

# Högupplösande vätskekromatografi (HPLC)

Niklas Dahrén



# Högupplösande vätskekromatografi (HPLC)

- ✓ **HPLC**= "high performance liquid chromatography" eller på svenska "högupplösande vätskekromatografi".
- ✓ **HPLC är en avancerad kemisk analysmetod** som används för t.ex. gift-, drog- och läkemedelsanalyser. Kan även användas för analyser av dopingpreparat, brandfarliga vätskor, miljögifter och många andra ämnen.
- ✓ **HPLC är en avancerad form** av vätskekromatografi. Det finns även andra enklare och mer begränsade former av vätskekromatografi, t.ex. papperskromatografi, tunnskikt-kromatografi, jonbyteskromatografi och gelfiltrering.
- ✓ **Namnet "kromatografi" kommer av** det grekiska ordet "chroma" som betyder färg. I början användes kromatografiska metoder endast för färgade ämnen men nu används dessa även till ofärgade ämnen så namnet är därför lite missvisande.

# Vilka olika typer av analyser kan utföras med HPLC?

1. **Separera (rena) olika ämnen som finns i ett prov:** Vi kanske har ett prov som innehåller ett stort antal olika ämnen, men vi är enbart intresserade av ett av dessa ämnen. Vi kan då använda HPLC för att separera ämnena från varandra och därmed "isolera" det ämne vi är ute efter.
2. **Undersöka vilka okända ämnen som finns i ett prov:** Vi kan identifiera okända ämnen (t.ex. gifter, droger, dopingpreparat, miljögifter, brandfarliga vätskor eller läkemedel) med denna metod. Om vi dessutom kopplar vår HPLC till en masspektrometer (en speciell detektor) får vi ett mycket kraftfullt verktyg för att identifiera okända ämnen.
3. **Bestämma koncentrationen av olika ämnen som finns i ett prov:** HPLC kan också användas kvantitativt för att mäta koncentrationen av de ämnen som finns i ett prov.
4. **Renhetstester:** Vi kan undersöka om ett prov är förorenat med andra ämnen som inte bör finnas där (t.ex. renhetstester av läkemedel eller livsmedel).

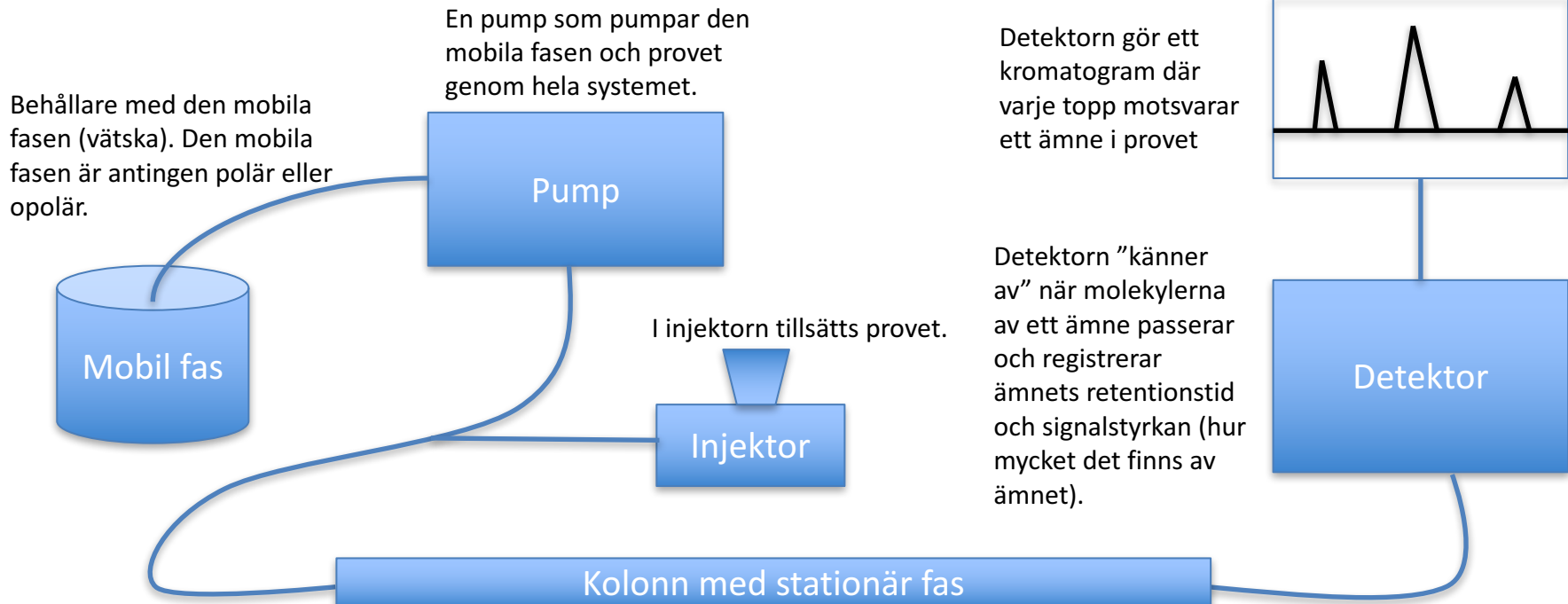
# En högupplösande vätskekromatograf (HPLC)



