



UPPSALA
UNIVERSITET

Kurskompendium B

Kompletterande kompendium i
analytisk farmaceutisk kemi

Innehåll

Farmaceutisk analys.....	4
Produktanalys	4
Halt aktiv substans.....	4
Stabilitet.....	4
Föroreningar	4
Excipienter.....	5
Jämviktens betydelse för läkemedel.....	5
Jämvikter: studie av amitriptylin i mag-tarmkanalen	6
Hur ser andelen laddad resp. oladdad amitriptylin ut vid pH 6,8?	6
Vad är lösligheten vid pH 6,8?	7
Vad är fördelningsförhållandet vid pH 6,8?	7
Sammanfattning.....	7
Spektrometri	8
Absorptionsspektroskopi	8
Ljusets egenskaper.....	8
Växelverkan mellan ljus och materia.....	9
Instrumentet	11
Haltbestämningar	11
Kemisk struktur och ljusabsorption	14
Felkällor.....	15
Fluorimetri.....	16
Emission av ljus.....	16
Instrumentet	17
Haltbestämning med fluorimetri.....	18
Kemisk struktur och flouescens.....	19
Jämförelse mellan absorptionsspektroskopi och fluorimetri	19
Titration och pH-metern	21
Elektrokemiska celler	21
Saltbrygga	21
Galvanisk cell	21
Referenselektroder.....	22
Koncentrationselement – pH-mätning.....	24

Titring	25
Kort sammanfattning	28
Flervärda protolyter	28
Fastställande av ekvivalenspunkten (EP)	29
Extraktion (engelska).....	31
Distribution principles	31
Degree of extraction	32
Repeated extractions	33
Intermolecular interactions in liquid-liquid distribution systems	34
Regulation of the distribution ratio by the organic phase	36
Influence of protolysis on distribution ratio	38
Separation of protolytes	40
Extraction techniques.....	41
Liquid-liquid extraction	41
Column extraction	41
Liquid-solid extraction.....	42
Löslighet av svaga protolyter.....	43
Svårlöslig, envärd syra (fenemal)	43
Svårlöslig, envärd bas (etylmorfin)	43
Farmaceutiska aspekter på protolys och löslighet	44

Farmaceutisk analys

Inom begreppet farmaceutisk analys ryms de båda disciplinerna produkt- och bioanalys. Med produktanalys avses kontroll av såväl bulkmaterial, som farmaceutiska beredningar avseende halt och stabilitet av aktiv substans, samt halt och struktur av föroreningar. Bioanalys innebär som namnet antyder, analys av biologiskt material, såsom t.ex. urin, blod, vävnad och cerebrospinalvätska avseende halt och/eller struktur av läkemedel och deras metaboliter, men behandlas inte i detta dokument.

Produktanalys

Halt aktiv substans

Inom läkemedelsindustrin måste en kontinuerlig kvalitetskontroll förekomma, där man förvissas sig om att t.ex. en tillverkad tablett verkligen innehåller den föreskrivna mängden aktiv substans. Vid denna typ av analys är sällan känsligheten ett problem, eftersom den sökta aktiva substansen föreligger i hög halt.

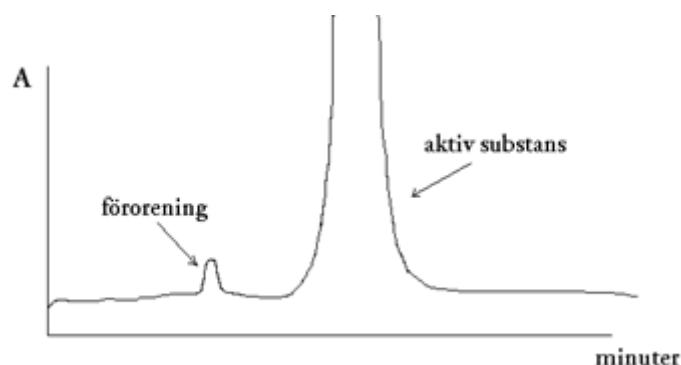
Förutsatt att den aktiva substansen har en kromofor och inga andra ämnen i provmaterialet har ljusabsorberande egenskaper, kan ofta en direkt bestämning göras med spektroskopi. Ingen komplicerad provupparbetning är då nödvändig, utan upplösning av den farmaceutiska beredningen i lämpligt lösningsmedel följt av centrifugering och/eller filtrering är oftast tillräcklig före analys. Det upplösta provet spädes sedan med en känd volym lösningsmedel så att en absorbans i intervallet 0,2 – 0,9 erhålles. Kända standardlösningar av provsubstansen beredes och en standardkurva konstrueras på sedvanligt sätt, varefter halten läkemedel i beredningen kan avläsas (jämför kapitlet "Absorptionsspektroskopi"). Ett alternativ till direkt spektroskopisk bestämning är vätskekromatografi med UV-detektion. Extern standardisering är då i allmänhet tillräcklig, eftersom ingen komplicerad provupparbetning kräves.

Stabilitet

För att avgöra hållbarheten för en farmaceutisk beredning är det viktigt att bestämma hur snabbt den aktiva substansen bryts ner. Dessa tester utförs under olika betingelser såsom varierande temperatur och luftfuktighet. Dessutom är det i sammanhanget viktigt att avgöra vilka nedbrytningsprodukter som bildas (se nedan).

Föroreningar

Det är viktigt att avgöra i vilken grad råvaror och farmaceutiska beredningar innehåller föroreningar, eftersom dessa kan vara farmakologiskt aktiva och/eller toxiska. Föroreningar kan vara av olika art och ha olika härkomst. I samband med syntes av den aktiva substansen i ett läkemedel är det inte säkert att produkten blir 100%-igt ren. Så kallade biprodukter kan då förekomma i materialet. En annan källa till föroreningar är kemisk nedbrytning av den aktiva substansen.



Figur 1: Kromatogram

Föroreningarna föreligger i allmänhet i betydligt lägre koncentration än den aktiva substansen. Detta innebär en analytisk komplikation jämfört med det ovan beskrivna. Vid en direkt spektroskopisk mätning skulle den aktiva substansen absorbera det mesta av ljuset och det skulle vara omöjligt att avgöra hur stor del som tagits upp av den förorening man vill bestämma. Ett separationssystem är därför nödvändigt före detektion i detta fall. Vätskekromatografi (HPLC) är idag den vanligast förekommande tekniken för ändamålet (se kapitlet "Separation"). Halten förorening uppskattas ofta i procent genom att topparean för föroreningen divideras med topparean för den aktiva substansen (Figur 1). Föroreningar som överskrider 0,1% måste strukturbestämmas oftast med hjälp av masspektrometri (MS).

Excipienter

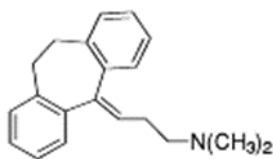
Kvalitetskontroll av farmaceutiska hjälpämnen, s.k. excipienter är också viktig. I de fall då hjälpämnena är lågmolekylära kan vanlig HPLC användas för analys. Ofta förekommer dock större molekyler såsom polysackarider i tabletter. Gelfiltrering (size-exclusion chromatography, SEC) kan då användas för att kontrollera att de tillsatta hjälpämnena har rätt molekylvikt (se kapitlet "Separation").

Jämviktens betydelse för läkemedel

En lösnings surhet, angiven som dess pH-värde, är en mycket viktig egenskap i farmaceutiska, analytisk-kemiska, såväl som fysiologiska sammanhang. Magsårsmedicinen omeprazol (Losec®) är ett exempel på en farmaceutisk produkt där kontrollen av omgivningens pH-värde är av yttersta vikt för dess funktion. Omeprazol bryts nämligen ner och inaktiveras vid surt pH. Detta medför givetvis en komplikation vid per oral administration, eftersom magsyran är mycket sur. Detta problem har lösts genom att den verksamma substansen i den farmaceutiska beredningen omges av ett polymerskikt som är olösligt i sur miljö. Således kommer inte omeprazol i direkt kontakt med magsyran utan löses ut först längre ner i tarmsystemet där pH-värdet är högre. Vidare är det viktigt för den analytiska farmaceutiska kemisten som skall utveckla en metod för att bestämma halten av omeprazol i patienters blodprov, att inte använda lösningar med för lågt pH. En god kunskap om läkemedlens protolytiska egenskaper och förmåga att beräkna och förutsäga pH i lösningar av dem är därför av yttersta vikt för den blivande farmaceuten.

Jämvikter: studie av amitriptylin i mag-tarmkanalen

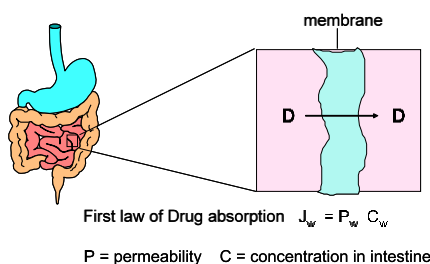
Amitriptylin (Figur 2), en svag bas, ingår i läkemedlet Saroten®. En tablett innehåller amitriptylinhydroklorid (HAMptCl) motsvarande 10 mg amitriptylin (M_w 277,41 g/mol). I en studie vill man att all amitriptylin i tablett löser sig och att $D > 10$ (oktanol). Uppnås dessa krav? Volymen tarmsaft är ca 650 ml och pH är ca 6,8. Koncentrationen av amitriptylin i tarmsaften, om all substans i tablett har löst upp sig, har ett nominellt värde på $C_{\text{Ami}} = 10 \times 10^{-3} / (277,41 \times 0,65) = 5,6 \times 10^{-5}$ M.



Figur 2: Amitriptylin, pK_a 8,82; $\log K_D$ 4,39; S_0 $5,0 \times 10^{-6}$ M

Följande frågor behöver besvaras:

- Hur ser andelen laddad resp oladdad amitriptylin ut vid pH 6,8?
- Vad är lösligheten vid pH 6,8?
- Vad är fördelningsförhållandet vid pH 6,8?



Figur 3: Läkemedels absorption i tarmen

Hur ser andelen laddad resp. oladdad amitriptylin ut vid pH 6,8?

$$pK_{HA} = 8,82 \quad C_{\text{Ami}} = 10 \times 10^{-3} / (277,41 \times 0,65) = 5,6 \times 10^{-5} \text{ M}$$

Approximering av andel laddad/oladdad:

Vid $pH < pK_a$ är större andel av basen laddad än oladdad:

$$C_{\text{Ami}} = [\text{Ami}] + [\text{HAMi}^+] = 5,6 \times 10^{-5} \text{ M} \rightarrow [\text{HAMi}^+] \approx 5,6 \times 10^{-5} \text{ M}$$

Insättning i uttrycket för K_a ger:

$$K_{HA} = 10^{-8,82} = [\text{Ami}][\text{H}_3\text{O}^+] / [\text{HAMi}^+] \rightarrow [\text{Ami}] = 10^{-8,82} [\text{HAMi}^+] / [\text{H}_3\text{O}^+]$$

Sätt in $[\text{H}_3\text{O}^+] = 10^{-6,8}$ och $[\text{HAMi}^+] = 5,6 \times 10^{-5}$ och räkna ut $[\text{Ami}]$.

$$\rightarrow [\text{Ami}] = 10^{-8,82} \times 5,6 \times 10^{-5} / 10^{-6,8} = 5,34 \times 10^{-7} \text{ M}$$

dvs $[Ami]$ är ca 100 ggr lägre än $[HAmi^+]$

En exaktare beräkning av $[HAmi^+]$ kan göras med en andragradsekvation

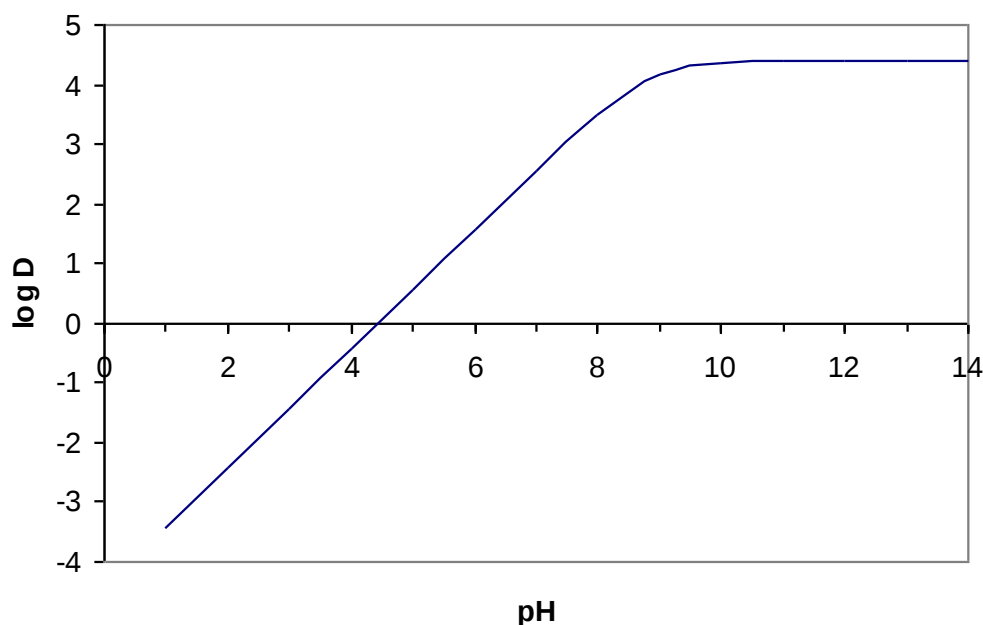
Vad är lösligheten vid pH 6,8?

$$S_x = S_0 \left(1 + \frac{[H_3O^+]}{K_{a(HB^+)}}\right) = 5,0 \cdot 10^{-6} \left(1 + \frac{10^{-6,8}}{10^{-8,82}}\right)$$

$S_x = 5,2 \times 10^{-4}$ M, dvs inga löslighetsproblem i tarmen (nominella totalkoncentrationen $C_{Ami} = 5,6 \times 10^{-5}$ M).

Vad är fördelningsförhållandet vid pH 6,8?

Gå in i fördelningsdiagrammet (Figur 4) på pH 6,8 och avläs $\log D_{Ami}$:



Figur 4: Fördelning av amitriptylin

$\log D = 2,4 \rightarrow D = 2 \times 10^2$, dvs det uppsatta målet för $D > 10$ är uppfyllt. Numerisk beräkning ger $D = 2,3 \times 10^2$.

Sammanfattning

Vid pH 6,8 är:

- $[HAmi^+] \gg [Ami]$
- $S_x = 5 \times 10^{-4}$ M (Numerisk beräkning ger $S_x = 5,3 \times 10^{-4}$ M)
- $D = 200$ (Numerisk beräkning ger $D = 2,3 \times 10^2$)

Spektrometri

Absorptionsspektroskopi

Varje dag utför du kvalitativa och kvantitativa analyser med ditt eget inbyggda spektroskopiska instrument – ögat. Ögat har förmågan att se skillnad på olika färger som de observerade objekten utstrålar. Vitt ljus, t.ex. från en glödlampa eller från vår sol, är en blandning av alla färger vi kan se. Vi bestämmer oss för att betrakta ett glas hallonsaft och frågar oss: Varför syns vätskan som röd? Den röda saften, som belyses med vitt ljus, måste alltså sända ut våglängderna för rött ljus som i sin tur träffar vår näthinna. Eftersom vitt ljus innehåller alla färger, måste det bland dessa också innehålla den röda. Kemiska ämnen i hallonsaften har från det vita ljuset tagit bort – absorberat – blått och grönt ljus och därmed endast lämnat kvar det röda.

