

Utvärdering av en vätskekromatografisk kolonn med kombinerad retentionsmekanism

Optimering av parametrar som påverkar separation av analyter vid farmaceutisk tillämpning

Elin Allgén, Ellen Enarsson, Erik Hedström,
Ingrid Martinsson, Henrik Sarge, Hannes Sellén

Institutionen för Kemi och Kemiteknik
Avdelningen för Kemi och biokemi

KANDIDATARBETE 2022

**Utvärdering av en vätskekromatografisk kolonn med kombinerad
retentionsmekanism**

Optimering av parametrar som påverkar separation av analyter vid
farmaceutisk tillämpning

Elin Allgén
Ellen Enarsson
Erik Hedström
Ingrid Martinsson
Henrik Sarge
Hannes Sellén



CHALMERS

Institutionen för Kemi och Kemiteknik
Avdelningen för Kemi och biokemi
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg, Sverige 2022

Utvärdering av en vätskekromatografisk kolonn med kombinerad retentionsmekanism

Optimering av parametrar som påverkar separation av analyter vid farmaceutisk tillämpning

Elin Allgén, Ellen Enarsson, Erik Hedström, Ingrid Martinsson, Henrik Sarge, Hannes Sellén

© Elin Allgén, Ellen Enarsson, Erik Hedström, Ingrid Martinsson, Henrik Sarge, Hannes Sellén, 2022.

Handledare: Per Malmberg, Avdelningen för Kemi och biokemi. Jan-Olof Svensson, AstraZeneca. Anna Granfors, AstraZeneca

Examinator: Anna Martinelli, Avdelningen för Tillämpad Ytkemi

Kandidatarbete 2022

Institutionen för Kemi och Kemiteknik

Avdelningen för Kemi och biokemi

Chalmers Tekniska Högskola

SE-412 96 Göteborg

Telefon +46 31 772 1000

Framsida: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Budesonid, Metoprolol, Formoterol, Alprenolol och Propanolol. Analys med flödes hastigheten 0,8 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med konstant saltkoncentration om 70 mM NaCl.

Göteborg, Sverige 2022

Förord

Vi vill framföra ett hjärtligt tack till våra handledare Per Malmberg, Jan Olof Svensson och Anna Granfors. Tack för att ni tagit er tiden att hjälpa oss och för att ni funnits med oss hela vägen genom projektet. Vi vill även tacka alla andra från AstraZeneca som hjälpt oss. Vi är oerhört tacksamma över att ni alltid har varit behjälpliga och villiga att dela med er av er kunskap som hjälpt oss framåt. Vi vill även tacka AstraZeneca för att de tillhandahållit de undersökta substanserna och den undersökta kolonnen.

Med Varma Hälsningar,

*Elin Allgén, Ellen Enarsson, Erik Hedström, Ingrid Martinsson, Henrik Sarge,
Hannes Sellén*

Göteborg, maj 2022

Abstract

Evaluation of a Liquid Chromatographic Column with Mixed-mode Retention Mechanism

Optimisation of Parameters that Affect Separation of Analytes in Pharmaceutical Application

In the pharmaceutical industry, liquid chromatographic separation and analysis methods are currently widely used for product development and quality control. A common method is reversed phase liquid chromatography, where methanol is often used as a solvent in sample preparation. As a result of the high polarity of methanol, difficulties may arise. This is mainly due to a disruption of the partition equilibrium between the stationary phase and the mobile phase, which limits the possibility of achieving good chromatographic results. The purpose of this project was therefore to investigate the column, *Coresep 100*, which combines both reversed phase and ion exchange mechanism to achieve separation.

The column was evaluated by analysing seven substances, which are common in method development, based on the three subproblems: co-elution, long retention times and poor peak symmetry. In order to attempt to solve the subproblems, analyses were carried out by varying different parameters. The parameters evaluated during this project were flow rate, pump gradient and different compositions of the mobile phase, such as its pH and ionic strength. The repeatability of the column was also evaluated.

The combination of parameters that gave the most beneficial results was a mobile phase with pH 2,3; using a constant salt concentration of 70 mM NaCl, with the pump gradient 20-5 and a flow rate of 0,8 ml/min. Based on the attained results, it was concluded that the column is suitable for further work. The problems with co-elution were considered avoidable and the retention times were deemed acceptable. Further work is recommended to focus on solving the remaining problem of the partially deficient peak symmetry and the relatively broad peaks.

Sammanfattning

Inom läkemedelsindustrin används idag vätskekromatografiska separations- och analysmetoder i stor omfattning för produktutveckling och kvalitetskontroll. En vanlig metod är *Reversed Phase Liquid Chromatography* där metanol ofta används som lösningsmedel vid provberedning. Till följd av metanolens höga polaritet kan svårigheter uppstå, framförallt störs fördelningsjämvikten mellan stationärfasen och mobilfasen. Detta begränsar möjligheten att uppnå goda kromatografiska resultat. Syftet med detta projekt var därför att undersöka kolonnen, *Coresep 100*, vilken använder sig av både *reversed phase*- och jonbytesmekanism vid separation.

Kolonnen utvärderades genom att analysera sju substanser, som är vanliga vid metodutveckling, utifrån de tre delproblemen: sameluering, långa retentionstider och dålig toppsymmetri. För att försöka hitta lösningar till delproblemen genomfördes analyser där olika parametrar varierades. Parametrarna som undersöktes under detta projekt var flödes hastighet, pumpgradient och olika sammansättningar av mobilfasen, såsom dess pH och jonstyrka. Repeterbarheten för kolonnen utvärderades också.

Den kombination av parametrar som uppvisade mest lovande resultat var en mobilfas med pH 2,3; konstant saltkoncentration på 70 mM NaCl, tillsammans med pumpgradienten 20-5 och en flödes hastighet på 0,8 ml/min. Utifrån de resultat som erhöles drogs slutsatsen att kolonnen är lämplig för vidare arbete, då problem med sameluering ansågs kunna undvikas och retentionstiderna bedömdes vara godtagbara. Ett vidare arbete ansågs kunna inrikta sig på att lösa det kvarstående problemet med delvis bristande toppsymmetri och relativt breda toppar.

Nomenklatur

Nedan presenteras använda akronymer i alfabetisk ordning. Även engelska begrepp vilka saknar lämplig svensk motsvarighet förklaras kortfattat.

α	Selektivtetsfaktor
As	Asymmetrifaktor
AZ	AstraZeneca
<i>Core-shell</i>	Partikelutformning med en solid kärna, <i>core</i> , och ett poröst skal, <i>shell</i>
<i>Fronting</i>	Icke idealitet hos signaltopp, se avsnitt 2.2.1
HAc	Ättiksyra
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> - Vätskekromatografi med högt tryck
H ₃ PO ₄	Fosforsyra
k	Retentionsfaktor
MeCN	Acetonitril
MM	<i>Mixed-mode</i> - Kombination av retentionsmekanismer
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumklorid
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
NPLC	<i>Normal Phase Liquid Chromatography</i> - Vätskekromatografi med polär stationärfas och opolär mobilfas
RP	<i>Reversed phase</i> - Mekanism med opolär stationärfas och polär mobilfas
RPLC	<i>Reversed Phase Liquid Chromatography</i> - Vätskekromatografi med opolär stationärfas och polär mobilfas
t_R	Retentionstid
t_0	Dödtid
<i>Tailing</i>	Icke idealitet hos signaltopp, se avsnitt 2.2.1
UV/Vis	<i>UltraViolet Visible spectroscopy</i> - Spektroskopi inom våglängdsintervallet ultraviolett och synligt ljus

Innehåll

1	Inledning	1
1.1	Bakgrund	1
1.2	Syfte	1
1.3	Problemformulering	1
1.4	Samhälleliga och etiska aspekter	2
1.5	Avgränsningar	2
2	Teoretisk bakgrund	3
2.1	Vätskekromatografi	3
2.1.1	Fördelningskromatografi	4
2.1.2	Jonbyteskromatografi	5
2.1.3	Kombinerad retentionsmekanism	5
2.1.3.1	Undersökt kolonn med kombinerad retentionsmekanism	6
2.2	Utvärderingsparametrar	6
2.2.1	Toppersymmetri	7
2.2.2	Selektivitet och separation	7
2.2.3	Metodoptimering	8
2.2.3.1	Retentionsfaktor	9
2.2.3.2	Optimering med hjälp av mobilfas	9
3	Metod	10
3.1	Utvalda substanser för analys	10
3.2	Förberedande laborativt arbete	10
3.2.1	Beredning av 1 mM substanser i vialer	10
3.2.2	Beredning av mobilfaser	11
3.2.2.1	Mobilfas med buffertsystem vid pH 1,9 och 2,3	11
3.2.2.2	Mobilfas med buffertsystem vid pH 4	12
3.2.2.3	Mobilfas med buffertsystem vid pH 6	12
3.2.3	Gradienter	12
4	Resultat	14
4.1	Mobilfassammansättning	14
4.1.1	Buffertsystem vid pH 1,9	14
4.1.2	Buffertsystem vid pH 2,3	15
4.1.3	Buffertsystem vid pH 4	17
4.1.4	Buffertsystem vid pH 6,2	19
4.1.5	Sammanfattande pH-jämförelse	20
4.2	Flödeshastighet	20
4.3	Gradient	21
4.3.1	Sammanfattande jämförelse av flödeshastighet och gradient	22
4.4	Repeterbarhet	22
5	Diskussion	24
5.1	Mobilfassammansättning och jonstyrka	24
5.2	Pumpgradient och flödeshastighet	25
5.3	Repeterbarhet	25
5.4	Felkällor	26
5.5	Fortsatta studier	26

6 Slutsats	27
Referenser	28
Bilagor	A.1
A Program	A.1
B Figurer	B.1
C Beräkningar	C.1
D Tidsplan	D.1

1 Inledning

1.1 Bakgrund

Vätskekromatografiska separations- och analysmetoder, främst *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), används i stor utsträckning inom läkemedelsindustrin. Metoderna används under såväl produktutveckling som kvalitetskontroll för kommersiellt tillverkade produkter innan introduktion på marknaden.

Läkemedelsföretaget AstraZeneca (AZ) har under lång tid använt sig av automatiserad utrustning, såsom analysrobotar, för att karaktärisera bland annat inhalationsprodukter. Anledningen har bland annat varit att öka effektiviteten i processen samt att bidra till en bättre arbetsmiljö genom mindre monotont arbete. Robotarna har exempelvis använts för att mäta avgiven dos av inhalatorerna som undersökts. Vid analys där den angivna dosen ska kvantifieras löses den upp i metanol, då detta lösningsmedel lämpar sig för lösa upp komplexa substanser [1, 2].

Nackdelen med att använda metanol vid provberedning är att det kan uppstå svårigheter vid *Reversed Phase Liquid Chromatography* (RPLC) [1]. RPLC är vanligt då det är den separationsmetod som ger bäst egenskaper, bland annat eftersom mobilfasen är polär, och således kan analysera komplexa föreningar [2]. Svårigheterna syftar till att metanolens höga polaritet kan leda till att den eftersträvade fördelningens jämvikten mellan stationär- och mobilfas i kolonnen störs. I sin tur leder detta till att optimala kromatografiska resultat inte uppnås.

Ett möjligt sätt att hantera den höga metanolhalten i proverna är att använda en kolonn med *mixed-mode* (MM), i vilken två olika retentionsmekanismer finns tillgängliga. MM är en relativt ny mekanism som inte är fullt testad. I detta projekt kommer därför en MM-kolonn undersökas, som kombinerar RP- med jonbytesmekanism, för att undersöka hurvida detta skulle kunna vara en lösning på de problemen som uppstår. Dessutom undersöks vilka kromatografiska betingelser som skulle hantera den höga metanolhalten bäst.

1.2 Syfte

Syftet med detta projekt är att undersöka MM-kolonnen, *Coresep 100*, från Helix Chromatography. Den undersöks för att avgöra om kolonnen är lämplig att använda vid analys av substanser när de är lösta i en hög halt av metanol. Detta projekt är tänkt att ligga till grund för hurvida AZ ser möjlighet att vidare tillämpa MM-kolonnen tillsammans med det automatiserade provberedningssystem som används i det dagliga arbetet. Det långsiktiga målet med MM-kolonnen är på så vis att öka produktiviteten och förbättra kvalitén på mätdata och arbetsmiljö.

1.3 Problemformulering

Det huvudsakliga problemet för AZ är att de läkemedelsprover som de studerar behöver lösas i metanol för att sedan kunna genomgå analys, vilket gör att RPLC inte fungerar optimalt [1]. När provet injiceras till kolonnen kommer den tillförda mängden metanol störa fördelningen av analyt mellan stationär- och mobilfas. Detta ger upphov till problem med retention, separation, samt toppsymmetri. En MM-kolonn kan eventuellt kringgå problematiken med metanol varvid en sådan kolonn undersöks.

Vidare blir utmaningen att för denna MM-kolonn undersöka hur betingelser kan förändras för att möjliggöra god separation och korta analystider för de substanser som tillhandahållits av AZ. Delproblemen som försvårar analys och önskas undvikas genom optimering är följande:

- Sameluering, vilket innebär att två eller flera analyter kommer ut samtidigt ur kolonnen och medför svårigheter att kvantifiera mängden analyt.
- Långa retentionstider, som sker till följd av att analyten interagerar starkare med stationärfasen än mobilfasen, vilket medför längre analystider.
- Dålig toppsymmetri och breda toppar som uppkommer till följd av oönskade interaktioner mellan analyt och stationärfas.

1.4 Samhälleliga och etiska aspekter

Analysen med hjälp av HPLC är i stort sett redan automatiserade förutom när det kommer till provberedning, som till viss del fortfarande sker manuellt [1]. Den manuella provberedningen innebär ett monotont arbete och leder på så vis till en försämrad arbetsmiljö. Om även provberedningen kan automatiseras kommer det resultera i en mindre tidskrävande analysprocess och därmed ett effektivare arbete. Genom att optimera analysprocessen och provberedningen vill AZ reducera mängden lösningsmedel som förbrukas. Mindre mängd lösningsmedel kommer i sin tur leda till reducerad miljöpåverkan. Detta då processen får ett minskat behov av råmaterial och följaktligen mindre avfall, vilka båda är energikrävande. Dessa samhälleliga och etiska aspekter kommer inte att tas hänsyn till, då effekterna av detta projektet till stor del ligger i vilka beslut som tas i framtiden.

1.5 Avgränsningar

Den laborativa delen av arbetet innefattar en mängd avgränsningar på grund av dess tidskrävande karaktär.

Under arbetets gång har flera olika pH-värden inom intervallet 1,9-6,2 testats för att synliggöra en effekt av pH hos MM-kolonnen. För de lägre pH-värdena 1,9-4,2 har endast en 70/30 (%v/v) sammansättning mellan organiskt lösningsmedel och buffert undersökts medan för det högre pH-värdet 6,2 testades 50/50 (%v/v). Valet av organiskt lösningsmedel baserades helt på rekommendation från AZ, och möjligheten att använda något annat organiskt lösningsmedel har inte hunnit undersökas. Den saltkoncentration som undersökts har varit 70 mM, vidare har inga ytterligare saltkoncentrationer undersökts vid analysen.

