Kandidat-nr.: .....

Studieprogr.: ..... (frivillig)

NTNU
NORGES TEKNISK-
NATURVITENSKAPELIGE UNIVERSITET
INSTITUTT FOR KJEMI

Faglig kontakt under eksamen:
Institutt for kjemi;
F.-Aman. Rudolf Schmid
Tel. 735 96203, (evt. M.: 913 75 546)

Eksamen i emnet KJ 2053; KROMATOGRAFI

Mandag 1. juni 2015,
kl. 9.00 – 13.00 (4 timer)

Bokmål

Skriftlig svar på oppgavene 1 – 8 skal gis på oppgavearkene bak som skal innleveres

(bruk ekstra ark om nødvendig)

Hjelpemidler: D
Ingen trykte eller håndskrevne hjelpemidler tillatt.
Bestemt (godkjent) enkel kalkulator tillatt.

Dette oppgavesett består av 15 - femten - sider :
2 forsider (s. 0-1), 13 sider med 8 oppgaver (s. 2-14).

Vektingen av hver (del-)oppgave er oppgitt. Maks. poengtall er 103. Karakterskalaen (100%) tar utgangspunkt i 100 poeng.

Det er tillatt å levere besvarelsen på vanlig svarark (med gjennomskriv-kopi). Det skal **ikke** skrives **med blyant** på oppgavearkene, fordi du ikke kan ha med deg gjennomslag av svarene dine (ikke får din sikkerhetskopi).

Sign.
……..
Rudolf Schmid
Eksamensansvarlig faglærer

Oppgavesettet er kontrollert :

Sign.
……
Jon Erik Aaseng
Sensor

Sensurdato : Lørdag, 22.06.2015

Oppgave 1. *(7+3+6= 16 p.)*

1.a) Hva er sammenhengen …

(1p) (i) … mellom k, t_R og t_0 ?

(1p) (ii) … mellom k og R ?

(2p) (iii) … mellom N og N_{eff} ?

(2p) (iv) …. mellom N og R_S ?

(1p) (v) Hvordan kvantifiseres toppasymmetri i et kromatogram (gi en formel, evt. med en skisse)?

1.b) (i) Hva er minimumsverdiene for α og for R_S ?
(1 p)

…… **< α** ….. **< R_S**

(ii) Hva er separsjonstallet, SN (eng. *Separation Number*; også kjent som *Trennzahl*, TZ (fra tysk)) ? Beskriv kort med ord hva det er, hvordan du bestemmer/måler det, og gi formelen for utregning.
(2 p)

1.c) (i) Vis den forenklede van Deemter-likningen og navngi faktorene/variablene som forekommer i den.
(2 p)

(ii) Hva er Eddy-diffusjon innen kromatografi, hvor/når forekommer den, hvilke(n) faktor(er) bestemmer dens størrelse ?
(2 p)

(iii) List opp faktorene som har innflytelse på bidraget til båndspredning fra mobilfase-massetransfer.
(2 p)

Oppgave 2. *(5+2= 7p + 1 Bonus)*

2.a) (i) Hva menes med ”planar kromatografi” ? Nevn eksempler på slike teknikker.
(2 p)

(ii) Hvilke fordeler har planar kromatografi i forhold til kolonnekromatografi (HPLC) ?
(2 p)

(iii) Hva er de(n) mest vanlige retensjonsparameteren(e) brukt i planar kromatografi ?
(1 p)

(iv) BONUS
Er planar gasskromatografi (GTLC) en populær teknikk ? Forklar kort årsaken(e).
(1 p)

2.b)
(2 p) Beskriv kort prinsipp og typiske anvendelser av …

ENTEN : (Bio)affinitetskromatografi (BAC).
ELLER : Hydrofob(isk) interaksjonskromatografi (HIC),
ELLER : Isoelektrisk fokusering (IEF).

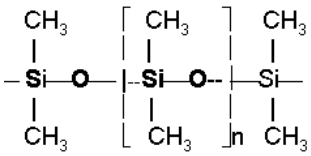
Oppgave 3. *(3+2+4+8=17 p pluss 1 Bonus)*

3.a) Når det gjelder gasskromatografi, beskriv likheter og forskjeller mellom kapillær-kolonner for bruk til hhv. GSC og GLC (med hensyn til oppbygging/innhold av dem).
(3 p)

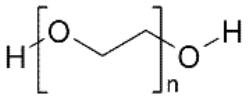
3.b) Hvilken GC-teknikk (om noen) kan brukes til å separere analyttene nedenfor:
(2 p) Kryss av for det som er aktuell, evt. kommenter.

analytt	GSC	GLC	GC ikke mulig	Hvorfor (kommentar) ?
metan og argon				
kinolin, bensofenon og 1-klor-naftalen				
insulin og hemoglobin				
sukkrose, glukose og glycerol				

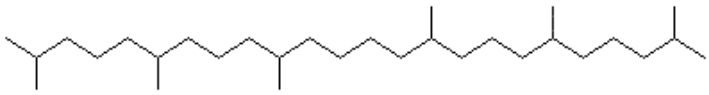
3.c) Strukturene **A** - **C** viser tre stasjonære faser som er til dels mye brukt innen GLC.



