



Høgskulen på Vestlandet

BIO160 Bacheloroppgave og Plakat Gruppe A - Bioingeniør

BIO160

Predefinert informasjon

Startdato:	26-05-2021 12:12	Termin:	2021 VÅR
Sluttdato:	28-05-2021 14:00	Vurderingsform:	Bestått/ikke bestått
Eksamensform:	Bacheloroppgave (skriftlig i gruppe)		
Flowkode:	203 BIO160 1 O 2021 VÅR		
Intern sensor:	Signe Lilia Steinkopf		
Intern sensor:	Marit Kristin Leiren		

Deltaker

Naun:	Ingvild Hansen Høring
Kandidatnr.:	222
HVL-id:	572338@hvl.no

Informasjon fra deltaker

Antall ord *:	15055
----------------------	-------

Egenerklæring *: Ja

Inneholder besvarelsen Nei
konfidensielt
materiale?:

Jeg bekrefter at jeg har Ja
registrert
oppgavetittelen på
norsk og engelsk i
StudentWeb og vet at
denne vil stå på
vitnemålet mitt *:

Gruppe

Gruppenavn: A5
Gruppenummer: 5
Andre medlemmer i gruppen: Benedikthe Celine Hartuigsen, Pernille Hermansen Wannemacher

Jeg godkjenner autalen om publisering av bacheloroppgaven min *

Ja

Er bacheloroppgaven skrevet som del av et større forskningsprosjekt ved HVL? *

Nei

Er bacheloroppgaven skrevet ved bedrift/virksomhet i næringsliv eller offentlig sektor? *

Nei

BACHELOROPPGAVE

Syntese av aspirin (acetylsalisylsyre) og analyse ved bruk av $^1\text{H-NMR}$ og UHPLC

Synthesis of aspirin (acetylsalicylic acid) and analysis by use of $^1\text{H-NMR}$ and UHPLC

Ingvild Hansen Høvring, Benedikthe Celine Hartvigsen og Pernille Hermansen Wannemacher

Bachelor i bioingeniørfag
Fakultet for ingeniør- og naturvitenskap
Institutt for sikkerhet, kjemi- og bioingeniørfag

Veiledere: Marit Kristin Leiren og Signe Lilia Steinkopf
Dato: 28.05.2021

Jeg bekrefter at arbeidet er selvstendig utarbeidet, og at referanser/kildehenvisninger til alle kilder som er brukt i arbeidet er oppgitt, jf. Forskrift om studium og eksamen ved Høgskulen på Vestlandet, § 12-1

Sammendrag

Hensikten med bachelorprosjektet er å lage et laboratoriekurs til et nyopprettet valgfag til kjemi- og bioingeniørutdanningen med navnet «Industriell legemiddelproduksjon». Målet for øvelsen er at studentene som tar dette faget skal få synteseerfaring og erfaring med analyse av produktet. Laboratoriekurset er basert på syntese av legemiddelet aspirin (acetylsalisylsyre). I Norge blir acetylsalisylsyre i hovedsak benyttet som et blodfortynnende legemiddel, men det har også dokumentert effekt for å redusere smerte, feber og betennelse. En klassisk prosedyre (Olmsted, 1998) ble brukt som utgangspunkt for tillaging av tre prøver. I to av prøvene ble prosedyren endret noe for å se om det var mulig å øke utbyttet. Prøvene ble analysert ved bruk av NMR og UHPLC for kvantitativ bestemmelse av mengde stoff og renhet. Resultatet fra de ulike analysemetodene ble sammenlignet basert på utbytte. Fra en artikkel hvor HPLC ble brukt for å kvantifisere acetylsalisylsyre i tabletter (Sawyer & Kumar, 2003) ble analysen tilpasset til UHPLC. Den ene prøven som avvek fra prosedyren (lengre tid i isbad) viste best utbytte på både NMR og UHPLC. Ut fra de to metodene viste NMR-analysen høyest utbytte for alle prøvene.

Nøkkelord: Acetylsalisylsyre, Aspirin, NMR, Syntese, UHPLC

Abstract

The purpose of this bachelor project is to establish a laboratory course for a new elective subject for both the chemistry- and the bioengineer-education. The subject is given the name “Industrial drug production”. The aim for the course is that the students should be experienced with synthesis and experience with analysis of the product. The laboratory course is based on the synthesis of the well-known drug aspirin (acetylsalicylic acid). In Norway acetylsalicylic acid is mainly used as a blood-thinning drug, but it also has a documented effect on pain relief, anti-inflammatory and antipyretic. A classic procedure (Olmsted, 1998) was used as a starting point for preparation of three samples. For two of the samples were adjusted to see if it was possible to increase the yield. The samples were analyzed by using NMR and UHPLC for quality and determination of the product. This was done to see if small adjustments from the procedure had effect on the yield. An article where HPLC was used to quantify acetylsalicylic acid in tablets (Sawyer & Kumar, 2003) was modified for analysis with UHPLC. One of the samples with a new adjustment (more time in the ice bath) showed the best yield with both NMR and UHPLC. Further the NMR showed highest yield for all the samples.

Keywords: Acetylsalicylic acid, Aspirin, NMR, Synthesis, UHPLC

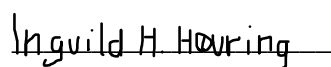
Forord

Denne bacheloroppgaven er et avsluttende prosjekt for bioingeniørutdanningen. Prosjektet ble gjennomført i samarbeid med Høgskulen på Vestlandet avdeling Bergen. Det praktiske arbeidet for oppgaven ble utarbeidet på laboratoriet for fysikalsk kjemi, generell kjemi og instrumentell analyse i perioden mars-mai 2021.

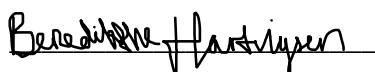
Det har vært en oppgave med mange nye utfordringer både praktisk og teoretisk. NMR er ikke en del av bioingeniørutdannelsen, og læringskurven har derfor vært bratt. Likevel er vi takknemlige for å få muligheten til å lære noe nytt. Prosjektet har for vår del vært spennende og givende.

Gjennom dette prosjektet har vi fått god hjelp og hatt et godt samarbeid med våre veiledere. Vi har fått god veiledning i både det praktiske arbeidet og den teoretiske utarbeidelsen av selve oppgaven. De har vært tålmodige og motiverende gjennom hele prosjektet. Vi vil derfor rette en stor takk til Marit Kristin Leiren og Signe Lilia Steinkopf. I tillegg vil vi takke Turid Aarhus Braseth for god prosessveiledning under prosjektarbeidet.

Høgskulen på Vestlandet, 28. mai 2021



Ingvild H. Høvring



Benedikthe C. Hartvigsen



Pernille H. Wannemacher

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	2
Abstract	3
Forord	4
1. Innledning	7
1.1 Problemstilling.....	8
2. Teori	9
2.1 Aspirin (Acetylsalisylsyre).....	9
2.1.1 Utvikling av aspirin som legemiddel	9
2.1.2 Bruksområder.....	9
2.1.3 Bivirkninger	11
2.2 Bruk av aspirin i laboratorieøvelser.....	12
2.2.1 Bruk i studentøvelser	12
2.2.2 Syntese av aspirin.....	13
2.2.3 Analysemetoder	14
2.3 Nuclear Magnetic Resonance (NMR).....	15
2.3.1 NMR instrumenter	15
2.3.2 Proton spekter	16
2.3.3 Kjemisk skift	17
2.3.4 Integral	18
2.3.5 Splitting	19
2.4 Kromatografi	20
2.4.1 UHPLC.....	21
2.4.2 Oppbygning av instrumentet.....	21
2.4.3 Kromatogram og tolkning av prøvesvar	25
2.5 Grønn kjemi	26
3. Material og metode	27
3.1 Laboratorieutstyr, kjemikalier og instrumenter.....	27
3.1.1 Utstyr.....	27
3.1.2 Kjemikalier.....	27
3.1.3 Instrumenter	28
3.2. Syntese av aspirin	28
3.3 NMR.....	29
3.4 UHPLC	30
3.4.1 Tillaging av løsninger, standarder og prøver	30
3.4.2 Analyse på UHPLC.....	30
3.5 Beregninger	31
3.5.1 Generelt.....	31
3.5.2 Syntese av aspirin.....	32

3.5.3 NMR.....	32
3.5.4 UHPLC.....	33
4. Resultat	34
4.1 Syntese av aspirin – utbytte basert på innveide mengder.....	34
4.2 NMR.....	35
4.2.1 Beregninger for NMR.....	46
4.3 UHPLC	48
4.3.1 Beregninger UHPLC.....	56
4.4 Resultater oppsummert	57
5. Diskusjon	58
5.1 Syntese av aspirin	58
5.1.1 Forslag til eksperimentell prosedyre i en studentoppgave	59
5.2 NMR.....	59
5.2.1 Løsemiddel og reagenser	59
5.2.2 Råprodukt, filtrat og sluttprodukt.....	60
5.2.3 Vannsignal	62
5.2.4 Forslag til NMR-prosedyre i en studentoppgave	64
5.3 UHPLC	64
5.3.1 Forslag til UHPLC-prosedyre i en studentoppgave	65
6. Konklusjon	66
7. Litteraturliste	68
8. Definisjoner	71
9. Vedlegg	73

1. Innledning

Aspirin (acetylsalisylsyre) ble først laget i 1853, men ble ikke brukt i klinisk sammenheng før over 50 år senere (Bayer Pharmaceuticals, 2020). Legemidlet har gjennom en årrekke blitt brukt som smertestillende, betennelsesdempende og febernedsettende. Årlig blir det inntatt over 60 milliarder tabletter av Aspirin på verdensbasis, hvor amerikanerne står for ca. 57 % av inntaket (Burt, 2020). Etter oppfinnelsen av gastroskopet i 1932 ble det oppdaget ulike bivirkninger knyttet til bruken av legemidlet, noe som har ført til at preparater som paracetamol og ibuprofen nå benyttes for tilsvarende effekt i Norge (Desborough & Keeling, 2017). Man har i senere tid kommet frem at medikamentet har gunstige effekter for forebygging av blodpropp. Derfor gis preparater som Acetylsalisylsyre (75 mg) og Albyl-E (75 mg) til pasienter med historikk med blodpropp (Johannessen, 2019).

Syntese av legemidlet aspirin benyttes hyppig som en laboratorieoppgave innenfor grunnkurs i kjemi. Det er en nyttig studentoppgave fordi det benyttes trygge kjemikalier som gjør det ufarlig for «uerfarne» kjemikere å utføre øvelsen. I tillegg er det en visuell øvelse med en enkel syntese, som er lett for studenter å forstå. Det finnes mange varianter av denne øvelsen, og derfor kan syntesen tilpasses til det enkelte laboratoriet.

Den mest vanlige måten å utføre en slik laboratorieoppgave på er ved bruk av salisylsyre som fast stoff, eddiksyreanhydrid som løsemiddel og fosforsyre som katalysator. Analysemetodene som ofte benyttes for syntese av aspirin er smeltepunktanalyser og infrarød stråling (IR). I nyere tid er Nuclear Magnetic Resonance (NMR) blitt mer vanlig dersom laboratoriet har tilgang på dette instrumentet.

Hensikten med denne oppgaven er å utarbeide et laboratoriekurs i et nyopprettet valgfag for kjemi- og bioingeniørutdanningen ved Høgskulen på Vestlandet (HVL), med navnet «Industriell Legemiddelproduksjon». Laboratorieøvelsen skal ta utgangspunkt i syntese av legemidlet aspirin, og man ønsker å se om det er mulig å øke utbytte med enkle endringer fra en klassisk prosedyre (Olmsted, 1998).

Renheten skal bestemmes ved hjelp av mer moderne analysemetoder som NMR og Ultra-High-Performance Liquid Chromatography (UHPLC). Begge metodene benyttes også for å kvantitativt bestemme mengden stoff. Grønn kjemi vil være i fokus gjennom hele prosjektet. Målet for øvelsen er at studentene som tar dette faget skal få synteseerfaring, erfaring med analyse av produktet og sammenligne utbytte fra metodene.

1.1 Problemstilling

Utarbeidelse av en laboratorieøvelse for syntese av legemiddelet aspirin ved hjelp av forbedrede og mer moderniserte analysemetoder. NMR og UHPLC er metoder som vil bli benyttet til å påvise og kvantitativt bestemme mengde og renhet av produktet.

2. Teori

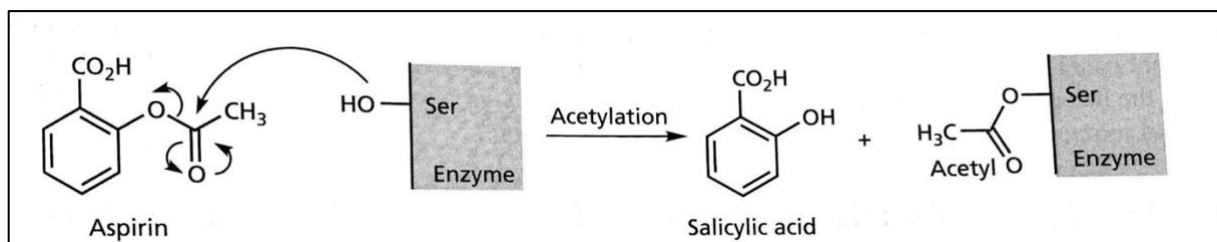
2.1 Aspirin (Acetylsalisylsyre)

2.1.1 Utvikling av aspirin som legemiddel

Legemidlet aspirin ble først laget i 1853. På grunn av at produktet var ustabil, og at det ga ulike bivirkninger ble ikke legemiddelet brukt i klinisk sammenheng før over 50 år senere. Farmasøyten Felix Hoffmann var den første om å danne acetylsalisylsyre i en kjemisk ren og stabil form ved å acetylere salisylsyre med eddiksyreanhydrid. Han hadde da klart å fremstille et legemiddel som hjalp for smertelindring og febernedsettelse, samtidig som det hadde anti-inflammatorisk effekt. I 1899 ble legemidlet lansert i pulverform under navnet Aspirin. Et år senere ble legemidlet gitt ut som tablett, og var derfor et av de første legemidlene som ble utgitt i denne doseringsformen (Bayer Pharmaceuticals, 2020).

2.1.2 Bruksområder

Aspirin har vist effekt for smertelindring, febernedsettelse og anti-inflamasjon. Humane celler reagerer på ulike stimuli som for eksempel traume og stress. Dette vil medføre at det oppstår en reaksjon hvor cellene produserer prostaglandiner. Prostaglandiner er substanser som forårsaker smerte, feber og inflammasjon i kroppen. Ved inntak av aspirin vil legemidlet inhibere enzymet syklooksigenase (COX) som er ansvarlig for produksjon av prostaglandiner (figur 1). Dermed vil legemidlet forebygge mot smerter, feber og inflammasjon (Bayer Pharmaceuticals, 2018).



Figur 1 Aspirin har betennelsesdempende virkning som følge av dets evne til å hemme et enzym kalt syklooksigenase (COX), som er nødvendig for syntese av prostaglandin og tromboxan A₂. Aspirin er ansvarlig for å tilføre en acyl-gruppe som blir kovalent bundet til aminosyren serin i det aktive setet på COX (Patrick & Spencer, 2009, s. 219).

I 1985 ble aspirin godkjent av USAs «Food and Drug administration» som et legemiddel for forebygging av et nytt hjerteinfarkt hos pasienter med gjennomgått hjerteinfarkt. Det hadde blitt påvist at aspirin hadde effekt på trombocytene i blodet (Bayer Pharmaceuticals, 2018). Virkestoffet til legemidlet Aspirin er acetylsalisylsyre. Acetyl-delen av legemidlet vil inhibere enzymet sykloogsygenase som er ansvarlig for dannelsen av tromboxan A2 i trombocytene, som vist i figur 1. Tromboxan A2 er viktig for at trombocytene skal aktiveres, og uten tilstedeværelse av tromboxan A2 vil trombocyttenes evne til å aggregere sammen reduseres. Trombocytene har ingen cellekjerne, og vil derfor ikke være i stand til å reproducere sykloogsygenase som betyr at trombocytene ikke inneholder tromboxan A2. Dette er en irreversibel effekt som vil si at ved inntak av acetylsalisylsyre mister trombocytene sin evne til å forandre form og binde seg til hverandre for hele sin resterende levetid (9-10 dager). Derfor er dette et effektivt legemiddel for å forhindre blodproppdannelse. Ved en allerede oppstått trombe gis det minst 300 mg acetylsalisylsyre for effekt, men for forebygging av trombedannelse gis det 75 mg daglig (Nordeng & Spigset, 2018, s. 134).

På det norske markedet benyttes preparatene Acetylsalisylsyre, Albyl-E og Aspirin. Preparatene finnes i ulike styrker fra 75 mg til 500 mg, se tabell 1. Aspirin og Acetylsalisylsyre i 500 mg benyttes mot feber, smerter og betennelser, mens Acetylsalisylsyre (75 mg) og Albyl-E (75 mg) inntas daglig for en forebyggende effekt mot trombedannelser. Bivirkninger av acetylsalisylsyre har ført til restriksjoner i tilgangen på legemidlet. Det er nødvendig med resept fra lege for å få utlevert legemiddel med blodfortynnende effekt. Aspirin med effekt mot smerter og feber kan kjøpes reseptfritt (Johannessen, 2019).

Tabell 1 Ulike preparater på det norske markedet som inneholder acetylsalisylsyre, mengden acetylsalisylsyre og effekten av legemidlet.

Preparat	Dose acetylsalisylsyre (mg)	Effekt mot
Acetylsalisylsyre	500	Feber, smerter og betennelser
Acetylsalisylsyre	75	Trombedannelse
Aspirin	500	Feber, smerter og betennelser
Albyl-E	75	Trombedannelse

2.1.3 Bivirkninger

Det er mange ulike bivirkninger som er knyttet til bruken av acetylsalisylsyre, men alvorlige komplikasjoner forekommer sjelden. Bivirkninger som fremtrer oftere er milde magesmerter, kvalme, oppkast og diaré, og sjeldnere hodepine, trettet og svimmelhet. Tilfeller av allergisk utslett i huden, astmaanfall og kraftige allergiske reaksjoner oppstår, men meget sjeldent. Slimproduksjonen i magesekken reduseres ved inntak av acetylsalisylsyre, noe som en sjelden gang kan forårsake magesår og alvorlige mageblødninger (Johannessen, 2018).

Etter oppfinnelsen av gastroskopet i 1932 ble det fastslått at bruken av Aspirin er assosiert med betennelse i slimhinnen av magesekken (gastritt). Videre ble det utviklet flere smertestillende legemidler med virkestoffene paracetamol og ibuprofen som ikke ga slike bivirkninger, og medførte at Aspirin etter hvert ble mindre benyttet. I 1962 ble det bekreftet at bruken av Aspirin ble forbundet med Reyes syndrom hos barn (Desborough & Keeling, 2017). Dette er en sjelden og alvorlig tilstand som har sammenheng med virusinfeksjon og feber hos barn, som samtidig behandles med acetylsalisylsyre. Symptomer som oppkast, forandret bevissthet, og etter hvert kramper, bevisstløshet og eventuelt død kan oppstå på grunn av alvorlig betennelse i hjerne og lever (Johannessen, 2021). Videre forskning støttet opp under denne teorien, og det er derfor anbefalt å ikke gi Aspirin til barn under 16 år (Desborough & Keeling, 2017).

2.2 Bruk av aspirin i laboratorieøvelser

2.2.1 Bruk i studentøvelser

Det finnes mange varianter for syntese og analyse av aspirin i studentøvelser. Det benyttes forskjellige katalysatorer, oppvarmingstider og analyseinstrumenter. Den vanligste måten å fremstille aspirin på er ved bruk av salisylsyre i pulverform. Ved laboratorieøvelsen ved Los Angeles Harbour College benyttes fosforsyre som katalysator og eddiksyreanhydrid som løsemiddel og reaktant ved syntese av aspirin. Løsningen ble varmet opp i 10 minutter, tilsatt deionisert vann og overført til isbad for å aktivere utfelling av krystallene i prøven.

Krystallene ble overført til en ny beholder som ble oppbevart i elevenes skap frem til neste dag på laboratoriet. Noen krystaller fra syntetisert aspirin ble overført til et kapillærrør for smeltepunktsanalyse som er nærmere beskrevet i kapittel 2.2.3.1. Til slutt ble prøvene overført til kyvetter og målt i et UV-spektrofotometer ved en bølgelengde på 530 nm (LAHC).

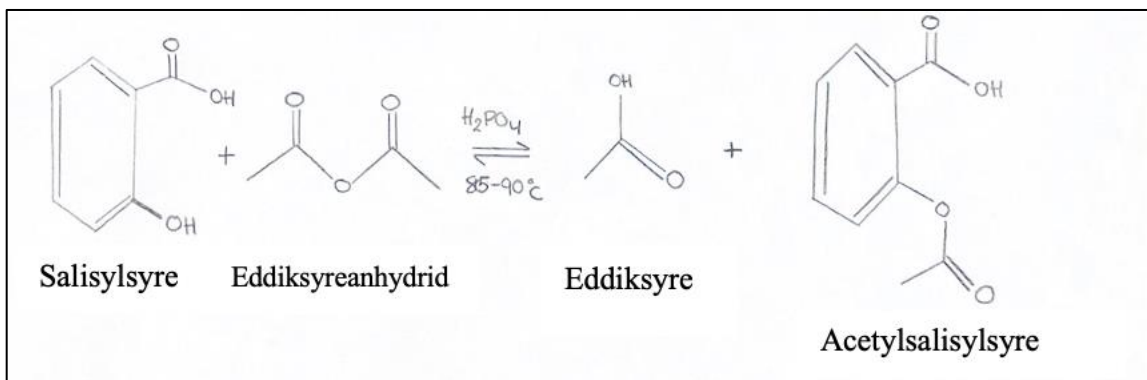
Det benyttes også fosforsyre som katalysator og eddiksyreanhydrid som løsemiddel og reaktant ved en annen prosedyre fra Odinity (nettbasert læringsplattform for studenter). Her ble prøven varmet i 15 minutter ved 75 °C, tilsatt deionisert vann og deretter plassert i isbad for å starte krystallisering. For å tørke krystallene ble løsningen plassert i et varmeskap ved 40 °C i 46 timer. Den syntetiserte aspirinen ble analysert med to ulike metoder som benyttet seg av spektrometrene: IR og NMR. For NMR analysen benyttet de 0,6 mL av deuterert løsemiddel, CDCl₃, for å unngå overlapp fra store proton-topper i spekteret mellom løsemiddel og prøven. Instrumentet for NMR var Anasazi 60 MHz FT-NMR. For IR analysen ble en liten mengde av sluttproduktet plassert på diamant ATR-platen til Nicolet iS10 Infrared spektrofotometer. Begge spektrometrene ga renhet av det syntetiserte produktet (Lola, 2013).