Två av substanserna injicerades i mindre volym än övriga substanser, då deras absorbans vid den valda detektionsväglängden var väldigt hög. Injektionsvolymens inverkan på deras toppform har dock inte undersökts. Vidare har endast två olika flödeshastigheter undersökts, 0,6 ml/min och 0,8 ml/min, då dessa visade sig lovande i ett tidigt skede av det projektet.

I detta projekt har endast två olika pumpgradients undersökts, eftersom fler skulle bli för tidskrävande. Då gradienter är sammankopplade med flödeshastighet och mobilfassammansättning, som även dessa justeras, valdes två gradienter för att begränsa mängden olika betingelser.

Under detta projekt har en optimal jämviktstid hos kolonnen inte undersökts. Två jämviktstider valdes tidigt under det laborativa arbetet, där analys skedde under 30 minuter och jämviktstiderna var då 5 och 10 minuter beroende på vilken pumpgradient som användes. De visade på lovande resultat och blev de tider som användes under projektets gång. Konditioneringstiden valdes på samma sätt där en godtycklig tid som visade på lovande resultat valdes utan vidare undersökning. I planeringen av detta projekt var även syftet att studera ytterligare en kolonn, *Amaze SC*. På grund av tidsbrist gjordes valet att endast undersöka *Coresep 100* och att inte studera *Amaze SC*.

2 Teoretisk bakgrund

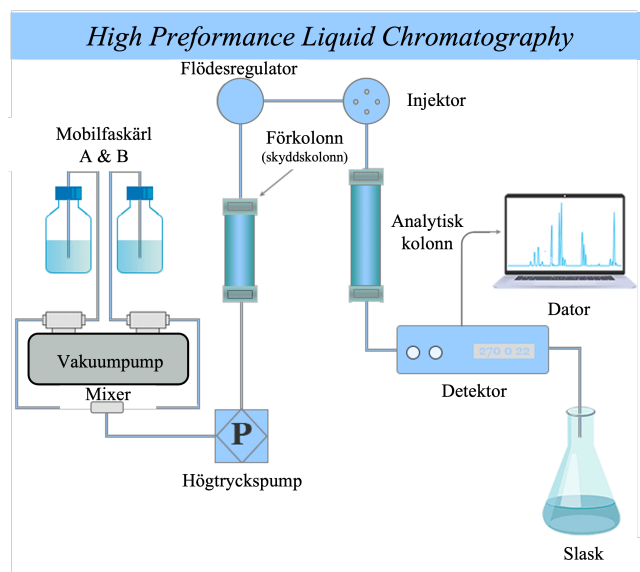
2.1 Vätskekromatografi

Vätskekromatografi är en analytisk separationsmetod där föreningar i ett vätskeprov analyseras. Föreningarna benämns analyter och dessa injiceras till en kolonn där separation sker, för att sedan kunna detekteras med hjälp av en detektor [3].

Ett vanligt vätskekromatografiskt instrument är HPLC, som visas i figur 1. Separationen i HPLC sker i kolonnen med hjälp av dess packmaterial. Materialet utgörs av porösa kiselpartiklar till vilka en stationärfas är kovalent bunden. Stationärfasen kan innehålla olika funktionella grupper, vilka styr stationärfasens egenskaper [3].

Stationärfasen ger upphov till att analyterna retarderas i kolonnen, medan mobilfasen som är en vätska bidrar till att analyterna elueras. Med elueras menas att analyterna transporteras genom kolonnen. De olika analyterna fördelas till olika grad mellan stationär- respektive mobilfas. Det är denna skillnad i fördelning som ger upphov till analyternas skilda retentionstid, tiden det tar för analyter att färdas genom kolonnen. Då olika analyter får olika retentionstid kan dessa urskiljas från varandra vid analys [4].

För att tvinga vätskeprovet genom den tätt packade kolonnen, och på så vis erhålla en god separation är det nödvändigt för HPLC-systemet att använda sig av ett högt tryck. Systemet innehåller därför en pump som kontinuerligt pumpar mobilfasen genom kolonnen [3].

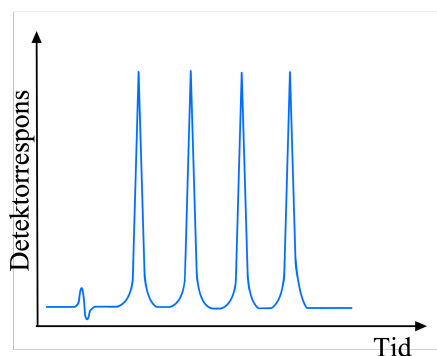


Figur 1: Schematisk bild över de ingående komponenterna i ett HPLC-system med bland annat kärl för mobilfas, pump, injektor, kolonn samt detektor. Använd och översatt med tillstånd [5].

När analyterna har eluerat ut ur kolonnen används en detektor för att registrera förekomsten av analyt, vilket resulterar i en mätbar signal. UV/Vis-detektorn är lämplig för analys av substanser eftersom dessa vanligen innehåller kromoforer. Kromoforer är funktionella grupper som gör att molekylerna kan absorbera synligt samt UV-ljus, alltså ljus inom våglängdsintervallet 200–800 nm [3].

Vid UV/Vis-detektion används en spektrofotometer. Denna mäter ljusabsorption och består huvudsakligen av en ljuskälla, monokromator samt en detektor. Provet bestrålas med ljus av en viss våglängd som en monokromator väljer ut med hjälp av ett gitter. Därefter mäter detektorn hur mycket ljus som absorberas av analyterna [4]. Kromatogrammet som UV/Vis-detektion resulterar i visar detektorrespons, vanligtvis absorbans, som funktion av elueringstid [3], vilket

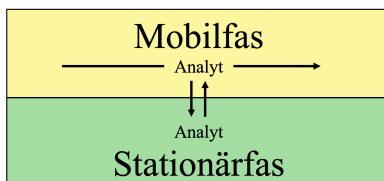
visas i figur 2. Från kromatogrammet som erhålls kan en kvantitativ bestämning göras, förutsatt att analysen görs för ett känt prov.



Figur 2: Schematisk bild över hur detektorn konverterat signaler till ett kromatogram, med detektorrespons på y-axeln och tid på x-axeln. Kromatogrammet visar fyra baslinjeseparerade toppar (CC BY-NC-SA 4.0) [3].

2.1.1 Fördelningskromatografi

Fördelningskromatografi är en typ av vätskekromatografi där separationen och således retentionen av analyter sker till följd av en skillnad i fördelningsjämvikt. Denna avgör hur analyterna fördelar sig mellan stationär- och mobilfasen [3]. Fördelningsjämvikten ger upphov till en längre retentionstid för analyter som interagerar mer med stationärfasen. Analyter som interagerar mindre med stationärfasen får istället en kortare retentionstid. Figur 3 visar hur mobilfasen tvingar analyterna framåt samtidigt som analyten kontinuerligt fördelar sig mellan de två faserna och därmed retarderas i kolonnen.



Figur 3: Schematisk bild över analytens fördelning mellan stationär- och mobilfas (CC BY-NC-SA 4.0) [3].

När HPLC används finns det huvudsakligen två varianter av fördelningskromatografiska kolonner, *normal phase* (NP) och *reversed phase* (RP), vilka används tillsammans med olika mobilfaser. Vid RPLC används en polär mobilfas, och vid *normal phase* HPLC (NPLC) används istället en mindre polär mobilfas [3]. Anledningen till att två olika varianter av mobilfaser används är att stationärfasen i de två kolonnvarianterna har olika kemiska egenskaper [3]. Den huvudsakliga skillnaden mellan kolonnerna är stationärfasens polaritet, vilken styrs av packmaterialet.

Tidigare nämndes att packmaterialet utgörs av porösa kiselpartiklar, till vilka stationärfasen är kovalent bunden har funktionella grupper. I fallet med RP-kolonner är det vanligtvis funktionella alkylgrupper som är kovalent bundna till silanoler i porösa kiselpartiklar. Alkylgrupperna kan varieras beroende på vilka retentionsegenskaper som önskas, men vanligen används C₈ eller C₁₈ [3]. Stationärfasen är således svagt polär eller opolär för RPLC, och vid NPLC används istället en mer polär stationärfas [3]. Av de två varianterna är RPLC generellt den vanligaste att använda när komplexa lösningar ska analyseras, då det flesta föreningar är lösliga i ett mer polärt lösningsmedel [2].

Analyternas fördelning kan förskjutas genom att variera mobilfasens sammansättning och polaritet. Möjligheten att justera mobilfasens karaktär är ett enkelt sätt att erhålla kortare retentionstider men samtidigt vidhålla god separation [3]. Den bakomliggande orsaken till förskjut-

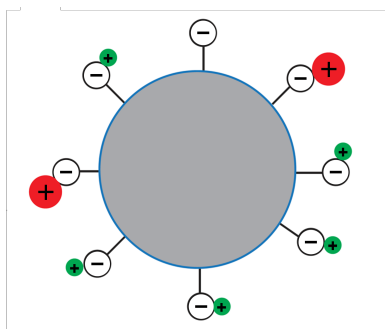
ningen av analyternas fördelning när mobilfasen ändras beror på analyternas kemiska egenskaper, exempelvis polaritet och hydrofobicitet, då dessa avgör var analyterna trivs bäst.

Om analyten exempelvis är opolär kommer den i större utsträckning att befinna sig i den mer opolära fasen. Mobilfasen väljs då så att dess polaritet är lägre än stationärfasens, så att analyten befinner sig till större utsträckning i mobilfasen än i stationärfasen. På så vis kommer retentionstiden att förkortas.

2.1.2 Jonbyteskromatografi

Jonbyteskromatografi är en annan variant av vätskekromatografi där separationen kräver att analyterna är jonföreningar, antingen anjoniska eller katjoniska. Separationen möjliggörs genom att analyterna retarderas till följd av interaktioner med kolonnens stationärfas [6]. Uppbyggnaden av stationärfasen är liknande den för RPLC som presenterats tidigare, men det finns några skillnader.

Den huvudsakliga skillnaden mellan stationärfasen vid jonbyteskromatografi jämfört med den för RPLC är att de funktionella grupperna är joniska. Precis som för RP-kolonner kan de funktionella grupperna optimeras, i detta fall för anjoniska eller katjoniska analyter [3]. Figur 4 visar schematiskt hur de joniska analyterna interagerar med stationärfasen. Separationsmetoden är lämplig vid analys av exempelvis protonerade och således joniska föreningar, medan föreningar som är oladdade inte påverkas av denna retentionsmekanism. På grund av bristande interaktion med stationärfasen kommer oladdade föreningar eluera med mobilfasen.



Figur 4: Schematisk bild som visar hur analyter under tiden för eluering interagerar med stationärfasen (CC BY-NC-SA 4.0) [3].

Valet av de funktionella grupperna påverkar även styrkan på stationärfasens laddning. Genom att binda in exempelvis sulfonatgrupper erhålls en stark syra-katjonbytare, vilket kommer med fördelen att sulfonatgrupperna bibehåller sin anjonform över ett stort pH-intervall hos mobilfasen [3]. Det är även möjligt att skapa en stationärfas som blir en så kallad svag syra-katjonbytare, vilken däremot kommer att påverkas av pH-värdet och jonstyrkan hos mobilfasen. En svag syra-katjonbytare kommer beroende på om pH-värdet är över eller under stationärfasens funktionella gruppernas pK_a vara mer protonerade eller deprotonerade [3].

Mobilfasen kan precis som vid fördelningskromatografi optimeras för specifika ändamål. När mobilfasen justeras vid jonbyteskromatografi är det framför allt jonstyrkan och pH som ändras [3], istället för mobilfasens polaritet som vid fördelningskromatografi.

2.1.3 Kombinerad retentionsmekanism

De två tidigare presenterade analysmetoderna, fördelnings- och jonbyteskromatografi, används som nämnts för olika typer av analyter baserat på deras kemiska egenskaper. I vissa fall då analyter med olika egenskaper ska separeras är en kolonn med endast en separationsmekanism inte tillräcklig. För att undgå dessa begränsningar har *mixed-mode*-kolonner (MM-kolonner)

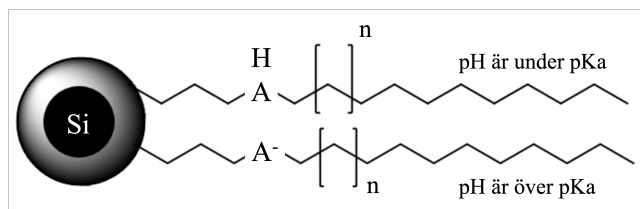
utvecklats, vilket är en kolonn där stationärfasen tillämpar två eller fler retentionsmekanismer som påverkar analyternas retention [7, 8, 9]. Exempelvis är RPLC inte kompatibel för retention av starkt polära eller laddade analyter, som är vanligt förekommande inom läkemedelsindustrin [10], vilket gör att en MM-kolonn kan vara användbar.

MM-kolonnens packmaterial är uppbyggt av kiselpartiklar med bundna alkylgrupper. Till dessa alkylgrupper binds olika typer av funktionella grupper, som kan vara laddade. Exempelvis kan en förändring av mobilfasens sammansättning resultera i att stationärfasen ändrar karaktär [8]. Det kan vara att kolonnen går från RP-karaktär till att vara en kombination av RP- och jonbyteskaraktär, genom en ändring i mobilfasens pH. Förändringen till det kombinerade fallet genom denna ändring gör att kolonnen blir lämplig att använda för tillämpningar med både polära, opolära samt laddade analyter. Genom denna förändring är det således möjligt att kringgå RPLCs begränsning för laddade analyter.

2.1.3.1 Undersökt kolonn med kombinerad retentionsmekanism

I projektet används kolonnen, *Coresep 100*, $2,7 \mu\text{m}$ 90\AA ($2,1 \times 50 \text{ mm}$) från Helix Chromatography. *Coresep 100* är en RP-kolonn kombinerad med katjonbytesmekanism. Dessutom kombinerar kolonnen MM-kromatografi med *core-shell*-partiklar [11]. *Core-shell*-partiklar är framtagna för att minska omfattningen av bandbreddning i kolonnen med hjälp av en solid kiselkärna [12], vilket åstadkoms genom partiklarnas utformning.

Partiklarna består av en innesluten solid kiselkärna samt ett mycket tunt poröst lager av kiselabsorbent, med en resulterande partikelstorlek under $3 \mu\text{m}$ [12]. I *Coresep 100* är *core-shell*-partiklarnas funktionella alkylgrupper C_{12} med karboxylsyror, vars pK_a är 2 [11]. En schematisk bild av en sådan partikel visas i figur 5.