# 3 saker viktiga saker som ingår i en HPLC-analys

- ✓ **Prov:** I HPLC tillsätts ett prov innehållande olika ämnen som ska analyseras.
- ✓ **Mobil fas:** I HPLC finns en s.k. mobil fas (rörlig fas) som består av en vätska (en blandning av olika ämnen). Syftet med den mobila fasen är att transportera provet genom vätskekromatografen, alltså genom den maskin som ska utföra själva analysen.
- ✓ **Stationär fas:** I HPLC finns en kolonn (ett ihåligt rör) som på insidan är beklädd med en stationär fas (stillastående fas) som består av olika molekyler. Den stationära fasen kan vara i fast form eller bestå av en trögflytande vätska. Molekylernas uppgift i den stationära fasen är att binda till de olika ämnena i provet så att dessa ämnen bromsas upp inuti kolonnen. Vissa ämnen kan binda mycket starkare till molekylerna i den stationära fasen och tar därför längre tid på sig genom kolonnen.

# Principen bakom HPLC



Behållare med den mobila fasen (vätska). Den mobila fasen är antingen polär eller opolär.

En pump som pumpar den mobila fasen och provet genom hela systemet.

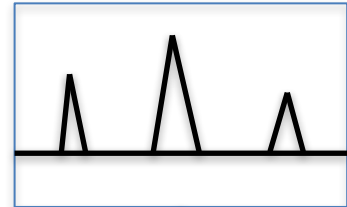
Pump

I injektorn tillsätts provet.

Injektor

Kolonn med stationär fas

Detektorn gör ett kromatogram där varje topp motsvarar ett ämne i provet

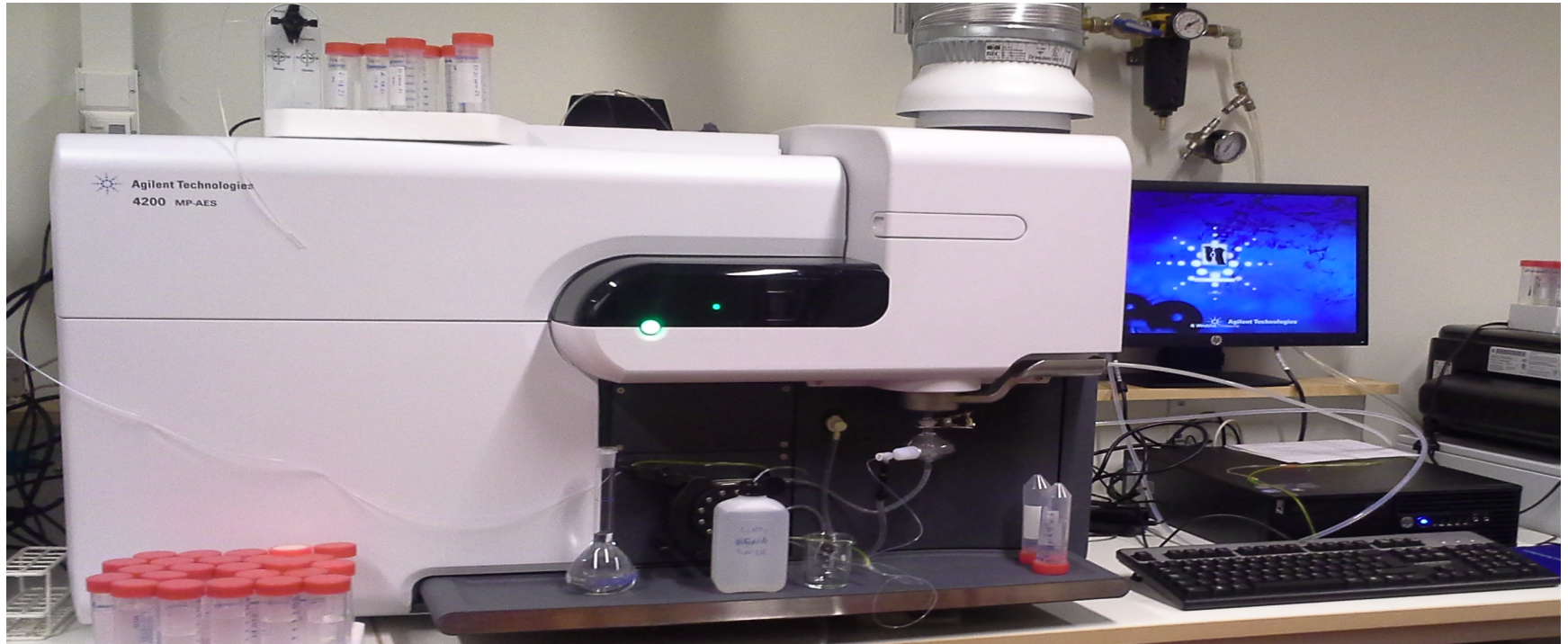


Detektorn "känner av" när molekylerna av ett ämne passerar och registrerar ämnets retentionstid och signalstyrkan (hur mycket det finns av ämnet).

