преку инјектирање на растворот од анализот низ метална капилара, во присуство на силно електрично поле. Создавањето на јони со ESI изворот настанува во три чекори:

- создавање на наелектризирани капки во регионот близу до излезот на металната капилара,
- брзо намалување на димензиите на капките преку испарување на растворувачот, и формирање на наелектризирани капки со намалени димензии, и

- создавање на јони во гасовита фаза, кои потекнуваат од малите наелектризирани капки.

При овој тип на јонизација, по инјектирање на примерокот, анализот излегува од металната капилара (со надворешен дијаметар од ред на величина 10^{-4} m) при потенцијал од 2-5 kV, додека, спротивната електрода, која се поставува на растојание од 1-3 cm, и која вообичаено, во ESI претставува скимер (внатрешен дијаметар 100-500 μ ; должина 5-10 cm) и “interface” кон масениот анализатор. Јачината на електричното поле е висока, а при вакви услови, наелектризираните честички од растворот се движат кон полето и се создава т.н. “Taylor конусна опашка”. Ако јачината на електричното поле е доволно висока, се формира спреј кој содржи мали наелектризирани капки. Во случај на позитивна анализа, т.е. кога иглата е поставена на позитивен напон, капките добиваат позитивен полнеж, односно негативен полнеж при негативна анализа. Наелектризираните капки се движат кон спротивната електрода. Испарувањето на растворот предизвикува намалување на димензиите на капките и зголемување на јачината на електричното поле. При специфичен радиус, одбивањето станува сè посилено и при вакви услови, доаѓа до “кулоновска експлозија” на капката.

Предложени се два механизми за формирање на јони во гасна фаза од мали наелектризирани капки. Првиот модел е наречен “механизам на полнеж на остатокот” и тој го опишува процесот на последователно лепење (раздвојување) кое доведува до формирање на мали капки со еден или повеќе полнежи, но само од една молекула на анализот. Подоцна, предложен е друг механизам, кој ја опишува директната емисија на гасовитите јони од капките, откако тие ќе достигнат одредени димензии. Овој процес е наречен “механизам на јонско испарување” (Lavagnini et al., 2006).

➤ *Фотојонизација при атмосферски притисок (APPI)*

Оваа метода на јонизација се состои од озрачување на испарениот раствор од анализот од интерес, со криптонова лампа при атмосферски притисок. Озрачувањето се врши со фотони чии енергии се до 10,6 eV

(Lavagnini et al., 2006). При фотојонизација важи едно едноставно правило, според кое, молекулата со јонизациона енергија (IEM) може да се јонизира со енергија $E\nu = h \cdot \nu$, само кога:

$$IEM \leq E\nu$$

Имајќи предвид дека поголем број растворувачи кои се користат во течната хроматографија имаат IE повисока од 10,6 eV, не може да се јонизираат при интеракција со фотон кој потекнува од Kг-лампа. Ова покажува дека APPI методата, во принцип е многу поефикасна за LC/MS анализа на компоненти кои имаат IE пониска од 10,6 eV. За компоненти со $IE > 10,6 \text{ eV}$, се користат фотојонизабилни супстанции кои делуваат како интермедиери за јонизација на молекулите од интерес (Иванова, 2009).

➤ *Ласерска десорпција/јонизација со помош на матрица (MALDI)*

При овој тип на јонизациона техника, настанува интеракција помеѓу ласерскиот зрак и цврстиот примерок кој претходно е подготвен со соодветна матрица (аналитот е присутен во многу мал моларен однос, 1:10 000). Оваа интеракција доведува до испарување на мал волумен од цврстиот примерок, во делот со висока густина на создадени пари, реактивните честички кои потекнуваат од озрачувањето на матриксот, реагираат со неутрални молекули од анализот, главно преку механизми на протонирање/депротонирање (Lavagnini et al., 2006). Подетален опис на оваа техника е даден во делот 11.5.

11.3.2. Примена на HPLC-DAD-MS за анализа на примероци примерок за анализа

Јаглехидрати

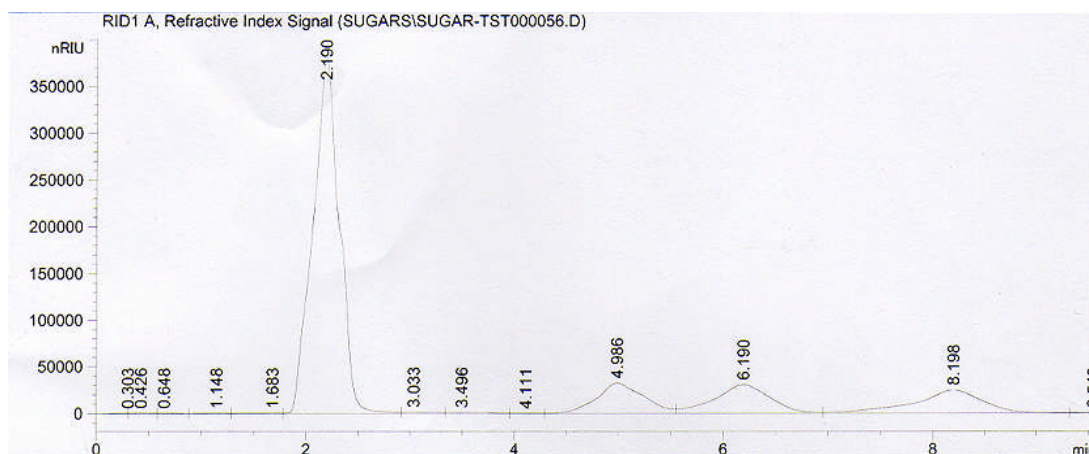
Јаглехидратите се важни компоненти во различни видови примерок за анализа. Квалитативниот и квантитативниот состав на јаглехидратите зависи од главно од природниот извор од каде потекнуваат. Освен тоа, концентрацијата на шеќери и/или нивниот однос со други компоненти (пр.

органски киселини) може да се искористи за следење на степенот на зрелост на овошјата, или за евалуација на рокот на траење на мед, условите на негово чување и складирање.

Анализата на поединечните шеќери може да се врши со HPLC, но нивната детекција не може да се врши со UV или флуоресцентен детектор без претходна дериватизација. Со години детекторот со индекс на прекршување (рефрактивен детектор, RID) се користи како единствен начин за детекција на јаглехидрати. Класичната анализа на шеќери со HPLC-RID се врши со изократно елуирање и најчесто користена мобилна фаза е вода или смеса од вода со ацетонитрил, како и посебна колона за анализа на шеќери или аминоклона. Односно, јаглехидратите се разделуваат со RP хроматографија (RP-реверзно-фазна хроматографија) со стационарни фази кои содржат аминоклопи поврзани со силика гел. Во 2000 година (Wey и Ding, 2000) разделувањето на шеќерите е извршено со слој од етилендиамин на силика гел, со што било постигната поголема стабилност на стационарната фаза.

За анализа на јаглехидрати применета и јоноразменувачка хроматографија, со примена на катјонски или анјонски јоноразменувачки смоли (Calull et al. 1999, Verette et al. 1995). За детекција на јаглехидрати, освен RID (Akiyama et al. 1999, Vendrell et al. 2000) од неодамна се применува електрохемиски детектор (ED), кој овозможува висока селективност и сензитивност дури и при анализа на комплексни смеси.

На Сл. XX е прикажан хроматограм на смеса од јаглехидрати која содржи глюкоза, фруктоза и сахароза.



Слика 6. HPLC хроматограм смеса од јаглехидрати (5 g/L) со ретенциони времиња на фруктоза (4.986 min), глюкоза (6.190 min) и сахароза (9.198 min) со проток на мобилна фаза (ацетонитрил:вода = 75:25) од 0,9 ml/min.

➤ *Протеини и пептиди*

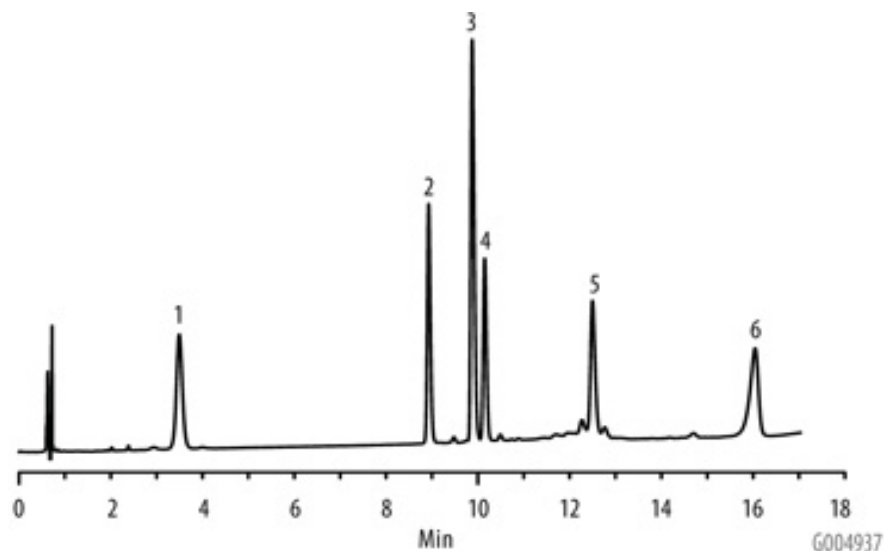
Протеините и пептидите се хетерогена група на соединенија кои содржат аминокиселини поврзани со аминокиселинска врска. Протеините се главни компоненти во хранта, главно поради нивната хранлива и функционална вредност. Тие обезбедуваат аминокиселини и азот потребен организмот. Имаат влијание на сензорните карактеристики на продуктите. Пептидите, кои настануваат со хидролиза на протеини, имаат важни сензорни, биолошки, технолошки и физиолошки својства. Тие се одговорни за сладкиот и горчлив вкус на многу продукти. Некои пептиди имаат антиоксидантна, токсиколошка и антимикробна активност. Протеините од млеко се главни извори на биолошки активни пептиди.

HPLC анализата на протеини и пептиди се врши со различна цел: да се карактеризира примерок за анализата, да се утврди лажен состав, да се проценат применети термички третмани и сл. За детекција и/или квантификација на протеини и пептиди се применуваат различни аналитички техники: хроматографија, електрофореза, масена спектроскопија, имунологија. Но, најчеста примена има HPLC поради високата резолуција. Со една хроматографска анализа може да се утврди составот и количеството на протеини, а анализата може да биде целосно автоматизирана.

Но, пред да се врши HPLC анализа на протеини и пептиди, примерокот треба претходно да се подготви. Цврстите примероци најчесто се хомогенизираат со соодветен растворувач. Најчесто се применуваат вода, кисели раствори или пуфери за екстракција на пептиди од примерок за анализа, а екстракцијата на хидрофобните пептиди најчесто се врши со хлороформ или метилен хлорид и метанол. Протеините и пептидите пред анализа може да се исталожат со органски растворувачи (етанол, метанол, ацетон), киселини (трихлорооцетна, сулфосалицилна), соли (амониум сулфат) или со подесување на pH до изоелектричната точка. По таложењето, се врши филтрирање или центрифугирање (Morton et al. 1999). Друг начин на подготовка е примена на дијализа или ултрафилтрација за изолација и разделување на протени и пептиди. Може да се применат и други методи, како ексклузивна хроматографија (SEC), афинитетна хроматографија (AC), а во поново време се почесто се користи цврсто-фазна екстракција (SPE) со различни сорбенти (од C2 до C18).

Детекцијата на пептиди се врши на 200-220 nm, бранови должини кои се карактеристични за многу компоненти во примерок за анализата. Пептиди со ароматичен остаток се детектираат на 254 nm (фенилаланин, тирозин и триптофан) или на 280 nm (тирозин и триптофан). Со флуоресцентен детектор може да се детектираат некои аминокиселини (тирозин и триптофан) или пептиди кои содржат аминокиселини. Електрохемиската детекција е ограничена само на некои пептиди кои содржат тирозин, триптофан, метионин, цистеин или цистин, но може да се примени за одредување на местоположбата на дисулфидните врски.

HPLC може да се примени за анализата на животиниски протеини (млеко, сирење и други млечни производи) и на растителни протеини (ориз, пченка, пченица и др.). На Сл. 7 е прикажан хроматограм на смеса од пептиди и нивна детекција на 220 nm.



Сл. 7. Сепарација на смеса од пептиди

Услови на разделување: колона C18 (10 cm x 4,6 mm I.D.), мобилна фаза: А (0,1 % трифлуороцетна киселина: ацетонитрил = 90:10) и В (0,1 % трифлуороцетна киселина: ацетонитрил = 25:75), градиентно елуирање (на почеток 25 % В, за 15 min 40 % В, на 20 min 60 % В), брзина на проток 1,5 mL/min

1- рибониклеоза, 2 – инсулин од свиња, 3 - инсулин од бизон, 4 - инсулин од човек, 5 - цитохром С, 6 – лизозом

11.4. MALDI-TOF-MS (Ласерска десорпција/јонизација со помош на матрикс- време на прелетување - масена спектрометрија)

MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization-ласерска десорпција/јонизација со помош на матрикс) е јонизациона метода базирана на ласерска јонизација и претставува една од најмоќните и најуспешни техники за масена спектрометриска анализа на големи молекули. Оваа техника за прв пат е воведена во 1987 год од Karas и соработниците (Karas et al., 1987). На почетокот била користена како масена спектроскопска метода за едноставна десорпција/јонизација, како што се методите FAB (fast atom bombardment-бомбардирање со брзи атоми) и LDMS (laser desorption mass spectrometry-ласерска десорпциона масена спектрометрија). Оваа техника се користи за изучување на полимерни биомолекули, како пептиди, протеини и олигонуклеотиди. Други полиња на примена на оваа техника се анализа на

технички полимери, мали органски молекули и молекули со мали маси, како аминокиселини, липиди и шеќери.

MALDI-MS се користи главно за квалитативна анализа, и главните предности на оваа техника се однесуваат на релативно лесниот начин на подготовка на примерокот; се анализира мал волумен од примерокот со висока осетливост, со прифатлива толерантност кон примеси, како соли и детергенти (Analytix, 2001).