Los Angeles City College benyttet svovelsyre som katalysator og eddiksyreanhydrid som løsemiddel. Løsningen ble plassert i kokende vann i 20 minutter før den ble kjølt i romtemperatur for å starte en krystallisering. Deretter ble løsningen overført til et isbad. Produktet ble videre oppbevart for å gjennomføre en smeltepunktsanalyse og en

renhetsanalyse for å observere fargeintensiteten ved bruk av jern (III). Fenolgrupper vil danne et farget kompleks med jernionet (Los Angeles City College, 2005).

2.2.2 Syntese av aspirin

Den vanligste måten å fremstille aspirin i studentøvelser på er ved bruk av eddiksyreanhydrid som løsemiddel og reaktant. I reaksjonen for dannelse av acetylsalisylsyre vil det foregå en omgjørelse fra en fenol (salisylsyre) til en ester (acetylsalisylsyre). Reaksjonen er reversibel og bør foregå ved en gunstig temperatur på 85-90 °C (Olmsted, 1998).



Figur 2 Reaksjonsligningen for syntese av acetylsalisylsyre.

Figur 2 viser reaksjonsligningen for dannelse av acetylsalisylsyre ved bruk av eddiksyreanhydrid og salisylsyre. Fosforsyre opptrer som en syrekatalysator (H^+) og aktiverer karbonylgruppen i eddiksyreanhydrid. Det tilsettes et overskudd av eddiksyreanhydrid slik at likevekten forskyves fullstendig mot høyre. Da får man en aktivert form av eddiksyreanhydrid med et positivt ladet oksygenatom (Hart, Hadad, Craine & Hart, 2020, s. 303). Salisylsyre vil deretter reagere med den aktiverte formen av eddiksyreanhydrid, og man får dannet acetylsalisylsyre (produkt) og eddiksyre (biprodukt). Eddiksyren som dannes i reaksjonen er vannløselig, og kan fjernes ved vakuumfiltrering. Vann blir tilsatt for å dekomponere eddiksyreanhydrid som ikke har reagert. Acetylsalisylsyre er lite løselig i vann og vil danne krystaller når løsningen nedkjøles. Sluttproduktet isoleres ved hjelp av vakuumfiltrering (Olmsted, 1998).

2.2.3 Analysemetoder

For syntese av acetylsalisylsyre i laboratorieoppgaver benyttes ulike analysemetoder. De mest brukte er smeltepunkt, IR-spektroskopi, NMR og UHPLC.

2.2.3.1 Smeltepunkt

Alle organiske forbindelser har et gitt smeltepunkt som er unikt for forbindelsen. Dermed kan smeltepunktet benyttes som en del av analysen for å bestemme hvilke forbindelser man har.

Det benyttes en liten mengde av materialet i et smeltepunkt-apparat som varmes sakte opp mot forventet smeltepunkt temperatur. For acetylsalisylsyre er smeltepunktet 135-136 °C.

Dersom smeltepunktet er lavere enn forventet temperatur kan dette skyldes urenheter i prøven.

Urenhetene kan komme av andre molekyler (biprodukter eller ureagert salisylsyre), eller av at produktet ikke var tørket godt nok. Det bør da utføres ny rekrystallisering av stoffet (Mettler Toledo, 2012).

2.2.3.2 IR-spektroskopi

IR-spektroskopi kan benyttes for å identifisere organiske forbindelser og strukturen deres, i tillegg til kvantitativ analyse. Det benyttes infrarød stråling, særlig med bølgelengde mellom 1-10 μm , i IR-spektroskopi (Wibetoe, 2020). De ulike funksjonelle gruppene i molekylet gir grunnlag til vibrasjoner med forskjellig frekvens som fører til at IR-stråling blir absorbert i molekylet. På spekteret som dannes kan man lese antall signaler, signalenes posisjon og høyde. Denne informasjonen gjør det mulig for kjente forbindelser å bli identifisert basert på referansespekter (UiB, 2019).

2.2.3.3 NMR

NMR kan benyttes for å undersøke hvilken struktur sluttproduktet har, og på den måten kan man avgjøre om det er acetylsalisylsyre som har blitt dannet. Metoden kan også si noe om renheten til produktet og gi informasjon om kvantitativ og kvalitativ bestemmelse. Se kapittel 2.3 for teori om NMR.

2.2.3.4 UHPLC

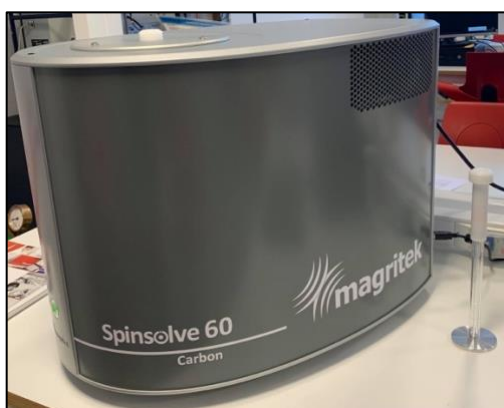
UHPLC kan benyttes for å vurdere prøvens renhet samt bidra til kvantitativ og kvalitativ bestemmelse. Se kapittel 2.4 for kromatografi og UHPLC.

2.3 Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

Kjernemagnetisk resonans spektroskopi (NMR) anvendes blant annet for å bestemme strukturen til en kjemisk forbindelse. NMR er basert på atomkjernenes magnetiske egenskap (spinn), og hvordan de magnetiske egenskapene blir påvirket av det kjemiske miljøet rundt atomkjernen. Under NMR analysen kan det anvendes faste stoffer, løsninger, væsker og flytende krystaller (Norsk Kjemisk Selskap, 2007).

2.3.1 NMR instrumenter

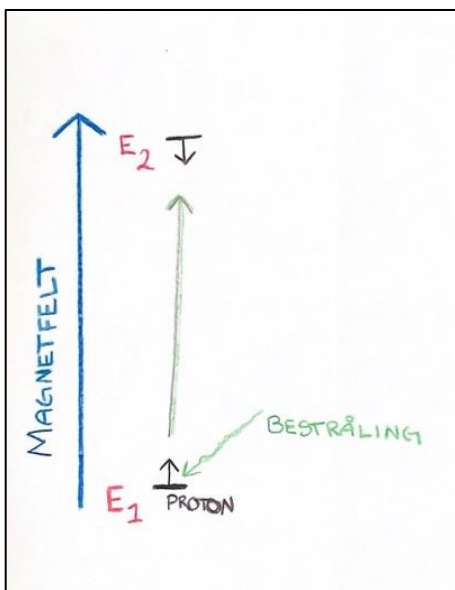
I NMR instrumenter benyttes et eksternt elektromagnetisk felt. Det finnes mange ulike typer instrumenter hvor styrken på magnetfeltet varierer. Spinsolve spektrometre kommer i 43, 60 og 80 MHz-modeller. Med sin enkle drift kan man få kraftig NMR-spektroskopi med høy oppløsning inne på laboratoriet, i løpet av kort tid (Magritek). Styrken på magnetfeltet kan variere mellom de ulike instrumentene. Instrumentet Magritek spinsolve 60 MHz (figur 3) benyttes i denne øvelsen og inneholder en relativt svak magnet. Likevel kan den produsere spektre raskt og effektivt for protonkjerner (^1H), fluorkjerner (^{19}F) og karbonkjerner (^{13}C) (Magritek). Det benyttes analyser av ^1H (proton) i prøvene for denne øvelsen.



Figur 3 HVL's Spinsolve 60 MHz instrument fra produsent Magritek, Bergen 14. april 2021 (Hartvigsen).

2.3.2 Proton spekter

Når en prøve med magnetiske egenskaper blir tilsatt i et prøverør, plassert i prøveholderen og satt inn i instrumentet, vil protoner i prøven rette seg etter det magnetiske feltet. Da vil et overskudd av protonene ligge parallelt med feltet og befinne seg i energinivå 1 (E_1) som illustrert i figur 4. Dersom prøven blir bestrålt med elektromagnetisk stråling, i radiofrekvensområdet, fører dette til at et overskudd av protonene i prøven forflyttes til et høyere energinivå (energinivå 2, E_2). I E_2 vil protonene befinne seg antiparallelt med magnetfeltet.



Figur 4 Illustrasjon av magnetfeltets- og strålingens effekt på protoner i en prøve.

Magnetfeltets styrke og kjernetypen man ser på i prøven, vil avgjøre hvor mye energi (hvilken bølgelengde) som skal til for å forflytte protonene fra E_1 til E_2 . En annen faktor som spiller inn, er omgivelsene rundt kjernen det gjelder (Norsk-kjemisk-selskap, 2007).

Resonansfrekvensen defineres som den frekvensen som gir interaksjon med radiobølgen. Når protonene faller ned igjen fra E_2 til E_1 sendes det ut et signal som blir registrert av detektoren. Signalet blir videre fourier-transformert i dataprogrammet, slik at signalet kan visualisere og tolkes (S, L. Steinkopf, personlig kommunikasjon, 16. mars 2021).

Det er informasjonen om hydrogenatomene (proton) i et molekyl og hvordan disse er relatert til resten av molekylet, som gir grunnlaget til forståelse av den kjemiske strukturen. De ulike kjemiske gruppene til molekylene vil opptre ved forskjellige parts per million (ppm) på spekteret (Leah4sci, 2013).

Tabell 2 Oversikten over kjemisk skift (ppm) for ulike kjemiske strukturer.

PPM	Gruppe
2-2,3 ^{*2}	Metyl bundet til ester i en aromatisk syre
3,31 ^{*3}	Deuterert metanol
3-5 ^{*1}	Halogener
~7 ^{*1}	Aromatiske grupper
9-12 ^{*1}	Terminale hydrogenatomer på karboksyl-grupper eller aldehyd

¹ ppm hentet fra (Leah4sci, 2013)

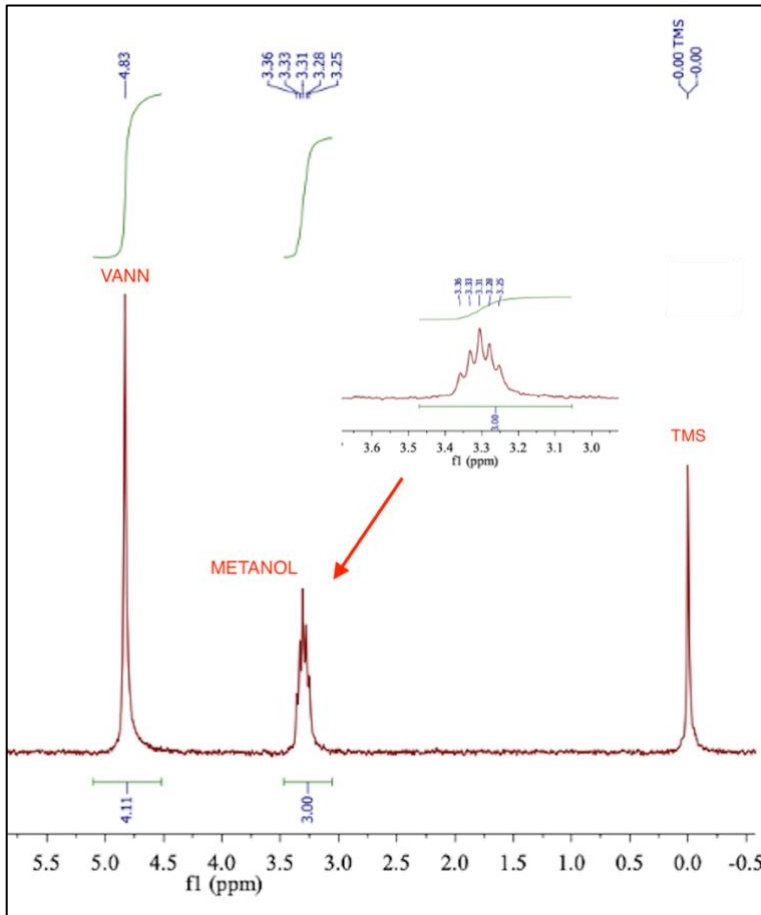
² ppm hentet fra (Fulmer et al., 2010).

³ ppm hentet fra (Dr.Starkey).

2.3.3 Kjemisk skift

Ved NMR analyse er det tre hovedtyper data som kan tolkes: kjemisk skift, integral og splitting. Kjemisk skift forteller hvilke grupper som finnes i molekylet, og gir informasjon om det kjemiske miljøet til et bestemt proton. Et elektronegativt molekyl vil ha en tiltrekkende effekt på elektronene til protoner. På grunn av den elektronegative effekten vil elektrontettheten fjernes, slik at elektronene beveges bort fra protonkjernen. Dette fører til at signalet fra dette protonet vil finnes mer til venstre i spekteret med et høyere kjemisk skift. Protoner med mindre elektrontetthet rundt seg vil oppleve det ytre magnetfeltet sterkere. Dette gir en større forskjell mellom E1 og E2 (figur 4), som gjør at det blir absorbert radiobølger med en høyere energi. Jo nærmere protonet er til et elektronegativt element, desto lenger mot venstre sees signalet. Dersom det ikke finnes noe elektronegativt element, vil protonet finnes lengre mot høyre i spekteret. Jo høyere elektrontetthet desto lavere skift (Farina, 2016). I denne øvelsen blir TMS (tetrametylsilan) benyttet som kjemisk skift standard, slik at de andre gruppene refereres i spekteret ut fra TMS. I figur 5 sees TMS til høyre og blir satt til 0,00

ppm. Dermed blir kjemisk skift for de andre toppene i spekteret satt ut fra standarden. For metylgruppen i metanol er kjemisk skift 3,31 ppm. For vanntoppen sees signal fra H₂O i prøven og OH i metanol. Det kjemiske skiftet til vanntoppen blir dermed 4,83 ppm.



Figur 5 Eksempel på et NMR-protonspekter til deuterert metanol med TMS.

2.3.4 Integral

Integral betyr arealet av toppene, og forteller hvor mange kjemisk ekvivalente protoner som generer signalet til toppen det gjelder. Dersom man har metan (CH₄) vil man ha fire magnetisk ekvivalente hydrogentyper som opplever et identisk kjemisk miljø (Leah4sci, 2013). Signalet fra denne gruppen vil da sees som én topp i NMR-spekteret, hvor hvert proton forsterker denne toppen. Dersom stoffet er propan (CH₃-CH₂-CH₃) vil hydrogenatomene på de terminale karbonatomene være magnetisk ekvivalente fordi molekylet er symmetrisk. I spekteret vil derfor begge CH₃- gruppene gi resultat i én og samme topp. Hydrogenatomene

på karbonet i midten vil være forskjellige fra de andre i kjeden, og resultere i en egen topp (Farina, 2016). I figur 5 gis integralet til hver topp under toppen. For metylgruppen i metanol blir integralet satt til 3 i og med at det er 3 hydrogenatomer som generer dette signalet. For vann- og OH-toppen blir integralet derfor automatisk satt til 4,11. Dette gir informasjon om at det finnes to vannmolekyl for hver metylgruppe.

2.3.5 Splitting

Splitting kan gi informasjon om hvor mange protoner som finnes på naboatomer. Kjemisk ekvivalente protoner gir samme signal, men dette signalet kan splittes i et visst antall mindre toppler. Dersom det ikke finnes naboprotoner vil man kun se én stor topp, som ved CH₄ (singlett). Om det finnes et naboproton vil dette protonet opptre som en liten magnet og kunne splitte signalet i to toppler (dublett). Ved to naboprotoner, vil signalet bli splittet i tre toppler (triplett). Finnes det mer enn fire toppler kalles det en multipllett. På grunnlag av dette kan regelen $n+1$ (n står for antall hydrogennaboer) benyttes for å finne ut hvor mange toppler den aktuelle gruppen gir i spekteret. Dersom det er en CH₂-gruppe med 3 naboprotoner, forventes en kvartett i spekteret. Denne regelen kan også benyttes motsatt vei ved å telle antall toppler og trekke fra 1. Da gis antall typer av hydrogennaboer. Det er også mulig å få overlappende toppler i spekteret (Farina, 2016).

Tabell 3 Oversikt over kjemiske grupper med tilhørende multiplisitet av toppler i protonspekteret, ut fra naboprotoner.

Kjemisk gruppe	Antall naboprotoner	Topp i spekteret
CH ₄	0	Singlett
CH ₃	1	Dublett
CH ₂	3	Kvartett

Metylgruppen for deuterert metanol som sees i det ekspanderte spekteret i figur 5 viser at CH₃-gruppen i metanol gir en multipllett (5 toppler). Dette er fordi molekylene ikke er fullstendig deuterert i løsningen, som gjør at proton som er deutererte byttes ut med proton som ikke er deutererte. Resultatet av dette blir protoner som ikke er kjemisk ekvivalente og derav gis det flere toppler i spekteret.

2.4 Kromatografi

Kromatografi er en fellesbetegnelse på ulike separasjonsteknikker som skiller hver enkelt komponent i blandinger av stoffer. Hver metode benytter kjent kunnskap om komponentenes kjemiske og fysiske egenskaper, som polaritet og størrelse, til å skille de fra hverandre. Alle metodene (tabell 4) benytter en stasjonær fase og en mobil fase. Den stasjonære fasen utnytter stoffenes affinitet til å «holde igjen» hver komponent. Den mobile fasen transporterer komponentene gjennom den stasjonære fasen (Lausund, 2018a).

Tabell 4 Oversikt over forskjellige kromatografimetoder.

Forskjellige kromatografimetoder	Prinsipp
Gasskromatografi	Skiller komponenter ved å øke temperaturen i instrumentet slik at komponentene i prøven fordamper og blir til gassform. Den mobile fasen er også i gassform ¹ .
Væskeskromatografi	Komponentene i prøven eluerer gjennom instrumentet i væskeform for å skille komponentene. Silica partiklene i den stasjonære fasen er bundet til en væskefase, og den mobile fasen er også i væskeform ² .
Adsorpsjonskromatografi	Benytter fast adsorpsjonsmiddel som stasjonær fase og væske eller gass til mobil fase ³ .
Ionebyttekromatografi	Den stasjonære fasen er enten en kationbytter eller en anionbytter som vil tiltrekke seg de oppløste ionene i prøven med motsatt ladning for å skille komponentene. Den mobile fasen er i væskeform ³ .
Tynnsjikt-kromatografi	Den stasjonære fasen er en plate av glass, plast eller aluminium dekket med en gel som den mobile fasen og prøven vandrer oppover ved hjelp av kapillærkreftene, stoffenes polaritet og kjemiske egenskaper. Den mobile fasen er i væskeform ⁴ .

¹ hentet fra (Harris, 2010, s. 565).

² hentet fra (Harris, 2010, s. 596).

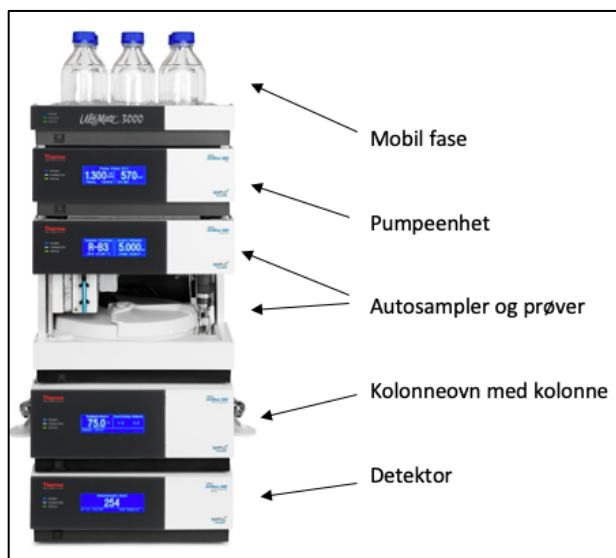
³ hentet fra (Harris, 2010, s. 543).

⁴ hentet fra (NTNU, 2018).

2.4.1 UHPLC

UHPLC står for Ultra-High-Performance Liquid Chromatography og er en type væskrokromatografi. Ved bruk av denne metoden vil den stasjonære fasen være plassert i en kolonne og den mobile fasen vil være i væskeform. Instrumentet består av flere deler (figur 6). En pumpe sørger for at den mobile fasen til enhver tid strømmer gjennom instrumentet, inkludert gjennom kolonnen med den stasjonære fasen. En autosampler injiserer et valgt volum av prøvematerialet inn i den mobile fasen, og den mobile fasen eluerer prøvematerialet gjennom kolonnen. Kolonnen, med den stasjonære fasen, er plassert i kolonneovnen. Når komponentene i prøven når detektoren, vil de bli detektert og tilhørende software omdanner informasjonen fra detektoren til et kromatogram. Tiden det tar fra en komponent blir injisert til den når detektoren blir kalt retensjonstid, og denne er unik for hver komponent i prøven (Harris, 2010, s. 596).

2.4.2 Oppbygning av instrumentet



Figur 6 Oppbygning av instrumentet for UHPLC (Thermo Fisher Scientific).

2.4.2.1 Pumpeenhet

Pumpeenheten kan pumpe løsemiddelet gjennom kolonnen, selv ved det høye trykket som er nødvendig for gjennomstrømming i en tettpakket kolonne som man benytter i UHPLC. Dette vil gi kortere retensjonstid for komponentene. I tillegg har pumpen en integrert vakuumpumpe som fjerner luftbobler fra den mobile fasen for å unngå interferens for analyseresultatet. Før prøvematerialet injiseres, eulers den mobile fasen gjennom hele instrumentet, bortsett fra kolonnen. Dette er for å fjerne eventuelle luftbobler og tidligere anvendt mobilfase. Deretter kondisjoneres kolonnen ved at den mobile fasen elueres gjennom i en jevn strøm i 10-15 minutter, for å unngå at forholdene skal variere underveis i analyseringen (Harris, 2010, s. 611).

2.4.2.2 Autosampler

Autosampleren suger opp prøvemateriale fra en valgt prøveposisjon og injiserer det i den mobile fasen (Harris, 2010, s. 598). Temperaturen i området der autosampleren og prøvematerialet er plassert, kan endres etter hvilke forhold som bevarer prøvene best. Temperaturen stilles inn for å forhindre at komponentene dekomponerer før analysen starter.

