

FACIT: ANALYSERA ORGANISKA FÖRENINGAR

1. Förklara tillvägagångssättet vid analys med tunnskiktskromatografi (TLC) och hur okända ämnen kan identifieras med den metoden. I din förklaring bör du ta med begreppet "Rf-värde".

Svar:

Tillvägagångssätt:

1. Provet (eller proven) appliceras en liten bit upp på den stationära fasen på TLC-plattan.
2. TLC-plattan placeras sedan lodrätt i en behållare (t.ex. i en bägare). Den mobila fasen fylls på i behållaren. Det är dock viktigt att nivån av den mobila fasen inte når upp till provet.
3. Med hjälp av kapillärkraften kommer den mobila fasen nu börja röra sig uppåt genom den stationära fasen.
4. De olika ämnena i provet följer med den mobila fasen i olika hög grad. Ämnen som är lösliga i den mobila fasen (kan skapa starka bindningar med molekylerna i den mobila fasen) kommer följa med lättast och hinner därför ta sig längst under den tid kromatografin pågår. Vi får p.g.a. detta en separation av olika ämnen.
5. Kromatografin avbryts innan den mobila fasen (lösningsmedlet) når toppen av TLC-plattan.
6. Ämnena kan åskådliggöras med UV-ljus eller genom att olika reagenser tillsätts. Ibland syns ämnena direkt.

Förklaring till hur de okända ämnena på TLC-plattan kan identifieras:

Ett Rf-värde räknas ut för att identifiera de olika ämnena i provet

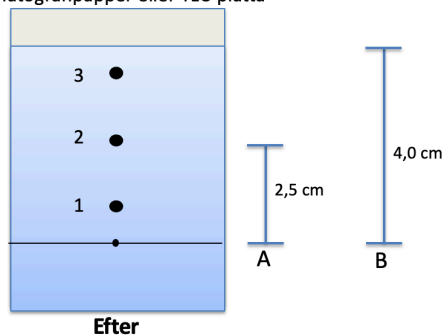
$$R_f = \frac{A}{B}$$

A= Avståndet från baslinjen (startpunkten) till punkten där ämnet nu befinner sig.

B= Avståndet från baslinjen till framkanten av den mobila fasen.

Om analysens utförs under samma betingelser så har ett visst ämne alltid samma Rf-värde. En identifikation av ämnet kan därför ske utifrån Rf-värdet.

Kromatografipapper eller TLC-platta



Uppgift: Vilket Rf-värde har ämne 2?
Svar: $R_{f2} = 2,5/4,0 = 0,625$

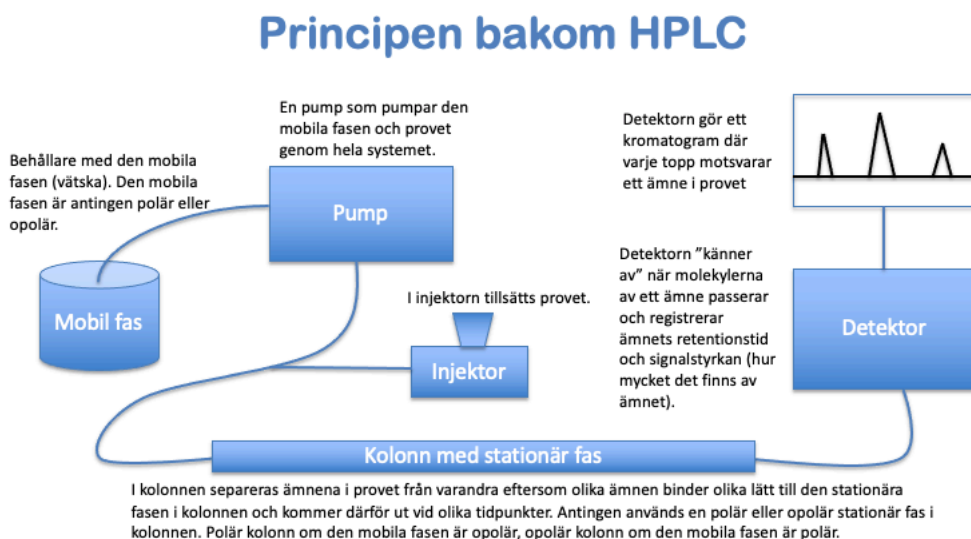
FACIT: ANALYSERA ORGANISKA FÖRENINGAR

2. Vilka olika typer av analyser kan utföras med HPLC?

Svar:

1. Undersöka vilka okända ämnen som finns i ett prov: Vi kan identifiera okända ämnen (t.ex. gifter, droger, dopingpreparat, miljögifter, brandfarliga vätskor eller läkemedel) med denna metod. Om vi dessutom kopplar vår HPLC till en masspektrometer (en speciell detektor) får vi ett mycket kraftfullt verktyg för att identifiera okända ämnen.
 2. Bestämma koncentrationen av olika ämnen som finns i ett prov: HPLC kan också användas kvantitativt för att mäta koncentrationen av de ämnen som finns i ett prov.
 3. Separera (rena) olika ämnen som finns i ett prov: Vi kanske har ett prov som innehåller ett stort antal olika ämnen, men vi är enbart intresserade av ett av dessa ämnen. Vi kan då använda HPLC för att separera ämnena från varandra och därmed "isolera" det ämne vi är ute efter.
 4. Renhetstester: Vi kan undersöka om ett prov är förorenat med andra ämnen som inte bör finnas där (t.ex. renhetstester av läkemedel eller livsmedel).
3. Beskriv principen bakom HPLC och hur okända ämnen i ett prov kan identifieras. I din förklaring bör du inkludera en beskrivning av de delar som ingår i en HPLC-apparat.

Svar:



Retentionstiden är specifik för varje ämne i ett givet system och därför kan vi använda retentionstiden för att identifiera de okända ämnena i provet (kvalitativ analys).

FACIT: ANALYSERA ORGANISKA FÖRENINGAR

4. Förklara skillnaden mellan "normal-fas-kromatografi" respektive "omvänd-fas-kromatografi" när det handlar om HPLC.

Svar:

Normal-fas-kromatografi (polär kolonn):

- Den mobila fasen är opolär medan den stationära fasen är polär (en polär kolonn används).
- Polär kolonn innebär att polära ämnen kommer bromsas upp mest och få längst retentionstid: Polära ämnen binder med starka vätebindningar (eller vanliga dipol-dipolbindningar) till den polära stationära fasen och "bromsas" därför mest i kolonnen. Opolära ämnen binder inte lika starkt till den stationära fasen (kan inte skapa vätebindningar eller vanliga dipol-dipolbindningar) och åker därför ut först genom kolonnen.

Omvänd-fas-kromatografi (opolär kolonn):

- Den mobila fasen är polär medan den stationära fasen är opolär (en opolär kolonn används).
- Opolär kolonn innebär att opolära ämnen kommer bromsas upp mest och få längst retentionstid: Nu kommer de polära ämnena "trivas" bäst i den polära mobila fasen eftersom de kan binda med starka vätebindningar (eller vanliga dipol-dipolbindningar) till ämnena i den. De polära ämnena kommer därför snabbt följa med den polära mobila fasen ut genom kolonnen och får därför kortast retentionstid. Opolära ämnen binder inte särskilt bra till polära mobila fasen men kan däremot binda bra till den opolära stationära fasen med van der Waalsbindningar (London dispersionskrafter) och kommer därför bromsas upp mest inuti kolonnen. Opolära ämnen kommer därför få längst retentionstid.

5. Butanol, hexanol och oktanol körs i en HPLC. Vilket ämne tar sig fram till detektorn först om omvänd-fas-kromatografi används?

Svar:

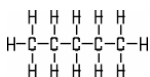
Vid omvänd-fas-kromatografi är den mobila fasen polär medan den stationära fasen är opolär (opolär kolonn). Opolära ämnen kommer kunna binda bäst till den stationära fasen medan polära ämnen kommer kunna binda bäst till den mobila fasen. Alla tre ämnen kan skapa vätebindningar men butanol har kortast kolvätekedja och är därför mest polär av dessa tre ämnen. Hexanol och oktanol har längre kolvätekedjor, låg polaritet, och kan skapa

FACIT: ANALYSERA ORGANISKA FÖRENINGAR

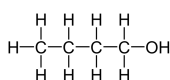
fler van der Waalsbindningar till den opolära kolonnen. Hexanol och oktanol bromsas upp mest i kolonnen vilket gör att butanol kommer fram först till detektorn.

6. Ett prov som innehåller nedanstående ämnen körs i en HPLC.

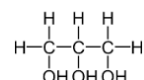
Pentan:



Butanol:



Glycerol:



- Vilket ämne får längst resp. kortast retentionstid om vi använder oss av en polär stationär fas inuti kolonnen? Motivera.
- Vilket ämne får längst resp. kortast retentionstid om vi istället använder oss av en opolär stationär fas inuti kolonnen? Motivera.