Detektor

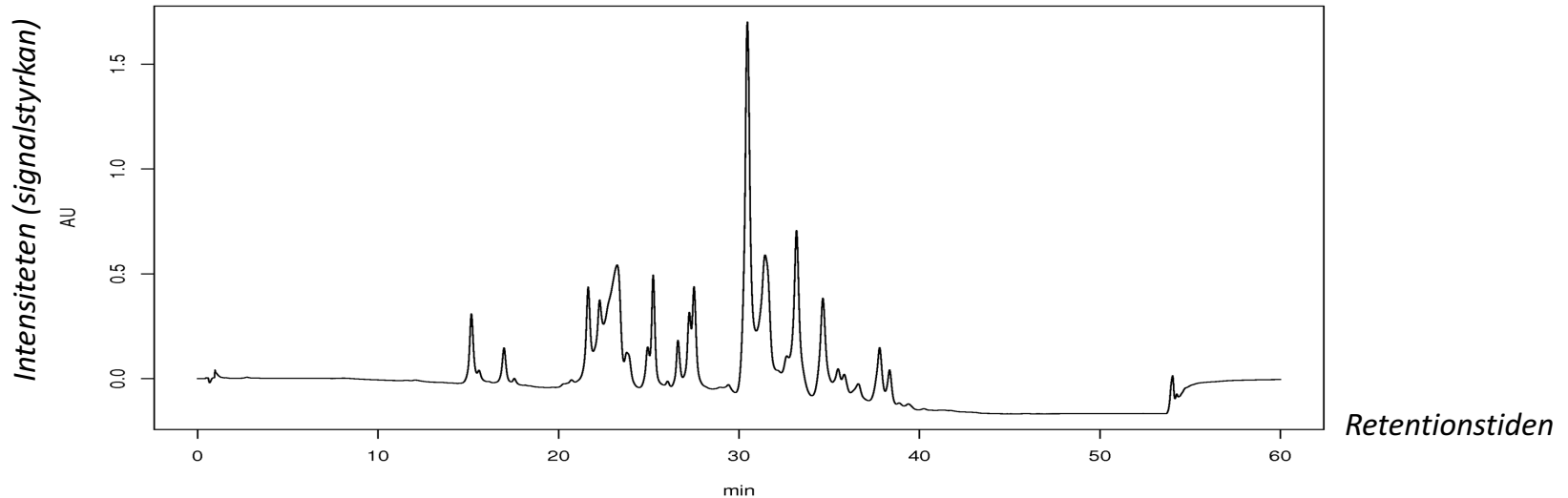
I kolonnen separeras ämnena i provet från varandra eftersom olika ämnen binder olika lätt till den stationära fasen i kolonnen och kommer därför ut vid olika tidpunkter. Antingen används en polär eller opolär stationär fas i kolonnen. Polär kolonn om den mobila fasen är opolär, opolär kolonn om den mobila fasen är polär.

# En högupplösande vätskekromatograf (HPLC)



# Exempel på ett kromatogram

- ✓ **Retentionstiden:** Retentionstiden är specifik för varje ämne i ett givet system och därför kan vi använda retentionstiden för att identifiera olika ämnen (kvalitativ analys).
- ✓ **Toppens area:** Detektorn mäter intensiteten (signalstyrkan) av varje ämne som passerar, vilket motsvarar hur många molekyler av ämnet som passerar detektorn. Utifrån det ritas en topp ut i kromatogrammet där arean av toppen motsvarar hur hög koncentration vi har ämnet (kvantitativ analys).