2.4.2.3 Den mobile fasen

Den mobile fasen består av buffer og løsemiddel. Bufferen benyttes for å holde den mobile fasen ved pH 4,7. Dersom mobilfasen har pH > 8 vil silicapartiklene i den stasjonære fasen løse seg opp. Ved pH < 2 vil bindingsstrukturer på silicapartiklene inngå i reaksjon med komponentene i prøven. Metanol blir ofte benyttet som løsemiddel i den mobile fasen da det bidrar til å justere elueringsstyrken til den mobile fasen. En sterk eluent gir kort retensjonstid gjennom kolonnen, mens en svak eluent gir lang retensjonstid. Forholdet mellom de ulike løsningene i mobilfasen tilpasses etter hvilke stoffer som skal analyseres. Derfor vil retensjonstiden til komponentene i prøven elueres ut av kolonnen til ulik tid, slik at resolusjonen mellom toppene som dannes i kromatogrammet blir god (Harris, 2010, s. 604-605).

Den mobile fasen kan eluere gjennom kolonnen ved isokratisk eller gradient eluering. Ved isokratisk eluering vil sammensetningen av løsningene i den mobile fasen holdes konstant gjennom hele analysen. Ved gradient eluering vil sammensetningen av løsningene i den mobile fasen endres i løpet av analyseringen. Dette gjøres for å forkorte retensjonstiden til de komponentene som bruker lengst tid gjennom kolonnen, men vil allikevel kunne gi god resolusjon mellom toppene i kromatogrammet (Harris, 2010, s. 604-605).

2.4.2.4 Kolonnen og den stasjonære fasen

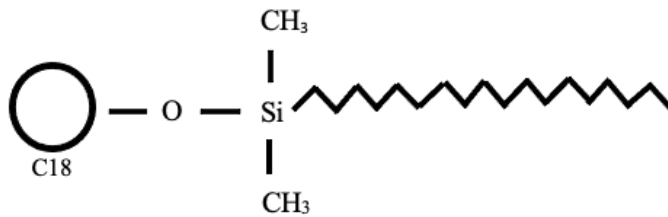
Kolonnene kan være av ulik lengde, partikkelstørrelse og diameter, mens kolonneovnen kan endre temperatur for å øke eller senke retensjonstiden (Harris, 2010, s. 597). UHPLC er en nyere versjon av HPLC-instrumentet der kolonnen har mindre diameter, på grunn av mindre partikler, som gjør at trykket gjennom kolonnen øker (opp til 100 MPa). Tabell 5 viser spesifikasjonene til UHPLC sammenlignet med HPLC. Bruk av UHPLC gir kortere retensjonstid og dermed et raskere analysesvar. Instrumentet har også lavere deteksjonsgrense ved analysering og bedre resolusjon (Harris, 2010, s. 598).

Tabell 5 Spesifikasjonene for HPLC og UHPLC (Harris, 2010, s. 598).

Spesifikasjoner	HPLC	UHPLC
Kolonnestørrelse (diameter)	3-4,6 mm	2,1 mm
Partikkelstørrelse (diameter)	2,1-5 µm	1,5-2 µm
Trykk gjennom kolonnen	7-40 MPa	Opp til 100 MPa
Strømningshastighet	0,5-5 mL/min	>5 mL/min

Den stasjonære fasen består av porøse silicapartikler og en væskefase. Væskefasen, i den stasjonære fasen, er kovalent bundet til silicapartiklene. Molekylene i væskefasen kalles oktadecylsilan og består av en kjede med 18 karbon, se figur 7 for illustrasjon. Molekylene er hydrofobe som gjør den stasjonære fasen upolar. En silicapartikkel er et polymer som er bygd opp av silisium og oksygen som danner en tredimensjonal struktur med porer som den mobile

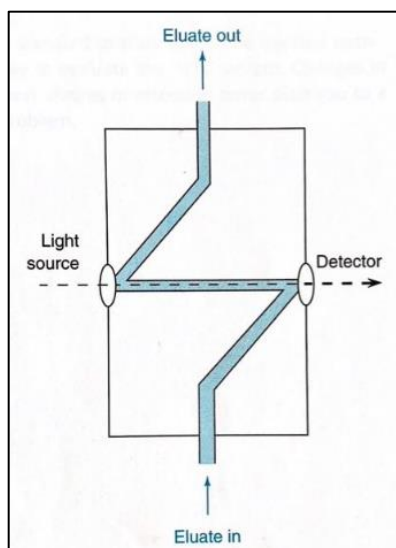
fasen, med prøvematerialet, eluerer gjennom. Komponentene i prøvematerialet vil interagere med væskefasen til silicapartiklene i ulik grad, noe som gjør at de vil bruke ulik tid gjennom kolonnen. På overflaten av silicapartiklene finnes blant annet en bindingsstruktur som kalles siloxan (Si – O – SiR). Ved lav pH kan siloxan inngå i reaksjon med komponentene, noe som ikke er ønskelig. For at komponentene kun skal interagere med silicapartiklene og ikke inngå i en reaksjon med dem, byttes siloxan ut med en gitt andel etylenbruer. Dette vil gi mer stabile silicapartikler (Harris, 2010, s. 599-602).



Figur 7 Strukturen av oktadecylsilan bundet til silicapartikkel i den stasjonære fasen.

2.4.2.5 Detektor

Detektoren, i enden av kolonnen, er en fotodioderekke detektor som benytter spektrofotometri. Detektoren benytter to lyskilder, en som avgir hvitt lys og en som avgir UV-lys. Bølgelengden på lyskildene er satt til 275 nm ved denne analysen. Lyset fra de to lyskildene sendes gjennom en flowcelle (se figur 8) som den mobile fasen strømmer gjennom. I andre enden av flowcellen vil lyset treffe et difraksjonsgitter som bryter lyset i ulike vinkler basert på bølgelengden. Lys med ulik bølgelengde vil dermed treffe på forskjellige diodeceller i en fotodioderekke. Deretter måles intensiteten for hver diodecelle som tilsvarer intensiteten til lys fra hver sin bølgelengde (Harris, 2010, s. 612-613).



Figur 8 Flowcellen i detektoren (Harris, 2010, s. 612).

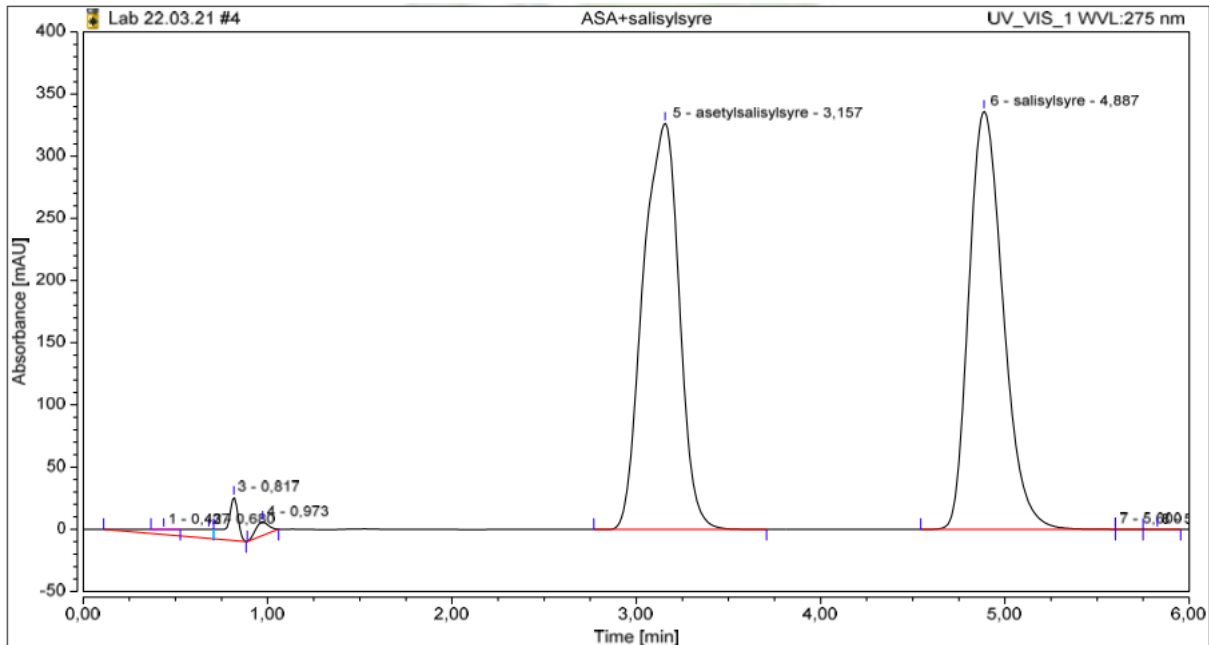
2.4.3 Kromatogram og tolkning av prøvesvar

Kromatogrammet som dannes viser en grafisk fremstilling av komponentenes signalintensitet i forhold til retensjonstid. Et kromatogram vil vise tiden (i minutter) komponentene bruker gjennom kolonnen langs x-aksen, og absorpsjonssignalet langs y-aksen (mAU). Hver topp viser signalet fra én komponent dersom komponentene i prøven er godt separert, og antall topper er proporsjonalt med antall forskjellige komponenter i prøven. Dersom komponentene i prøven har ulik retensjonstid, vil absorpsjonssignalet mellom toppene gi et signal på 0 og kurven vil nå helt ned til grunnlinjen før toppen for neste komponent vises. Toppene vil da være fullstendig adskilt og dette tyder på god resolusjon. Motsatt, vil to topper som overlapper hverandre, tyde på dårlig resolusjon. Høyden på hver topp viser signalintensiteten for komponenten. Arealet under toppene er proporsjonalt med konsentrasjonen i prøven. Retensjonstiden til komponentene brukes til å identifisere forbindelsene i kromatogrammet. Før prøvene settes på analyseinstrumentet, analyseres en rekke med standarder. Standardene har kjente konsentrasjoner og benyttes til å lage en standardkurve som prøveresultatene sammenlignes med for å beregne konsentrasjon (Lausund, 2018b).

Kromatogrammet i figur 9 viser en prøve tilsatt acetylsalisylsyre og salisylysyre.

Kromatogrammet viser tre topper. Alle toppene har ulik retensjonstid som gjør de fullstendig

adskilt fra hverandre og gir god resolusjon. Første topp viser løsemiddelet, som i dette tilfelle er metanol, og har en retensjonstid på 0,8 min. Andre topp viser acetylsalisylsyre med en retensjonstid på 3,2 min, og tredje topp viser salisylsyre med retensjonstid på 4,9 min. Arealet til hver topp benyttes til å regne ut mengden til stoffet.



Figur 9 Eksempel på kromatogram. Prøven inneholder acetylsalisylsyre (retensjonstid 3,2 min) og salisylsyre (retensjonstid 4,9 min). Første topp viser metanol som ble benyttet som løsemiddel i prøven.

2.5 Grønn kjemi

Gjennom hele laboratorieøvelsen skal fokuset være grønnere kjemi sammenlignet med tidligere laboratorieøvelser for syntese og analysering av aspirin. Grønn kjemi er en samlebetegnelse på 12 prinsipper for kjemisk virksomhet der målet er å eliminere dannelsen av farlige forbindelser i fremstilling og utnyttelse av kjemiske prosedyrer (Uggerud, 2018). Det bygger på prinsippet om å begrense eller hindre forurensning allerede ved kilden. Dette blir tatt hensyn til ved valg av kjemikalier, mengde løsemiddel og bruk av instrumenter. Det velges å bytte ut helseskadelige løsemidler med mindre helseskadelige løsemidler for å opprettholde en mer bærekraftig og grønnere kjemi. For eksempel ved UHPLC er kolonnestørrelsen og partikkelstørrelsen på silicapartiklene mindre enn ved HPLC, noe som gir kortere retensjonstid og dermed krever mindre mengde av løsninger til den mobile fasen.

3. Material og metode

For sikkerhetsdatablad til alle reagenser som ble benyttet i øvelsene, se vedlegg 2.

3.1 Laboratorieutstyr, kjemikalier og instrumenter

3.1.1 Utstyr

Syntese av aspirin:

- Erlenmeyerkolbe
- Gummipropp med 2 cm kanyle
- Vannbad med stativ
- Engangssprøyte med kanyle
- Isbad
- Hirsch trakt med filter
- Papirfilter
- Vakuumslange
- Begerglass
- Analysevekt
- Varmeplate
- Glasstav
- Prøveglass med lokk
- Varmeskap

Analyse på NMR:

- NMR-rør (Norell)
- Glasspipette med ballong
- Prøveholder
- Dybdemåler

Analyse på UHPLC:

- Analysevekt
- Målekolbe med tilhørende trakt
- UHPLC-glass (VWR)
- Deionisert vann

3.1.2 Kjemikalier

Syntese av aspirin:

- Salisylsyre
- Eddiksyreanhydrid
- Fosforsyre
- Deionisert vann

Analyse på NMR:

- Salisylsyre
- Eddiksyreanhydrid
- Fosforsyre
- Deuterert metanol med TMS

Analyse på UHPLC:

- Acetylsalisylsyre
- Salisylsyre
- Metanol
- Eddiksyre

3.1.3 Instrumenter

- NMR – Margitek spinsolve 60 MHz med tilhørende software (MestReNova)
- UHPLC – Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000; Diode Array Detector, Hypersil GOLD (C18) UHPLC-kolonne, 100*3,0 mm, 1,9 μm .

3.2. Syntese av aspirin

Utgangspunktet for syntesen er hentet fra et kjemiekksperiment beskrevet i en artikkel fra *Journal of Chemical Education* av John Olmsted III (Olmsted, 1998). På bakgrunn av dette eksperimentet ble det utført tre ulike forsøk for å se om det var mulig å øke utbytte ved små endringer i prosedyren. Forsøk 1 følger prosedyren beskrevet i artikkelen. Ulikhetene er presisert i tabell 6.

Tabell 6 Tiden de ulike prøvene ble oppbevart i vannbad og isbad.

Prøve	Tid i vannbad (min)	Tid i isbad (min)
1	5	10-15
2	30	10-15
3	5	60

Til alle prøvene ble det veid inn ca. 1,4 g salisylsyre som ble overført til 125 mL Erlenmeyerkolber. Salisylsyren var på forhånd analysert med NMR-instrumentet som påviste at krystallene ikke var forurenset. 3 mL av eddiksyreanhydrid og 5 dråper konsentrert fosforsyre ble tilsatt Erlenmeyerkolbene. Kolbene ble dekket med en gummipropp og en kanyle ble tredd gjennom for ventilering. Deretter ble kolbene overført til et vannbad som holdt 85-90 °C. Prøve 2 var i vannbadet i 30 minutter, mens prøve 1 og 3 var i vannbadet i 5 minutter. Etter oppvarming ble det tilsatt 2 mL deionisert vann gjennom gummiproppen med en ny engangskanyle. Kolbene ble tørket og satt på benken for å nå romtemperatur. De nedkjølte kolbene ble tilsatt 20 mL deionisert vann, og oppbevart ved romtemperatur for å aktivere krystallisering. Da krystallene begynte å forme seg ble det tilsatt 10 mL deionisert vann før kolbene ble plassert i isbad. Prøve 3 var i isbadet i 60 minutter, mens prøve 1 og 2 var i isbadet til produktløsningen var nedkjølt (ca. 10-15 minutter).

En vakuumslange ble montert på en vakuumkolbe med en tilhørende hirsch trakt, og et filterpapir ble plassert i bunnen av filtertrakten. Krystallene ble samlet opp på filterpapiret og filtratet ble samlet opp i vakuumkolben. Erlenmeyerkolben ble vasket med 15 mL iskaldt deionisert vann, slik at alt produktet ble overført til hirsch trakten. Vakuumfiltreringen foregikk i 10 minutter før krystallene fra råproduktene ble overført til et begerglass, og tilsatt 10 mL deionisert vann per gram produkt. Begerglasset ble plassert på en varmeplate i kontinuerlig røring med glass-stav, hvor løsningen ble varmet til 85-90 °C. Da hele løsningen var oppløst ble begerglasset nedkjølt, og videre plassert i et isbad for rekrystalisering. Vakuumfiltreringen ble gjennomført på tilsvarende måte i 10 minutter. Krystallene ble overført til et nytt begerglass og tørket i et varmeskap som holdt 80 °C i én time. Sluttproduktet ble overført til prøveglass og veid. For kurshefte til studenter se vedlegg 3, side 2.

3.3 NMR

Det ble tatt opp ¹H-NMR-spektre av reagensene som skulle benyttes, inkludert løsemiddelet, for å fastslå at de ikke var forurensning til stede. En liten mengde av hvert reagens ble tilsatt i hvert sitt respektive NMR-rør, og 0,75 mL av løsemiddelet deuterert metanol (d-metanol) med 0,03 % TMS ble tilsatt ved hjelp av glasspipette. Før NMR-røret ble satt i instrumentet ble det plassert i en prøveholder. NMR-røret og prøveholderen ble deretter plassert i en dybdemåler. NMR-røret ble tørket med lofritt papir og ble sammen med prøveholderen plassert i instrumentet. For å homogenisere det magnetiske feltet for den gitte prøven, ble hver prøve «shimmet» før opptak av et spekter. Det ble tatt opp spektre av d-metanol, salisylsyre, fosforsyre og eddiksyreanhydrid.

For sluttprodukt og råprodukt til prøve 1, 2 og 3 ble en liten mengde krystaller løst i d-metanol med TMS i et prøveglass, før løsningen ble blandet og overført til NMR-rør for opptak av spekter. I tillegg ble det laget en prøve for opptak av NMR-spekter av filtratet til prøve 2. For detaljert prosedyre for bruk av Software til NMR-instrumentet og prosessering av spektre, se vedlegg 3 side 3-5.

3.4 UHPLC

3.4.1 Tillaging av løsninger, standarder og prøver

Utgangspunktet for analysen på UHPLC var basert på en artikkel hvor HPLC ble brukt for å kvantifisere acetylsalisylsyre i tabletter (Sawyer & Kumar, 2003). Acetylsalisylsyren var på forhånd analysert med NMR som påviste at krystallene ikke var forurenset. Først ble det tillagd en løsning bestående av vann og eddiksyre i forholdet 958:42 som til sammen rommet 1 L. Eddiksyren ble tilsatt for å holde den mobile fasen fast ved pH 4,7. Løsningen ble koblet til løsemiddelreservoaret på instrumentet, hvor det allerede stod en løsning bestående av metanol klar. Det organiske løsemiddelet, metanol, ble benyttet for å justere eluentstyrken til mobilfasen. En sterk eluent, med mer metanol i mobil fase, gir kort retensjonstid gjennom kolonnen. En svak eluent, med mindre metanol i mobil fase, gir lang retensjonstid. Analysen ble utført ved en isokratisk eluering med løsningene vann, metanol og eddiksyre i forholdet 690:280:30.

Standardene som ble benyttet var salisylysyre, acetylsalisylsyre og én blanding med disse to. 25,0 mg av acetylsalisylsyre og 25,1 mg salisylysyre ble veid ut på hvert sitt veieskip og løst i metanol i hver sin 25 mL målekolbe til en konsentrasjon på 1 mg/mL. For standarden som inneholdt begge stoffene, ble det veid ut 25,1 mg salisylysyre og 25,0 mg acetylsalisylsyre som ble blandet med metanol til en konsentrasjon på 1 mg/mL av hver. Det ble også laget en prøve med ren metanol. Løsningene ble overført til UHPLC-glass. For prøve 1, 2 og 3 ble det laget tilsvarende konsentrasjon med sluttproduktet.

3.4.2 Analyse på UHPLC

For oppstart av instrumentet se «Brukerveiledning for UHPLC» (Skøld, Kvamme, Leiren & Eriksen, 2020) som ligger ved instrumentet på laboratoriet. Området til autosampleren og prøvematerialet ble satt til 7 °C. Ved rensing av pumpe, «purging», ble ventilen åpnet og alle væskene eluert gjennom systemet, utenom kolonnen og detektoren, etter synkende polaritet. Dette tilsvarte rekkefølgen: A (deionisert vann), C (deionisert vann-eddiksyre), D (metanol vasking) og B (metanol). Væsken som eluerte gjennom systemet ble satt til 100 %. Ventilen ble lukket, og metanol og deionisert vann ble pumpet gjennom hele systemet med samme

prosent sammensetning som ønsket mobilfase med pH-justering: 72 % A (deionisert vann) og 28 % B (metanol) i 10 minutter. Deretter ble løsning A byttet ut med løsning C (deionisert vann-eddiksyre) for å eluere gjennom ønsket mobilfase i 10-15 minutter. Dette ble gjort for å kondisjonere kolonnen slik at stasjonærfase kom i likevekt med mobil fase før injisering av prøver. Strømningshastigheten ble satt til 0,4 mL/min. For oppsett av sekvens (figur 10), analyse og shut down se «Brukerveiledning for UHPLC» (Skøld et al., 2020).

#	UV_VIS_1	Name	Type	Level	Position	Volume [µl]
1		metanol	Unknown		BA1	5,000
2		acetylsalisylsyre	Unknown		BA2	5,000
3		salisylsyre	Unknown		BA3	5,000
4		ASA+salisylsyre	Calibration Standard	04	BA4	5,000
5		ASA+salisylsyre 0,5	Calibration Standard	02	BA4	2,500
6		ASA+salisylsyre 0,75	Calibration Standard	03	BA4	3,750
7		ASA+salisylsyre 1,25	Calibration Standard	05	BA4	6,250
8		ASA+salisylsyre 0,25	Calibration Standard	01	BA4	1,250
9		Prøve 1	Unknown		BA5	3,750
10		Prøve 2	Unknown		BA6	3,750
11		Prøve 3	Unknown		BA7	3,750

Figur 10 Oppsett av sekvens for analysering på UHPLC.

For visualisering av kromatogrammene og standardkurven ble «Brukerveiledning for UHPLC» benyttet (Skøld et al., 2020, s. 4).

