

ANALYTISK KEMI SAMMANFATTNING

1. Den analytiska processen

Huvudstegen

1) Definiera problemet - Vad vill man mäta
kvantitativt / kvalitativt
nurmkt vad

2) Val av metod - Typ av prov, vilken mängd
upparbetning

3) Erhålla representativt prov -

Homogent

Samma sammansättning
oavsett var du tittar
→ hur stort är provet

Heterogent

Segregerat. Större
ansamlingar på vissa ställen
→ massa prov

10x10 cm bitar



Random

Olika sammansättning helt
random inga större ansamlingar
Bestäm antal slumpartade delprover

4) Provupparbetning

- Vätska, gas, fast?
- Extraktion, separation, späda, koncentrera, derivatisera?

5) Kemisk separation

Utfällning, extraktioner, kromatografi, elektrofores.

6) Utföra mätning

Kalibrering, validering
Kontrollprov, blankprov

Validering { Kolla linjaritet, känslighet, mätområde,
matriseffekter etc.
När: ny metod, förändrad metod, avvikande resultat

7) Utvärdera resultat

Statistisk analys, rapportering med noggrannhet
från analys.

Provberedning och förvaring av prov

- Fast, lösning eller gas
- Lösa upp provet
- Kemisk sep.
- Maskering av interferens
- Vilka halter förväntas
- Koncentrera/späda
- Derivatisering
- Justering av lösningens egenskaper t.ex pH, salthalt

Förvaring:

Plast	- metaller	b mån
Glas		
Teflon	- aromater	2 veckor
Aluminium	- fisk	liten tid.
	kyla	

Provberedning

Vågning - Torkning - Mätning - Malning - Mixning
Uplösning - Dekantning - Filtrering - centrifugering
Förångning - Kristallisering - Utfällning - Extraktion
Jonbyte - derivatisering - koncentring.

Vanliga instrumentella metoder o, nödvändiga
provberednings steg:

Förening	Provberedning	Metod
Organiska	Extraktion, koncentring	Kromatografi GC, LC, GC/MS LC/MS
LdH flyktiga organiska	Gör till ånga, koncentring	Kromatografi GC, GC/MS
Metaller	Extraktion, koncentring	AA, Molekylspektroskopi
Joner	Extraktion, koncentring derivatisering	Jonkromatografi, Molekylspektr.
DNA/RNA	Extraktion, PCR	Kromatografi, Elektrofores
Aminosyror, fetter kolhydrater	Extraktion	Kromatografi, Elektrofores

Eliminera ämnen som stör analys

- Centrifugering eller filtrering: Sep partiklar o, fast material
- Utfällning: Analyt fälls ut. Filtreras, renas o, löses i lösningm.
- Destillering: Ämne med olika kokpunkt sep.
- Extraktion: Kemiska föreningar/grupper isoleras från lösningar, matris eller gaser med hjälp av lösningsmedel.

Vätske-vätske extraktion

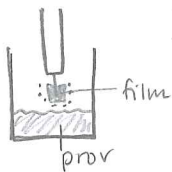
- Två icke-blandbara vätskor - Emulsion
- Extraktions lösning väljs utifrån vad som sep.
 - extrahera organiska polära föreningar → vatten.

Fastfas - Vätskeextraktion - sep. analyt från kompl. matris.

• Solid Phase extraction

Filtreringshållare fiskar ut analyter från komplext prov
Egenskaper hos analyter används för isolering.

• Solid Phase Microextraction



Koncentrera flyktiga, halvflyktiga, icke-flyktiga.
Rena prov innan GC.

Selektivt extraherar ut flyktiga föreningar som har samma egenskaper som filmen på nålen.
(adsorberas till nålen)

• Superkritisk vätskeextraktion

Ämne utsatt för P o, T över termodynamiska kritiska punkten. En gas o, vätska samtidigt
Diffusion likt gas o, löser upp likt vätska.
 CO_2 vanligt att man använder.

Kammare med högt P . Till extraktet sätts ett lösningsmedel som blir kvar då P sänks o, superkritiska vätskan blir gas.

Ger rena extrakt, snabb on-line HPLC, GC
Går åt små mängder lösningm.

Analysmetod: Föroreningskällor / validering

Föroreningskällor

- Provrinsamling: Utrustning, bågare, hantering
- Transport: Bågare, kontaminering från andra prov
- Provrupparbetning: Instrument, hantering, homogenisering
- Analys: Reagens, Instrument.

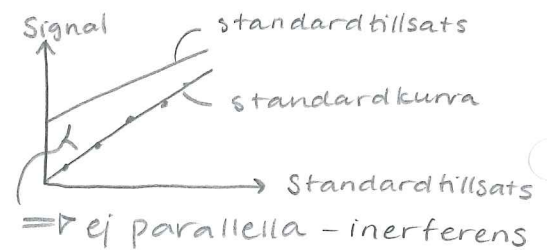
2. Kalibrering

Extern standard

- Standard lösningar med känd koncentration analyt
- Samma lösningsmedel som prov.
- Veta vad man har inom det linjära området.

Standardtillsats (blod, havsvatten)

- Om prov har annan matris än standarder.
- Mäter signal från delprov. Delar upp prov i delprover.
- Tillsätter känd mängd standard (ändrar ej matrisen)
- Mäter signal efter varje tillsats
- Plotta o, extrapolera



- ⊖ Tidskrävande - ny kalibrering för varje prov.
- ⊖ Kontroll av interferens i prov - begränsning

Internstandard

- Känd mängd förening som tillsätts prov o, standardlösningar som inte är samma förening som de analyserade analyterna.
- Kompensera förluster vid provupparbetning t.ex spädningar, reaktioner, extraktioner.

KRAV: Likna provet, ej reagera med provet, finns med under hela upparbetningen, måste kunna separeras från analyten, detekteras med liknande respons, eluera samtidigt som analyterna

$$\frac{A_{is}}{C_{is}} F' = \frac{A_x}{C_x}$$

Split/splitless
olika injiceras varje gång

3. Separationer

- Kapacitetsfaktor: $K' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$ $K' < 1$ för snabb eluering
 $K' > 10$ för långsam — " —
 K' mellan 1,5 bra!

- Fördelningskonstant: $K = \frac{C_s - \text{stat. fas}}{C_m - \text{mobil fas.}}$

Större $K \rightarrow$ lägre t_R

- Mobilfas - lösningsmedel eller gas
- Stat. fas - kolonnmaterial: fast fas

- Separationer sker pga att analyter i den mobila fasen interagerar med den stationära fasen i olika grad.