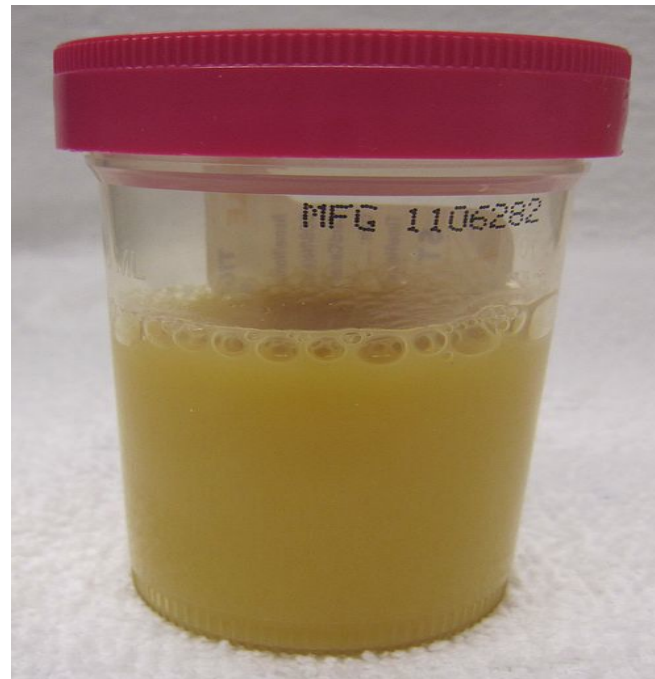


Bildkälla: "Hplc-perfume-chromatogram" by Lukke - Own work. Licensed under CC BY-SA 3.0 via Commons - <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hplc-perfume-chromatogram.png#/media/File:Hplc-perfume-chromatogram.png>





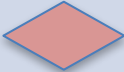

# Exempel: Analys av droger i ett urinprov med hjälp av HPLC

- ✓ **De kemiska forensikerna** på Nationellt forensiskt centrum (NFC) i Linköping får till uppgift att analysera ett urinprov från en person som misstänks ha intagit någon form av drog.
- ✓ **Forensikerna väljer att analysera provet** med hjälp av HPLC.



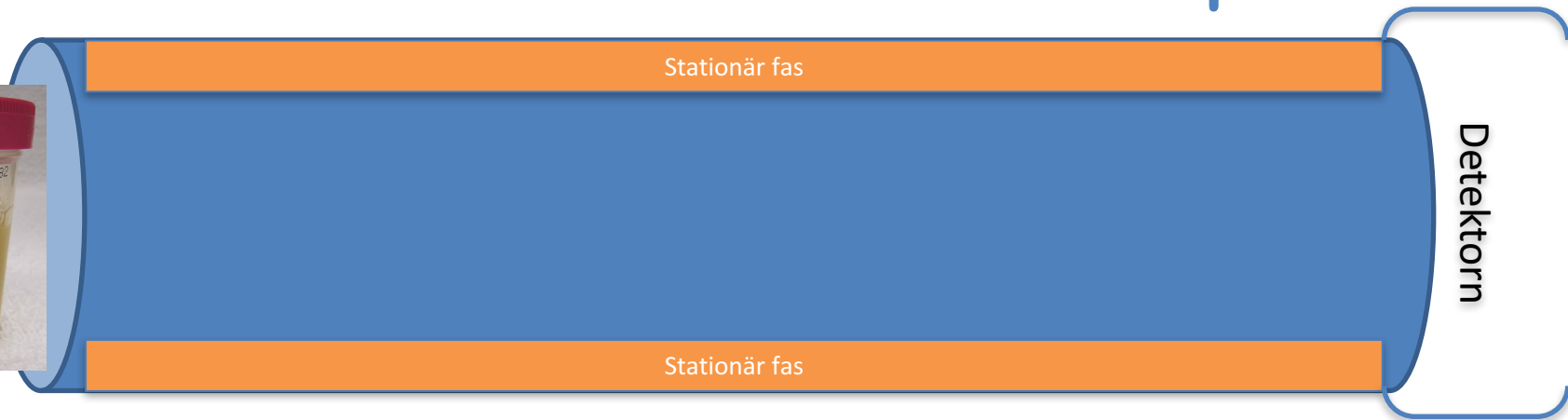
Bildkälla: By James Heilman, MD (Own work) [CC BY-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>)], via Wikimedia Commons.  
<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/29/Pyuria2011.JPG>.

# Kända retentionstider för några utvalda ämnen (obs. påhittade retentionstider)

Utseende:	Ämne:	Retentionstid (min):
	Urinämne	2,5
	Kokain	6,0
	Anabola steroider	8,2
	Amfetamin	8,9

- ✓ **Innan de utför analysen tar de fram en tabell** med kända retentionstider för de ämnen de misstänker kan finnas i urinprovet (obs. påhittade retentionstider!). Genom att jämföra de erhållna retentionstiderna med de kända så kan de lista ut vilka okända ämnen som finns i urinprovet.

