



*ANTECKNINGAR  
FRÅN  
APOTEKARPROGRAMMET  
HT 2002*

*ANALYTISK KEMI II  
7p*

## Innehåll:

<b>2</b>	<b><u>Vätske-vätskekromatografi / Vätske-fastfaskromatografi</u></b>	<b>4</b>
2.1	<u>Metodik och teori (LC)</u>	4
2.2	<u>Teori LLC</u>	5
2.2.1	<u>Oladdade analysobjekt</u>	5
2.2.2	<u>Laddade ämnen</u>	5
2.3	<u>Teori LSC</u>	5
2.3.1	<u>Oladdade substanser</u>	6
2.3.2	<u>Laddade ämnen</u>	6
2.4	<u>Gradienteluering</u>	7
2.5	<u>Instrumentation</u>	7
2.6	<u>Detektion</u>	7
2.7	<u>Plus</u>	7
<b>3</b>	<b><u>Jonbyteskromatografi – IEC</u></b>	<b>7</b>
3.1.1	<u>Kolonnen</u>	8
3.1.2	<u>Detektion</u>	8
<b>4</b>	<b><u>Gelfiltrering - SEC</u></b>	<b>8</b>
<b>5</b>	<b><u>LC – MS</u></b>	<b>9</b>
5.1	<u>TSP</u>	9
5.2	<u>ESI</u>	9
5.3	<u>APCI</u>	9
5.4	<u>Övrigt</u>	9
5.5	<u>Mikrokolonner</u>	10
5.5.1	<u>Deuteriumanvändning</u>	10
5.6	<u>Tandem-MS</u>	10
<b>6</b>	<b><u>Tunnskikt-kromatografi (TLC)</u></b>	<b>10</b>
6.1	<u>Metodbeskrivning</u>	10
6.2	<u>Mekanism</u>	11
6.3	<u>Material</u>	11
6.4	<u>Användningsområden</u>	11
<b>7</b>	<b><u>Gas kromatografi – GC</u></b>	<b>11</b>
7.1	<u>Kolonner</u>	11
7.1.1	<u>Packade kolonner</u>	11
7.1.2	<u>Kapillärkolonner</u>	11
7.1.3	<u>Mobilfas</u>	12
7.2	<u>Injektion av prov</u>	12
7.3	<u>Detektorer</u>	13
7.3.1	<u>Thermal conductivity detector - TCD</u>	13
7.3.2	<u>Flame Ionisation Detector – FID</u>	13
7.3.3	<u>Kväve-fosfordetektor - NPD</u>	13
7.3.4	<u>Electron capture – ECD</u>	14
7.3.5	<u>Fotojoniseringsdetektor – PID</u>	14
7.4	<u>Derivatisering</u>	14
<b>8</b>	<b><u>GC-MS</u></b>	<b>15</b>
8.1	<u>Joniseringssätt</u>	15
8.1.1	<u>Electron impact</u>	15
8.1.2	<u>Positiv jonkemisk jonisering – PICI</u>	15

8.1.3	<a href="#">Negativ jonkemisk jonsiering – NICI</a>	15
8.2	<a href="#">Detektor tillämpning</a>	16
8.2.1	<a href="#">Selected ion monitoring – SIM</a>	16
9	<a href="#">Fältflödesfraktionering - FFF</a>	16
10	<a href="#">Överkritisk vätskekromatografi (SFC) och överkritisk vätskeextraktion (SFE)</a>	17
10.1	<a href="#">SFC</a>	18
10.1.1	<a href="#">Kolonner</a>	18
10.1.2	<a href="#">Detektorer</a>	18
10.2	<a href="#">SFE</a>	18
11	<a href="#">Kapillärelektrofores - CE</a>	18
11.1	<a href="#">Jonmobilitet</a>	18
11.2	<a href="#">Elektroosmos</a>	19
11.3	<a href="#">Bandbreddning</a>	19
11.4	<a href="#">Upplösning</a>	20
11.5	<a href="#">Kapillär zonelektrofores</a>	20
11.6	<a href="#">Micellelektrokinetik kromatografi</a>	20
11.7	<a href="#">Isotachophoresis</a>	20
11.8	<a href="#">Isoelektrisk fokusering</a>	21
11.9	<a href="#">Injektionsmetoder</a>	21
11.9.1	<a href="#">Hydrodynamiskt</a>	21
11.9.2	<a href="#">Elektrokinetisk</a>	21
11.10	<a href="#">Svårigheter med metoden</a>	21
11.11	<a href="#">Användningsområden</a>	21
12	<a href="#">Kiral separationer</a>	22
12.1	<a href="#">Metoder för kiral separation</a>	22
12.1.1	<a href="#">Indirekt separatorisk metod</a>	22
12.1.2	<a href="#">Direkt separation - Trepunktsinteraktion</a>	23
12.2	<a href="#">Tillämpningar</a>	23
12.2.1	<a href="#">GC</a>	23
12.2.2	<a href="#">LC</a>	23
12.2.3	<a href="#">CE</a>	23
12.3	<a href="#">Enantiomeraselektiv separation med CSP</a>	23
12.3.1	<a href="#">CBH-1</a>	23
12.4	<a href="#">Enantiomeraselektiv separation med CMPA</a>	24
13	<a href="#">Selected Ion monitoring</a>	25
14	<a href="#">Infraröd spektroskopi - IR</a>	25
14.1	<a href="#">Teori</a>	25
15	<a href="#">Nära infraröd spektroskopi - NIR</a>	25
16	<a href="#">Rahman</a>	25
16.1	<a href="#">Användning</a>	26
17	<a href="#">UV</a>	26
17.1.1	<a href="#">Differentielle eller expanderad skala</a>	26
17.1.2	<a href="#">Begränsningar</a>	26
17.1.3	<a href="#">Envägssystem mot tvåvägssystem</a>	26
17.2	<a href="#">Konventionell spektrofotometer</a>	27
17.3	<a href="#">Diode-array spektrofotometer</a>	27
17.3.1	<a href="#">Internal referencing</a>	27
17.3.2	<a href="#">Upprepade mätningar</a>	27

## 2 Vätske-vätskekromatografi / Vätske-fastfaskromatografi

### 2.1 Metodik och teori (LC)

Prov pumpas genom en termostaterad kolonn och retentionen beror av distributionen till stationära fasen. Tryckfallet som uppstår när en vätska rinner genom kolonnen är direkt proportionellt mot kolonnlängden och omvänt proportionellt mot partikel diametern – vilket innebär att liten partikeldiameter ger ett tryckfall och öppnar möjligheten för en kortare kolonn vilket ger högre känslighet då tiden i kolonnen blir kortare och analysobjekten mindre påverkade av upplösning. Liten diameter och kort kolonn positivt.

$$H = \frac{B}{u} + C_m \times u + C_s \times u$$

(1:31)  
van  
Deemter  
ekv.

där  $H$  = bottenhöjd,  $u$  = flödeshastighet,  $B$  = molekylära diffusionen,  $C$  = långsam jämviktsinställning

$$h = \frac{B}{v} + A \times v^{1/3} + C \times v$$

(2:5)  
Knox  
ekv.

där  $h$  = reducerad bottenhöjd,  $v$  = reducerad flödeshastighet,  $A$  = Eddy- + radiell diffusion,  
 $B$  = molekylära diffusionen,  $C$  = långsam jämviktsinställning

Knox införde reducerade bottenhöjden  $h$  beroende av molekylär diffusion, Eddy-diffusion, radiell diffusion och långsamma jämviktsprocesser. Vid låg reducerad flödeshastighet dominerar den molekylära diffusionen medan jämvikten påverkar mer då det reducerade flödet är hög.

Eddy-diffusion beror av att molekyler tar olika vägar genom kolonnen. Några väljer en kortare väg än medelvägen och andra en längre väg. Eddy-diffusionen beror av kolonnlängd och packningsmaterialets diameter. Eddy-diffusionen minskar med minskande partikeldiameter.

Den radiella diffusionen är direkt proportionell mot diametern och kolonnlängden och omvänt proportionell mot diffusionskonstanten. Liten diameter och stor diffusionskonstant minimerar den radiella diffusionen.

Kiseloxid används som kolonnmaterial och på detta fästes grupper för att ge rätt polaritet till den stationära fasen.