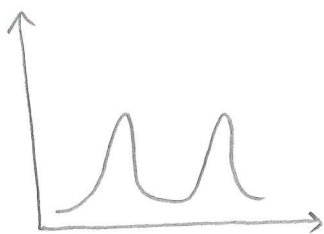
$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} (\gamma - 1)$$

Kvantitativt (hur mkt) kolonnen förmår att sep. två analyter.

- Interaktion för separation

- Fördelning
- Adsorption
- Jonbyte
- Filtrering (storlek, små kommer in på småvägar)
- Affinitet.

- Kromatogram



Långt ifrån 0, smala toppar - bra!

Topphöjd/area är proportionellt mot konc.

Mobilfasens hast: $u = \frac{L}{t_0}$

Migrationshast: $v = \frac{L}{t_R}$

Utvärderar topp med avseende på:

$t_R, h, w, w_{1/2}$
↑ ↑
höjd bredd

- Selektivitet $\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$

mätt på separation ska vara ganska stort.

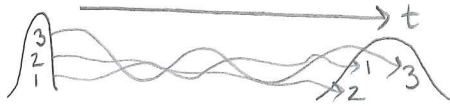
• Van Deemter ekvation

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (\text{vill ha litet } H)$$

↳ bottenhöjd

(A) Multipla vägar = analyter kan ta olika lång väg genom packad kolonn.

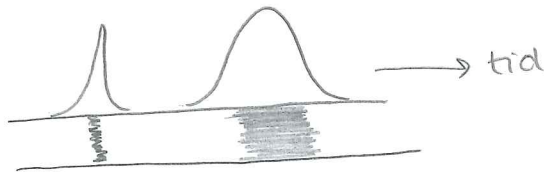
bandbreddning oberoende av mobilfastflödet
- ändå lika många vägar att välja mellan.



(B) Longitudinell diffusion = analytens förmåga att diffundera under flödet. Påverkas av mobilfasens egenskaper o, hast.

Ökat flöde → mindre B

Långsamt flöde → analyten hinner diffundera mer
→ bandbreddning.



(C) Masstransport: Beror på hur analyten jämviktar med stationärfasen o, mobilfasen.
Analyter som jämviktar med stat-fasen "halkar efter".

Bandbreddning ökar då mobilfastflödet ökar.

Snabbt flöde → jämvikt går långsamt - inte bra!

↳ Snabbt flöde → analyten löser sig i stat-fasen o, halkar efter flödet.

Lågt flöde förhindrar detta då jämvikt hinner ställa in sig.

• Kolonneffektivitet: $N = L/H$

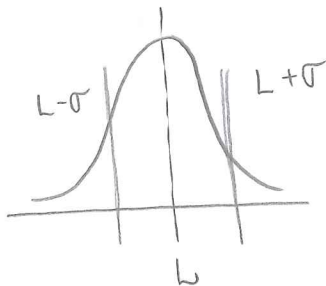
H = bottenhöjd N = antal bottnar L = kolonnlängd.

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

Kolonnens effektivitet ökar
då N ökar.

Gaussisk topp

$$H = \frac{\sigma^2}{L}$$



σ = standard avvikelse

Variabler som påverkar separationseffektiviteten

- Kolonn effekten ökar när N ökar

- Partikelstorlek hos packningsmaterialet

Små partiklar \rightarrow jämnare flöde \rightarrow mindre A
lösningen tar kortare väg.

Jämvikten ställs in snabbare då det är mindre partiklar att diffundera in i
 $\rightarrow C$ minskar.

(- Filmtjocklek (öppen kolonn i GC) ?
minskad filmtjocklek \rightarrow mindre H \rightarrow större N)

- Mobilfasens viskositet

minskad viskositet \rightarrow mindre H \rightarrow större N

- Kolonn längd \rightarrow högre N alltså bättre
upplösning/separation

HPLC vs GC

- H mindre i HPLC mkt längre i GC
 N blir större för GC.

4. HPLC och GC

GC

Analyt: gas eller flyktig vätska

- Stationär fas: Ofta icke-flyktig vätska, ibland fast fast

Mobilfas: Bäringsgas

film
högkokande vätska
fördelning: lika löser lika

adsorption
silika, kol
låg molekylära analyter
→ annars för många toppar
håller ej starkt polära molekyler.

- Mobilfas: Bäringsgas: endast transportmedel. ex He, N₂, H₂
Inert

- Separation i GC baseras på:

opolar Stat. fas → Analyternas flyktighet, ju lägre kokpunkt → lägre t_R.
 polär Stat. fas båda två → Fördelningskonstanten, $K = \frac{C_s}{C_m}$ ju större K → högre t_R.

- Olika typer av kolonner

- Packade kolonner: Fyllda med partiklar = stat. fas. små
- Öppna kolonner: Stat. fasen sitter på innerväggen.
Kapillär kolonn

Öppen/Kapillär kolonn

Packad kolonn

- Högre upplösning R_s
- Större H och N
- Kortare analysstid
- Högre känslighet
- Mindre provvolym
- Dyrare per kolonn
- Vanligast i GC

- Större provkapacitet
- Längre analysstid
- Enklare analyser
- Kortare längd minskar R_s, N
- Lägre kostnad

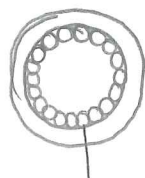
○
Liten ID
- större chans för analyt att "träffa" väggen



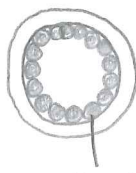
Typer av kapillärkolonn



Stat.
vätske
fas



Fast fas
Stödd med
Stat. vätske fas



Stat.
fast fas
partiklar

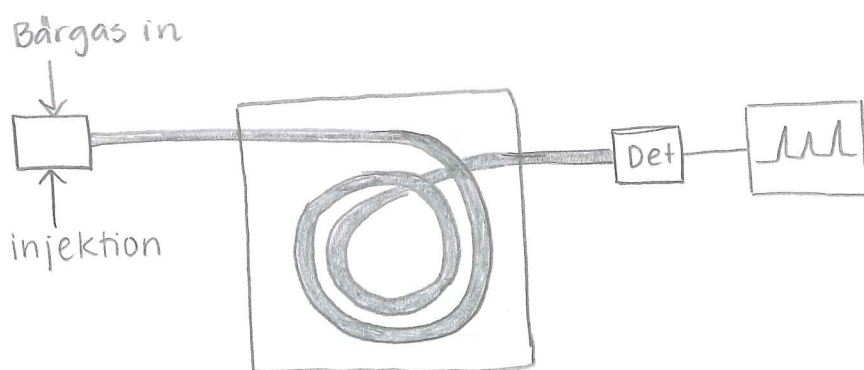
Val av GC-kolonn

- Pölar stat. fas för pölar analyter o, tvärtom.
- Ofta kompromissa stat. fas - blanding av analyter

Ändra sep. i GC - ändra kolonn temp

- Hög T : toppar eluerar samtidigt
- Låg T : toppar separeras men eluerar sent.