3.5 Beregninger

3.5.1 Generelt

For beregning av mol benyttes følgende formel:

$$n = \frac{m}{Mm} \quad (1)$$

n = mol

m = masse (g)

Mm = molarmassen (g/mol)

3.5.2 Syntese av aspirin

For beregning av utbytte ved bruk av vektmålinger benyttes følgende formel:

$$\frac{n_{(\text{sluttprodukt via vekt})}}{n_{(\text{salisylsyre via vekt})}} * 100 \% = \text{utbytte basert på vekt} \quad (2)$$

3.5.3 NMR

Det ble observert at vanntoppen i prøven ikke bare kommer fra H₂O- og OH-gruppen i løsemiddelet (d-metanol), men at det også fantes vann i selve produktet. Ved bruk av spektrene fra NMR kan man finne mengden vann i produktet ved å trekke fra arealet for H₂O- og OH-toppen som stammer fra løsemiddelet. I ren d-metanol ble forholdstallet $4,11/3 = 1,37$ mellom CH₃-toppen og OH/H₂O-toppen fra spekteret med d-metanol.

For å finne massen av stoff i prøven basert på NMR-analysen benyttes følgende formel:

$$m_{\text{stoff}} = n_{\text{stoff}} * Mm_{\text{stoff}} + n_{\text{H}_2\text{O}} * Mm_{\text{H}_2\text{O}} \quad (3)$$

Formel 4 settes inn for $n_{\text{H}_2\text{O}}$ i formel 3:

$$n_{\text{H}_2\text{O}} = n_{\text{stoff}} * \frac{\text{Areal H}_2\text{O i prøven}}{2} \quad (4)$$

For å finne ut hvor mye vann som er til stede i prøven benyttes formel 5:

$$\text{Areal fra vann i prøven} = \text{areal vann totalt} - \text{areal vann/OH i løsemiddel} \quad (5)$$

For beregning av utbytte fra NMR-analysen benyttes følgende formel:

$$\frac{n_{(\text{sluttprodukt via NMR})}}{n_{(\text{salisylsyre via NMR})}} * 100 \% = \text{Utbytte NMR} \quad (6)$$

For beregning av utbytte basert på vekt benyttes følgende formel:

$$\frac{n_{(sluttprodukt\ via\ NMR)}}{n_{(salisylsyre\ via\ vekt)}} * 100 \% = Utbytte\ NMR \quad (7)$$

3.5.4 UHPLC

For å finne mol acetylsalisylsyre ble standardkurven brukt. Ligningen til standardkurven er:

$$y = 57,442x + 0,4397 \quad (8)$$

x = konsentrasjon (mg/mL)

y = areal (mAU*min)

For beregning av % acetylsalisylsyre i prøven ble konsentrasjonen fra standardkurven multiplisert med 25 mL (fortynningsvolumet), og dividert på innveid masse av prøven:

$$\frac{m_{acetylsalisylsyre\ fra\ UHPLC}}{m_{innveid\ prøve\ til\ UHPLC}} * 100 \% = \% acetylsalisylsyre\ i\ prøven \quad (9)$$

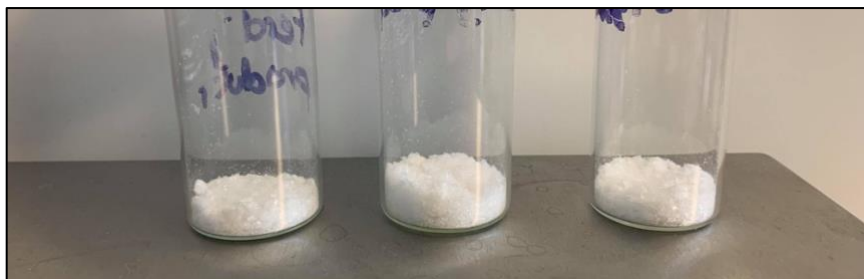
For å få ut massen basert på UHPLC multipliseres massen av innveid sluttprodukt med prosentfaktoren av acetylsalisylsyre i prøven. Massen gjøres om til mol og formel 10 benyttes for å finne utbytte basert på UHPLC:

$$\frac{n_{(via\ UHPLC)}}{n_{(salisylsyre\ via\ vekt)}} * 100 \% = Utbytte\ UHPLC \quad (10)$$

4. Resultat

4.1 Syntese av aspirin – utbytte basert på innveide mengder

Figur 11 viser at alle prøvene hadde dannet et fast hvitt stoff som indikerte at syntesen og krystalliseringen var vellykket.



Figur 11 Sluttproduktene til prøve 1, 2 og 3 fra venstre.

Resultatene for alle prøvene er oppsummert i tabell 7.

Tabell 7 Oversikt over innveid salisylsyre, rekrystallisert acetylsalisylsyre etter syntese, samt utbytte i prosent.

Prøve	Salisylsyre		Produkt acetylsalisylsyre		Utbytte (%)
	m (g)	n (mmol)	m (g)	n (mmol)	
1	1,4005	10,14	1,0953	6,08	60,00
2	1,4000	10,14	1,0658	5,916	58,34
3	1,4004	10,14	1,1315	6,28	61,93

For utregning av millimol for både salisylsyre og acetylsalisylsyre benyttes formel (1).

Eksemplene er basert på resultatene fra prøve 2:

$$\text{Salisylsyre: } \frac{1,4000 \text{ g}}{138,121 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} * 1000 \frac{\text{mmol}}{\text{mol}} = 10,14 \text{ mmol}$$

$$\text{Acetylsalisylsyre: } \frac{1,0658 \text{ g}}{180,158 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} * 1000 \frac{\text{mmol}}{\text{mol}} = 5,916 \text{ mmol}$$

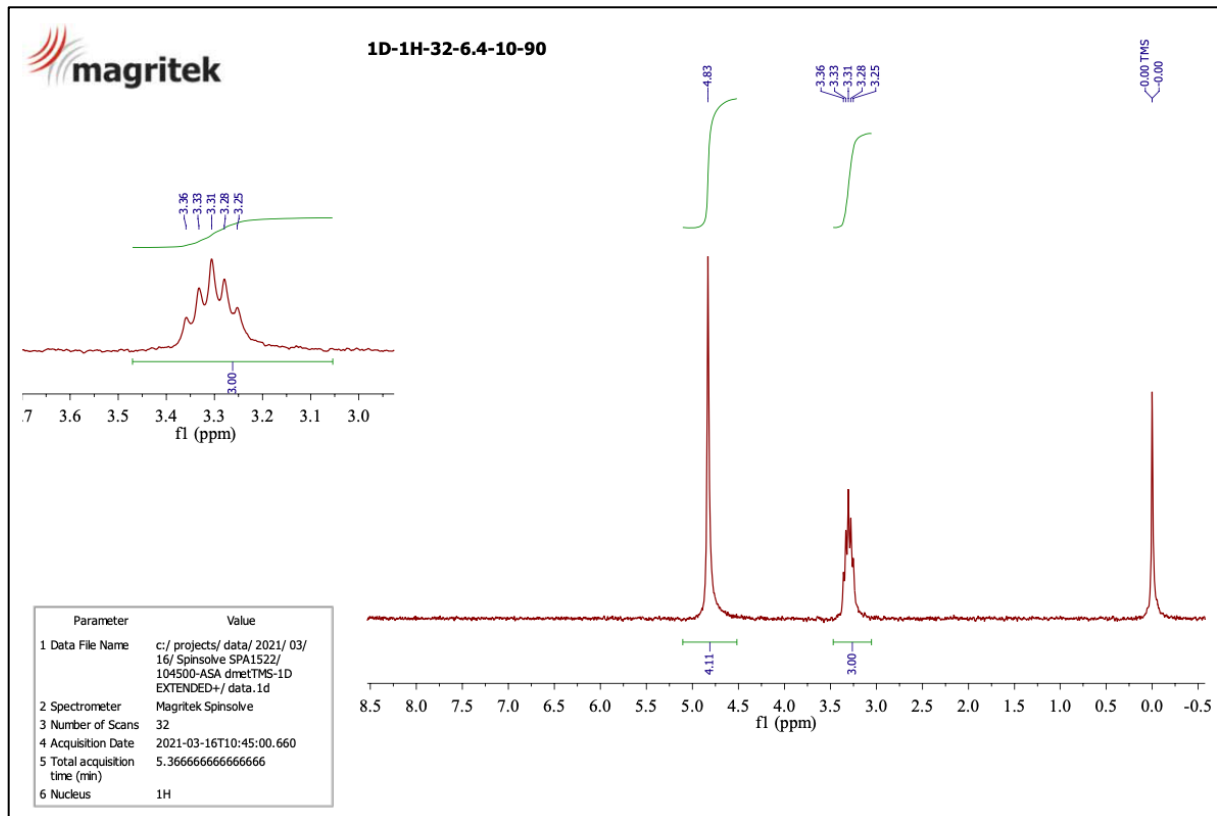
For utregning av utbytte basert på vekt fra syntesen av aspirin ble formel (2) benyttet:

$$\frac{5,916 \text{ mmol}}{10,14 \text{ mmol}} * 100 \% = 58,34 \%$$

Tilsvarende beregninger ble gjort for prøve 1 og 3.

4.2 NMR

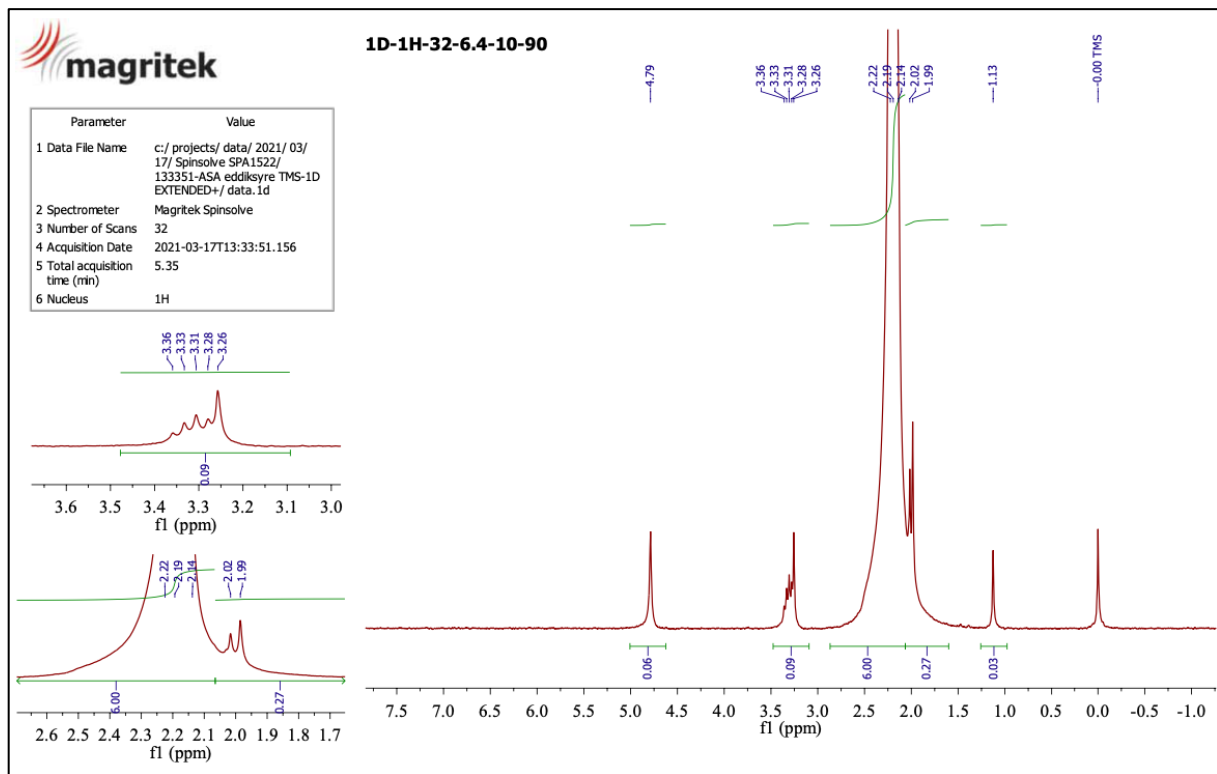
Det ble tatt opp NMR-protonspektre av reagensene og prøvene. Reagensene ble analysert for å påse at det ikke var noen forurensning til stede før de ble benyttet i syntesen. Prøvene ble analysert for å påvise at alle prøvene hadde dannet acetylsalisylsyre som produkt fra syntesen.



Figur 12 Protonspekter av deuterert metanol med TMS. TMS er en singlett med kjemisk skift 0,0 ppm. Metylgruppen fra metanol gir fem topper (multipllett), med kjemisk skift 3,31 ppm og integral 3,00. Vann er en singlett med kjemisk skift på 4,83 ppm og integral 4,11.

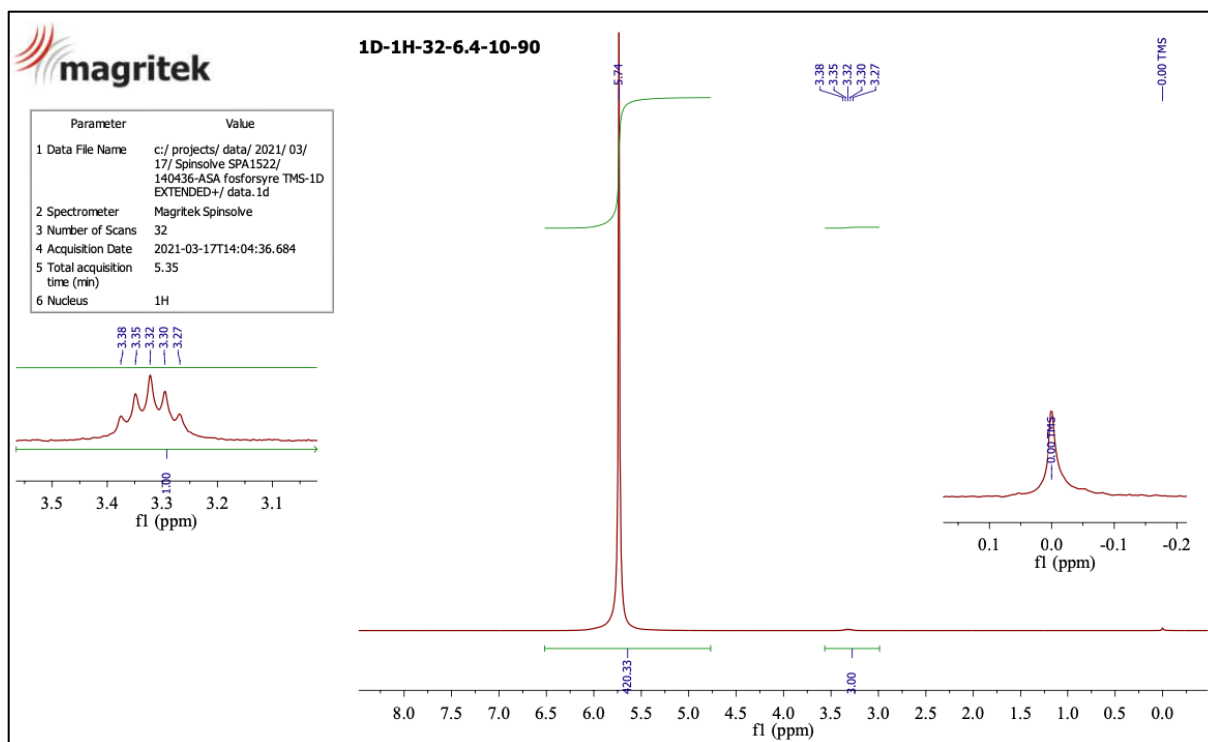
Figur 12 viser et NMR-protonspekter for prøven av d-metanol med TMS. TMS blir benyttet som en kjemisk skift standard og satt til 0,00 ppm. Alle andre signal blir referert i forhold til denne. TMS består av 12 magnetisk ekvivalente H-atomer som resulterer i en singlett. Integralet for metylgruppen fra d-metanol ble satt til 3 fordi det er tre hydrogenatomer til stede i metylgruppen som gir signalet. Årsaken til at metylgruppen fra d-metanol gir en multipllett er at d-metanol ikke er fullstendig deuterert. Dette gjør at deutererte proton byttes ut med ikke deutererte proton, og protonene er dermed ikke magnetisk ekvivalente. Integralet

under vann-og OH-toppen blir automatisk satt til 4,11 av tilhørende software. Det ekspanderte spekteret viser multiplisiteten til metylgruppen i d-metanol.



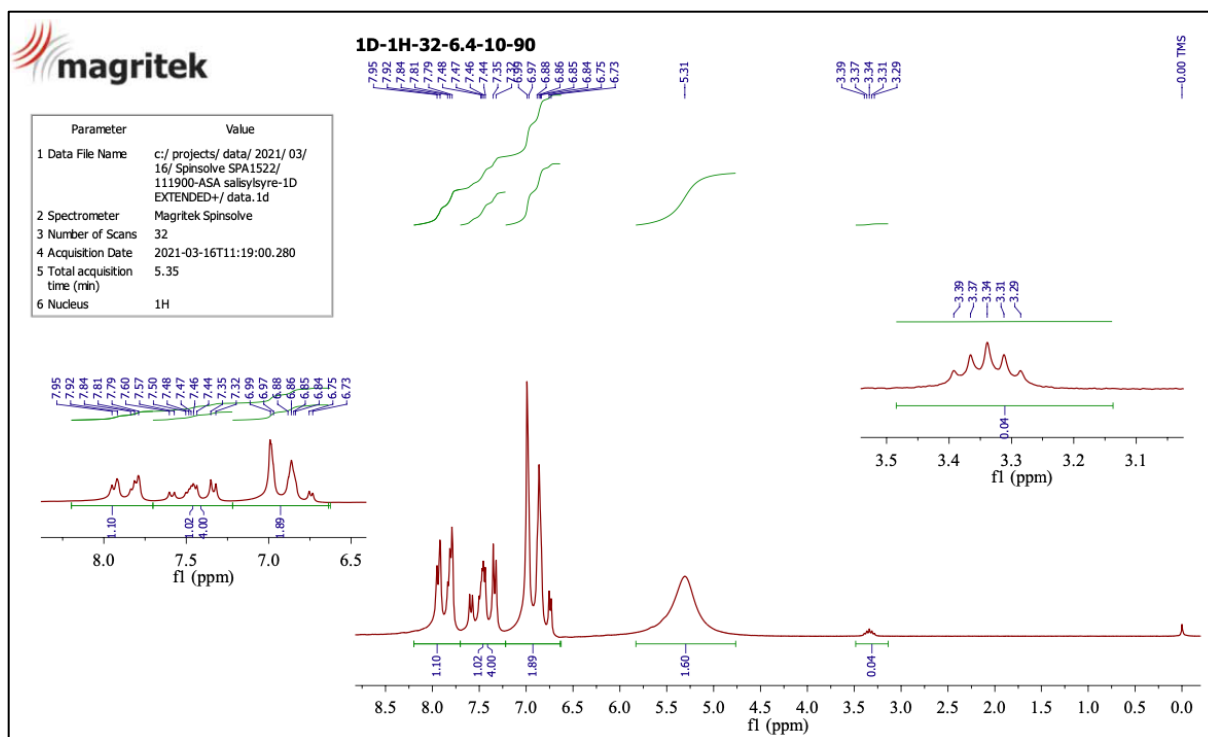
Figur 13 Protonspekter av eddiksyreanhydrid tilsatt d-metanol med TMS. TMS er en singlett med kjemisk skift 0,0 ppm. Spekteret viser også to satellitter. Én satellitt ses ved kjemisk skift 1,13 ppm og integral 0,03, og én satellitt ses ved kjemisk skift 3,26 ppm og integral 0,09. Metylgruppen fra metanol har et kjemisk skift 3,31 ppm og integral 0,09. Vann er en singlett med kjemisk skift 4,79 ppm og integral 0,06. Eddiksyreanhydrid ses som den store toppen med kjemisk skift ~ 2,19 ppm og integral 6,00. Dette signalet har en skulder med kjemisk skift 1,99 ppm og 2,02 ppm og er en dublett med integral 0,27.

Figur 13 viser et NMR-protonspekter for prøven med eddiksyreanhydrid tilsatt d-metanol med TMS. Metylgruppen fra d-metanol overlapper med satellitten til venstre, og bidrar i dette integralet. Det ekspanderte spekteret oppe til venstre viser overlapp mellom metylgruppen fra d-metanol og den ene satellitten. På eddiksyreanhydridtoppen observeres det en dublett som oppfattes som en «skulder», og vises i det nederste ekspanderte spekteret.



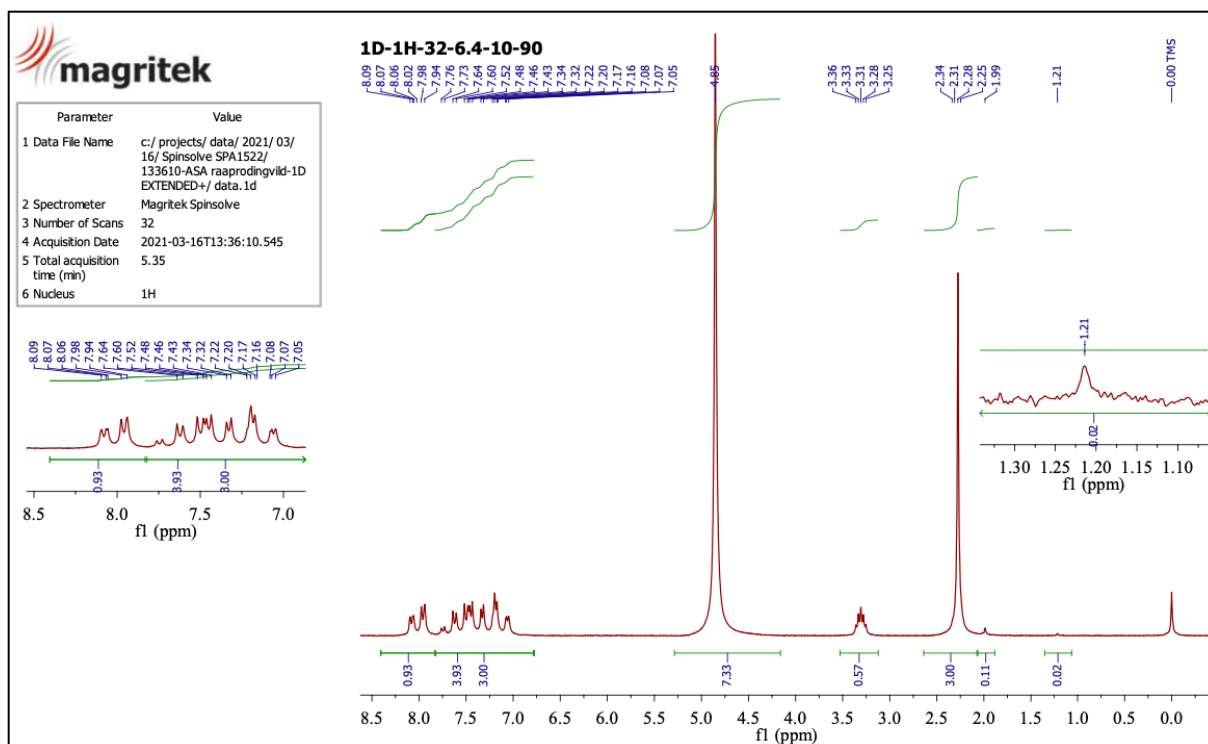
Figur 14 Protonspekter av fosforsyre tilsatt d-metanol med TMS. TMS er en singlett med kjemisk skift 0,0 ppm. Metylgruppen fra d-metanol gir fem topper (multipllett), og kjemisk skift 3,32 ppm med integral 3,00. Vann er en singlett med kjemisk skift 5,74 ppm og integral 420,33.