Om du på ett kafé beställt ett glas hallonsaft, men av misstag blir serverad apelsinjuice istället, så kommer du att reagera direkt när du får syn på glaset. Detta beror på att apelsinjuicen släpper igenom gul färg och därmed absorberar violett och blått från det vita ljuset. Genom att hallonsaften och apelsinjuicen alltså absorberar olika färger kan du med ögat göra en kvalitativ spektroskopisk analys – d.v.s. du kan skilja dem åt.

Ditt sällskap på kafébesöket får in ett glas hallonsaft, men klagar utan att smaka på det: ”Men, saften är ju alldeles för svag!” Givetvis var grunden till detta att färgen på saften var betydligt svagare röd än vad som var förväntat. Ju mer utspädd saften är i vatten, desto lägre koncentration finns av de ljusabsorberande ämnena och desto mindre mängd violett-blått ljus absorberas. Detta gör att mer vitt ljus släpps igenom och färgen blir svagare. Din kompis har på detta sätt utfört en sorts kvantitativ analys – d.v.s. kunnat uttala sig om mängden av ett ämne – genom att avgöra styrkan på färgen (graden av ljusabsorption).

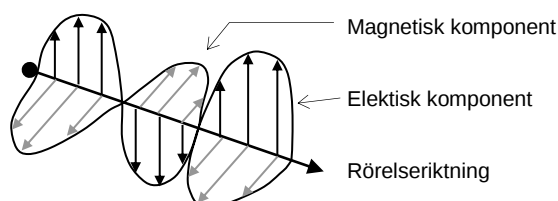
Följande kompendium om absorptionsspektroskopi kommer att behandla tekniker att utföra analyser med hjälp av olika ämnens förmåga att absorbera ljus. Instrumenten som används möjliggör mer exakta mätningar än vad ögat kan åstadkomma och även absorption av osynligt ljus är möjligt. De grundläggande principerna bygger dock på de fenomen som beskrivits i saftfallet ovan.

Ljusets egenskaper

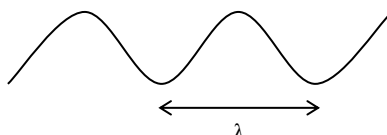
Då du står på en öppen plats en solig dag, ger kroppen som bekant en skugga. Om du lägger två glasskivor mot varandra med en vattendroppe emellan, så uppstår ett mönster av ringar. I det första fallet beter sig ljuset som ett knippe partiklar som skickas ut från solen och stoppas av din kropp, medan ljuset i det andra fallet beter sig som en elektromagnetisk vågrörelse med interferensmönster. Denna dubbelnatur har gäckt världens mest framstående fysiker under lång tid. År 1928 presenterade så dansken Niels Bohr en lösning på problemet, genom att helt enkelt tillskriva ljuset både partikelegenskaper och vågegenskaper. Det var upp till varje fysiker att avgöra vilket beskrivningssätt som passade bäst för varje specifikt ändamål. På detta sätt betraktar även dagens fysiker ljuset, antingen som ett knippe partiklar, s.k. fotoner, eller som en elektromagnetisk vågrörelse, jämförbara med t.ex. radiovågor, mikrovågor eller röntgenvågor. Även vi kommer att ha nytta av detta dubbla beskrivningssätt när vi studerar spektroskopiska fenomen.

Några definitioner av begrepp är här nödvändiga som underlag för den fortsatta diskussionen. En elektromagnetisk våg består av en elektrisk komponent och en magnetisk komponent som rör sig med 90° vinkel mot varandra (Figur 5). Våglängden (λ) är sträckan mellan två identiska punkter på en våg och har oftast enheten nanometer ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$, Figur 6).

Frekvensen (ν), definieras som antalet kompletta svängningar som vågen utför per sekund och har enheten s^{-1} , vilket är detsamma som Hertz (Hz).



Figur 5: Ljusets komponenter



Figur 6: Ljusets egenskaper

Ljushastigheten, som betecknas c , har i vakuum ett värde på $2,998 \times 10^8$ m/s. Vi ser genom att analysera de olika storheterna, att det måste finnas en relation mellan våglängden (sträcka), frekvensen (inverterad tid) och ljushastigheten (sträcka/tid) för en viss vågrörelse:

$$\lambda \cdot \nu = c \Leftrightarrow \text{m} \cdot \text{s}^{-1} = \text{m/s} \quad (\text{ekv. 1})$$

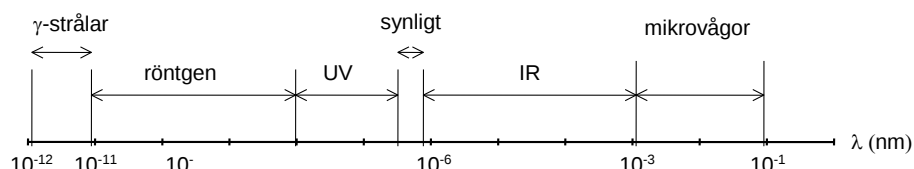
Detta är ett grundläggande samband, vilket möjliggör beräkning av en vågrörelses frekvens om man känner dess våglängd och vice versa. När vi sedan tittar på ljusets energi, är det dock lämpligast att se på det som partiklar, fotoner. Varje foton bär på en energi (E) som ges av:

$$E = h \cdot \nu \quad (\text{ekv. 2})$$

Där h är Plancks konstant ($6,626 \times 10^{-34}$ Js). Alltså är ljusets energi direkt proportionellt mot dess frekvens. Kombinerar vi ekvationerna 1 och 2, ser vi också att energin är omvänt proportionell mot våglängden:

$$E = h \cdot c / \lambda \quad (\text{ekv. 3})$$

För att lättare kunna relatera olika värden på ovan nämnda storheter till praktiska ting, så finns i Figur 7 en våglängds- och energiskala med olika strålningstyper insatta.



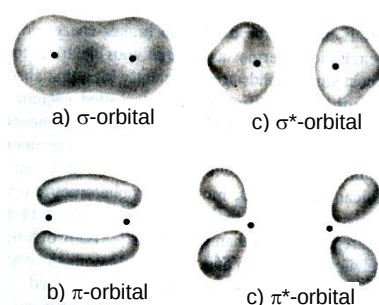
Figur 7: Vakuum UV-ljus 10-180 nm; UV-ljus 180-380 nm; Synligt ljus 380 - 780 nm

Växelverkan mellan ljus och materia

I det inledande stycket ovan, sade vi att anledningen till att ett glas hallonsaft syns som rött vid belysning med vitt ljus, är att saften absorberar den röda färgens komplementfärg (d.v.s. blå-grönt). När en molekyl absorberar en foton så ökar dess energi - man säger att den hamnar i ett exciterat tillstånd. Den lägsta energi som molekyl kan ha kallas för grundtillstånd. Vi skall i detta avsnitt diskutera vilka fysikaliska mekanismer som ligger bakom kemiska ämnens förmåga att ta upp ljus.

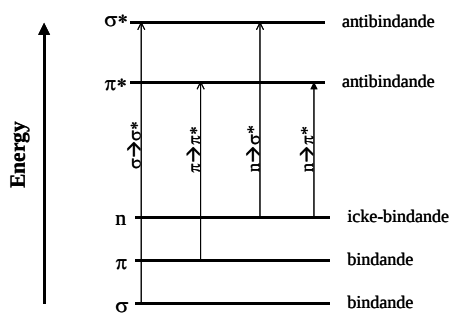
Ett ämne som bestrålas med mikrovågor kan ta upp energin genom att molekylerna börjar rotera, medan infrarött ljus absorberas genom att intramolekylära bindningar börjar vibrera. Energi från ultraviolett och synligt ljus (UV-vis) tas upp genom att elektroner i molekylerna som belyses exciteras till ett högre energitillstånd. Det är spektroskopi i det sistnämnda våglängdsintervallet som denna kurs främst kommer att beröra.

De elektroner som orsakar absorption av ultraviolett och synligt ljus är de som deltar i bindningar (σ - eller π -orbitaler) eller är fria elektroner (n-elektroner) som främst finns runt atomtyperna syre, kväve, svavel och halogener (fluor, klor, brom, jod). Molekylorbitaler kan förekomma i både en bindande form med låg energi (σ - eller π -orbitaler) och en antibindande form med hög energi (σ^* - eller π^* -orbitaler, Figur 8).



Figur 8: Elektronorbitaler

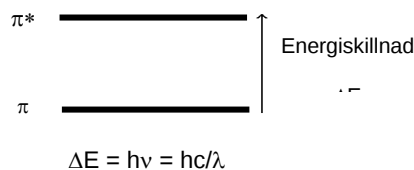
I grundtillståndet befinner sig elektronerna i den bindande orbitalen, medan absorption av ljus orsakar en övergång till den antibindande formen. Energin hos molekylorbitaler skiljer sig signifikant beroende på deras miljö, men generellt kan sägas att σ har lägre energi än π och att n-elektronerna ligger mellan de bindande och antibindande orbitalerna (Figur 9).



Figur 9: Orbitalenergies

Absorption av ljus i det ultravioletta och synliga våglängdsområdet kan orsaka fyra olika typer av elektronövergångar: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$ och $n \rightarrow \sigma^*$. Övergångar av typerna $\sigma \rightarrow \sigma^*$ och $n \rightarrow \sigma^*$ kräver så hög energi att det är praktiskt svårt att utnyttja dem i analytiska sammanhang. Denna kurs behandlar således endast $\pi \rightarrow \pi^*$ och $n \rightarrow \pi^*$.

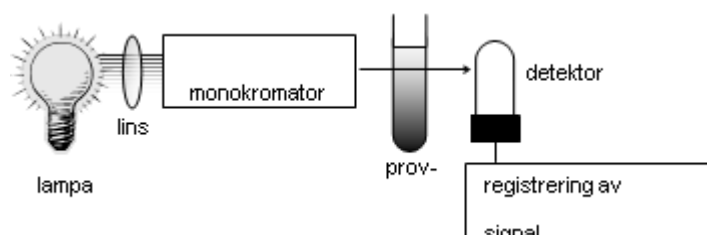
Generellt gäller att energin hos det infallande ljuset (fotonen) exakt måste överensstämja med energiskillnaden mellan orbitalerna i elektronövergången för att absorption skall kunna ske (Figur 10). En molekyl kan alltså inte absorbera delar av en foton, utan det är allt eller inget som gäller. Man säger således att energinivåerna i en molekyl är kvantiserade.



Figur 10: Energikvanta

Instrumentet

För att i praktiken kunna utföra en kvantitativ eller kvalitativ kemisk analys med hjälp av ovan nämnda mekanismer, krävs tillgång till ett speciellt mätinstrument – en spektrofotometer. Denna instrumenttyp finns i en mängd olika fabrikat och utformningar, men de flesta är uppbyggda kring samma princip. I Figur 11 visas en schematisk skiss av en spektrofotometer och dess olika komponenter.

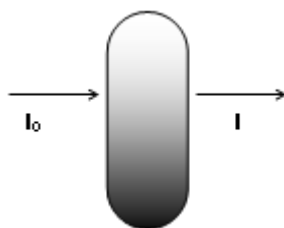


Figur 11: Schematisk skiss av en spektrofotometer

Lampan, ljuskällan, sänder ut ljus av olika våglängder. Oftast används en wolframlampa för synligt ljus och en deuteriumlampa för det ultravioletta våglängdsområdet. Linsen tjänar till att fokusera ljuset. En blandning av våglängder från lampan lyser in i monokromatorn, som sorterar ut en våglängd (en färg) som skall användas (ordet kommer från grekiskan: mono = en kroma = färg). Det är på de flesta spektrofotometrar möjligt att justera monokromatorn och därmed fritt välja vilken våglängd som skall träffa provet. I kyvetten finns provlösningen som skall analyseras. Kyvetten består ofta av kvarts, glas eller plast och det är viktigt att den inte absorberar ljus i det våglängdsområde som skall användas vid mätningen. Efter passage genom provet träffar ljuset en detektor som mäter dess intensitet – d.v.s. antal fotoner per tidsenhet. Detektorns signal registreras oftast i en dator för vidare utvärdering.

Haltbestämningar

Vi skall i detta stycke visa hur en kvantitativ analys, d.v.s. en haltbestämning av en substans kan utföras med hjälp av absorptionsspektroskopi. För att möjliggöra detta, måste vi introducera ett par ytterligare begrepp. I figur 1.1.8 ser vi en provkyvett och pilen betecknad I_0 representerar intensiteten på det ljus som från lampan, linsen och monokromatorn faller in mot provet och I representerar intensiteten på det ljus som kommer ut från provet och träffar detektorn.



Figur 12: Provkyvett

Utifrån detta kan vi definiera termen transmittans (T):

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (\text{ekv. 4})$$

T beskriver alltså den fraktion av ljusintensitet som återstår efter passage genom provkyvetten. Skillnaden mellan I_0 och I måste alltså vara den intensitet som försvunnit genom att provet absorberat ljus. För att erhålla en storhet som vi verkligen kan relatera till koncentrationen av provet måste vi dock även introducera termen absorbans (A):

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} = \log \frac{I_0}{I} = \log I_0 - \log I \quad (\text{ekv. 5})$$

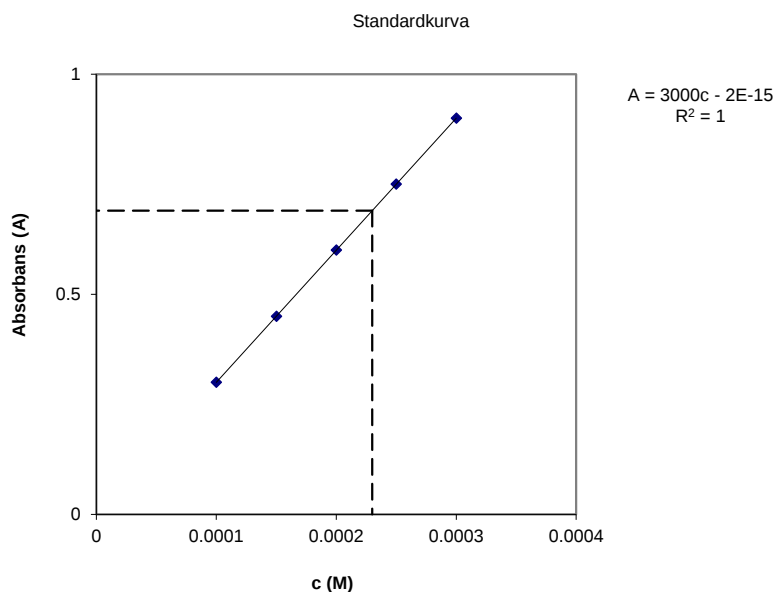
A, som är enhetslös, beskriver alltså skillnaden i logaritmerna av I_0 och I och är således ett mått på hur mycket ljus som absorberats. Det kan synas märkligt att vi plötsligt börjar använda oss av en logaritmisk enhet, men det har sin förklaring i att ljusintensiteten avtar exponentiellt vid passage genom provet.