# Vilket eller vilka ämnen finns i urinprovet?

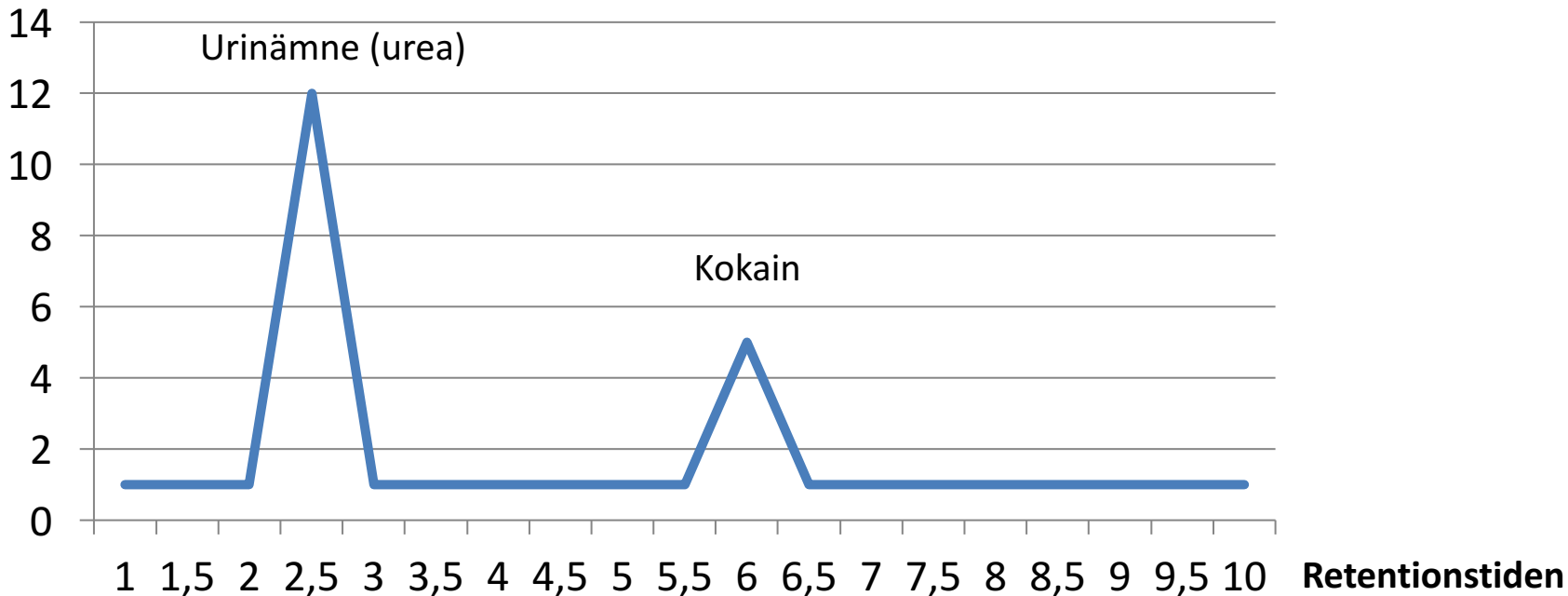


Ämnen som passerar detektor:	Retentionstid (min):	Identifiering utifrån de kända retentionstiderna:
	2,5	Urinämne
	6,0	Kokain

**Slutsats:** Urinprovet innehåller urinämne och kokain.

# Kromatogram av urinprovet

Intensiteten



# HPLC-analyser kan utföras på 2 olika sätt

## 1. Normal-fas-kromatografi (polär kolonn):

- Den mobila fasen är opolär medan den stationära fasen är polär (en polär kolonn används).
- Polär kolonn innebär att polära ämnen kommer bromsas upp mest och få längst retentionstid:

Polära ämnen binder med starka vätebindningar (eller vanliga dipol-dipolbindningar) till den polära stationära fasen och "bromsas" därför mest i kolonnen. Opolära ämnen binder inte lika starkt till den stationära fasen (kan inte skapa vätebindningar eller vanliga dipol-dipolbindningar) och åker därför ut först genom kolonnen.

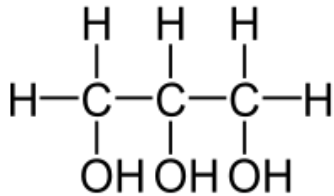
## 2. Omvänd-fas-kromatografi (opolär kolonn):

- Den mobila fasen är polär medan den stationära fasen är opolär (en opolär kolonn används).
- Opolär kolonn innebär att opolära ämnen kommer bromsas upp mest och få längst retentionstid:

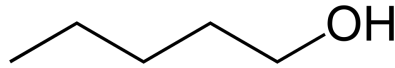
Opolära ämnen består ofta av långa kolvätekedjor och är därför bra på att skapa många van der Waalsbindningar till den opolära stationära fasen (som också består av långa kolvätekedjor). Samtidigt "trivs" de polära ämnena bättre i den mobila fasen eftersom de kan binda till ämnena i den med starka vätebindningar (eller vanliga dipol-dipolbindningar). Detta sammantaget leder till att de polära ämnena åker ut först genom kolonnen och att de opolära får längst retentionstid.