Основниот принцип на MALDI-TOF-MS се состои во подготовка на смеса од аналитот со соодветна матрична супстанца, која значително го олеснува создавањето на јони во гасна фаза од големи, неиспарливи и термолабилни компоненти како што се протеини, олигонуклеотиди, синтетски полимери и големи неоргански соединенија (Tholey и Heinzle, 2006). Оваа смеса се озрачува со пулсирачки ласер, предизвикувајќи разградување на молекулите од аналитот и матриксот, проследено со јонизација на молекулите на аналитот. Ласерскиот зрак, UV (ултравиолетов) или IR (инфрацрвен), служи како извор за десорпција и јонизација. Матрицата, која игра клучна улога во оваа техника, преку апсорбирање на ласерската енергија, овозможува мал дел од анализираниот супстрат да испари. Кога молекулите на примерокот ќе преминат во пара, тие се јонизираат и електростатски се пренесуваат во масениот спектрометар, каде што се разделуваат од јоните на матриксот и индивидуално се детектираат со масена спектроскопија со време на прелетување (TOF-MS).

Најчесто применувани матрици за MALDI се мали органски молекули кои апсорбираат во опсег од 266-355 nm. Типичните матрици се супстанции кои имаат хидроксидни и аминокиселински групи во орто- или пара- положба (-OH, -NH₂) и карбонилни групи (карбокси група, амиди, кетони) (Tholey и Heinzle, 2006). Постојат неколку класи на супстанции кои најчесто се применуваат како матрици:

- Деривати на бензоева киселина, на пр. 2,5-дихидроксибензоева киселина (2,5-DHB), посебно погодна за анализа на молекули со мали молекуларни маси, протеини и гликопротеини;

- Деривати на циметна киселина, на пр. α -цијано-4-хидроксициметна киселина (CHCA), за анализа на пептиди; ферулна киселина (FA), за анализа на пептиди; синапинска киселина (SA), за анализа на протеини;
- Полихидроксиацетофенони, на пр. 2,3,4-трихидроксиацетофенон
- Хетероароматични и кондензирани ароматични соединенија, посебно деривати кои содржат азот, како на пр. пиридин, никотинска киселина, 3-амино хиолин и деривати на пиколинска киселина, како на пр. 3-хидроксипиколинска киселина (ЗНРА). Овие матрици се користат за анализа на олигонуклеотиди, гукопротеини.
- *MALDI матрици. Својства и услови*

Матриците кои се користат за MALDI анализа треба да исполнуваат повеќе услови истовремено:

- Да можат да ги вметнат и да ги изолираат анализите (на пр. со ко-кристализација)
- Да бидат растворливи во растворувачи компатибилни со анализот
- Да бидат стабилни на вакуум
- Да ја апсорбираат ласерската енергија
- Да предизвикуваат редесорпција на анализот под дејство на ласерското зрачење
- Да поддржуваат јонизација на анализот.

Се смета дека соединенијата со лабилни протони, како што се карбоксилните киселини, се добри MALDI матрици во позитивен јонски мод бидејќи може лесно да протонираат неутрални молекули на анализот. Кисели средини не се секогаш пожелни ако треба да се спречи денатурирање на терциерната структура на биомолекули кои се анализираат. Затоа, за анализи на протеини, најчесто се користат некисели матрици. Соединенијата кои не се протонираат лесно, наместо да се претворат во катјонска форма, често се додаваат мали количини на соли во примерокот (Cu или Ag), а соединенијата кои лесно се депротонираат, како што се олигонуклеотидите, обично се детектираат во негативен јонски мод.

Анализата со MALDI масена спектрометрија се одвива во два чекори:

- 1- Првиот чекор вклучува подготовка на примерокот, со мешање на анализот и матрикот во моларен вишок. Кога се применува ултравиолетов ласер, типични матрици се најчесто ароматични киселини кои силно ја апсорбираат ласерската енергија при соодветната бранова должина. Могли се и други ласерски бранови должини, како што е областа на инфрацрвено зрачење, при што матрикот се стимулира со вибрациона екситација. Во овој случај, се користат различни компоненти како матрици.
- 2- Вториот чекор при изведување на MALDI анализата вклучува десорпција на големи делови од примерок во цврста форма преку кратки пулсеви на ласерската енергија.

➤ *Техники за подготовка на примероците*

Освен избор на матрикс, за успешна MALDI анализа потребно е да се примени соодветна постапка за подготовка на анализот (Иванова, 2009). Се применуваат различни протоколи и методи, меѓу кои најважни се методата на сува капка, препокриен слој и сендвич метода. Накратко, подолу е даден опис на неколку постапки кои се применуваат за подготовка на примероците од различна природа:

- **Сува капка (Dried Droplet).** Оваа постапка за прв пат е воведена од страна на Karas и Hillenkamp во 1988 год. Капка од раствор на матрицата се меша со растворениот анализ и се суши, при што се создава цврст кристален слој кој се внесува во масениот спектрометар за анализа. Кристалите од анализ/матрикс може да се измијат за да се отстранат неиспарливите компоненти. Оваа метода толерира присуство на соли и пуфери, но во ограничено количество и претставува добар избор за анализа на примероци кои содржат повеќе од еден протеин или пептид.
- **Сушење со вакуум (Vacuum Drying).** Кристализација со вакуум сушење е варијација на методата со сува капка при која, финалната капка од анализ и матрикс брзо се суши во вакуумска комора. Ова овозможува хомогено редуцирање на големината на кристалите од

аналит/матриксот. Формирањето на помали кристали ја подобрува точноста на детекција на маси и резолуцијата.

- **Иситнет кристал (Crushed Crystal).** Методата “иситнет кристал” е посебно разработена за да се овозможи растење на кристалите од анализит и матрикс во присуство на високи концентрации на неиспарливи растворувачи (глицерол, 6 М уреа и др.) без претходно пречистување. Создадените филмови се поеднородни, во споредба со слоевите кои се формираат со методата на сува капка, но главниот недостаток на оваа метода е долгото време за подготовка на примерокот кое се одвива во неколку степени. Бара прецизна контрола во текот на подготовката на примерокот за да се елиминираат нерастворени матрични кристали, кои може да предизвикаат поместување на нуклеацијата (формирањето на кристали) од металната површина на поголемиот дел од капката.
- **Брзо испарување (Fast Evaporation).** Методата на брзо испарување е воведена со цел да се подобри резолуцијата и точноста на мерење на масите. При оваа метода, капка од матричниот раствор се нанесува на MALDI плочката и се остава да испари растворувачот. На врвот од исушената капка од матрицата се нанесува капка од растворот од анализитот, па и тој се остава за да испари растворувачот. Потоа се внесува во масениот спектрометар за анализа. Оваа постапка овозможува формирање на стабилни филмови.
- **Препокриен слој (Overlayer).** Оваа метода е комбинација од методите на иситнет кристал и брзо испарување, при што се овозможува брзо испарување на растворувачот, се формира прв слој од мали кристали, проследено со нанесување на смеса од матрикс и анализит на врвот од кристалниот слој. Разликата помеѓу брзо испарување и препокриен слој е во вториот слој од растворот кој се нанесува, при што се смета дека овој слој дава подобри резултати, особено за анализа на протеини или смеси од протеини и пептиди.
- **Сендвич (Sandwich).** Сендвич методата е добиена од методите на брзо испарување и препокриен слој. При оваа постапка, анализитот не се меша со матриксот. Капка од матриксот се нанесува на MALDI плочката, се суши, а потоа се додава капка од анализитот, а по неговото сушење,

следува повторно додавање на капка од матриксот, при што анализот се наоѓа во сендвич, помеѓу два слоја од матриксот.

- **Хемиска течност (Chemical Liquid).** Подготовката на вакви примероци се состои од растворање на анализот во соодветен моларен однос во течен матрикс, често проследено со испарување на растворувачот пред да се внесе примерокот во вакуум системот на масениот спектрометар.
- **MALDI на 2D-гелови (MALDI on 2D-Gels).** Специјален протокол кој овозможува директно проучување на комплексни примероци со MALDI MS: детекција на протеоми во внатрешни ќелии, MALDI записи на биолошки тенки секции, или анализа на 2D-гелови не само со постоечки точки, туку и директна анализа на плочка.
- **Нерастворливи примероци (Insoluble Samples).** Посебен предизвик претставуваат нерастворливите примероци за кои се смета дека е речиси невозможно да се вметнат во матрикс со еден од претходно споменатите методи. Најдено е дека со притискање на смеса од фино смелен примерок и матрикс, под притисок, можно е да се добијат MALDI податоци и за нерастворливи соединенија, како што се на пр. синтетски полимери со големи молекулски маси.

Иако електроспреј јонизацијата е конкурентна и комплементарна, MALDI останува метод на избор во повеќе клучни области, главно протеомика. ESI/MS спектрите вклучуваат многу пикови на повеќекратно наелектризираны јони кои може да ја усложнат интерпретацијата на спектрите на сложените примероци. Осетливоста на ESI (електроспреј изворот) се намалува во присуство на соли, примеси и органски пуфери, кои пак добро се толерирани со MALDI.

MALDI-TOF-MS има предности над другите методологии, вклучувајќи едноставна употреба, брза анализа, висока осетливост, широка примена комбинирана со добра толеранција кон контаминанти (Karas, 1996). Таа претставува нова, значајна техника за карактеризација на неколку различни молекули и неодамна е воведена и за анализа на кондензирани танини или едноставни флавоноли и антоцијани, главно во научни истражувања во областа на примерок за анализа.

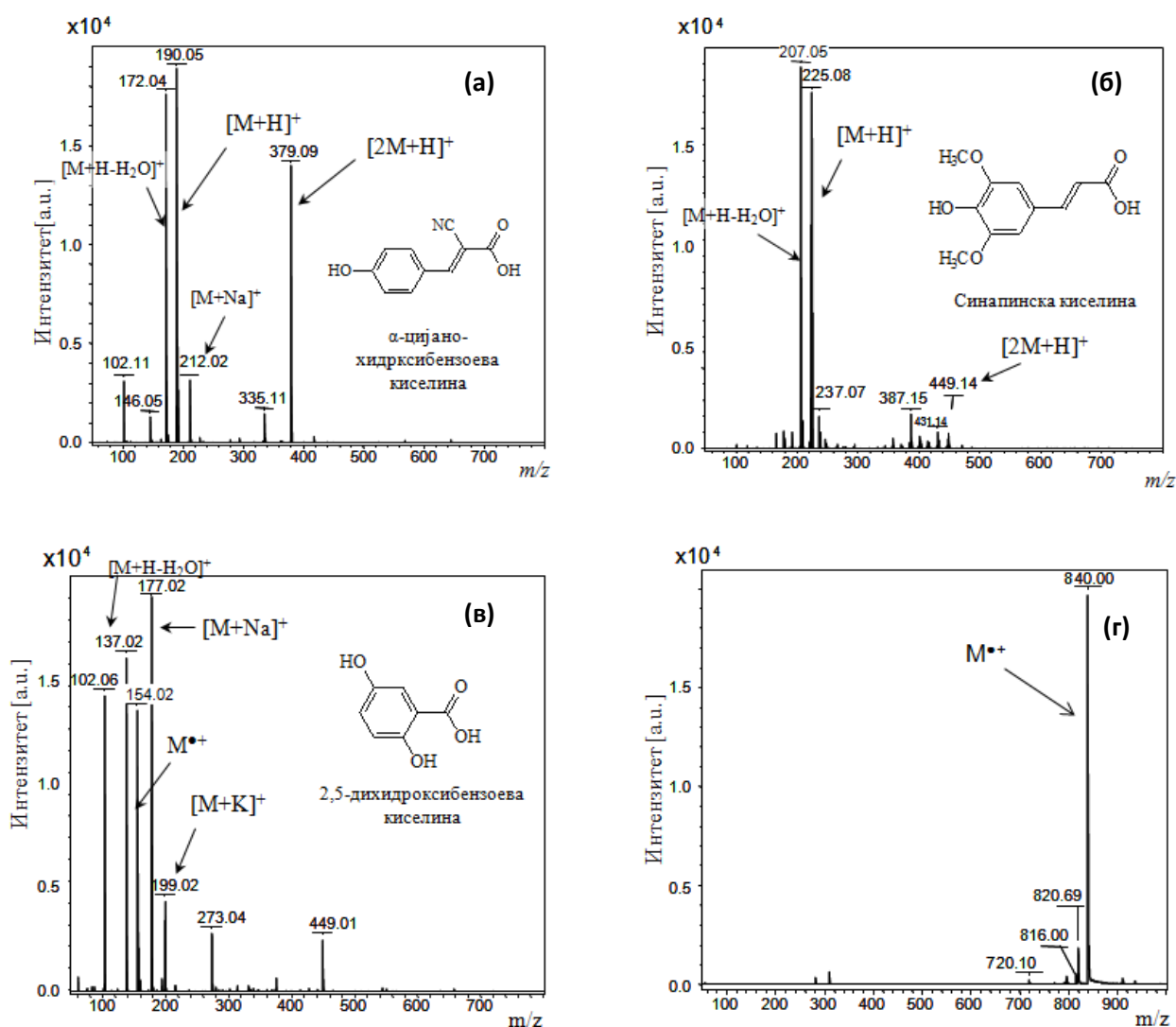
11.4.1. Примена на MALDI-TOF-MS за анализа на примероци примерок за анализа

Примената на MALDI-TOF-MS техника за анализа на примерок за анализа е многу важна област на истражување. Оваа техника е ефикасна за определување на состав на протеини во различни примероци примерок за анализа (Catinella et al. 1996, Camafeita et al. 1998, Angeletti et al. 1998, Sabbadin et al. 1999, Cozzolino et al. 2001). Така, оваа техника може успешно да се примени за брзо утврдување на потекло на млеко, односно со оваа техника може да се открие додавање на млеко во прав во свежо млеко. Бидејќи со оваа техника многу брзо се вршат анализите, за време од 1 час, може да се анализираат околу 100 примероци на млеко. Освен тоа, со оваа техника може да се утврди дали млекото е од еден вид на животно или тоа е мешано. Така, со MALDI-TOF-MS се детектираат мали количества на млеко од крава додадено во млеко од овца, брз база на присуство на β -лактоблбулини.