Figur 5: Packmaterialet i *Coresep 100*-kolonnen: En kiselpartikel med bunden stationärfas där det illustreras hur de funktionella grupperna ser ut vid olika pH på mobilfasen. Använd och översatt med tillstånd [11].

Figuren visar hur de funktionella gruppernas betingelser ändras beroende på om mobilfasens pH är över eller under stationärfasens pK_a . Då $\text{pH} = pK_a$ är lika stor del av de funktionella grupperna protonerade som deprotonerade [13]. Stationärfasen är till större grad laddad när den är deprotonerad och oladdad när den är protonerad. Stationärfasen uppvisar således på mer jonbyteskaraktär när den är deprotonerad. Önskas exempelvis en hög grad deprotonering hos de funktionella grupperna bör en mobilfas med högt pH användas.

2.2 Utvärderingsparametrar

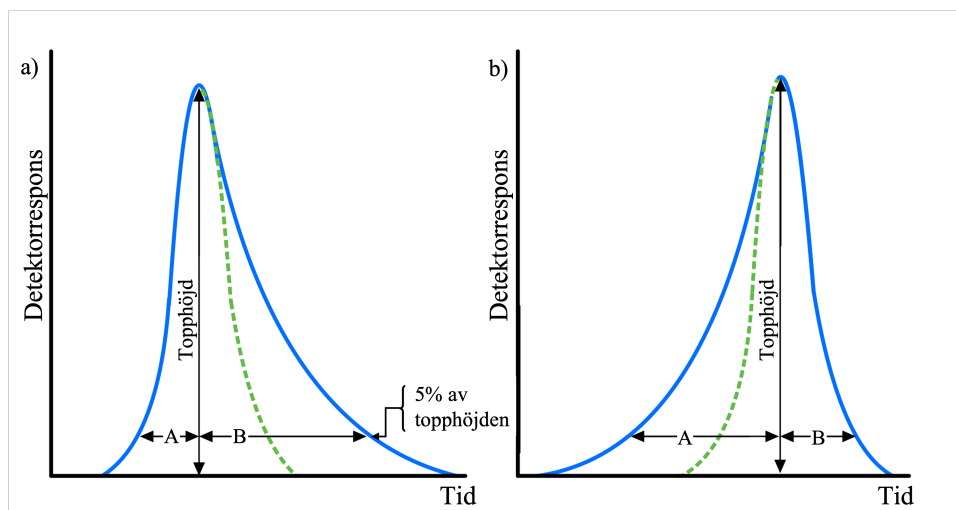
En analytisk kolonn är som tidigare nämnt ofta utformad för specifika ändamål och kan kombinerats med flertalet olika mobilfaser. För att enklare kunna jämföra och utvärdera olika kolonner med varandra är det vanligt att använda så kallade utvärderingsparametrar [3]. Utvärderingsparametrarna gör det även möjligt att jämföra exempelvis olika flödes hastigheter samt mobilfasset sammansättningar. Vanligtvis studeras parametrarna: toppsymmetri, selektivitet, jämviktstid och repeterbarhet [3].

2.2.1 Toppsymmetri

Analyterna ska i ideala fall eluera med en Gaussisk fördelning och följaktligen ge signaltoppar som är symmetriska [3, 14]. För att erhålla ett kromatogram som uppvisar denna idealitet behöver analyternas interaktioner med stationärfasen vara oberoende av deras koncentration i kolonnen. Avvikelse från ideala fallet är vanligen *fronting* eller *tailing*, som beror på en för stor injektionsvolym respektive ofördelaktiga interaktioner mellan stationärfas och analyter [3]. Även *tailing* kan orsakas av för stora injektionsvolym av provet [15]. För fallet med icke-symmetriska toppar är det vanligt att använda asymmetrifaktorn, A_s , vilken ger ett mått hur avvikande topparna är från det ideala fallet. A_s beräknas enligt ekvation (1)

$$A_s = \frac{B}{A} \quad (1)$$

där B och A är bredden till höger respektive vänster om topphöjdslinjen vid 5% av den totala topphöjden [16], vilket visas i figur 6. A_s erhålls vanligtvis automatiskt av kromatografidataprogrammet.

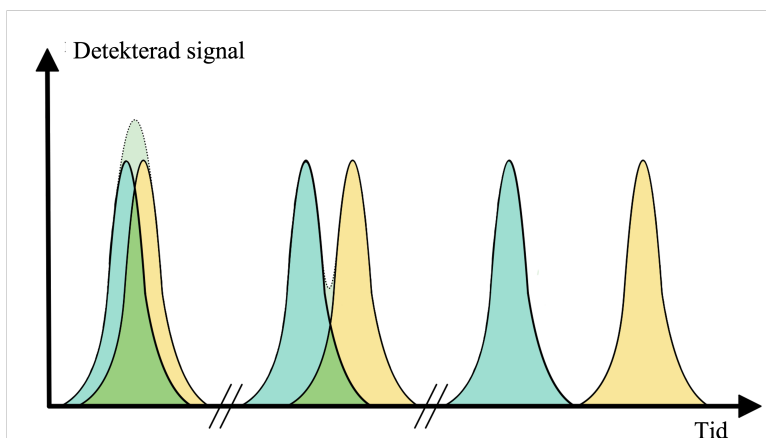


Figur 6: Två fall av asymmetriska toppar, a) visar fallet med *tailing* och b) visar fallet med *fronting*. I båda figurerna visas vart A och B för ekvation 1, hämtas automatiskt (CC BY-NC-SA 4.0) [3, 16].

De värden på A_s som erhålls är för symmetriska toppar kring 1 [16]. Om A_s däremot befinner sig mellan 1,2-5 har topparna ökande grad *tailing*, och ett värde under 1 tyder på *fronting*.

2.2.2 Selektivitet och separation

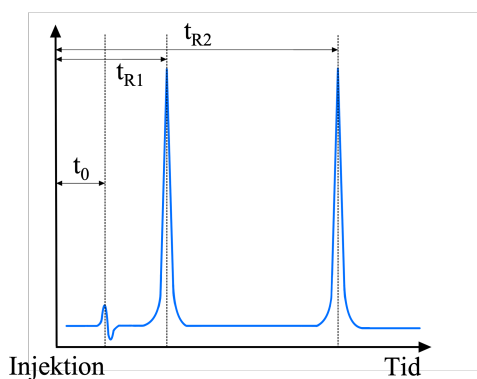
Ett annat begrepp som används när signaltoppar studeras är topparea, som beräknas av kromatografidataprogrammet [3, 17]. En faktor som kan försvåra bestämningen är exempelvis om två analyter sameluerar, det vill säga att de eluerar samtidigt eller väldigt tätt inpå varandra. Vid sameluering skulle således två toppar som helt eller delvis överlappar genereras, vilket kan ses i figur 7.



Figur 7: Tre fall av till olika grad separation och hur den detekterade signalen för två olika analyter kan se ut i ett kromatogram (CC BY-NC-SA 4.0) [3].

I figur 7 syns från vänster till höger minskad sameluerung, vilket även innebär ökad grad av separation. Den skuggande toppen som syns längst till vänster i figuren är den resulterande topp som kommer att synas i kromatogrammet, då detektorn inte kan skilja topparna åt i praktiken. Huvudanledningen till att separerade toppar önskas är att det ska vara möjligt att bestämma en viss analyts topparea för att kunna bestämma mängden analyt.

Om en metod klarar av att separera analyter tillräckligt kan sameluerande toppar undvikas och då har således metoden god selektivitet. Enligt IUPAC är detta definierat som i vilken utsträckning en metod kan användas för att bestämma förekomsten av en viss analyt i en lösning utan störningar från föreningar av liknande karaktär [18]. Figur 8 illustrerar hur det vidare går att bestämma selektivitetsfaktorn, α .



Figur 8: Dödtid i förhållande till två olika toppars retentionstid. Utifrån detta kan bland annat selektivitet bestämmas (CC BY-NC-SA 4.0) [3].

Selektivitetsfaktorn, α , för en analys går att bestämma matematisk enligt ekvation (2)

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad (2)$$

där t_0 är dödtiden, den tid det tar för mobilfasen att passera genom kolonnen. t_{R1} och t_{R2} är den första respektive den andra analytens retentionstid.

2.2.3 Metodoptimering

Metodoptimering syftar till att påverka de utvalda utvärderingsparametrarna för att uppnå god analys, och i detta projekt försöka lösa de tre delproblem som formulerats.

2.2.3.1 Retentionsfaktor

Retentionsfaktor är en funktion av den tid som analyten spenderar i stationärfasen i relation till tiden den spenderar i mobilfasen [19]. Ju högre retentionsfaktor, desto större andel av tiden kommer analyten spendera i stationärfasen vilket i sin tur leder till längre retentionstider [3].

Selektiviteten kan förbättras genom förändring av retentionsfaktorn för den senare eluerade analyten [3], vilket kan ses från ekvation (2) som även kan skrivas enligt ekvation (3)

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad (3)$$

där k_2 och k_1 är retentionsfaktorn för den sent respektive tidigt eluerade analyten

2.2.3.2 Optimering med hjälp av mobilfas

För att uppnå förhållandevis korta retentionstider och god separation mellan analyterna, kan mobilfasens sammansättning förändras under analysens gång, vilket kallas gradienteluering. Exempelvis vid RPLC inleds analysen med en mer polär mobilfas och avslutas med en mindre polär mobilfas för att få en optimal separation på kortast möjliga tid [3].

Efter gradienteluering tar det en viss tid för kolonnen att återfå ett stabilt tillstånd, vilken benämns jämviktstid [20]. Även när en ny mobilfas med andra betingelser introduceras behöver kolonnen stabiliseras, denna tid benämns konditioneringstid [20]. Jämviktstiden och konditioneringstiden är intressanta för att kunna erhålla repetitiva resultat. Det är även önskvärt att jämviktstiden är så kort som möjligt för att minimera tiden mellan injektionerna och således maximera effektiviteten. Vid upprepade analyser av ett prov är det viktigt att resultaten överensstämmer med varandra, vilket mäts med repeterbarhet [21].

Det är ibland önskvärt att använda sig av en buffert som mobilfas för att reglera mobilfasens pH i syfte att protonera alternativt deprotonera analyterna vid RPLC. Protoneringen hos analyterna leder till ökad polaritet, och därmed kortare retentionstid vid RPLC. Då $\text{pH} = \text{p}K_a$, är andelen som är protonerad lika stor som andelen som är deprotonerad [13]. För den undersökta kolonnen kan även dess packmaterial protoneras eller deprotoneras.

En ökad deprotonering av stationärfasen hos den undersökta MM-kolonnen ger upphov till att de joniserbara analyternas retentionstid och separation påverkas, då separationsmekanismen inte enbart är beroende av hydrofobicitet utan även joninteraktioner [22]. För att påverka analyternas retentionstid, samt säkerhetsställa att all analyt eluerat, kan salt tillsättas till mobilfasen. När salt tillsätts kommer jonerna konkurrera med analyterna om att interagera med stationärfasen och medföra att analyterna eluerar snabbare.

3 Metod

I detta avsnitt presenteras tillvägagångssätten för projektets laborativa delar samt gradienter. Först introduceras de substanser som analyserats, varpå provberedningen av dessa presenteras. Därefter visas metoden för beredning av de mobilfaser som använts under analyserna. Till sist presenteras exempel på hur gradienter utformats för analyserna. Hur kromatografidataprogrammet användes finns i bilaga A.

3.1 Utvalda substanser för analys

Sju substanser lösta i metanol har tillhandahållits av AZ. Substanserna är utvalda utefter att de representerar olika ämnesklasser, olika funktionella grupper och molekylstrukturer och är vanliga inom farmaceutisk metodutveckling hos AZ (Personlig kommunikation JO Svensson 2022-04-08). Substanserna presenteras i tabell 1 tillsammans med några av deras fysikalisk-kemiska data.

Tabell 1: Fysikalisk-kemiska data för studerade substanser

Substans	Molmassa [g/mol]	pKa	logP _{oct}	Potentiell laddning
Alprenololhydroklorid	285,81	9,67	2,69	+1
Atenolol	266,34	9,67	0,57	+1
Budesonid	430,55	-2,90	2,73	0
Formoterol fumarat dihydrat	804,90	9,81	1,06	+1
Metoprololsuccinat	652,82	9,67	1,76	+1
Propranololhydroklorid	295,81	9,67	3,03	+1
Salbutamolsulfat	576,70	9,40	0,44	+1

Substanserna förkortas härnäst enligt: Alprenolol, Atenolol, Budesonid, Formoterol, Metoprolol, Propranolol och Salbutamol. Molekylstrukturer för substanserna finnes i bilaga B.

3.2 Förberedande laborativt arbete

3.2.1 Beredning av 1 mM substanser i vialer

Stamlösningar av de sju substanserna lösta i metanol med koncentrationen 1 mg/ml tillhandahålls av AZ. Dessa önskades därefter spädas i 1,5 ml-vialer till koncentrationen 1 mM. Beräkningsgång för detta finnes i bilaga C.

De resulterande provspädningarna presenteras i tabell 2 där respektive molekylvikt samt den molära koncentrationen för respektive substans i stamlösningarna visas. I tabellen visas även den volym av respektive stamlösning som användes samt den volym metanol som tillsattes för spädning till 1 mM.

Tabell 2: Provspädning av substanser till 1 mM

Substans	Molmassa [g/mol]	c ₁ [mM]	V ₁ [μl]	V _{metanol} [μl]
Alprenolol	285,81	3,50	428,8	1071,2
Atenolol	266,34	3,75	399,6	1100,4
Budesonid	430,55	2,32	645,8	854,2
Formoterol	804,90	1,24	1207,4	292,7
Metoprolol	652,82	1,53	979,2	520,8
Propranolol	295,81	3,38	443,6	1056,2
Salbutamol	576,70	1,73	865,0	635,0

3.2.2 Beredning av mobilfaser

Vid beredning av varje mobilfas gjordes två olika lösningar i separata kärl, fas A och fas B. I kromatogrammen benämns däremot fas B som "C", och fas A utgör resterande mängd, detta beror på att kanalerna var kopplade som så i systemet. Faserna blandades i pumpen innan de pumpas in i kolonnen. Fördelningen mellan hur mycket fas A respektive fas B som pumpas in till kolonnen berodde på utformningen av pumpgradienten, vilken förklaras mer ingående i avsnitt B.2 Gradienter. Beräkningar av koncentrationer under mobilfasberedning finns i bilaga C.

pH uppmättes i buffertfasen, det vill säga i den delen av lösningen som bestod av syra eller bas och Milli-Q-vatten innan eventuellt organiskt lösningsmedel tillsattes.

Tre varianter av salthalt hos mobilfasen har använts och är följande: utan salt, saltgradient samt konstant saltkoncentration. Den första varianten innebär att inget extra salt har tillsatts till mobilfasen, och att den initiala jonstyrkan hos mobilfasen inte har ökat. Den andra varianten innebär att fas B innehåller en tillsatt av 70 mM NaCl för pH i intervallet 1,9-4. Den tredje varianten innebär att fas A och fas B har en konstant saltkoncentration på 70 mM NaCl för pH-intervallet 1,9-4 respektive 70 mM NH₄Ac för pH 6,2.