Instrument



Split injektion: liten provvolym till öppen kapillärkolonn
Analyt > 0,1%.

Splitless injektion: Lägre konc av analyt med hög kokpunkt
Analyt < 0,01%.

On-kolonn injektion: Temiskt instabila analyter i lösningsm.
med hög kokpunkt.
Bra för kvantitativ analys.

Split - analyt förs in i kraftigt upphettad kammare där bärgas
strömmar igenom. En liten del går till kolonn medan
resten går till slask.

splitless/on kolonn - lösningsmedel med analyt som en film i början
av kolonn. Värms upp försiktigt.

HPLC

Analyt - lcke-flyktiga föreningar

Organiska, oorganiska o, biologiska.

- Stationär fas: Partiklar med eller utan ytfunktionella grupper
- Mobilfas: Vätska

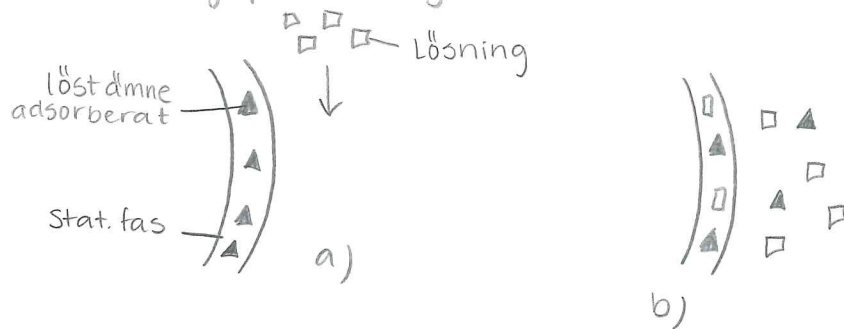
Separation i vätskekromatografi

- Analyter har olika jämviktskonstant för interaktion mellan mobilfas och stat.fas.

$$K = C_s / C_m$$

- Interagerar olika mkt → olika medelhast.
- Separeras.

Elueringsprocess genom kolonn



• Adsorption / Fördelningskromatografi

- Normal phase vs Reverse Phase

- Normal phase — Lösningssm: organiska, hexan

Polar stationär fas

Opolar mobilfas

Mer polära analyter

} elueringstyrkan ökar
med ökad andel
polar mobilfas

- Reversed phase — Lösningssm. vatten, MeOH

Opolar stationär fas

Polar mobilfas

Mer opolära analyter

} elueringstyrkan ökar
med ökad andel
opolar mobilfas.

Olika typer av kolonner - packade kolonner

Typer av LC:

bara packade kolonner

• Kolonnkromatografi

- mobilfas flödar mha gravitation genom fylld kolonn med partiklar (150-200 μm i D)

• Tunnskikt-kromatografi

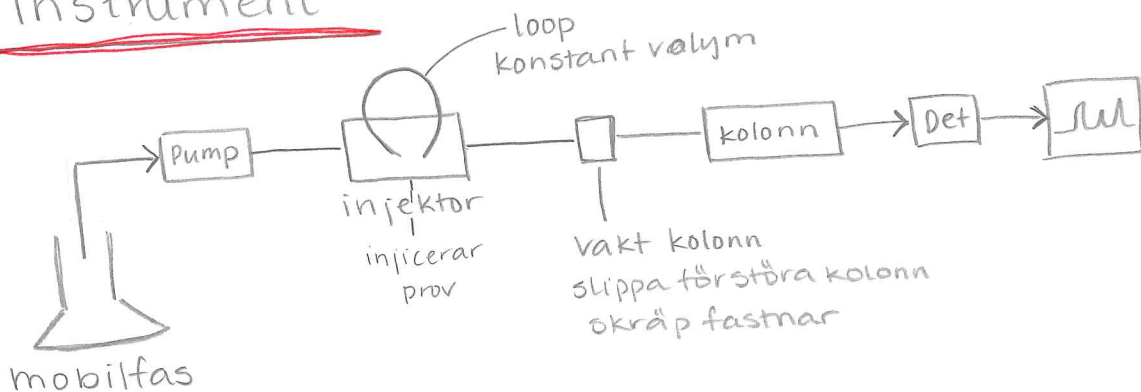
- mobilfas drar sig uppåt i tunn stationärt film mha kapillardkraft. sep - interaktion med stat.fas.

• HPLC

- mobilfas pumpas mha. höga tryck genom kolonn fylld med små partiklar (3-10 μm i D)

- Packade kolonner

• Instrument



Kommentar på bärgasen i GC

→ N_2 - lågt η dock höga flöden

→ He - hög diffusinitet av analyt - snabbt utbyte
→ högre flöde.

H_2

H_2 o, He är små molekyler → bättre diffusion.

Elueringsprocessen

HPLC: Analyten "tävlar ut" mellan mobilfas o, stationärfas. I vilken som analyten löser sig i

GC: Lättflyktigt ämne kommer ut först i opolär stationärfas.

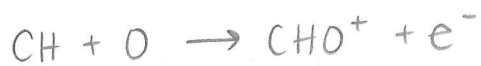
Om opolär stationärfas så elueras analyterna med avseende på kokpunkt o, polaritet.

Tumregel vid opolär stationärfas:

- 1) Mättade kolväten
- 2) Ketoner
- 3) Alkoholier

Detektorer

GC Flame Ionization detector (FID)



- Bildning av joner o, elektroner detekteras av elektroder i detektorn som en ström.
- Signalen är proportionell mot antalet kolväten
- Linjär i område 10^7
- Bara kolväteanalyser! Okänslig för ickekolväte analyt.
- Destruktiv mot analyt.

Termisk konduktivitetsdetektor (TCD)

- Bärgasen har känd termisk konduktivitet.
 - När analyt eluerar ändras den termiska konduktiviteten o, mäts som förändring i resistans i filamentet.
 - Universell
 - Icke-destruktiv
- Ädelgaser!

Mass-spektrometer

- Passar för de flesta analyter
- Kör in gas så den passar bra för GC.
- Dyr!

Electron capture

- Halogener, konjugerade

Jod

Brom

Klor

Fluor



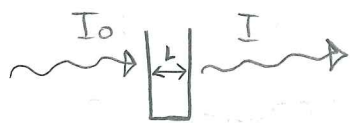
mkt specifik.