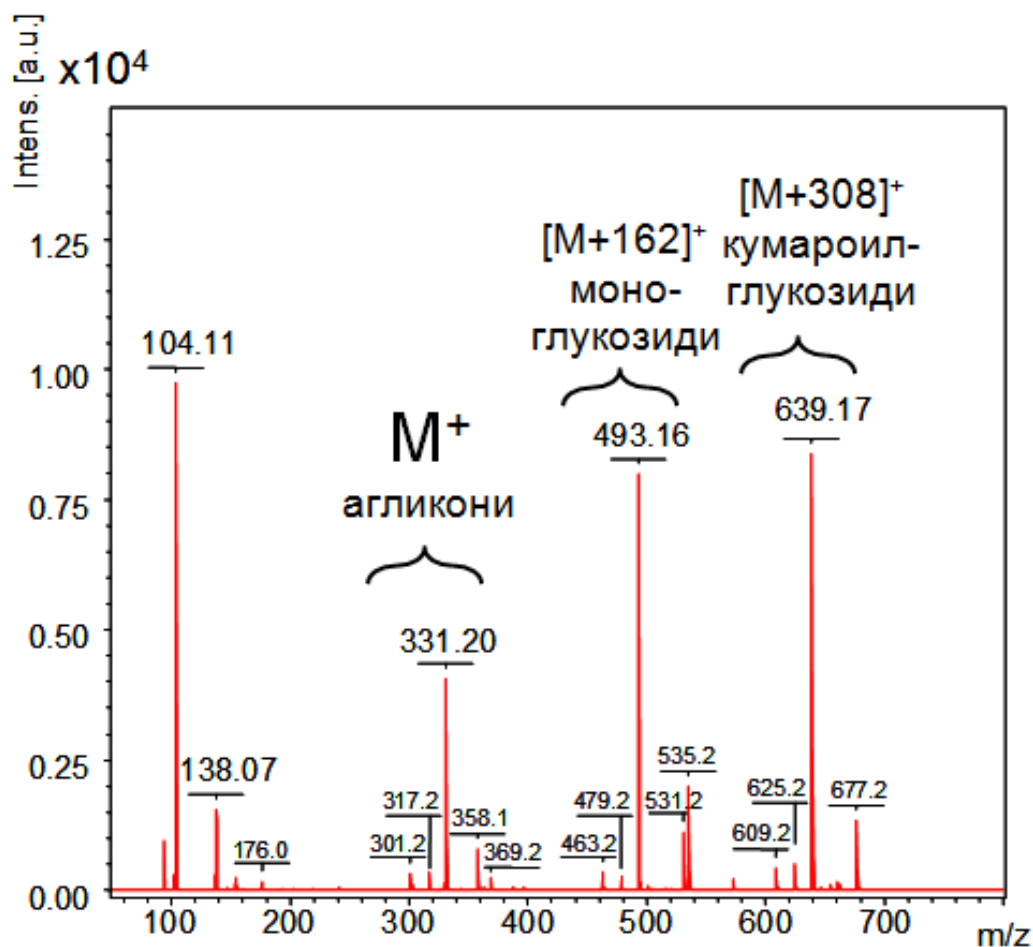
MALDI-TOF-MS е моќна техника за карактеризација на јаглехидрати. Оваа техника е ефикасно употребена за разработка на MS методологија за квалитативна и квантитативна анализа на фруктоолигосахариди во различни примероци (Wang et al. 1999). За анализа на јаглехидрати тестирани се повеќе матрици, меѓу кои 2,5-дихидроксибензоева киселина (DHB), 3-аминоквинолин (3-AQ), 4-хидрокси- α -цијано-цинематна киселина (HCCA) и 2,5-дихидроксибензоева киселина (DHB) – 1 – хидроксиизокинолин (HIC). Најдобри резултати, вклучувајќи задоволителни спектри и повторливост се постигнати со примена на матрицата 2,5-дихидроксибензоева киселина (DHB). На Сл. XX се прикажани MALDI-TOF-MS спектри на четири најчесто применувани матрици за MALDI анализи.

MALDI-TOF-MS може да се примени за проучување на структурата на полифеноли во различни примероци. Така, оваа техника игра важна улога во научните истражувања од областа на лозарството и енологијата. Претставува софистицирана техника за карактеризација на полифенолни компоненти во вино и грозје користена од страна на повеќе истражувачи (Sugui et al., 1998; Sugui et al., 1999; Wang & Sporns, 1999; Reed et al., 2005; Es-Safi et al., 2006; Tholey и Heinzle, 2006; Carpentieri et al., 2007). Оваа форма на молекулска

јонизација овозможува масена спектрометриска анализа на молекули со широк опсег на маси. На Сл. XX е прикажан MALDI-TOF-MS спектар на екстракт од луспи од грозје од сортата Вранец, со примена на DBH марица, за анализа на антоцијани (агликони, моноглукозиди и кумароилглукозиди).



Сл. 8. Позитивни јонски MALDI-TOF-MS спектри на матриците: CHCA (а), SA (б), (в) 2,5-DHB, (в) C70 фулерен (г) (превземено од Иванова, 2009, Докторска дисертација)

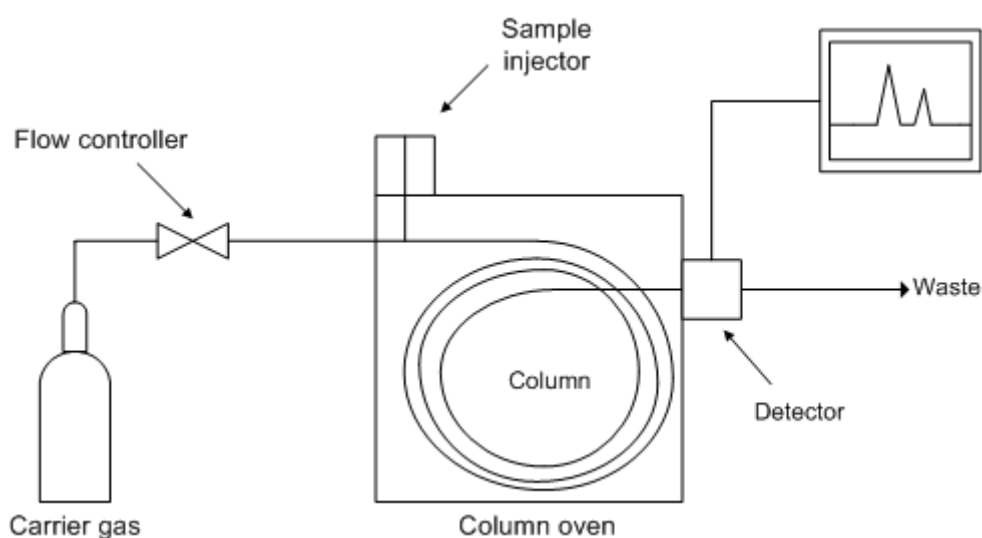


Сл. 9. MALDI-TOF-MS спектар на екстракт од лушки од грозје од сортата Вранец со примена на DHB матрица

11.5. Гасна хроматографија

Гасната хроматографија е физички метод на разделување компоненти од некоја смеса помеѓу подвижна гасна фаза и неподвижната цврста или течна фаза. Во зависност од агрегатната состојба на неподвижната фаза, постојат два типа гасна хроматографија: гасно – апсорпциона хроматографија која се обележува со **GSC** (*gas solid chromatography*) и гас–распределбена хроматографија **GLC** (*gas liquid chromatography*). Кај **GSC**, неподвижната фаза е активан цврст апсорбенс, а основен процес на разделување на компонентите од пробата е апсорпцијата. Феноменолошки тоа е апсорпциона

хроматографија. Кај **GLC** неподвижната фаза е тешко испарлива течност разлеана преку некоја цврста подлога со голема површина. Основниот процес е распределба и феноменолошки тоа е распределбена хроматографија. Сите закони што важат за апсорпцијата и распределбата ќе важат во гасната хроматографија.



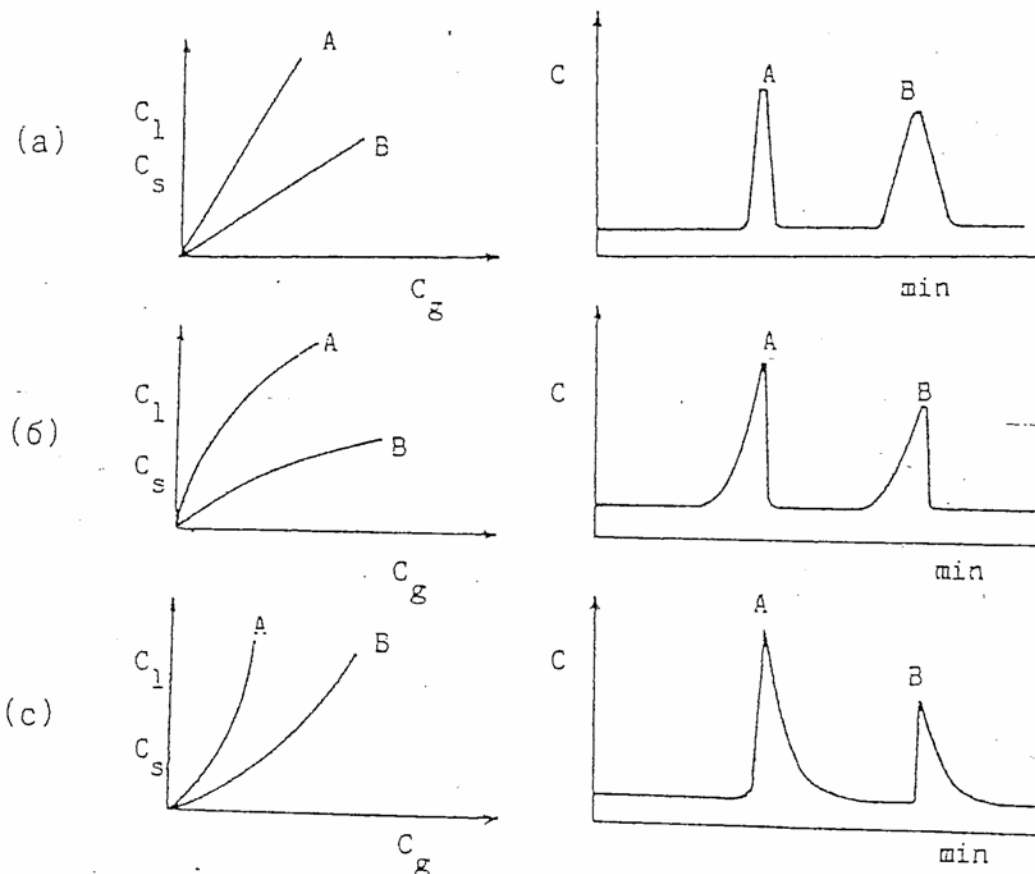
Слика 10, Уред за гасна хроматографија

11.6. Теоретски основи на гасната хроматографија

За да може да се даде теоретско толкување на овие процеси треба да се претпостави дека постои рамнотежа на испитуваните компоненти во подвижната и неподвижната фаза. Кај **GLC** хроматографијата односот на рамнотежните концентрации во подвижната и неподвижната фаза е даден со **Nernst – овата равенка** $K = C_p / C_s$. Во идеален случај, кога **K** не зависи од концентарцијата на **C_p** и **C_s**, се добива линеарна изотерма (сл. а.). Експериментално, ваква изотерма обично се добива за разредени системи, односно за мали концентрации на **C_p** и **C_s**, при што детекторот ќе даде добро дефинирани и симетрични пикови. Во случај кога **K** се менува со односот на концентрациите **C_p** и **C_s**, се добиваат нелинеарни изотерми (сл. b. и сл. c.). Добивањето нелинеарни изотерми е доста чест случај во **GSC** хроматографијата. Обликот на кривите (сл. b.) одговара на **Langmuir – овите**

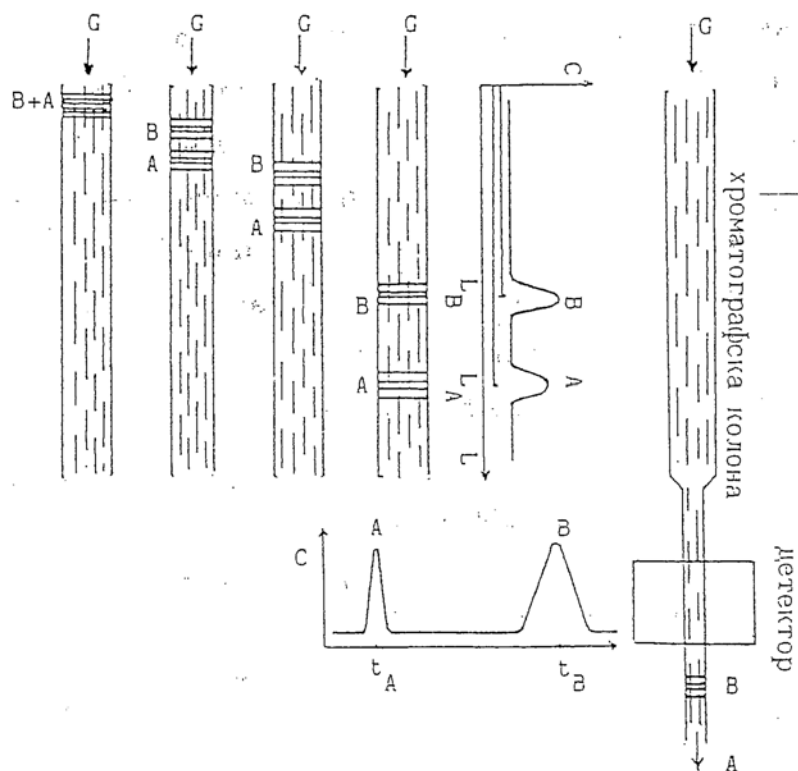
изотерми, додека формата на кривите (**сл. с**) одговара на **Froindlich – овите** изотерми. И кај двата типа криви детекторот дава асиметрични пикови.

Основниот принцип на разделување во гасната хроматографија е прикажан на сликата погоре. Испитуваната смеса влегува во хроматографска колона и во неа се разделува на составните компоненти кои имаат различно време на задржување во колоната, како резултат на различната адсорпција (**кај GSC**) или различните вредности на коефициентот на распределба (**кај GLS**). Потоа, компонентите, сите при различни временски интервали, излегуваат од колоната заедно со гасот носител кој истовремено претставува и елуент. Како што претходно спомнавме, во хроматографската анализа постојат три техники на разделување: фронтална анализа, анализа со истиснување и елуентна анализа. Најчесто користена е последната, при што инертниот гас носител е растворач и елуент. На тој начин, хроматографската колона ќе биде испрана по завршувањето на една анализа и веднаш спремна за друга анализа. Ова значи дека гасот носител, носејќи ја испитуваната проба најпрво ги создава зоните, а потоа колоната ја пере од нив, однесувајќи ги со себе надвор од колоната разделените компоненти.



**Слика 11. а) Линеарни изотерми со симетрични пикови
 б) Нелинеарни Langmuir – ови изотерми со асиметрични пикови
 с) Нелинеарни Froindlich – ови изотерми со асиметрични пикови**

Со гасната хроматографија може да се изведуваат квалитативни и квантитативни анализи на раздвоените компоненти како и да се определуваат поголем број физичко – хемиски и термодинамички параметри на испитуваната проба. За таа цел најнапред треба да се изврши анализа на добиениот хроматограм, да се покаже кои се параметри може да се прочитаат од него и потоа да се дефинираат прочитаните параметри.