Med en spektrofotometer kan man mäta upp I_0 innan man sätter provet till kyvetten och sedan mäta I efter det att provet tillsatts. Instrumentets dator kan sedan räkna ut värdet på A enligt ekvation 5. Man kan experimentellt och teoretiskt visa att följande samband gäller:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (\text{ekv. 6})$$

A är som förut absorbansen, b är kyvettlängden (cm), c är koncentrationen av provet (M) och ε är den så kallade molära absorptiviteten ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$). Ekvation 6 kallas för Lambert-Beers lag och talar om att den uppmätta absorbansen är proportionell mot provets koncentration, under förutsättning att b och ε är konstanta. Kyvettlängden (b) beskriver hur lång sträcka som ljuset färdas genom provet och hålls utan problem konstant om så länge inte kyvetten byts ut. Den molära absorptiviteten (ε) är konstant för ett visst ämne vid en viss våglängd (λ) och en viss miljö (t.ex. lösningsmedel, temperatur etc.).

För att kunna utföra en haltbestämning krävs således att faktorn εb bestäms. Om vi betraktar Lambert-Beers lag som en form av räta linjens ekvation med A ($=y$) som en funktion av c ($=x$), så måste εb beskriva linjens lutning. Denna lutning kan experimentellt bestämmas genom att A uppmäts för ett antal kända provkoncentrationer (c) och avsätts i en graf med A på y-axeln och c på x-axeln (Figur 13). Genom en matematisk anpassning av mätpunkterna till en rät linje, kan lutningen (εb) bestämmas. Denna graf kallas för en standardkurva eller kalibreringskurva. Absorbansen för det okända provet som skall haltbestämmas mäts sedan och dess koncentration kan beräknas antingen numeriskt genom ekvation 6 eller grafiskt.



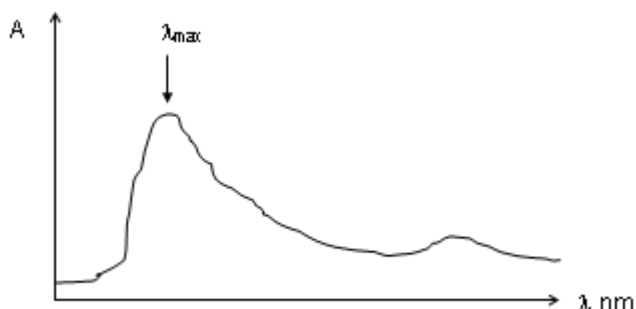
Figur 13: Standardkurva

Det är dock viktigt att det verkligen är absorbansen för provsubstanten som uppmäts och anpassas till Lambert-Beers lag. Ett problem är mediet provet befinner sig i, d.v.s. lösningsmedlet, eventuella buffertkomponenter, andra salter o.dyl. också kan absorbera ljus. Det som uppmäts vid en direkt absorbansmätning av ett prov löst i ett speciellt medium är summan av provsubstansens och mediets absorbanser (A_{tot}):

$$A_{\text{tot}} = A_{\text{provsubstans}} + A_{\text{medium}} \quad (\text{ekv. 7})$$

Det vi egentligen är intresserade av är $A_{\text{provsubstans}}$. Denna absorbans kan dock lösas ut om A_{medium} kan bestämmas genom ett separat experiment. Detta utförs enklast genom att absorbansen uppmäts för det rena mediet (utan provsubstansen närvarande). Detta ”prov” som endast innehåller mediet, brukar betecknas blindprov eller blankprov.

Ovan nämndes att ϵ för ett visst ämne är våglängdsberoende. För att största möjliga känslighet skall erhållas vid en haltbestämning – d.v.s. så låga koncentrationer som möjligt skall kunna uppmätas – är det viktigt att en våglängd väljs som ger ett så högt värde på ϵ som möjligt. På många moderna spektrofotometrar kan man programmera monokromatorn att kontinuerligt variera den våglängd som släpps genom provet samtidigt som absorbansen hela tiden registreras. Den graf som då erhålls med absorbansen (A) som en funktion av våglängden (λ), kallas för ett absorbansspektrum (Figur 14). Den våglängd som ger maximal absorbans (λ_{max}) väljs lämpligast för haltbestämning.



Figur 14: Absorbansspektrum

Kemisk struktur och ljusabsorption

Det är som analytiker viktigt att kunna förutsäga om ett ämne kan absorbera ljus genom att studera en dess strukturformel. Detta för att snabbt kunna avgöra om absorptionsspektroskopi är en möjlig analysmetod för substansen i fråga. Det nämndes ovan att de elektronövergångar som är aktuella i våglängdsområdet för ultraviolett och synligt ljus, är $\pi \rightarrow \pi^*$ och $n \rightarrow \pi^*$. Detta betyder att en molekyl måste innehålla π -orbitaler, d.v.s. ha dubbelbindningar för att kunna absorbera ljus i detta våglängdsområde. Det strukturelement som orsakar absorptionen (t.ex. en dubbelbindning) kallas för en kromofor.

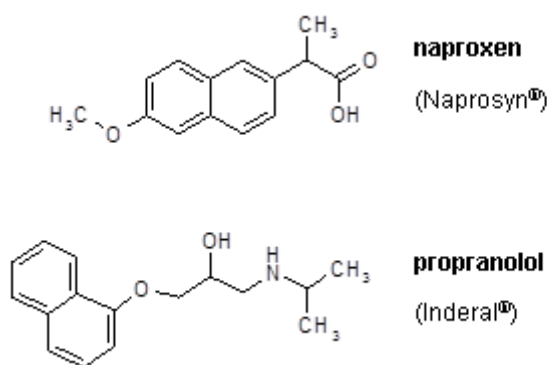
Den molära absorptiviteten (ϵ), beskrevs ovan som en proportionalitetskonstant mellan absorbans och koncentration. Denna konstant uttrycker egentligen hur hög sannolikheten är för att absorption av en foton skall ske. Ett högt värde på ϵ betyder hög sannolikhet för absorption och därmed ett högre värde på A vid en viss koncentration (jfr. ekv 6). Vi skall med hjälp av Tabell 1 resonera lite kring vad som bestämmer denna sannolikhet.

Tabell 1: Ljusabsorption för kemiska strukturelement

struktur	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$ ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
a) <chem>CCCC=CH2</chem>	184	10000
b) <chem>C=CC=CC=CH2</chem>	185	20000
c) <chem>C=CC=CH2</chem>	217	21000
d) <chem>c1ccccc1</chem>	256	
e) <chem>Oc1ccccc1</chem>	270	

Ämne b) har två isolerade dubbelbindningar (mer än en enkelbindning emellan), vilket ger ett dubbelt så högt ϵ -värde jämfört med ämne a) som bara har en dubbelbindning. Sannolikheten för absorption måste alltså vara dubbelt så hög för b) som för a). Detta kan rationaliseras genom att den sammanlagda kromoforen är dubbelt så stor för b), d.v.s. träffytan för en foton blir dubbelt så stor jämfört med a). Våglängden för maximal absorbans ($\lambda_{\max}$) och därmed energin i övergången skiljer sig dock inte nämnvärt mellan a) och b), eftersom dubbelbindningarna är isolerade och inte påverkar varandra (jfr. ekv. 3). Molekyl c) har två konjugerade dubbelbindningar (endast en enkelbindning emellan). Dess ϵ -värde skiljer sig inte signifikant från b), d.v.s. träffytan är ungefär lika stor. Dock ligger $\lambda_{\max}$ vid en högre våglängd (lägre energi jfr. ekv. 3) för c) jämfört med a) och b).

Detta illustrerar två viktiga principer vad gäller struktur-absorptionssamband, att ju fler dubbelbindningar, desto kraftigare absorption (högre ϵ) och ju större grad av konjugation, desto lägre energi krävs för elektronövergång (högre $\lambda_{\max}$). Aromater faller under dessa principer och absorberar alltså ljus i hög grad i ultravioletta-synliga våglängdsintervallet. Som tumregel kan därför sägas att absorptionsspektroskopi fungerar väl att använda som analysmetod för ämnen som innehåller aromatiska strukturelement (t.ex. bensenringar, naftalenringar), vilket gäller för många läkemedel (exempel Figur 15).



Figur 15: Läkemedelsmolekylerna naproxen och propranolol

Olika substituenten på aromaringen kan påverka absorptionspektrums utseende. Ett strukturelement som bidrar till att öka ϵ och/eller öka $\lambda_{\max}$ (minska energin) utan att själv absorbera ljus, kallas för en auxokrom. Ett exempel på detta fenomen ges av Tabell 1 d) och e). Hydroxigruppen på fenol orsakar ett skift i $\lambda_{\max}$ från 256 till 270 nm jämfört med bensen. Detta beror på att de fria elektronparen runt syret kan konjugeras in i aromaringen och därmed sänka energin för π^* -tillståndet.

Felkällor

Vissa felkällor och fällor i samband med haltbestämningar med absorptionsfotometri är värda att ta upp. Lambert-Beers lag gäller strikt endast vid monokromatiskt ljus, d.v.s. endast en våglängd träffar provet till detektorn. Det är dock tekniskt omöjligt att konstruera en på detta sätt ideal monokromator och det blir alltid en liten blandning av våglängder som kommer ut (så kallat polykromatiskt ljus). Ju större spann av våglängder som används, desto större kommer felet i mätningen att bli.

Det är viktigt att man använder rätt medium till blindprovet, så att kompensationen för dess absorbans blir korrekt (jfr. ekv. 7). Kyvetten måste vara transparent (ej absorbera ljus) i det våglängdsintervall som skall användas för mätningen. I övrigt måste man se till att kyvetten är ren – fingeravtryck och andra avlagringar kan absorbera ljus och orsaka mätfel.

Det är viktigt att inget ljus från lampor i rummet utanför spektrofotometern tar sig in i apparaten och träffar detektorn. Risker finns även att ljus från detektorns lampa genom icke-ideal konstruktion reflekteras, går runt provkyvetten och träffar detektorn. I båda fallen överskattar man den ljusintensitet som verkligen föreligger efter passage genom provet. Det ljus som träffar detektorn utan att ha passerat provet kallas för ströjlus. Ströjluset orsakar störst mätfel vid höga absorbanser (låga transmittanser) och en allmän rekommendation är att inte utföra kvantitativa mätningar vid $A > 0,9$.

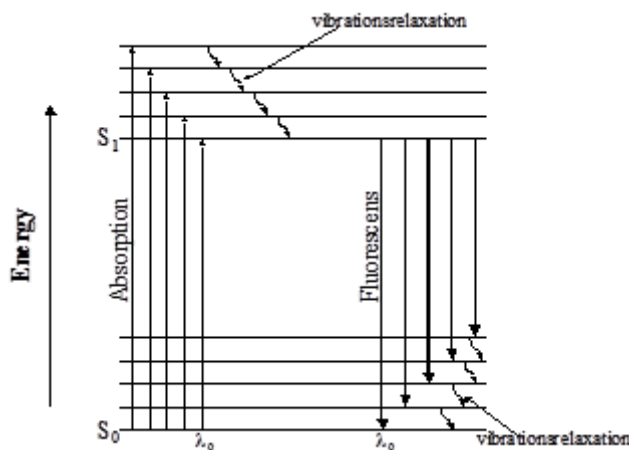
Om å andra sidan absorbansen är för låg (transmittansen hög), så innebär det att den bestäms av skillnaden mellan två nästan lika stora tal (jfr. ekv. 5) eftersom I är nästan lika stor som I_0 . En liten felmätning i I eller I_0 kommer då att ge ett stort fel i A . Därför bör inga kvantitativa bestämningar göras vid $A < 0,2$.

Fluorimetri

Emission av ljus

Allt i naturen strävar efter en så låg energinivå som möjligt. Detta gäller även en molekyl som exciterats genom absorption av en foton och därmed antagit ett högre energitillstånd (d.v.s. absorberat ljus). Det finns olika sätt för molekyler att göra sig av med den upptagna energin. Det vanligaste är att den försvinner som värme genom kollisioner med lösningsmedelsmolekyler. I vissa fall är det dock möjligt att energin också avges genom att de exciterade molekylerna sänder ut fotoner. Detta kallas för ljusemission eller fluorescens. Analysmetoder baserade på detta fenomen kännetecknas av hög känslighet och hög selektivitet.

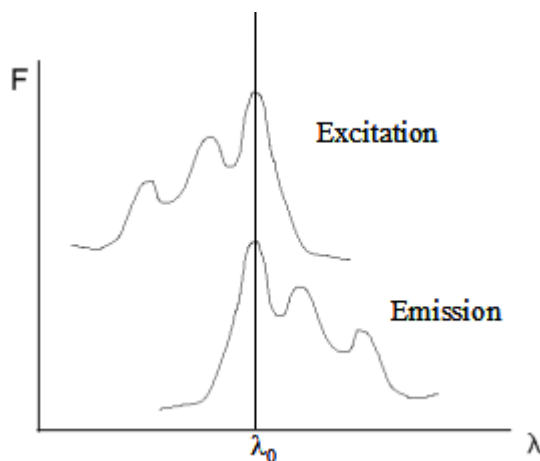
Figur 16 visar ett så kallat Jablonskidiagram. De två tjockare linjerna (S_0 och S_1) illustrerar schematiskt det elektroniska grundtillståndet, respektive det exciterade elektroniska tillståndet (t.ex. π resp. π^*). De tunnare linjerna ovanför både S_0 och S_1 visar vibrationsnivåer. En molekyl som befinner sig i grundtillståndet (S_0) kan genom ljusabsorption exciteras till S_1 . Den kan antingen hamna på den lägsta S_1 -nivån (den tjocka linjen) eller ta upp lite ytterligare energi genom vibration och därmed hamna på någon av S_1 's vibrationsnivåer.



Figur 16: Jablonskidiagram

Observera att energins kvantisering gäller även i detta fall och att en foton med en energi ($E=h\nu$) som exakt överensstämmer med ett energigap i Jablonskidiagrammet måste träffa molekylen för att absorption skall kunna ske. Eventuell vibrationsenergi avges snabbt genom kollisioner med lösningsmedlet – så kallad vibrationsrelaxation.