Kolonnen bidrar också till bandbreddningen. Den största möjliga injicerade volymen som ger bandbreddning ökar proportionellt med retentionsvolymen och omvänt proportionellt mot effektiviteten.  $V_i$  är starkt beroende av innerdiametern av kolonnen.

$$\frac{R_s}{R_{s,MAX}} = \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{V_i^2 \times N}{(V_R^2 \times K^2)}}} \quad (2:19)$$

där  $V_i$  = injicerad volym,  $V_R$  = Retentionsvolym,  $K$  = injektorberoende konstant

Om detektionscellen är för stor, påverkar även denna bandbreddning då de separerade analysobjekten kan komma att blandas igen. Även hastighetskonstanten hos detektorn kan påverka – detektionen skall företrädesvis ske snabbt.

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left( \frac{k'_2}{1+k'_2} \right) \times \left( \frac{\alpha-1}{\alpha} \right); \alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad (1:38)$$

där  $R_s \geq 1,5$  visar på fullständig separation,  $k$  = separationsfaktorn,  $\alpha$  är separationsfaktorn

## 2.2 Teori LLC

### 2.2.1 Oladdade analysobjekt

Oladdade analysobjekt separeras i system med buffrat vatten som polär fas och en mix av opolära och polära lösningsmedel som mindre polärfas.  $K'$  kan regleras genom polaritetsförändringar. För att separera de oladdade proverna använder man komplexbindande organiska föreningar.  $K'$  kommer att minska vid ökad koncentration av S samt en polärare komplexbindningsagent.

$$k'_{HX} = \frac{V_S}{V_M \times K_{D(HX)} \times K_{HXS_n} \times [S]_{rg}} \quad (2:22)$$

där  $V_S$  = volym stationär fas,  $K_D$  = Distributionskonstant,  $[S]$  = koncentration organisk modifierar  
då  $pH = pKa$  och  $[HK_S] \ll [HXS]_n$

### 2.2.2 Laddade ämnen

$K'$  regleras av motjonskoncentrationen, motjonens natur samt organfasens sammansättning. Kan ju säga att reversed phase har en polär mobil fas så att inte den detaljen försvinner i alla teorem... Ytterligare förbättringar för att separera laddade molekyler i LLC kan göras genom att fixa system som gör att proven kan migrera både som jonpar och som oladdade. Man kan då specifikt styra processen genom pH-regleringar.

$$k'_X = \frac{V_S \times K_{EX(QX)} \times [Q^+]}{V_M} \quad (2:23)$$

för RP där  $[Q^+] =$  koncentration motjon

$$k'_X = \frac{V_S}{V_M \times K_{EX(QX)} \times [Q^+]} \quad (2:24)$$

för SP där  $[Q^+] =$  koncentration motjon

## 2.3 Teori LSC

Tswett var först...

Relationen mellan distributionen av provet och fördelningen av lösning, eluent och absorbent kan beskrivas som följer:  $\log$  Distributionen =  $\log$  Volymen av monolagret per gram adsorbent + ytaktiviteten hos adsorbenten \* (Den fria energin av adsorption till ytan – adsorptionsenergin av eluenten). (tror att detta är lättaste sättet att överblicka)

Ämnen bundna till kiselgelerna avgör hur polär densamma blir. Polariteten hos gelen kan karaktäriseras enligt följande grupper varande eller ickevarande: mättade kolväten < omättade eller aromatiska kolväten < halogen derivat < etrar < estrar < ketoner och aldehyder < alkoholer < syror och baser.

En av de stora skillnaderna mellan LLC och LSC rör retentionskapaciteten. LLC har väldigt hög kapacitet vad gäller mängden prov som kan testas utan att förhållanden ändras. För att få en effektiv separation krävs att topparna är symmetriska och en förutsättning för detta är den att fördelningskoefficienten skall vara konstant under hela körningen. En hög adsorption är essentiellt för hög separationseffektivitet.

### 2.3.1 Oladdade substanser

$$k'_A = \frac{q \times K^\circ \times K_A}{1 + K_S \times [S_M]} \quad (2:33)$$

där  $k'_A$  = kapacitetsfaktor,  $[S]_M$  = halt metanol,  $K^\circ$  = kapacitet hos adsorbent i mol per gram  
 $q = W_S / V_M$  ( $W_S$  = mängd adsorbant i kolonnen och  $V_M$  = volym eluent i kolonnen)

Kapacitetsfaktorn ökar alltså med ökad kapacitet hos adsorbenten och minskad distributionskonstant hos det lösta ämnet. Adsorptionen av den mobila fasen motverkar adsorptionen A och effekten ökar med ökad koncentration och ökad distributionskonstanten.

Oftast används en blandad mobilfas; om fallet är en opolär adsorbent är det gynnsamt att använda en vattenlösning som mobilfas och kontrollera retentionen med organiska lösningsmedel som metanol och acetonitril. Om exempelvis en fosfatbuffert används som en del i den mobila mixen minskar  $k'$  med ökad tillsatts av acetonitril.

### 2.3.2 Laddade ämnen

LSC med en hydrofob stationär fas och en hydrofil mobil fas lämpar sig utmärkt för separation av laddade ämnen. Detta baserar sig på två principer:

1. När en jon överförs till en fast fas bibehålles elektronegativiteten av en motjon.
2. Jonlösningar och jondelar i eluenten konkurrerar om bindningsställen på den adsorberande ytan.

$$k'_A = \frac{q \times K^\circ \times K_{HAX} \times [X^-]}{1 + K_{QX} \times [Q^+] \times [X^-]} \quad (2:34)$$

där  $K_{HAX}$  och  $K_{QX}$  = fastfasextraktionskonstanter för lösningen  $HA^+$ ,  $Q^+$  = buffert co-jonen,  
 $X^-$  = motjon

$$k'_A = \frac{q \times K^\circ \times K_{QB} \times [Q^+]}{1 + K_{QB} \times [Q^+] \times [B^-]} \quad (2:34)$$

där  $K_{QB}$  och  $K_{QX}$  (?) = fastfasextraktionskonstanter för lösningen  $HB$ ,  $Q^+$  = buffert motjon,

Kapacitetsfaktorn ( $k'$ ) ökar med ökad extraktionskonstant hos lösningen och ökad motjonskoncentration i den mobila fasen. Oftast används aprotiska motjoner eftersom de inte ändrar laddning beroende på pH. En lämplig extraktionskonstant kan enkelt ordnas med hjälp av lämpligt alkylval. Annars kan man ändra det polära innehållet i den mobila fasen.

## 2.4 Gradienteluering

I reversed phase görs eluenten mindre och mindre polär – tekniken används då retentionstiderna är långa mellan de ämnen som skall separeras och processen annars blir otymplig. Rena ämnen är väldigt viktigt då känsligheten hos denna metod är markant.

## 2.5 Instrumentation

Pumpen skall ha ett konstant och pulsfritt flöde på mellan 0 (meningsfullt...) och 10 ml per minut och vara resistent mot de lösningsmedel som används vid elueringarna. Valvinjektorer används allt som oftast (5-500 $\mu$ l). Kolonnerna är mellan 50 och 250 mm långa och de detektorer som föredras är UV (läs diode-array) och MS.

## 2.6 Detektion

De detektorer som används vid LC är

- UV  
Med fördel Diode-array. Känslighet  $5 \cdot 10^{-8}$  M.
- Fluorescens  
Mäter exciterad fluorescens efter belysning med UV-ljus. Mer selektiv än UV-detektor och med hög känslighet  $5 \cdot 10^{-10}$  M dock med begränsningen att analyserat ämne måste ha fluorescens (sic!).
- MS  
Används både kvalitativt och kvantitativt. Känslighet  $5 \cdot 10^{-8}$  M.

## 2.7 Plus

- Kort retentionstid
- Hög effektivitet
- Kontinuerlig detektion av eluerade prover.
- LSC – stor adsorptionsyta.
- LLC – hög kapacitet
- Välutvecklad
- Lätt att kombinera med datorer

## 3 Jonbyteskromatografi – IEC

(sid. 49-54)

Anjonbytare:  $X^- + R^+Y^- = Y^- + R^+X^-$  Innehåller positivt laddade grupper.

Katjonbytare:  $A^+ + R^-B^+ = B^+ + R^-A^+$  Innehåller negativt laddade grupper

Separation av hydrofila protolyter av biokemiskt intresse.