3.2.2.1 Mobilfas med buffertsystem vid pH 1,9 och 2,3

Fas A – Milli-Q-vatten

Fas B – H₃PO₄ med 70 volym% MeCN

Fas B beredd genom att fosforsyra adderades till 300 ml Milli-Q-vatten tills det att önskat pH uppnåddes, därefter adderades 700 ml MeCN. I tabellerna 3 och 4 presenteras sammansättningen av mobilfasen vars buffert har pH 1,9 respektive 2,3.

Tabell 3: Sammansättning av mobilfas innehållande buffertlösning med pH 1,9 utan tillsatt salt, med saltgradient samt med konstant saltkoncentration.

pH ¹	V _{Milli-Q} ² [ml]	V _{H₃PO₄} ² [μl]	c _{H₃PO₄} ² [mM]	V _{MeCN} ² [ml]	NaCl
1,9	300	620	10	700	-
1,9	300	620	10	700	Fas B: 4,09g / 70 mM
1,9	300	620	10	700	Fas B: 4,09g / 70 mM Fas A: 4,09g / 70 mM

¹ i buffert

² i fas B

Tabell 4: Sammansättning av mobilfas innehållande buffertlösning med pH 2,3 utan tillsatt salt, med saltgradient samt med konstant saltkoncentration.

pH ¹	V _{Milli-Q} ² [ml]	V _{H₃PO₄} ² [μl]	c _{H₃PO₄} ² [mM]	V _{MeCN} ² [ml]	NaCl
2,3	300	150	2,42	700	-
2,3	300	150	2,42	700	Fas B: 4,29g / 73 mM
2,3	300	150	2,42	700	Fas B: 4,29g / 73 mM Fas A: 4,29g / 73 mM

¹ i buffert

² i fas B

3.2.2.2 Mobilfas med buffertsystem vid pH 4

Fas A: Milli-Q-vatten

Fas B: Natriumacetat och isättiksyra med 70 volym% MeCN

Fas B bereddes genom att NaAc och isättiksyra löstes i Milli-Q-vatten tills pH 4 uppnåddes. I tabell 5 visas sammansättningen av mobilfasen vars buffert har pH 4.

Tabell 5: Sammansättning av mobilfas innehållande buffertlösning med pH 4 utan tillsatt salt, med saltgradient samt med konstant saltkoncentration.

pH ¹	m _{NaAc} ² [g]	c _{NaAc} ² [mM]	V _{HAc} ² [ml]	V _{Milli-Q} ² [ml]	V _{milli-Q} ² [ml]	NaAc
3,8	6,8	0,56	13	700	300	-
4,2	6,8	0,56	13	700	300	Fas B: 5,18g / 63,2 mM
4,2	6,8	0,56	13	700	300	Fas B: 5,18g / 63,2 mM Fas A: 5,74g / 70 mM

¹ i buffert

² i fas B

3.2.2.3 Mobilfas med buffertsystem vid pH 6

Fas A - 70 mM NH₄Ac

Fas B - 70 mM NH₄Ac med 50 volym% MeCN

Fas A bereddes genom att Milli-Q-vatten tillsattes till en uppvägd mängd NH₄Ac och fas B bereddes genom att MeCN tillsattes till en lösning av NH₄Ac och Milli-Q-vatten. Beräkningsgång för uträkning av tillsatt massa NH₄Ac finnes i bilaga C. I tabell 6 visas sammansättningen av mobilfasen vars buffert har pH 6,2.

Tabell 6: Sammansättning av mobilfas innehållande buffertlösning med pH 6,2 med konstant saltkoncentration.

pH ¹	c _{NH₄Ac} ¹ [mM]	m _{NH₄Ac} ¹ [g]	V _{Milli-Q} ² [ml]	V _{milli-Q} ³ [ml]	V _{MeCN} ³ [ml]
6,2	70	5,4	1000	500	500

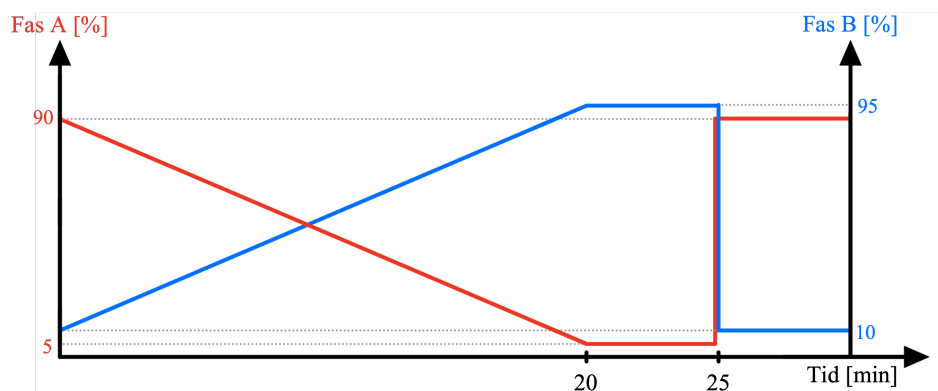
¹ i båda faserna

² i fas A

³ i fas B

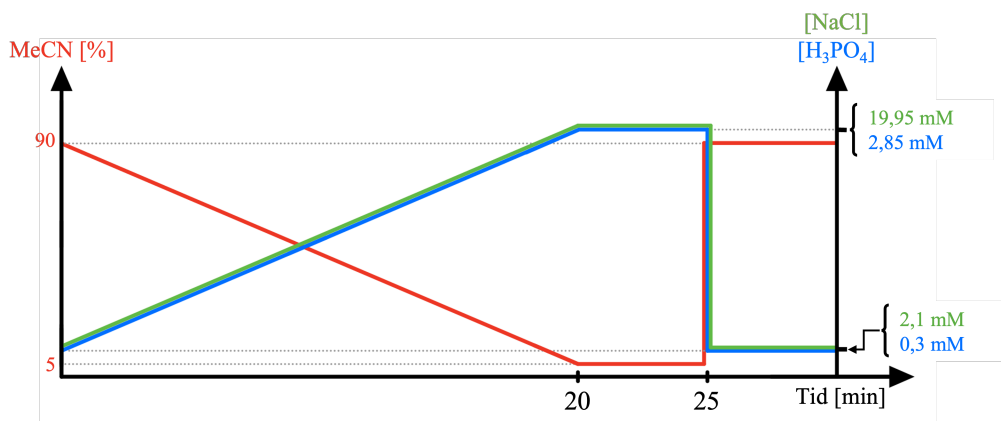
3.2.3 Gradienter

I detta projekt användes två pumpgradients varav den ena visas i figur 9 medan den andra återfinns i bilaga B. Pumpgradienten var utformad med en initialfördelning med 90 volym-% fas A och 10 volym-% fas B följt av en linjär ökning till 95 volym-% av fas B under 20 minuter. Det följs av en plåtå i 5 minuter med konstant volym-% av båda faserna, för att därefter direkt återgå till initialfördelningen. Den beskrivna gradienten benämns "20-5", den andra pumpgradienten benämns "15-5" då dess linjära ökning varar i 15 istället för 20 minuter. För pumpgradienten 20-5 användes en jämviktstid på 5 minuter, vilket är den tid som följer efter återgång till initialfördelningen. För pumpgradienten 15-5 är jämviktstiden istället 10 minuter.



Figur 9: Pumpgradient 20-5 som visar hur stor andel av fas A och fas B som används vid analyser.

I figur 10 visas hur koncentrationen, av ingående komponenter i mobilfasen, förändras med pumpgradienten. Det vill säga hur kvoten mellan fas A och fas B förändrar koncentrationen under analysens gång.



Figur 10: Koncentrationsgradient för mobilfas innehållande buffertlösning med pH 1,9 och salt i fas B, vid pumpgradient 20-5.

4 Resultat

I detta avsnitt presenteras resultaten från analyserna som gjorts. Resultaten presenteras med hjälp av underkategorierna mobilfassammansättning, flödes hastighet, gradient och repeterbarhet där resultaten utvärderas utifrån följande parametrar; toppsymmetri, retentionstid och selektivitet. De resultat som presenteras är de som anses vara mest lovande och framgångsrika. Övriga resultat i form av kromatogram finns i bilaga B.3.

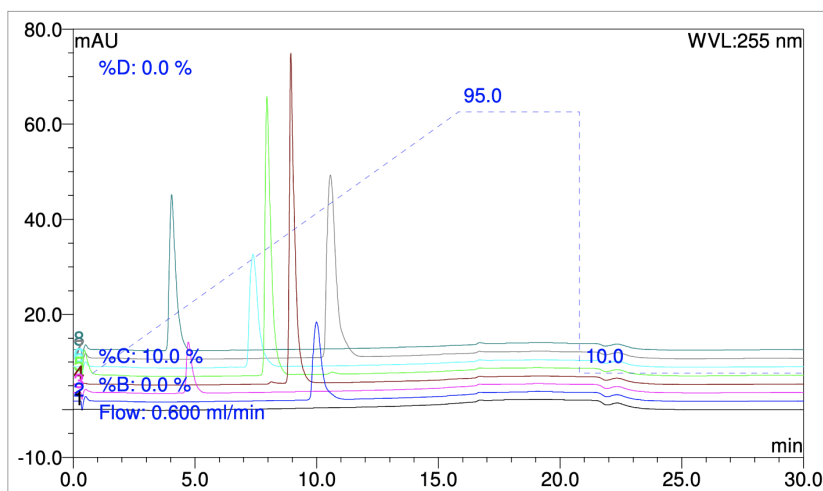
Vid samtliga analyser, exkluderat utvärderingen av repeterbarhet, har analyterna injicerats separat och detekterats med våglängden 255 nm. Samtliga substanser har haft injektionsvolymen 5 μl förutom där det har specificerats annorlunda i form av fotnoter.

4.1 Mobilfassammansättning

Samtliga analyser har gjorts i pH-intervallet 1,9–6,2; ett intervall där jonsbytesmekanismen hos den undersökta kolonnen, *Coresep 100*, förväntas variera i styrka. Mobilfasen har vid de lägre pH-värdena även undersökts med hög respektive låg jonstyrka. De salt som användes var NaCl för pH 1,9 och 2,3, NaAc samt NaCl för pH 4 och NH_4Ac för pH 6,2. Vid pH 6,2 har analyser endast gjorts med konstant saltkoncentration i båda faserna. I kommande avsnitt presenteras resultaten från respektive pH och slutligen kommer en kort sammanställning.

4.1.1 Buffertsystem vid pH 1,9

Analys för pH 1,9 visas i figur 11. Figuren visar ett kromatogram där analysen är gjord med flödes hastigheten 0,6 ml/min och pumpgradienten 15-5 följt av 10 minuters jämviktstid. Endast fas B innehåller 70 mM NaCl.



Figur 11: Kromatogram som visar analyterna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Metoprolol, Formoterol¹, Budesonid², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödes hastigheten 0,6 ml/min, pumpgradienten 15-5 och med saltgradient med fas B innehållande 70 mM NaCl. Notera toppen för Atenolol, som skymts bakom texten i kromatogrammet, samt att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,5 μl

²Injektionsvolym: 0,25 μl

Vid denna analys varierade analyternas retentionstider mellan 4,0-10,6 minuter. Kromatogrammet i figur 11 uppvisar nästintill fullgod separation av analyterna, med delvis sameluering mellan Salbutamol och Atenolol i början av kromatogrammet samt mellan Metoprolol och Formoterol kring 7 minuter in i analysen. Från figuren syns det att samtliga toppar uppvisar på olika grad av *tailing* men det är mest utmärkande för Propanolol, Alprenolol och Metoprolol. Analysdata från figuren presenteras i tabell 7.

Tabell 7: Analysdata för pH 1,9 med flödes hastigheten 0,6 ml/min, pumpgradienten 15-5, och 70 mM NaCl i fas B. Data som presenteras är retentionstid, retentionsfaktor, asymmetrifaktor och selektivitet för respektive analyt.

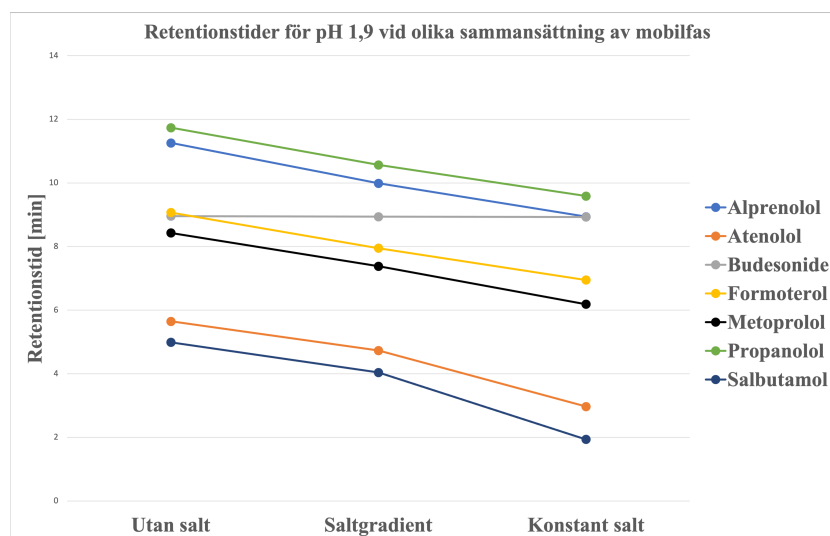
Analyt	Retentionstid [min]	Retentionsfaktor	Asymmetri	Selektivitet
	t_R	k	A_s	$\alpha_{n,n+1}$
Salbutamol	4,04	10,22	1,95	1,19
Atenolol	4,73	12,14	2,15	1,61
Metoprolol	7,38	19,50	1,86	1,08
Formoterol ¹	7,95	21,08	2,2	1,13
Budesonid ²	8,94	23,83	2,29	1,12
Alprenolol	9,99	26,75	1,91	1,06
Propanolol	10,57	28,36	2,02	—

¹ Injektionsvolym: 0,5 μ l

² Injektionsvolym: 0,25 μ l

Asymmetrifaktorerna från tabellen är för alla analyter över 1,5 vilket innebär dålig symmetri. Det går även att se att retentionsfaktorerna varierar mellan 10,22 och 28,36.

I figur 12 illustreras hur retentionstiderna för analyterna förändras med olika jonstyrka hos mobilfasen vid pH 1,9. Det som visas är resultatet av tre skilda analyser där mobilfasen bytts ut mellan varje analys. Flödes hastigheten var 0,6 ml/min och pumpgradienten 15-5 för alla tre analyser.



Figur 12: Graf som visar analyternas^{1 2} retentionstider mot mobilfasset sammansättningen med avseende på salt. Vid pH 1,9, med flödes hastigheten 0,6 ml/min och pumpgradienten 15-5.