HPLC

UV/VIS-detektor

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

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = -\log(T)$$



Ökar $l \Rightarrow$ högre känslighet

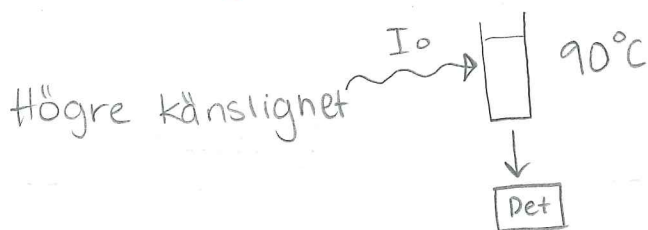
Filter: En våglängd

Monokromator: Varierande våglängd

Photodiode Array: Multipla våglängder

Fungerar bra vid konjugerade dubbelbindningar.

Fluorescence



Kräver att analyten fluorescerar (derivatisering)

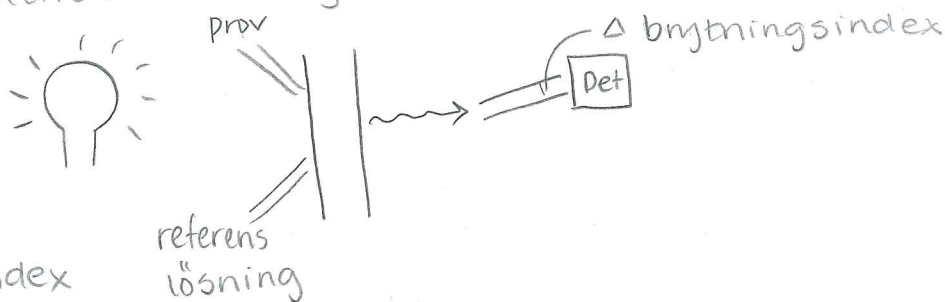
Elektrokemisk detektion

Oxidation/reduktion

För varje molekyl som oxiderar $\rightarrow e^- \rightarrow$ mäta strömmen

Reflektions detektor

- Känner igen många typer av analyter
- Har låg känslighet
- Ej vid gradientändring av kons.



Olika

brytningsindex

referens

lösning

Faktorer som påverkar upplösning

- GC:
- Ju mindre innerdiameter hos kapillär desto högre upplösning
 - Upplösning (R_s) ökar med kolonnlängd.
 - Valet av mobilfas påverkar upplösningen.
dvs bärgasen $\rightarrow N_2$ - lågt flöde, lågt H
 $He, H_2 \rightarrow$ jmv ställer in sig
snabbare \rightarrow kan ha
högre flöde och liten cu .

- HPLC:
- Ökad kolonn längd
 - Minskad kolonn diameter
 - Minskad flödes hastighet
 - Jämnt packad kolonn
 - Jämn stationärfas
 - Minskad provvolym
 - Val av bra stat.fas/mobilfas
 - Val av bra tryck
 - Gradient utvring
- Ökar upplösningen.

Absorptionsspektrometri o, Atomspektroskopi

Lambert Beers lag

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c \quad A = -\log(T) \quad T = \frac{P}{P_0}$$

c - analytens konc.

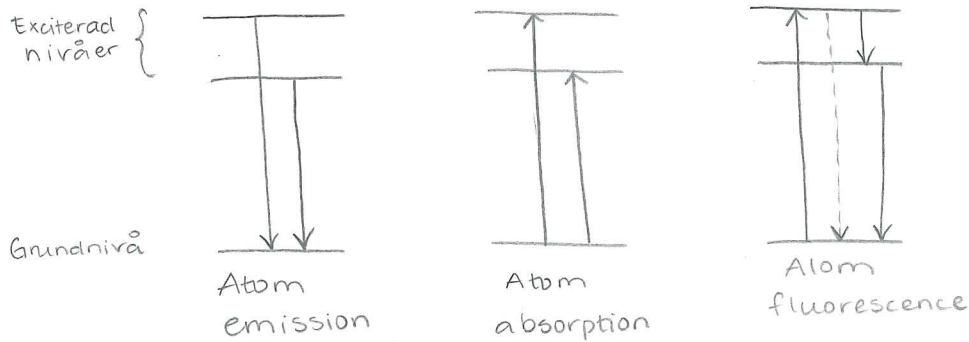
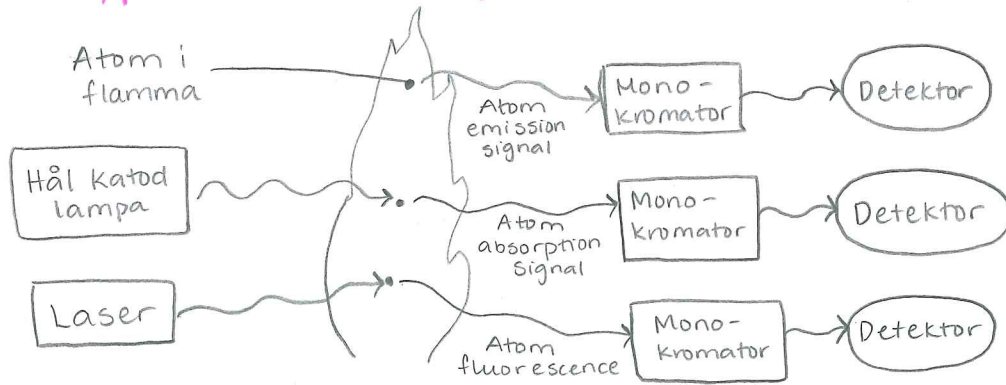
l - kyvettlängden

ϵ - molar absorptivitet ($M^{-1} cm^{-1}$)

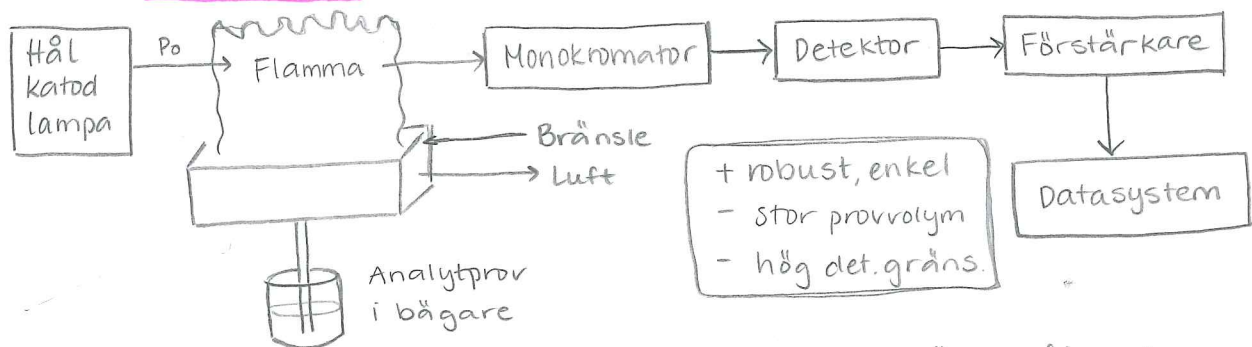
Gäller vid: monokromatiskt ljus
låga konc. av analyt

ϵ varierar med våglängden.

