

Analytisk kemi föreläsning 1/9-10. 1v1

- Provupparbetning
- Validering av analytisk metod
 - Bekräftelse på identitet
 - Specificitet
 - Mätområde
 - Linearitet
 - Känslighet (detektorn + ^{t.ex. absorptivitet av UV.} analytens egenskaper)
 - Undersökning av matrixeffekter
 - Detektionsgräns = lägsta konc. som kan uppmätas.
 - Noggrannhet (riktighet o, precision)
 - Robusthet Stabilitet Utbyte.

När ska en metod valideras?

- En metod ska valideras när det är nödvändigt att bevisa att den är lämplig för att lösa det specifika analytiska problemet.
 - då ny metod ska utvecklas
 - vid förändring
 - kvalitetskontroll
 - flyttar etablerad metod till nytt lab.

Den analytiska Processen

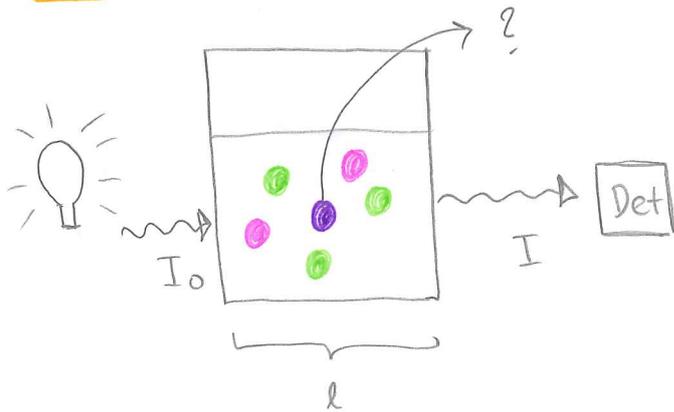
Analytkemisk frågeställning

1. Erhålla ett representativt bulkprov
2. Extrahera från bulkprovet ett mindre homogent labprov.

...

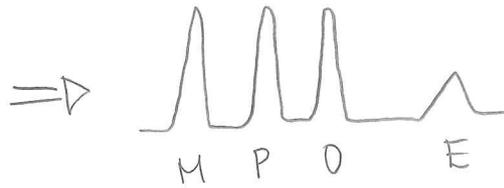
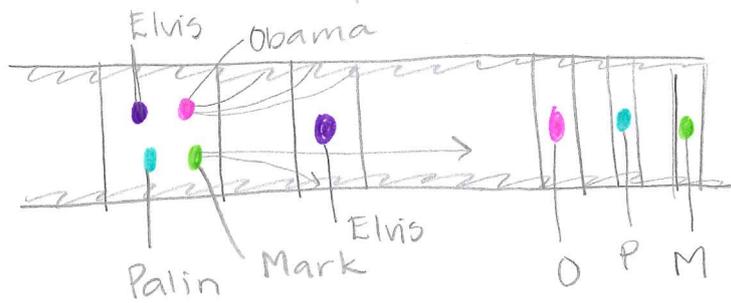
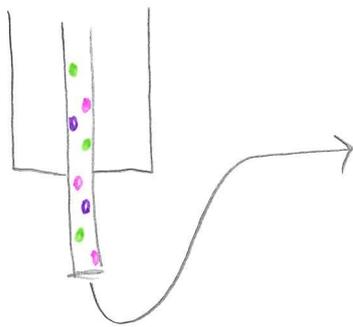
Analytisk kemi föreläsning lv 2 8/9-10

Ex: Ett prov med olika ämnen.