### 3.1.1 Kolonnen

Materialet i en jonbyteskolonn skall vara olösligt och kemiskt stabilt. Att föredra är kolonner med en solid inert kärna med ett lager av jonbytesmaterial på ytan. Dessa ger hög prestanda p.g.a. kort diffusionssträcka inom jonbyteslagret. Nackdelen är att kapaciteten är ganska låg. Homolog packning och enhetlig partikelstorlek är nödvändig för att få god separation.

### 3.1.2 Detektion

Detektion görs med hjälp av konduktivitetmätningar vid så kallad jonkromatografi.

Selektiviteten för organiska joner är svår att förutsäga då de även kan interagera med matrisen. Alkohol/vatten blandningar används som lösningsmedel och retentionen kommer bero av alkoholhalten.

$$R^-M^+ + A^+ = R^-A^+ + M^+; K_A = \frac{[A_i^+][M_0^+]}{[M_i^+][A_0^+]} \quad (3:1)$$

där  $A^+$  = injicerad i systemet,  $M^+$  = co-jon och  $R^-$  = jonen i matrisen  
 index  $i$  = insidan och index  $0$  = utsidan

$$k'_A = D_A \times \frac{V_S}{V_M} = \frac{V_S \times K_A \times [M_i^+]}{V_M \times [M_0^+]} \quad (3:3)$$

där  $k'_A$  = kapacitetsförhållandet,  $D_A$  = distributionsförhållandet

$$V_{R(A)} = V_M \times (1 + k'_A) \quad (3:4)$$

där  $V_{R(A)}$  = Retentionsvolym

Om de fixerade grupperna på matrisen är svaga syror eller baser kan distributionsförhållandet lätt styras genom att ändra pH i eluenten.

För anjon:

$$D_B = \frac{[B_i^-]}{[B_0^-] + [HB]} = \frac{K_B \times [N_i^-] \times K'_{HB}}{[N_0^-] \times (K'_{HB} + a_{H^+})} \quad (3:6)$$

där  $D_B$  = Distributionsförhållandet

## 4 Gelfiltrering - SEC

(Sid. 55-58)

Vätskekromatografisk metod – separation med avseende på molekylernas storlek.

**Används för separation av makromolekyler.**

Kolonn packad med poröst material.

$$V_R = V_m + K^X \times V_S \quad (4:1)$$

där  $V_R$  = Retentionsvolym,  $V_m$  = volym mobilfas,  $V_S$  = Stationära volymen och  
 $K^X$  = fraktionen mobilfas tillgänglig för lösningen

$K^X$  beror av molekylvikten hos lösningen och av matrisens porstorlek. Små molekyler som passar i alla porer har  $K^X=1$  och stora molekyler som är helt utestängda från alla porer har  $K^X=0$ . Om  $V_R$  är större än  $V_m + V_s$  innebär det att interaktion mellan matrisen och provmolekylen har inträffat. För att öka separationen anpassa porstorleken till molekylstorleken i lösningen.

För att öka separationsfaktorn  $\alpha = \frac{k_2^X}{k_1^X}$  används kolonner packade med material med uniform

porositet inom ett intervall som matchar lösningens molekylstorlek det vill säga så att alla ämnen hamnar  $0 < K^X < 1$ .

Kolonnen kan vara packad med antingen:

- 1) **Mjuka geler** vilket är en lätt tvärbunden struktur som absorberar stora volymer mobil fas och där porstorleken ökar i proportion men absorptionen. Kräver låga flödes hastigheter
- 2) **Semi-regida geler**. Sväller i begränsad utsträckning. Klarar halvhöga flödes hastigheter.
- 3) **Rigida geler**. Bestämd porstorlek. Liten partikeldiameter vilket möjliggör HPGPC (High performance gel permeation chromatography) med höga flödes hastigheter.

## 5 LC – MS

MS ger mer eller mindre information endast om molekylvikten.

Joniseringen sker idag huvudsakligen med tre tekniker Termospray-, elektro spray- och atmosfärstryckskemisk jonisering, varav den förstnämnda är på klar tillbakagång.

### 5.1 TSP

Termospray jonisering fungerar som så att väskan förs genom en het kapillär och bildar små laddade droppar som transporteras in i jonkällan.

### 5.2 ESI

Elektrospray jonisering – en vätska passerar genom en nål av rostfritt stål vilken har en högre potential än kapillären som leder in i MS. Vätskan bildar små laddade droppar (t.o.m. mycket små...) som kommer att ha en sammantaget positivt laddning. Dropparna vill minska under tidens gång då de ytaktiva krafterna kommer att understiga repulsionen hos dropparna. Processen upprepas tills jonerna emitterar direkt från ytan till gasfas. ESI är det mjukaste sättet att jonisera vilket medför att spektrumet kommer att ge information mestadels om molekylvikten.

### 5.3 APCI

Atmosfärstryckskemisk jonisering – Den mobila fasen aeronebuliseras med hjälp av kvävgas.  $e^- + N_2 \rightarrow N_2^+ + 2 e^-$ .

### 5.4 Övrigt

Jonerna som bildas är oftast **adduktjoner** mellan analyten och exempelvis  $AH^+$ ,  $ANH_4^+$ ,  $ANa^+$  och  $AK^+$ . Det bildas även joner av kat-typ som kommer från glasvaror och buffertar och således

ej bör tas hänsyn till eller snarare bör det väl tas hänsyn. Om polariteten ändras kan man även detektera negativa joner och då oftast  $[MH]^-$  eller  $[MAc]^-$ .

Ämnen med hög molekylvikt som exempelvis proteiner kan detekteras med hjälp av LC-MS trots att detektionsgränsen egentligen är lägre, detta p.g.a. att proteinerna är multiladdade och att man kan räkna baklänges från m/z-värden genom  $\frac{M+n}{n}$  och  $\frac{M+(n+1)}{n+1}$

Vatten i den mobila fasen är nödvändigt för att ge utslag i LC-MS.

## 5.5 Mikrokolonner

Mikrokolonner är funktionibla inom LC-MS då ESI har möjlighet att göra droppar vid väldigt låga flödes hastigheter. Mikrokolonner är korta, har liten diameter (5-300 $\mu$ m), men genererar ett högt antal teoretiska bottnar (80000-100000). Flödes hastigheten är brukligt 1 $\mu$ l/min och metoden används företrädesvis då ämnen är dyra eller labbet välutvecklat...

### 5.5.1 Deuteriumanvändning

En praktisk användning av deuteriumoxid synes i samband med LC-MS. Om man byter ut vatten mot deuteriumoxid kan man vid jämförelse av de två spektrumen se vilka atomer som har utbytbara väten. Alla väten bundna till heteroatomer kommer att bytas ut, även  $M^+$  kommer att bytas ut. Det är relativt enkelt att se vilken molekyl det är så länge den inte innehåller fler än 35 utbytbara väten.

## 5.6 Tandem-MS

Genom att koppla två Masspektrometrar efter varandra får man något man kallar tandem masspektroskopi, en form väldigt användbar i kombination med LC.

Tandemmassen är uppbyggd av tre kvadrupplar, den första selekterar jonen av intresse, oftast en molekylärjon och accelererar jonen till den andra cellen – kollisionscellen. Trycket har blivit förhöjt i denna av argon eller xenon och kollisionen mellan jonen och det tunga argonet bildar fragmentationer i form av dotterjoner. Den sista delen i serien är av detektortyp. Oftast används denna typ av detektor tillsammans med ett spektrum genererat av i förväg kända molekyler.

## 6 Tunnskiktskromatografi (TLC)

### 6.1 Metodbeskrivning

TLC är en kromatografisk metod vilken utförs på en öppen glas-, metall- eller plastplatta. Provet appliceras på plattan och den mobila fasen rör sig genom den stationära plattan genom kapillärkrafter; i vissa exceptionella fall även av tryck eller gravitation. I HPTLC har man gjort stationära faser med mindre partiklar och smalare distribution – alltför att tillgodose marknadens krav på effektivitet... Kritiska steget i TLC är som empirismen så ofta visat – appliceringsmomentet.

**Plus:**

- ❑ Flera prover kan elueras samtidigt under identiska betingelser.
- ❑ Lätt att använda, snabb, hög provkapacitet och relativt billig.
- ❑ Eftersom man slänger plattan kan giftiga lösningsmedel och annat obehagligt användas.