Figur 14 viser et NMR-protonspekter for prøven med fosforsyre tilsatt d-metanol med TMS. Integralet for metylgruppen fra d-metanol ble satt til 3 fordi det er tre hydrogenatomer i metylgruppen som vil generere signalet. Integralet under vann- og OH-toppen blir dermed automatisk satt. Det ekspanderte spekteret til venstre viser multiplisiteten til metylgruppen i d-metanol, og det ekspanderte spekteret til høyre viser TMS toppen.



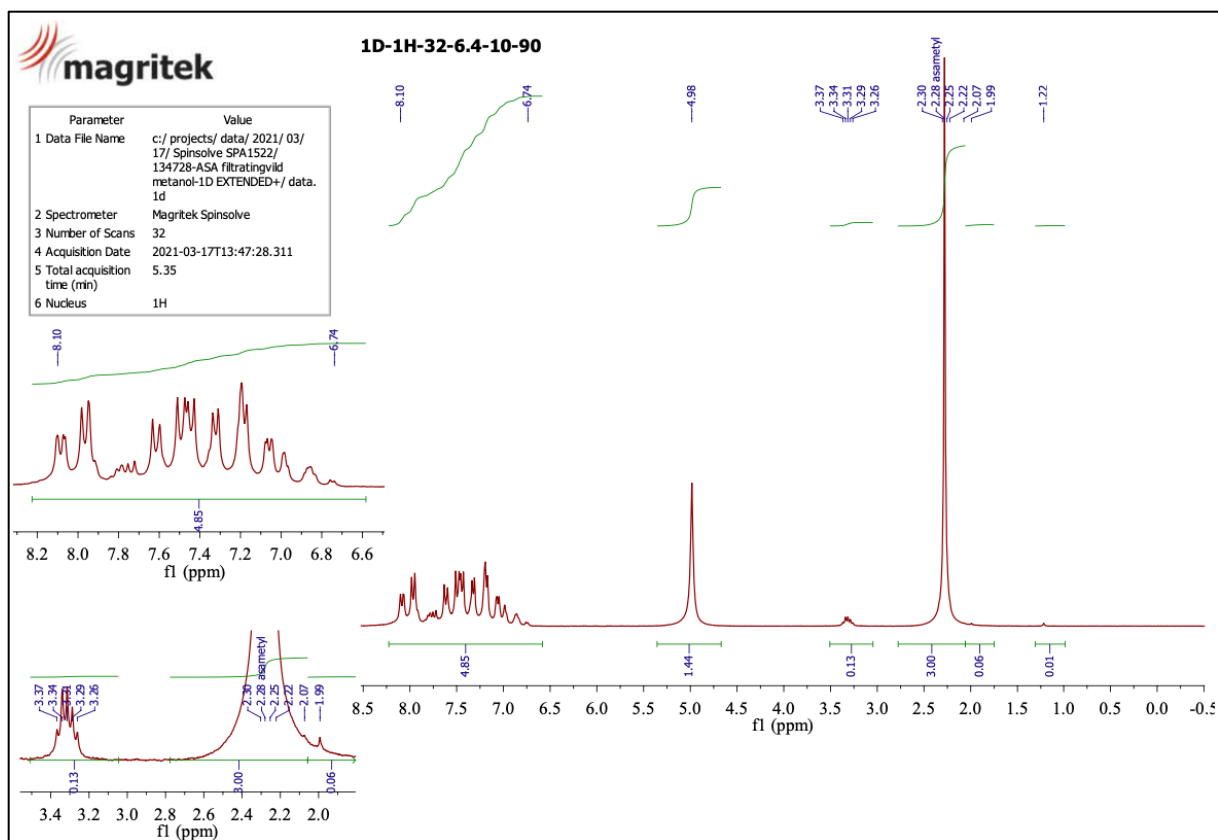
Figur 15 Protonspekter av salisylsyre tilsatt d-metanol med TMS. TMS er en singlett med kjemisk skift 0,0 ppm. Metylgruppen fra d-metanol gir fem toppe (multiplett), med kjemisk skift 3,34 ppm og integral 0,04. Vann er en bred singlett med kjemisk skift på 5,31 ppm og integral 1,60. Den aromatiske gruppen har kjemisk skift 6,73-7,95 ppm og integral 4.

Figur 15 viser et NMR-protonspekter for prøven med salisylsyre tilsatt d-metanol med TMS. Integralet under den aromatiske gruppen ble satt til 4 fordi det er fire hydrogenatomer som gir signalet. Integralet under vann- og OH-toppen, og metylgruppen fra metanol ble dermed automatisk satt. Vannsignalet er forskjøvet mot høyere kjemisk skift i forhold til figur 12. Det ekspanderte spekteret til venstre viser multiplisiteten for den aromatiske gruppen med kjemisk skift, og det ekspanderte spekteret til høyre viser metylgruppen i d-metanol.



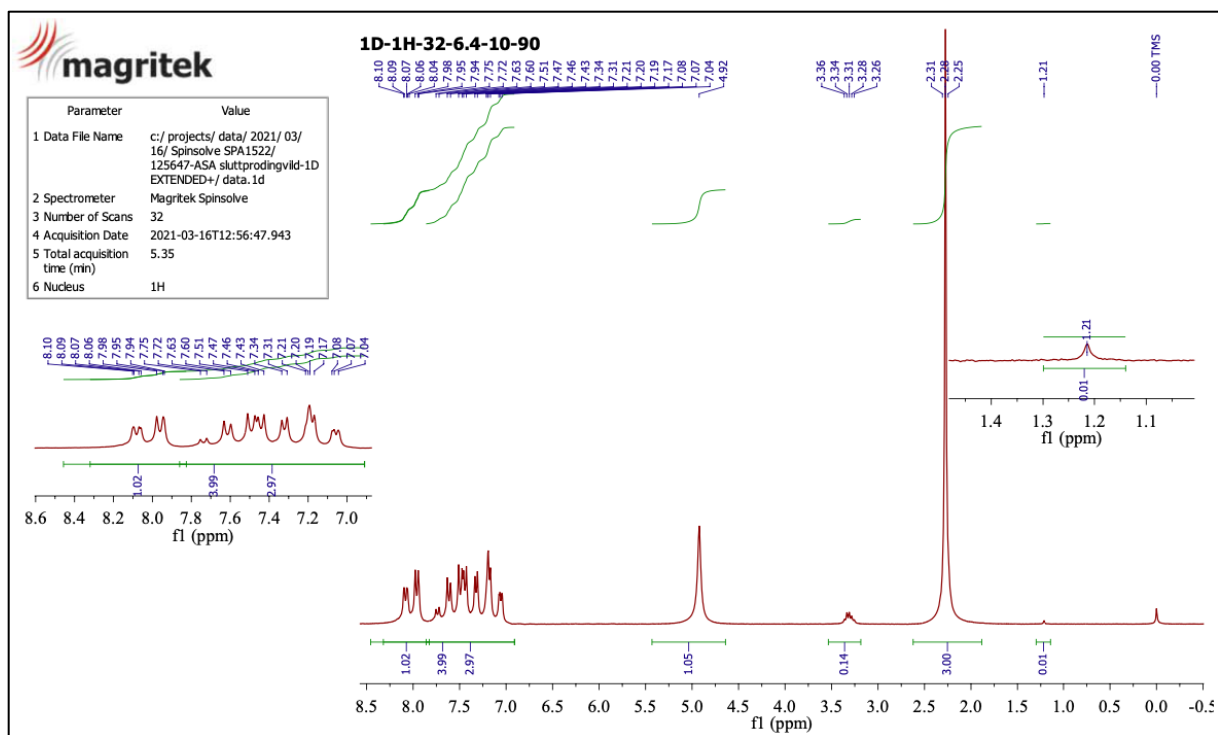
Figur 16 Protonspekter av råprodukt til prøve 2 tilsatt d-metanol med TMS. TMS er en singlett med kjemisk skift 0,0 ppm. En singlett sees ved kjemisk skift 1,21 ppm og integral 0,02. En annen singlett sees ved kjemisk skift 1,99 ppm og integral 0,11. Metylgruppen fra acetylsalisylsyre er en singlett med kjemisk skift ~ 2,29 ppm og integral 3. Metylgruppen fra d-metanol gir fem toppe (multipllett), med kjemisk skift 3,31 ppm og integral 0,57. Vann er en singlett med kjemisk skift 4,85 ppm og integral 7,33. Den aromatiske gruppen sees til venstre i spekteret med kjemisk skift 7,05-8,09 ppm og integral 3,93.

Figur 16 viser et NMR-protonspekter for råproduktet til prøve 2 tilsatt d-metanol med TMS. Ved kjemisk skift 1,99 ppm observeres det en rest av eddiksyre (Babij et al., 2016). En ukjent topp observeres ved kjemisk skift 1,21 ppm. Integralet til acetylsalisylsyretoppen ble satt til 3 fordi det er tre hydrogenatomer som gir signalet. Integralet under vann og OH-toppen, og metylgruppen fra d-metanol ble dermed automatisk satt. Det er høyere intensitet av vann i råproduktet enn i sluttproduktet i prøve 2, se figur 18. Det ekspanderte spekteret til venstre viser multiplisiteten for den aromatiske gruppen med kjemisk skift 7,05-8,09 ppm, og det ekspanderte spekteret til høyre viser en singlett med kjemisk skift 1,21 ppm. For råproduktene til prøve 1 og 3 se vedlegg 1 figur 3 og 4.



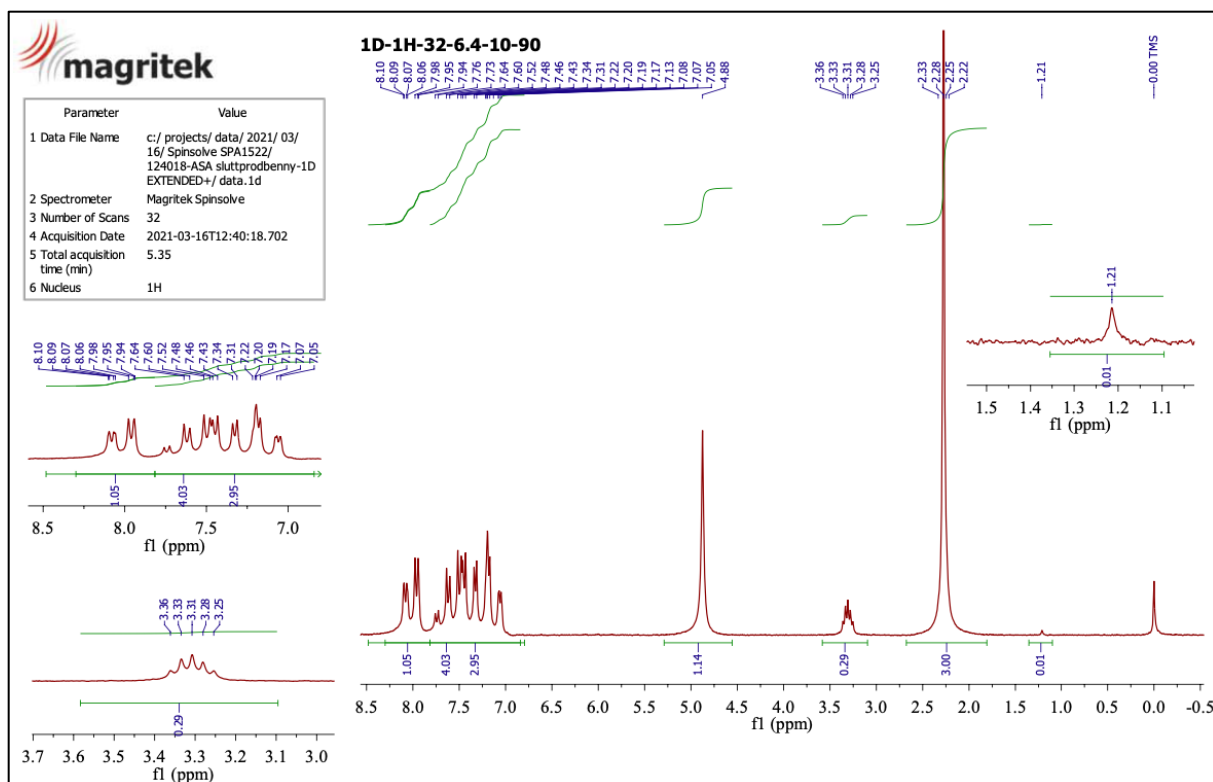
Figur 17 Protonspekter av filtrat til prøve 2. En singlett sees ved kjemisk skift 1,21 ppm og integral 0,01. Metylgruppen fra acetylsalisylsyre er en singlett med kjemisk skift ~2,27 ppm og integral 3. Dette signalet har en «skulder» med kjemisk skift 1,99 ppm og integral 0,06, og en «skulder» ved 2,07 ppm. Metylgruppen fra d-metanol gir fem topper (multiplert), med kjemisk skift 3,31 ppm og integral 0,13. Vann er en singlett med kjemisk skift 4,98 ppm og integral 1,14. Den aromatiske gruppen har kjemisk skift 6,74-8,10 ppm og integral 4,85.

Figur 17 viser et NMR-protonspekter for filtrat til prøve 2. Ved kjemisk skift 1,99 ppm og 1,21 ppm observeres det to topper av ukjent opphav. Integralet til acetylsalisylsyretoppen ble satt til 3 fordi det er tre hydrogenatomer som gir signalet. Integralet under de andre toppene ble dermed automatisk satt. Vannsignalet viser høyere intensitet i filtratet enn i sluttproduktet til prøve 2, se figur 18. Det øverste ekspanderte spekteret til venstre viser multiplisiteten for den aromatiske gruppen med kjemisk skift 6,74-8,10 ppm. Det observeres nye signaler i den aromatiske gruppen. Det nederste ekspanderte spekteret til venstre viser multiplisiteten til metylgruppen fra d-metanol og «skuldrene» til metylgruppen fra acetylsalisylsyre.



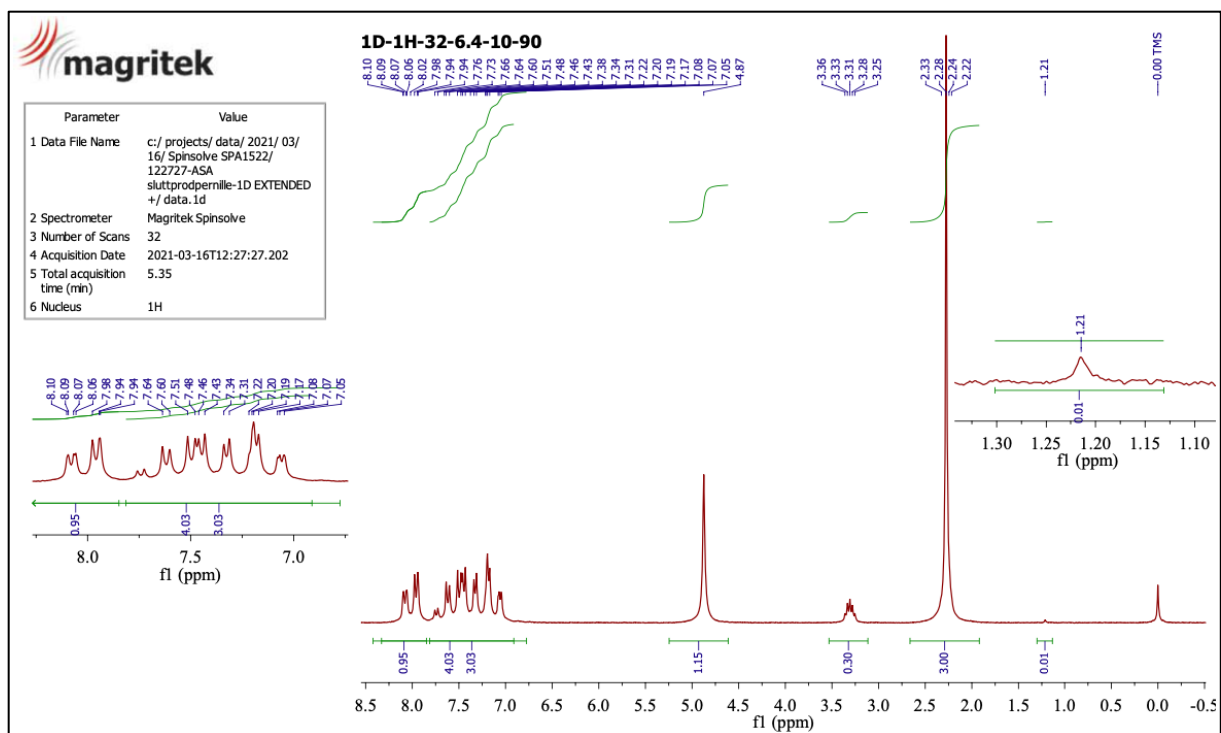
Figur 18 Protonspekter til sluttprodukt av prøve 2 tilsatt d-metanol med TMS. TMS er en singlett med kjemisk skift 0,0 ppm. En singlett sees ved kjemisk skift 1,21 ppm og integral 0,01. Metylgruppen fra acetylsalisylsyre er en singlett med kjemisk skift 2,28 ppm og integral 3. Metylgruppen fra metanol gir fem toppene (multiplett), med kjemisk skift 3,31 ppm og integral 0,14. Vann er en singlett med kjemisk skift 4,92 ppm og integral 1,05. Den aromatiske gruppen sees til venstre i spekteret med kjemisk skift 7,04-8,10 ppm og intergral 3,99.

Figur 18 viser et NMR-protonspekter for prøve 2 tilsatt d-metanol med TMS. Det observeres en ukjent topp i spekteret med kjemisk skift 1,21 ppm, som også kan ses i det ekspanderte spekteret til høyre. Det ekspanderte spekteret til venstre viser den aromatiske gruppen ved kjemisk skift 7,04-8,10 ppm. Integralet under metylgruppen fra acetylsalisylsyre ble satt til 3, fordi tre hydrogenatomer gir dette signalet. Integralet under de andre toppene ble automatisk satt ut fra dette.



Figur 19 Protonspekter av sluttprodukt av prøve 1 tilsatt d-metanol med TMS. TMS er en singlett med kjemisk skift 0,0 ppm. En singlett sees med kjemisk skift 1,21 ppm og integral 0,01. Metylgruppen fra acetylsalisylsyre er en singlett med kjemisk skift på ~ 2,27 ppm og integral 3. Metylgruppen fra d-metanol gir fem topper (multipllett), med kjemisk skift 3,31 og integral 0,29. Vann er en singlett med kjemisk skift 4,88 ppm og integral 1,14. Den aromatiske gruppen sees til venstre i spekteret med kjemisk skift 7,05-8,10 ppm og integral 4,03.

Figur 19 viser et NMR-protonspekter for prøve 1 tilsatt d-metanol med TMS. Det observeres en ukjent topp i spekteret med kjemisk skift 1,21 ppm, som også kan sees i det ekspanderte spekteret til høyre. Det øverste ekspanderte spekteret til venstre viser den aromatiske gruppen med kjemisk skift 7,05-8,10 ppm, og det nederste ekspanderte spekteret viser metylgruppen fra d-metanol. Integralet under metylgruppen fra acetylsalisylsyre ble satt til 3, fordi tre hydrogenatomer gir dette signalet. Integralet under de andre toppene ble automatisk satt ut fra dette.



Figur 20 Protonspekter av sluttprodukt av prøve 3, tilsatt d-metanol med TMS. TMS er en singlett med kjemisk skift 0,0 ppm. En singlett sees med kjemisk skift 1,21 ppm og integral 0,01. Metylgruppen fra acetylsalisylsyre er en singlett med kjemisk skift ~ 2,26 ppm, og integral 3,00. Metylgruppen fra metanol gir fem topper (multiplett), med kjemisk skift 3,31 ppm og integral 0,30. Vann er en singlett med kjemisk skift 4,87 ppm og integral 1,15. Den aromatiske gruppen sees til venstre i spekteret med kjemisk skift 7,05-8,10 ppm og intergral 4,03.

Figur 20 viser et NMR-protonspekter for prøven 3 tilsatt d-metanol med TMS. Det observeres en ukjent topp i spekteret med kjemisk skift 1,21 ppm, som også kan sees i det ekspanderte spekteret til høyre. Det ekspanderte spekteret til venstre viser den aromatiske gruppen med kjemisk skift 7,05-8,10 ppm. Integralet under metylgruppen fra acetylsalisylsyre ble satt til 3, fordi tre hydrogenatomer gir dette signalet. Integralet under de andre toppene ble automatisk satt ut fra dette.

Kjemisk skift, areal og multiplisitet for hver organisk gruppe i hver prøve blir oppsummert i tabell 8.

Tabell 8 Oppsummerer kjemisk skift, integral og multiplisitet til de ulike spektrene fra NMR-analysen.