A



B



C (= Squalan)

(i) Hva er **A** og **B** ? Angi de generelle navnene på fasene, og hvordan er de som GLC-faser.
(2 p)

3.c (ii) Forbindelse **C** er squalan, som brukes bare i begrenset omfang i GC i dag:
Hva brukes Squalan som ? Hvorfor er det ikke i bruk i større omfang ?

(1 p)

(iii) Angi omtrentlig CP-indeks, som uttrykker polariteten, for de tre stasjonære fasene.

(1 p)

A: …… **B**: ……. **C** (=Squalan): …….

3.d) (i) Navngi og beskriv kort (evt. med skisse) injeksjonsteknikken du brukte i KJ2053-GC-forsøkene.

(4p)

(ii) Nevn 2 andre GC-injeksjonsteknikker (anta manuelle) som er vanlige for kapillærkolonner.

(1 p)

-

-

(iii) Hva er styrker og svakheter for injeksjons-teknikken vi brukte på lab.-forsøka våre (jfr. (i)), i forhold til alternative metoder (jfr. (ii)) ?

(3 p)

(iv) BONUS
Brukte vi septum i vår injeksjonsmetode på lab'en? Hvorfor / hvorfor ikke ?

(1 p)

Oppgave 4. *(3+3+7=13 p)*

4.a) (i) Hva er navnene, og forskjellen mellom hhv. HPLC og UHPLC ?
(1p)

(ii) Angi typiske dimensjoner for en LC-kolonne (lengde/indre diameter/partikkeldiameter)
(1p)

for HPLC ?

for UHPLC ?

(iii) Er de vanligste HPLC-kapillærkolonner i dag av typen pakket, PLOT- eller WCOT-kolonner ?
(1p)

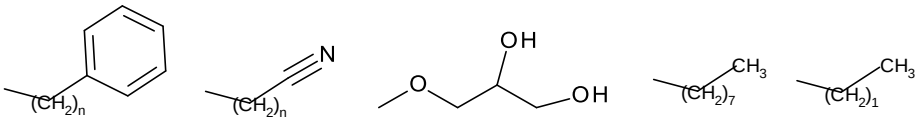
4.b) (i) I hvilke(n) kromatografisk teknikk(er) benyttes ubehandlet silikagel som pakningsmaterial ? Navgi, og forklar silikagelens rolle (meget) kort.
(2 p)

(ii) Vis et representativt utsnitt av den molekylære strukturen av overflaten av (ubehandlet) silikagel.
(1p)

4.c) (i) Hva er den mest benyttede stasjonære fasen (SF) ved omvendt-fase (RP) HPLC ?
(2p) Angi et spesifikt navn og representativ delstruktur.

(ii) Hvilken kjemisk svakhet har silikagel ved bruk i (bl.a.) omvendt-fase RP-HPLC, og hvilke alternative pakningsmaterialer brukes da når silikagel ikke kan brukes ?
(2p)

(iii) Kjemisk bundne faser (*Bonded Phases*) kan brukes med varierende substituenter som gir varierende SF-egenskaper. Ranger de følgene aktuelle substituentene etter ØKENDE polaritet (minkende RP-LC-retensjon):



(1p) alkylfenyl, nitrill (=cyano), diol, oktyl, etyl

(iv) Etter en analyseserie med sterkt forurensede prøver skal du grundig vaske
(1p) (tilbakespyle) din RP-HPLC-kolonne, noe som kan gjøres med en trinnvis gradient av løsningsmidler med økende styrke. Kolonnen ble sist brukt med eluenten 90:10 vandig natriumfosfatbuffer - metanol.
Foreslå en vaskesekvens med følgende varierte ”vaskemidler”:
metanol, toluen, aceton, vann, diklormetan.

(v) Hvorfor tar man seg i 4.c.(iii) bryet med å *snu* kolonnen for å *tilbake*-spyle den ?
(1p)

Oppgave 5. *(2+2+1=5 p)*

5.a) Ditt HPLC-system har en manuell ventil-injektor med 50 µL-"Loop".
Hva må du passe på m.h.t. prøvestørrelse når du skal injisere prøven med denne ?
Er det viktig, hva slags løsningsmiddelet prøven din består av ?