Слика 12. Создавање зони и регистрирање на гасниот хроматограм:
 G – гас носител; B и A – компоненти на пробата; L_A и L_B – измината
должина на колоната A и B ; t_A и t_B – време на детекција на A и B .

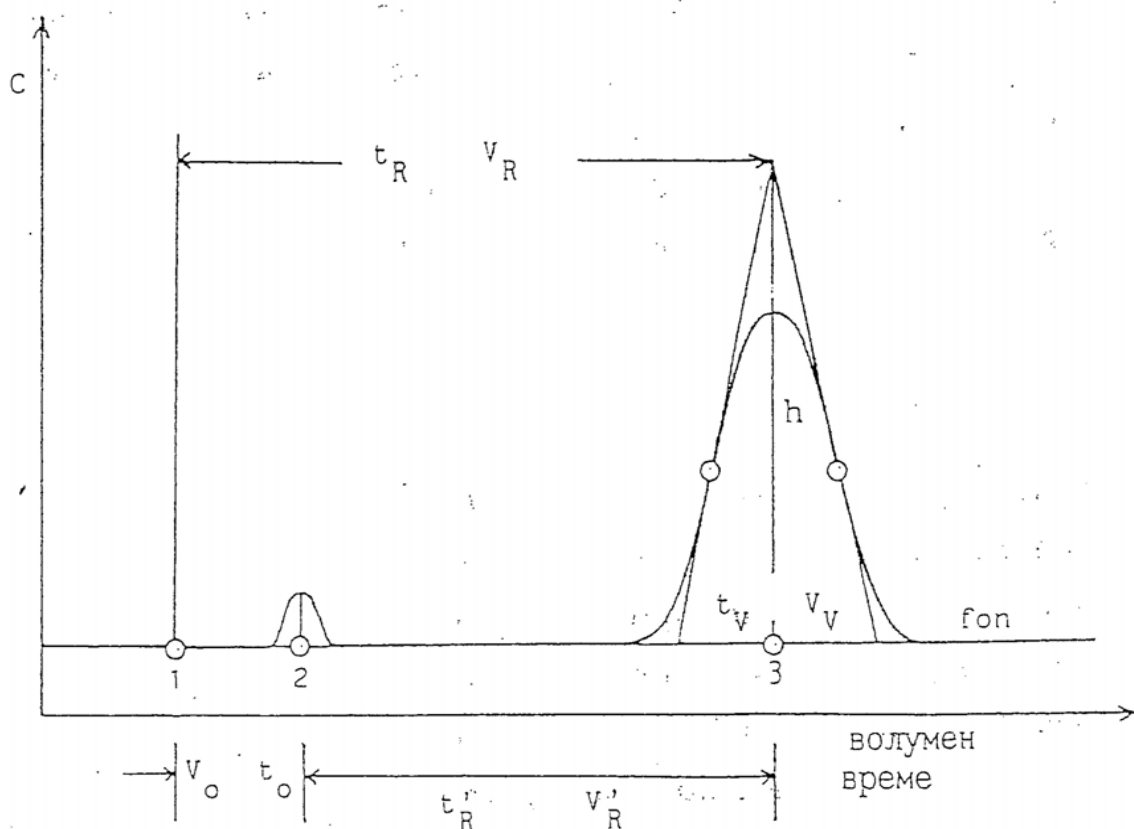
11.6.2. Анализа на хроматограм

На сликата подолу има претставено еден идеализиран хроматограм кои што е добиен при елуирање на една компонента. На апсцисната оска е дадено времето на елуирање или волуменот на инертниот гас носител (чиј проток е константен), а на ординатата одговорот на детекторот (концентрација или mV).

Основната или нултата линија (фон) претставува одговор на детекторот од подвижната фаза на чистиот гас носител. Во точката 1 во хроматографската колона се внесува испитуваната проба, при што неизбежно е внесување макар и на некое минимално количество воздух или друг инертен гас кој влегува паралелно со пробата. На точката 2 се појавува мал пик на инертниот гас кој не се апсорбирал во колоната и кој има иста брзина како и брзината на гасот

носител. Времето потребно воздухот (кој не се задржува на неподвижната фаза) да помине од местото на внесување во хроматографската колона до местото на детекција, се вика **време на поминување и се обележува со t_0** . Внатрешниот волумен на гасната фаза во колоната плус мртвиот волумен на уредот се обележува со V_0 , од каде произлегува дека V_0 е волумен на задржување на неапсорбиралиот гас.

Во точката 3 се појавува изразен пик на изелуираната компонента која, поради адсорпцијата, се задржала извесно време во колоната. Кривата на изелуираната компонента (пикот) има форма на **Gaus – овата крива** на распределба. Формата на овој пик за реален систем ќе зависи од вредноста на коефициентот на распределба, а неговата висина (h) е растојание помеѓу фонот и врвот на пикот, t_v е растојание помеѓу пресечните точки на фонот и тангентите повлечени од точките на инфлексција. Висината на пикот е функција од концентрацијата на елуираната компонента, а површината под пикот е право пропорционална со неа.



Сл. 13. Основни параметри на еден хромтограм

1 – внесување проба; 2 – воздушен пик; 3 – изелуирана компонента, t_0 – време на поминување на инертниот гас; V_0 – внатрешен волумен на гасната фаза + мртов волумен на колоната; t_R – време на задржувањето (ретенционо време); V_R – волумен на задржувањето (ретенционен волумен); V_R – редуциран волумен на задржување; t_R – редуцирано време на задржувањето

$$t_V = 4g \text{ и } V_V = 4g - \text{ширина на пикот.}$$

Време на задржување или ретенционо време t_R – претставува време од внесувањето на пробата до појавата на максимумот на пикот. Тоа зависи од природата на изелуираната компонента, природата и количината на неподвижната фаза, мртвиот волумен во хроматографскиот систем, волуменот на гасот носител, големината на протокот, разликата во притисоците по должината на колоната и температурата. Ако ретенционото време се коригира за времето на поминување t_0 , се добива редуцирано ретенционо време t_R :

$$t_R = t_R - t_O$$

Волумен на задржување или ретенционен волумен V_R – е потребниот волумен на гасот носител за да може од колоната да излезе некоја од разделените компоненти на испитуваната проба. Тоа е волумен од моментот на влезот на пробата во колоната до излезот на некоја раздвоена компонента. Ако t_R се помножи со протокот на инертниот гас носител F_C , се добива ретенционен волумен:

$$V_R = F_C \cdot t_R$$

Ако t_R се помножи со протокот на инертниот гас носител F_C , се добива редуциран ретенционен волумен:

$$V_R = F_C \cdot t_R = V_R - V_O$$

Чист или вкупен ретенционен волумен V_C – се добива кога редуцираниот ретенционен волумен ќе се помножи со некој фактор j кој врши корекција на градиентот на притисокот по должината на колоната:

$$V_C = j \cdot V_R = (V_R - V_O) \cdot j$$

каде што:

$$j = \frac{3 \cdot (P^2 - 1)}{2 \cdot (P^3 - 1)} \quad \text{при што} \quad P = \frac{P_1}{P_2}$$

P_1 и P_2 – притисоци на гасот носител на влезот и на излезот од колоната.

Специфичен ретенционен волумен V_S . Ретенциониот волумен во голема мерка зависи од количеството на стационарната течна фаза и температурата во колоната. За да се земат предвид овие два фактора, воведена е големината на специфичен ретенционен волумен.

$$V_S = \frac{V_C \cdot 273}{T \cdot C_L}$$

каде што C_L е тежина на течната фаза во колоната, а T температура на колоната.

Корегираното време на задржување t_R° - се добива кога експерименталното добиено време на задржувањето ќе се помножи со факторот J .

$$t_R^o = t_R \cdot j$$

Корегиран волумен на задржување V_R^o - се добива кога експериментално добиениот волумен на задржување се помножи со факторот **J**.

$$V_R^o = j \cdot V_R = j \cdot t_R \cdot F_C = t_R^o \cdot F_C$$

Мртов волумен V_m . Во хроматографскиот апарат вкупниот волумен што го зафаќа гасот носител е :

$$V_{BK} = V_{КОЛ} + V_{ИСПАРУВАЧ} + V_{КОМУНИКАЦИИ} + V_{ДЕТЕКТОР}$$

Од V_{BK} само $V_{КОЛ}$ е активен волумен, односно волумен на кој се одвива хроматографскиот процес.

Другите волумени ($V_{ИСПАРУВАЧ}$, $V_{КОМУНИКАЦИИ}$ и $V_{ДЕТЕКТОР}$) низ кој поминува гасот носител се неактивни волумени и претставуваат мртов волумен, т.е :

$$V_m = V_{ИСПАРУВАЧ} + V_{КОМУНИКАЦИИ} + V_{ДЕТЕКТОР}$$

Според тоа, во волуменот на задржување на неапсорбираниот гас V_o удел има и мртниот волумен.

Волуменот на гасот носител во колоната, што всушност претставува активен волумен на гасот се добива од равенката:

$$V_c = V_o \cdot j$$

V_c – претставува слободен волумен на хроматографска колона, кој може да го заземе гасот носител. Според тоа, V_c е волумен на гасот носител во колоната.

Коефициент на распределба. Кога испитуваната проба влегува во колоната, таа веднаш се распределува во согласност со **Нернстовиот закон** и се воспоставува динамичка рамнотежа во испитуваната проба помеѓу стационарната течна фаза и подвижната гасна фаза. Концентрацијата на испитуваната проба, во секоја од фазите, е дадена преку коефициентот на распределба:

$$K = \frac{C_s}{C_c}$$

C_s и C_c се концентрации на пробата во стационарната течна фаза и подвижната гасна фаза.

Ако $K = 1$, испитуваната проба за време на нејзиното поминување низ колоната е рамномерно распределена помеѓу двете фази (половина време во гасната фаза, а половина време во течната фаза).

Ако се земе предвид дека специфичниот ретенционен волумен V_s претставува однос на чистиот ретенционен волумен V_c (кој претставува волумен на гасна фаза) и C_L , што претставува тежина на течната фаза, коефициентот на распределба може да се пресмета и од изразот:

$$K = \frac{V_c \cdot 273}{T \cdot C_L} P_L \left[\frac{T}{273} \right] = V_s \cdot P_L \left[\frac{T}{273} \right] = \frac{V_c}{V_L}$$

P_L – густина на течната фаза на температура T на колоната.

Експериментално, коефициентот на распределба се определува по равенката:

$$V_R^o = V_c + V_L \cdot K \quad \text{или} \quad K = \frac{V_R^o - V_c}{V_L}$$

каде што V_L е волумен на течната фаза во хроматографската колона.

Фактор на ретенција или фактор на селективност α . Стационарната фаза е толку поселективна колку е поголема разликата на ретенционите времиња на разделуваните компоненти. Селективноста на стационарната фаза се одредува преку факторот на ретенција. За двокомпонентниот систем **A** и **B** тој ќе биде:

$$\alpha = \frac{t_{R_B}}{t_{R_A}} = \frac{V_{c_B}}{V_{c_A}} = \frac{K_B}{K_A}$$

Кога $\alpha \gg 1$ или $\alpha \ll 1$, селективноста е поголема.

➤ **Ефикасност на хроматографската колона**

Под ефикасност на хроматографската колона се подразбира способноста на колоната во целост да ги раздвои компонентите од испитуваната проба. Таа се изразува преку бројот на теоретските подови. **Под теоретски под** се подразбира оној најмал замислен дел (елемент) од хроматографската колона чиј волумен е доволно голем за во него, при распределбата на испитуваната проба, да може да се постави рамнотежа помеѓу подвижната и неподвижната фаза. За да може да се пресмета бројот на

замислените подови и за да може да се постават некои математички зависимости, треба да се постави модел на идеализирана хроматографска колона, кој треба да ги исполнува следниве услови.

А) Цврстиот носител на неподвижната фаза да е апсолутно инертен;

Б) Протокот на гасната фаза по целата должина на колоната да е константен;

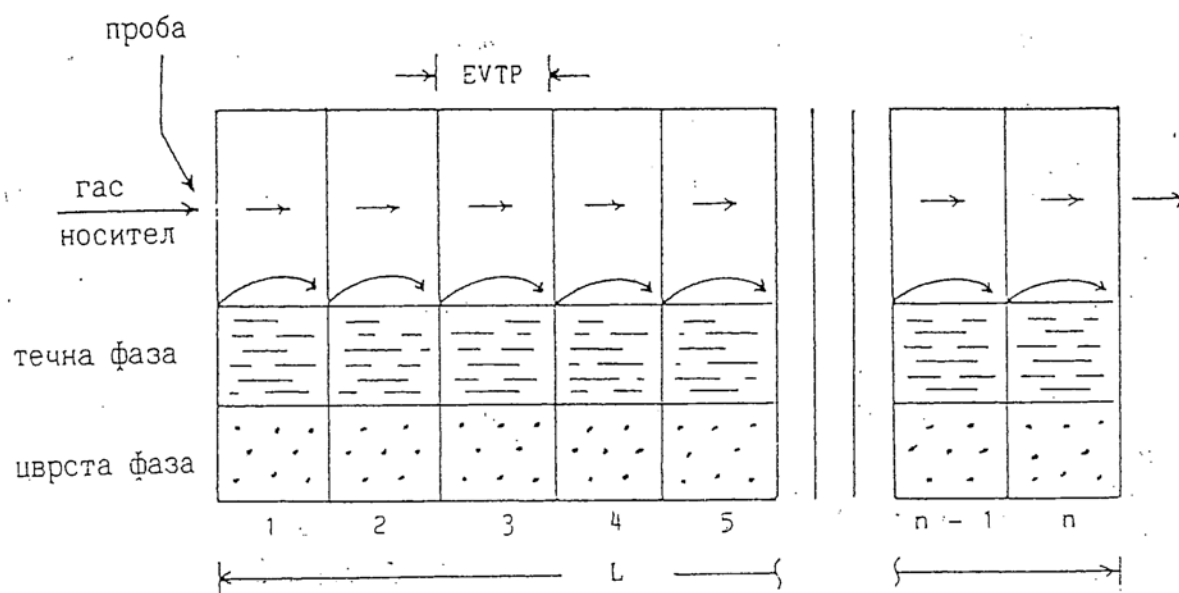
В) Притисокот на гасот да е константен и да е ист на влезот и излезот;

Г) Да нема мртов волумен;

Д) Да нема процеси на дифузија

Ако испитуваната проба се внесе во теоретски замислениот изолиран прв под, таа ќе се распредели помеѓу гасната и течната фаза кои се наоѓаат во рамнотежа, за што важи **Нернстовиот закон** за распределба:

$$C_{\text{НЕПОДВИЖНА ФАЗА}} \times V_{\text{НЕПОДВИЖНА ФАЗА}} = C_{\text{ПОДВИЖНА ФАЗА}} \times V_{\text{ПОДВИЖНА ФАЗА}}$$



Сл. 14. Шема на хроматографска колона со теоретски подови

L – должина на колоната; **EVTP** – еквивалентна висина на теоретскиот под;
n – број на подовите

Доколку во некој временски интервал во првиот теоретски под навлезе ново количество на гасот носител **dv** (а бидејќи гасот има константен проток) **dv = V_g**, каде што **V_g** е волумен на гасот што постои во секој теоретски под и е во рамнотежа со течната фаза. Со влегувањето на **dv** во првиот теоретски под, постојниот гас со волумен **V_g** од првиот теоретски под ќе биде истиснат и ќе

премине во вториот, заедно со молекулите или јоните на испитуваната проба кои се распределени во гасната фаза. Сега повторно се воспоставува рамнотежа помеѓу гасната и течната фаза. Ова поместување оди каскадно, така што идентично количество на гас dv излегува од последниот теоретски под на колоната и влегува во детекторот. На тој начин, со преминување на испитуваната проба од под во под количеството на испитуваната супстанца која во даден момент би се наоѓала во секој од теоретските подови, може да се пресмета со развивање на биномната равенка:

$$\left[\left(1 - \frac{dv}{V_{ef}} \right) + \frac{dv}{V_{ef}} \right]^V$$

Каде што $V_{ef} = V_g + V_f * K$ или $V_R = n * (V_g + V_f * K)$

V – број на елуираната низ еден теоретски под, односно број на поминатите волумени dv низ еден теоретски под;

V_g и V_f – волумени на течната и гасовитата фаза во еден теоретски под.