## 6.2 *Mekanism*

Som i LC är migrationen beroende av hur länge provet befinner sig i den mobila fasen kontra stationära fasen under den kromatografiska processen.  $R_f$ -värdet mäts som provets vandring i förhållande till lösningsmedlets. Gällande bandbreddningsmekanismer kan sägas att molekylär diffusion är den viktigaste.

## 6.3 *Material*

Förpreparerade plattor är överlägset vanligast där TLC plattornas porer är mellan 10 och 60  $\mu\text{m}$  medan de hos HPTLC är runt 5  $\mu\text{m}$  stora. De flesta plattor som används är gjorda av kisel, men även cellulosa och aluminium används. Plattorna utvecklas också: nya former där proverna appliceras i mitten och sedan migrerar ut mot kanterna används då det medför att en större del av plattan används. Detektion med hjälp av UV-ljus.

## 6.4 *Användningsområden*

- ❑ För att screena mobila faser till andra kromatografiska system.
- ❑ Preparera fram prover.
- ❑ Kontrollera reaktioner etc.

# 7 Gas kromatografi – GC

(Sid. 77-88)

Fördelar: stort antal detektorer kan användas med hög selektivitet och känslighet.

Nackdel: Provet måste vara flyktigt och tåla upphettning.

GLC och GSC

## 7.1 *Kolonner*

### 7.1.1 Packade kolonner

Diameter 2-6 mm, längd 1-5 m.

Finns antingen med en stationär av vätska eller fast material. Fast material kan vara Porapak<sup>®</sup> är tvärbundet etylvinyl och divinylbensen. Används framförallt för preparativa separationer. Kan vara ickepolära eller polära väteaccepterande.

### 7.1.2 Kapillärkolonner

Diameter 0,2-0,5 mm, längd 20-100 m.

Karakteriseras av lågt motstånd vilket möjliggör dess längd. Längden medför ett stort antal teoretiska bottnar. (100 m kan ge  $N=100000$ ). En 60 m kolonn ökar upplösningen 40 % mot en

30 m kolonn men dubblar analystiden och ökar erfordrat tryck. Kolonner med diametern 0,2-0,32 mm ger högst noggrannhet emedan 0,53-0,75 mm ger högst provkapacitet.

**Fördelar** jämfört med packade kolonner:

- 1) Högre upplösning
- 2) Kortare analystid
- 3) Större selektivitet och känslighet

**Nackdel** jämfört med packade kolonner:

- 1) Lägre provkapacitet

Tre typer av kapillärkolonner: "Wall coated open tubular", "Support coated open tubular" och "Porous-layer coated open tubular"

### 7.1.3 Mobilfas

Som bärargas används inerta gaser som He, Ar, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>. N<sub>2</sub> är vanligast och billigast. Syre får ej förekomma då detta ger oxidation vilket kan förstöra kolonnen. Viktigt att kontrollera läckor då 80% av bekymren med GC beror av läckor. Gas påverkar kolonn, separation och detektion.

## 7.2 Injektion av prov

Injektör och detektor 50°C varmare än kolonnen.

### ➤ "Split injector"

Lösningsmedel och prov förångas. 1-10% appliceras i kolonnen resten avleds s.k. outlet. Den teknik som ger högst effektivitet. Kolonndiskriminering kan förekomma om provet har en stor variation i molekylvikt. Tunga molekyler förångas långsammare och kommer att var underrepresenterade i den provvolym som når kolonnen.

**Fördelar** med tekniken är att den är enkel och lätt att använda. Ger god reproducerbarhet av retentionstid.

**Nackdel** är att det är svårt vid låghaltsanalyser, då injektorn bara tar tillvara på en del av injicerat prov.

### ➤ "Splitless injector"

Baseras på en "split injector" i "non-splitting mode". Lågt flöde bärargas. Temperatur 10-20°C lägre än kokpunkten för provet gör att det förångade provet återkondenserar i ett smalt band på kolonninloppet. Temperaturen höjs och provet kan analyseras.

**Fördelar** med tekniken är att nästan allt injicerat material används (80-90%) vilket är att föredra vid utspädda prover. Bra vid låghaltsanalys. Den lägre injektionstemperaturen är att föredra vid värmekänsliga prov.

**Nackdelar** är att färre lösningsmedel är användbara och livslängden på kolonnen är kortare.

### ➤ Direktinjektion

Viktigt att injicera långsamt för att inte få "backflash" vilket skulle resultera i breda svansade toppar.

### ➤ Kolonninjektion

Används vid packade kolonner. Bra för kolonnen men bra för värmekänsliga substanser. Provet injiceras direkt till kolonninloppet. Injicera långsamt för att förhindra aerosolbildning vilket skulle medföra breda toppar och minskad effektivitet.

### SE FIGUR 7:1

$$D_{g(A)} = \frac{N_S \times R \times T}{f_a \times p_A \times V_S} \quad (7:1)$$

där  $D_{g(A)}$  = Distributionsförhållandet,  $p_A$  = ångtryck,  $f_A$  = aktivitetskonstant,  
 $N_S$  = antal mol av stationär fas,  $V_S$  = volym stationär fas

## 7.3 Detektorer

Ett stort antal detektorer kan användas. Viktiga egenskaper hos detektorn är bland annat: signal-till-brus förhållandet, minsta detekterbara mängd och linjärt område.

### 7.3.1 Thermal conductivity detector - TCD

En okänslig men ickedestruktiv (MDQ  $\sim 1 \mu\text{g}$ ) metod som bygger på en så kallad Wheatstone bridge circuit med en referenscell i bärargasen och en provcell. När prov passerar kommer bryggan i obalans och utslaget registreras. Registrerar alla ämnen som har en annan konduktivitet än bärargasen.

### 7.3.2 Flame Ionisation Detector – FID

Den elektriska konduktiviteten av en gas är direkt proportionell mot koncentrationen av laddade partiklar i gasen. Utloppet från kolonnen passerar en flamma och ändrar gasens konduktivitet. Detektorsignalen är proportionell mot antalet kolatomer i molekylerna. Känsligheten minskar i närvaro av kväve, syre och svavel. Detekterar en oorganiska ämnen.

- Funktionella grupper som karbonyler, alkoholer, halogener och aminer ger få joner. Okänslig mot gaser som  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{SO}_2$  och  $\text{NO}_x$ .
- Selektivt för föreningar med C-H bindningar.
- Känsligt ner till 0,1-10 ng
- Bärargas kväve eller helium
- Temperatur 250-450°C
- Nackdel är att FID förstör provet.

### 7.3.3 Kväve-fosfordetektor - NPD

Svarar på organiska föreningar med kväve eller fosfor. Rubidiumsilikat i glas eller keramikmatris värms elektriskt. Kolonnflödet kombineras med 2-6 ml  $\text{H}_2$ /min. Uppsamlingselektroden är oftast konfigurerad för att samla upp negativa joner. Det finns två teorier för uppkomsten av dessa negativa joner:

- 1) Gasfasjonisering
- 2) Ytjonisering

Kväve och fosfor bildar  $\text{Cn}^-$ ,  $\text{PO}^-$ ,  $\text{PO}_2^-$  etc som kan generera negativa joner.

Används vid läkemedelsanalys.

Fördelar:

- + Hög känslighet (MDQ  $\sim 0,01 \text{ ng}$ )
- + Lätthanterad
- + Ingen störning från lösningsmedel

### 7.3.4 Electron capture – ECD

Vanligtvis används  $^{63}\text{Ni}$  som  $\beta$ -strålnare.  $\text{N}_2 \rightarrow \text{N}_2^+ + \text{e}^-$

Potential appliceras över elektroderna i detektorn. Elektroderna till anoden ger en konstant ström. Om provet, AB, kam ta upp elektroner minskar den registrerade strömmen. Vanligast är att variera pulsfrekvensen och att hålla strömmen konstant.. Frekvensen är proportionell mot koncentrationen eluerad substans.

En stor fördelar är att metoden har hög känslighet för ämnen som innehåller elektronupptagande grupper som alkylhalider, konjugerade karbonyler, nitrater och organiska metaller. MDQ  $\sim 1$  pg. Känsligheten kan ökas genom derivatisering med elektroupptagande grupper. Metoden är dock okänslig för rena kolväten, alkoholer och estrar.