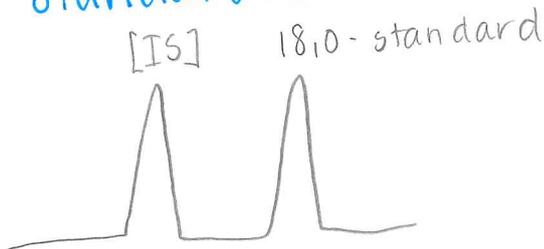


$$A = \epsilon \cdot l \cdot c + \epsilon \cdot l \cdot c + \epsilon \cdot l \cdot c$$

För att få reda på hur mkt lila vi har måste vi komma på ett sätt för att plocka ut denna

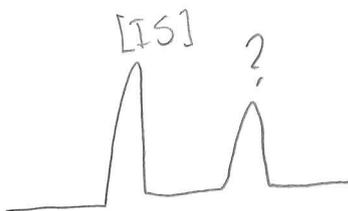


Responsfaktor används ist för standardkurva för kvantifiering.



$$\frac{[18]}{[IS]} = K$$

IS - intern standard



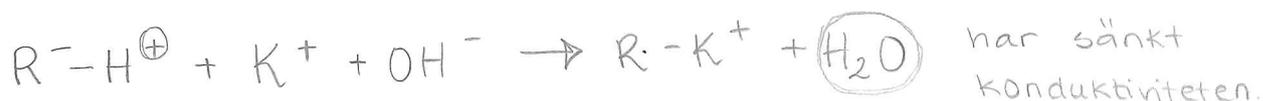
Föreläsning: Analytisk kemi lv3 15/9-10

Detektor Konduktivitetsdetektor
- mäter ledningsförmåga

Mobilfas: hög konc. av jonen
⇒ högt bakgrundsbrus
⇒ kan ej mäta låga halter av analyt.

Lösning på konduktivitetsproblemet.

⇒ Suppressor kolonn



Kationbytare: suppressorkolonn anjonbytare

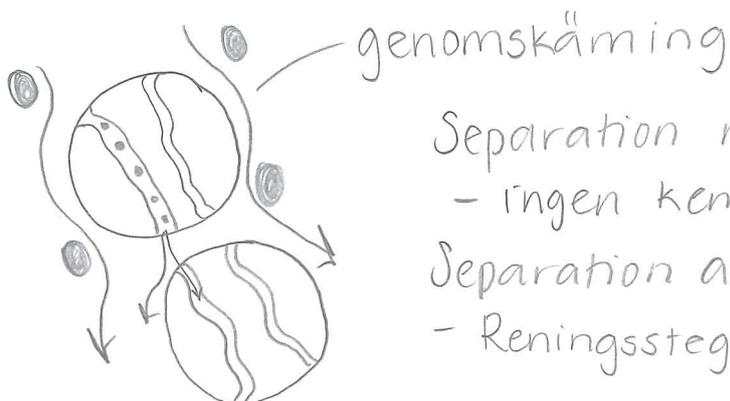


→ Byter ut mobilfasens elektrolytjoner mot joner som bildar t.ex. H_2O eller annan produkt som har låg konduktivitet.



Gelfiltrering: Hydrofil mobilfas, stationärfas.

Gelpermeation: Hydrofob ——— " ———



Separation m.a.p. storlek

- ingen kemisk interaktion

Separation av makromolekyl

- Reningsteg (protein, polymerer)



$$V_{tot} = V_{gel} + V_i + V_o$$

|
volymer inuti partiklar

Void
volymer
(utaför)

$$V_r = \text{retentionsvolymer} = V_o + K \cdot V_i$$

↑ Fördelningskonst.
för analyter att
gå in i partikelporer.