Бројот на теоретските подови може да се пресмета од равенката:

$$n = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{t_V} \right)^2$$

Вредностите на t_R и t_V се читаат од снимениот хроматограм. Ако должината на колоната **L** се подели со бројот на теоретските подови **n** , се добива *еквивалентна висина на теоретскиот под-EVTP*:

$$EVTP = \frac{L}{n}$$

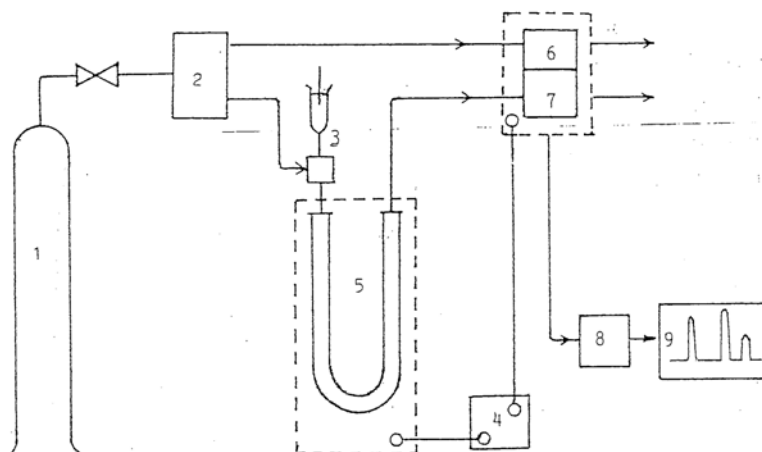
Под EVTP се подразбира онаа минимална должина на хроматографската колона каде се воспоставува целосна фазна рамнотежа. **EVTP** е различна за секоја испитувана проба и за секоја количина. Колку **EVTP** е помала за дадена должина на колоната **L** , односно што почесто се воспоставува фазната рамнотежа, бројот на теоретските подови расте, а колоната подобро го извршува разделувањето.

Кај реална хроматографска колона, врз големината на **EVTP** влијаат повеќе параметри, како што се: дифузија во гасната и течната фаза,

дебелината на течниот слој, хомогеното полнење на колоната, брзината и природата на гасот носител

11.6.3. Опис на апаратурата на гасната хроматографија

На оваа шема подетално ќе ги опишеме составните делови на гасната хроматографија.



Сл. 15. Шематски приказ на гасен хроматограф:

1 – боца со инертен гас (гас носител); 2 – регулатор на проток; 3 – инјектор на проба; 4 – терморегулатор; 5 – хроматографска колона; 6 и 7 – детектори на гасот за носител и елуираниот гас со пробата; 8 – амплификатор; 9 – регистратор

Принципот на работа на гасениот хроматограф е следен: од боцата 1 што се наоѓа под притисок и претставува извор на перманентен проток на гасот носител, преку регулаторот 2 низ хроматографската колона се пушта одреден проток на гас. Преку инјекторот 3 се инјектира испитуваната проба која заедно со гасот носител, влегува во хроматографската колона. Во хроматографската колона се врши разделување на компонентите по пат на апсорпција (**кај GSC**) или по пат на распределба (**кај GLC**). После разделувањето, компонентите се промиваат (елуираат) со самиот гас носител кој перманентно поминува низ колоната. Како што е познато, компонентите во колоната се задржуваат различно време поради што во различни временски интервали, влегуваат во детекторот (**6 и 7**) и, преку електронскиот амплификатор 8, на регистарот 9 се

регистрира концентрацијата на секоја од компонентите. Целиот овој процес на добивање гасен хроматограм, почнувајќи од инјектирањето на пробата па се до нејзиното регистрирање, трае **од 10 секунди до 20 минути**.

➤ *Уред за обезбедување константен притисок на гасот носител*

Гасот носител во хроматографската колона обично се доведува од гасната боца 1 што се наоѓа под висок притисок. Преку редукциониот вентил и цевката во која се наоѓа средството за чистење и сушење на гасот, со помош на регулаторот 2, се регулира протокот и притисокот на гасот што влегува во колоната. Најчесто употребувани гасови се: хелиум, водород, азот и аргон. Ако детекторот работи на принципот на топлинска спроводливост, тогаш најупотребувани се хелиумот и водородот поради нивната висока топлинска спроводливост. Овие гасови имаат и низок вискозитет што овозможува постигнување големи брзини на протокот при пониски притисоци во колоната. Брзината на гасот најчесто се движи помеѓу **10 и 100 ml/min**. Брзината се регулира според времето на задржување на одделни компоненти во колоната.

➤ *Колона за гасна хроматографија*

Еден од најбитните делови на хроматографската апаратура е хроматографската колона во која се врши разделувањето на испитуваната проба. Точноста и прецизноста на резултатите зависат од правилното работење со колоната. Најчесто колоните се направени од метални, стаклени или пластични цевки во форма на буквата **U** или во форма на спирала. Должината и дијаметарот на колоната се одредуваат во зависност од целта на нејзината намена. Колку должината е поголема толку ефикасноста на колоната е поголема. Со капиларни колони, чиј внатрешен дијаметар е **од 0.1 до 0.5 mm** и должина од **200 m**, се постигнува најголема селективност. **EVTP** кај овие колони се движи од **0.2 до 1 mm**. Селективната течност е нанесена по внатрешните ѕидови на капиларот, а низ средината на капилрот поминува гасот носител. За аналитички цели се користат колони со дијаметар од **2 до 4 mm** и должина од **0.5 до 6 m**. Тие се исполнети со инертен цврст носител,

импрегниран со течен филм од селективна течност. **EVTP** кај овие колони е од **0.5 до 2 mm**. Најшироките колони (**од 6 до 500 mm**) со должина од **1 до 5 m**, се користат за препаративни цели, но нивната селективност е мала. Нивните **EVTP** се движат од **1 до 5 mm**.

Течна фаза. Како течна неподвижна фаза во гасната хроматографија можат да се користат органски или неоргански супстанции кои ги исполнуваат следниве услови: **а)** низок напон на пареите при собна температура, **б)** хемиска инертност спрема цврстиот носител и компонентите на испитуваната проба, **в)** висока селективност и стабилност при повисоки температури. Количеството на течната фаза мора да биде оптимално поради влијанието на дебелината на филмот d_f врз ефикасноста на разделувањето. Колку d_f е помало **EVTP** е помало, а разделувањето е поефикасно. Волуменот на задржување ќе зависи од количеството на течната фаза. Со намалувањето на волуменот на течната фаза се продолжува трајноста на хроматографската колона. Течната фаза мора да биде во количество што ќе го прекрие зрното на носителот со мономолекулатен слој. Најчесто користени течности се: тетраизобутиленот, диметилсулфоланот, тетраетиленгликолот, диметилетерот и др.

Температура на колоната. Како оптимална работна температура се смета температурата која за **10 - 20° C** е пониска од средната температура на вриење на испитуваната проба. Зголемувањето на температурата го намалува коефициентот на распределба, а со тоа се зголемува брзината на излегувањето на компонентите од колоната, односно се намалува времето на задржувањето.

Зависноста помеѓу волуменот на задржувањето и темепературата на колоната е дадена со равенката:

$$\log V_g = \frac{A}{B + T_c} + C$$

каде што **A**, **B** и **C** се константи, експериментално определени, валидни само за определен температурен интервал и дадена фаза.

➤ *Детектор*

Врз база на некое физичко или хемиско својство од изелуираната супстанца, се регистрира нејзиното присуство во гасот носител. При детекција можат да се користат следниве својства и методи: топлинска спроводливост, електрична спроводливост, потенциометриски титрации, радиоактивност, пламена фотометрија и фотојонизација, **IR** и **UV** спектрофотометрија, масена спектрометрија и др.

Според начинот на регистрирање на концентрацијата на изелуираната компонента, детекторите се делат на интегрални и диференцијални. Со интегрални детектори се регистрира вкупната концентрација од почетокот на регистрирањето до моментот на разгледувањето. При тоа се добива скалест хроматограм, кај кои растојанието помеѓу два хоризонтални дела од кривата е пропорционално на масата на изелуираната компонента во временски интервал.

Со диференцијални детектори се добиваат податоци за составот и концентрацијата на изелуираната компонента во моментот на читањето. Овие податоци се прикажуваат во вид на пикови, при што позицијата на секој пик одговара на некоја компонента од смесата што се анализира, а висината, поточно површината на пикот е пропорционална на концентрацијата на изелуираната компонента. Во поново време практично се употребуваат само диференцијалните детектори.

Според принципот на работа, детекторите се делат на концентрациони (на пр. катарометри) и проточни (јонизациони детектори). Кај концентрациските детектори сигналот е пропорционален на концентрацијата на изелуираната компонента. Ако се промени брзината со која се движи гасот носител, ќе се промени и површината под пикот додека пак неговата висина останува иста. Кај проточните детектори сигналот е пропорционален на бројот на молекулите од изелуираната компонента. Ако се промени брзината со која се движи гасот носител, ќе се промени и површината под пикот додека пак неговата висина останува иста. Кај проточните детектори сигналот е пропорционален на бројот на молекулите од изелуираната компонента што влегле во детекторот.

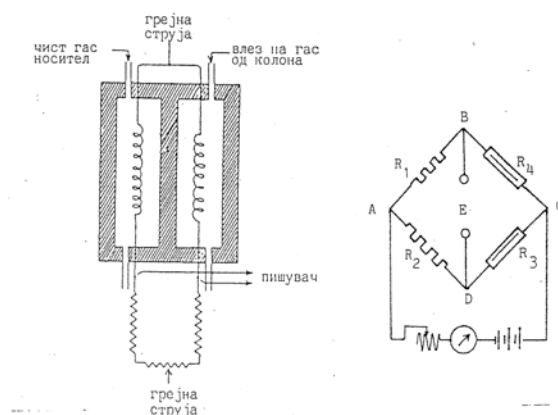
Катарометар. Детектор кој има најширока примена во гасната хроматографија е катарометарот. Тој е осетлив скоро на сите типови проби (не е селективен), има едноставна изведба, а со тоа и ниска цена на чинење.

Катарометарот е детектор кој работи на принципот на мерење на разликите во топлинската спроводливост помеѓу чистиот гас носител кој излегува од колоната заедно со испитуваната проба. Тој се состои од две ќелии (мерна и референтна), еднакви по форма, а во секоја од ќелиите се наоѓа метална жица од волфрам-платина, со дијаметар од **20 до 30 μm** .

Жиците од двете ќелии се поврзани со уште два отпорника во еден **Westono-ов мост**, жиците се загреваат на некоја константна температура ако низ нив тече константна струја. Ако се земе предвид дека отпорот на жиците расте со температурата, а низ жиците тече константна струја, јасно е дека со промената на температурата ќе се менува напонот на краевите од жицата.

Бидејќи е тешко мерењето на апсолутната вредност на топлинската спроводливост на гасот, вообичаено е да се изведуваат релативни мерења на гасот носител со пробата што струи низ мерната ќелија во однос на чистиот гас носител кој струи низ референтната ќелија.

Во почетокот, низ мерната и референтната ќелија се пропушта константен проток од чист гас носител. Потоа се врши балансирање на мостот, на тој начин што од изворот на еднонасочна струја се задава некоја потенцијална разлика помеѓу точките **A** и **C**, се додека потенцијалната разлика помеѓу точките **B** и **D** не стане 0.

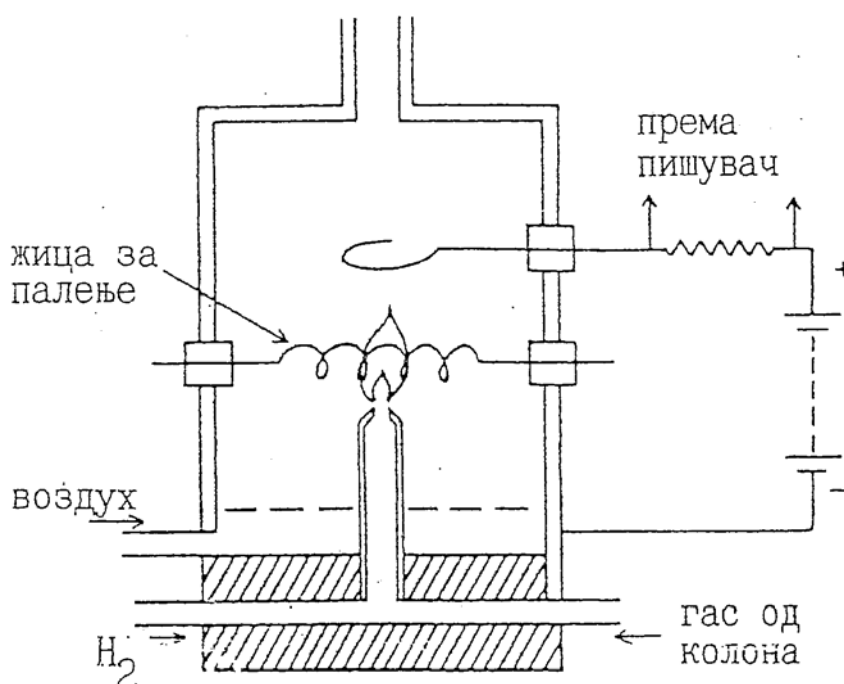


Сл. 16. Катарометар

а) референтна и мерна ќелија; б) електрична шема

Еден катарометар се смета за добар ако неговата чувствителност е од **500 до 1000 mV cm³ / mg** и може да определува примеси чие количество е **10⁻⁶** грама.