Svar:

- Glycerol har störst förmåga att skapa vätebindningar till den polära kolonnen och kommer därför ha längst retentionstid (bromsas upp mest). Pentan har ingen förmåga att skapa vätebindningar och kommer därför få kortast retentionstid. Butanol kan skapa vätebindningar, men inte lika många som glycerol, och kommer därför på andra plats.
 - Pentan har störst förmåga att skapa van der Waalsbindningar till den opolära kolonnen och kommer därför bromsas upp mest och få längst retentionstid. Glycerol har störst förmåga att skapa vätebindningar och binder därför bäst till den polära mobila fasen. Samtidigt har butanol större förmåga än glycerol att skapa van der Waalsbindningar till den opolära kolonnen. Detta tillsammans gör att glycerol får kortast retentionstid.
7. Ibland vid HPLC kan det vara så att topparna från flera olika ämnen sammanfaller i kromatogrammet (dålig upplösning). Det blir då svårare att identifiera olika ämnen. Vilka faktorer kan ändras för att få till en bättre separation?

Svar:

Åtgärder för att förbättra separationen och få en bättre upplösning i kromatogrammet:

- Använda en kolonn med en annan storlek: I en längre och/eller smalare kolonn kommer de olika ämnena i provet binda fler gånger till den stationära fasen och därmed separeras från varandra i högre utsträckning.

FACIT: ANALYSERA ORGANISKA FÖRENINGAR

2. Sänka hastigheten av den mobila fasen: Om vi sänker den mobila fasens hastighet så kommer ämnena i provet ha längre tid på sig inuti kolonnen och de kommer hinna binda i större utsträckning till den stationära fasen. Det leder till en bättre separation.
 3. Ändra kolonnens polaritet: Om vi får en dålig separation på en opolär kolonn så kan vi testa med att byta ut den mot en polär kolonn (eller tvärtom).
 4. Ändra den mobila fasens polaritet: Vi kan öka eller minska polariteten av den mobila fasen genom att påverka sammansättningen av de ämnen som ingår.
8. Gaskromatografi (GC) påminner om HPLC, men det finns några viktiga skillnader.
- a) Vad utgörs den mobila fasen av vid GC?
 - b) Varför kan HPLC användas för att analysera fler ämnen jämfört med GC?
 - c) Vilka egenskaper måste ett ämne ha om det ska kunna identifieras med hjälp av GC?
 - d) Vilka är de främsta fördelarna med GC framför HPLC?

Svar:

- a) I gaskromatografi används en gas som mobil fas (helium, kvävgas eller vätgas) medan en vätska (en blandning av olika ämnen) används vid HPLC.
- b) GC kan enbart separera och analysera ämnen som är flyktiga (kan övergå i gasform relativt lätt) och som är värmetåliga. Gaser och lättflyktiga vätskor kan analyseras med GC medan de flesta vanliga vätskor ej kan analyseras. HPLC kan däremot användas även för icke flyktiga ämnen och för ämnen som är värmekänsliga och har därför ett större användningsområde (t.ex. används HPLC för kolhydrater, fetter och proteiner och har därför stor betydelse inom biokemi, medicin etc.).
- c) GC kan enbart separera och analysera ämnen som är flyktiga (kan övergå i gasform relativt lätt) och som är värmetåliga. Därför är det enbart värmetåliga ämnen som har en lägre kokpunkt än 350 grader som kan analyseras med GC.
- d) Fördelen med GC framför HPLC är framförallt att det är en snabbare och lite enklare metod att genomföra.

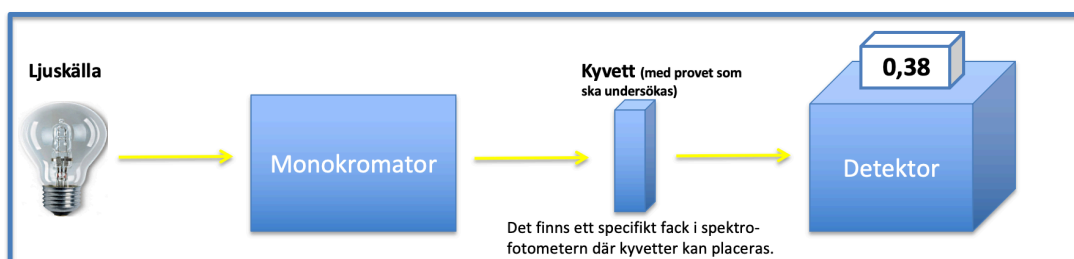
FACIT: ANALYSERA ORGANISKA FÖRENINGAR

9. Beskriv uppbyggnaden av en spektrofotometer.

Svar:

En spektrofotometer består av en ljuskälla (lampa), en monokromator, ett speciellt fack där en eller flera kyvetter placeras, samt en detektor.