För stora partiklar $K=0$

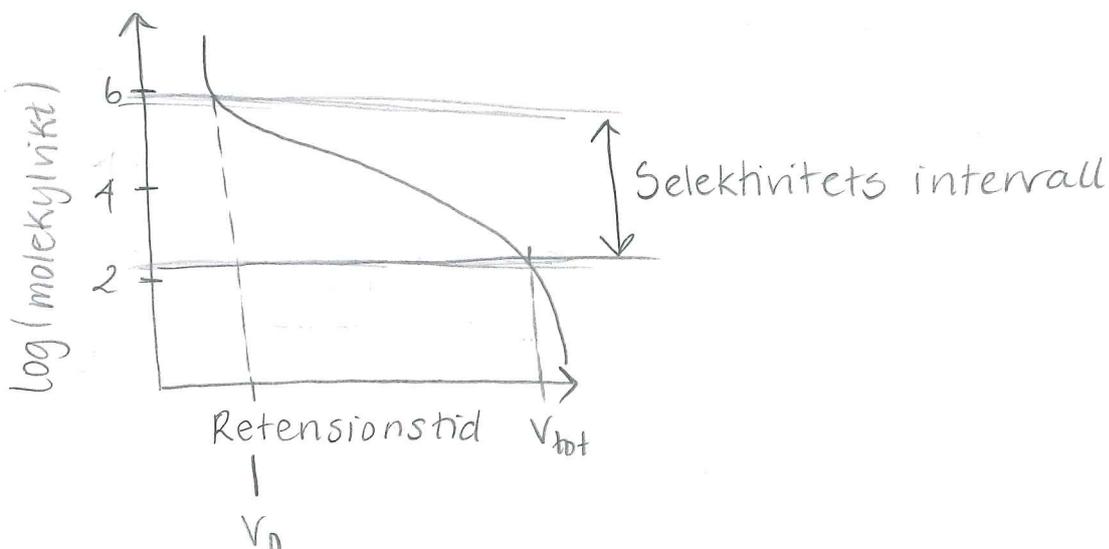
$$V_r = V_o$$

För små partiklar där $K \leq 1$

$$V_r = V_o + V_i$$

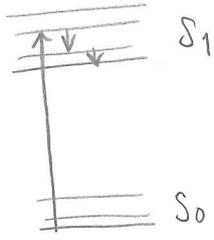
⇒ Stora analyter kommer först
och små kommer sist!

Partiklar separerar ett intervall av molekylstorlekar



Jablonski diagram

1) Excitation $S_0 \rightarrow S_1$



2) Vibrations + rotationsrelaxation
till lägst nivå i $S_1 \rightarrow$ emissionsfri

3) Resterande del av energin kan avges som
strålning av lägre λ än λ_{ex} .

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

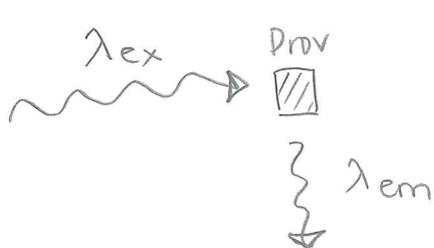
↑ ↑
lägre större

a) Fluorescence $S_1 \rightarrow S_0$ (nanosek - μ sek)

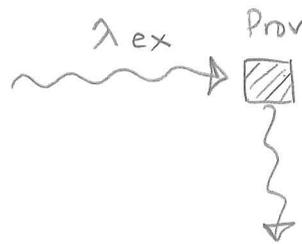
b) Fosforescence intern energiomvandling
 $S_1 \rightarrow T_1 \rightarrow S_0$ (sekunder)

$E_{fluorescence} > E_{fosforescence}$

Fluorescence är ovanligt hos analyter
 \rightarrow fosforescence är ännu mer ovanligt.



Fluorescence



Fosforescence

gynnad av låga T
0, stora molekyler

störst analytisk kemi
t.ex detektor för HPLC,
kapillärfluorescence, fluorometri

* Fluorescence är känslig nog att detektera enstaka molekyler.

I ett prov med 1 fluorescerande analyt:

- minimal interferens
- mäter mot mörk bakgrund
- Fluorescens har mycket lägre detektionsgräns jmf. med absorptionsmätning.

Vid låga koncentrationer: $I_F \propto \text{konc.}$

→ kalibreringskurva.

Excitations spektra: variera λ_{ex}

→ mäter λ_{em} vid konstant våglängd.

Emissions spektra: $\lambda_{ex, max}$ konstant

→ emission mäts vid varierande våglängd.

Kvantitativ analys

Intensiteten för emitterad fluorescence $I_F \propto I_0$

enligt $I_F = k' \cdot \phi \cdot I_0 \cdot \epsilon \cdot b \cdot c$

konstant för effektivitet hos detektor

→ ideala förhållande
konstant
liknar L.B.-lag.