Јонизациони детектори. Благодарение на високата чувствителност, малата инертност, широкиот линеарен дијапазон, јонизационите детектори се, исто така, често употребувани во гасната хроматографија. Јонизационите детектори се базираат на мерење на електричната спроводливост на гасовите што директно е пропорционална на количеството на јонизираните честици во гасот. При нормални услови гасовите се изолатори, меѓутоа тие можат да се јонизираат и потоа да се мери електричната спроводливост на јоните. Како извор на јонизација, обично, се користат: радиоактивни изотопи или водороден пламен. На шемата е прикажан принципот на работа на еден пламен јонизационен детектор.



Сл. 17. Шематски приказ на пламен јонизационен детектор

Во пламеникот влегува смеса од водород и гасот што излегува од хроматографската колона во однос **1 : 1**. На горната страна на пламеникот се наоѓаат 2 паралелни електроди кои се под истонасочен напон од **100 до 300 V**.

Во пламеникот, чија температура е **1000 – 2000 ° C** согоруваат компонентите од пробата. При согорувањето се создаваат позитивни и негативни јони и слободни електрони. Јоните патуваат кон спротивно наелектризираните електроди и на тој начин се создава сигнал кој е пропорционален на количеството на пробата.

Пламено – јонизационите детектори може да се користат само ако испитуваниот примерок е од органска природа.

Освен **пламено – јонизациони детектори**, постојат и други типови јонизациони детектори, како што се алкалните, органските, потоа детекторите што работат на принцип на „ фаќање” електрони и др. Секој од нив има специфична примена.

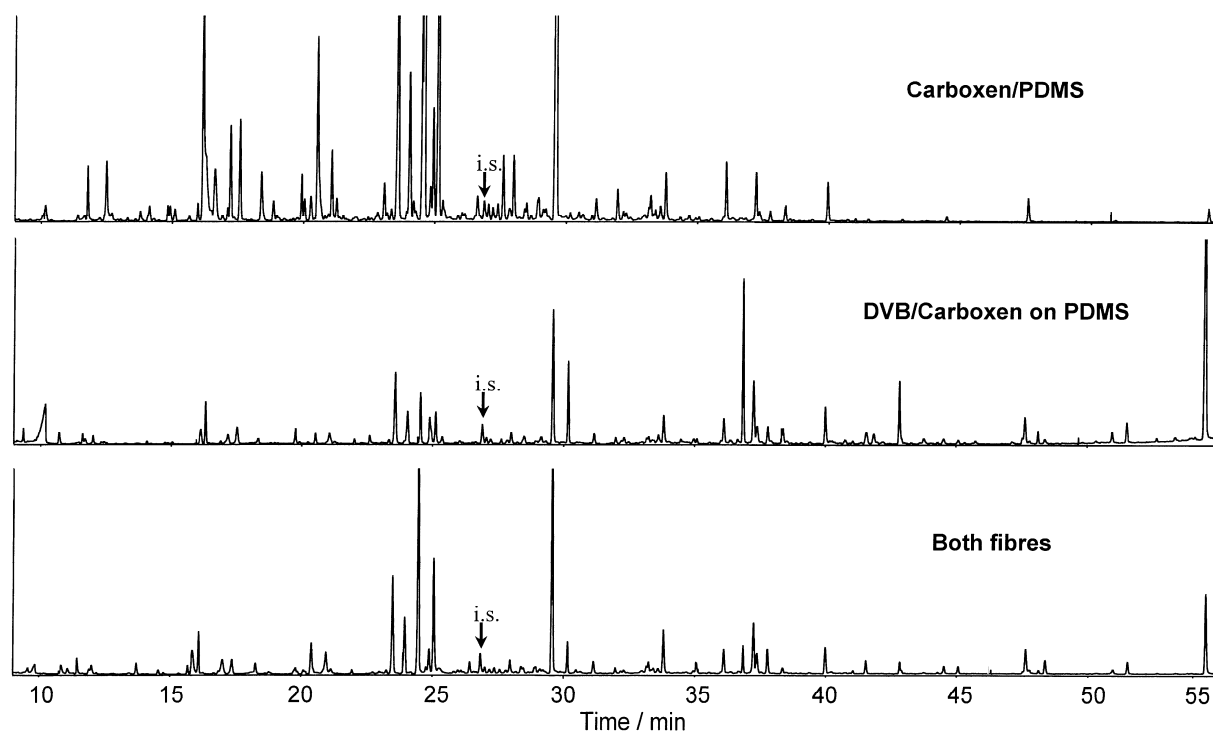
➤ *Регистратори*

Одговорот на детекторот, преку засилувач се пренесува врз регистраторот кој може да биде осцилоскоп, пишувач и др., на кој се регистрира хроматограм. Пишувачот има повеќе скали на осетливост. Тој треба да биде линеарен во целото подрачје на сите скали, да има систем за менување на брзината на движењето на хартијата, и да има мала инерција. Со пишувачот се испорачуваат и електронски интегратори што директно ја мерат површината под пиковите од изелуираните компоненти. Електронските интегратори регистрираат импулси, а секој импулс одговара на мал инкремент на површина. Од бројот на регистрираните импулси се одредува површината под пикот. Во поново време се прават интегратори на кои, наместо површината под пикот директно се чита количеството на испитуваната компонента.

11.6.3. Примена на GC-MS за анализа на примероци примерок за анализа

Гасната хроматографија со маседн детектор (GC-MS) наоѓа широка примена за анализа на испарливи соединенија во примерок за анализа со различна природа. За анализа на овие соединенија, пред GC-MS потребно е да се изврши екстракција, односно концентрирање. За таа цел се применуваат различни постапки како што се: цврсто-фазна микроекстракција (SPME) (Elmore

et al. 2000, Servili et al. 2000, Cremer и Eichner, 2000), цврсто-фазна екстракција (SPE) (Vendramin и Trugo, 2000, Boulanger и Crouzet, 2000), дестилација со пара (Mulet et al. 1999, Dirinck и Winne, 1999), течно-течно екстракција со различни растворувачи (Lambert et al. 1999, Adahchour et al. 1999). Така, за анализа на испарливи соединенија во свинско месо користена е SPME-GC-MS (Elmore et al. 2000) со примена на две влакна покриени различни стационарни фази: карбоксен-полидиметилсилоксан и дивинилбензен-карбоксен на полидиметил-силоксан. При вакви услови, детектирани се 95 супстанции, од кои 36 се идентификувани за прв пат во примерок за анализа (Сл. XX).



Сл. 18. GC-MS хроматограми на испарливи соединенија во свинско месо, со примена на цврсто-фазна микроекстракција со две различни стационарни фази

Анализите на ароми се извршуваат во текот на преработката на примерок за анализа, како и при нејзино чување, со цел да се добијат информации за можни модификации во сензорниот и нутритивниот квалитет. Така, испитуван е ефектот на третмани со висок притисок и стерилизација врз составот на ароми кај сос од јагоди (Lambert et al. 1999). Утврдено е дека промени во профилот на ароми настанува и при висок притисок (повисок од

800 МРа) и при стерилизација (120 °C, 20 min), со создавање на испарливи соединенија, како 3,4-диметокси 2-метил фуран, γ -лактон, ванилин и гераниол.

ЕЛЕКТРОХЕМИСКИ АНАЛИТИЧКИ ТЕХНИКИ

Вовед

Електрохемиските техники се неопходни алатки во речиси секоја хемиска и биохемиска истражувачка лабораторија. Овие техники помагаат во разјаснувањето на механизмите на процесите на редукција и оксидација, во проучувањето на кинетичките и термодинамичките процеси за трансфер на електрони и јони, како и за изучување на феномените на адсорпцијата и на кристализација на површината на електродата.

Нивната широка примена се заснова врз релативно евтината инструментација, големата осетливост во широк линеарен опсег на концентрации за неорганските и органските соединенија, брза анализа (во секунди), а истовремено определување на неколку аналити.

Волтаметриските техники се развиени после поларографијата во 1922 година од страна на Jaroslav Heyrovsky (Нобелова награда во 1959). Заради нивната голема сензитивност (како за неоргански, така и за органски системи), и брзината на изведувањето на експериментите, волтаметриските техники денес имаат голема примена во истражувачките лаборатории.

Зборот волтаметрија е кратенка од волт-ампер-метар односно voltammetry од volt-ampere-metry.

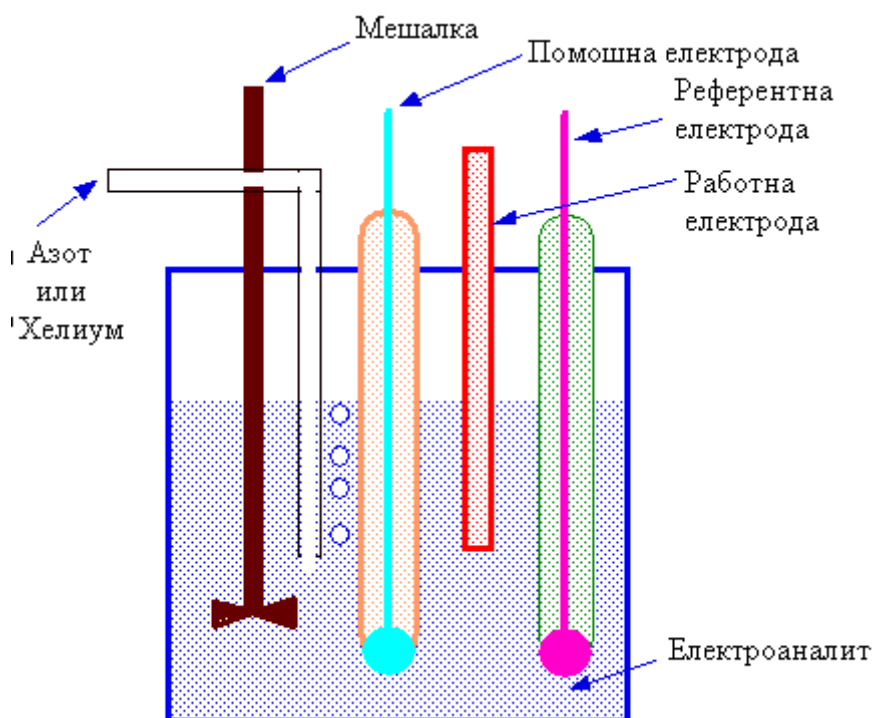
Предности на електрохемиските техники во однос на останатите техники е тоа што анализата на примерокот може да се одвива директно во обоени/необоени системи, во присуство на други супстанции и дури и во колоидни системи. При анализа на биолошки или еколошки примероци, потребна е претходна подготовка на примерокот, но овој процес е брз, ефтин, и лесен за употреба во споредба со стандардните третмани за претходна подготовка на примерокот, како на пример при анализа на примерок со помош на хроматографски методи. Во споредба со хроматографските методи, на пример, кај електрохемиските методи ефектот на интерференцијата е низок, но ако е потребно и тоа, волтаметриските методи лесно можат да се применат заедно со други методи односно да се спојат со нив. Таков пример е нивната употреба како детектори во хроматографските сепарации.

Употребата на волтаметриски техники има големо значење во неколку технолошки полиња како што се истражувањето на корозивни материјали (корозијата е последица на серија од електрохемиски реакции); студирањето на нови електродни процеси за хемиските индустрии (всушност, на пример, милиони тони на алуминиум, хлор, сода се произведуваат со помош на електрохемиски реакции), како и во производството на нов тип на батерии кои можат да складираат големи количини на енергија.

Принципи на функционирање на волтаметриските техники

Волтаметриските техники се базираат на мерење на зависноста на јачината на струјата во зависност од применетиот потенцијал при услови кои предизвикуваат поларизација на некоја индикаторска или работна електрода во електрохемиската ќелија. Аналитичкиот сигнал кај волтаметријата е струја која протекува низ ќелијата во текот на редокс реакцијата на анализот на работната електрода. Анализот може да биде анјон, катјон или неутрална органска или неорганска молекула. Соодветниот анализ е растворен во погоден растворувач, во кој е ставен и јонски електролит. Анализот и електролитот се наоѓаат во сад кој што е наречен електрохемиската ќелија.

Електрохемиската ќелија е едноставна и е стаклен сад во кој се сместени референтна електрода, работна електрода и обично помошна електрода, како што е прикажано во слика 1.



Слика 1. Шематски приказ на електрохемиска ќелија

Работната електрода- електрода со мала површина (најчесто со милиметарски димензии, обично се со дијаметар од 1-2 mm), за да може да се зголеми нејзината склоност кон поларизација, што преставува спроводник на електрони. Таа е местото каде се одвиваат реакциите од интерес и нејзиниот потенцијал се мери во однос на потенцијалот на референтната електрода.

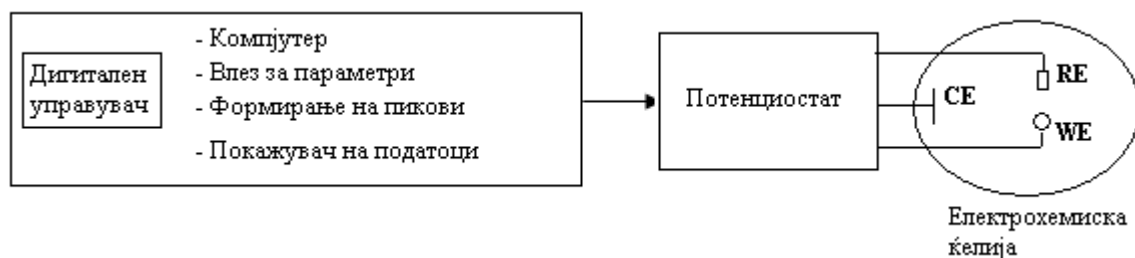
Промената на оксидацискиот степен на кој било учесник во реакцијата на површината на работната електрода ќе предизвика транспорт на електрони низ електродата. Во таков случај, протокот на електрони низ електродата е директно пропорционален со концентрацијата на анализот во ќелијата. Електродите кои се употребуваат во волтаметријата се разликуваат по обликот и составот. Тие најчесто се мали сплоснати дискови изградени од проводник кој е втиснат во стапче од инертен материјал, како тefлон. Проводникот може да биде инертен метал како платина или злато, пиролитички графит или стаклест јаглерод [6].