(2p)

5.b) I et HPLC-system har vi 2 seriekoblede detektorer, først en UV-detektor, så en ELSD (*Evaporative Light-Scattering Detector,* fordampnings-lysspredning-detektor). I en prøve observeres 4 topper i hvert kromatogram fra de to detektorene. Én topp, *A*, finnes bare i UV-kromatogrammet, en annen, *B*, finnes bare i ELSD-signalet.
Hva kan du si om de egenskapene (fysiske, kjemiske) til hhv. topp *A* og topp *B* som fører til dette ?
Hva om detektorene hadde blitt koplet i omvendt rekkefølge ?

(2p)

5.c) **ENTEN:** Når og hvorfor (og hvor) trengs avgasser *(eng.: degasser)* ved HPLC ?

ELLER: Hva er de tre egenskapene som HPLC-mobilfaser karakteriseres med / klassifiseres etter i 'Snyders selektivitets-trekant' ?

ELLER: Hvor i HPLC-analyser og i HPLC-systemet foretas filtreringer ?

(1p)

Oppgave 6. *(4+3 =7p)*

6.a) (i) Tegn en representativ del-struktur for en sterk anionebytter-funksjon.
(1p.)

(1p.) (ii) Tegn en representativ del-struktur for en sterk kationebytter-funksjon.

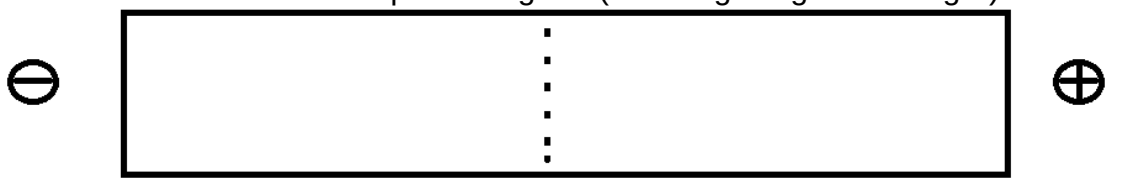
(iii) På hvilke måter (nevn 2) kan du øke mobilfase-styrken for ionebytter-kromatografi på en sterk kationbytter (ved konstant pH) ?
(2p.)

6.b) (i) Gelfiltrering (SEC) med MF-buffer med pH 4,5 eluerer proteinet X med en retensjonstid som er ca. dobbelt så lang som ved eluering med pH 7,4-buffer. Hva kan du si om proteinets tilstand ved pH 4, sammenlignet med tilstanden ved pH 7,4 ?
(2p.)

(ii) Det er relativt vanlig å bruke brytningsindeksdetektor (RI-detektor) ved eks-klusjonskromatografi (SEC), mens den brukes lite i de øvrige LC-teknikkene. Hvorfor passer SEC og RI-detektoren såpass bra sammen ?
(1p.)

Oppgave 7. *(5+2 +3 = 10 p pluss 1 Bonus)*

7.a) (i) En elektroforetisk separasjon av en blandet løsning av natriumnitrat,
(2p) magnesiumsulfat og kaliumhydrogenkarbonat gjennomføres i en fosfatbuffer ved (pH 3,5). Anta at det ikke finnes EOF (*elektroosmotic flow*). Tegn inn de omtrentlige relative posisjonene av de separerbare stoffene/ionene i figuren under: Forklar kort de relative plasseringene (vandringslengder/retninger).



(ii) Hvordan regner du ut den observerte migrasjonshastigheten, u_{obs} , og den observerte mobiliteten, μ_{obs} , av et ion i kapillærsoneelektroforese (CZE) ? Hva utgjør forskjellen mellom de observerte verdiene og de tilsvarende elektroforetiske verdiene, u_{ef} og μ_{ef} ?

(2p)

(iii) Ved elektroforese av aminosyrer skifter den elektroforetiske mobiliteten av mange aminosyrer fortegn når vi endrer pH fra høy til lav (el. omv.). Forklar kort dette fenomenet.

(1p)

7.b) Ved in-line kobling av GC og massespektrometri (MS), GC-MS, er det relativt rett fram å koble massespektrometeret til kapillær-GC-kolonner, mens det oppstår problemer når det skal kobles til pakkede kolonner.
Hva er årsaken til problemet, og hvordan ordnes grensesnittet (interfacen) mellom pakket kolonne-GC og massespektrometeret slik at det fungerer sammen ?
(2p)

7.c) (i) Når det anvendes fastfase-ekstraksjon (SPE, *Solid Phase Extraction*),
(2p) hvilke to fordeler kan særlig oppnås med det, i forhold til vanlig "klassisk" væske-væske ekstraksjon ?