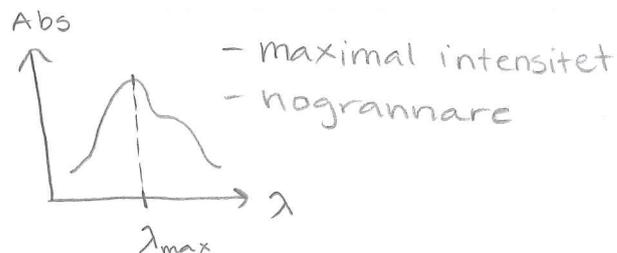
$$\phi = \frac{\# \text{ fluorescerande molekyler}}{\# \text{ totalt exciterade molekyler}}$$

I_0 hög → bra laser

(UV/VIS-lab)

Mätning Spektrofotometer

1) Bestäm λ_{max} -spektra

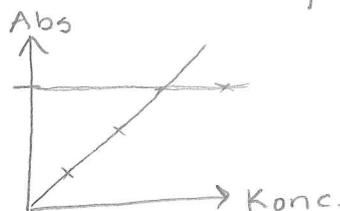


2) Ta fram blank - allt utom analyt t.ex. lösningsmedel, reagens etc.

3) Mät baslinje av blank

4) Mät noll genom att blockera strålgång det. sign = 0

5) Mät standarder och bestäm linjärt område.



6) Mät prov \rightarrow bestäm om spädning behövs.

7) Subtraherar blank från mäträrden för analys.

Hur vet vi om interferens finns i prov?

\rightarrow Analys med standardtillsats metoden.

Dubbelsträlände UV/VIS

Chopper dirigerar strålgång mellan referens o, provkyvett.

1) Baslinje med blank i båda kyvetterna.

2) Blank + prov / förändringar

\rightarrow korigerar för - drift i I_0

- detektorrespons o, våglängd

Lämplig för snabba mätningar - kinetik mätningar

Monokromator

- Gitter
- Prisma
- Filter

- sprider o, fördelar ljus av våglängder o, tillåter endast ett smalt band av våglängder att passera genom spalt till prov i kyvett o, detektor.

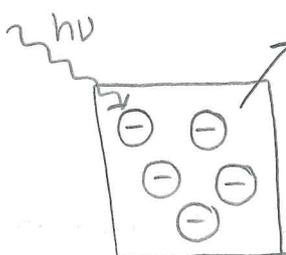
Optimering av spaltbredd

- smal: liten bandbredd (+)
låg ljusintensitet (-)
- bred: stor bandbredd (-)
hög ljusintensitet (+)

Överväga:
- selektivitet
- känslighet

Fototub

Neg. laddad yta



frigör e^-
→ mäta ström

Fotomultiplikator

Atomspektroskopi

- Studerar atomerna i ett prov oberoende vilken vilken kemisk form de befunnit sig i.
- atomerna måste vara separerade från varandra
- prov vaponiseras
- analyter atomiseras (= bryts ner till atomer)

Konc. atomer kan bestämmas genom:

- absorption
- emission
- fluorescence

Absorption

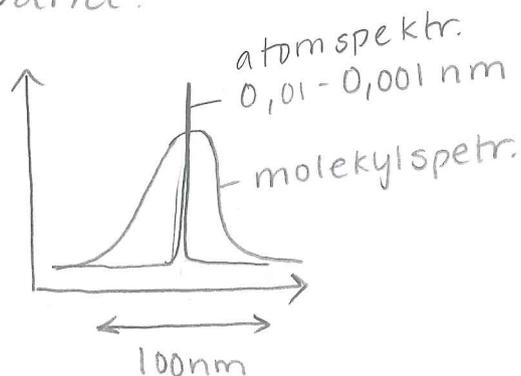
Väldefinierade energiovergångar hos atomer

- specifika absorptionsband.



tillsätta lättare

joniserbart ämne.



- Hålkatod -

Lampa med specifika våglängder för ett ämne
"monokromatiskt ljus"

Innehåller grundämnet som detekteras.