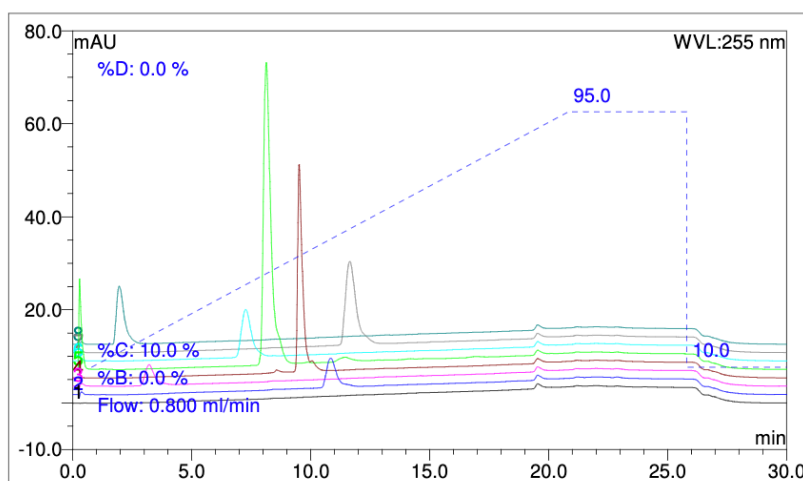
¹Injektionsvolym Formoterol: 0,5 μ l

²Injektionsvolym Budesonid: 0,25 μ l

Figur 12 visar att retentionstiderna är som kortast vid konstant saltkoncentration. Skillnaden i retentionstid mellan saltgradient och konstant saltkoncentration är större för Atenolol och Salbutamol jämfört med resterande analyter. Notera att Budesonid bibehåller samma retentionstid oavsett jonstyrka i mobilfasen.

4.1.2 Buffertsystem vid pH 2,3

Analys för pH 2,3 visas i figur 13. Figuren visar ett kromatogram där analysen är gjord med flödes hastigheten 0,8 ml/min och pumpgradienten 20-5 följt av 5 minuters jämviktstid. Både fas A och fas B innehåller 70 mM NaCl.



Figur 13: Kromatogram som visar analyterna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Metoprolol, Formoterol¹, Budesonid², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödes hastigheten 0,8 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med konstant saltkoncentration på 70 mM NaCl. Notera toppen för Atenolol, som skymts bakom texten i kromatogrammet, samt att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,5 μ l

²Injektionsvolym: 0,25 μ l

I figur 13 syns det att retentionstiderna varierar mellan 1,9-11,7 minuter. Samtliga toppar i figuren uppvisar *tailing*. Analysen uppvisar lovande separation, då topparna inte överlappar varandra särskilt mycket. Analysdata från figuren presenteras i tabell 8.

Tabell 8: Analysdata för pH 2,3 med flödes hastigheten 0,8 ml/min, pumpgradienten 20-5, och 70 mM NaCl i både fas A och fas B. Data som presenteras är retentionstid, retentionsfaktor, asymmetrifaktor och selektivitet för respektive analyt.

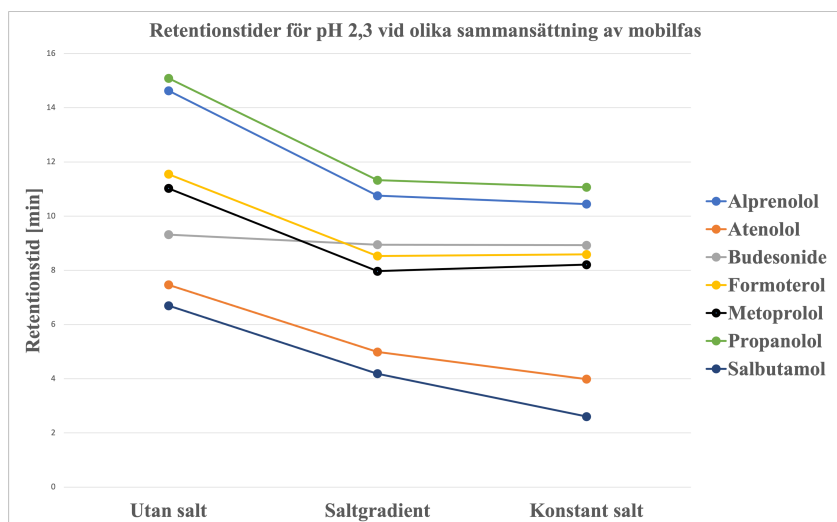
Analyt	Retentionstid [min]	Retentionsfaktor	Asymmetri	Selektivitet
	t_R	k	A_s	$\alpha_{n,n+1}$
Salbutamol	1,96	4,44	1,86	1,78
Atenolol	3,21	7,92	1,60	2,42
Metoprolol	7,27	19,19	1,48	1,12
Formoterol ¹	8,13	21,58	1,96	1,18
Budesonid ²	9,51	25,42	2,21	1,15
Alprenolol	10,85	29,14	1,7	1,08
Propanolol	11,65	31,36	1,73	—

¹ Injektionsvolym: 0,5 μ l

² Injektionsvolym: 0,25 μ l

Tabell 8 visar att asymmetrifaktorn är över 1,2 för samtliga analyter, vilket innebär att fullt symmetriska toppar ej uppnåtts. Utöver asymmetrin framgår det att selektiviteten varierar mellan 1,08 och 2,42, vilket tyder på god separation.

I figur 14 illustreras hur retentionstiderna för analyterna förändras med olika jonstyrka i mobilfasen vid pH 2,3. Det som visas är resultatet av tre skilda analyser där mobilfasen bytts ut mellan varje analys, med flödes hastigheten 0,6 ml/min och pumpgradienten 15-5.



Figur 14: Graf som visar analyternas^{1 2} retentionstider mot mobilfassoc sammansättningen med avseende på salt. Vid pH 2,3, med flödes hastigheten 0,6 ml/min och pumpgradienten 15-5.

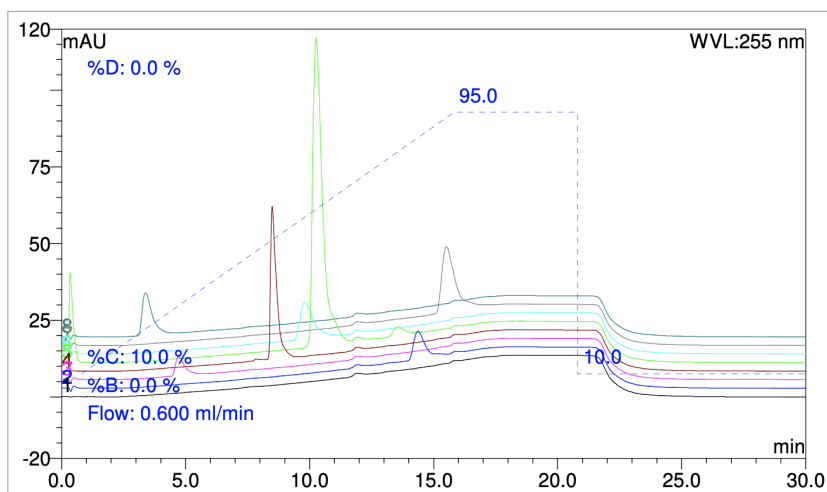
¹Injektionsvolym Formoterol: 0,5 μ l

²Injektionsvolym Budesonid: 0,25 μ l

Från figur 14 framgår det att retentionstiderna sjunker när en saltgradient tillämpas gentemot fallet utan salt. Metoprolol samt Formoterol får något längre retentionstider när konstant saltkoncentration används medan övriga analyter får något kortare retentionstider. Utöver dessa observationer syns det att Budesonids retentionstider inte påverkas nämnvärt av de tre saltkonfigurationerna, utan bibehåller en relativt konstant retentionstid.

4.1.3 Buffertsystem vid pH 4

Analys för pH 4,2 visas i figur 15. Figuren visar ett kromatogram där analysen är gjord med flödes hastigheten 0,6 ml/min och pumpgradienten 15-5 följt av 10 minuters jämviktstid. Både fas A och fas B innehåller 70 mM NaCl.



Figur 15: Kromatogram som visar analyterna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Budesonid¹, Metoprolol, Formoterol², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödes hastigheten 0,6 ml/min, pumpgradienten 15-5 och med konstant saltkoncentration på 70 mM NaCl. Notera toppen för Atenolol, som skymms bakom texten i kromatogrammet, samt att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,25 μ l

²Injektionsvolym: 0,5 μ l

I figur 15 syns det att retentionstiderna varierar mellan 3,4-15,5 minuter. De flesta topparna uppvisar *tailing*. Det syns även att Metoprolol och Budesonid överlappar i stor utsträckning.

Det kan även observeras att denna analys ger bakgrundsbrus, i form av att baslinjerna lutar. Data från figur 15 presenteras i tabell 9.

Tabell 9: Analysdata för pH 4,2 med flödes hastigheten 0,6 ml/min, pumpgradienten 15-5, och 70 mM NaCl i både fas A och fas B. Data som presenteras är retentionstid, retentionsfaktor, asymmetrifaktor och selektivitet för respektive analyt.

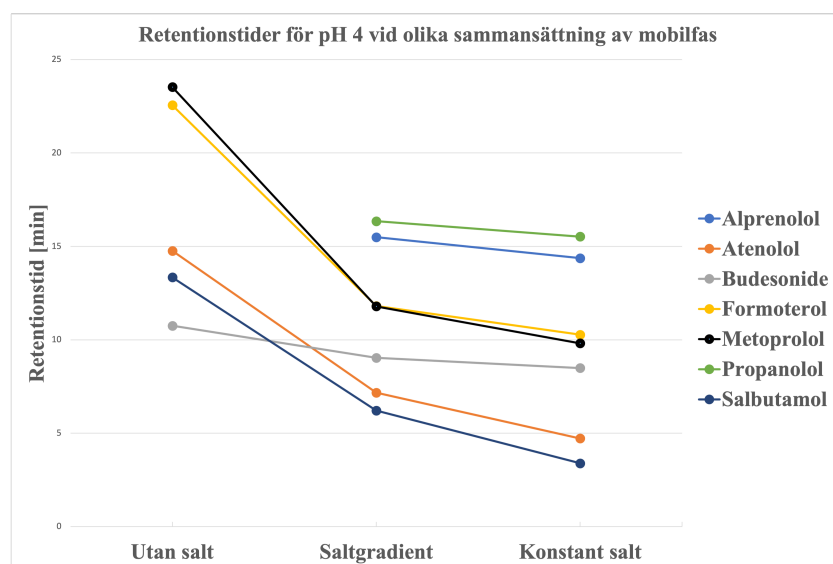
Analyt	Retentionstid [min]	Retentionsfaktor	Asymmetri	Selektivitet
	t_R	k	A_s	$\alpha_{n,n+1}$
Salbutamol	3,39	8,16	2,25	1,44
Atenolol	4,72	11,76	2,23	1,87
Budesonid ¹	8,49	21,95	2,51	1,16
Metoprolol	9,81	25,51	2,32	1,05
Formoterol ²	10,27	26,76	2,28	1,41
Alprenolol	14,37	37,84	1,49	1,08
Propanolol	15,52	40,95	2,32	—

¹ Injektionsvolym: 0,25 μ l

² Injektionsvolym: 0,5 μ l

Asymmetrifaktorerna i tabell 9 visar på att topparna inte är fullt symmetriska, då alla värden är över 1,2. Det syns i kromatogrammet i figur 15 att alla toppar uppvisar varierande grad av *tailing*. Retentionsfaktorerna är för flera av analyterna höga, vilket förklarar de längre retentionstiderna. Selektiviteten varierar mellan 1,05 till 1,87 där de högre värdena är bättre, eftersom det innebär god separation.

I figur 16 illustreras hur retentionstiderna för analyterna förändras med olika jonstyrka i mobilfasen vid pH 4. Det som visas är resultatet av tre skilda analyser där mobilfasen bytts ut mellan varje analys, med flödes hastigheten 0,6 ml/min och pumpgradienten 15-5.



Figur 16: Graf som visar analyternas^{1 2} retentionstider mot mobilfassoc sammansättningen med avseende på salt. Vid pH 4, med flödes hastigheten 0,6 ml/min och pumpgradienten 15-5. Alprenolol och Propanolol saknas vid analys utan salt, då eluering av dessa uteblivit vid denna jonstyrka.

¹Injektionsvolym Formoterol: 0,5 μ l

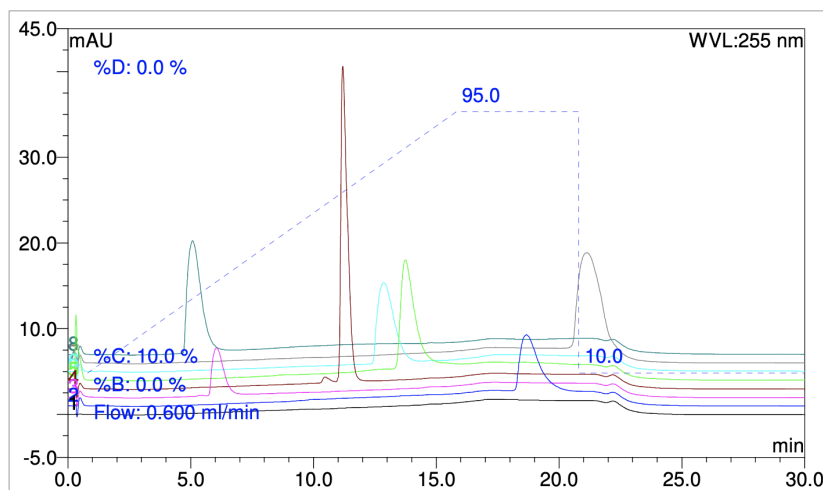
²Injektionsvolym Budesonid: 0,25 μ l

I figur 16 är det möjligt att se hur retentionstiden blir kortare för samtliga analyter när mobilfasen innehåller salt, först som saltgradient och sedan vid konstant saltkoncentration. Även om retentionstiderna blir kortare, förhåller sig de flesta analyter till varandra på ett liknande

sätt. Vid saltgradienten sameluerar dock Formoterol och Metoprolol, vilket framgår av att deras retentionstider är densamma. Det är även synligt att Budesonid påverkas minst av analyterna vid ökad saltkoncentration.

4.1.4 Buffersystem vid pH 6,2

Vid pH 6,2 har analyser enbart gjorts med konstant saltkoncentration i mobilfasen, 70 mM NH₄Ac i både fas A och fas B. Analys vid pH 6,2 med flödes hastigheten 0,6 ml/min och pumpgradienten 15-5 presenteras i figur 17 och i tabell 10.