Prøve	Signal	Kjemisk skift (ppm)	Integral	Multiplisitet
D-metanol med TMS	TMS	0,00		S
	CH ₃ i d-met	3,31	3,00 ^{*1}	M
	H ₂ O i d-met	4,83	4,11	S
Eddiksyreanhydrid tilsatt d-met med TMS	TMS	0,00		S
	Satellitt 1	1,13	0,03	S
	Eddiksyreanhydrid	~ 2,19	6,00 ^{*2}	S
	Satellitt 2	3,26	0,09	S
	CH ₃ i d-met	3,31		M
	H ₂ O i d-met	4,79	0,06	S
Fosforsyre tilsatt d-met med TMS	TMS	0,00		S
	CH ₃ i d-met	3,32	3,00 ^{*3}	M
	H ₂ O i d-met	5,74	420,33	S
Salisylysyre tilsatt d-met med TMS	TMS	0,00		S
	CH ₃ i d-met	3,34	0,04	M
	H ₂ O i d-met	5,31	1,60	S
	Aromatisk gruppe	~ 6,73 – 7,95	4,00 ^{*4}	M
Råprodukt til prøve 2 tilsatt d-met med TMS	TMS	0,00		S
	Ukjent	1,21	0,02	S
	Eddiksyre	1,99	0,11	S
	Acetylsalisylysyre	~ 2,29	3,00 ^{*5}	S
	CH ₃ i d-met	3,31	0,57	M
	H ₂ O i d-met	4,85	7,33	S
	Aromatisk gruppe	~5,05-8,09	3,93	M
Filtrat fra råprodukt til prøve 2	TMS			

	Ukjent	1,21	0,01	S
	Eddiksyre	1,99	0,06	S
	Ukjent	2,07		S
	Acetylsalisylsyre	~2,27	3,00 * ⁵	S
	CH ₃ i d-met	3,31	0,13	M
	H ₂ O i d-met	4,98	1,14	S
	Aromatisk gruppe	~6,74-8,10	4,85	M
Prøve 2 tilsatt d-met med TMS	TMS	0,00		S
	Ukjent	1,21	0,01	S
	Acetylsalisylsyre	2,28	3,00 * ⁵	S
	CH ₃ i d-met	3,31	0,14	M
	H ₂ O i d-met	4,92	1,05	S
	Aromatisk gruppe	~7,04-8,10	3,99	M
Prøve 1 tilsatt d-met med TMS	TMS	0,00		S
	Ukjent	1,21	0,01	S
	Acetylsalisylsyre	~2,27	3,00 * ⁵	S
	CH ₃ i d-met	3,31	0,29	M
	H ₂ O i d-met	4,88	1,14	S
	Aromatisk gruppe	~ 7,05-8,10	4,03	M
Prøve 3 tilsatt d-met med TMS	TMS	0,00		S
	Ukjent	1,21	0,01	S
	Acetylsalisylsyre	~ 2,26	3,00 * ⁵	S
	CH ₃ i d-met	3,31	0,30	M
	H ₂ O i d-met	4,87	1,15	S
	Aromatisk gruppe	~7,05-8,10	4,03	M

*1 Satt areal på CH₃ i d-metanol til 3,00 dermed blir H₂O 4,11.

*2 Satt areal på Eddiksyreanhydrid til 6,00 dermed blir resterende areal beregnet deretter.

*3 Satt areal på CH₃ i d-metanol til 3,00 dermed blir H₂O-toppen automatisk regnet ut.

*4 Satt areal på aromatisk gruppe til 4,00 dermed blir resterende areal beregnet deretter.

*5 Satt areal på CH₃ i acetylsalisylsyre til 3,00 dermed blir resterende areal beregnet deretter.

4.2.1 Beregninger for NMR

Eksemplene er basert på resultatene til prøve 2.

Salisylsyre:

Som nevnt under kapittel 3.5.3 antas det at arealet til H₂O- og OH-toppen i d-metanol er 4,11/3 = 1,37 ganger større enn metyltoppen (i spekteret for d-metanol, figur 12). Arealet til metylgruppen i d-metanol i spekteret til salisylsyre (figur 15) er 0,04. Arealet ble multiplisert med forholdstallet 1,37:

$$\text{Areal H}_2\text{O og OH fra d-metanol:} \quad 1,37 * 0,04 = 0,0548$$

$$\text{Areal H}_2\text{O i salisylsyreprøven:} \quad 1,60 - 1 - 0,0548 = 0,5452$$

Formel (4) ble benyttet for å finne n_{H_2O} som deretter ble satt inn i formel (3):

$$n_{H_2O} = 1 * \frac{0,5452}{2}$$
$$n_{H_2O} = 0,2726$$

0,2726 ble satt inn for n_{H_2O} i formel (3). Deretter ble formel (3) omgjort med hensyn på n_{stoff} for salisylsyre:

$$1,4000 \text{ g} = n_{stoff}(138,121 \text{ g/mol} + 0,2726 * 18,01 \text{ g/mol})$$

$$n_{stoff} = \frac{1,4000 \text{ g}}{143,03 \text{ g/mol}} * 1000 = 9,79 \text{ mmol}$$

Acetylsalisylsyre:

Forholdstallet, 1,37, ble multiplisert med arealet til metanol toppen til figur 18.

$$1,37 * 0,14 = 0,1918$$

Dette tallet ble subtrahert fra vanntoppen i prøve 2 for å finne ut hvor mye vann det var til stede. Formel (5) ble benyttet:

$$1,05 - 0,1918 = 0,8582$$

Formel (3) ble omgjort med hensyn på n_{stoff} for prøve 2 og acetylsalisylsyre:

$$1,0658 \text{ g} = n_{stoff} (180,158 \text{ g/mol} + \frac{0,8582}{2} * 18,01 \text{ g/mol})$$

$$n_{stoff} = \frac{1,0658 \text{ g}}{187,88 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 5,67 \text{ mmol}$$

Utbytte basert på NMR ble beregnet ut fra formel (6):

$$\frac{5,67 \text{ mmol}}{9,79 \text{ mmol}} * 100 \% = 57,92 \%$$

Utbytte basert på vekt av salisylysyre ble beregnet ut fra formel (7):

$$\frac{5,67 \text{ mmol}}{10,14 \text{ mmol}} * 100 \% = 55,92 \%$$

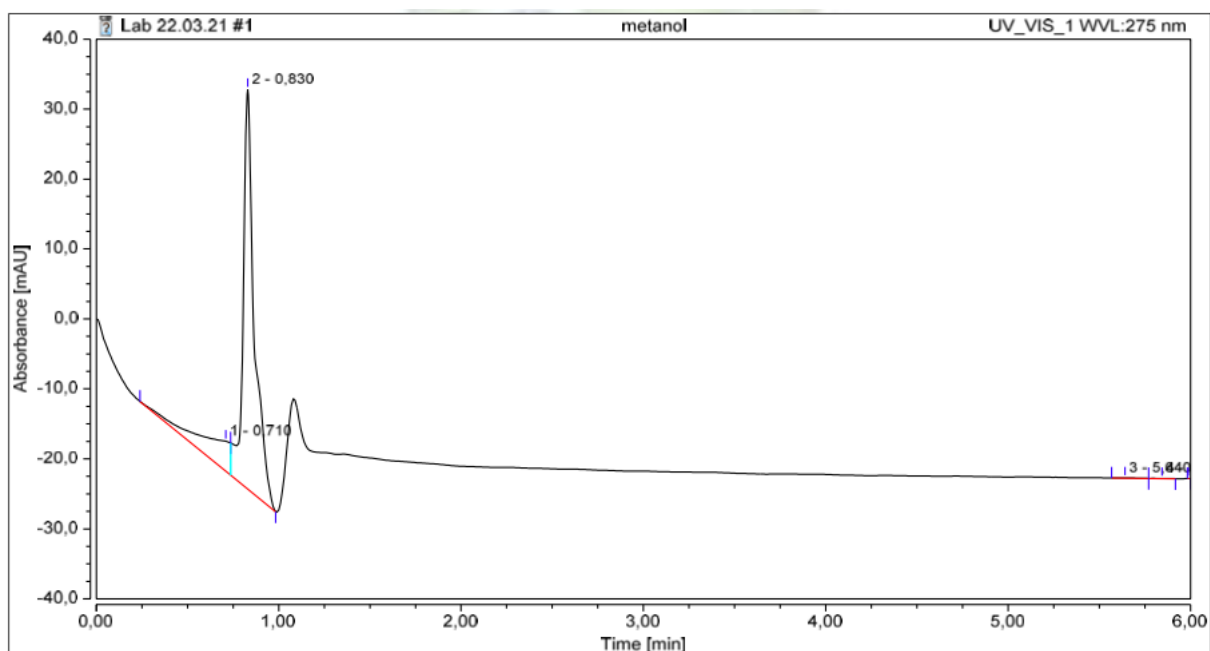
Tilsvarende ble gjort for prøve 1 og 3, og resultatene er oppsummert i tabell 9.

Tabell 9 Oppsummerer utbytte basert på NMR og utbytte basert på vekt for sluttproduktet til alle prøvene.

Prøve	% Utbytte basert på NMR	% Utbytte basert på vekt
1	59,87	57,79
2	57,92	55,92
3	61,89	59,76

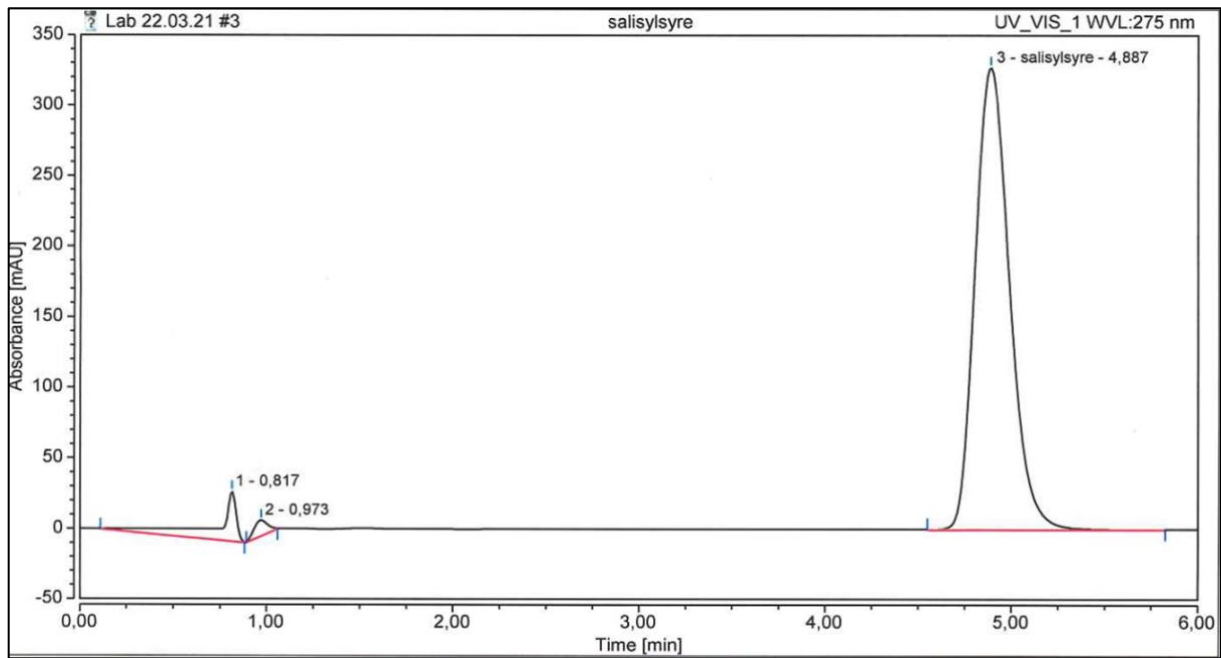
4.3 UHPLC

For UHPLC ble det tillagd ulike standarder; én for salisylsyre og én for acetylsalisylsyre hvor begge hadde en konsentrasjon på ca. 1 mg/mL. Disse standardene ble brukt for å se hvilken retensjonstid hver komponent ville ha. Det ble i tillegg laget en standard som inneholdt både acetylsalisylsyre og salisylsyre med tilsvarende konsentrasjon for å bekrefte at analysen ga god resolusjon mellom toppene. Fra denne standarden ble det injisert fem valgte volum for å lage en standardkurve. Injeksjonsvolumet var fra 1,25-6,25 μL . Prøvene ble tillagd ved å veie ut ca. 25 mg av krystallene. Krystallene ble løst fullstendig i 25 mL metanol for å få en konsentrasjon på 1 mg/mL.



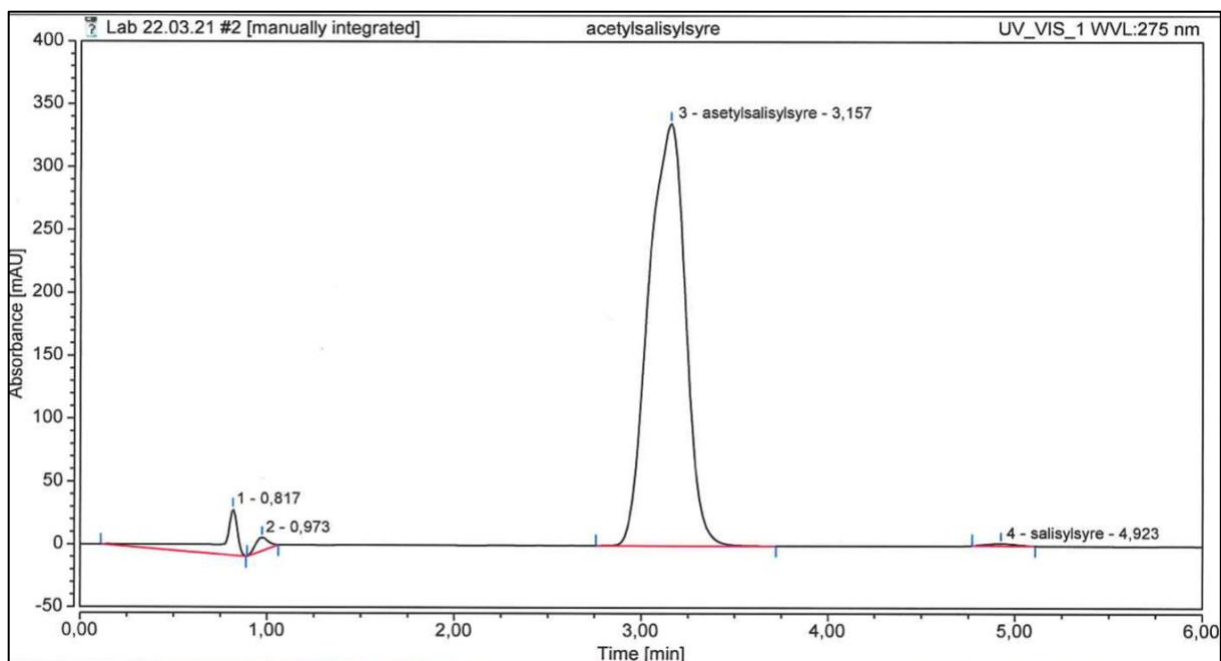
Figur 21 Kromatogram av løsemiddelet metanol. Retensjonstiden var på 0,830 minutter.

Figur 21 viser kromatogrammet for metanol som ble benyttet som løsemiddel. Toppen for metanol sees igjen i alle kromatogrammene for standarder og prøver. Det tar 0,830 min fra injeksjon av prøven til løsemiddelet i prøven når detektoren.



Figur 22 Kromatogram av standarden med salisylsyre etter injeksjonsvolum på 5,00 μ L. Salisylsyre har retensjonstid på 4,887 min.

Figur 22 viser kromatogrammet til standarden med salisylsyre som har en retensjonstid på 4,887 min.



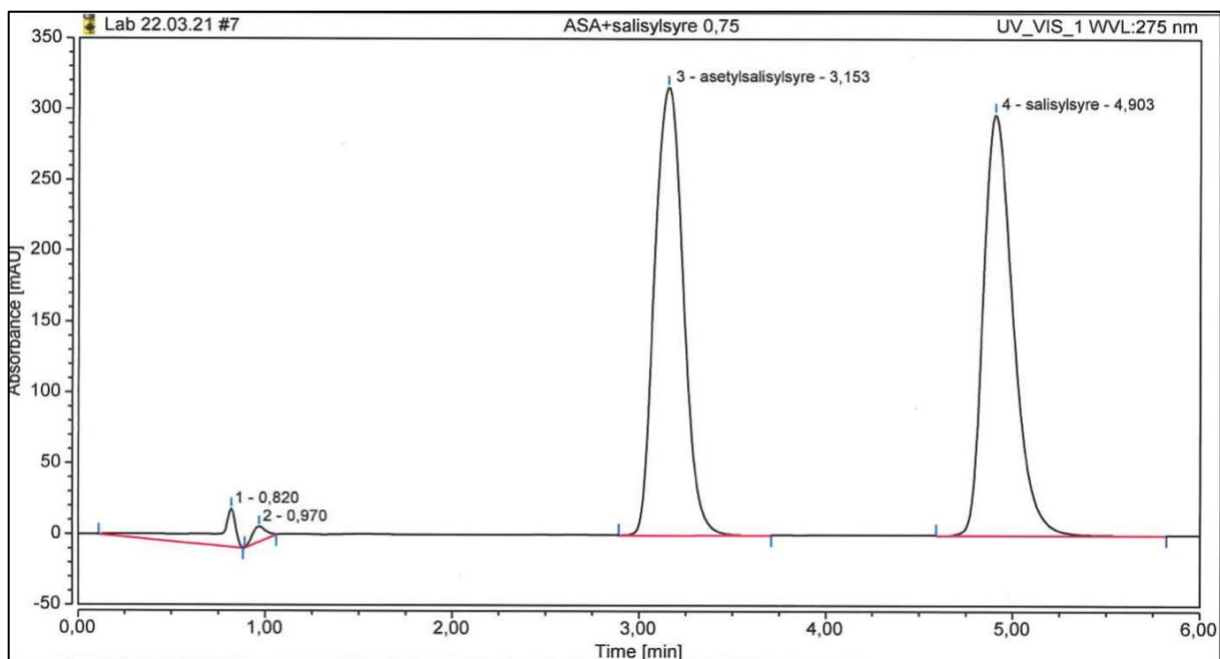
Figur 23 Kromatogram av standarden med acetylsalicylsyre etter injeksjonsvolum på 5,00 μL . Acetylsalicylsyre har retensjonstid på 3,157 min.

Figur 23 viser kromatogrammet til standarden med acetylsalicylsyre som har en retensjonstid på 3,157 min. Det observeres en liten topp ved ca. 5 minutter.

Tabell 10 Oppsummerer injeksjonsvolum, retensjonstid og areal for salisylsyre og acetylsalicylsyre.

Standard	Injeksjonsvolum (μL)	Retensjonstid (min)	Areal (mAU*min)
Salisylsyre (figur 22)	5,00	4,887	69,950
Acetylsalicylsyre (figur 23)	5,00	3,16	76,421

Kromatogrammene til figur 22 og 23 viser at toppene for salisylsyre og acetylsalicylsyre har ulik retensjonstid ved denne metoden, som oppsummeres i tabell 10. Dermed kan man danne standarder med begge komponentene i samme prøve. Arealet for salisylsyre og acetylsalicylsyre er hentet fra vedlegg 1, figur 5 og 6.



Figur 24 Kromatogram av standarden med acetylsalisylyre (0,964 mg/mL) og salisylyre (1,004 mg/mL) etter injeksjonsvolum på 3,75 μ L. Acetylsalisylyre har retensjonstid på 3,153 min. Salisylyre har retensjonstid på 4,903 min.

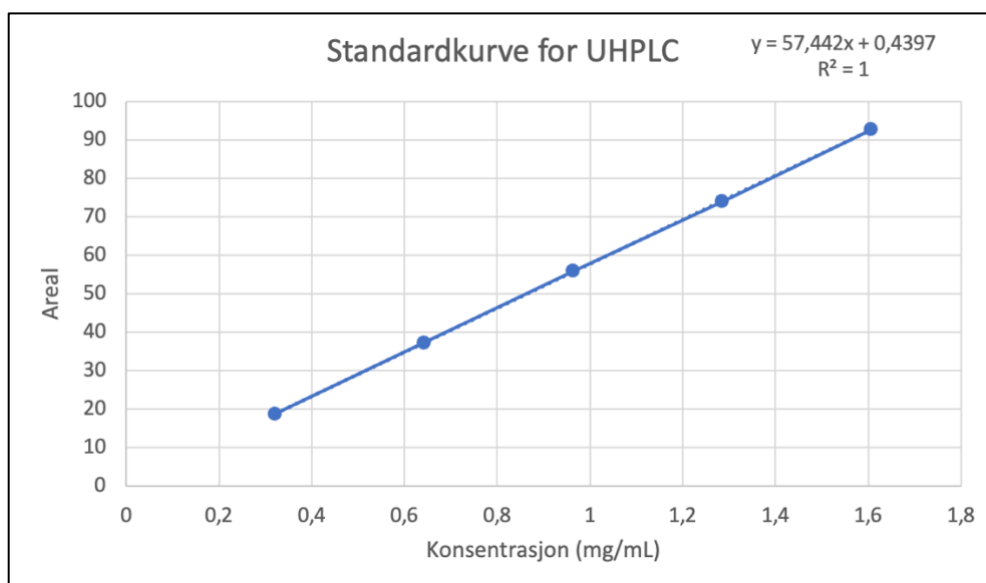
Kromatogrammet av standarden med injeksjonsvolum 3,75 μ L viser god resolusjon mellom toppene for acetylsalisylyre og salisylyre. Arealet for acetylsalisylyre er 56,018 mAU*min og arealet til salisylyre er 54,875 mAU*min, hentet fra vedlegg 1, figur 9.

Det ble totalt brukt 5 standarder med ulikt injeksjonsvolum for å danne standardkurven (figur 25). Injeksjonsvolumet, retensjonstid og konsentrasjonen for de ulike standardene sees i tabell 11. Kromatogrammene med tilhørende areal til hver standard sees i vedlegg 1 (figur 7-11). Standard 1-5 inneholder både salisylyre og acetylsalisylyre.

Tabell 11 Oppsummerer retensjonstid for acetylsalisylsyre og salisylsyre for standardene.