- dessa atomer exciteras i lampan, sänder strålning av samma λ som absorberas av atomer av grundämnet i provet.

⇒ en lampa krävs för varje grundämne

Det finns katodlampor med legeringar.

Introducera prov i ~~flamma~~ flamma: Absorption flamma

- 1) Prov flödar 10 ml/min via förstoftare som → droppar till aerosolkammaren
- 2) Droppar evaporerar
- 3) Förångade föreningar förs in i flamma
o, atomiseras → spendera ~1ms.

Fördelar

- Robust
- Enkel

Nackdelar

- Begränsar område att mäta $0,1 < A < 1,0$
- Stor provvolym \rightarrow ml-ar
- Relativt hög detektionsgräns
konc: μM mängd: fmol

Grafitugn

- 1) Pipetterar liten volym prov $\sim \mu\text{L}$
- 2) Torkning: $\sim 110^\circ\text{C}$ - bort med lösningsmedel
- 3) Organiskt material bryts ner: $T \sim 1000^\circ\text{C}$
- 4) Argon sköljer bort gaser som bildas.
- 5) Atomisering: $T \sim 2000-3000^\circ\text{C}$
 \rightarrow hög konc. fria atomer i ugnen.



- b) Rengör: $T \sim 3500^\circ\text{C}$ + sköljer Ar-gas

Fördelar

- Mkt små volymer
- Låg detektionsgräns

Nackdelar

- Lättflyktiga ämnen kan försvinna
- Svårt att skapa uniforma betingelser
- Prov i kontakt med ugnens vägg bildar karbidler.

Emissions spektroskopi ICP

Argonplasma erhålls genom att argongas utsätts för ett starkt fokuserad högfrekvent radiokälla.

- gnista tändar plasma.

ICP: minst 2-3 ggr varmare än flamma

o, graditugn ~ 6000-10000 K.

→ Tillräckligt varmt för att excitera de flesta element o, eliminera interferens som ofta förekommer i flamma eller ugn.

Standardaddition

prov

P P P P

0 2 4 ... 10 ← addera
analyt
vi mäter
på.

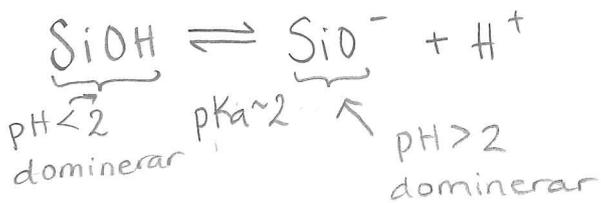
Standardkurva

- standarder

Föreläsning Analytisk kemi lv 6 4/10-10

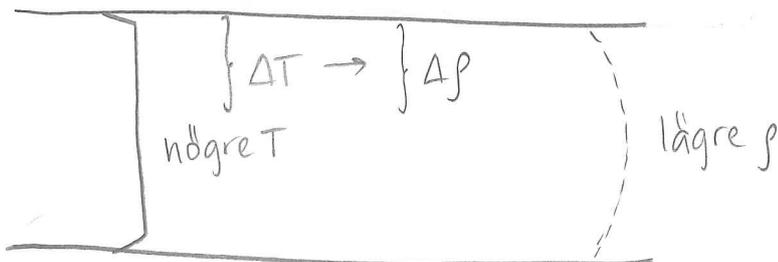
Den enklaste formen: kapillär zon elektrofores.

- kapillär fylld med buffert
- kapillärändar stoppas i välar o, applicerar ett elektriskt fält.
- elektroforetisk mobilitet.
- elektroosmotiskt flöde
- analyter separeras med avseende på nettomobilitet som beror av _____



I jämförelse med HPLC så är N oberoende av L .