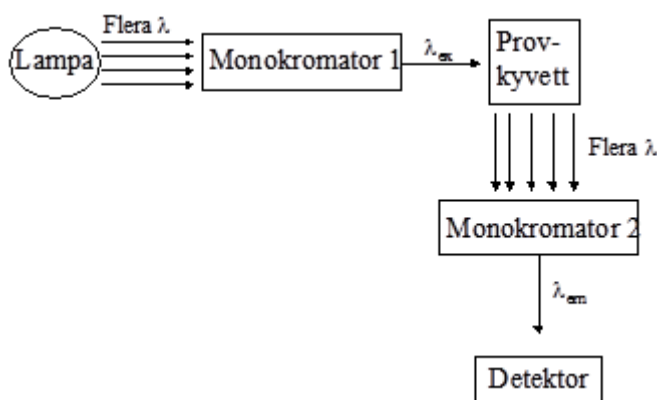
Den energi som kvarstår från den lägsta S1-nivån kan dock för vissa molekyler avges som ljus (fluorescens). Antingen avges all energi och molekylen hamnar på den lägsta S0-nivån eller så avges en del av energin och en del kvarstår som vibrationer. Molekylen ”landar” då på en av S0:s vibrationsnivåer. Det ljus som utsänds har också en energi som exakt motsvarar energigapet i diagrammet. Detta betyder att fluorescensen sker vid samma våglängd eller längre (samma energi eller lägre) än den längsta för excitationen. Detta illustreras vidare i Figur 17, som visar ett schematiskt excitationsspektrum och ett emissionsspektrum. Emissionen (fluorescensen) sker vid lika eller längre våglängd än excitationen (absorbansen).



Figur 17: Excitations- och emissionsspektrum

Instrumentet

De instrument som används för fluorescensmätningar, så kallade fluorimetrar, finns i en mängd olika utföranden, men de bygger alla på den princip som visas i . Lampan sänder ut ljus, oftast i det ultravioletta eller synliga våglängdsområdet. Monokromator 1 sorterar ut den våglängd som skall användas till att excitera provet. Provkylvetten innehåller provlösningen på vilken fluorescens skall mätas. Monokromator 2 sorterar ut önskad våglängd bland de som emitteras från provet.



Figur 18: Schematisk skiss av en fluorimeter

Detektorn mäter intensiteten på det emitterade ljuset. Signalen visas på en mätare och kan registreras i en dator eller på en skrivare. En viktig skillnad i uppbyggnaden av en fluorimeter och en absorptionsspektrofotometer, är att det emitterade ljuset mäts i 90° vinkel från lampan. Provet utsänder ljus åt alla håll, men för att undvika att ljus direkt från lampan når detektorn, så anses denna geometri som den

bästa. På liknande sätt som en absorptions-spektrofotometer, kan en fluorimeter användas som detektor för vätskekromatografi (HPLC). I detta fall ersätts provkyvetten av en flödescell, men den principiella uppbyggnaden av instrumentet är i övrigt densamma som i Figur 18.

Haltbestämning med fluorimetri

Fluorimetri, är som nämndes ovan, en känsligare analysmetod än absorptionsspektroskopi. Den lämpar sig därför väl för haltbestämningar av ämnen i låga koncentrationer. Man kan visa att följande samband gäller:

$$F = KI_0 \cdot \epsilon bc \quad (\text{ekv. 8})$$

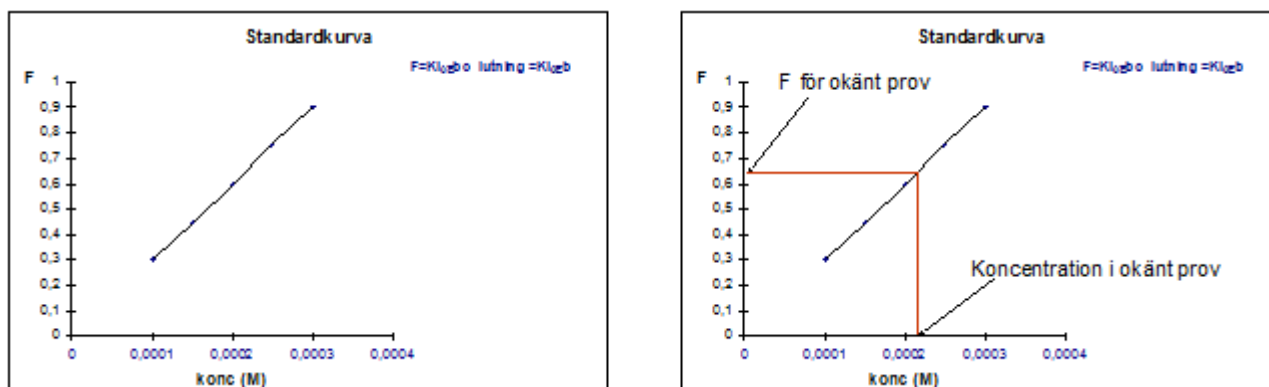
F är den uppmätta fluorescensintensiteten, K är en konstant som bl.a. beror på det analyserade ämnets egenskaper, I_0 är intensiteten på det infallande ljuset, ϵ är den molära absorptiviteten ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) vid vald excitationsvåglängd, b är kyvettlängden och c är provkoncentrationen (M). Detta betyder alltså att F ökar, förutom proportionellt mot c, med förmågan att absorbera ljus (ϵ), I_0 och b. För en viss excitationsvåglängd och en viss använd ljusintensitet, så är även I_0 , ϵ och b konstanter. Detta betyder att ekvation 8 kan skrivas som:

$$F = K' \cdot c \Leftrightarrow K' = KI_0 \cdot \epsilon b \quad (\text{ekv. 9})$$

Ekvation 9 säger att det råder ett linjärt samband mellan F och c. Viktigt är dock att notera att denna ekvation endast gäller vid låga provkoncentrationer.

För att praktiskt utföra en haltbestämning med fluorimetri, bör man först ta upp ett excitationsspektrum och ett emissionsspektrum för ämnet man skall analysera (jfr Figur 19). Ett excitationsspektrum tas upp genom att monokromatorn för excitationsvåglängden varieras kontinuerligt medan monokromator 2 endast släpper igenom en våglängd. Emissionsspektrumet tas upp på motsvarande sätt med fast våglängd för monokromator 1 och varierande för monokromator 2. För att uppnå maximal känslighet i haltbestämningen, skall man helst utföra mätningen vid respektive maximal våglängd för emission och excitation.

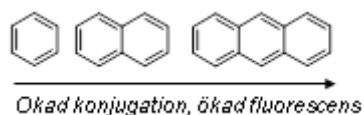
Arbetsgången är sedan i princip densamma som för en haltbestämning med absorptionsspektroskopi. Fluorescensintensiteten (F) uppmäts vid excitations- och emissionsmaximum för c:a fem kända koncentrationer av provsubstanten löst i aktuellt lösningsmedel. En standardkurva upprättas med F som en funktion av c (Figur 19, vänster). En linjär kurvanpassning utförs och lutningen blir lika med K' . F uppmäts sedan på det okända provet och dess koncentration kan avläsas i standardkurvan (Figur 19, höger).



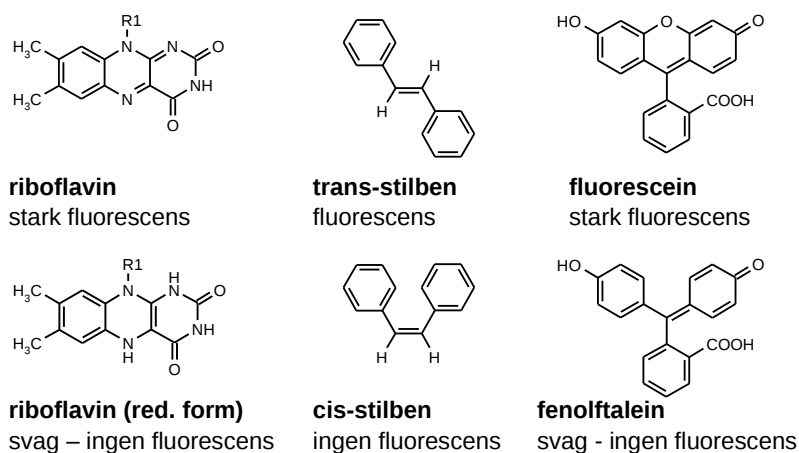
Figur 19: Standardkurvor vid fluorimetri

Kemisk struktur och fluorescens

För att som kemist kunna avgöra om fluorimetri är en lämplig teknik för att analysera ett visst ämne, är det av yttersta vikt att ha en känsla för vilka kemiska strukturer som kan emittera ljus. Som grundregel kan sägas att konjugerade, stela plana strukturer har god förmåga att fluorescera.



Figur 20: Bensen, naftalen, antracen



Figur 21: Fluorescens hos några molekyler

I Figur 20 ser vi aromatserien bensen, naftalen, antracen som ger ökad fluorescens ju större det konjugerade systemet är. Vidare jämförs den reducerade formen av riboflavin, som endast har svag fluorescens, med den oxiderade formen där konjugationen är större och därmed även fluorescensen. I Figur 21 ser vi fluorescein, som har en stel struktur genom sin eterbrygga och därmed starkare fluorescens än fenolftalein som har en högre grad av rörlighet. Vidare uppvisar den plana molekylen trans-stilben fluorescens, vilket inte gäller för dess cis-form. Detta beror på att den senare isomeren av steriska skäl ej är plan.

Jämförelse mellan absorptionsspektroskopi och fluorimetri

Som nämnts ovan, så är fluorimetri en betydligt känsligare analysmetod än absorptionsspektroskopi. Detta beror på att man i den första metoden mäter intensiteten av utsänt ljus jämfört med ”mörker”. I det senare fallet mäter man en skillnad mellan två intensiteter, se kapitlet ”Absorptionsspektroskopi”, ekvation 5: ($A = \log I_0 - \log I$), vilket ger en stor osäkerhet då absorbansen är låg (liten skillnad mellan I_0 och I). Detta kan illustreras genom följande liknelse. Ett av landets större rederier oroar sig för en av sina kapteners plötsliga viktuppgång och du har fått i uppdrag att väga honom. Du får två olika förslag på hur detta kan gå till. En variant är att du ber kaptenen gå ombord på sitt skepp och så väger du hela skeppet med kaptenen i. Sedan ber du kaptenen stiga av och du väger skeppet ensamt. Kaptенens vikt får du genom skillnaden mellan de två vikterna. Den andra vägningsmetoden är att du ställer kaptenen direkt på en våg. Vilken metod bör vara känsligast? Givetvis den sista. Den förstnämnda metoden får illustrera förfarandet vid en absorptionsmätning – responset blir skillnaden mellan två nästan lika stora tal, medan den sistnämnda metoden illustrerar fluorimetri – direkt mätning jämfört med nollnivå (”mörker”).

Fluorimetri är även betydligt mer selektiv än absorptionsspektroskopi. Detta beror för det första på att ett mycket färre antal ämnen har förmågan att fluorescera, jämfört med de som kan absorbera ljus. De

strukturella kraven är som nämnts högre för fluorescens än för absorbans. Ett annat skäl till den högre selektiviteten är att man väljer ut två våglängder vid mätningen, en excitations- och en emissionsvåglängd. Om man mäter på en blandning av två ämnen, vars absorptionsvåglängder överlappar, finns det således möjlighet att finna selektiva emissionsvåglängder och vice versa.

Titration och pH-metern

Elektrokemiska celler

En metallstav (elektroden) som är neddoppad i en lösning innehållande samma metalls joner kallas i elektrokemiska sammanhang för en halvcell. Om man kopplar ihop metallstaven med en annan halvcell bestående av en annan metall/metalljon har man fått en enkel elektrokemisk cell. För att elektrisk ström skall kunna flyta genom cellen måste de två halvcellernas lösningar med metalljoner (elektrolyterna) stå i förbindelse med varandra. Detta kan man uppnå med hjälp av en saltbrygga. Exempel på halvceller är en kopparstav nedsänkt i en lösning med kopparsulfat (CuSO_4) och en zinkstav nedsänkt i en zinksulfatlösning (ZnSO_4).

Saltbrygga

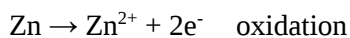
En saltbrygga är i sin enklaste form ett U-format glaströr som innehåller en gel (ofta agar) med en hög halt av joner (elektrolyt) som inte kan delta i redoxreaktioner eller reagera med andra lösta joner. Exempel på joner i en saltbrygga är KNO_3 och KCl . I ändarna på glaströret sitter ett poröst glasmembran som gör att jonerna kan diffundera både ut ur och in i elektrolyten i glaströret.

Om man förbinder de två halvcellerna med en saltbrygga och förbinder elektroderna med en metalltråd med hög ledningsförmåga kan elektronerna röra sig fritt mellan de båda halvcellerna. En spontan elektrokemisk reaktion ger en elektrisk ström i metalltråden vilken kan mätas med en voltmeter. En sådan elektrokemisk cell kallas för en galvanisk cell (galvaniskt element). Om man istället för voltmeter sätter in ett batteri så kan man få den spontana reaktionen att gå åt andra hållet. Denna typ av elektrokemisk cell kallas för en elektrolytisk cell.

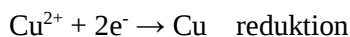
Reaktionen i en elektrolytisk cell är en påtvingad process vilken man bl. a. utnyttjar inom metallindustrin för att rena vissa metaller. Man utgår då ofta från en saltsmälta över vilken man lägger en spänning med hjälp av två elektroder. Elektrontransporten leder till att de positiva metalljonerna (katjonerna) tar upp elektroner så att ren metall bildas. Den elektrolytiska cellen kan också användas som ett analytiskt kemiskt verktyg men detta tas inte upp i detta kompendium.

Galvanisk cell

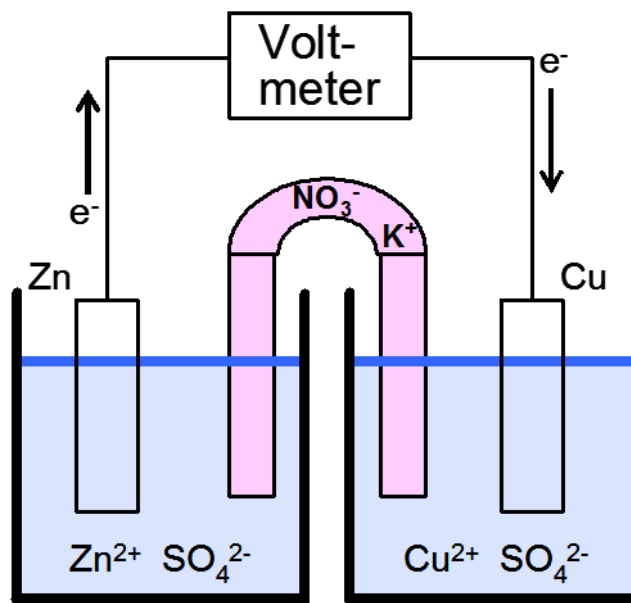
Exempel på en galvanisk cell ges i Figur 22. Den spontana redoxreaktionen gör att metallisk zink ger ifrån sig elektroner så att zinkjoner bildas vilka går ut i lösningen:



Elektronerna leds via metalltråden till den kopparelektroden där elektronerna fångas upp av kopparjoner:



Strömmen av elektroner mäts av voltmeter som en elektrisk spänning. Hur mycket ström som levereras beror på zinkens och kopparjonernas benägenhet att reagera.