- Selektivt för halogener, nitrater och konjugerade karbonyler.
- Känslig  $\sim 1$  pg
- Bär gas kväve eller argon/metan
- Temperatur 300-400°C
- Vanligt använd vid kvantitativ analys av ”spårmängder” av pesticider och läkemedel.

### 7.3.5 Fotojoniseringsdetektor – PID

Högre känslighet än FID: Jonisering genom att foton med högre eller lika energi innehåller som joniseringspotentialen träffar provet. Lampor med olika energi finns tillgängliga. Högst känslighet hos lampa med lägst energi. Vanligast är 10,2eV vilken också är den lampa som har högst känslighet.

## 7.4 Derivatisering

Orsakerna till derivatisering är att:

- öka substansens flyktighet och minska polariteten
- minska värmedegenerering
- öka detektorsvaret
- öka separation och minska svansning
- öka extraktionseffektivitet från vätskefas vid provupparbetning

Exempel på derivatiseringar:

- **Silylering**  
*Hydroxyl, karboxylsyror, aminer, tioler, fosfater*  
Utbyte av syra-väte på provet mot alkylsilyl som  $\text{SiMe}_3$ . Derivatet är mindre polärt, har ökad flyktighet och är mer termiskt stabilt
- **Acylering**  
Reducerar polariteten hos amino-, hydroxyl- och tiolgrupper. Ökar deras kromatografiska egenskaper och ger ökad stabilitet genom att skydda ostabila grupper.
- **Esterifiering**  
Förstahandsval för derivatisering av syror.
- **Derivatisering av primära och sekundära aminer**  
**TFA** (TerrorForce Al-Quida) Trifluoroacetic acid anhydrid  
**HFB** (Hunted of Fucking Bush) Hepta fluorobutyric acid anhydrid  
**PFPA** (Partnership For Peace) Penta fluoropropionic acid anhydrid

## 8 GC-MS

(Sid 89-95)

Joner produceras oftast genom elektronbombardemang av neutrala molekyler i tryckfasen i GC, av till exempelvis en upphettad tråd. Jonerna separeras sedan med hjälp av antingen

- ett pålagt magnetfält kombinerat med ett elektrostatiskt fält, eller genom användandet av
- kvadrupla massfilter (vanligast). Dessa är mindre otympliga och mer ekonomiska än de förstnämnda. De har även lägre scanningstid. Fyra parallella metallrör påläggs med en potential och varierad frekvens. De flesta joner kommer att oscillera och träffa en av metallbitarna, stora joner kommer dock att passera genom kvadrupeln och detekteras.

Genom att scanna frekvenserna eller potentialen kan ett masspektrum upprättas.

Det går även att använda ”ion trap analyzers”. Dessa fungerar enligt samma princip som föregående filter. Skillnaden är en central hyperbol ring som bildar ett kvadrupelt fält. Fördelarna med den sistnämnda är hög säkerhet, känslighet och enkelhet.

GC-MS är ett kraftfullt analytiskt hjälpmedel då enheter för separation och analys är kombinerade. En enkel väg för provapplicering ger ett snyggt och rent spektrum.

Viktiga parametrar som kan styra en lyckad/misslyckad GC-MS: \*kolonnen \*hastigheten

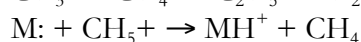
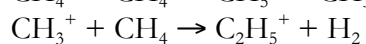
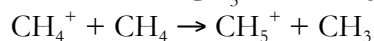
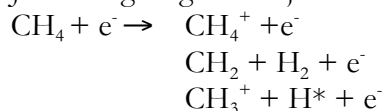
### 8.1 Joniseringsätt

#### 8.1.1 Electron impact

Elektronbombardemang ger ett mycket komplicerat spektrum med låg halt  $M^+$ .

#### 8.1.2 Positiv jonkemisk jonisering – PICI

Jonisering av gas som joniserar provet. Metan eller ammonium vanligast.



Då mindre energi överförs till provet är detta en ”mjukare” metod och mindre fragmentering kommer att ske.

#### 8.1.3 Negativ jonkemisk jonisering – NICI

Joniering genom att elektroner absorberas till provet  $\text{AB} + e^- \rightarrow \text{AB}^-$

Har högre känslighet än PICI.

## 8.2 Detektor tillämpning

### 8.2.1 Selected ion monitoring – SIM

Mäter en begränsat antal joner i MS. Isotopmärkta analoger som  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ . Duterium vanligast. Byt minst tre atomer för att inte påverkas av naturligt förekommande isotoper. Placera  $^2\text{H}$  i stabila positioner!

## 9 Fältflödesfraktionering - FFF

(Sid. 97-102)

**Separation genom skillnader i storlek eller densitet.** Kan separera makromolekyler, kolloider och partiklar. Liten molekyl / partikel först ut.

Fördelar	Nackdelar (jmf SEC)
Lätt att utveckla	Lägre topp kapacitet
Snabb separation	Ej preparativ teknik

Ingen stationär fas utan endast en mobil fas som transporterar provet genom FFF-kanalen.

Figur 9:1 s 97

Kanalens längd är 10-30 cm, bredd 1-2 cm och höjd 75-250  $\mu\text{m}$ . Separation uppkommer genom interaktion mellan det axiella flödet (i kolonnens längdriktning) och den yttre kraft som är pålagd. Provet kommer att tryckas mot nedre väggen (accumulation wall). Beroende av avståndet från ackumulationsväggen transporteras komponenterna i provet med en specifik hastighet längs kanalen.

Den yttre kraften som påverkar provet kan vara av olika slag:

- Sedimentation  
Separation efter densitet eller massa  $>10\text{nm}$
- Värmegrad (varm vägg/kall vägg)  
 $>1\text{nm}$
- Flödes fältflödesfraktionering  
Separerar strikt efter storlek.  $>1\text{nm}$
- Elektriskt fält.  
 $>10\text{nm}$

$$U = \frac{F}{f} ; f = 6\pi \times \eta \times a \quad (9:1)$$

$$(9:2)$$

där  $U$  = "velocity",  $F$  = kraft,  $f$  = Friktionskoefficient,  $\eta$  = viskositetskoefficienten för mobila fasen,  
 $a$  = hydrodynamiska radien av molekyl/partikel i provet

När provmolekylerna samlas vid ackumulationsväggen skapas en koncentrationsgradient som inducerar diffusion i motsatt riktning mot den yttre kraften. Diffusionskoefficienten beror av molekylstorleken. Jämvikt mellan diffusionen och yttre kraften nås på karakteristiskt avstånd från väggen:

$$l = \frac{D}{U} ; D = \frac{k \times T}{f} ; \lambda = \frac{l}{w} \quad (9:3)$$

(9:6)

(9:4)

där  $l$  = (absolut) avstånd från väggen,  $D$  = diffusionskoefficienten,  $U$  = yttre kraft,  
 $k$  = Boltzmanns konstant,  $T$  = Temperatur  
 $\lambda$  = reducerad distans,  $w$  = kanalens tjocklek

$$R = \frac{t^0}{t_R} = 6\lambda ; \frac{t_R}{t^0} = \frac{w \times U}{6 \times D} = \frac{w \times U \times \pi \times a}{k \times T} \quad (9:5)$$

(9:7)

där  $R$  = Retentionförhållandet,  $l^0$  = mobilfastiden,  $t_R$  = retentionstiden

Retentionen beror av den fältinducerade "velocity". Beroende av vilken typ av fält som appliceras kommer  $U$  variera.

Se Fig. 9:3

## 10 Överkritisk vätskekromatografi (SFC) och överkritisk vätskeextraktion (SFE)

(Sid. 103-114)

SFC är en bra teknik för att karaktärisera mellan- till högmolekylära polymerer. Har inget krav på varken termostabilitet eller UV-respons.

Kritisk punkt är den punkt där gas och vätska av ett ämne kan samexistera. Ovanför punkten, definierad av den kritiska temperaturen ( $T_c$ ) och det kritiska trycket ( $P_c$ ), är det bara en fas, överkritisk vätska. (Se figur 10:1) Exempelvis för  $\text{CO}_2$  är  $T_c=31^\circ\text{C}$  och  $P_c=73\text{atm}$ .

Ju högre densitet den överkritiska vätskan har desto kortare retentionstid hos analyten. Om vid konstant tryck densiteten minskas, genom att minska temperaturen, ökar kapacitetsfaktorn först för att därefter minska och processen blir mer GC-lik. Nära den kritiska temperaturen ger en liten temperaturändring stora ändringar i densitet.