Референтна електрода - е електрода што има константен потенцијал и таа е неопходна во сите волтаметриски експерименти. Типична референтна електрода е добро познатата заситена каломелова електрода($\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Hg}$),

најчесто употребувана при pH мерењата. Референтната електрода е дизајнирана така што секогаш има точно определен дефиниран потенцијал. Бидејќи потенцијалот е мерка на напонот меѓу две точки, постојаната вредност на потенцијалот на референтната електрода обезбедува начин за мерење на потенцијалот на работната електрода.

Помашната електрода – обично е електрода со поголема површина во однос на работната електрода, која е важна за балансирање на вкупниот полнеж во системот. Оваа електрода најчесто е платинска на која се одвива редокс реакција што е спротивна на редокс реакцијата што се одвива на работната електрода. Оваа електрода овозможува проток на струјата преку растворот до работната електрода. Помошната електрода не игра улога во редокс реакцијата што е од интерес, но е неопходна за затворање на струјното коло во системот.

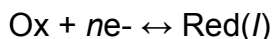
Покрај електрохемиска ќелија, модерниот електроаналитички систем за волтаметриски мерења обично се оддржува и со помош на следните модули: *потенциостат и персонален компјутер* (слика 2). Потенциостатот може да се разгледува како "срце" на секоја електроаналитичка техника. Во волтаметриските техники, задачата на потенциостатот е да го контролира нанесениот потенцијал и да ја регистрира моменталната промена во системот. Во сите модерни електрохемиски инструменти, потенциостатот вклучува во себе електрично струјно коло, различни пресметувачи и појачувачи, како и микропроцесоти со внатрешна меморија. Денес можат да се најдат различни типови на потенциостати во зависност од големината, моќта и софистицираноста.



Слика 2. Едноставна шема за електрохемиски систем дизајниран за волтаметриско мерење

1. Теорија и дефиниција на волтаметриските техники

Следната едноставна електрохемиска реакција може да послужи како референтен систем за теоријата на волтаметриските техники:



каде:

- Ox е оксидирана форма на електроактивната супстанца;
- Red е редуцираната форма (полнежот се изоставува заради едноставност).

За изразување на взаемната зависност помеѓу применетиот потенцијал и концентрацијата на Ox и Red (оксидираната и редуцираната форма) може да се применат две познати математички релации.

Врската помеѓу Ox и Red на редокс парот во состојба на рамнотежа најчесто се прикажува со Nernst-овата равенка:

$$E = E^\ominus + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Ox}]_{x=0}}{[\text{Red}]_{x=0}}$$

каде: R е гасна константа (8,3144 J/mol K), F е Фарадеева константа (96,485 C/mol), T е апсолутна температура (K), $E^\ominus$ е стандарден редокс потенцијал, n е број на разменети електрони во елементарниот акт на електрохемиската трансформација во системот.

За голем број на електрохемиски системи, посебно за кинетичките контролираните реакции, често се употребува и Butler-Volmer-овата равенка:

$$\frac{I}{nFA} = k_a e^{-\alpha f} [c(\text{Ox})_{x=0} - e^{\psi} c(\text{Red})_{x=0}]$$

каде: $\varphi = nF(E - E^0)/RT$, k_s е стандардна константа за брзина на електронска размена, α е коефициент на трансфер на електрони, A е активниот дел (површината) од работната електрода.

Оваа равенка често се употребува за пресметување на хетерогена стандардна константа за брзина на електронска размена k_s . Кога електрохемискиот експеримент се одвива, потенцијалната разлика помеѓу работната и референтната електрода се менува во зависност од односот на концентрациите на двете форми на редокс парот. Тоа ќе предизвика транспорт на електроните низ (или од) работната електрода. Резултатот од оваа електрохемиска трансформација на електрохемиското активно место е познат како Фарадеева струја, и таа е поврзана со дифузијата на супстанцијата од растворот кон електродата, што најчесто сее опишува преку Fick-овиот закон. Резултатите од овие волтаметриски техники се добиваат во облик на волтамограми. Видот на волтамограмот зависи од типот на електронскиот трансфер, бројот на разменетите електрони, времето на мерење, како и од природата на различни типови од хемиски реакции што може да се случуваат во електрохемиската ќелија.

За аналитички цели, важно е да се знае големината на фарадеевата струја на волтамограмот е пропорционална со концентрацијата на аналитот и кинетиката на пренос на електрони што е карактеристична величина за дадената електроактивна супстанца на дадена електродата. Фарадеевата струја е функција и од други фактори, како што се големината, формата и материјалот на електродата, отпорот на растворот, волуменот на ќелијата и бројот на разменети електрони во актот на електрохемиска трансформација.

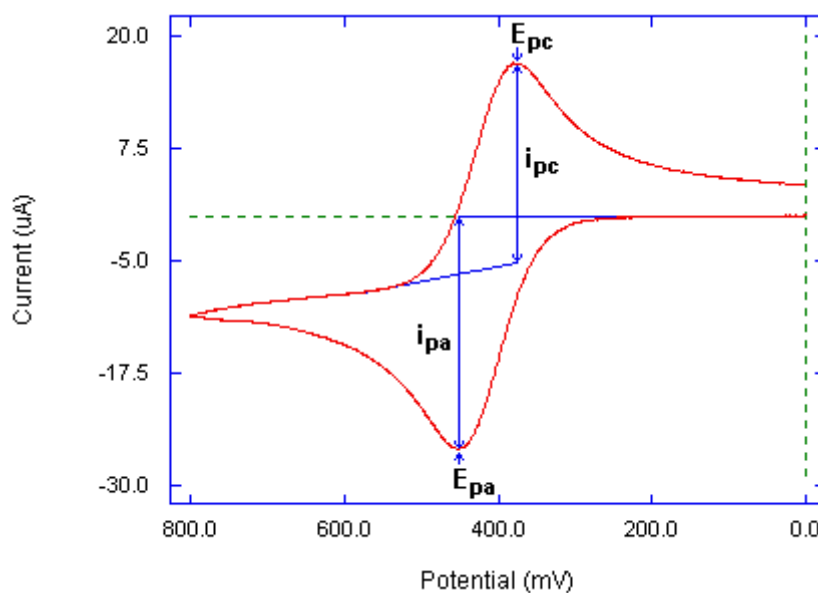
2. Краток преглед на некои волтаметриски техники

Бројни динамични методи во електроаналитичката хемија се развија во последнава декада. Меѓу нив, најпознати се цикличните волтометриски и т.н. пулсни волтаметриски техники. Подолу се опишани некои од овие техники.

4.1 Циклична волтаметрија

Цикличната волтаметрија е една од најкористените техники во електрохемиските студии. Во оваа техника се започнува со аплицирање на потенцијал на работната електрода, кој преставува иницијален потенцијал во линеарна форма, се додека не се достигне еден дефиниран краен потенцијал, при што потенцијалот повторно се враќа до првобитната вредност. Главна карактеристика на оваа техника е што таа дава увид и за двете полуреакции кои што се случуваат во системот, обезбедувајќи во исто време информација за хемиските или физичките појави поврзана со проучуваната електрохемиска реакција. Оттука, цикличната волтаметрија често се смета за електрохемиска спектроскопија.

Главниот инструментален параметар кај цикличната волтаметрија е брзината на скенирање ($v=dE/t$), бидејќи ја контролира временската скала на волтаметрискиот експеримент. Брзината на скенирање може да варира од 1-1000 mV/s, иако технички достижни се и брзини на скенирање и од над 10V/s. Како резултат на анализите што се вршат со помош на цикличната волтаметриска техника се добива т.н. цикличен волтамограм како тој прикажан на слика 3.



Слика 3. Цикличен волтамограм добиен при реверзибилен трансфер на еден електрон: $E_{p,c}$, потенцијал на катоден пик; $E_{p,a}$, потенцијал на аноден пик; E_i , почетен потенцијал; E_f , завршен потенцијал; $i_{p,c}$, струја на катоден пик; $i_{p,a}$, струја на аноден пик.

Главната карактеристика на цикличниот волтамограм се потенцијалите на катодните или анодните пикови, како и полубрановиот потенцијал што е во суштина медијана од вредностите на потенцијалите на катодниот и анодниот пик. Полубрановиот потенцијал е битна физичка величина бидејќи тој во својата вредност содржи важни термодинамички параметри за испитуваната електродна реакцијата. Големината на пиковите е пропорционална со концентрацијата на испитуваниот аналит и со кинетиката на реакцијата на трансфер на електрони од електродата до аналитот. Формата на цикличниот волтамограм дава податоци за типот на електродната реакција, бројот на електрони кои се размениле во елементарниот акт на електрохемиска трансформација, како и за феномените кои се поврзани со електрохемиската реакција што е од интерес.

Ако електронскиот трансфер се одвива многу брзо, тогаш кинетиката на транспортот на електроните е голема. Во случај на потенцијалната сепарација помеѓу катодниот и анодниот пик ΔE_p е дефиниран како:

$$\Delta E_p = |E_{p,c} - E_{p,a}| = 2.303 \frac{RT}{nF}$$

На пример, за термодинамички реверзибилна електродна реакција што е дифузно-контролиран, во која еден електрон се разменува во еден елементарен акт на електрохемиска трансформација, потенцијалната сепарација помеѓу катодниот и анодниот пик од цикличниот волтамограм треба да изнесува 59 mV (на 25 °C).

Кај термодинамички реверзибилни електродни реакции, потенцијалната сепарација помеѓу катодниот и анодниот пик од цикличниот волтамограм не се менува со брзината на скенирање, додека вредностите на струите на двата пика (и катодниот и анодниот) се линеарна функција од квадратниот корен брзината на скенирање. Секое прекршување на ова правило значи скршнување од електрохемискиот реверзибилитет, најчесто предизвикан од бавен електронски трансфер, или поради додатна комплицираност на електродната реакција со хемиски реакции или феномени на адсорпција.

4.2 Пулсни волтометриски техники

Воведувањето на пулсните волтаметриски техники било мотивирано пред сè од фактот дека со менување на потенцијалот и мерење на струјата со помош на пулсеви, може да се постигне значително дискриминирање на фарадеевската во однос на капацитетната струја. Примената на потенцијална разлика меѓу работната и референтната електрода во електрохемиската ќелија е предуслов за иницирање на електронска размена помеѓу работната електрода и молекулите или јоните од електроактивниот аналит во ќелијата. Меѓутоа, при ваквата промена во потенцијалната разлика се предизвикува полнење и празнење на електричниот двоен слој на границата електрода-електролит, што иницира проток на капацитетна струја. Оваа струја не е пожелна за кинетички и аналитички цели и често се прават напори за да се минимизира нејзиниот придонес во вкупната измерена струја во системот. Основата на сите пулсивни техники лежи во разликата во опаѓањето на капацитетната и фарадеевската струја во текот на потенцијалните чекори. Додека фарадеевската струја опаѓа пропорционално со $t^{-1/2}$ (за дифузно-

контролирани електродни реакции), за истите реакции, капацитетната струја опаѓа експоненцијално со времето. Според тоа, со мерење на струите на крајот на применетите потенцијални импулси се добиваат занемарливи капацитетни струи, додека вредностите на фарадеевските струи се далеку поголеми. На овој начин, чувствителноста на волтаметриската метода ќе биде значајно зголемена и измерената струја ќе се однесува речиси исклучиво на фарадеевската реакција што ни е од интерес. Најважните параметри на сите пулсни волтометриски техники се: амплитудата-што претставува висина на потенцијалниот пулс; ширина на потенцијалниот пулс-што претставува времетраење на потенцијалниот пулс; и период на мерење на струјата-што е дефиниран како време на крајот на потенцијалниот пулс во кој се мери струјата во текот на еден пулс.

4.2.1 Нормална пулсна волтометрија

Во нормалната пулсна волтометрија (NPV), се применуваат серија од потенцијални пулсеви со константна ширина и амплитуда што континуирано се зголемува, со потенцијално враќање на почетната вредност после секој пулс. Струјата се мери во одредени периоди на крајот од секој пулс, што е доволно да се намали компонентата на капацитетната струја. Времетраењето на пулсот се движи од 1-200 ms, додека интервалот помеѓу пулсовите е неколку секунди. Инструменталниот одговор кај оваа техника е I - E крива (нормален пулс волтамограм), со сигмоидална форма како што најчесто се добива во класичните (нормални) поларографни техники. Оттука, оваа техника се нарекува и "нормална" пулсна волтометрија.

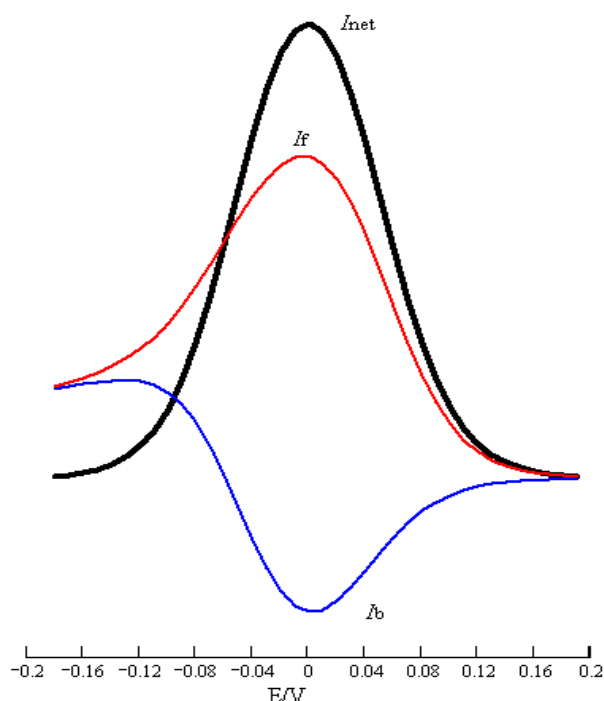
4.2.2 Диференцијална пулсна волтометрија

Формата на потенцијалните импулси кај диференцијалната пулсна волтометрија (DPV) се состои од мали импулси на константна амплитуда (10-100 mV) што се нанесуваат на потенцијална рампа со скалеста форма. Струјата во оваа техника се мери два пати во секој пулс, прво во потенцијалот на почетокот на применетиот пулс, и втор пат на крајот на истиот пулс.

Инструменталниот одговор кај оваа техника се нарекува диференцијален пулсен волтамограм. Измерената струја на овој начин им овозможува на овие техники да добијат многу повисока осетливост во однос на нормалната пулсна волтаметрија.