Figur 17: Kromatogram som visar analyterna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Budesonid¹, Metoprolol, Formoterol², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödes hastigheten 0,6 ml/min, pumpgradienten 15-5 och med konstant saltkoncentration om 70 mM NH₄Ac i fas A och fas B. Notera att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,25 µl

²Injektionsvolym: 0,5 µl

I figur 17 syns det att retentionstiderna varierar mellan 5,1-21,1 minuter. Samtliga toppar uppvisar *tailing*. Det syns även i figuren att Salbutamol och Atenolol överlappar till viss del, samt att Metoprolol och Formoterol överlappar något. Utöver dessa överlapp uppvisar analysen lovande selektivitet, vilket stärks med data från tabell 10.

Tabell 10: Analysdata för pH 6,2 med flödes hastigheten 0,6 ml/min, pumpgradienten 15-5, och 70 mM NH₄Ac i fas A och fas B.

Analyt	Retentionstid [min]	Retentionsfaktor	Asymmetri	Selektivitet
	t_R	k	A_s	$\alpha_{n,n+1}$
Salbutamol	5,08	12,73	1,81	1,21
Atenolol	6,05	15,35	1,74	1,90
Budesonid ²	11,19	29,24	2,04	1,15
Metoprolol	12,85	33,74	1,78	1,07
Formoterol ¹	13,75	36,16	2,21	1,37
Alprenolol	18,67	49,46	2,12	1,13
Propanolol	21,13	56,11	1,44	—

¹ Injektionsvolym: 0,5 µl

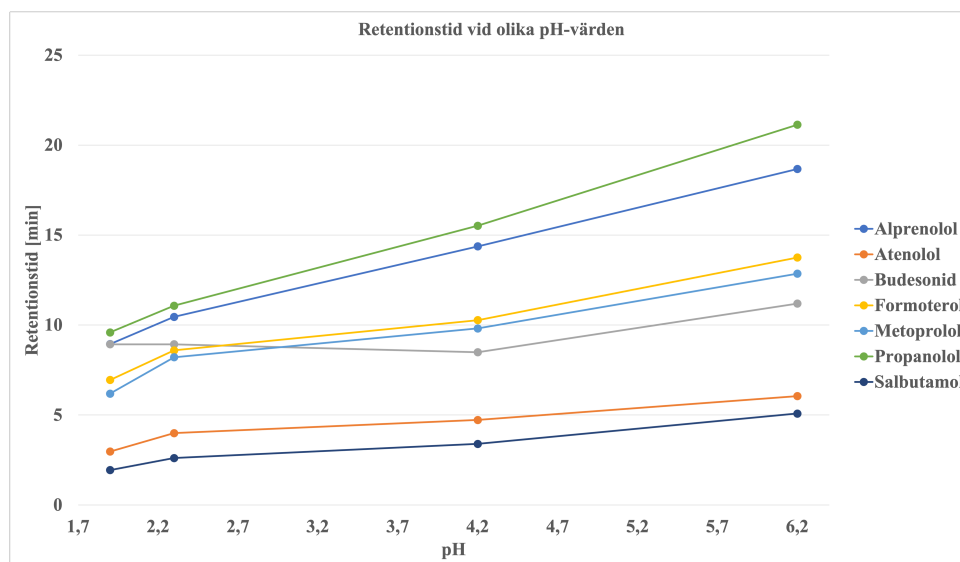
² Injektionsvolym: 0,25 µl

Från tabell 10 framgår det att retentionsfaktorerna för de senare eluerade analyterna är mellan 30-50. För Salbutamol och Atenolol är retentionsfaktorerna lägre och således är även deras retentionstiderna kortare. Asymmetrifaktorn för samtliga analyter är över 1,2 och analyternas toppar är inte fullt symmetriska. Selektivitetsfaktorn är för samtliga analyter, med undantag

från Metoprolol, över 1,1 vilket tyder på god selektivitet. Metoprolols selektivitetsfaktor är precis under 1,1 vilket tyder på att den inte är fullt separerad i förhållande till Formoterol.

4.1.5 Sammanfattande pH-jämförelse

I figur 18, visas en graf över retentionstiderna vid de olika pH-värdena vid flödes hastigheten 0,6 ml/min, pumpgradienten 15-5 och konstant saltkoncentration .



Figur 18: Graf som visar analyternas^{1 2} retentionstider mot mobilfassammansättningen med avseende på pH i buffert. Med flödes hastigheten 0,6 ml/min, pumpgradienten 15-5 och konstant saltkoncentration.

¹Injektionsvolym Formoterol: 0,5 μ l

²Injektionsvolym Budesonid: 0,25 μ l

Det framgår i figuren att för ökat pH ökar retentionstiderna för samtliga analyter förutom Budesonid mellan pH 1,9 och 4. De analyter som visar på störst ökning i retentionstid mellan pH 2,3 och 6,2 är Alprenolol och Propanolol. Observera att sammansättningen av fas B är 70 volym% MeCN vid alla pH-värdena förutom 6,2 där det är 50 volym% MeCN till följd av löslighetsproblem.

4.2 Flödes hastighet

Förutom att undersöka analyser vid olika pH har även olika flödes hastigheter på mobilfasen undersökts experimentellt för samtliga analyser. Flödes hastigheterna som undersökts var 0,6 och 0,8 ml/min, där jämförelser av retentionstid och asymmetri gjordes. Data för jämförelser är tagna från analyser med pumpgradienten 20-5 och vid konstant saltkoncentration. Analysdata vid pH 1,9 presenteras i tabell 11.

Tabell 11: Analysdata för jämförelse vid pH 1,9 med flödeshastigheterna 0,6 ml/min och 0,8 ml/min, pumpgradienten 20-5, och 70 mM NaCl i fas A och fas B.

Analyt	Retentionstid ¹	Retentionstid ²	Asymmetri ¹	Asymmetri ²
	t_R	t_R	A_s	A_s
Salbutamol	1,96	1,53	1,51	1,49
Atenolol	3,03	2,37	2,18	2,23
Metoprolol	6,91	5,85	2,03	2,05
Formoterol ³	7,93	6,87	2,21	2,15
Alprenolol	10,45	9,22	2,03	2,10
Budesonid ⁴	10,58	9,53	2,76	2,43
Propranolol	11,33	10,11	2,09	2,16

¹ Flödeshastighet: 0,6 ml/min

² Flödeshastighet: 0,8 ml/min

³ Injektionsvolym: 0,5 μ l

⁴ Injektionsvolym: 0,25 μ l

Tabell 11 visar att retentionstiderna minskar med ökad flödeshastighet för samtliga analyter, dock varierar förändringen i asymmetri. För Salbutamol, Formoterol och Budesonid minskar asymmetrin vid ökad flödeshastighet men för resterande analyter ökar asymmetrin.

Analysdata vid jämförelse av de två flödeshastigheterna 0,6 och 0,8 ml/min vid pH 6,2 visas i tabell 12.

Tabell 12: Analysdata för jämförelse vid pH 6,2 med flödeshastigheterna 0,6 ml/min och 0,8 ml/min, pumpgradienten 20-5, och 70 mM NH₄Ac i fas A och fas B.

Analyt	Retentionstid ¹	Retentionstid ²	Asymmetri ¹	Asymmetri ²
	t_R	t_R	A_s	A_s
Salbutamol	5,79	4,22	1,88	2,34
Atenolol	7,50	5,82	1,92	2,16
Budesonid ³	13,43	11,93	2,06	2,24
Metoprolol	15,52	13,05	1,89	2,12
Formoterol ⁴	16,83	14,41	2,23	2,47
Alprenolol	22,99	20,49	2,17	2,20
Propranolol	25,12	21,91	1,95	2,40

¹ Flödeshastighet: 0,6 ml/min

² Flödeshastighet: 0,8 ml/min

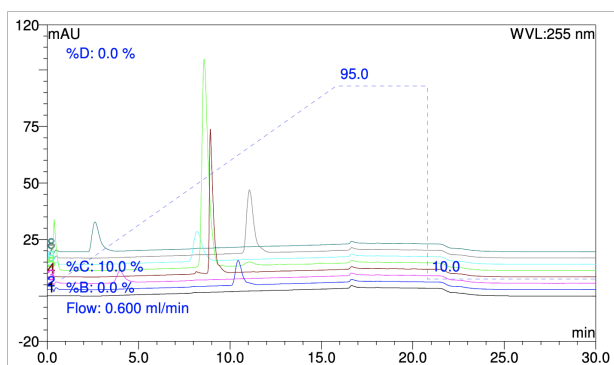
³ Injektionsvolym: 0,25 μ l

⁴ Injektionsvolym: 0,50 μ l

Det framgår att vid ökad flödeshastighet minskar retentionstiderna för samtliga analyter, däremot ökar asymmetrin för samtliga analyter. En ökning av flödeshastighet resulterar således i kortare retentionstider, men även sämre toppsymmetri vid detta pH-värde.

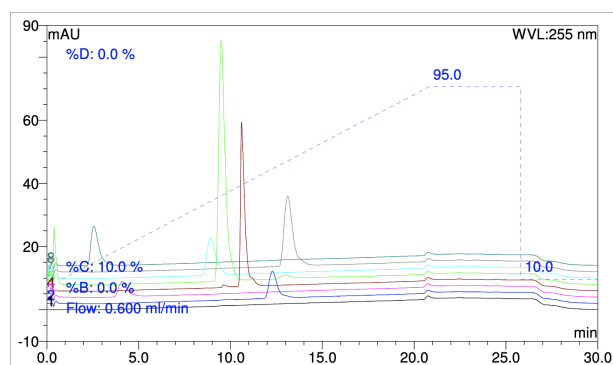
4.3 Gradient

I figurerna 19 och 20 presenteras två analyser vid pH 2,3 med konstant saltkoncentration i mobilfasen, flödeshastigheten 0,6 ml/min men med två olika gradienter för att illustrera skillnaderna som uppstår när pumpgradienten förändras.



Figur 19: Kromatogram som visar analyterna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Metoprolol, Formoterol¹, Budesonid², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödes hastigheten 0,6 ml/min, pumpgradienten 15-5 och med konstant saltkoncentration om 70 mM NaCl i fas A och fas B. Notera toppen för Atenolol, som skyms bakom texten i kromatogrammet, samt att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,5 μ l
²Injektionsvolym: 0,25 μ l



Figur 20: Kromatogram som visar analyterna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Metoprolol, Formoterol¹, Budesonid², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödes hastigheten 0,6 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med konstant saltkoncentration om 70 mM NaCl i fas A och fas B. Notera toppen för Atenolol, som skyms bakom texten i kromatogrammet, samt att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,5 μ l
²Injektionsvolym: 0,25 μ l

Figur 19 visar en analys med pumpgradient 15-5 som ger upphov till dålig selektivitet och mycket sameluering mellan Budesonid, Formoterol och Metoprolol. Retentionstiderna är relativt korta då analysen är runt 12 minuter, avläst ur kromatogrammet.

I figur 20 visas en analys med pumpgradient 20-5, där den linjära ökningen innan platån är 5 minuter längre än i figur 19. Vid denna analys ses det att selektiviteten ökat för Budesonid, Formoterol och Metoprolol, dock sameluerar de fortfarande till viss grad. Analystiden för denna analys är ungefär 14 minuter, avläst från kromatogrammet.

4.3.1 Sammanfattande jämförelse av flödes hastighet och gradient

Vid jämförelse av olika flödes hastigheter kan det konstateras att retentionstiderna minskade vid ökad flödes hastighet oberoende pH. Vad gäller asymmetrin så varierar förändringen för denna vid ökad flödes hastighet.

Jämförelsen av olika pumpgradients visar att selektiviteten ökar när tiden för den linjära ökningen i pumpgradienten förlängs, vilket ger upphov till mindre sameluering. Vid den längre pumpgradienten blir analystiden längre, vilket kan förväntas.

4.4 Repeterbarhet

Vid varje pH har repeatabiliteten hos kolonnen undersökts. För att utvärdera repeatabiliteten i kolonnen har en lösning med analyterna Budesonid, Formoterol, Propanolol och Salbutamol injicerats som ett prov istället för enskilda injektioner. Repeterbarheten har testats vid konstant saltkoncentration. Tabell 13 visar repeatabiliteten vid pH 1,9. Kromatogram som visar repeatabilitet vid pH 2,3 och 4 återfinns i bilaga B.

Tabell 13: Analysdata för repeterbarhet. Blandning av analyter (Budesonid, Formoterol, Propanolol, Salbutamol) vid pH 1,9 med flödes hastigheten 0,8 ml/min och pumpgradienten 20-5. Båda faserna innehåller 70 mM NaCl.

Injektion	Retentionstid¹ <i>t_R</i> [min]	Retentionstid² <i>t_R</i> [min]	Retentionstid³ <i>t_R</i> [min]	Retentionstid⁴ <i>t_R</i> [min]
1	1,49	6,95	9,54	10,11
2	1,49	6,95	9,54	10,12
3	1,50	6,95	9,54	10,13
4	1,50	6,95	9,54	10,13
5	1,51	6,95	9,54	10,14
6	1,51	6,96	9,55	10,15

¹ Salbutamol

² Formoterol

³ Budesonid

⁴ Propanolol

I tabell 13 syns att kolonnen uppvisar god repeterbarhet. Detta ses då retentionstiden avviker lite eller inget vid varje injektion. Den största avvikelserna är för Salbutamol som har en skillnad på 1,3% mellan injektion 1 och injektion 6. I tabellen syns även att retentionstiden blir gradvis längre för varje injektion för både Salbutamol och Propanolol. För de andra två analyterna är retentionstiden den samma för alla injektioner förutom den sista.

5 Diskussion

I diskussionen kommer analyserna att tolkas utifrån tidigare presenterade resultat, med grund i utvärderingsparametrarna retentionstid, selektivitet och toppsymmetri. Kopplingar görs till grundproblemet som är att substanserna löses i metanol och utvärderingen av hur kolonnen förhåller sig till detta. Även repeterbarheten hos kolonnen utvärderas då det är en förutsättning för att kunna använda den kommersiellt.

Den analys, och således de parametrar, som uppvisar mest lovande separation på kortast möjliga tid är en analys vid pH 2,3. Vid denna analys användes en konstant saltkoncentration om 70 mM NaCl, pumpgradienten 20-5 och en flödes hastighet på 0,8 ml/min, vilket visas i figur 13. Analysen anses vara den mest lovande då analyterna i stort sett är fullständigt separerade inom loppet av 11,7 minuter, vilket anses vara en relativt kort analys jämfört med de analyser som gjordes vid högre pH. Dessvärre uppvisar samtliga toppar olika grad av *tailing*. Analysen vid pH 1,9 uppvisar bättre toppsymmetri men har sämre selektivitet än analysen vid pH 2,3 och anses därmed mindre lovande.

En potentiell förklaring till graden av *tailing* som förekommit vid samtliga analyser är mängden metanol som använts för att lösa analyterna i injektionsproverna. Som nämnt i bakgrunden kan metanol ge upphov till problem vid användning av en RP-kolonn och därav undersöktes MM-kolonnen, *Coresep 100*. De undersökta varianterna av mobilfassammansättning samt gradienter har delvis kringgått problematiken som metanolen ger upphov till, då en MM-kolonn använts. Fortsatt optimering av mobilfasen hade kunnat resultera i mer symmetriska toppar.