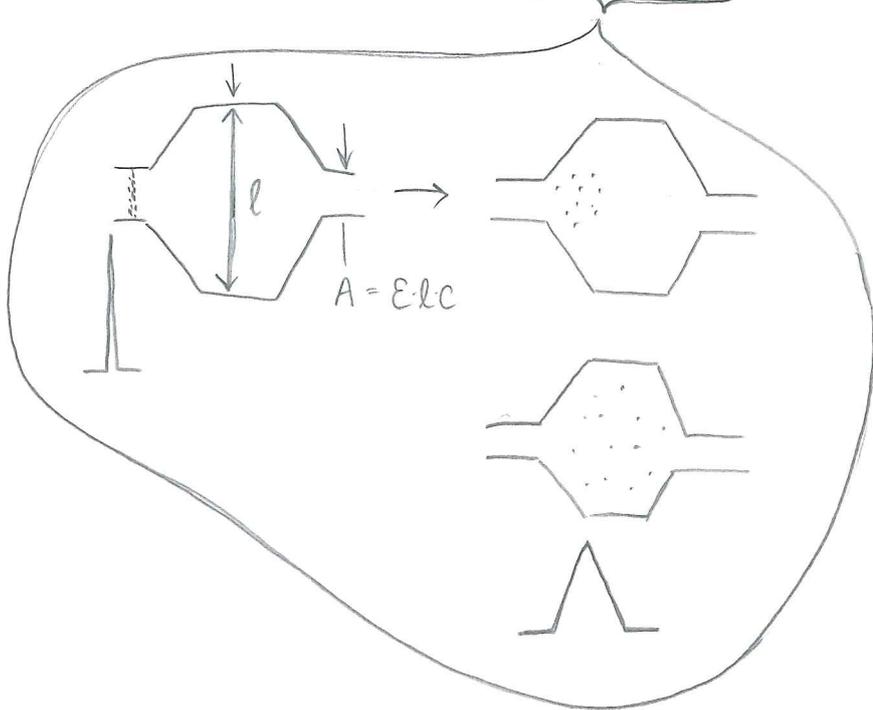
$$\text{HPLC: } N = \frac{L}{H}$$



värmeutveckling
som orsakar
parabolisk
temp. profil.

Källor till bandbreddning:

- Storlek injektionsband
- Parabolisk flödesprofil från värmskillnader i kapillären.
- Adsorption på kapillärväggen.
- Detektorvolym - dödvolymer.



Injektion - liten provvolymer $\sim 1-10$ nl

Totalvolymer $\sim \mu\text{L}$

Elektrokinetisk: - diskriminerande

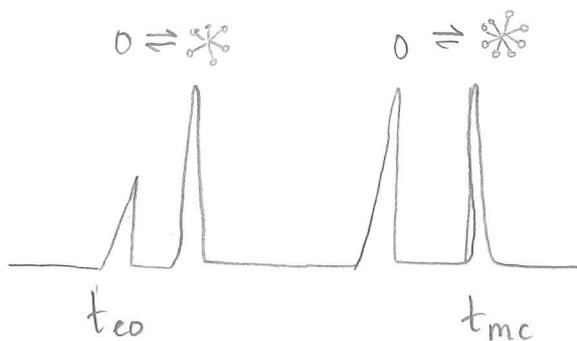
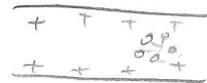
injicerat prov har ej samma
sammansättning som ursprungligt
prov. \rightarrow beror av μ_{net} (μ_{app})

Används ofta i gelelektrofores
vid analys av peptider, DNA etc.

Indirekt analys:

- Fluorescence
- UV-detektion
- Amperometri
- Konduktinitet.

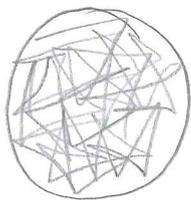
MECK - använder miceller som pseudo-stationärfas.



$$C \cdot u_x \neq 0$$

ofta snabba förlopp
så $C \cdot u_x$ är liten.

t_{co} int. ej neutral
följer med u_{co} ut först



Kapillär gelelektrofores

- Elektrofores
- Filtrering m.a.p. storlek
- små fragment snabbast
- laddning storlek. små först

Lab on a chip

- Kemisk fallanalys på ett integrerat chip.
- Injektion
- Provrupparbetning
- Separation.