# HPLC-analyser kan utföras på 2 olika sätt

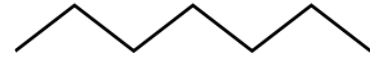
- ✓ För att lättare förstå skillnaden mellan de 2 varianterna så testar vi att köra ett prov bestående av följande 3 ämnen i en HPLC med polär resp. opolär kolonn:



*Glycerol*



*Pentanol*

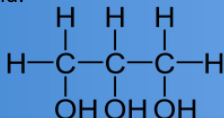


*Heptan*

# HPLC-analyser kan utföras på 2 olika sätt

## Normal-fas-kromatografi (polär kolonn):

Glycerol kan binda med många starka vätebindningar till den polära stationära fasen. Får längst retentionstid.

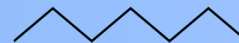


### Opolär mobil fas (t.ex. en blandning av hexan och kloroform)

Pentanol kan skapa vätebindningar till den stationära fasen, men inte lika många som glycerol. Har även en ganska lång kolvätekedja och kan skapa relativt många van der Waalsbindningar till de opolära molekylerna i den mobila fasen. Får därför en medellång retentionstid.



Heptan kan ej binda med vätebindningar (eller vanliga dipol-dipolbindningar) till den polära kolonnen. Heptan kan däremot skapa många van der Waalsbindningar med de opolära molekylerna i den mobila fasen. Får kortast retentionstid.



Lägst polaritet först

Polär stationär fas (OH-grupper)

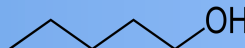
## Omvänd-fas-kromatografi (opolär kolonn):

Heptan kan ej binda med vätebindningar (eller vanliga dipol-dipolbindningar) till molekylerna i den polära mobila fasen. Däremot kan heptan skapa många van der Waalsbindningar med de långa kolvätena i den opolära stationära fasen. Får längst retentionstid.

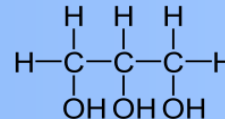


### Polär mobil fas (t.ex. en blandning av vatten och metanol)

Pentanol kan skapa vätebindningar till den mobila fasen, men inte lika många som glycerol. Har även en ganska lång kolvätekedja och kan skapa relativt starka många van der Waalsbindningar till de opolära molekylerna i den stationära fasen. Får därför en medellång retentionstid.



Glycerol kan binda med många starka vätebindningar till molekylerna i den polära mobila fasen. Får kortast retentionstid.



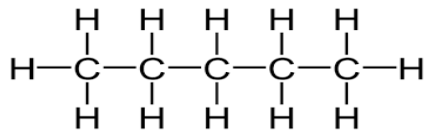
Högst polaritet först

Opolär stationär fas (kolväten, t.ex. C18)

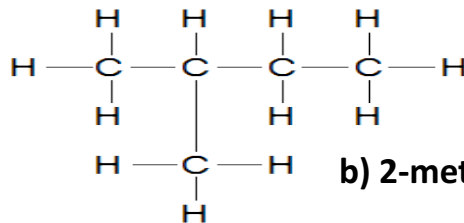
**Obs.** De mobila faserna består av blandningar av olika ämnen med olika polaritet. Vi vill nämligen inte ha en mobil fas som är 100 % polär eller 100 % opolär eftersom alla ämnen till slut ska kunna ta sig igenom kolonnen. Efter ett tag kan man också förändra polariteten av den mobila fasen för att "locka ut" de ämnen som sitter väldigt hårt bundna till den stationära fasen.

# Uppgift 1:

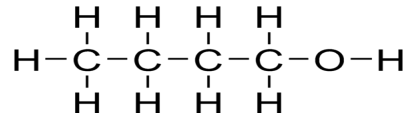
Ett prov med okända ämnen analyseras med hjälp av HPLC (opolär kolonn). Tre retentionstider erhålls; 2,5, 7,7 och 12,3. Kemisterna identifierar nedanstående tre ämnen i provet. Men vilken retentionstid tillhör vilket ämne?



a) Pentan



b) 2-metylbutan



c) Butanol

**Lösning:** Kolonnen innehåller en opolär stationär fas. Det innebär samtidigt att den mobila fasen är polär. Opolära ämnen (ofta kolväten) kan binda starkare till den opolära stationära fasen i kolonnen än till de polära molekylerna i den mobila fasen (kan skapa många van der Waalsbindningar med de långa kolvätena i den stationära fasen). Samtidigt "trivs" de polära ämnen bättre i den mobila fasen eftersom de kan binda till den med starka vätebindningar (alt. vanliga dipol-dipolbindningar).