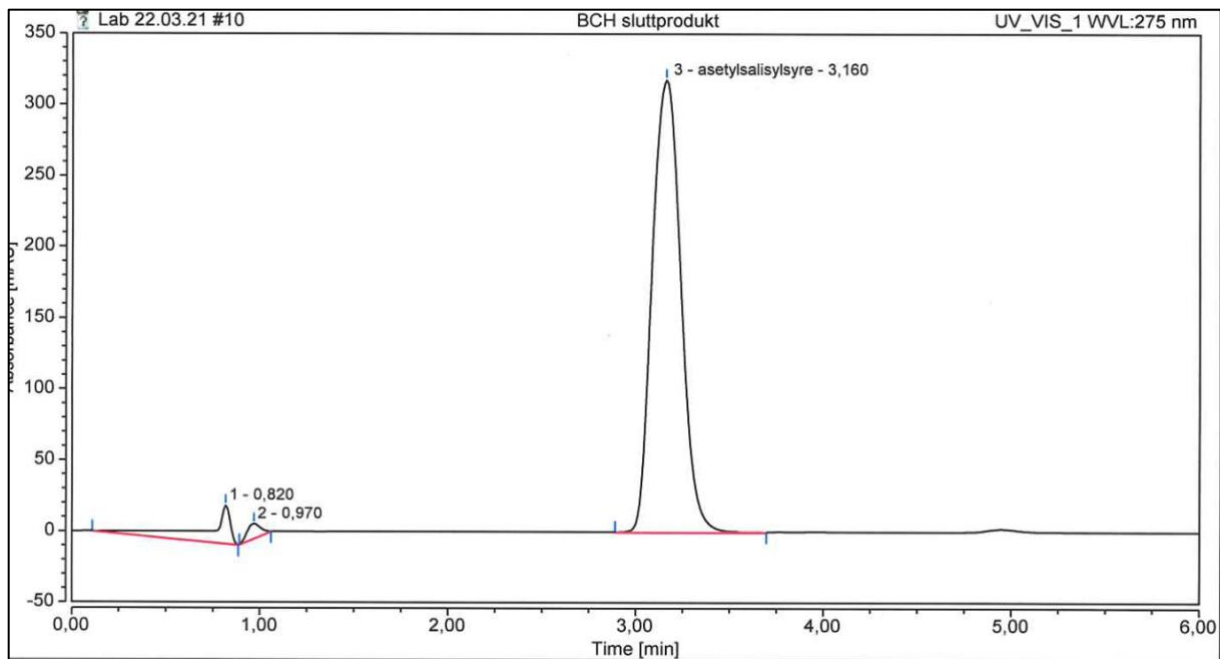
Standard	Injeksjonsvolum (μL)	Retensjonstid til acetylsalisylsyre (min)	Areal av acetylsalisylsyre (mAU*min)	Konsentrasjon acetylsalisylsyre (mg/mL)
Standard 1	1,25	3,17	18,876	0,321
Standard 2	2,50	3,16	37,321	0,643
Standard 3 (figur 24)	3,75	3,15	56,018	0,964
Standard 4	5,00	3,16	74,056	1,285
Standard 5	6,25	3,17	92,799	1,607

På bakgrunn av standardene ble det dannet en standardkurve som ble benyttet for å regne ut konsentrasjonen i prøve 1-3.



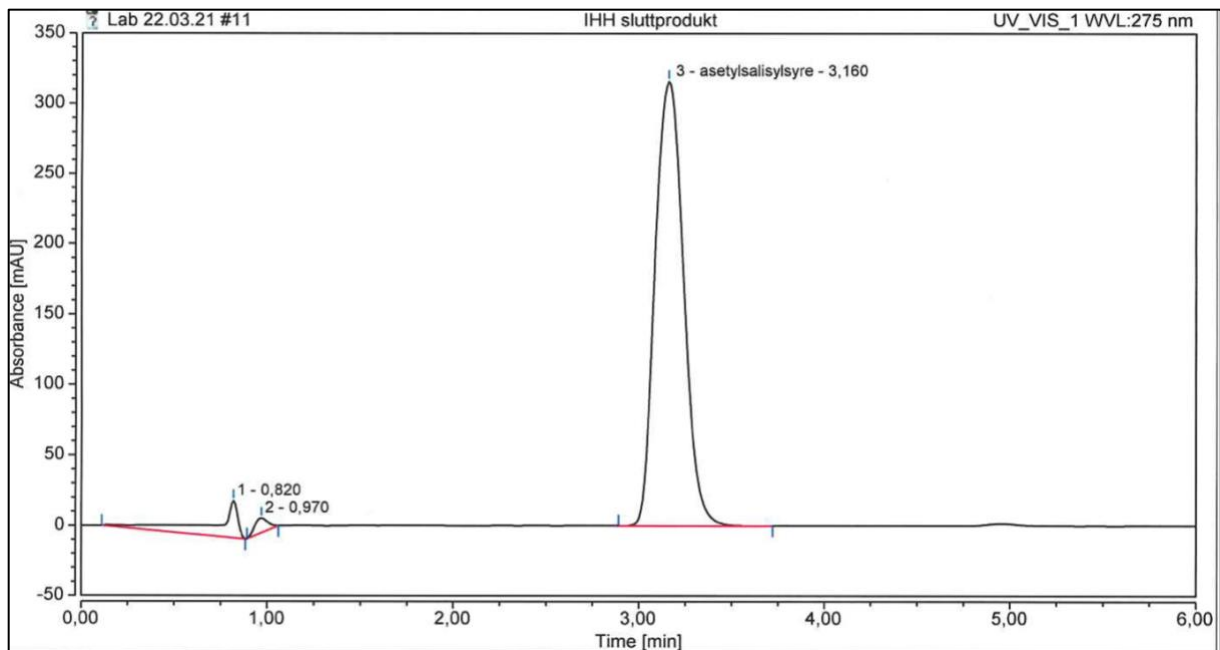
Figur 25 Standardkurven for UHPLC. Langs x-aksen sees konsentrasjonen (mg/mL), og langs y-aksen sees arealet (mAU*min) til acetylsalisylsyre i de ulike standardene.

Figur 25 viser standardkurven fra UHPLC. Konsentrasjonen (mg/mL) av acetylsalisylsyre er plottet mot areal (mAU*min) til acetylsalisylsyre i standardene.



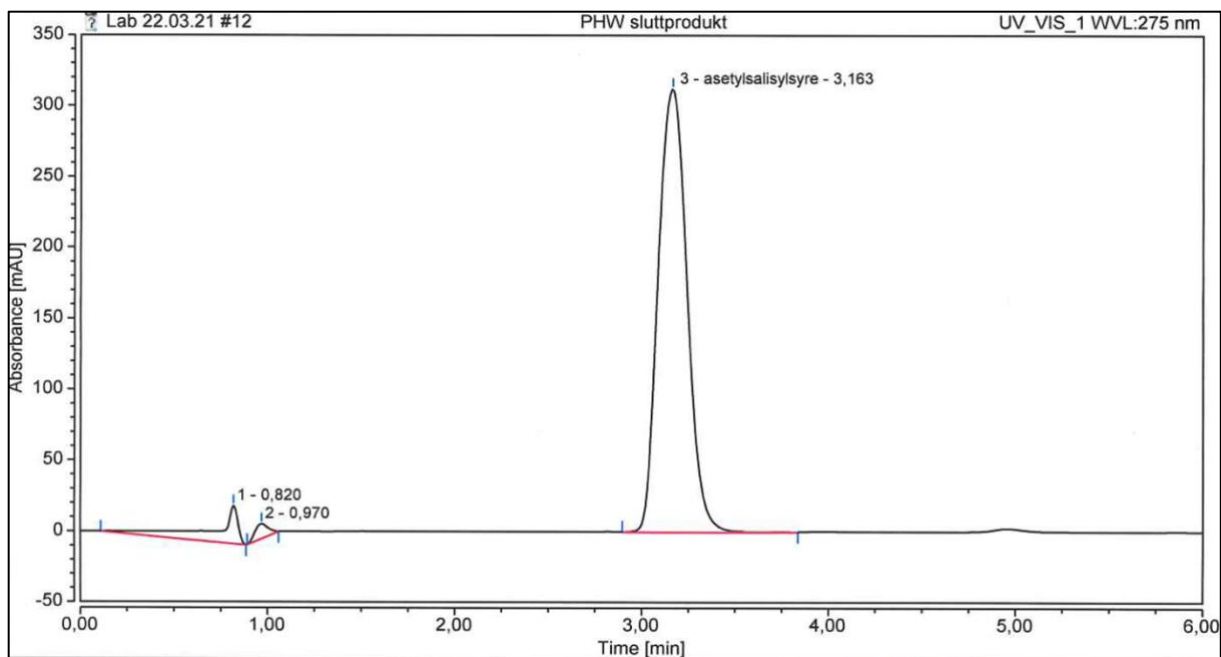
Figur 26 Kromatogram av sluttprodukt til prøve 1, med acetylsalisylsyre (0,970 mg/mL) etter injeksjonsvolum på 3,75 μ L. Acetylsalisylsyre har retensjonstid på 3,160 min. Det observeres en antydning til en topp med retensjonstid på ca. 5 min.

Figur 26 viser kromatogrammet for sluttprodukt til prøve 1. Løsemiddelet sees ved den første toppen til venstre og sluttproduktet ved den store toppen til høyre. Det observeres en antydning til en topp med retensjonstid på ca. 5 minutter. Arealet til acetylsalisylsyre for prøve 1 er 56,145 mAU*min (se figur 12 i vedlegg 1).



Figur 27 Kromatogram av sluttprodukt til prøve 2, med acetylsalisylsyre (0,970 mg/mL) etter injeksjonsvolum på 3,75 μ L. Acetylsalisylsyre har retensjonstid på 3,160 min. Det observeres en antydning til en topp med retensjonstid på ca. 5 min.

Figur 27 viser kromatogrammet for sluttprodukt til prøve 2. Løsemiddelet sees ved den første toppen til venstre og sluttproduktet ved den store toppen til høyre. Det observeres en antydning til en topp med retensjonstid på ca. 5 min. Arealet til acetylsalisylsyre for prøve 2 er 56,169 mAU*min (se figur 13 i vedlegg 1).



Figur 28 Kromatogram av sluttprodukt til prøve 3, med acetylsalisylsyre (0,960 mg/mL) etter injeksjonsvolum på 3,75 μ L. Acetylsalisylsyre har retensjonstid på 3,163 min. Det observeres en antydning til en topp med retensjonstid på ca. 5 min.

Figur 28 viser kromatogrammet for sluttprodukt til prøve 3. Løsemiddelet sees ved den første toppen til venstre og sluttproduktet ved den store toppen til høyre. Det observeres en antydning til en topp med retensjonstiden på ca. 5 min. Arealet til acetylsalisylsyre for prøve 3 er 55,594 mAU*min (se figur 14 i vedlegg 1).

Injeksjonsvolumet for hver prøve (1-3) var 3,75 μ L. Retensjonstiden, areal og beregnet konsentrasjon basert på standardkurven til sluttproduktene sees i tabell 12 og kromatogrammene i figur 26-28.

Tabell 12 Oppsummerer retensjonstid, areal og konsentrasjon for acetylsalisylsyre til prøvene.

Prøve	Retensjonstid acetylsalisylsyre (min)	Areal acetylsalisylsyre (mAU*min)	Konsentrasjon acetylsalisylsyre (mg/mL)
1	3,160	56,145	0,970
2	3,160	56,169	0,970
3	3,163	55,594	0,960

4.3.1 Beregninger UHPLC

Eksemplene er basert på resultatene til prøve 1.

For å finne mol acetylsalisylsyre ble standardkurven brukt. Ligningen til standardkurven i formel (8) ble omgjort med hensyn på x :

$$x = \frac{(56,145 - 0,4397)}{57,442}$$

$$x = 0,97$$

Formel (9) ble benyttet for beregning av % acetylsalisylsyre i prøven. Konsentrasjonen fra standardkurven ble multiplisert med 25 mL (fortynningsvolumet), og dividert på innveid masse av prøven:

$$\frac{24,26}{25,4} * 100 \% = 95,51 \%$$

For å få ut den totale massen av rekrystallisert produkt basert på UHPLC ble massen av innveid sluttprodukt multiplisert med prosentfaktoren av acetylsalisylsyre i prøven. Masse innveid var 1,0953 g.

$$1,0953 * 0,9551 = 1,0461 \text{ g}$$

Massen ble omgjort til mol ved bruk av formel (1). Formel (10) ble benyttet for å finne utbytte basert på UHPLC:

$$\frac{5,807 \text{ mmol}}{10,14 \text{ mmol}} * 100 \% = 57,27 \%$$

Tilsvarende ble gjort for prøve 2 og 3. Resultatet er oppsummert i tabell 13.

Tabell 13 Oppsummerer utbytte basert på UHPLC for alle prøvene.

Prøve	% acetylsalisylsyre i prøven	Masse av rekrystallisert produkt (g)	% utbytte UHPLC
1	95,51	1,0953	57,27
2	95,49	1,0658	55,75
3	96,02	1,1315	59,52

4.4 Resultater oppsummert

Tabell 14 oppsummerer utbytte basert på de ulike metodene; vekt målinger, NMR og UHPLC.

Tabell 14 %-utbytte basert på innveid masse (av salisylsyre), NMR-analysen og UHPLC-analysen.

Prøve	Innveide masser	% utbytte basert på		
		NMR analysen		UHPLC-analysen
		NMR	Vekt	
1	60,00	59,87	57,79	57,27
2	58,34	57,92	55,92	55,75
3	61,93	61,89	59,76	59,52

5. Diskusjon

I denne oppgaven ble det utført syntese av aspirin for 3 prøver med små variasjoner i fremgangsmåten. Tillaging av den ene prøven (prøve 1) fulgte en klassisk prosedyre (Olmsted, 1998), mens prøve 2 og 3 hadde små justeringer som er oppsummert i tabell 6, kapittel 3.2.

Syntesen av aspirin viste at alle prøvene hadde fått dannet et fast hvitt stoff som lignet på krystaller (figur 11). Videre ble produktene fra syntesen analysert ved NMR og UHPLC for å se om det var forskjell mellom utbyttet til prøvene, og i resultatene fra de ulike analysemetodene. Analysen viste at forskjeller for prøve 1, 2 og 3 var til stede, og funnene vil videre omtales i underkapitlene i diskusjonen.

5.1 Syntese av aspirin

I alle prøvene ble det dannet et hvitt fast stoff fra syntesen som lignet på krystaller, se figur 11. Dette kan indikere at syntesen var vellykket for alle prøvene da man forventer utfelling av acetylsalisylsyre, i og med at stoffet kun er delvis løselig i vann (3 g/L). Ved syntese av aspirin vil man kunne forvente 100 % utbytte. Dette skyldes at man tilsetter et overskudd av eddiksyreanhydrid for å tvinge reaksjonen fullstendig mot høyre (figur 2). For prøvene ble det funnet utbytte mellom 58,3-61,9 %, som betyr at noe av produktet må ha forsvunnet underveis i prøveopparbeidingen. Det var flere feilkilder som oppstod under gjennomførelse av syntesen for aspirin. Ved første vakuumfiltrering ble papirfilteret i hirsch trekten klippet for stort for alle prøvene. Dette resulterte i at en del av råproduktet havnet under filteret og ned i filtratet. En andel av krystallene hang fast i ulikt utstyr under de ulike stegene av syntesen, som resulterte i at en noe av krystallene gikk tapt. Eksempler på utstyr er glass-stav, spatel, begerglass og papirfilter. I tillegg er produktet delvis løselig i vann (3 g/L), og dermed kan det antas at noe av krystallene løste seg opp under opparbeidelsen av råproduktet og i rekrystalliseringen.

Prøve 2, som stod 30 min i varmebad, fikk et råprodukt hvor krystallene ble observert til å være våtere og mer klumpete enn for prøve 1 og 3. Under rekrystalliseringen etter første

filtrering ble ikke krystallene i prøve 2 fullstendig oppløst. Det var en væskelignende «klump» som ikke løste seg opp ved berøring. «Klumpen» ble hardere når prøven ble nedkjølt. På grunnlag av dette ble filtratet fra andre filtrering lagret for analysering ved NMR. Etter filtrering og tørking i varmeskap var utseende til alle de tre prøvene tilnærmet lik (se figur 11). Prøve 2 hadde lavest utbytte som kan ha sammenheng med dannelse av et biprodukt, diskutert i kapittel 5.2.2.

Tabell 7 oppsummerer utbytte for alle prøvene hvor ingen av prøvene viste tilnærmet 100 % utbytte. Det er prøve 3 som har høyest utbytte for alle målemetodene, som antas å komme av at prøven var i isbad i 1 time. Dermed fikk prøve 3 ekstra lang tid på rekrystalliseringen.

5.1.1 Forslag til eksperimentell prosedyre i en studentoppgave

En studentoppgave kan baseres på prosedyren til Olmsted (Olmsted, 1998), men med lengre tid i isbad for å forbedre krystalliseringsprosessen, og lengre tid i tørkeskap for å få bort mest mulig vann fra krystallene. I tillegg vil det være gunstig å tilpasse filterpapiret nøyaktig til hirsch trakten, og være forsiktig med overføringen av krystallene gjennom hele prosessen. Det kan også være nyttig med en gummivisker til glassutstyret for å få med mest mulig produkt. Disse faktorene kan bidra til økt utbytte.

5.2 NMR

5.2.1 Løsemiddel og reagenser

Det ble tatt opp NMR-spektre av reagensene for å undersøke renheten, og for å se om det var rester igjen fra reagensene i sluttproduktene. NMR-spektret av løsemiddelet d-metanol (figur 12) ble tatt opp for å undersøke om toppene i løsemiddelet hadde overlappende signal med de andre prøvene.

Figur 13 viser spekteret av eddiksyreanhydrid som ble brukt som løsemiddel og reaktant i selve syntesen. Spekteret viser en dublett som en «skulder» på eddiksyreanhydridtoppen. Det antas at den ene toppen med kjemisk skift 1,99 ppm (av dubletten) kommer fra dekomponering av eddiksyreanhydrid som reagerer med vann fra luften. Det vil da dannes eddiksyre som vises å være med kjemisk skift 1,99 ppm i tabell 1 i artikkelen skrevet av

Nicolas R. Babij med flere. Den andre toppen av dubletten med kjemisk skift 2,02 ppm kan komme av at eddiksyreanhydrid reagerer med d-metanol, slik at det dannes en annen ester; *metylacetat*. Metylacetat sees med kjemisk skift 2,02 ppm i d-metanol, ifølge tabell 1 i artikkelen. Artikkelen hevder også at kjemisk skift for eddiksyreanhydrid ikke er definert på grunnlag av reaktivitet i deuterert løsemiddel (Babij et al., 2016, s. 2-3).

Fosforsyre ble brukt som katalysator for syntesen av aspirin. NMR-spekteret til fosforsyre vises i figur 14, og det observeres ingen andre topper enn vann og løsemiddelet. Dette indikerer at fosforsyren var uten organisk forurensning.

NMR-spekteret for salisylysyre, figur 15, viser at den aromatiske gruppen har et lavere kjemisk skift (~ 6,73-7,95 ppm) enn for sluttproduktene (~ 7,04-8,10 ppm) til prøve 1-3 (figur 18-20). Ifølge teorien, kapittel 2.3.3, vil et elektronegativt atom ha en tiltrekkende effekt på elektronene i et molekyl. På grunn av denne effekten vil det redusere elektrontettheten og elektronene kan beveges vekk fra protonkjernen. Da vil signalet for protonene sees ved et høyere kjemisk skift. OH-gruppen til salisylysyre (figur 2) vil kunne donere elektrontetthet til aromatgruppen, og mer elektroner gjør protonene i aromatingen mer skjermet som resulterer i et lavere skift. For estergruppen til acetylsalisylysyren (figur 2) vil elektronene til oksygenet bli trukket mer mot karbonylatomet (C=O) da det er bundet til det elektronegative karbonyloksygenet. Dermed vil ikke dette bidra til økt elektrontetthet i den aromatiske gruppen. Protonene i aromatgruppen til acetylsalisylysyre vil derfor føle det eksterne magnetfeltet i instrumentet sterkere, som vil føre til et høyere kjemisk skift. Vanntoppen i salisylyrespekteret er bredere enn i de andre spektrene. Se kapittel 5.2.3 for beskrivelse og tolkning av vannsignalet.

5.2.2 Råprodukt, filtrat og sluttprodukt

I NMR-spektrene for alle råproduktene, filtratet til prøve 2 og alle sluttproduktene observeres det et metylsignal med kjemisk skift 2,26-2,29 ppm. Kjemisk skift for metyl (CH₃) bundet til en ester i en aromatisk syre forventes, ifølge tabell 2, å være med kjemisk skift ~ 2-2,3 ppm.

Acetylsalisylsyre er en aromatisk syre og metylgruppen for alle prøvene er innenfor det angitte kjemiske skiftet. Derfor anslås det å være dannet acetylsalisylsyre i alle prøvene.

For råproduktet, filtratet til prøve 2 og alle sluttproduktene observeres det en uidentifisert topp med kjemisk skift 1,21 ppm. Det kan være en neglisjerbar forurensning som har dukket opp under syntesen siden toppen ikke observeres i de andre spektrene til reagensene. I tillegg blir det observert ny topp med kjemisk skift 1,99 ppm i spekteret for råproduktet til prøve 1-3. Toppen med kjemisk skift 1,99 ppm antas å være eddiksyre (Babij et al., 2016, s. 2). Den aromatiske gruppen i råproduktet har et høyere kjemisk skift enn filtratet til prøve 2.

Filtratet til prøve 2 ble tatt vare på for å undersøke om «klumpen» som oppstod under oppvarming ved syntesen kom fra et biprodukt eller fra forurensning under opparbeidelse av produktet. Det kan antas at «klumpen» bestod av dimere i molekylet. Dimere blir mye mindre vannløselig enn monomere, som forklare den uløselige «klumpen». Den kan derfor også ha krystallisert i en egen krystall og blitt samlet opp på filterpapiret, uten å påvirke acetylsalisylsyrekrystallene. Fra NMR-spekteret til filtratet (figur 17) observeres det tre nye signaler i starten på den aromatiske gruppen sammenlignet med råproduktet (figur 16) og sluttproduktet (figur 18) til prøve 2. Det kjemiske skiftet for den aromatiske gruppen i filtratet starter med 6,74 ppm og slutter med 8,10 ppm. For sluttproduktet starter det kjemiske skiftet til den aromatiske gruppen med 7,04 ppm og slutter med 8,10 ppm. I NMR-spekteret for salisylyre (figur 15) starter det kjemiske skiftet for den aromatiske gruppen med 6,73 ppm og slutter med 7,95 ppm. Det kjemiske skiftet for den aromatiske gruppen i filtratet starter med 6,74 ppm, og at det kjemiske skiftet for den aromatiske gruppen i salisylyre starter med 6,73 ppm. Derfor antas det å være rester av salisylyre i filtratet, og ikke i dimeren.