Spektrofotometers uppbyggnad



10. Förklara hur monokromatorn i en spektrofotometer är uppbyggd och vilken funktion den har.

Svar:

Monokromatorn innehåller ett vridbart prisma och en spalt. Prismet delar upp det vita ljuset, som kommer från ljuskällan, i alla dess våglängder. Spalten gör att bara en enda våglängd passerar ut ur monokromatorn. När vi ställer in spektrofotometern på en viss våglängd så vrider vi prismet så att rätt våglängd "slinker" ut genom spalten!

Vi ställer in monokromatorn på den våglängd av ljuset som ämnet i vårt prov är bäst på att absorbera. Varje ämne har en specifik våglängd som ämnet absorberar bäst. Monokromatorn filtrerar alltså bort de oönskade våglängderna och släpper enbart igenom den våglängd vi har ställt in den på.

FACIT: ANALYSERA ORGANISKA FÖRENINGAR

11. Förklara hur en spektrofotometer fungerar och hur koncentrationen av ett ämne kan bestämmas med hjälp av spektrofotometri?

Svar:

I spektrofotometern skickar en ljuskälla (en speciell lampa) ut ljus av en viss våglängd (monokromatorn ställs in på en viss våglängd) mot kyvetten där provlösningen med ämnet finns.

Ämnets molekyler absorberar en stor del av det ljus som åker in i kyvetten. Desto fler molekyler (högre koncentration av ämnet) desto mer ljus absorberas. Detektorn registrerar sedan transmittansen vilket är den andel ljus som tar sig igenom och träffar detektorn. Detektorn kan sedan utifrån transmittansen beräkna absorbansen.

Absorbansvärdet är proportionerligt mot koncentrationen. En högre koncentration av ämnet ger ett högre absorbansvärde. Spektrofotometern kan dock inte själv beräkna koncentrationen utan för att ta reda på koncentrationen måste man jämföra med absorbansen från prover med kända koncentrationer.

Man blandar därför till ett antal, ca 4-6 st, standardlösningar/referenslösningar med kända koncentrationer av ämnet. Absorbansen av dessa kända prover mäts och en standardkurva (kalibreringskurva) ritas upp med värdena från standardlösningarna. Denna standardkurva används sedan för att ta reda på den okända koncentrationen.

12. Beskriv översiktligt och steg för steg hur man praktiskt går tillväga för att bestämma koncentrationen av ett ämne med hjälp av spektrofotometri.

Svar:

1. Blanda till 4-6 standardlösningar/referenslösningar med kända koncentrationer av det aktuella ämnet.
2. Mät absorbansen av standardlösningarna/referenslösningarna (obs. nollställ först spektrofotometern med hjälp av en kyvett innehållande destillerat vatten).
3. Mät absorbansen av provlösningen (obs. nollställ först spektrofotometern med hjälp av en kyvett innehållande destillerat vatten).
4. Rita upp en standardkurva/kalibreringskurva med värdena från standardlösningarna. Använd standardkurvan för att ta reda på den okända koncentrationen av ämnet i provlösningen.

FACIT: ANALYSERA ORGANISKA FÖRENINGAR

13. Redogör för Lambert-Beers lag och vad den kan användas till.

Svar:

”Lambert-Beers lag” är en formel som visar sambandet mellan absorbans och koncentration. Om extinktionskoefficienten är känd för det ämne som undersöks kan ”Lambert-Beers lag” användas för att beräkna koncentrationen, vi behöver då inte göra en standardkurva.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

A = Absorbansen.

ϵ = ”Molära extinktionskoefficienten”, den är specifik för det ämne som undersöks och är ett värde på hur bra ämnet är på att absorbera ljus vid en viss specifik våglängd.

c = Koncentrationen av ämnet i kyvetten. Desto högre koncentration, desto större absorbans.

l = Kyvettens längd, oftast 1 cm (den sträcka ljuset färdas genom kyvetten). Desto längre sträcka ljuset måste passera genom lösningen, desto mer ljus absorberas.