4.2.3 Квадратно бранова волтаметрија

Квадратно брановата волтаметрија (SWV) е една од најсофистицираните техники во фамилијата на пулсни волтаметриски техники. Потенцијалната форма во SWV се состои од симетрични квадратно бранови пулсеви со постојана амплитуда E_{SW} , кои се нанесуваат на скалеста потенцијална рампа. Потенцијалот во SWV се менува за постојан потенцијал dE . Струјата во оваа техника се мери два пати на крајот од секоја пулс. Струите измерени на крајот од анодните потенцијални пуслеви ја даваат оксидативната компонента на струјата, додека струите измерени на крајот на катодните потенцијални пулсеви ја даваат редуктивната компонента на струјата (слика 4).



Слика 4. Квадратно-бранов волтамограм: I_b , повратна струја (катодна); I_f , директна струја (анодна); I_{net} , вкупна струја.

Вкупната струја во SWV се добива како разлика помеѓу катодната и анодната струја. Но, бидејќи редокските струи (по дефиниција) имаат негативен знак, вкупната струја во SWV е всушност сума на апсолутните вредности на двете струјни компоненти (слика 4). Овој метод на мерење ја прави SWV најчувствителна електроаналитичка техника.

Измерената струја на пиковите добиени во SWV, како и во другите пулсни волтаметриски техники, е пропорционална на концентрацијата на аналитот. Кај оваа техника често се достигнуваат граници на детекција во суб-наномоларни подрачја. Покрај тоа, SWV обезбедува увид и во двете електродни реакции (оксидација и редукција), и на тој начин е слична со цикличната волтаметрија, што и дава можност да се применува за проучување на механизмите на електрохемиски реакции. SWV е многу брза техника, обезбедува увид во кинетиката на електронските трансфери на електродните реакции, како и во кинетика на хемиските реакции што може да се спрегнати со електродната реакција што ја студираме. Иако теоријата на SWV сеуште се развива, многу одлични теоретски трудови на SWV се појавија во последните 30 години, обезбедувајќи критериуми за признавање на многу комплексни електродни механизми, и обезбедување на методи за мерење на кинетиката и термодинамиката на различните процеси што се среќаваат кај релевантни електрохемиски системи. Во текот на последните 25 години, SWV е една од волтаметриски техники што се употребува како за квантитативни апликации, така и за механистички студии кај голем број на биохемиски и неоргански системи. Притоа, оваа метода е широко применувана и за квантитативна апликација како при директни, така и при т.н. „стрипинг„ мерења. Некои јони или соединенија можат да се мерат директно без додавање на реактант или продукт во електрохемиската реакција, некои од нив се 5-аминосалицилна киселина, арсен, атрацин, ацидотимидин, кофеин, допамин, етанол, олово, индиум, манган, рибофлавин, ураниум, уратна киселина, серотонин, витамин Б6 и Б12 и.т.н. Стрипинг анализите се базираат на формирање на амалгами и метални комплекси, како на пример за мерење на траги на цинк, кадмиум, олово или бакарни јони. Методот се заснова на механичка имобилизација на микрочестички на нерастворливи органски или неоргански соединенија на

површината на соодветна цврста електрода (на пример: графитна прачка заситена со парафин што во последно време се користи како работна електрода во експериментите на квадратно-брановата волтаметрија). Исто така оваа метода се користи и за механички и кинетички проучувања.

Волтаметриски техники со преконцентрација

Главната цел на секоја аналитичка техника е да има ниски граници за детекција, добра сензитивност и добра селективност. Во сите волтаметриски техники, границата на детекција најчесто зависи од природата на феномените на транспорт на маса што се случуваат во системот, од брзината на трансфер на електроните од електродата од молекулите на испитуваниот аналит, како и од карактеристиките на работната електрода (нејзината природа, големината и активната површина). Ако транспортот на маса кон електродата се одвива само преку дифузија, тогаш границата на детекција обично се движи околу микромолярни концентрации. Меѓутоа, најголем дел од биолошки релевантните соединенија како и повеќето органски соединенија имаат површински активни својства, што се манифестираат со нивна апсорпција од растворот на површината на работната електрода. Други соединенија пак се способни да се раствораат во материјалот од кој е направена електродата (металите на пример се раствораат во жива и прават амалгами). Овие феномени се предуслов за развивање на волтаметриски техники со преконцентрирање, како што се апсорпциона стрипинг волтаметрија (AdSV) и катодната стрипинг волтаметрија (CSV).

Апсорпциона стрипинг волтаметрија

AdSV е една од начувствителните волтаметриски техники што се применува за анализа на траги од различни соединенија во субнаноомоларни концентрации. Оваа техника се заснова на иницијална апсорпција на молекулите од соединенијата на работната електрода при дефиниран

потенцијал, при што при подоцнежна промена на потенцијалот можеме да предизвикаме реакција на оксидација или редукција на адсорбираниот материјал. Познато е дека повеќето органски и неоргански соединенија имаат тенденција да се апсорбираат на живина електрода, но апсорпција може да настане и кај други типови на цврсти електроди.

Анодна стрипинг волтаметрија

Оваа техника се користи за определување на траги од метали, кои што во контакт со живина електрода можат да формираат амалгами. Кај оваа техника, најпрво се аплицира негативен потенцијал при продолжено време за електролиза, при што се предизвикува редукција на присутниот јон на металот и паралелно на тоа се постигнува преконцентрацијата на металот во живината електрода. Притоа, испитуваниот метал се раствора во живата при што се создава амалгам. При аплицирање на позитивен потенцијал на работната електрода, можеме да предизвикаме оксидација (растворање) на металот што е амалгамиран во живината електрода. Овој процес на растворање се рефлектира со волтаметриски пик, чиј потенцијал зависи од природата на металот. Струјата што одговара на волтаметрискиот пик е пропорционална со концентрацијата на металните јони во растворот. Со ASV можат да се испитуваат истовремено и повеќе метални јони, ако нивниот стандарден редокс потенцијал се разликува за 150-200 mV.

4.3.3 Катодна стрипинг волтаметрија

CSV е техника при која испитуваното соединение има тенденција да реагира со јоните на жива од работната електрода, и да формира растворлива сол на работната електрода. Во првиот чекор кога се аплицира позитивен потенцијал за одредено време, се формира нерастворлив филм на површината од живината електрода, односно доаѓа до хемиска реакција помеѓу испитуваното соединение и јоните на жива од живината електрода. Во вториот чекор, со нанесување на негативен потенцијал доаѓа до редукција на тој филм. Овој

метод се користи за квантитативно одредување на многу неоргански анјони како сулфидите, селенидите, за голем број на биолошки активни соединенија што содржат реактивни групи кои може да реагираат со јоните од живината електрода (аминокиселини, протеини, нуклеински киселини, тиоли). Сите соединенија што содржат Cl, F, Br, SH и SeH групи се потенцијални катодни-стрипинг активни супстанции.

Предноста на ова техника е тоа што може да се одредуваат и електрохемиски неактивни соединенија т.е. соединенија кои не покажуваат електрохемиска активност во дадениот потенцијален опсег.

СПИСОК НА КРАТЕНКИ

Ox - оксидирана форма на супстанца/елемент;

Red - редуцирана форма на супстанца/елемент;

NPV - нормалната пулсна волтометрија;

DPV - диференцијална пулсна волтометрија;

SWV - квадратно-бранова волтаметрија;

AdSV - апсорпциона стрипинг волтаметрија;

CSV - катодна стрипинг волтаметрија;

ASV - анодна стрипинг волтаметрија;

ЛИТЕРАТУРА

- Adahchour, M., Vreuls, R.J.J., van der Heijden, A., & Brinkman, U.A.Th. (1999). Trace-level determination of polar flavor compounds in butter by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 844, 295-305.
- Akiyama, S., Nakashima, K., & Yamada, K. (1992). High-performance liquid chromatographic determination of sugars in an infusion and soft drinks using a silica-based 3-morpholinopropyl-bonded stationary phase. *Journal of Chromatography A* 626, 266–270.
- Analytix, (2001). Advances in Analytical Chemistry, Sigma-Aldrich.
- Angeletti, R., Gioacchini, A. M., Seraglia, R., Piro, R., & Traldi P. (1998). The potential of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in the quality control of water buffalo mozzarella cheese, *Journal of Mass Spectrometry*, 33 525-531.
- Boulanger, R., & Crouzet, J. (2000). Free and bound flavor components of Amazonian fruits: 3-glucosidically bound component of cupuacu. *Food Chemistry*, 70, 463-470.
- Catinella, S., Traldi, P., Pinelli, C., & Dallaturca, E. (1996). Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: a Valid Analytical Tool in the Dairy Industry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10, 1123-1127.
- Camafeita, E., Alfonso, P., Mothes, T., & Mendez, E. (1998). Gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes evaluated by gas chromatography/mass spectrometry using deuterated water, *Journal of Mass Spectrometry*, 32 444-452.
- Carpentieri, A., Marino, G., & Amoresano, A. (2007). Rapid fingerprinting of red wines by MALDI mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(3), 969–982.

- Calull, M., Lopez, E., Marce, R. M., Olucha, J. C., & Borrull, F. (1992). Optimization of an ion-exchange high-performance liquid chromatographic method for the determination of carboxylic acids, sugars, glycerol and ethanol in wines. *Journal of Chromatography A*, 589, 151–158.
- Cozzolino, R., Passalacqua, S., Salemi, S., Malvagna, P., Spina, E., & Garozzo, D. (2001). Identification of adulteration in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 36, 1031-1037.
- Cremer, D.R., & Eichner, K. (2000). Formation of Volatile Compounds during Heating of Spice Paprika (*Capsicum annuum*) Powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2454-2460.
- Dirinck, P., & De Winne, A. (1999). Flavour characterization and classification of cheese by gas chromatographic-mass spectrometric profiling. *Journal of Chromatography A*, 847, 203-208.
- Elmore, J.S., Mottram, D.S., & Hierro, E., J. (2000). Two-fibre solid-phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry for the analysis of volatile aroma compounds in cooked pork, *Journal of Chromatography A*, 905, 233-240.
- Es-Safi, N.-E., Guyot, S., & Ducrot, P.-H. (2006). NMR, ESI/MS, and MALDI-TOF/MS analysis of pear juice polymeric proanthocyanidins with potent free radical scavenging activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(19), 6969–6977.
- Harris, D. C. (1995). Quantitative Chemical Analysis, Fourth Ed., Freeman, New York.
- Karas, M. (1996). Matrix-assisted laser desorption ionization MS: a progress report, *Biochemical Society Transactions*, 24(3), 897-900.
- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., & Hillenkamp, F. (1987). Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of nonvolatile compounds, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 78, 53–68.
- Lambert, Y., Demazeau, G., Largeteau, A., & Bouvier, J.-M. (1999). Changes in aromatic volatile composition of strawberry after high pressure treatment. *Food Chemistry*, 67, 7-16.
- Lavagnini, I., Magno, F., & Seraglia R. (2006). Quantitative Applications of Mass Spectrometry, John Wiley & Sons, Ltd.

- Lough, W. J. & Wainer, I. W. (1995). High Performance Liquid Chromatography, Fundamental Principles and Practise, Blackie Academic & Professional, Glasgow.
- Morton, M., Arisak, O., Miyake, A., & Evans, B. (1999). Analysis of phyto-oestrogens by gas chromatography-mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 7, 221-225.
- Mulet, A., Escriche, I., Rossello, C., & Tarrazo, J. (1999). Changes of volatile fraction during ripening of Mahòn cheese. *Food Chemistry*, 65, 219-225.
- Reed, J. D., Krueger, C. G., & Vestling, M. M. (2005). MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols, *Phytochemistry*, 66(18), 2248–2263.
- Sabbadin, S., Seraglia, R., Allegri, G., Bertazzo, A., & Traldi, P. (1999). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in evaluation of protein profiles of infant formulae *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 13, 1438-1443.
- Scott, R. P. W. (1992). Modern liquid chromatography, *Chemical Society Reviews*, 21, 137-145.
- Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Begliomini, A.L., & Montedoreo, G. (2000). Relationships between the volatile compounds evaluated by solid phase microextraction and the thermal treatment of tomato juice: optimization of the blanching parameters. *Food Chemistry*, 71, 407-415.
- Skoog, A., West, D. M. & Holler F. J. (1994). Fundamentals of Analytical Chemistry, Sixth Ed. Saunders College Publishing, Fort Worth.
- Sugui, J. A., Bonham, C., Lo, S. C., Wood, K. V., & Nicholson, R. L. (1998). MALDI-TOF analysis of mixtures of 3-deoxyanthocyanidins and anthocyanins, *Phytochemistry*, 8(6), 1063–1066.
- Sugui, J. A., Wood, K. V., Yang, Z. Y., Bonham, C. C., & Nicholson, R. L. (1999). Matrixassisted laser desorption ionization mass spectrometry analysis of grape anthocyanins, *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(2), 199–203.
- Tholey A., & Heinzle E. (2006). Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-applications and perspectives, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 24-37.

- Vendramini, A.L., & Trugo, L.C. (2000). Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity. *Food Chemistry*, 71, 195-198.
- Wang, J., & Sporns, P. (1999). Analysis of anthocyanins in red wine and fruit juice using MALDI-MS, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(5), 2009–2015.
- Wang, J., Sporns, P., & Low, N.H. (1999). Analysis of Food Oligosaccharides Using MALDI-MS: Quantification of Fructooligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1549-1557.
- Verette, E., Qian, F., & Mangani, F. (1995). On-line dialysis with high-performance liquid chromatography for the automated preparation and analysis of sugars and organic acids in foods and beverages. *Journal of Chromatography A*, 705, 195–203.
- Watson, J. T., & Sparkman, O. D. (2007). Introduction to Mass Spectrometry. Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation, Fourth Edition, John Wiley & Sons, Ltd.
- Wei, Y., & Ding, M. Y. (2000). Analysis of carbohydrates in drinks by high-performance liquid chromatography with a dynamically modified amino column and evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A*, 904, 113–117.
- Vendrell, S., Castellote, A. I., & Lopez, M. C. (2000). Determination of inulin in meat products by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *Journal of Chromatography A*, 881, 591–597.
- Иванова, В. (2004). Разработка на методи за определување на резидуални мономери ослободени од забарски пломби и лекови во биолошки флуиди со високоефикасна течна хроматографија, Магистерска работа, Институт за хемија, Природно-математички факултет, Универзитет “Св. Кирил и Методиј”, Скопје.
- Иванова, В. (2009). Докторска дисертација, Институт за хемија, Природно-математички факултет, Универзитет “Св. Кирил и Методиј”, Скопје.