Typer av atomspektroskopi



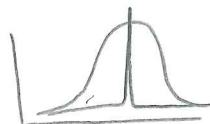
Atomabsorption



Prövet introduceras genom att flöda in i en förstoftare som för in prövet i form av droppar till en aerosol kammare. Här evapoeras dropparna, en liten del av prövet förångas, förs in i flammen, atomiseras.

Hålkatodlampan innehåller samma grundämne som analyten man analyserar. Dessa atomer exciteras i lampan, emitterar ljus av specifika mkt smala våglängder för grundämnet som absorberas specifikt av atomiserade analyter av samma grundämne i prövet när de befinner sig i flammen. Absorbansen detekteras.

Absorption - väldefinierade energiövergångar hos atomer
- specifika absorptionsband.



Istället för flamma:

Elektrokemisk absorption - Grafitugn.



Organiskt material bryts ner
Argon sköljer bort gaser som bildas.

- + Mindre volym
- + Låg detektionsgräns
- Dålig för lättflyktiga
- Kan reagera med ugnens väggar
- Svårt att skapa uniforma betingelser

Emissions spektroskopi (ICP)

Argonplasma erhålls genom att argongas utsätts för ett starkt fokuserat högtrekrent radiokälla
- gnista tändar plasma

ICP: minst 2-3 ggr varmare än flamma, grafitugn.
6000 - 10000 K

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

ICP kan mäta mycket känsligare.

Atom-spektroskopi

- Studerar atomerna i ett prov oberoende av vilken kemisk form de befunnit sig i
- Atomerna måste vara separerade från varandra
- Prov vaponiseras
- Analyter atomiseras

Atomiseringsmetod	Temp ($^{\circ}$ C)	Spektroskopi
Flamma	1700-3150	Abs, Em, Fluor
Elektrotermisk	1200-3000	Abs, Fluor
Inductively coupled plasma	6000-8000	Em, Mass

5 typer av kromatografi

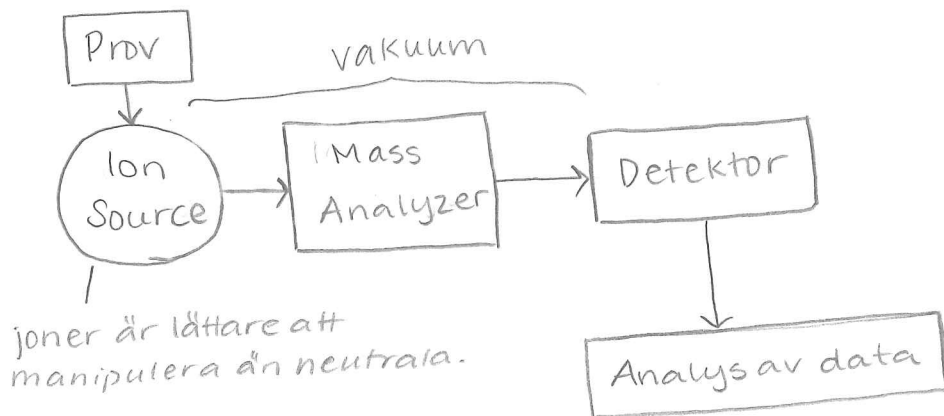
- 1, Fördelning - löser sig i
- 2, Adsorption - jmv med yta
- 3, Jonbyte
- 4, Affinitet - handen i handsken - kovalent
- 5, Storlekstördelning

Masspektrometri

Fördelar i jämförelse med andra detektorer

- Bestämmer molekylvikt från ett litet prov
- Involverar inte absorption, emission av ljus.
- Bra vid analys av rena föreningar
- Det. gräns bättre än vid optiska metoder
- Enkelt spektra - unikt, lätt att tolka.

Uppbyggnad av masspektrometer



Ion Source: Produktion av joner från provet

Analyser: Separation av joner med olika massor

Detektor: Detekterar antalet joner för varje massa som produceras, m/z .

För in molekylerna i gasfas. Jonisera molekylerna som går in i gasfasen. Separera joner med avseende på deras massa eller snarare massa-till-laddning (m/z)

Mät mängden joner för varje m/z .

Vakuum: fås med pumpar används eftersom joner är mkt reaktiva

Jonisation

Molekyler som förs in i gasfasen utsätts för en energi som är större än jonisationsenergin \rightarrow frigör e^- \rightarrow radikal kation

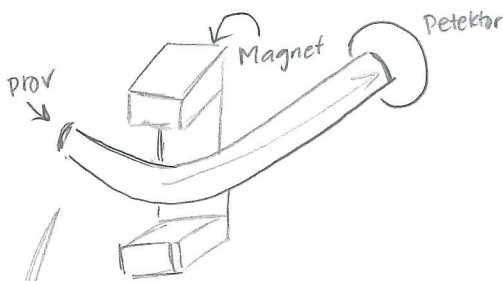
- Små molekyler - Electron Impact
Kollisioner med elektroner
Strålar med e^- , måste vara stabila
- Stora molekyler - Matrix assisted Laser Desorption and Ionisation (MALDI)
Laser
Sott jonisation teknik
analys av känsliga biomolekyler

Mass Analyzer

Separerar joner med avseende på deras massa-laddnings förhållande m/z .

Upplösning: Trå toppar $m_0, \Delta m + m \rightarrow \frac{m}{\Delta m}$

Separering av joner: Katjoner stöts bort från det magnetiska fältet.

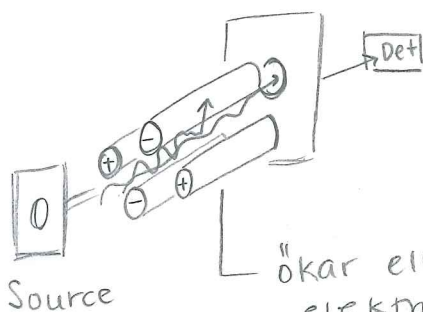


Hur mkt det stöts bort beror på $\frac{m}{z}$.
Detektorsignal \propto joner som slår i den
Varierar det magnetiska fältet för att detektera alla joner.