5.1 Mobilfassammansättning och jonstyrka

Mobilfasen har haft en central roll i utvärderingen av kolonnen, där det syns att jonstyrkan i mobilfasen har haft en stor påverkan på retentionstiderna och toppsymmetrin för analyterna. Retentionstiden blir kortare för samtliga analyter, förutom Budesonid, vid ökad saltkoncentration och minskat pH. Effekten av jonstyrka, i form av tillsatts av salt i mobilfasen, är störst vid pH kring 4 i jämförelse med analyserna gjorda vid lägre pH. Det framgår i figurerna 12, 14 samt 16 att lutningen är brantare mellan analyserna utan salt och saltgradient, ju högre pH analyserna är gjorda vid. Den mest troliga förklaringen är att jonbytesmekanismen är mer framträdande vid pH kring 4, och saltet konkurrerar då med analyterna om att interagera med de laddade funktionella grupperna i stationärfasen och bidrar således till en snabbare eluering av analyterna.

Effekten av salt är inte lika påtaglig vid pH 1,9, där förklaringen kan ligga i huruvida jonbytesmekanismen inte är lika framträdande eftersom de funktionella grupperna i kolonnens stationärfas har pK_a 2. Det medför att pH 1,9 bör ge en 50/50 deprotonering av de funktionella grupperna och således svagare jonbyteskaraktär än de högre pH-värdena. Det var med detta i åtanke analyserna gjordes vid pH 1,9 och 2,3; för att undersöka huruvida jonbytesmekanismen var delvis dämpad vid pH under kolonnens pK_a 2.

Jonbytesmekanismen förväntas vara stark även vid pH 6,2. Resonemanget styrks av resultaten från figur 18, eftersom retentionstiderna för de analyter med nettoladdning +1 blir mycket längre. Dessa längre retentionstider missgynnar en verklig tillämpning inom läkemedelsindustrin, då det önskas så korta retentionstider som möjligt. Exempelvis har Propanolol en retentionstid på 21,91 minuter vid analysen med pH 6,2 och pumpgradient 20-5, med flödes hastighet på 0,8 ml/min och 70 mM NH_4Ac i båda faserna. Vid jämförelse med analysen vid pH 2,3 med samma pumpgradient och flödes hastighet, är retentionstiden för samma analyt 11,65 minuter vilket är nästintill hälften så lång.

Budesonid följer inte samma trend som övriga analyter gällande förändring i retentionstid vid ökad jonstyrka samt lägre pH. Det visas i figurerna 12, 14 samt 16; och beror troligtvis på att Budesonids potentiella laddning är 0. Budesonids retentionstid ändras något mellan pH-värdena som undersökt, där skillnaden är som störst mellan pH 4,2 och 6,2. Värt att notera är att denna skillnad kan bero på att andelen organiskt lösningsmedel, MeCN, i buffersystemet är olika mellan dessa två analyserna.

I detta projekt har andelen organiskt lösningsmedel i fas B varit 70/30 vid låga pH-värden. För pH 6,2 har en annan andel MeCN, 50/50 MeCN/buffert, använts på grund av problem med löslighet av NH_4Ac . Löslighetsproblematiken beror framförallt på att NH_4Ac har en låg löslighet i MeCN. Det är önskvärt att ha så hög andel MeCN som möjligt, då tillsatsen av MeCN begränsar analyternas hydrofoba interaktioner med stationärfasen och således bidrar till kortare retentionstider för analyterna.

Skillnaden i sammansättning av mobilfasen med avseende på andelen MeCN kan vara en förklaring till att retentionstiderna för Atenolol och Salbutamol inte påverkas lika mycket som hos resterande substanser när pH går från 4,2 till 6,2. Dessa två analyter har de lägsta värdena på $\log P_{oct}$, fördelningskoefficienten mellan n-oktanol och vatten. Atenolol och Salbutamol hade värden på 0,57 respektive 0,44; vilket skulle kunna vara en förklaring till att de påverkas minst då de är mer hydrofila och således trivs mer i bufferten. Enligt detta resonemang förväntas Propanolol som har högst värde på $\log P_{oct}$ påverkas mest, vilket även visas i figur 18. Resterande analyter följer trenden med ökande retentionstid i förhållande till ett högre $\log P_{oct}$ -värde. Budesonid avviker dock från det förväntade utfallet sett till fördelningskonstanten, då den borde fått den tredje högsta retentionstidsökningen. Retentionstidsökningen som erhålls liknar istället en analyt med lägre $\log P_{oct}$ -värde. En möjlig förklaring till denna avvikelse kan vara att den är oladdad och därmed inte påverkas lika mycket som övriga analyter av jonbyteskaraktären. Det hela tyder på att det är mer än en faktor som avgör hur retentionstiderna varierar.

5.2 Pumpgradient och flödes hastighet

Pumpgradientens utformning har främst påverkat selektiviten i analyserna. Vid olika pH har olika pumpgradients visat sig vara mest gynnsamma. För pH 1,9 var 15-5 den mest optimala av de undersökta pumpgradienterna för att uppnå bäst selektivitet och kortast retentionstider, vilket visas i figur 11. Vid jämförandet av olika pumpgradients för pH 2,3 vid samma flödes hastighet, 0,6 ml/min, ses det att pumpgradienten 15-5 med en brantare linjär ökning ger upphov till mer sameluering. När den linjära ökningen förlängdes med 5 minuter, till pumpgradienten 20-5, ökade selektiviteten och således minskade samelueringen. Dessa förändringar kan kopplas till att vid pumpgradient 15-5 så ökar mängden MeCN snabbare gentemot vid pumpgradienten 20-5. Förändringen i retentionstiderna kan som tidigare nämnts kopplas till fördelningskoefficienten mellan n-oktanol och vatten. Då analyterna är relativt hydrofila medför det att en ökning av MeCN resulterar i att analyterna bör eluera snabbare.

5.3 Repeterbarhet

Repeaterbarheten hos kolonnen har överlag varit god då retentionstiden för analyserna i princip varit samma. Retentionstiden avvek som mest mellan den första och sista injektionen, som visas i tabell 13 där den även blev gradvis längre för både Salbutamol och Propanolol. Detta kan tyda på att jämviktningen av kolonnen inte har varit tillräcklig, och att en längre jämviktstid krävts för att kolonnen ska stabiliseras fullständigt. Att kolonnen visar på god repeaterbarhet är viktig eftersom resultaten önskas vara repeterbara vid en större mängd analyser.

5.4 Felkällor

Substanserna som användes under detta projekt visade på viss nedbrytning, vilket var speciellt tydligt för Formoterol där lösningen gick från ofärgad till gul. Även i kromatogrammen som erhållits gick det att se en trend med minskade toppareor, vilket troligtvis beror på att substanserna brutits ned. En förklaring var att proverna förvarades i en metanolösning i rumstemperatur istället för i kylskåp, vilket inte var möjligt, och stamlösningarna byttes därför ut i mitten av projektet. Nedbrytningen kan ha bidragit till mindre toppar, vilket syns i figurerna 13 och 15.

Under det laborativa arbetet användes en pH-meter som fluktuerade mellan olika pH-värden, där skillnaden kunde vara $\pm 0,4$ för lösningar med identisk sammansättning, även när den var kalibrerad. På grund av osäkerheten kring pH, kan det inte säkerställas hur stor del av kolonnens stationärfas, samt hur stor mängd av analyterna som varit protonerade respektive deprotonerade. För lösningar där pH-metern uppvisade skillnader för identisk sammansättning, antogs pH vara samma som det först uppmätta pH-värdet.

En ytterligare felkälla är att det förekommit en stor del laborativt arbete. Exempelvis har lösningar vägts och volymbestämts, vilket bidragit till att en mänsklig faktor spelat en viss roll. Då olika personer genomfört momenten i det laborativa arbetet har det varit upptill den enskilda individen hur noggrant de genomförts. Det moment som kan bidragit med störst osäkerhet var volymbestämming, då både mätkolv och mätglas använts och den senare visade sig vara mindre exakt när de två jämfördes.

5.5 Fortsatta studier

Effekten som andelen MeCN i mobilfasen hade på retentionstiderna kopplat till $\log P_{oct}$ upptäcktes först i en senare del av projektet. Den sena upptäckten tillsammans med tidsbrist ledde till att fler analyser kring dess effekter uteblev. Ett fortsatt arbete för att utvärdera denna aspekt är av intresse då det potentiellt kan vara en parameter som kan förbättra separationen, precis som tillsatsen av salt visade sig vara.

Budesonids retentionstid vid pH 2,3 är oberoende av jonstyrka i mobilfasen. Vid analyserna med pH 4 förändras dock Budesonids retentionstid, vilket inte förväntas för en oladdad analyt. Vad det kan bero på är okänt och kan vara ett skäl att analysen borde upprepas.

De oönskade interaktionerna som bland annat misstänks resultera i den *tailing* som setts hade minst effekt vid pH 1,9. Här hade det varit möjligt att göra fortsatta analyser och ändringar av parametrarna för att uppnå en bättre selektivitet samt bättre toppsymmetri. Det hade bland annat varit av intresse att prova högre saltkoncentrationer och annan utformning av pumpgradienten. Det hade även kunnat undersökas om en annan syra än fosforsyra hade påverkat och haft en mer gynnsam effekt på separationen.

I en fortsatt studie av kolonnen hade även jämviktstiden kunnat undersökas mer noggrant, i projektet har endast två olika jämviktstider använts, 5 och 10 minuter, varvid den kortare mest troligt hade kunnat ersätta den längre för samtliga analyser. Det hade varit intressant att se om en kortare jämviktstid hade gett fortsatt god repeterbarhet samt att den skulle mätas i kolonnvolymen istället för i tid. Mäter man i kolonnvolymen hade det enklare kunnat kopplas till flödes hastigheten på mobilfasen och därmed appliceras enklare i andra situationer.

Konditioneringstiden för kolonnen har inte undersökts i detta projekt i enlighet med avgränsningarna. Det hade varit av intresse att bestämma den optimala konditioneringstiden som önskas vara så kort som möjligt. Istället för att, som i detta projekt, använda en konditioneringstid som var avsedd att ha god marginal för att uppnå repeterbara förhållanden i kolonnen.

6 Slutsats

Problematiken som metanol ger upphov till har visat sig svårlöst men med bakgrund av erhållna resultat och förda diskussioner kan slutsatsen dras att den konstanta saltkoncentrationen visat sig vara mest lovande för att erhålla korta retentionstider med förhållandevis god selektivitet.

De försök till optimering som genomförts har nästintill lyckats undvika sameluering helt, framförallt i analysen vid pH 2,3 där det i princip sker fullständig separation. Det var ett av de mål som satts upp för detta projekt. Med andra ord är det första delproblemet i stort sett avklarat.

Delproblem nummer två var att undvika långa retentionstider, vilket har visats sig vara lite av en tolkningsfråga kring vad det egentligen innebär. Vid pH 2,3 är den längsta retentionstiden 11,65 minuter vilket tillsammans med en jämviktstid på 5 minuter leder till en total analysid på 16,65 minuter. För ett helautomatiserat laboratorie skulle det resultera i att det är möjligt att genomföra 86 analyser på ett dygn, vilket får ses som ett godtagbart utfall.

Rörande toppsymmetrin och breda toppar kopplade till oönskade interaktioner har inte detta helt lyckats undvikas. Ett arbete som skulle utgå från projektets resultat har stor potential att lösa delproblemet som kvarstår.

Sammanfattningsvis har två av tre delproblem lösts inom ramen för detta projekt och i förhållande till tidsramen kan kolonnen anses vara lämplig för vidare arbete. Det fortsatta arbetet skulle kunna fokusera på att lösa problemet med de något breda topparna och med viss grad av *tailing* vid pH 2,3. I stort sett har kolonnen, *Coresep 100*, visat att det finns möjlighet att undvika problematiken orsakad av metanol med hjälp av den kombinerade retentionsmekanismen.

Referenser

- [1] Svensson JO, Holmstén L, Lundgren S, Sjödin S, Skogevall M, Bodin Sunnerstam R, et al. Fully Automated Delivered Dose Uniformity and Fine Particle Dose Testing of Dry Powder Inhalers- analytical principles using UPLC with UV- and MS-detection [poster]. Göteborg: AstraZeneca; u.å.
- [2] Sarker S, Nahar L. Chapter 19 - Applications of High Performance Liquid Chromatography in the Analysis of Herbal Products. I: Mukherjee P, redaktör. Evidence-Based Validation of Herbal Medicine [e-bok]. Liverpool: Elsevier; 2015 [citerad 2 feb 2022]. Tillgänglig från: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800874-4.00019-2>.
- [3] Harvey D. Analytical Chemistry 2.1 [e-bok]. New York, New York: McGraw Hill Companies; 2016 [citerad 25 jan 2022]. Tillgänglig från: http://dpwadweb.depauw.edu/harvey_web/eTextProject/AC2.1Files/AnalChem2.1.pdf.
- [4] Harris DC. Quantitative Chemical Analysis. 8 uppl. New York: W.H Freeman and company; 2010.
- [5] Priyam Study Centre. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) [internet]; u.å. [citerad 6 maj 2022]. Tillgänglig från: <https://www.priyamstudycentre.com/2021/12/high-performance-liquid-chromatography-hplc.html>.
- [6] Paull B, Nesterenko P. Chapter 8 - Ion Chromatography. I: Fanali S, Haddad P.R, Poole C.F, Schoenmakers P,Lloyd, D, redaktörer. Liquid Chromatography [e-bok]. Amsterdam: Elsevier; 2013 [citerad 27 jan 2022] s.157-91. Tillgänglig från: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415807-8.00008-0>.
- [7] Zhao G, Dong XY, Sun Y. Ligands for mixed-mode protein chromatography: Principles, characteristics and design. J. Biotechnol. [internet]; oktober 2009 [citerad 25 jan 2022];144(1): s. 3-11. Tillgänglig från: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.04.009>.
- [8] Yang Y, Geng X. Mixed-mode chromatography and its applications to biopolymers. J. Chromatogr. A [internet]; december 2011 [citerad 25 jan 2022];1219(49): s. 8813-25. Tillgänglig från: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.009>.
- [9] Lesellier E, West C, Lemasson E, Hennig P, Bertin S. Mixed-Mode Chromatography — A Review. LCGC North Am. [internet]; juni 2017 [citerad 29 jan 2022];30(6): s. 22-33. Tillgänglig från: <https://www.chromatographyonline.com/view/mixed-mode-chromatography-review>.
- [10] Wang J, Wang J, Ning X, Liu J, Xia H, Wan G, et al. pH-dependent selective separation of acidic and basic proteins using quaternary ammonium functionalized cysteine-zwitterionic stationary phase with RPLC/IEC mixed-mode chromatography. Talanta [internet]; april 2021 [citerad 25 jan 2022];225. Tillgänglig från: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122084>.
- [11] Helix Chromatography. Coresep [internet]. Utan ort: HELIX chromatography; u.å; [citerad 1 feb 2022]. Tillgänglig från: <https://helixchrom.com/products/hplc-columns/coresep/>.
- [12] Preti R. Core-Shell Columns in High-Performance Liquid Chromatography: Food Analysis Applications. Int. J. Environ. Anal. Chem. [internet]; april 2016 [citerad 3 feb 2022];2016. Tillgänglig från: <https://doi.org/10.1155/2016/3189724>.