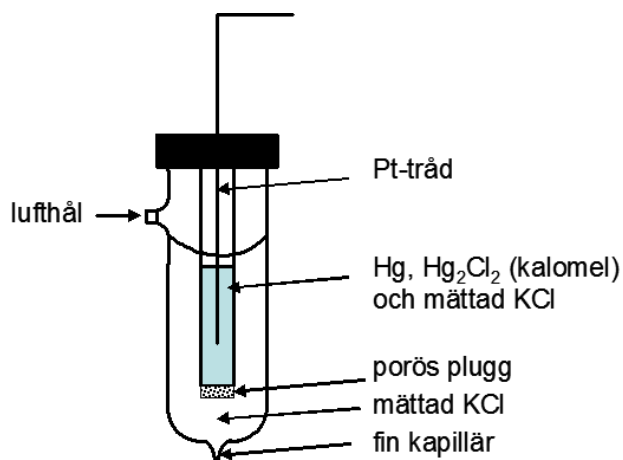
Figur 22: Galvanisk cell

Den elektrokemiska reaktionen bygger upp en energiskillnad mellan elektroden och elektrolyten i resp. cellhalva, en s. k. elektropotential. En enskild cellhalvas elektropotential kan inte mätas, se längre fram. När man kopplar ihop de två cellhalvorna kommer dessa att sträva efter att utjämna skillnaden i energi, dvs. skillnaden i elektropotentialen. Denna energiskillnad kallas för potentialskillnad. Detta gör att elektronerna strömmar mot den elektrod som har högst energi. Skillnaden i elektropotential mellan de två hopkopplade halvcellerna kallas för elementets elektromotoriska spänning, ems. I viss litteratur används begreppet elektromotorisk kraft, emk. Mätning av galvaniska elements ems kallas för potentiometri. Detta kan bl. a. användas för att beräkna koncentrationen av den ena cellhalvans joner, exempelvis pH.

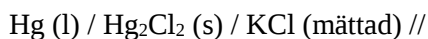
Referenselektroder

Eftersom man inte kan mäta enstaka elektropotentialer utan endast skillnaden mellan två elektropotentialer har man infört en jämförelseelektrod, referenselektrod, mot vilken man kan mäta alla elektropotentialer. En vanlig referenselektrod är kalomelektroden. Hela elektroden utgör en cellhalva som doppas ner i den lösning man skall mäta ems mot. Kalomelektroden består av ett inre glasrör försett med en porös glasplugg. I detta glasrör finns en mättad KCl-lösning i vilken Hg_2Cl_2 (kalomel) är uppslammad samt kvicksilver som står i kontakt med en platinatråd. Kalomel är ett svårslösligt salt och när löslighetsjämvikten inställt sig får Hg_2^{2+} -koncentrationen ett konstant värde och därmed blir också elektropotentialen konstant. Mätt mot en normalvätgaselektrod blir elektropotentialen för kalomelektroden 0,24 V. I denna elektrod ersätts saltbryggan av en tunn kapillär. Ibland kan man också använda en porös glasplugg istället.

Halvcellens reaktion: $\frac{1}{2} \text{Hg}_2\text{Cl}_2 (\text{s}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Hg} (\text{l}) + \text{Cl}^-$



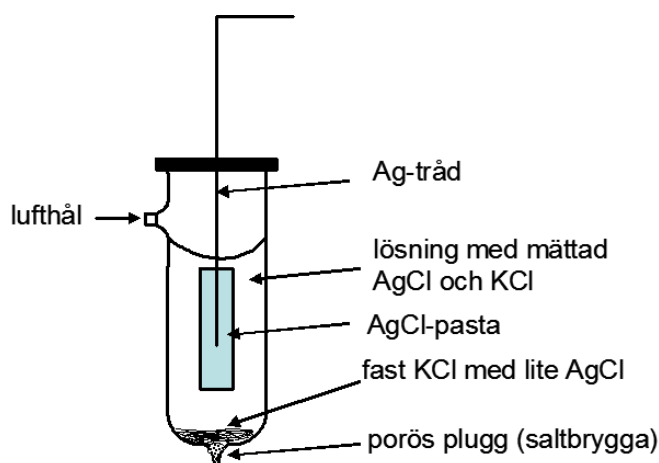
Figur 23: Kalomelelektrod



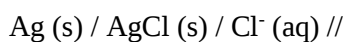
Observera att när kalomelelektroden används kommer den uppmätta ems att visa ett värde som är 0,24 V högre än om man skulle använda en normalvätgaselektrod. Om man vill bestämma en halvcells normalpotential måste man ta hänsyn till denna skillnad.

Eftersom kalomelelektroden innehåller kvicksilver har man idag övergått till att använda en silver-silverkloridelektrod som referenselektrod. I denna elektrod har man ersatt kvicksilver/kalomel mot Ag/AgCl. Denna elektrod är mycket enklare i sin uppbyggnad jämfört med kalomelelektroden. Elektrolyten består av en vattenlösning mättad med KCl och AgCl i vilken en silvertråd med en beläggning av AgCl-pasta är nersänkt. AgCl är ett svårslösligt salt vilket gör att när löslighetsjämvikten är inställd blir Cl⁻-koncentrationen konstant. Mätt mot en normalvätgaselektrod blir elektrodpotentialen 0,20 V. Precis som för kalomelelektroden måste man ta hänsyn till detta när man vill bestämma olika halvcellers normalpotential.

Halvcellens reaktion: $\text{AgCl (s)} + \text{e}^- \rightarrow \text{Ag (s)} + \text{Cl}^-$

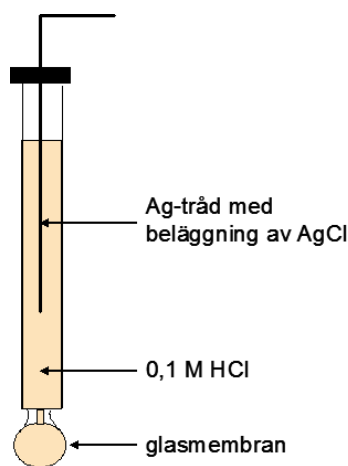


Figur 24: Silver-silverkloridelektrod



Koncentrationselement – pH-mätning

Om man kopplar ihop två halvceller med samma redoxsystem som endast skiljer sig i koncentration, kommer man att kunna mäta en spänning över elektroderna. Detta innebär att ström inte bara passerar mellan två halvceller med olika redoxsystem utan också mellan likadana halvceller. Denna typ av celler kallas för koncentrationselement. Koncentrationselement används bl. a. vid pH-mätning. För pH-mätning används idag särskilda elektroder där glaselektroden är den vanligaste. Den består ofta av en Ag/AgCl-elektrod omgiven av saltsyra 0,1 M. Denna saltsyralösning skiljs från den lösning vars pH man skall mäta genom ett glasmembran. Detta glasmembran har förmåga att leda elektrisk ström när vätejoner finns i lösningen. En potentialskillnad som är beroende av de båda lösningarnas pH uppstår över membranet.

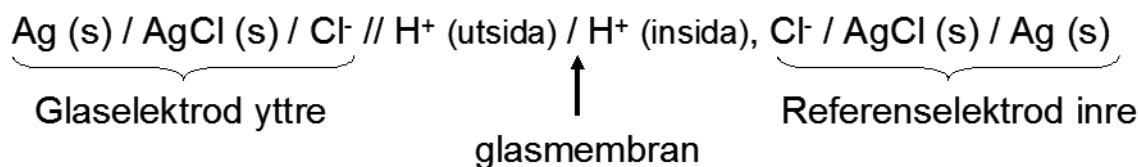


Figur 25: Glaselektrod

Ag, AgCl / HCl / glasmembran / lösning //

Glaselektroden doppas ner i den lösning man vill mäta pH på och som referenselektrod kan silver-silverkloridelektroden användas.

Den idag allra vanligaste glaselektroden är den s. k. kombinerade glaselektroden där referenselektroden är inmonterad i glaselektroden. På marknaden finns det olika typer av kombinerade glaselektroder där sammansättningen i referens resp. glaselektrodens lösningar skiljer sig åt. Ett exempel på en sådan kombinerad elektrod ges i Figur 26.



Figur 26: Kombinerad elektrod

Som tidigare visats finns det ett samband mellan E_{cell} och pH. För att göra korrekta mätningar av pH måste elektroden kalibreras regelbundet. Detta görs mot väl definierade buffertar med exakt pH. Den vanligaste kalibreringen görs mot pH 7,00 och pH 4,01. Vid kalibreringen används följande samband (av potentiometern):

$$E = \alpha + \beta \times 0,05916 \times \text{pH}$$

Värdet på konstanterna α och β får man vid kalibreringen. β har oftast värden $> 0,98$, idealvärdet är 1.

Titration

Syror och baser kan haltbestämmas med s.k. acidimetrisk titration (syra-bas-titration). Vid titration av en syra tillsätter man en stark bas med känd koncentration och vid titration av en bas tillsätter man en stark syra. Vid en titration har man det protolytiska provet (= titranden) löst i vatten och med hjälp av en byrett tillsätts lösningen av den starka syran/basen (= titratoren). Under titrationens gång omvandlas titranden till sin korresponderande form, och när allt prov omvandlats har man nått ekvivalenspunkten, EP.

Titrationens förlopp är lättast att överblicka om pH mäts efter resp. tillsats av titrator. En kalibrerad pH-elektrod kan mäta pH med stor noggrannhet efter varje tillsats. Om man avsätter pH mot volym titrator i ett diagram erhålles en titrationskurva.

Starka syror titreras vanligen med NaOH vilket kommer att ge reaktionen:



Under titrationens gång reagerar all tillsatt NaOH med syran. Före EP styr syran pH i vattenlösningen. I EP är all syra förbrukad och då styrs pH av vattnets jonprodukt, dvs $\text{pH} = 7,0$. Efter EP styrs pH av överskottet NaOH.

När man titrerar starka syror med starka baser fås start-pH ur lösningens koncentration och EP kommer alltid att ligga i pH 7.

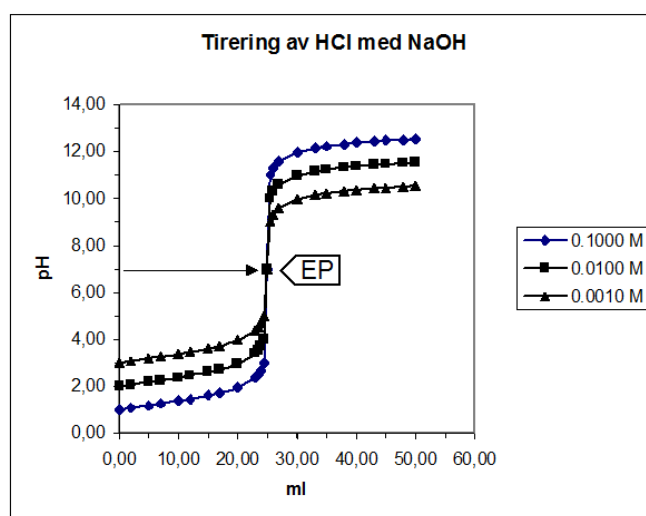
I Tabell 2 visas hur pH, $[\text{H}_3\text{O}^+]$ och $[\text{OH}^-]$ förändras när 25,00 ml av 0,1000 M HCl titreras med NaOH 0,1000 M. Tabellen är teoretiskt framräknad med hänsyn tagen till volymförändringen. Observera att initialt sker små förändringar i pH när relativt stora volymer titrator sätts till. Jämför detta med buffertkapaciteten som diskuterades i samband med pH-buffertar.

Titrationens förlopp är lättast att överblicka om data i tabellen nedan, ritas upp som en titrationskurva där pH är avsatt mot volym titrator.

Som man kan se i Tabell 2 och i titrationskurvan nedan, så medför mycket små tillsatser av titrator mycket stora pH-förändringar när man närmar sig EP vilket gör att man får ett titrationsprång. Titrationsprångets storlek är beroende av både titratorns och titrandens koncentration, ju högre koncentrationer desto större språng.

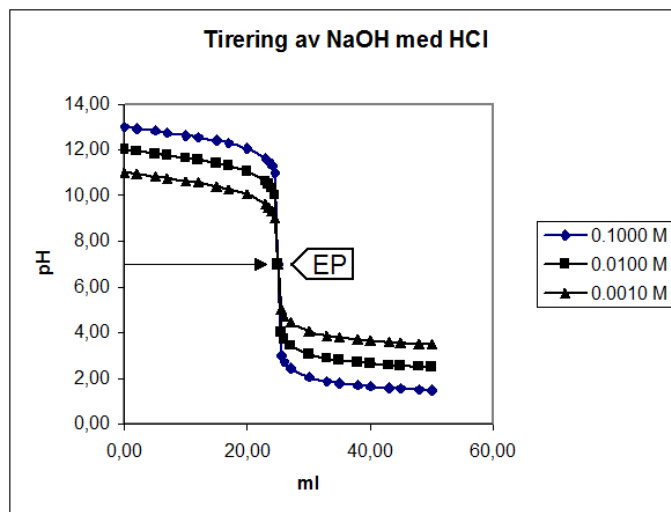
Tabell 2: Titrering av stark syra med stark bas

ml NaOH	pH	$[H_3O^+]$	$[OH^-]$
0	1,00	1,000E-01	1,000E-13
1,00	1,03	9,231E-02	1,083E-13
5,00	1,18	6,667E-02	1,500E-13
10,00	1,37	4,286E-02	2,333E-13
15,00	1,60	2,500E-02	4,000E-13
20,00	1,95	1,111E-02	9,000E-13
24,00	2,69	2,041E-03	4,900E-12
24,90	3,70	2,004E-04	4,990E-11
24,95	4,00	1,001E-04	9,990E-11
24,99	4,70	2,000E-05	4,999E-10
24,995	5,00	1,000E-05	9,999E-10
24,999	5,70	2,000E-06	5,000E-09
24,9995	6,00	1,000E-06	1,000E-08
24,9999	6,70	2,000E-07	5,000E-08
25,00	7,00	1,000E-07	1,000E-07
25,0001	7,30	5,000E-08	2,000E-07
25,0005	8,00	1,000E-08	1,000E-06
25,001	8,30	5,000E-09	2,000E-06
25,005	9,00	1,000E-09	9,999E-06
25,01	9,30	5,001E-10	2,000E-05
25,05	10,00	1,001E-10	9,990E-05
25,10	10,30	5,010E-11	1,996E-04
26,00	11,29	5,100E-12	1,961E-03
40,00	12,36	4,333E-13	2,308E-02
50,00	12,52	3,000E-13	3,333E-02



Figur 27: Titrerkurvor för titrering av HCl med NaOH, samma koncentration för båda

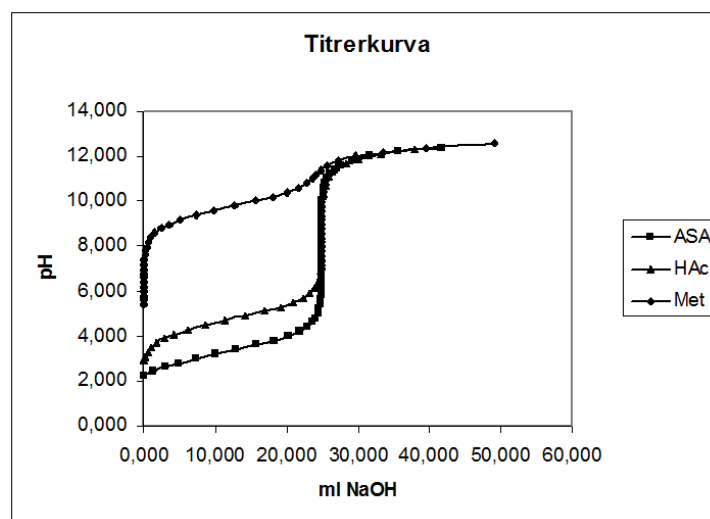
Starka baser titreras vanligen med HCl. Start-pH vid denna titrering fås ur titrandens koncentration och vattnets jonprodukt. I nedan visas titrering av NaOH med HCl.