Ofta internstandard:

- osäkerhet i injektions volym
- temperaturskillnader under analys
- adsorption / desorption.

Föreläsning Analytisk kemi lv 7 11/10-10

Most widely used techniques

- Biosensors
- Glucometer (glucose)
- Urea Analysis
- Soil testing
- Oxygen sensor (Clark Electrode)

Resting human

- Uses $\sim 0,2$ l O_2 / min
- ~ 9 mmol O_2
- ~ 36 mmol electrons / min
- $\rightarrow 60$ Amperes

Standard Cell and Reduction Potentials

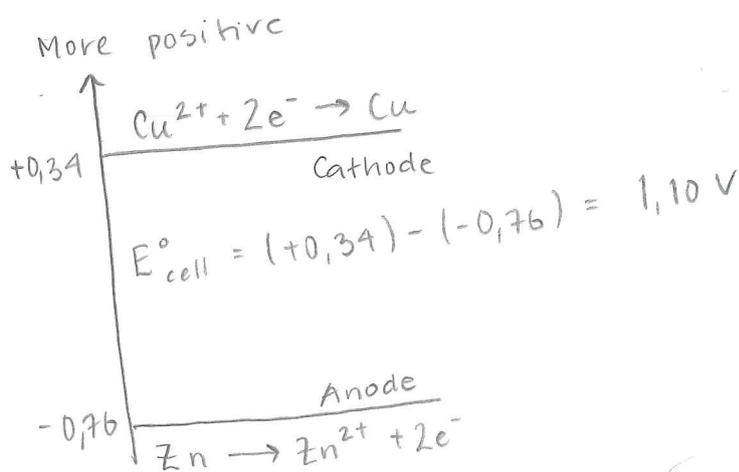


Cell potential at standard conditions

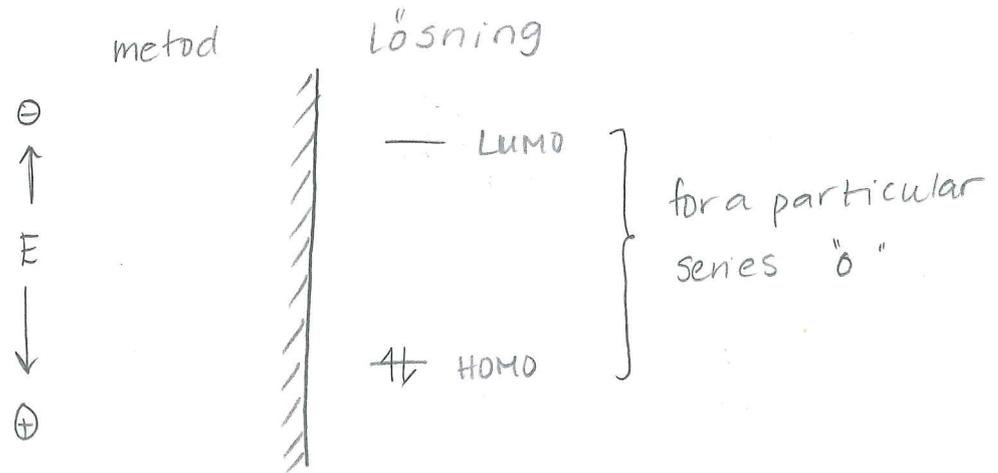
$$E^\circ_{cell} = E^\circ_{red}(cathode) - E^\circ_{red}(anode)$$

$$= +0,34 V - (-0,76 V)$$

$$= +1,10 V$$



Reactions at electrode interface (half cell)



FREE ENERGY

$$\Delta G = -nFE$$

↑ Faraday konstant



$$\Delta G^{\circ} = -nFE^{\circ} \quad [z=n]$$

$$aA + bB \rightleftharpoons cC + dD \quad \Rightarrow \quad Q = \frac{C^c D^d}{A^a B^b}$$

$$\Delta G = \Delta G^{\circ} + RT \ln Q$$

$$-nFE = -nFE^{\circ} + RT \ln Q$$

$$\Rightarrow E = E^{\circ} - \frac{RT}{nF} \ln Q$$

$$E = E^{\circ} - \frac{2,303 RT}{nF} \ln Q$$

$$25^{\circ}\text{C} \quad (298 \text{ K}) \quad \frac{2,303 RT}{nF} \quad 0,059$$