Olika typer av Mass Analyzer

- Magnetic Sector
- Time-of-Flight
- Quadrupole
- Ion Trap
 - Quadrupole Ion Trap
 - Fourier Transform Ion-Cyclotron Resonance.

Quadrupole



Jonerna åker mellan "rods".
Elektriskt fält sep. joner.
Joner utsätts för komplexa krafter
Endast vissa joner når detektorn.

"ökar eller minskar
elektrod styrkan.

Detektorer

De Detektor 1: Detekterar den inducerade laddningen då jonen åker förbi eller slår mot ytan

- Electron Multipliers (EM)
 - Vanligaste detektorn
 - Kan detektera både pos. o, neg. joner
- Jon slår mot ytan \rightarrow ger ifrån sig e^-
- Faraday Cup

Detektor 2

- Microchannel Plate

Kalibrering - Måste kalibrera mass spektrometer
kan göras med känd förening

Hög upplösning i MS

GC passar bra med MS.

GC-MS, LC-MS, MS-MS o, CE-MS

Nackdelar

- Dyra instrument jmf m. optiska metoder

7. Elektrokemi

Baseras på elektiska egenskaper hos en analytlösning
i en elektrokemisk cell.

Fördelar jmf med andra metoder

- Relativt billigt
- Enkla instrument
- Snabb analys
- Hög känslighet

Oxidation: Ger ifrån sig e^-

Reduktion: Tar upp e^-

Elektrod: Electrical double layer.



Referens elektrod: Ha en stabil potential
som andra potentialer kan mätas mot

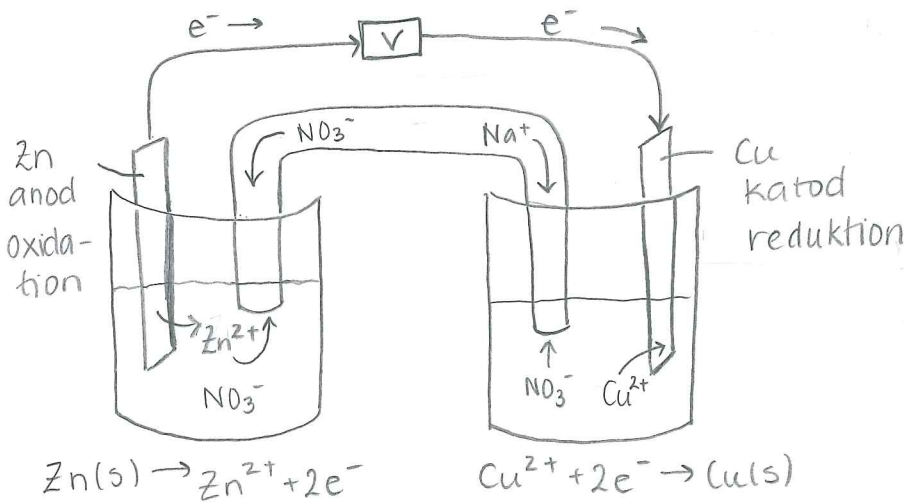
$H_2 \rightarrow 0$ - kränglig

Använder nu andra t.ex Ag/Cl

Galvanisk cell:

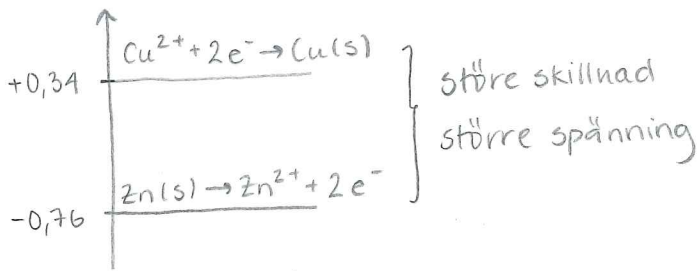
Spontan oxidation-reduktion reaktion

$\rightarrow e^-$ transporteras \rightarrow energi bildas



Electromotiv Force (emf)

Elektroner flödar spontant
en väg i en redoxreaktion
Från hög → låg
potentiell energi
 e^- flow →
← current flow
ström



Nernst ekv.

Hela cellen:

$$E_{\text{cell}} = E_{\text{cell}}^{\circ} - \frac{RT}{zF} \ln Q$$

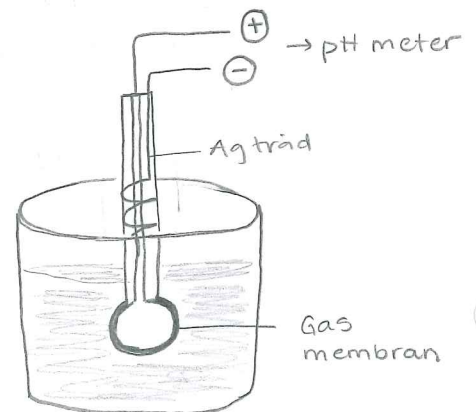
Typer av elektrokemiska analysmetoder

1) Potentiometri

- pH-elektroden
- Ionsselektiva elektroder dvr vanligt
- Plockar endast upp en specifik jon
- Har ett membran som kan binda endast till den önskade jonen.
- Ingen redoxprocess

Elektrod potentialen def:

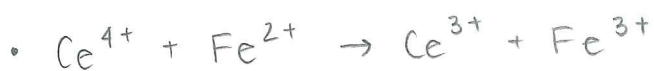
$$E = \text{konstant} + \frac{0,059}{n} \log [C^+]$$



2) Coulometri

- Mäta en okänd konc. av analyt i en lösning genom att fullständigt konvertera analyten från en oxidationsnivå till en annan.
- Kräver ingen kalibrering
- Använder ett konstant strömflöde → mätt mängd laddning

Fe^{2+} via Ce^{3+}/Ce^{4+}



8. Jonkromatografi o, Kapillärelektrofores

Jonkromatografi - En typ av LC

Typer av jonkromatografi

- Jonbyteskromatografi
- Jonparskromatografi

Andra typer av vätskekromatografiska metoder (HPLC)

- Affinitetskromatografi
- Gelfiltrering

Jonbyteskromatografi

- Anjonbytare: Stat. fas binder \oplus -laddade grupper
- Katjonbytare: Stat. fas binder \ominus -laddade grupper
- Mobilfas: Vattenbaserad (ofta buffert) - (hög konc joner bakgrundsfas)
- Sep. joner o, renar biomolekyler ex protein, DNA, RNA
- Olika jonbytare har olika selektivitet för joner