Figur 28: Titreringskurvor för titrering av NaOH med HCl, samma koncentration för båda

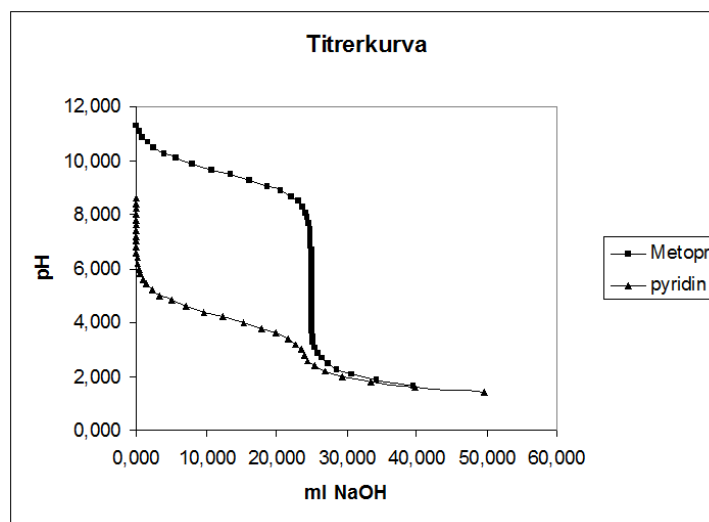
På samma sätt som för starka syror erhålls ett titrersprång, som är beroende av koncentrationen av både titrator och titrand.

Svaga syror titreras ofta med NaOH. Start-pH beror av titrandens pK_a och koncentration samt vattnets jonprodukt. Vid EP har all syra omvandlats till dess korresponderande bas. För svaga syror minskar titrersprånget med ökande pK_a , dvs ju svagare syran är desto mindre titrersprång. Figuren nedan visar en NaOH-titrering av tre svaga syror med olika pK_a i 25,00 ml vatten med koncentrationen 0,1000 M. NaOH-koncentrationen är 0,1000 M. När pK_a -värdet närmar sig 10 (som för metolazon i Figur 29) så är språnget obetydligt.



Figur 29: Titrering av Acetylsalicylsyra, ASA ($pK_a = 3,36$), ättiksyra, HAc ($pK_a = 4,76$) och metolazon, Met ($pK_a = 9,77$)
Startkoncentration = 0,1000 M

Svaga baser titreras oftast med HCl. På samma sätt som för svaga syror styrs titrersprångets storlek av pKa-värdet. Här gäller däremot att titrersprånget minskar med minskande pKa, dvs. ju svagare bas desto mindre språng. Figur 30 visar en HCl-titrering av två svaga baser med olika pKa i 25,00 ml vatten och koncentrationen 0,1000 M. På samma sätt som för syror kan pKa-värdet bestämmas när man nått $\text{pH} = \text{pKa}$. HCl-koncentrationen är 0,1000 M. När pKa-värdet närmar sig 4 är det uppenbart att språnget är obetydligt.



Figur 30: Titring av Metoprolol, Metopr ($\text{pKa} = 9,54$) och pyridin ($\text{pKa} = 4,2$). Startkoncentration = 0,1000 M

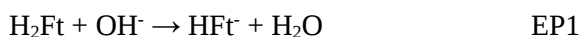
Kort sammanfattning

- Ju större titrersprånget är desto noggrannare blir värdet för volymen titrator i EP.
- Titrersprångets storlek beror på koncentrationen av titrand, ju högre koncentration desto större titrersprång. Gäller för både starka och svaga protolyter.
- För svaga protolyter styrs också titrersprångets storlek av pKa-värdet. För svaga syror ökar titrersprånget med minskande pKa-värde. För svaga baser ökar titrersprånget med ökande pKa-värde.

Flervärda protolyter

Flervärda protolyter har mer än en ekvivalenspunkt eftersom de antingen kan avge mer protoner eller ta upp fler protoner. En flervärd protolyt i sin grundform (oladdade form) har lika många ekvivalenspunkter som den har pKa-värden. En tvåvärd syra har två ekvivalenspunkter, EP1 och EP2. När man titrerar till EP1 har den lämnat ifrån sig en proton och när man titrerar till EP2 har den lämnat ifrån sig två protoner.

Exempelvis ftalsyra (H_2Ft) är en tvåvärd syra som kan titreras antingen till EP1 eller EP2:



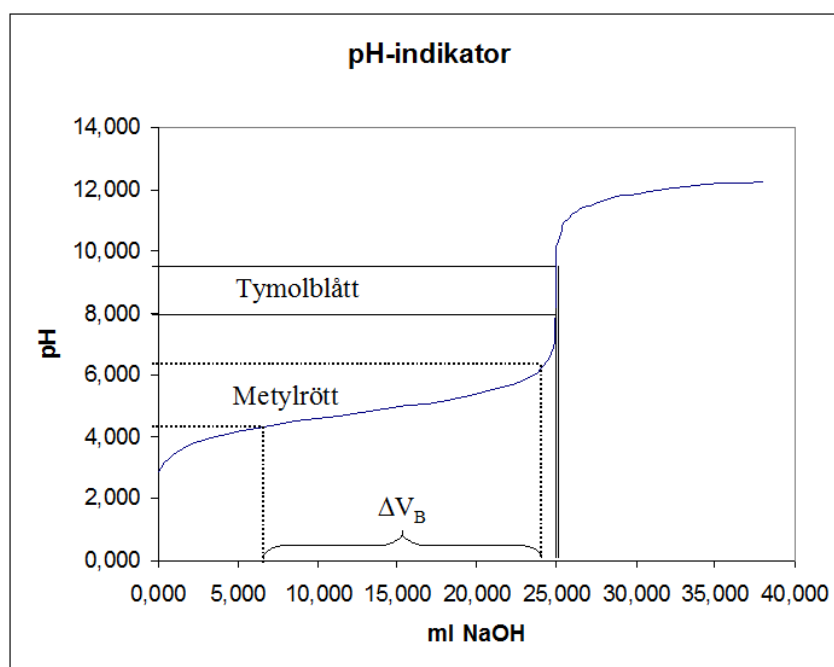
Om man titrerar till EP2 går det åt dubbelt så många mol av OH^- än vad man har H_2Ft vilket man måste ta hänsyn till när man skall räkna ut hur många mol man har av ftalsyran. Samma resonemang gäller för trevärda syror som har tre ekvivalenspunkter. För flervärda baser gäller samma sak. Tvåvärda baser har två ekvivalenspunkter och trevärda har tre.

Fastställande av ekvivalenspunkten (EP)

Ekvivalenspunkten vid en syra-bas titrering kan indikeras på två sätt. När man arbetar med utveckling av nya metoder är endast potentiometrisk bestämning (pH-meter) möjlig. När man utvecklat en metod som skall användas vid rutianalyser kan pH-indikator användas.

pH-indikator

En pH-indikator är ett syra-bas par där syran har en annan färg än korresponderande basen. pH-indikatorn har ett eller fler pK_a -värden vilket gör att färgen som indikatorn visar styrs av pH i lösningen. Indikatorn visar blandfärg i intervallet $pH = pK_a \pm 1$, vilket innebär att kvoten basform/syraform ligger i intervallet 0,1 - 10. Man brukar kalla detta pH-intervall för indikatorns omslagsintervall. Det finns ett antal olika pH-indikatorer med olika omslagsintervall. För att välja rätt bör man veta vid vilket pH som EP ligger. Väljer man fel indikator kommer den avlästa titratorvolymen att bli fel. Detta illustreras i figuren nedan där två olika indikatorer använts vid titrering av 25,00 ml 0,1000 M ättiksyra med 0,1000 M NaOH.



Figur 31: Omslagsintervall för pH-indikatorer

I figuren ovan är metylrött en felaktig pH-indikator. Den börjar visa blandfärg när man tillsatt ca 7 ml NaOH och fortsätter att visa blandfärg tills man tillsatt ca 24 ml. Detta är ett mycket stort osäkerhetsspann med avseende på volym tillsatt titrator. När det gäller tymolblått så visar den blandfärg i ett mycket snävt volymintervall vilket ligger på 25 ml. I detta exempel är det ingen tvekan om att tymolblått skall användas.

Anledningen till skillnaden mellan indikatorerna är att titrersprånget är relativt litet och det är i den mest lodräta delen som EP ligger.

När man titrerar starka protolyter kan de flesta indikatorer användas om titrandens koncentration är hög (0,1000 M). Är koncentrationen lägre begränsas urvalet.

Viktigt att komma ihåg när man använder pH-indikatorer är att dessa påverkar lösningens pH om man har en hög koncentration av dem. Oftast rekommenderar man att till 25,00 ml titrandlösning sätta 3 droppar av indikatorn. Sänker man titratorkoncentrationen för mycket kan man dock få problem med titreringen.

Färgindikatorer kan inte användas om man har för svaga protolyter. För syror gäller detta om pK_a -värdet > 6 och för baser om pK_a -värdet < 8 .

När man arbetar med potentiometrisk bestämning för att fastlägga EP är det, som ovan beskrivits, lätt att rita upp en titrerkurva. Det är dock ofta svårt att med stor noggrannhet se var ekvivalenspunkten ligger. I praktiken så fastställer de automattitratorer som finns idag EP genom att derivatera titrerkurvan och avsätta första eller alternativt andra derivatan mot ml titrator, vilket ger en bättre noggrannhet i bestämningen av EP.

Extraktion (engelska)

Liquid-liquid extraction is an isolation and separation method based on the distribution between two immiscible solvents that are in close contact with one another. The principle has been applied in preparative organic chemistry for more than a century. Metal ion extraction came into common use in the early 1940's through the introduction of organic chelating agents, which facilitated highly selective isolations. Extraction methods for organic compounds have undergone a rapid development, mainly due to the need for efficient and mild isolation procedures for trace amounts of organic compounds in biomedical, biochemical and environmental research. Principles for a systematic regulation of the degree of extraction have been developed, which make the liquid-liquid distribution technique suitable for very difficult isolations.

In liquid-liquid distribution methods the composition of the phases can be varied within wide limits, which provides potentials for very high separation selectivity. This chapter will concentrate mainly on the principles for liquid-liquid distribution of organic compounds in analytical procedures. The distribution will be discussed on a quantitative level, using equilibrium expressions for main and side processes. The same approach will be applied in discussions of the relation between molecular structure and distribution properties and the regulation of the distribution by changes in the properties of the phases.

Distribution principles

The distribution of a compound, B, between two immiscible phases can be described by the **distribution ratio**, D_B , which is defined as:

$$D_B = \frac{\text{total concentration of B in the less polar phase}}{\text{total concentration of B in the more polar phase}} = \frac{C_{B\text{org}}}{C_B} \quad (\text{Eq. 10})$$

The less polar phase is designated "the organic phase", and concentrations are given with the subscript *org*: $C_{B\text{org}}$ (the total concentration of all species containing B, in moles per litre of the organic phase), $[B]_{\text{org}}$ (the concentration of B itself, in moles per litre of the organic phase), etc. The more polar phase is designated "the aqueous phase", and concentrations are given without subscripts: C_B , $[B]$, etc.

When B is an uncharged compound, its distribution is governed by the **distribution constant**, $K_{D(B)}$, which is defined as:

$$\frac{[B]_{\text{org}}}{[B]} = K_{D(B)} \quad (\text{Eq. 11})$$

The distribution constant will change with the nature of the phases but is otherwise constant at constant temperature. The distribution ratio and the distribution constant will be equal if B is not involved in any secondary chemical equilibria ("side-reactions") in the aqueous or the organic phase.

Protolysis in the aqueous phase can have an influence on the distribution of acids and bases. A weak base, A, will partly be present as HA^+ in the aqueous phase and the extent of protolysis will depend on pH. If the base is extracted into the organic phase as A only, the distribution ratio is given by:

$$D_A = \frac{C_{A\text{org}}}{C_A} = \frac{[A]_{\text{org}}}{[A] + [HA^+]} \quad (\text{Eq. 12})$$

which combined with the expressions for the distribution constant of A (cf. (Eq. 11)) and the acid dissociation constant of HA^+ :

$$\frac{a_{\text{H}^+} \cdot [\text{A}]}{[\text{HA}^+]} = K'_{\text{HA}} \quad (\text{Eq. 13})$$

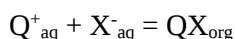
gives:

$$D_{\text{A}} = \frac{K_{\text{D(A)}} \cdot K'_{\text{HA}}}{a_{\text{H}^+} + K'_{\text{HA}}} \quad (\text{Eq. 14})$$

The distribution ratio will increase with decreasing a_{H^+} until a_{H^+} is negligible in comparison with K'_{HA}

An ionic compound can not be extracted alone as electroneutrality must prevail in each of the phases. However, it can be transferred between the phases if it is accompanied by an equivalent amount of a compound of the opposite charge (a counter ion). The two ions will form an association complex in the organic phase, usually called an ion pair.

The extraction of a cation, Q^+ , as an ion pair with the counter ion X^- , can be illustrated by the formula:



A quantitative expression for the distribution equilibrium is given by the **extraction constant**, $K_{\text{ex(QX)}}$ which is defined as:

$$\frac{[\text{QX}]_{\text{org}}}{[\text{Q}^+] \cdot [\text{X}^-]} = K_{\text{ex(QX)}} \quad (\text{Eq. 15})$$

The value of $K_{\text{ex(QX)}}$ will change with the interactions between solute and solvent molecules, i.e. with the nature of the phases. It should be noted that the extraction constant expresses the combined effect of the phase transfer and the ion pair formation. It will not give any insight into the sequence between the processes.

If no side-reactions occur, the distribution ratio of Q^+ is expressed by the equation:

$$D_{\text{Q}} = \frac{[\text{QX}]_{\text{org}}}{[\text{Q}^+]} = K_{\text{ex(QX)}} \cdot [\text{X}^-] \quad (\text{Eq. 16})$$

D_{Q} is governed by the concentration of the counter ion, X^- , in the aqueous phase. It will also change with the value of the constant, $K_{\text{ex(QX)}}$, which depends on the properties of the counter ion and the liquid phase. This indicates that the possibilities for regulating the distribution are considerably better on extraction of ion pairs than on extraction of uncharged molecules.

The ion-pair extraction principle can be used for all kinds of ionizable organic substances, but it offers particular advantages for compounds that are difficult to extract in uncharged form, such as highly hydrophilic acids and bases (e.g. aminophenols, amino acids, glucuronides) and for aprotic ions such as quaternary ammonium ions, sulfates and sulfonates.