Den aromatiske gruppen sitt kjemiske skift område forflytter seg høyere enn salisylyre som skyldes at man har fått bundet på acetylgruppen. Toppen med kjemisk skift 1,99 ppm i råproduktene til prøve 1-3 er fjernet ved siste filtrering, og sees ikke i sluttproduktene. Den ukjente toppen med kjemisk skift 1,21 ppm sees fortsatt, og antas å være en neglisjerbar forurensning fra syntesen. Metanoltoppen for prøve 1 og 3 er tilnærmet lik med integral 0,29

og 0,30, mens metanoltoppen til prøve 2 har et integral lik 0,14. For prøve 1 ble det veid ut 0,0166 g av sluttproduktet, og for prøve 3 ble det veid ut 0,0153 g. For prøve 2 ble det veid ut 0,0329 g av sluttproduktet. Dermed er blandingsforholdet tilnærmet likt for prøve 1 og 3, mens prøve 2 hadde mer stoff tilsatt under tillaging av NMR-prøvene, som kan forklare at arealet fra denne prøven ble lavere.

5.2.3 Vannsignal

Ut fra NMR-spekteret til d-metanol (figur 12) er det kjemiske skiftet for vann 4,83 ppm. Siden d-metanol blir brukt som løsemiddel for alle reagensene og prøvene forventes det å finne vann i samme område for kjemisk skift som i d-metanol.

I NMR-spektrene for eddiksyreanhydrid (figur 13), fosforsyre (figur 14) og salisylysyre (figur 15) er det kjemiske skiftet for vann endret, sammenlignet med det kjemiske skiftet for vann i NMR-spekteret for d-metanol (figur 12), se tabell 8. Spekteret av eddiksyreanhydrid har et vannsignal med kjemisk skift 4,79 ppm, som er lavere enn det kjemiske skiftet for vann i d-metanol. Spekteret av salisylysyre har et vannsignal med kjemisk skift 5,31 ppm, som er høyere enn det kjemiske skiftet for vann i d-metanol. Fosforsyre har et vannsignal med kjemisk skift 5,74 ppm, som er det høyeste kjemiske skiftet for vann for alle prøver og reagenser som ble analysert. Fosforsyreløsningen har lavest pH, etterfulgt av salisylysyre og deretter eddiksyreanhydrid. Det antas at det kjemiske skiftet for vann følger surhetsgraden (pH) til stoffet som analyseres, hvor lav pH fører til et høyere kjemisk skift. pH for reagenser som ble benyttet sees i vedlegg 2. I råproduktet og sluttproduktet til prøve 1-3 er det kjemiske skiftet for vann høyere enn i d-metanol. Dette skyldes at prøvene inneholder acetylsalisylysyre.

Vannsignalet for salisylysyre (figur 15) sees å være mye bredere enn i de andre spektrene med vannsignal. Det antas å kunne være involvert i hydrogenbindinger med salisylysyre. Salisylysyre har en syre- og alkoholgruppe som kan bidra til signal for vanntoppen.

For prøve 1 og 3 observeres det at de kjemiske skiftene for vannsignalet i råproduktene og sluttproduktene er tilnærmet like. For prøve 2 observeres det at det kjemiske skiftet blir høyere i sluttproduktet enn i råproduktet (se tabell 8). Som nevnt tidligere var

blandingsforholdet for prøve 1 og 3 tilnærmet likt. For prøve 2 ble det tilsatt mer stoff under tillaging av NMR-prøvene. Dette førte til at det var mer acetylsalisylsyre til stede i forhold til vann i prøve 2, sammenlignet med prøve 1 og 3. Forholdet mellom vann og acetylsalisylsyre kan se ut til å påvirke det kjemiske skiftet for vann.

Integralet for vannsignalet til råproduktet i prøve 1 er 1,18, og i sluttproduktet er integralet 1,14. Integralet for vannsignalet til råproduktet i prøve 2 er 7,33, og i sluttproduktet er integralet 1,05. Integralet for vannsignalet til råproduktet i prøve 3 er 1,67, og i sluttproduktet er integralet 1,15. Integralene sees i tabell 8. For alle råproduktene observeres det et høyere integral for vannsignalet, enn for integralet for vann i sluttproduktene. Dette antyder at siste filtrering og tørking i varmeskap har fjernet deler av vannet i prøvene. For prøve 2 er forskjellen i integralet for vann i råproduktet og sluttproduktet mye større enn for de andre prøvene. Vannsignalet i sluttproduktene for prøve 1 og 3 er tilnærmet like, mens prøve 2 viser mindre vanninnhold i sluttproduktet enn de andre prøvene. Hvis man sammenligner vannsignalet med metylgruppen i råproduktet til prøve 2 (figur 16) mot filtratet til prøve 2 (figur 17), observeres det større vanninnhold i råproduktet enn i filtratet. For prøve 1 er forskjellen liten mellom vannsignalet i råproduktet og sluttproduktet. Dette kan skyldes at i prøve 1 ble det fjernet mer vann ved første filtrering enn i de andre. For prøve 2 er forskjellen mellom vannsignalet i råproduktet og sluttproduktet større. Til slutt viste prøve 2 mindre vannsignal enn de andre prøvene. Dette kan komme av at det ikke ble fjernet like mye vann ved første filtrering for prøve 2, men det ble fjernet mest vann ved siste filtrering og i tørkeskap.

Fra tabell 8 sees det at prøve 2 inneholder minst vann, og denne observasjonen kan antas å komme fra tilfeldige variasjoner. Prøve 3 hadde 1 time i isbad mens prøve 1 og 2 hadde 10-15 minutter. Integralet for vann i prøve 1 og 3 er tilnærmet lik som tilsvarer at prøvene ble like godt tørket ved filtrering og i varmeskap.

5.2.4 Forslag til NMR-prosedyre i en studentoppgave

Under tillaging av reagenser til NMR-analyse er det lurt å benytte parafilm og over analyserøret for å forhindre dekomponering, da acetylsalisylsyre reagerer med vann i luften. For å unngå unødvendige forstyrrelser i det magnetiske feltet til instrumentet skal det unngås å berøre den nedre delen av NMR-røret, og å tørke NMR-røret godt med lofritt papir før analysering. Det er også viktig å tilpasse NMR-røret i dybdemåleren slik at den får korrekt posisjon i instrumentet. For å effektivisere analyseringen er det nyttig å prosessere et ferdig analysert spekter samtidig som en ny prøve blir «shimmet».

5.3 UHPLC

Figur 22 og figur 23 viser at toppen for acetylsalisylsyre og toppen for salisylsyre ikke overlapper. Metoden betraktes å være god basert på retensjonstid, resolusjon og linearitet i konsentrasjonsområdet til standardene. Dermed kan det lages standarder med begge disse reagensene til stede. Det observeres en liten topp til høyre for acetylsalisylsyretoppen i figur 23, ved ca. 5 minutt. Denne toppen er i området for salisylsyre, og kan skyldes at acetylsalisylsyre dekomponerer i kontakt med luft. Toppen til acetylsalisylsyre har et areal på 76,421 mAU*min, og salisylsyre toppen har et areal på 0,324 mAU*min. Dermed utgjør salisylsyren en liten prosentandel av prøven, da like konsentrasjoner forventer omtrent likt areal (se figur 5 og 6 i vedlegg 1).

Standardkurven ble dannet på bakgrunn av standarder med ulikt injeksjonsvolum, og sees i figur 25. Standardkurven viser god linearitet med $R^2 = 1$ som bekrefter at konsentrasjonsområdet til standardene er proporsjonalt med arealet under toppene.

Standardkurven viser linearitet frem til en konsentrasjon på 1,6 mg/mL, og konsentrasjonen til prøvene blir beregnet til < 1 mg/mL. Dermed kan konsentrasjonen til prøve 1-3 beregnes ut fra ligningen til standardkurven.

Figur 11 i vedlegg 1 viser standarden med det høyeste injeksjonsvolumet (6,25 μ L). Det observeres en «skulder» på venstre side av acetylsalisylsyretoppen. Dette antas å være på grunn av at konsentrasjonen blir for høy, og kolonnen kan dermed bli mettet. Dette fører til at resterende materiale ikke får interagert med den stasjonære fasen, og vil derfor eluere raskere

ut av kolonnen. Det ble kjørt en prøve med høyere injeksjonsvolum for å bekrefte at årsaken til «skulderen» kommer av høy konsentrasjon og ikke fra forurensing. Med høyere konsentrasjon ble det observert en tydeligere «skulder» enn ved injeksjonsvolum på 6,25 μL . Likevel tas standarden 6,25 μL med som et punkt i standardkurven fordi den gir et godt areal som kan benyttes. Det tas ikke med standarder med høyere konsentrasjon på grunn av trenden som ble observert, og fare for overlapp med salisylsyretoppen.

Det ble gjort noen forsøk på å redusere retensjonstiden slik at komponentene i prøvene eluerte raskere gjennom kolonnen. Dette ble gjort ved å øke temperaturen i kolonnen, og endre til ulike gradientelueringsmetoder. Resultatet ga dårligere resolusjon og metoden ble derfor ikke endret ytterligere.

For alle prøvene (figur 26-28) sees det en antydning til en topp rundt ca. 5 minutter. Denne toppen ligger i området hvor salisylsyre har retensjonstid (figur 22). Det antas å være spor av salisylsyre i prøvene som kommer fra at acetylsalisylsyre dekomponerer i kontakt med luft. Prøvene ble oppbevart tildekket med parafilm i kjøleskap i ca. 2 uker før analysen ble foretatt. Denne tiden kan antas å bidra til dekomponering. Det antas at toppen for acetylsalisylsyre er ren, og at antydningen til toppen av salisylsyre ikke er av stor betydning for resultatet.

5.3.1 Forslag til UHPLC-prosedyre i en studentoppgave

Metoden var basert på Sawyer og Kumar (Sawyer & Kumar, 2003) og ble tilpasset et UHPLC instrument. Strømningshastighet ble satt til 0,4 mL/min og det ble benyttet lite løsemiddel under analysering. En analyse tok ca. 6 minutt per kjøring som ansees å være tilfredsstillende, men metoden kan forbedres til kortere analyseringstid. I og med at sluttproduktet fra syntesen kan dekomponere i kontakt med luft, vil det være gunstig å kjøre UHPLC-analysen relativt raskt etter syntese. Det vil også være nyttig å oppbevare produktet i en lukket beholder i kjøleskap før analysering.

6. Konklusjon

Fordeler ved å analysere prøver ved hjelp av UHPLC er blant annet at vann og andre organiske produkter i prøven vil bli fjernet, fordi stoffene kommer ut ved ulike retensjonstider. Samtidig er det mulig å analysere et større antall prøver av gangen. Det er mulig å justere injeksjonsvolumet til prøvene som gjør det mulig å lage en standardkurve av én og samme standardprøve. Kromatogrammene som dannes fra prøvene er enklere å tolke for studenter fordi én topp viser én forbindelse. En av ulempene med UHPLC er at oppsettet for én analyse tar lang tid, og instrumentet må være klargjort før analysen kan starte. En annen ulempe med analysen er at det må dannes en standardkurve fra standardene for å kunne beregne konsentrasjonen til prøvene.

Fordeler ved å analysere prøver ved hjelp av NMR er at det er en rask analysemetode hvor en kan avdekke om alt stoffet er reagert, og om man har fått dannet det produktet man ønsker. Metoden har et enkelt oppsett og benytter lite reagens. Det er i tillegg en god metode for å undersøke om reagenser er forurenset. Ved hjelp av NMR blir de ulike delene av molekylet fordelt over spekteret, og blir derav lettere å skille fra hverandre. Ulempene med NMR er blant annet at det kun er mulig å analysere én prøve av gangen, og man er nødt til å være til stede under store deler av prosessen. I tillegg må det magnetiske feltet i instrumentet klargjøres for hver prøve ved hjelp av «shimming», noe som vil medføre at analysering av hver prøve tar lang tid. En annen ulempe ved analyse på NMR kan være at en prøve med flere typer molekyler kan medføre en overlapping mellom toppene i prøven.

Resultatene fra UHPLC for prøve 1-3 viser at det er eliminert bort vann fra prøven, samtidig som det observeres spor av salisylysyre som kan stamme fra ureagert reagens eller dekomponert produkt. Likevel antas det at toppen for acetylsalisylysyre er ren og ikke består av noe annet. Resultatene fra NMR for prøve 1-3 viser at det er acetylsalisylysyre som er dannet på grunn av metyltoppen med kjemisk skift 2-2,3 ppm. I tillegg viser NMR-spektrene for prøvene de ulike gruppene molekylet og løsemiddelet består av. Ved bare vektmålinger vil man ikke se de ulike molekylene som er til stede i prøven. Det er heller ikke mulig å eliminere bort vann i prøven slik som ved NMR og UHPLC. Vannet i prøven kan bidra til økt vekt og

dermed falsk forhøyet utbytte. For studentene vil en kombinasjon av spektrene fra NMR og kromatogrammene fra UHPLC være til hjelp for å vurdere resultatet fra syntesen.

Av alle prøvene er det prøve 3 som viser høyest utbytte ved analyse på både NMR og UHPLC (se tabell 14). På bakgrunn av forsøkene utført i dette prosjektet gis det grunnlag for å påstå at 1 time i isbad er den justeringen på prosedyren til Olmsted (Olmsted, 1998) som gir best utbytte. Analysen for NMR viste også høyere utbytte for alle 3 prøvene sammenlignet med UHPLC, som kan komme av at NMR fjerner vann fra både acetylsalisylsyre og salisylysyre.

7. Litteraturliste

- Babij, N. R., McCusker, E. O., Whiteker, G. T., Canturk, B., Choy, N., Creemer, L. C., ... Yang, Q. (2016). NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Industrially Preferred Solvents Used in Process and Green Chemistry, 7.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acs.oprd.5b00417>
- Burt, D. C. (2020). Aspirin - Helpful or Harmful. Hentet 21. april 2021 fra <https://www.eliteuppercervical.com/2020/10/15/aspirin-helpful-or-harmful/>
- College, L. A. C. (2005). Synthesis and Analysis of Aspirin. Hentet 13. april 2021 fra <https://www.csun.edu/~alchemy/Chem51-LACC/Labs/C51F07L12.pdf>
- Desborough, M. J. & Keeling, D. M. (2017). The aspirin story - from willow to wonder drug. Hentet 24. mars 2021 fra <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bjh.14520>
- Farina, D. (2016). *NMR Spectroscopy* [Videoklipp]. Hentet 30. mars 2021 fra <https://www.youtube.com/watch?v=SBir5wUS3Bo>
- Fulmer, G. R., Miller, A. J. M., Sherden, N. H., Gottlieb, H. E., Nudelman, A., Stoltz, B. M., ... Goldberg, K. I. (2010). NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. Hentet 9. mars 2021 fra <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/om100106e>
- Harris, D. C. (2010). *Quantitative Chemical Analysis* (8. utg.). New York: W. H. Freeman and Company.
- Hart, D. J., Hadad, C. M., Craine, L. E. & Hart, H. (2020). *Organic Chemistry* (13. utg.). Boston, USA: Cengage.
- Johannessen, T. (2018). Acetylsalisylsyre. Hentet 8. april 2021 fra <https://nhi.no/sykdommer/hjertekar/lakemedel/acetylsalisylsyre/>
- Johannessen, T. (2019). Acetylsalisylsyre på godt og vondt. Hentet 19 mars 2021 fra <https://nhi.no/forskning-og-intervju/aspirin-pa-godt-og-vondt/?page=all>
- Johannessen, T. (2021). Reyes syndrom. Hentet fra <https://nhi.no/sykdommer/infeksjoner/virusinfeksjoner/reyes-syndrom/?hp=true>
- LAHC. Experiment 5: Aspirin synthesis. Hentet 12 april 2021 fra <https://www.lahc.edu/classes/chemistry/arias/exp%205%20-%20aspirinf11.pdf>

- Lausund, S. (2018a). Kromatografi. Hentet 6. april 2021 fra <https://www.ntnu.no/wiki/display/medtekipedia/Kromatografi>
- Lausund, S. (2018b). Kromatogram. Hentet 6. april 2021 fra <https://www.ntnu.no/wiki/display/medtekipedia/Kromatogram>
- Leah4sci. (2013). *Proton NMR - How To Analyze The Peaks Of H-NMR Spectroscopy* [Videoklipp]. Hentet fra <https://www.youtube.com/watch?v=k0eR8YqcA8c>
- Lola. (2013). Aspirin Synthesis and Analysis. Hentet 12. april 2021 fra <https://www.odinity.com/aspirin-synthesis-analysis/>
- Magritek. Discover the Spinsolve family Hentet 9. april 2021 fra <https://magritek.com/products/spinsolve/>
- Magritek. *Spinsolve 60* [Brosjyre]. Magritek.com. Hentet 9. april 2021 fra <https://magritek.com/wp-content/uploads/2020/03/Magritek-Spinsolve-60-Brochure-Apr-18.pdf>
- Nordeng, H. & Spigset, O. (2018). *Legemidler og bruken av dem* (3. utg.). Oslo: Gyldendal.
- Norsk-kjemisk-selskap. (2007). Kjernemagnetisk resonans. Hentet 30. mars 2021 fra <https://www.naturfag.no/artikkel/vis.html?tid=686155>
- NTNU. (2018). Tynnsjiktromatografi. Hentet 22. april 2021 fra <https://www.ntnu.no/wiki/display/medtekipedia/Tynnsjiktromatografi>
- Olmsted, J. (1998). Synthesis of Aspirin. *Department of Chemistry and Biochemistry, California State University, 3*, 1261-1263.
- Patrick, G. L. & Spencer, J. (2009). *An Introduction of Medicinal Chemistry* (4. utg.). New York: Oxford University Press.
- Pharmaceuticals, B. (2018). About Aspirin. Hentet 19. mars 2021 fra https://www.aspirin.com/en/about-aspirin/how-it-works/#hiw_0
- Pharmaceuticals, B. (2020). Biographies Felix Hoffmann. Hentet 19. mars 2021 fra <https://www.bayer.com/en/history/felix-hoffmann>
- Sawyer, M. & Kumar, V. (2003). A Rapid High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Quantitation of Aspirin, Salicylic Acid, and Caffeine in Effervescent Tablets. Hentet 15. april 2021 fra <https://academic.oup.com/chromsci/article/41/8/393/350984>

- Scientific, T. F. *UltiMate™ 3000 Standard Binary System* [Bilde]. Hentet 14. april 2021 fra <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/IQLAAAGABHFAPBMBEX#/IQLAAAGABHFAPBMBEX>
- Skøld, T., Kvamme, K., Leiren, M. & Eriksen, A. G. (2020). *Brukerveiledning fro UHPLC (Thermo Sientific Ultimate 3000)*. Bergen: Høgskulen på Vestlandet.
- Starkey, L. S. ¹H NMR Chemical Shifts. Hentet 2. mai 2021 fra <https://www.cpp.edu/~lsstarkey/courses/NMR/NMRshifts1H-general.pdf>
- Toledo, M. (2012). Kjemisk industri - smeltepunkt. Hentet 12. april 2021 fra https://www.mt.com/dam/LabDiv/Campaigns/chem/Downloads/Helper_Booklet_Melting%20Point_NO.pdf
- Uggerud, E. (2018). Grønn kjemi. Hentet 28. april 2021 fra https://snl.no/grønn_kjemi
- UiB. (2019). Kvalitativ infrarød analyse. Hentet 12. april 2021 fra <https://www.uib.no/kj/57698/kvalitativ-infrarød-analyse#tolkning>
- Wibetoe, G. (2020). IR-spektroskopi. Hentet 12. april 2021 fra <https://snl.no/IR-spektroskopi>

8. Definisjoner

Acetylering: Er en kjemisk prosess for å innføre acetylgruppen i forskjellige kjemiske forbindelser.

Dimeriserer: Når to like molekyler (monomere) bindes sammen.

Dybdemåler: Benyttes for at NMR-røret skal ha riktig dybde i instrumentet (avbildet til høyre i figur 3).

Grønn kjemi: Prinsippet går ut på å bruke mindre reagenser, hindre forurensing allerede ved kilden og bidra til mer miljøvennlig bruk i kjemien.

Hirsch trakt: Trakt med integrert filterplate.

Integral: Arealet under hver topp kalles integral, og forteller oss hvor mange kjemisk like protoner som generer signalet til toppen det gjelder. Integral sees under hver topp i NMR-spektre.

IR-spektroskopi: Analysemetoden benytter infrarød stråling for å identifisere organiske forbindelser og strukturen deres, i tillegg til kvantitativ analyse.

Kjemisk skift: Forteller oss hvilke grupper som finnes i molekylet, og gir informasjon om det kjemiske miljøet til et bestemt proton. Kjemisk skift sees øverst i NMR-spektre.

Krystallisering: Når en løsning skiller seg ut og danner gitterstruktur (fast stoff) ved nedkjøling.

Mobilfase: Eluerer prøvematerialet gjennom den stasjonære fasen.

NMR: Nuclear Magnetic Resonance er en analysemetode som baseres på de magnetiske egenskapene til atomkjernene og hvordan det kjemiske miljøet rundt atomkjernen påvirker disse egenskapene.

Prostaglandiner: Substanser som forårsaker smerte, feber og inflammasjon i kroppen.

Resolusjon: Avstanden mellom to topper i et kromatogram.

Resonansfrekvens: Den frekvensen som gir interaksjon med radiobølgen fra instrumentet.

Retensjonstid: Tiden det tar fra prøvematerialet injiseres i den mobile fasen til en komponent elueres ut av kolonnen med den stasjonære fasen.

Reyes syndrom: En sjelden og alvorlig tilstand som har sammenheng med virusinfeksjon og feber hos barn som samtidig behandles med acetylsalisylsyre.

Shimming: Blir utført for å homogenisere det magnetiske feltet for den gitte prøve, før NMR-spekteret skal tas opp.

Smeltepunktsanalyse: Analysemetode som baseres på at alle organiske forbindelser har et gitt smeltepunkt som er unikt for forbindelsen.

Spinn: Atomkjernenes magnetiske egenskap.

Stasjonærfase: Komponentene i prøvematerialet interagerer ulikt med den stasjonære fasen slik at de eluerer ut av kolonnen til ulik tid.

Syklooksygenase: Er et enzym som omdanner arakidonsyre til prostaglandin-H₂. Finnes to ulike typer; COX-1 og COX-2.

Tromboxan A₂: Er en type tromboxan som produseres av aktiverte trombocytter under hemostase. Aktiverer flere trombocytter og forsterker aggregeringen av trombocytene.

UHPLC: Står for Ultra-High-Performance Chromatography og er en type væskechromatografi.

9. Vedlegg

Vedlegg 1 – Resultater fra NMR og UHPLC

Vedlegg 2 – Sikkerhetsdatablad for benyttede reagenser

Vedlegg 3 – Prosedyre for syntese av aspirin og analysering ved bruk av NMR og UHPLC