Faktorer - styrkan på bindning till jonbytare

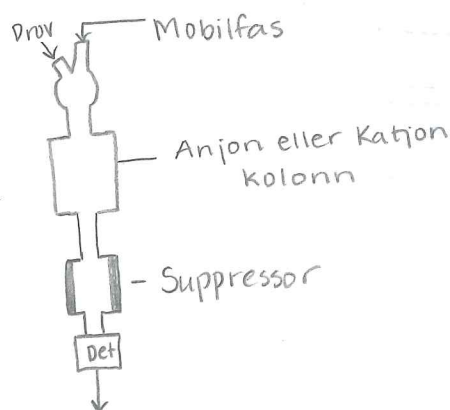
- 1) Laddning ökar \rightarrow starkare
- 2) Storlek på hydratiserad jon minskar \rightarrow starkare
- 3) Jonens polariserbarhet ökar \rightarrow starkare

Eluering: tävla ut analyten

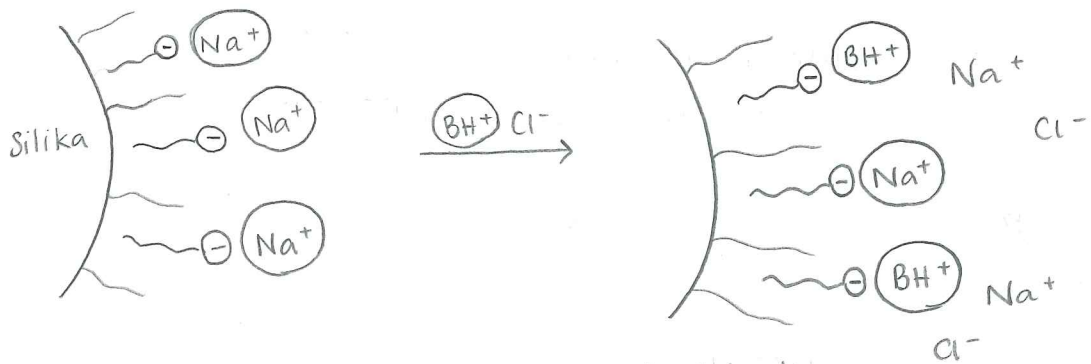
- 1) Höjer jonstyrkan
- 2) Ändrar pH = anjonbytare - öka H^+ - sänker pH
katjonbytare - öka OH^- - höjer pH

Detektor: Konduktivitets detektor - mäter ledningsförmåga

Instrumentellt:



Jonparskromatografi



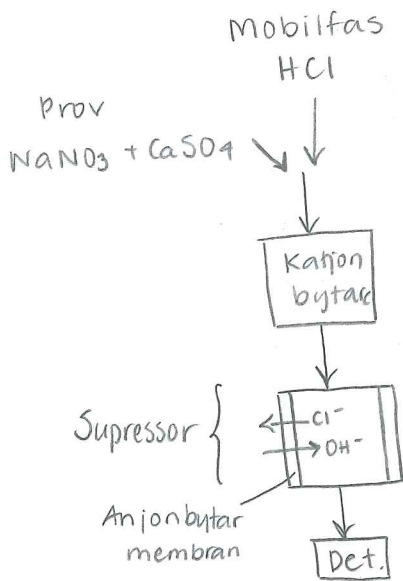
Tensider gör att stat.fasen blir laddad
 → attraherar mobilfasen

• Detektion - Indirekt UV detektion

Mobilfas absorberar lys medan analyter inte gör det.
 Mäter, hur mkt som inte absorberar

Suppressorcell

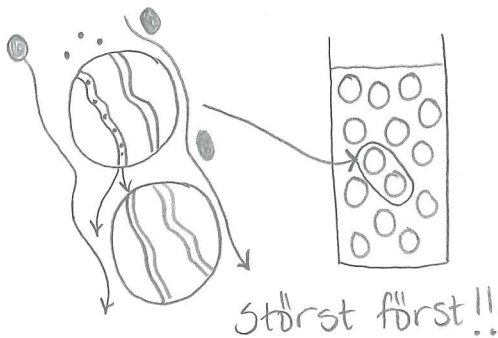
donbytarmembran. På ena sidan leds kolonnflödet förbi innan det går till detektor, på andra sidan en svag svavelsyralösning. Mobilfasens joner kommer binda till analytjoner. För att separera dessa används suppressorcellen. Byter till en jon med låg konduktivitet. → Ingen bakgrundskonduktivitet.



Här kan Cl^- o, OH^- byta sida fritt. Av laddningskål måste lika många joner gå in o, ut.
 Cl^- byts ut mot OH^-

Gelfiltrering - Gelpermeation

Gelfiltrering: Hydrofil mobilfas o, stat.fas
Gelpermeation: Hydrofob mobilfas o, stat.fas



Separation m.a.p storlek
- ingen kemisk interaktion
Separation av makromolekyler
- reningssteg (protein, polymer)

Affinitetskromatografi

- Separationsmetod där en ligand är bunden till stat.fas.
- Liganden binder specifikt till målmolekylen

- ⊕
- Hög specificitet
 - Färre reningssteg
 - Produktproteiner med låg konc. kan renas

- ⊖
- Dyra matriser
 - Få ligander tillgängliga
 - Proteiner ofta låg stabilitet
 - Tuffa elueringsförhållande

Eluering: 1) Sänka pH
2) Ändra jonstyrka - minska bindning till ligand.

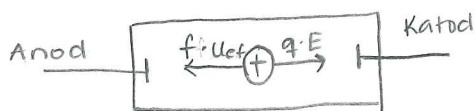
Molekylspektroskopi

$$\nu\lambda = c, \quad E = h\nu, \quad E = \frac{hc}{\lambda} = hc\tilde{\nu}$$

$$T = \frac{P}{P_0}, \quad A = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) = -\log(T), \quad A = \epsilon l c$$

Kapillärelektrofores

Elektroforetisk effekt



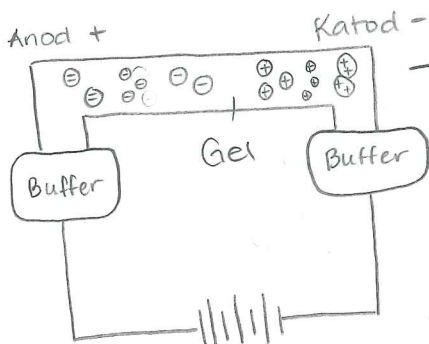
q - jonens laddning
 E - elektrisk fältstyrka
 f - friktionskraft
 u_{ef} - elektroforetiska hast.