Degree of extraction

When a compound, A, present in an aqueous solution, is extracted into an organic solvent by shaking the two phases until equilibration (= batch extraction), the percentage extracted into the organic phase, P_{org} , (= the degree of extraction) is given by the equation:

$$P_{\text{org}} = 100 \cdot \left(\frac{C_{\text{Aorg}} \cdot V_{\text{org}}}{C_{\text{Aorg}} \cdot V_{\text{org}} + C_{\text{A}} \cdot V_{\text{aq}}} \right) = 100 \cdot \frac{1}{1 + k'_{\text{A}}} \quad (\text{Eq. 17})$$

where:

$$k'_{\text{A}} = \frac{V_{\text{aq}}}{D_{\text{A}} \cdot V_{\text{org}}} \quad (\text{Eq. 18})$$

which can be expressed as:

$$P_{B(\text{org})} = 100 \cdot \frac{1}{1 + \frac{V_{\text{aq}}}{V_{\text{org}} \cdot D_{\text{B}}}} \quad (\text{Eq. 19})$$

The degree of extraction is controlled by the distribution ratio, D_{A} , and the volumes of the aqueous (V_{aq}) and the organic (V_{org}) phases.

The extraction of a compound into the organic phase can in practice often be regarded as quantitative when $P_{\text{org}} > 99\%$, which corresponds to a distribution ratio of > 100 when equal phase volumes are used. The extraction can, on the other hand, often be regarded as negligible when the extraction degree is $< 1\%$, corresponding to a distribution ratio of < 0.01 .

The degree of extraction of compounds with low distribution ratios can be considerably improved by changing the volume ratio. A compound with $D_{\text{A}} = 10$ will only be extracted to about 91 % with equal phase volumes, while 99 % extraction is obtained by using $V_{\text{org}}/V_{\text{aq}} = 10$. In practice it is not suitable to use $V_{\text{org}}/V_{\text{aq}}$ higher than 100.

Repeated extractions

In the case of compounds with low distribution ratios, it is always possible to obtain an increased degree of extraction by repeated extractions, as demonstrated by the following examples.

An aqueous solution containing y moles of A is extracted with an organic solvent. After equilibration, x_1 moles remain in the aqueous phase. The distribution ratio of the compound is given by the formula:

$$D_{\text{A}} = \frac{C_{\text{Aorg}}}{C_{\text{A}}} = \frac{y - x_1}{x_1} \cdot \frac{V_{\text{aq}}}{V_{\text{org}}} \quad (\text{Eq. 20})$$

which gives:

$$x_1 = \frac{y}{1 + \frac{D_{\text{A}} \cdot V_{\text{org}}}{V_{\text{aq}}}} \quad (\text{Eq. 21})$$

If the extraction is repeated with an identical volume of the organic solvent, the number of moles in the aqueous phase after n extractions is:

$$x_n = \frac{y}{\left(1 + \frac{D_A \cdot V_{org}}{V_{aq}}\right)^n} \quad (\text{Eq. 22})$$

The percentage remaining in the aqueous phase after n extractions, $P_{n,aq}$, can be calculated from the formula:

$$P_{n,aq} = \frac{100}{\left(1 + \frac{D_A \cdot V_{org}}{V_{aq}}\right)^n} \quad (\text{Eq. 23})$$

Repeated extractions are often difficult to perform with good precision, and it is usually not advisable to run more than 3-4 extractions of the same solution. Tabell 3 shows the degree of extraction that can be obtained under these conditions as calculated by eq. (23).

Tabell 3: Degree of extraction by repeated extractions with organic solvents

$\frac{D_A \cdot V_{org}}{V_{aq}}$	$P_{n,org}(\%)$			
	n=1	n=2	n=3	n=4
1	50.0	75.0	87.5	93.7
3	75.0	93.7	98.5	99.6
5	83.3	97.2	99.5	99.9

It is obvious that quantitative extraction cannot be obtained by repeated extraction if $DA \cdot V_{org} / V_{aq}$ is smaller than 3. When high precision is wanted, it is usually not possible to use a phase volume ratio, V_{org} / V_{aq} , higher than 10. Consequently repeated batch extraction can hardly give a quantitative yield if the distribution ratio is lower than 0.3.

Intermolecular interactions in liquid-liquid distribution systems

The distribution of a substance between two immiscible liquid phases depends on the physical and chemical interactions between the solvent and the solute in the two phases, i.e. the structure of the molecules. The distribution ratio is a quantitative measure of the relative strength of these interactions.

The intermolecular interactions are of widely differing origin and strength. The reversible interactions of a mainly physical character are in an approximate order of increasing strength:

1. Dispersion interaction
2. Dipole orientation interaction and dipole-induced dipole interaction (induction)
3. Hydrogen bonding or other electron donor-acceptor interactions
4. Ionic bonding of other ions or dipoles.

It is usually not possible to make a quantitative assessment of the influence of all these factors on the distribution of a solute in a liquid-liquid system. Estimates of practical importance can, however, often be made on the basis of a qualitative discussion that takes into account both the lipophilic (hydrophobic) character of the solute and specific interaction forces.

Dispersion forces (1) are nonspecific in nature and exist between any adjacent pair of organic molecules. The origin of the dispersion forces is the oscillating movements of the electrons of the molecule which give rise

to an electrical dissymmetry (i.e. an instantaneous dipole). This polarizes the electron cloud in adjacent molecules, inducing dipoles of opposite polarity, which attract the original dipole.

Extension of an alkyl chain gives a contribution per methylene group that is very nearly the same for all kinds of solutes in a certain liquid-liquid system. The physico-chemical background of the effect is still incompletely understood but it is not probable that the increase is due to specific intermolecular bonding.

The interaction forces 2-4 are specific in nature and play an important role for the distribution in many extraction systems. Two adjacent molecules with permanent dipole moments attract each other electrostatically and dipole orientation occurs when the positive head of one dipole is positioned close to the negative head of the other dipole. A molecule with a permanent dipole also induces temporary dipoles in an adjacent molecule, which also results in an interaction.

Hydrogen bonding is by far the most common of the specific interaction forces in extraction systems. It arises from the interaction of a proton-donor group (e.g. -OH, =NH, -SH, H-CCl₃) with a proton acceptor, i.e. a group or atom with unpaired electrons. In general, the strength of a hydrogen bond increases with the acidic strength of the proton-bearing group (CHCl₃ < alcohols < phenols < thio-phenols < strong acids) and with increasing basicity of the proton acceptor group (sulphides < unsaturated hydrocarbons < nitriles < neutral oxygen compounds < amines). Examples of proton donors and proton acceptors are given in Tabell 4.

Tabell 4: Hydrogen-bonding groups

Group	Proton donors	Group	Proton acceptors
-OH	Alcohols Carboxylic acids Phenols Water	-O-	Alcohols Aldehydes Amides Carboxylic acids
=NH	Amides Amines, primary and secondary Ammonia Pyrrol		Esters Ethers Ketones Phenols Water
≡ CH	Chloroform Methylene chloride	=N-	Nitriles Amines Ammonia Pyridine Pyrrol

From these relationships it follows that hydrogen-accepting solvents such as ethers, esters or ketones should be used when an increase of the extraction of hydrogen-donating solutes, e.g. organic acids, is needed, while weakly hydrogen-donating solvents such as chloroform and methylene chloride are suitable extracting agents for amines and other hydrogen-accepting solutes. Higher alcohols have high extracting ability for both hydrogen-donating and hydrogen-accepting solutes.

The extracting ability of the organic phase can be modified by an addition of a component with a different ability to bind the solute. Higher alcohols as well as more strongly hydrogen-bonding agents such as trioctylphosphine oxide, tributyl phosphate or fluorinated alcohols are usually diluted with hydrocarbons, e.g. hexane or decane. Modifiers that are easily soluble in both phases should be avoided as they can give rise to noncalculable changes of the properties of the system.

Interactions in systems with an aqueous polar phase

The polar phase is aqueous in most extraction systems. Due to strong intermolecular hydrogen bonding, the water molecules are highly associated and interact with hydrocarbons and other nonpolar compounds only to a very small extent. Introduction of a hydrophilic group in a hydrocarbon will increase its binding to the aqueous phase but the effect varies strongly with the character of the substituent. Ionic compounds as well as lower amines, alcohols, carboxylic acids and carbonyl compounds show particularly strong interaction with the water molecules. If a molecule contains several hydrophilic groups, their effect will depend on their relative positions. Hydrogen bonding between two substituents increases the hydrophobicity: 2-hydroxybenzoic acid has a considerably higher distribution constant ($\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$) than 3- and 4-hydroxybenzoic acids. Transposition of alkyl substituents at a hydrogen-bonding group can also have a significant effect: n-hexylamine and triethylamine contain the same number of alkyl carbons but the distribution constant of the primary amine is three times higher than that of the tertiary amine.

Regulation of the distribution ratio by the organic phase

The extraction of a compound changes with the binding ability of the organic solvent. An example is given in Figur 32 which shows how the distribution constant of a secondary amine, nortriptyline, and its N-methyl derivative, amitriptyline, depends on the hydrogen-bonding ability of the organic phase. The amines show a much higher distribution to the hydrogen-donating chloroform and methylene chloride than to the hydrogen-accepting solvents (ethyl acetate, methylisobutyl ketone, diethyl ether).



Figur 32: Extraction of nortriptyline (○) and amitriptyline (Δ) as bases into different solvents

The influence of the organic solvent on the extraction of ion pairs is illustrated in Tabell 5, which gives extraction constants of some quaternary ammonium ions, tetrabutylammonium, trimethylethylammonium and its monohydroxy derivative (choline), as picrates. Non-polar solvents, such as carbon tetrachloride, extract the ion pairs to a much lower extent than the more polar chloroform and methylene chloride. A considerable increase of the extraction constant is obtained when hydrogen bonds are formed between solute

and solvent as between the ion pairs of the hydrogen-donating choline and ethyl acetate or methylisobutyl ketone.

Tabell 5: Extraction of picrate ion pairs

Organic phase	$\log K_{ex(QX)}$		
	TBA *	TMEA *	Choline *
1-pentanol	-	1.24	1.19
Methylisobutyl ketone	-	0.64	0.98
Ethyl acetate	-	0.45	0.69
Methylene chloride	6.68	0.77	-0.32
Chloroform	5.91	0.04	-1.45
Benzene	3.59	-	-
Carbon tetrachloride	1.94	-	-

TBA*=tetrabutylammonium

TMEA*=trimethylethylammonium

Choline*=2-hydroxyethyltrimethylammonium

Complex formation in organic phase

The distribution ratio can be varied systematically if the distribution process is combined with a complexation to a hydrophobic agent in the organic phase.

When an uncharged compound, B, is extracted into an organic phase that contains a hydrophobic, uncharged complexing agent, S, and the complexes BS and BS₂ are formed in the organic phase, the extraction is governed by the following equilibria:



The distribution ratio is then given by:

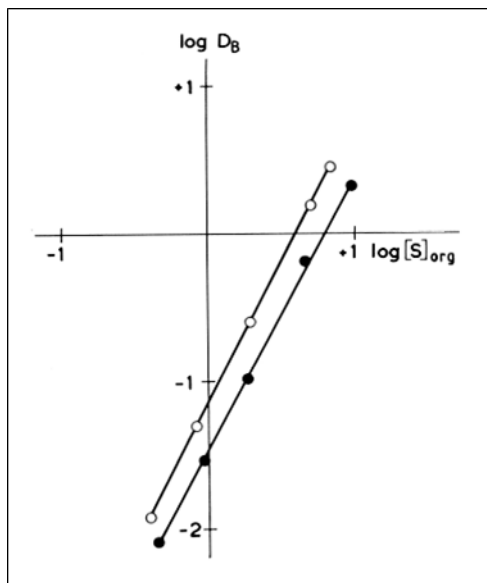
$$D_B = K_{D(B)}(1 + K_{BS} \times [S]_{org} + K_{BS_2} \times [S]_{org}^2) \quad (\text{Eq. 27})$$

D_B can be controlled by the nature of the organic solvent and the complexing agent, S, (which affect K_{D(B)}, K_{BS} and K_{BS₂}) and by the concentration of S. If one complex dominates, eq. (27) can be simplified and given the following logarithmic form:

$$\log D_B = \log (K_{D(B)} \times K_{BS}) + n \log [S]_{org} \quad (\text{Eq. 28})$$

A plot of log D_B versus log [S]_{org} will then give a straight line. The slope of the line, n, is a formal expression of the number of S molecules in the complex. A non-linear relation between log D_B and log [S]_{org} might indicate that complexes of different stoichiometry are present.

Linear relationships in accordance with eq. (28) are often obtained when hydrogen-bonded complexes are formed. An example is given in Figur 33 which demonstrates the influence of two hydrogen-accepting agents, ethyl acetate and diethyl ether, on the partition of the hydrogen-donating diphenol hexestrol, (3,4-bis(4-hydroxyphenyl)hexane), between ethylene glycol and cyclohexane. The linearity of the curves shows that one complex dominates in the organic phase. The slope is about 2 for both the complexing agents, which indicates that the complexes have the same stoichiometry.



Figur 33: Relation between distribution ratio of hexestrol and the concentration of a hydrogen-accepting agent (S) in the non-polar solvent

Influence of protolysis on distribution ratio

On protolysis, acids and bases acquire a change in charge that strongly affects their distribution in uncharged form and as ion pairs. Varying the pH of the aqueous phase is a common way of regulating the distribution ratio of protolytic compounds. A good survey that will simplify the choice of extraction conditions can be obtained by simple diagrams, as demonstrated below.

Extraction of weak protolytes in uncharged form

The extraction of an acid, HX, in uncharged form is governed by the following equilibrium expressions, when protolysis in the aqueous phase is the only sidereaction:

$$D_{\text{HX}} = \frac{C_{\text{HXorg}}}{C_{\text{HX}}} \quad (\text{Eq. 29})$$

$$K_{\text{D(HX)}} = \frac{[\text{HX}]_{\text{org}}}{[\text{HX}]} \quad (\text{Eq. 30})$$

$$C_{\text{HXorg}} = [\text{HX}]_{\text{org}} \quad (\text{Eq. 31})$$

$$C_{\text{HX}} = [\text{HX}] + [\text{X}^-] \quad (\text{Eq. 32})$$

Combination of these eqs. with the expression for the acid dissociation constant, K'_{HX} , gives:

$$D_{\text{HX}} = \frac{K_{\text{D(HX)}} \cdot a_{\text{H}^+}}{K'_{\text{HX}} + a_{\text{H}^+}} \quad (\text{Eq. 33})$$

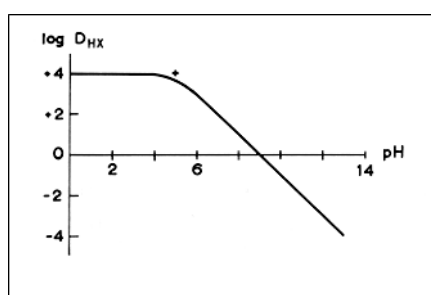
Which can also be expressed as:

$$D = \frac{K_D}{1 + \frac{K_a}{[H_3O^+]}}$$

(Eq. 33)

A computation of $\log D_{HX}$ can be made in a diagram with pH as the independent variable. The curve for $\log D_{HX}$ follows construction lines parallel to the pH-axis to the left of the construction (system) point and with a slope of -1 to the right. The curve deviates from the construction lines in the vicinity of the construction point and passes 0.3 log units under it.