-

-

(1p) (ii) Nevn tre viktige (hoved-)typer sorbenter som benyttes til fastfase ekstraksjon, og deres aktuelle kromatografiske separasjonsmekanismer.

-

-

-

7.d) (BONUS)
En ukorrigert integrasjonsrapport (f.eks. topphøyde) av HPLC-separasjonen av solfiltre gir signalstørrelser på hhv. 25% (filter **A**) og 65% (filter **B**) av "*Sum Peak Height*".
Hva er det faktiske blandingsforhold, når absorptiviteten av **A** og **B** ved den brukte bølgelengden er hhv. 0,9 og 0,3 ? (Beregning ikke nødvendig hvis korrekt ligning settes opp.)
(1p)

Oppgave 8. *(25p)*

Gi Ja/Nei svar pluss (nødvendig !) kort forklaring ("fordi…"):

(1 poeng pr. riktig og grunngitt svar : uten forklaring ansees ja/nei som potensielt tipping og telles som følger *: riktig svar gir + 0,2 poeng, feil svar gir -0,2 poeng (trekk!).*

		Enig/ uenig (Ja/Nei)	**…, fordi ….**
1.	Båndspredning er generelt et uttrykk for en kolonnes effektivitet.		
2.	Båndspredning er generelt et uttrykk for en kolonnes permeabilitet.		
3.	I ionebytterkromatografi utgjør alkaner, aromater og etere de beste mobile fasene for å separere uorganiske anioner.		
4.	Elektronaffinitetsdetektoren (*Electron Capture Detector*, ECD) er en universell detektor.		
5.	Ett-punkts-kalibrering ved kvantitativ analyse er det samme som å bruke responsfaktor.		
6.	Løseligheten til analyttene i et superkritisk fluid øker med økende trykk i fluidet (forhold ellers like).		
7.	HILIC (hydrofilisk interaksjons-kromatografi) er normal-fase-kromatografi.		
8.	Til å beskrive migrasjonen brukes i kapillær-elektroforese normalt avstandsmålinger eller R_F-verdier.		
9.	Ved kapillærelektroforese (CE) vil ioner *alltid* vandre/migrere mot elektroden med motsatt ladning på grunn av elektrostatisk tiltrekning.		
10.	Overflateporøse (core-shell) partikler har lavere massetransfer-bidrag fra stillestående mobil fase, H_{sMF} , i forh. til like store helporøse partikler.		
11.	Derivatisering av analytter for GLC skal ofte redusere analyttens polaritet og dermed øke analytt-damptrykket.		
12.	Fastfase-ekstraksjon (SPE) bruker store væskekromatografi-kolonner med gass-overtrykk for rask eluering.		

fortsetter på neste side

(Oppgave 8 fortsetter)

Gi Ja/Nei svar pluss (nødvendig !) kort forklaring ("fordi…"):

(1 poeng pr. riktig og grunngitt svar: uten forklaring ansees ja/nei som potensielt tipping og telles som følger *: riktig svar gir + 0,2 poeng, feil svar gir -0,2 poeng (trekk!).*

		Enig/ uenig (Ja/Nei)	**…, fordi ….**
13.	Kvantifiseringsgrensen (LOQ) settes ofte til en toppstørrelse 10x større enn støybåndet i kromatogrammet.		
14.	For å kunne separere enantiomerer må kolonnen (SF) eller mobilfasen i kromatografisystemet være kiral.		
15.	Elektroforetisk mobilitet av et ion øker proporsjonalt med spenningen mellom elektrodene.		
16.	Gelpermeasjonskromatografi er eksklusjonskromatografi, SEC.		
17.	Aluminiumoksid-TLC-plater brukes typisk for omvendt fase TLC-analyser.		
18.	I ionekromatografi (IC. *Ion Chromatography*) brukes normalt en elektrisk ledningsevne-detektor som universell detektor for (alle) ioner.		
19.	Silikagel m. Aktivitet 1 (høyere aktivitet) retarderer analyttene sterkere enn silka med Aktivitet 5 (lavere aktivitet, som inneholder mer vann).		
20.	I en 'eluotropisk serie' er løsnings-midler rangert etter eluerings-styrke (*solvent strength*), ε°, for NP-LSC.		
21.	CO_2 som mobil fase brukes oftere innen GLC enn innen SFC ?		
22.	Viskositeten til et superkritisk fluid er sammenlignbar med en væske.		
23.	Papirkromatografi er vanligvis basert på adsorpsjonskromatografi (LSC).		
24.	Den vanlige ioniseringsmetoden ved koblet LC-MS i dag er elektrospray-ionisering (ESI).		
25.	Elektroosmose er en sonespredningsprosess ved gasskromatografi.		