Då $f =$ accelerationskraft

$$\rightarrow u_{ef} = \frac{q \cdot E}{f} = \mu_{ef} \cdot E$$

μ_{ef} = elektroforetiska mobiliteten

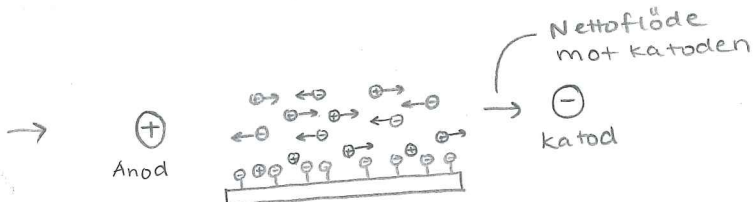
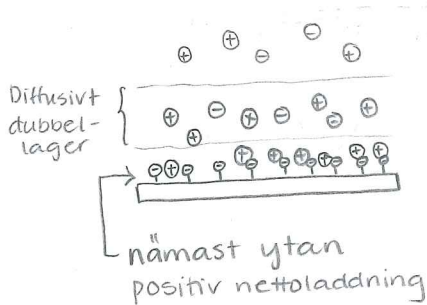
$$\mu_{ef} \propto q$$



Kapillär zon elektrofores

Elektroosmotiska flödet 0, Kapillär zonelektrofores (CZE)

Kapillärens yta av silika är täckt av SiOH



När spänning kopplas på - joner rör sig med elektroforetisk kraft.
 Dubbellagret nära ytan rör sig mot katoden
 \rightarrow drar med sig hela lösningen i kapillären mot katoden.

\ominus -partikel vill till anod med nettoflödet går mot katoden.

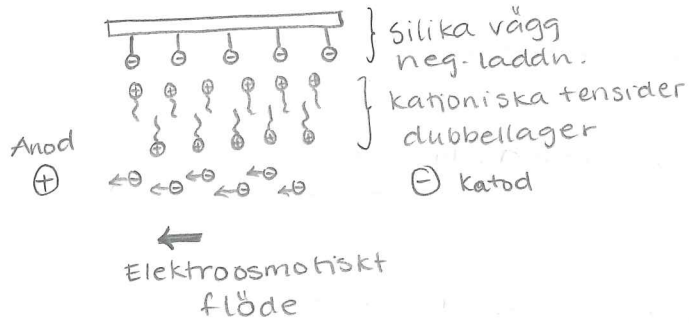
Elektroosmotiskt flöde: $u_{eo} = \mu_{eo} \cdot E$

u_{eo} - hast på elektroosmotiska flödet.
 μ_{eo} - elektroosmotiska mobiliteten
 E - den pålagda fältstyrkan.

Kontroll av elektroosmotiska flödet:

- pH
- jonstyrka
- elektrokemisk potential
- kemisk beläggning på kapillär väggar

Ytmodifiering av kapillärens yta kan ändra flödesriktningen av elektroosmotiska flödet.



Anjoner bildar diffusivt dubbager. Flödet går mot anoden.

Van Deemter vid kapillär elektrofores

$$H = A + \underbrace{\frac{B}{u}}_{\text{longitudinell diffusion}} + C u$$

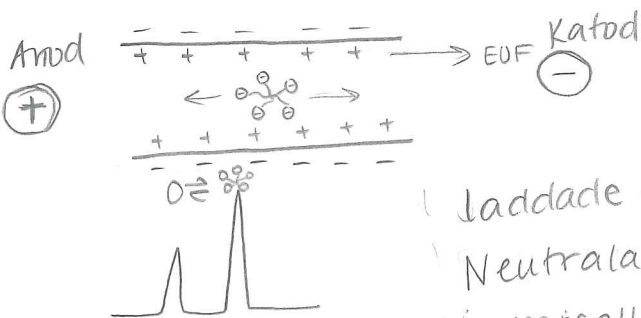
Kapillärzoneelektrofores

Kapillär fylld med buffert - kopplar på spänning
 → sep. med avseende på nettomobilitet

N är oberoende av L .

Micell elektrokinetisk kromatografi

Använder miceller som pseudostat. fas



$C_u \neq 0$ Van Deemter
 ofta snabbt förlopp
 → C_u liten

Laddade partiklar går mot + eller -
 Neutrala partiklar kommer lösa sig
 i micellen. Beror om partikeln löser
 sig bra kommer det ta lång tid och
 om den löser sig mindre bra kommer
 det ta lite kortare tid än för den
 som löser sig bra.

Kapillärgelelektrofores DNA, proteiner

- Filtrening m.a.p. storlek - små fragment först
- ären storlek + laddning (lika stora)
- Elektrofores + gelfiltrening
Stora långsammare genom gelen.

Detektionsmetoder i kapillärelektrofores

även
indirekt

- | | | | |
|-----------------|----------|-------------------|--------------------|
| • UV/VIS | 1-100 | • Amperometri | 0,00001-10 |
| • Fluorescense | 0,001-1 | • Masspektrometri | 0,001-0,01
bra! |
| • Konduktinitet | 0,01-100 | | |

Varför använda CE?

- Ny typ av selektivitet - allt till HPLC
- Kombinera hög upplösning med enkelhet att automatisera.
- Kort analysstid
- Våldigt liten provvolym
- Stor variation på storlek på analyter (från joner till partiklar)

Varför inte CE?

- Preparativ sep
- Prover med låg konc, stor volym - svårt
- Analyter som är svåra att lösa upp
- Analyter som lätt adsorberas till kapillärväggen
ex. proteiner

CE jmf med HPLC

- Överlägsen upplösning
- Ej lika känslig för föroreningar
- Mindre förbrukning av prov o, dyra lösningar
- Snabbare analys
- Känslig för högre salthalt som stör sep.
pga minskning av dubbellagret
- Inte lika känsligt i HPLC

9. Felanalys, statistik o, databehandling

- Redovisa relevans av analysresultaten o, validera dem.
- Karakterisera analysmetoden o, rapportera osäkerhet

- Riktighet = hur nära värdet är det riktiga värdet.
- Precision = avser spridning i resultatet.
- Noggrannhet = hur reproducerbart ett resultat är

testas genom att olika labbers. vid olika tillfällen

Typer av felkällor

* Slumpmässigt - Data fördelar sig jämnt runt ett medelvärde.
Finns alltid o, kan inte korrigeras
påverkar precisionen.

* Systematiskt fel - Alla data är för låga eller höga.
Kan åtgärdas om de upptäcks
påverkar riktighet.

* Grova fel - Långt ifrån det sanna värdet
t.ex. labbslavr = spill, felavläsning

- Medelvärde = $\frac{\sum_i x_i}{N}$

- Median = mittersta värdet

- Standardavvikelse $\sigma = \left(\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}{N} \right)^{1/2}$

- Varians = σ^2

10. Generella övervägande