Figur 34 shows a diagram for an acid with $\log K_{D(HX)} = 4.0$ and $pK'_{HX} = 5.0$. The acid can be extracted quantitatively with equal phase volumes if $pH < 7.0$. At $pH > 11.0$ the extraction is negligible



Figur 34: Relation between the distribution ratio and pH

The extraction of a weak base, A, in uncharged form can be calculated analogously. The following expression is obtained:

$$D_A = \frac{K_{D(A)} \cdot K'_{HA}}{a_{H^+} + K'_{HA}} \quad (\text{Eq. 34})$$

$K_{D(A)}$ is the distribution constant and K'_{HA} the acid dissociation constant. The variation of $\log D_A$ with pH can be illustrated by a diagram where the line for $\log D_A$ is parallel with the pH-axis to the right and has a slope of +1 to the left and passes 0.3 log units under the construction (system) point ($pH = pK'_{HA}$; $\log D_A = \log K_{D(A)}$).

Simultaneous extraction of weak protolyte as ion pair and base

The extraction of an amine, A, from an aqueous phase containing the aprotic anion X^- , is taken as an example. The amine is extracted as the ion pair HAX at low pH, and in uncharged form at high pH. When a simultaneous extraction of the ion pair HAX and the base A occurs, the total concentration of A in the organic phase is given by:

$$C_{Aorg} = [A]_{org} + [HAX]_{org} \quad (\text{Eq. 35})$$

while the total concentration in the aqueous phase is given by:

$$C_A = [A] + [HA^+] \quad (\text{Eq. 36})$$

This gives the following expression for the distribution ratio of A:

$$D_A = \frac{C_{Aorg}}{C_A} = \frac{[A]_{org} + [HAX]_{org}}{[A] + [HA^+]_{org}} \quad (\text{Eq. 37})$$

which can be combined with the expressions for the extraction constant, $K_{ex(HAX)}$, the distribution constant, $K_{D(A)}$, and the acid dissociation constant, K'_{HA} , to the equation:

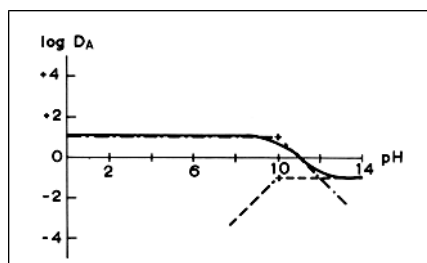
$$D_A = \frac{K_{D(A)} \cdot K'_{HA}}{K'_{HA} + a_{H^+}} + \frac{K_{ex(HAX)} \cdot [X^-] \cdot a_{H^+}}{K'_{HA} + a_{H^+}} \quad (\text{Eq. 38})$$

The dependence of $\log D_A$ on pH, at constant concentration of the counter ion X^- , can be illustrated by a diagram obtained by combining the construction lines for the distribution as base and as ion pair.

The construction line for the distribution as base has the construction point ($\text{pH} = \text{p}K'_{HA}$; $\log D_A = \log K_{D(A)}$). The line for $\log D_A$ is parallel with the pH-axis to the right of the system point and has a slope of +1 to the left. The construction line for the extraction as ion pair has the system point ($\text{pH} = \text{p}K'_{HA}$; $\log D_A = \log K_{ex(HAX)} \times [X^-]$) and the line for $\log D_A$ is parallel with the pH-axis to the left of the system point and has a slope of -1 to the right.

The construction line for the total distribution of A follows the highest line in the diagram and passes 0.3 log units over the intersection point between the lines for the distribution as base and ion pair.

An example is given in Figur 35 which shows a diagram valid for $\log K_{ex(HAX)} = 2$, $[X^-] = 0.1$, $\log K_{D(A)} = -1$ and $\text{p}K'_{HA} = 10.0$. The figure shows that the extraction as ion pair dominates at pH below 11 while the extraction as base dominates at pH above 13. A simultaneous extraction of both species occurs mainly in the range pH 11-13.



Figur 35: Relation between the distribution ratio and pH of amine extractable as ion pair and base

Separation of protolytes

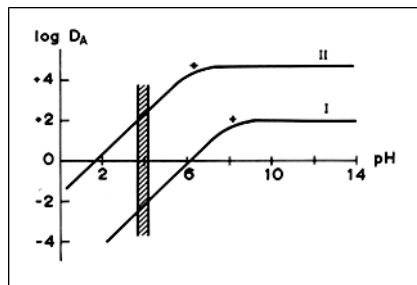
The graphical method for the calculation of distribution ratios, allows a systematic approach to the choice of conditions for separations by liquid-liquid distribution.

Separation of two compounds by a single extraction can be obtained if the quotient between the distribution ratios is $\geq 10^4$ and one of the compounds has a distribution ratio of 100 or more at equal phase volume while the other has a distribution ratio of less than 0.01. Two examples are given below.

Codeine and papaverine as bases

The extraction of codeine ($\log K_{D(A)} = 2.0$, $\text{p}K'_{HA} = 8.2$) and papaverine ($\log K_{D(A)} = 4.7$, $\text{p}K'_{HA} = 6.4$) into methylene chloride is illustrated in Figur 36. Papaverine is extracted quantitatively when $\text{pH} \geq 3.7$ while the extraction of codeine is negligible at $\text{pH} \leq 4.2$. A separation can be obtained by a single extraction in the pH-

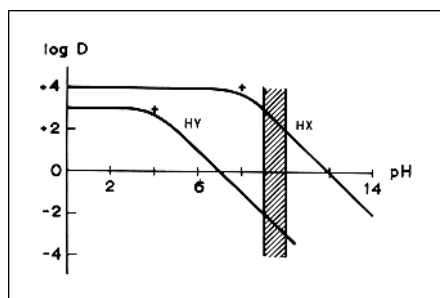
range 3.7-4.2 (the shaded area). Papaverine is extracted to the organic phase while codeine remains in the aqueous phase.



Figur 36: Separation of two weak bases: codeine (I) and papaverine (II).

Two acids

The extraction of the two acids HX ($\log K_{D(HX)} = 4.0$, $pK'_{HX} = 8.0$) and HY ($\log K_{D(HY)} = 3$, $pK'_{HY} = 4.0$) is shown in Figur 37. It can be seen that HX is quantitatively extracted when $pH \leq 10.0$ while the extraction of HY can be regarded as negligible when $pH \geq 9.0$. This means that a separation of the two acids can be obtained by a single extraction in the pH-range of 9-10 (the shaded area). HX will be extracted into the organic phase, while HY will remain in the aqueous phase.



Figur 37: Separation of two weak acids.

Extraction techniques

Liquid-liquid extraction

Batch extraction is the traditional technique. For analytical or other precision purposes it is often performed in centrifuge tubes, which are agitated until equilibrium is attained (usually 10-20 minutes). After centrifugation, the phases are separated by siphoning.

With certain types of samples, such as those of biological origin, vigorous shaking might give rise to emulsions that are so stable that they might remain even after centrifugation and prevent complete phase separation. The problem can often be avoided by a less intensive mixing of the phases. In difficult cases it might be necessary to use other methods, e.g. freezing the aqueous phase before removing the organic phase.

Column extraction

Compounds with low distribution ratios cannot as a rule be extracted quantitatively by batch extraction. A quantitative extraction can sometimes be achieved by column technique.

The aqueous solution of the compound is mixed with a hydrophilic support (cellulose powder or diatomaceous earth) and the mixture is packed in a tube. An organic phase is then passed through the tube

until complete extraction is obtained. The volume of organic phase required should be determined by experimental runs, since both the influence of the support and zone broadening are difficult to estimate.

Column extraction may offer considerable technical advantages in certain cases, e.g. for samples of biological origin, which may cause problems in batch extraction owing to the formation of more or less stable emulsions. Column extraction can also simplify the isolation of the components in commercial products (tablets, liquid mixtures), if the compounds have such widely differing distribution properties that they can only be extracted by using different organic solvents.

Liquid-solid extraction

Liquid-solid extractions are usually carried out with the adsorbent packed in a column. The aqueous sample solution is passed through the column and nonadsorbed impurities are removed by washing, usually with water of a suitable pH. The sample is then eluted with a solvent that will displace it from the adsorbent.

Löslighet av svaga protolyter

Många svaga organiska syror och baser (karboxylsyror, aminer, imider etc) är mer eller mindre svårslösliga i vatten. I mättad lösning i rent vatten föreligger dessa ämnen huvudsakligen i oprotolyserad form. Ändringar av lösningens pH som medför ökad jonisation av den svaga protolyten leder som regel till ökad löslighet. Om protolytens syrakonstant och dess löslighet i rent vatten (S_0) är känd, kan man beräkna protolytens löslighet S_x (= totala koncentration i mättad lösning) vid ett visst pH.

Principerna för dessa beräkningar demonstreras med nedanstående exempel. Beräkningarna är gjorda under förutsättningen att protolyten i joniserad form inte bildar svårslösligt salt med någon annan komponent i lösningen.

Svårslöslig, envärd syra (fenemal)

Fenemal (HP) är en svag syra med $pK_{HP} = 7.4$. Lösligheten i rent vatten (= fenemal är pH-bestämmande) $S_0 = 10^{-2.41}$ M. Svaga syrors löslighet ökar med ökande pH.

I den mättade lösningen i rent vatten gäller

$$S_0 = [HP] + [P^-] \quad (\text{ekv. 39})$$

I den mättade lösningen gäller att

$$[HP] \gg [P^-] \quad (\text{ekv. 40})$$

vilket ger

$$S_0 = [HP] \quad (\text{ekv. 41})$$

Ekv. 41 gäller i varje mättad lösning av fenemal (= när HP finns närvarande som fast fas). I en mättad lösning av fenemal med godtyckligt pH gäller ekvationerna:

$$S_x = [HP] + [P^-] \quad (\text{ekv. 42})$$

$$K_{a(HP)} = \frac{[H_3O^+][P^-]}{[HP]} \quad (\text{ekv. 43})$$

Insättning av ekv. 41 och 43 i ekv. 42 ger:

$$S_x = S_0 \left(1 + \frac{K_{a(HP)}}{[H_3O^+]} \right) \quad (\text{ekv. 43})$$

Ekv. 43 kan sedan användas för beräkning av lösligheten av fenemal vid godtyckligt pH. Ex. Beräkning av lösligheten vid pH 8,0 för fenemal:

$$S_x = 10^{-2.41} \left(1 + \frac{10^{-7.4}}{10^{-8.0}} \right) = 1,9 \times 10^{-2} \text{ M}$$

Svårslöslig, envärd bas (etylmorfin)

Etylmorfin (B) är en svag bas med $pK_{HB} = 8,9$. Lösligheten i rent vatten (etylmorfin är pH-bestämmande) $S_0 = 10^{-2.3}$ M. Svaga basers löslighet minskar med ökande pH.

I den mättade lösningen av etylmorfin i rent vatten gäller:

$$S_0 = [\text{HB}^+] + [\text{B}] \quad (\text{ekv. 44})$$

I den mättade lösningen gäller att:

$$[\text{B}] \gg [\text{HB}^+] \quad (\text{ekv. 45})$$

vilket ger:

$$S_0 = [\text{B}] \quad (\text{ekv. 46})$$

Ekv. 46 gäller i varje mättad lösning av etylmorfin (= där B finns närvarande i fast form). I en mättad lösning av etylmorfin med godtyckligt pH gäller ekvationerna:

$$S_x = [\text{B}] + [\text{HB}^+] \quad (\text{ekv. 47})$$

$$K_{a(\text{HB}^+)} = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{B}]}{[\text{HB}^+]} \quad (\text{ekv. 48})$$

Ur ekv. 46, 47 och 48 fås:

$$S_x = S_0 \left(1 + \frac{[\text{H}_3\text{O}^+]}{K_{a(\text{HB}^+)}} \right) \quad (\text{ekv. 49})$$

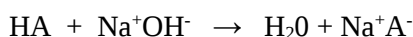
Beräkning av lösligheten av etylmorfin kan sedan göras med hjälp av ekv. 49. Ex: Beräkning av lösligheten av etylmorfin vid pH 10,0:

$$S_x = 10^{-2,3} \left(1 + \frac{10^{-10,0}}{10^{-8,9}} \right) = 5,4 \times 10^{-3} \text{ M}$$

Farmaceutiska aspekter på protolys och löslighet

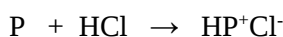
Många läkemedelssubstanser innehåller protolytiska funktionella grupper. Det är ofta viktigt att kunna bedöma protolysgradens storlek framförallt för att kunna avgöra om ett ämne föreligger i laddad eller oladdad form. Laddningen kan nämligen ha stort inflytande på ämnets egenskaper. Ett exempel är att kroppsvävnadernas förmåga att absorbera en läkemedelssubstans påverkas av om substansen är oladdad eller laddad. Ofta blir absorptionen bättre om läkemedlet är oladdat.

Ett annat exempel är att lösligheten av organiska ämnen oftast är högre när de är laddade. Många organiska ämnen är i själva verket svårlösliga i vatten när de befinner sig i oladdad form (och de flesta läkemedelssubstanser är ju organiska ämnen). Om man t ex behöver göra en läkemedelsberedning som skall utgöra en lösning (t ex en injektionslösning) måste man se till att läkemedlet har tillräckligt hög löslighet. Det kan man göra på följande sätt. Man ser till att substansen föreligger i löslig form, t ex som ett salt. Detta kan man göra med protolyter enligt följande reaktioner:



syra	bas	salt
	(OH ⁻)	(natriumsalt)

Genom protolysen med OH^- -jonen har nu den oladdade svårlösliga syraformen HA överförs till den laddade lösligare basformen A^- . Vid protolysen neutraliseras syran med den starka basen och det bildas vatten och ett salt, Na^+A^- . I lösningen dissocieras förstås saltet till natriumjon och A^- -jon. Saltet kan sedan isoleras som torr substans och man kan använda sin substans i denna form. Om ett svårlöst ämne, P, är basiskt kan man utnyttja följande protolysreaktion:



bas

salt

(hydroklorid)

Den oladdade basen får reagera med en stark syra och protoneras därvid fullständigt. Detta är också en neutralisation och det bildas ett kloridsalt, HP^+Cl^- . Ämnet P har alltså överförs till löslig form.

Många aminer är lättare att hanteras i form av salter än i form av fria baser vilket gör att de oftast endast finns tillgängliga som salter, vanligen som hydroklorider. Ett stort antal läkemedelssubstanser är aminer och om man t ex tittar i FASS upptäcker man att de ingår i läkemedlen i form av salter.

Ett annat sätt att påverka laddning och löslighet är att justera pH på den lösning som man har gjort av en protolyt. Då måste man naturligtvis känna till protolytens pK_a -värde. De vanligaste protolytiska grupperna är:

- karboxylgruppen (sur) med $\text{pK}_a \approx 5$
- fenolisk hydroxyl (sur) med $\text{pK}_a \approx 10$
- barbitursyror (sura) med $\text{pK}_a \approx 6 - 8$
- aminogrunder (basiska) med $\text{pK}_a \approx 9 - 11$