Föreläsning Analytisk kemi lv 7 13/10-10

Absolut o, Relativ osäkerhet

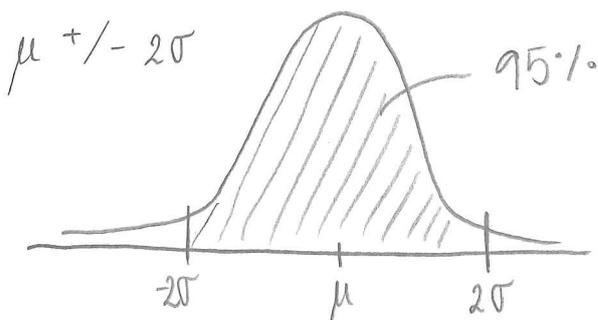
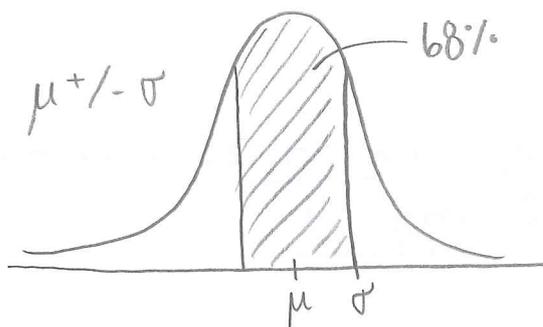
- Absolut osäkerhet = relaterad till mätning
t.ex. känslighet på analysväg $\pm 0,0001$

- Relativ osäkerhet = $\frac{\text{absoluta osäkerheten}}{\text{omfattning av mätvärde}}$

t.ex. väga 10 mg prov Rel. os = $\frac{0,0001}{0,010} = 1\%$

väger 100 mg prov Rel. os = $\frac{0,0001}{0,100} = 0,1\%$

Area under Gaussisk kurva



- Extern standard \rightarrow vanlig standardkurva
- Intern standard
- Standard addition

Hur fungerar dom o, när används dom.

- GC - sep. med arseende på stat. fas o, kokpunkt.
- Stor volym använder ej kapillär elektrofores.
- UV - konjugarand dubbelbindningar.
- Polär molekyl → ej flyktig → ej GC

Fe i havsvatten

- Jonbyteskromatografi - hög salthalt - stör
- Spektroskopi - binder Fe till ligand.
- Elektrokemi - Potentiometri
- Atomabsorption - halkatödlampa för Fe
- ICP - MS

Små organiska aminer o, ammoniak i vatten från ett oljeraffinereri? (mg/l)

- HPLC - Filtrera
- Kapillär Interfores - analysera direkt

Klorofyll i ^{havs-}vatten

- UV / ev fluorescence
extraktion (separation) av klorofyll från plankton
solid phase extraktion → bli av med biologiskt material.
- HPLC - bara extraktion - liten organisk molekyl.

Cytostatika (cellgifter) i blodplasma

- Provrupparbetning: Ta bort blodkroppar - centrifugering
Gel filtration tar bort proteiner
- (Affinitetskromatograf - binder till receptor)

Detektion : UV-detektion

Spektrofotometri : Standard addition som kalibrering

HPLC o, CE o, om analyten är neutral → micellkromatografi.

CD i bilavgaser

GC - MS

Polyklorerade bifenyler i sediment

Det: UV

Extrahera - organ

HPLC - reversed phase

Kviksilver i gädda

Atomabsorption - Hg hållkatodlampa

Hg extraheras i syra.

("Ashing" eldar upp gäddan o, får kvar Hg.)
bra vid andra metaller.

Bly i vin

Atomabsorption - Blykatod lampa.

- surgör vinet.

Elektrokemi - Potentiometri