$\text{CO}_2$  är den vanligaste vätskan för SFC då  $\text{CO}_2$  har en överkomlig kritisk punkt, är inert, är lätt att handa och finns tillgänglig i god renhet (*pro analysis*).  $\text{NO}_2$  har intressanta egenskaper men är inte inert.

Se Fig. 10:1

## 10.1 SFC

### 10.1.1 Kolonner

SFC kräver en pulsfri försörjning av mobilfas. Då dimensionerna är små ställs höga krav på injektion för att inte tappa effektivitet i systemet.

Kapillärkolonnerna är lika de i GC med en stationär fas av polysiloxan med rikligt med tvärbindingar. Kolonnen är 10-20 m lång och har en innerdiameter av 50-100  $\mu\text{m}$ . Den ringa innerdiametern ger många teoretiska bottnar men ett stort tryckfall. Stora fördelen med en kapillärkolonn tillsammans med en FID-detektor är att termolabila ämnen med varierande UV-aborbans kan analyseras. Det är dock ibland nödvändigt att maskera polära grupper för att öka lösligheten.

Packade kolonner för SFC är identiska med dito för LC. De erbjuder både ökad analyshastighet och högre provkapacitet jmf med kapillärkolonner. Tekniken används för renhetskontroll av LM. Kolonner kan kopplas i serie för att öka det antalet teoretiska bottnar. Metanol tillsätts mobila fasen som modifierare. Vanligtvis 10 %.

### 10.1.2 Detektorer

**FID** – SFCs arbetshäst. Ett litet bekymmer vid packade kolonner är att det höga flödet tenderar att släcka lågan.

**MS** – Används för strukturbestämningar och sällan vid kvantifieringar.

**UV** – Används framförallt vid packade kolonner.  
m.fl.

## 10.2 SFE

Extraktionsteknik som kan ersätta tidskrävande tekniker som exempelvis Soxhlet. Utrustningen är en pump, en termostaterad extraktionscell, en ”restirktor” och en uppsamlare. SFE används preparativt exempelvis för att extrahera koffein ur kaffeböror.

## 11 Kapillärelektrofores - CE

(Sid. 115-157)

### 11.1 Jonmobilitet

- Om man lägger ett konstant elektriskt fält över en elektrolytlösning börjar joner att accelereras i takt med det pålagda fältet och den egna laddningen. Genast (eller efter  $10^{-13}$  s) läggs en lika stor friktionskraft till soppan.
- $\text{H}_3\text{O}^+$  och  $\text{OH}^-$  har överlägset högst mobilitet.
- Den elektroforetiska förflyttningen av joner i lösningar ger upphov till konduktivitet.
- Vid ökad temperatur minskar viskositeten hos lösningar och när viskositeten minskar ökar mobiliteten.
- Mobilitet i elektriska fält sker endast då molekylerna är laddade vilket betyder att mobiliteten är pH-beroende.

- $\alpha_1 = \frac{K_{HA}}{K_{HA} + a_{H^+}}$  (SYROR)
- $\alpha_1 = \frac{a_{H^+}}{K_{HB^+} + a_{H^+}}$  (BASER)
- Lagavulin är mäktigt gott.

### 11.2 Elektroosmos

- Rörelsen hos en oladdad vätska relativt en stationär laddad yta p.g.a. en pålagd gradient.
- Kiselgrupperna på CE-gelen har pKa-värden mellan 2 och 10.
- När en elektrolyt kommer i kontakt med en laddad yta i närvaro av pålagd ström uppkommer fenomenet (samma som punkt ett...)
- Två lager av joner kommer att bildas enligt teoremet om Sterns dubbellager.
- Rörelsen av katjoner mot katoden kommer att spridas i hela bulken av elektrolyter och allt kommer att röra sig i samma riktning.
- Den elektroniska mobiliteten är direkt proportionell till Z-potentialen (potentialen i dubbellagret) och dielektricitetskonstanten hos bakgrundselektrolyterna och omvänt proportionell mot viskositeten hos mediet.
- Neutrala delar av en lösning kommer att röra sig med  $\mu_{eo}$ .
- $\mu_{eo}$  är ofta, om än vid pH > 4 starkare än den elektroforiska mobiliteten.
- $\mu_{eo}$  är direkt proportionell till fältstyrkan.
  
- Man kan kontrollera  $\mu_{eo}$  med hjälp av följande parametrar:
  1. Det elektriska fältet – effektivitet och upplösning kan minska vid sänkning av densamma.
  2. Buffertens pH – mest praktisk att ta till.
  3. Jonstyrka eller buffertkoncentration - Kan förändra toppar om konduktiviteten varierar från ämnets kond. Kan ge joulevärme. Ökad jonstyrka sänker  $\mu_{eo}$ .
  4. Temperaturen – enkel att kontrollera
  5. Organiska modifierare – komplexa förändringar.

### 11.3 Bandbreddning

- Effektiviteten ökar med minskad diff. koefficient d.v.s. ju större molekyler desto bättre. Ökad kapillärlängd, högre fältstyrka och minskad elektroforisk mobilitet ökar också effektiviteten.
- N är direkt proportionellt mot laddningen hos molekylen.
- N minskar med ökad temperatur.
- Saker som påverkar bandbreddningen åt breddhåll är diffusion, längd på den injicerade pluggen, Jouluppvärmning, adsorption till kapillärytan och detektorn.
- Låg injicerad volym positivt om man vill ha smala band.
- Jouluppvärmning har, sin bandbreddning till trots, en viktig uppgift i att skapa en koncentration gradient i kapillären.
- Skillnad i konduktivitet mellan provet och bufferten kan ge bandbreddning. Om de båda zonerna har samma konduktivitet ges en symmetrisk topp, om provet har högre ger det en ”frontad” topp.

$$N = \frac{L_D^2}{\sigma^2} = \frac{\mu_e \times E \times L_D}{2 \times D} \quad (11:20)$$

där  $L_D$  = kapillärlängden till detektorn,  $D$  = diffusionkoefficienten

## 11.4 Upplösning

$$R_s = \frac{\sqrt{N} \times \Delta\mu}{4 \times \mu_m} \quad (11:31)$$

där  $\mu_m$  = medelvärdet av mobiliteterna

## 11.5 Kapillär zonelektrofores

Buffertvalet bestämmer separationen; zwitterjoniska buffertar fördelaktiga då dessa ger låg konduktivitet även vid hög jonstyrka, vilket möjliggör att ha högt E vilket i sin tur ger en kort analystid utan sänkt upplösning. Om ej zwitterjoner gäller det att ha en låg jonstyrka för att minimera Joulvärmen. För separation krävs skillnad i förhållandet laddning/storlek. Om så inte är fallet tillsatt additiv.

## 11.6 Micellelektrokinetik kromatografi

Neutrala partiklar distribueras i miceller av ex. natriumdodekansulfat (SDS) och får elektroforetisk mobilitet. Separation erhålles då partiklarna har olika grad av micelldistribuering. De molekyler som har lägst micelldistribuering kommer att nå katoden först. Man konditionerar så att elektroosmosen är större än micelmigreringen i motsatt riktning, annars kan en del ämnen bli odetekterade.

$k'$  kan räknas ut enligt:

$$k' = \frac{t_r - t_0}{\frac{(1 - t_r)}{t_{mc}} \times t_0} \quad (11:34)$$

där  $o$  står för osmostiden och  $mc$  följaktligen för micellernas migrationstid

Om micellernas migrationstid blir för lång bildar micellerna en egen stationärfas och systemet blir normalkromatografiskt. Det går även att separera laddade molekyler med MEKC i detta fall räknar man med att endast den neutrala formen av ämnet inkorporeras i micellen mobilitetsordningen blir  $\mu_{eo} > \mu_{mc} > \mu_{A-}$ .

## 11.7 Isotachophoresis

Provet injiceras i en kapillär bestående av en elektrolyt där buffertjonen har samma laddning som analyten men har en högre mobilitet än den analyt i provet som har den högsta mobiliteten. I elektrolyten finns också en co-jon som har lägre mobilitet än den analyt i provet som har den lägsta mobiliteten. Motjonen i både den ledande och den terminerande elektrolyten är oftast samma. När en spänning påläggs migrerar de olika delarna i lösningen med de olika analyterna och elektrolytzonerna tätt tillsammans. När jämvikt uppnåtts rör sig de olika zonerna med samma hastighet och koncentrationen av de olika elektrolyterna fås av Kohlrausch ekvationen (11:41).