**Pentan:** Opolär molekyl med avlång struktur vilket möjliggör fler van der Waalsbindningar med molekylerna i den stationära fasen, i jämförelse med 2-metylbutan. **Retentionstid: 12,3.**

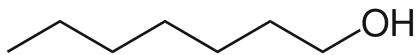
**2-metylbutan:** Opolär molekyl men med en mer sfärisk/rund form i jämförelse med pentan. Antalet van der Waalsbindningar med molekylerna i den stationära fasen blir därför färre. **Retentionstid: 7,7.**

**Butanol:** Polär molekyl (OH-grupp) vilket möjliggör vätebindningar med de polära molekylerna i den mobila fasen. Binder alltså starkast till den mobila fasen och kommer ut först. **Retentionstid: 2,5.**

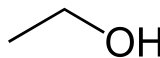


# Uppgift 2:

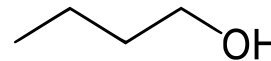
Ett prov med okända ämnen analyseras med hjälp av HPLC (opolär kolonn). Tre retentionstider erhålls; 3,5, 8,2 och 11,7. Kemisterna identifierar nedanstående tre ämnen i provet. Men vilken retentionstid tillhör vilket ämne?



a) Heptanol



b) Etanol



c) Butanol

**Lösning:** Kolonnen innehåller en opolär stationär fas. Det innebär samtidigt att den mobila fasen är polär. Alla ovanstående ämnen har en OH-grupp. De kan alltså skapa vätebindningar. Skillnaden mellan ämnena är hur lång kolvätekedjan är. En lång kolvätekedja innebär att molekylen inte blir så polär trots förekomsten av en OH-grupp. De polära molekylerna som finns i den polära mobila fasen "störs" av den långa kolvätekedjan och vill därför inte så gärna skapa vätebindningar med den typen av molekyler utan binder då hellre med vätebindningar till andra molekyler. Samtidigt så kommer den långa kolvätekedjan kunna skapa många van der Waalsbindningar med den opolära kolonnen. Detta tillsammans leder till att molekyler med långa kolvätekedjor binder hellre till den opolära stationära fasen jämfört med den polära mobila fasen, trots förekomsten av en OH-grupp.

**Heptanol:** Har en OH-grupp, men har även en lång kolvätekedja vilket innebär att polariteten är ganska låg trots OH-gruppen. Den långa kolvätekedjan kan skapa många van der Waalsbindningar med den opolära kolonnen. Bromsas därför upp mest i kolonnen av de 3 ämnena. **Retentionstid: 11,7.**

**Etanol:** Har en OH-grupp och en kort kolvätekedja. Har därför högst polaritet och binder starkt till den polära mobila fasen. Kan inte skapa så många van der Waalsbindningar till den opolära kolonnen. **Retentionstid: 3,5.**

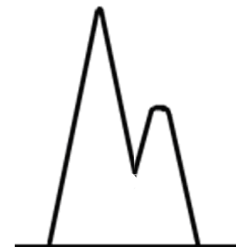
**Butanol:** Har en OH-grupp och en ganska lång kolvätekedja. Har därför medelhög polaritet. Kan skapa ganska många van der Waalsbindningar med den opolära kolonnen. **Retentionstid: 8,2.**

# Vi kan förbättra separationen i kolonnen genom att ändra olika faktorer

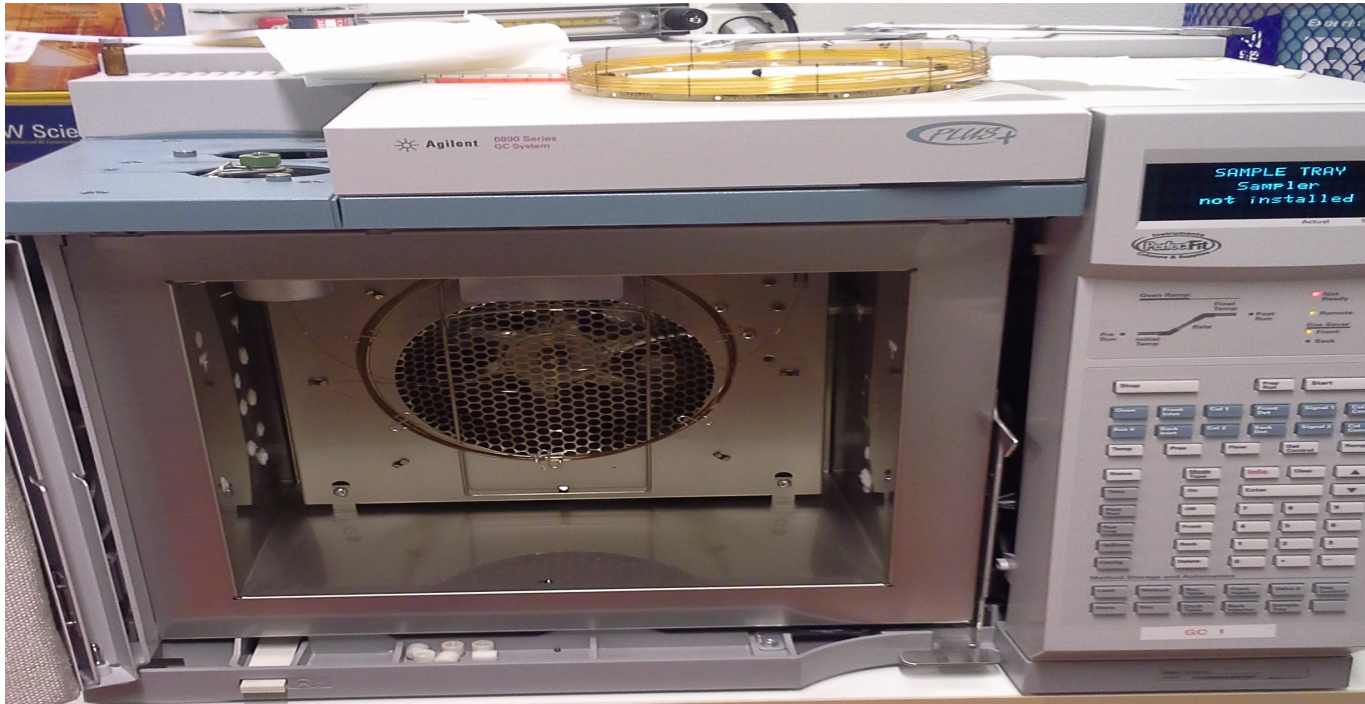
✓ Ibland kan det vara så att topparna från flera olika ämnen sammanfaller i kromatogrammet (dålig upplösning). Det krånglar i så fall till vår analys eftersom det blir svårare att identifiera olika ämnen och att bestämma koncentrationen av dessa.