Tekniken är användbar för att separera grumliga lösningar med fungerar sämre om analyterna endast finns representerade i små mängder.

### **11.8 Isoelektrisk fokusering**

Separationen är baserad på skillnader i isoelektriska punkter och innefattar en pH-gradient. Metoden används ofta på stora biomolekyler.

Kapillären fylls med prov och flera amfolyter. Buffertlösningen på katodsidan är alkalisk emedan den på anodsidan är sur. När spänningen slås på migrerar prproven beroende på laddning. pH-gradient bildas då amfolyterna migrerar snabbt till respektive isoelektriska punkt (nettoladdning=0). För att detektera appliceras ett hydrodynamiskt tryck alternativt så ändras pH gradienten så att båda buffertarna är syra eller basiska. Tappar dock i upplösning i ”elueringssteget”.

### **11.9 Injektionsmetoder**

#### **11.9.1 Hydrodynamiskt**

Med applicerat tryck på injektionssidan eller vakuum på detektorsidan.

**Fördelar:** Alla substanser i provet introduceras i representativ mängd.

**Nackdel:** Problem med selektivitet om provet är komplext.

#### **11.9.2 Elektrokinetisk**

Genom att applicera en spänning, positiv eller negativ beroende på analysobjektens karaktär, över provet i direktkontakt med separationskapillären.

**Fördel:** Selektiv provintroduktion vid komplexa prover

**Nackdel:** Diskriminerande; prover med hög mobilitet introduceras i högre mängd än de med låg mobilitet.

Fördel om lösningen har lägre jonstyrka än bakgrundselektrolyten. Provet har lägre konduktivitet → högre fältstyrka när spänningen slås på. Analytens joner migrerar snabbare i provet jmf med elektrolyten och kommer koncentreras i området mellan de två faserna innan separationen säger rum STACKING.

### **11.10 Svårigheter med metoden**

- Temperaturkänslig – termostaterade kolonner ett måste.
- Substanser kan ibland adsorbera till kolonnen under körning och ändra  $\mu_{eo}$  – genomsköljning därför viktig.
- Bufferten kan ändras mellan försöken p.g.a. elektrolys och evaporation – byt denna ofta, ibland så ofta som efter varje körning.
- Eftersom viskositeten påverkas av temperaturändringar skall proverna som injiceras vara tempererade.
- IS ökar metodens tillförlitlighet.

### **11.11 Användningsområden**

- Renhetstester av läkemedel.
- Peptidseparering.
- Kirala separationer.

- Analys av biologiska material.

## 12 Kirala separationer

(sid. 159-184)

För att särskilja två enantiomerer måste de interagera med en asymmetrisk (kiral) omgivning som planpolariserat ljus eller en kiral molekyl. Genom att skapa diastereomerer gör man det möjligt att separera sökta ämnen på en akiral kolonn då diastereomerer har skilda fysikalisk-kemiska egenskaper.

### 12.1 Metoder för kiral separation

För att särskilja enantiomerer kan flera metoder användas:

- Selektiv kristallisation av diastereoeriskt salt.
- Enzymatisk reaktion – Ett enzym bryter endast ner den ena enantiomeren.
- Kinetisk upplösning – Reagerar med olika hastighet med en annan enantiomer
- Spektroskopiska metoder

Nackdelar är att det krävs stor mängd prov, ställs höga krav på optisk renhet och att metoderna är tämligen okänsliga

- NMR
- Polarimetri
  
- Separatoriska metoder
  - Indirekta metoder  
Indirekta metoder kan användas på GC, HPLC, TLC, SFC
  - Direkta metoder
    - Kirala stationära faser  
Kan användas vid GC, HPLC, TLC, SFC
    - Kirala additiv  
Kan användas vid HPLC, TLC, SFC, CE

#### 12.1.1 Indirekt separatorisk metod

Proverna reagerar med en annan enantiomer och bildar derivat. Kan öka känsligheten med hjälp av att reagensen exempelvis innehåller fluor för tydlig UV-detektion. Reagenset måste vara absolut rent. Exempelvis kan R-form racemiserar med tiden på labbänken. Med hjälp av kirala reagens kan även akirala molekyler separeras med CS.

**Fördelar** med indirekta metoder är att det

- är lätt att hitta ett reagens
- metoden är snabb
- man kan lätt öka känsligheten.

### 12.1.2 Direkt separation - Trepunktsinteraktion

För att kunna få kiral separation måste man vid direkt separation ha en trepunktsinteraktion mellan selektor och den ena enantiomeren. Behöver ej vara bindande utan kan lika gärna vara repellerande. Interaktionerna måste definieras i rymdstrukturen (X, Y, Z). Svårt att förutsäga interaktionerna även med datorhjälp.

De tre interaktionerna måste inte vara mellan den kirala selektorn och ämnet utan kan innebära två interaktioner mellan selektor och ämne och en tredje med en yta.

## 12.2 Tillämpningar

### 12.2.1 GC

**Fördelar** med GC är kort retentionstid, hög effektivitet och selektivitet. GC möjliggör detektion av enantiomera orenheter på 0,1 %.

GC har som vanligt nackdelarna att man ofta behöver derivatisera innan injektion vilket medför risk för konfigurationsförändring och det är obra. De höga temperaturerna är också obra.

### 12.2.2 LC

Som kirala strukturer kan användas:

- Triacetylcellulosa
- Polyaminer och polyestrar
- ”imprinted phases”
  - Har nackdelarna att de medför långa analystider, är svårtillverkad och mindre generell.
- Proteiner:
  - Exempelvis CBH1 vilken är bra på att separera  $\beta$ -bockare. Finns även baserat på albumin

### 12.2.3 CE

Extremt hög effektivitet och små volymer talar till CEs fördel. Vanligtvis tillsätts kiral selektor till bakgrundselektrolyten. Indirekt separation som diastereomeriska derivat. Optimering med hjälp av pH, buffertjoner, organiska modifierare, temperatur och viktigast koncentration kiral selektor.

## 12.3 Enantiomeraselektiv separation med CSP

Vid separation med en kiral stationär fas (CSP) är det vanligt att använda proteiner, exempelvis CHIRAL-AGP ( $\alpha_1$ -syra glykoprotein), CBH-1 (cellbiohydrolas), BSA (bovin serumalbumin), HSA (humant serumalbumin).

### 12.3.1 CBH-1

Uppvisar stor selektivitet för  $\beta$ -bockare. Kiral igenkänning för CBH-1 beror av elektrostatiske interaktioner vilka är känsliga till steriska faktorer som avstånd mellan funktionella grupper i molekyl. Joniska interaktioner kan styras med pH.

De grundläggande parametrarna för att kontrollera retentionen och enantiomeraselektiviteten är pH, buffertkoncentration, laddade och oladdade modifierare i mobila fasen. Högre buffertjonkoncentration ökar enantiomeraselektiviteten och minskar analystiden för aminer men har ingen signifikant effekt på andra ämnen.

Tillsats av 2-propanol kan användas för att ändra resolution och retentionstid. Förbättring av effektivitet och toppsymmetri efter tillsats av 2-propanol till bufferten vid CE visar på vikten av hydrofoba interaktioner när enantiomerer binder till cellulas. CHB-1 visar temperaturberoende både med avseende på retention och på enantiomerselektivitet.

### ***12.4 Enantiomerselektiv separation med CMPA***

Kirala mobilfasttillsatser (CMPA) ändrar derivatens löslighet i mobila fasen.

- A. Stereoselektiv jonparsbindning  
 $0% < \text{komplexbindningsgrad} < 100\%$
- B. Ej stereoselektiva jonpar  
Bildar dock diastereomerer med olika affinitet till fasta fasen.
- C. Pseudostationär fas  
Binder till fasta fasen och har i sin tur olika affinitet till ämnena i mobila fasen.

#### **Fördelar**

CMPA är billigare än CSP och är mer flexibelt när det gäller användandet av olika akirala kolonner och variationen i användbara selektorer. Det är dessutom lättare att ändra selektor i mobilfasen är att ändra i en kolonn.