✓ Åtgärder för att förbättra separationen och få en bättre upplösning i kromatogrammet:

1. **Använda en kolonn med en annan storlek:** I en längre och/eller smalare kolonn kommer de olika ämnena i provet binda fler gånger till den stationära fasen och därmed separeras från varandra i högre utsträckning.
2. **Sänka hastigheten av den mobila fasen:** Om vi sänker den mobila fasens hastighet så kommer ämnena i provet ha längre tid på sig inuti kolonnen och de kommer hinna binda i större utsträckning till den stationära fasen. Det leder till en bättre separation.
3. **Ändra kolonnens polaritet:** Om vi får en dålig separation på en opolär kolonn så kan vi testa med att byta ut den mot en polär kolonn (eller tvärtom).
4. **Ändra den mobila fasens polaritet:** Vi kan öka eller minska polariteten av den mobila fasen genom att påverka sammansättningen av de ämnen som ingår.



# En annan liknande metod är gaskromatografi (GC)



# Vad är de viktigaste skillnaderna mellan HPLC och GC?

- ✓ **Olika mobila faser:** I gaskromatografi används en gas som mobil fas (helium, kvävgas eller vätgas) medan en vätska (en blandning av olika ämnen) används vid HPLC.
- ✓ **HPLC kan användas för fler ämnen:** GC kan enbart separera och analysera ämnen som är flyktiga (kan övergå i gasform relativt lätt) och som är värmetåliga. Gaser och lättflyktiga vätskor kan analyseras med GC medan de flesta vanliga vätskor ej kan analyseras. Det är enbart ämnen som har en lägre kokpunkt än 350 grader som kan analyseras med GC, vilket motsvarar ca 15-20 % av alla kända ämnen. HPLC kan däremot användas även för icke flyktiga ämnen och för ämnen som är värmekänsliga och har därför ett större användningsområde (t.ex. används HPLC för kolhydrater, fetter och proteiner och har därför stor betydelse inom biokemi, medicin etc.).
- ✓ **Fördelen med GC framför HPLC** är framförallt att det är en snabbare och lite enklare metod att genomföra.

# För den bästa kvalitativa analysen krävs dock en masspektrometer som detektor

- ✓ **Många prover är komplexa och innehåller ett stort antal ämnen** med likartade retentionstider. Dessa är därför svåra att identifiera med enbart HPLC eller GC kopplad till en "vanlig" detektor. Om vi däremot kopplar vår HPLC eller GC till en detektor som heter "masspektrometer" (MS) så kommer vi få ett mycket kraftfullt verktyg. Dessa analysmetoder kallas för HPLC-MS resp. GC-MS.
- ✓ **Med hjälp av en masspektrometer kan massan av de olika ämnena** i provet bestämmas. Masspektrometern kan även "lista" ut vilka delar som finns i de olika ämnenas molekyler eftersom molekylerna "slås sönder" i mindre beståndsdelar och sedan vägs varje beståndsdel. Varje beståndsdel i molekylen kan då identifieras och vi kan göra en strukturbestämning av hela molekylen. Masspektrometern skapar på detta sätt ett kemiskt fingeravtryck för varje ämne. Därmed kan vi identifiera helt nya ämnen (t.ex. helt nya droger).

Se gärna fler filmer av Niklas Dahrén:

<http://www.youtube.com/Kemilektioner>

<http://www.youtube.com/Medicinlektioner>