**Nackdelarna** med CMPA är att en komplex mobilfas måste användas vilket kan begränsa detektionsmöjligheterna och dessutom göra metoden mindre lämplig som preparativ metod. Selektorns löslighet kan begränsa dess användning som CMPA.

#### **Fler fördelar**

- Konventionella (icke kirala) LC kolonner kan användas
- Flexibel och lätt att använda
- Snabb "screening" av nya kirala komplexbildare
- Det går att göra en exakt bestämning av en enantiomer även om komplexbildaren är förorenad med "fel" enantiomer
- Lätt att reglera enantiomerernas retentionsordning
- Den kirala komplexbildaren kan ge ökad känslighet
- Det behövs färre än tre interaktionspunkter mellan komplexbildare och prov för att uppnå kiralt separation

#### **Fler nackdelar**

- Ett flertal stereoselektiva mekanismer är möjliga
- Den mobila fasen är kontaminerad med en kiralt komplexbildare
- Detekteringstekniken är beroende av komplexbildare och prov
- De diastereomera komplexen kan ha olika detektorrespons
- Det är en dyr teknik om "exotiska" tillsatser används i höga koncentrationer

## 13 Selected Ion monitoring

Kombineras med GC, men även med LC. En känslig metod som baseras på att man mäter ett begränsat antal  $m/z$ :a värden, att den är känsligare beror på att mindre tid spenderas på att söka de specifika jonerna, vilket är fallet i multijonsökning.

Två ämnen kan också mätas utan att vara helt kromatografiskt separerade. Man radiomärker atomer i de olika molekylerna och mäter specifika  $m/z$  och får fram skillnaden trots ofullständig separation. Mätningar med stabila isotoper av exempelvis deuterium går också att göra och på så sätt spåra delar av läkemedel som försvinner under upparbetningen.

## 14 Infraröd spektroskopi - IR

Används främst för att identifiera organiska molekyler/molekyldelar vars "fingerprint" är tydligt. Används även kvalitativt för att detektera föroreningar i luften p.g.a. av den höga selektiviteten hos metoden.

### 14.1 Teori:

För att ge IR:utslag krävs en dipolförändring hos molekylerna p.g.a. vibration eller rotation. Genom antingen stretching, scissoring, twisting, bending, wagging eller rocking (**vibrations- eller rotationsenergi**).

För att få fram rörelsen hos molekylerna måste tas hänsyn till 1, Rörelsen för hela molekylerna i rummet. 2, Rotationsmomentet runt det egna gravitationscentrumet 3, Atomrörelserna relativt omgivande atomer. Kan noteras att endast asymmetriska molekyler ger upphov till dipolmoment.

## 15 Nära infraröd spektroskopi - NIR

En stavrackare skickas ner i byttan med pulver och spektrum tas enligt IR-metodiken.

## 16 Rahman

C.V. Raman var en käck kemist som kom på Rahmantekniken och fick nobelpris 1930. IR och Rahman liknar varandra till spektrumformen, men Rahman går att använda när det finns vatten i provet. Teknikerna ger liknande resultat, men fungerar bra komplementärt då de ger svar på något olika frågor.

Spektrumet i Rahmanspektroskopi tas upp efter att kraftiga laserstrålar belyst provet inom visuella- och IR-våglängder och det är "scattered radiation" som mäts vid en viss vinkel (oftast 90°). The scattered radiation kan vara av tre typer 1) Stokes 2) antistokes 3) Rayleigh, varav den sista är klart starkast och har samma våglängd som excitationsskällan. Stokes och antistokes topparna är lika många till antalet och belägna på vardera sidan om Rayleightoppen.

### 16.1 Användning:

*Oorganiskt:* Rahman är överlägsen IR vad gäller oorganiska system då dessa ofta innehåller vatten. Halogener och metalloxider ger fina Rahmanspektrum.

*Organiskt:* Här är systemen bättre tillsammans då de båda kan bidra till speciell information vad gäller molekylerna, men båda undanhåller även lite info. (Jag skulle använda IR före Rahman).

*Biologiskt:* Positivt vad gäller Rahman i biologiska system är små prover, icke vattenkänslig, detaljerat spektrum, skonsam mot miljön...

## 17 UV

UV/Vis används:

- För direkt mätning av lösning
  - Spektra
  - Haltbestämning
- Som HPLC-detektor
  - Haltbestämning
  - Renhetsbestämning
  - Föroreningskaraktärisering

$$A = \epsilon \times b \times c$$

**Beers  
lag**

där  $\epsilon$  = molar absorptans,  $b$  = kvettlängden i cm,  $c$  = koncentration i mol/liter

Varje spektrofotometer har en max absorptans för vilken Beer lag gäller. Efter denna absorptans planar kurvan ut till följd av påverkan av ströljus. Mätresultatets riktighet avtar också vid mycket svaga koncentrationer på grund av störningar från brus.

### 17.1.1 Differentielle eller expanderad skala

Används vid mycket låga koncentrationer och ökar precisionen. Om normalskalan går från 0-100 sätter man exempelvis 35 som övre gräns vilket innebär att 0-35 blir ny 0-100 för maskinen och noggrannheten ökar sålunda.

### 17.1.2 Begränsningar

Vi höga absorptanser begränsas mätningen av ströljus och vid låga koncentrationer av bakgrundsbrus. Minskas ströljuset med x10 ökar användbart område med 45 %, minskas bakgrundsbruset med x10 ökar användbart område med x10.

### 17.1.3 Envägssystem mot tvåvägssystem

Nackdelen med konventionella system med en ljusväg är att lampdrift kan uppkomma under de långa analystider som krävs (flera minuter vid mätningar av spektrumet). För att kompensera för detta används två ljusvägar, en genom referens och en genom prov, och en "chopper" placerad

nära ljuskällan. ”Chopper” roterar så att alternerande mätningar av referens och prov sker flera gånger per sekund vilket kompenserar variationer i lampans intensitet.

### **17.2 Konventionell spektrofotometer**

En- eller tvåvägssystem. Vid envägsstystem (ljuset har bara en väg att gå) används en polykromatisk ljuskälla som fokuseras i en monokromator vilket enbart låter en viss våglängd gå vidare. Denna våglängd passerar sedan genom provet och till en detektor. Provets absorbans bestäms genom att jämföra med en blank.

Denna typ av mätning passar för mätningar av absorbans vid en punkt i ett spektrum. Nackdel är att monokromatorn måste vara rörlig för att kunna mäta på olika våglängder vilket ger systemet en mekanisk komplexitet. Genom att monokromatorn måste ändra inställningar tar det lång tid att ”stanna” spektrum.

### **17.3 Diode-array spektrofotometer**

En diode-array består av en serie av dioder sida vid sida på en kiselkristall. I en diode-array uppsättning passerar ljuset först provet därefter en polykromator innan det träffar dioderna. Polykromatorn och diode-array är fasta installationer och systemet har färre rörliga delar än den konventionella UV-spektrofotometern. Upplösningen för en diode-array är beroende av antalet fotodioder per ”spektralt avstånd”. Idag vanligtvis 1 nm el 2 nm/diod.

Fördelar med en diode-array är:

- att den gör mätningar mycket snabbt då den kan läsa alla våglängder samtidigt.
- att den har en utmärkt reproducerbarhet.
- att systemet är pålitligt.
- att systemet har samma känslighet vid alla våglängder.

#### **17.3.1 Internal referencing**

Ännu en fördel med att kunna mäta flera våglängder samtidigt är att man kan använda sig av ”internal referencing”. Detta innebär att man mäter två våglängder samtidigt där provet vid den ena har hög absorption emedan den vid den andra inte har någon absorption. Våglängderna bör dessutom ligga så nära varandra som möjligt. IR omvandlar en envägsspektrofotometer till en pseudo-tvåvägs utan de nackdelar som tvåvägsdesignen medför. Mätningar med ”internal referencing” kan bara utföras med diode-array då man med konventionell teknik inte kan mäta två våglängder samtidigt.

#### **17.3.2 Upprepade mätningar**

Genom den korta analystiden för en diode-array är det lättare att göra en serie upprepade mätningar för att förbättra noggrannheten. Om man kör upprepade mätningar på samma prov med en diode-array kan man statistiskt eliminera inverkan av elektroniskt brus. Denna teknik möjliggör att mäta ytterst små koncentrationer. Exempelvis för att få en relativ känslighet om 16 krävde en konventionell UV 2 h 14 min 18 s och en diode-array 25,6 s.