- [13] Dolan J. A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection [broschyr]. Aberdeen: Advanced Chromatography Technologies; 2006.
- [14] Kadjo AF, Liao H, Dasgupta PK, Kraiczek KG. Width Based Characterization of Chromatographic Peaks: Beyond Height and Area. *Anal. Chem.* [internet]; februari 2017 [citerad 3 feb 2022];89(7): s. 3893–3900. Tillgänglig från: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.6b04858>.
- [15] Chemtech Int. Understanding Chromatogram Peaks - Fronting, Tailing, Ghosting & Rounded explained [internet]; 2020 [citerad 25 apr]. Tillgänglig från: <https://chemtech-us.com/articles/understanding-chromatogram-peaks-fronting-tailing-g-hosting-rounded-explained/>.
- [16] Dionex. Chromeleon 6.70 Tutorial and User Manual [manual]. Thermo scientific; april 2005 [citerad 26 apr 2022]. Tillgänglig från: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/Man-Chromeleon-670-EN.pdf>.
- [17] Thekkudan DF, Rutan SC, Carr PW. A study of the precision and accuracy of peak quantification in comprehensive two-dimensional liquid chromatography in time. *J. Chromatogr. A* [internet]; juni 2010 [citerad 2 feb 2022];1217(26): s. 4313-27. Tillgänglig från: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.039>.
- [18] Vessman J, Stefan RI, Van Staden JF, Danzer K, Lindner W, Burns DT, et al. Selectivity in Analytical Chemistry. *Pure Appl. Chem.* [internet]. 2001 [citerad 27 jan 2022]; 73(8):1381–6. Tillgänglig från: <http://publications.iupac.org/pac/pdf/2001/pdf/7308x1381.pdf>.
- [19] Ardent Scientific. Fundamentals of HPLC 10 - The Retention Factor [videofil]; 29 februari 2016 [citerad 28 apr 2022]. Tillgänglig från: <https://www.youtube.com/watch?v=SO9dmFbbCEY>.
- [20] Stoll DR, Seidl C. Column Re-equilibration Following Gradient Elution: How Long is Long Enough? Part I: Reversed-phase and HILIC Separations of Small Molecules. *LCGC North Am.* [internet]; november 2019 [citerad 3 feb 2022];37(11): s. 790-5. Tillgänglig från: <https://www.chromatographyonline.com/view/column-re-equilibration-following-gradient-elution-how-long-long-enough-part-i-reversed-phase-and-hi>.
- [21] Agency EM. ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology - Step 5 [broschyr]. London: European Medicines Agency; 1995 [citerad 3 feb 2022].
- [22] Gritti F, Guiochon G. Effect of the ionic strength of salts on retention and overloading behavior of ionizable compounds in reversed-phase liquid chromatography: II. Symmetry-C18. Department of Chemistry, University of Tennessee [internet]; april 2004 [citerad 23 apr 2022];1033-1 s. 57-69. Tillgänglig från: <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2004.01.029>.
- [23] Chemspider. ChemSpider | Search and share chemistry [internet]; [2022 [citerad 10 maj]]. Tillgänglig från: <http://www.chemspider.com/>.

Bilagor

A Program

Genomförande av separation och analys gjordes med hjälp av kromatografimjukvaran Chromeleon™. För att kunna genomföra analyserna krävs det som i Chromeleon™ kallas pumpprogram och sekvens.

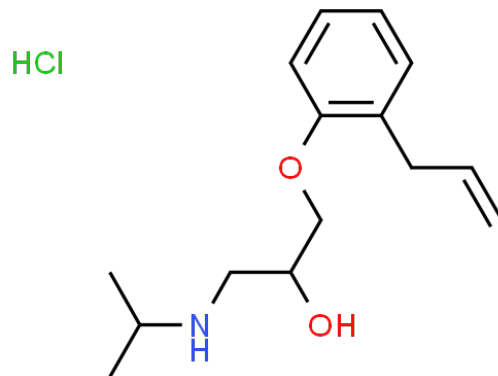
I pumpprogrammet bestämdes parametrar som detektionsvåglängd, analystid samt om analysen ska genomföras med isokratisk eluering eller gradienteluering. Vid gradienteluering bestämdes hur stor den linjära ökningen av fas B skulle vara, som sedan följdes av en platå innan gradienten återgick till det initiala stadiet. Gradientens utformning justerades genom att förändra tiden för den linjära ökningen och platån. En flackare lutning uppnåddes genom att den linjära ökningen skedde under en längre tid och det omvända för en brantare lutning. I programmet valdes även start- och slutandel av fas A respektive fas B.

När sekvenserna skapades bestämdes antalet prover som skulle analyseras, provernas injektionsvolym samt vilket pumpprogram som användes för analysen.

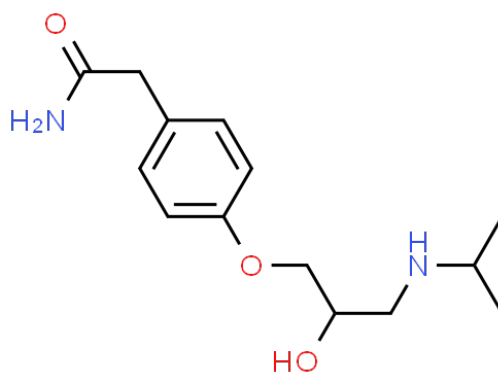
B Figurer

B.1 Substanser

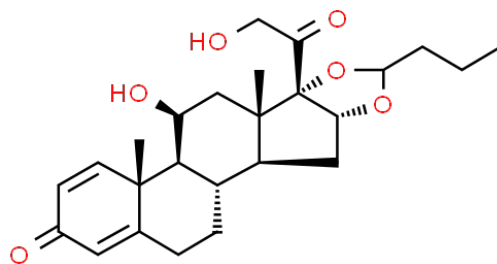
I följande avsnitt presenteras molekylstrukturen hos de studerade substanserna.



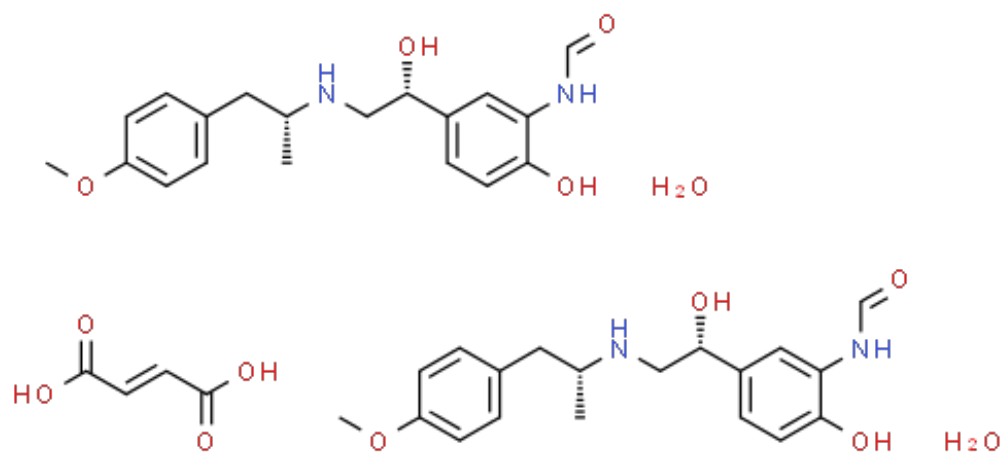
Figur B.1: Molkeylstruktur för Alprenolol (CC BY 2.0) [23].



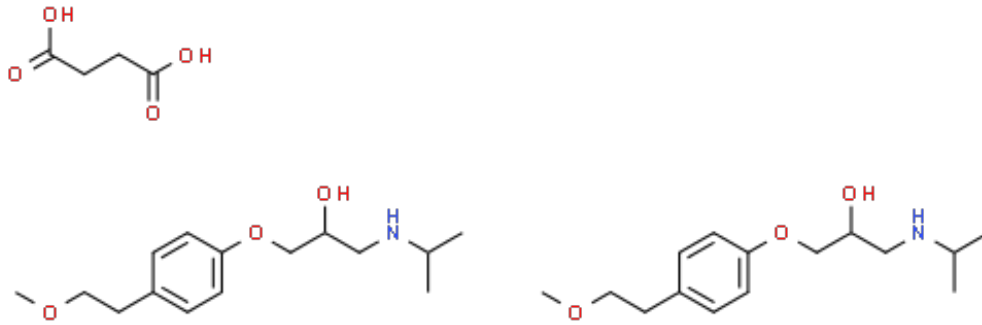
Figur B.2: Molkeylstruktur för Atenolol (CC BY 2.0) [23].



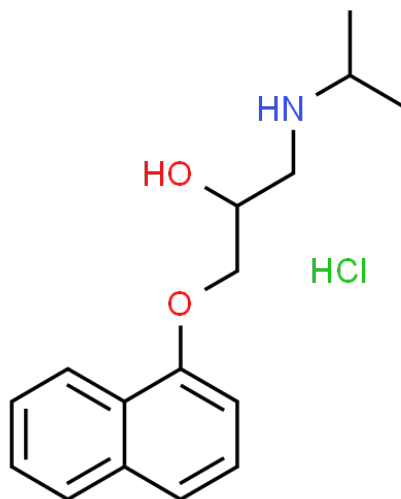
Figur B.3: Molkeylstruktur för Budesonid (CC BY 2.0) [23].



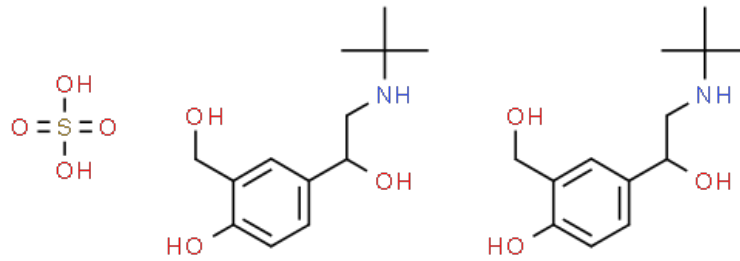
Figur B.4: Molkeystruktur för Formoterol (CC BY 2.0) [23].



Figur B.5: Molkeylstruktur för Metoprolol (CC BY 2.0) [23].



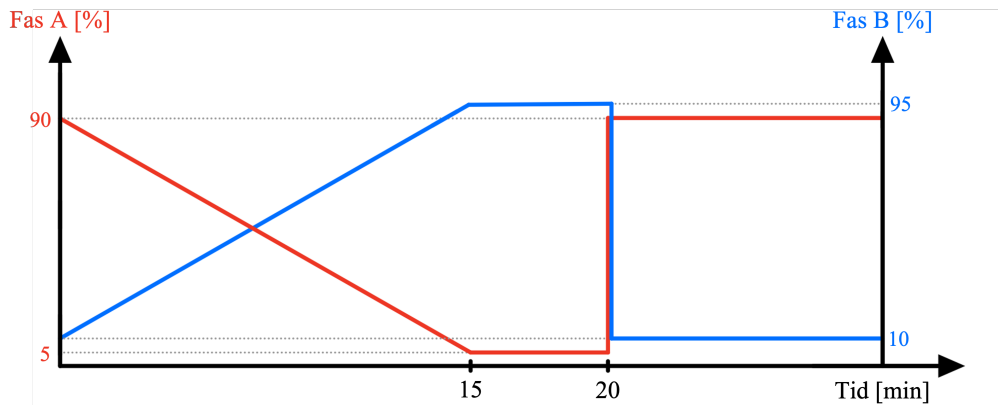
Figur B.6: Molkeylstruktur för Propranolol (CC BY 2.0) [23].



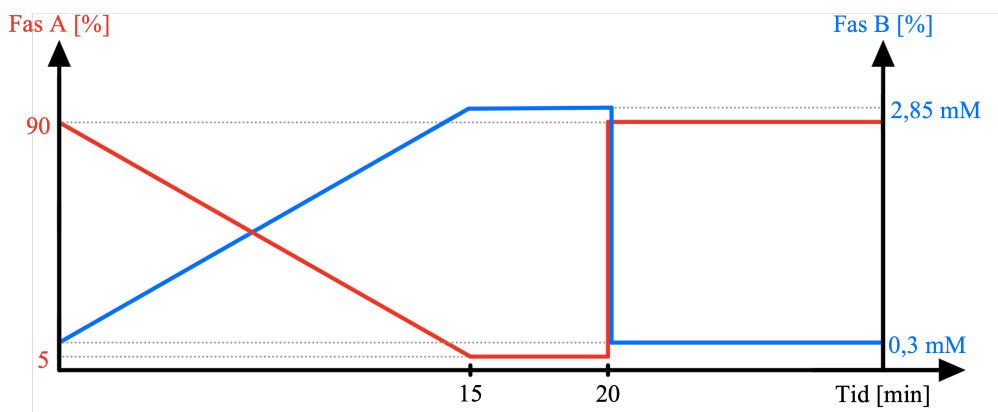
Figur B.7: Molkeylstruktur för Salbutamol (CC BY 2.0) [23].

B.2 Gradienter

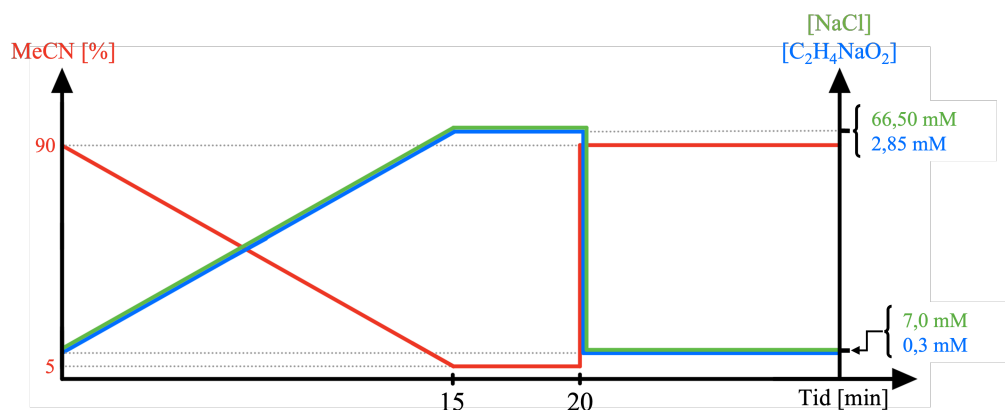
I följande avsnitt visas pumpgradienter samt verkliga gradienter vid mobsammansättning för pH 1,9.



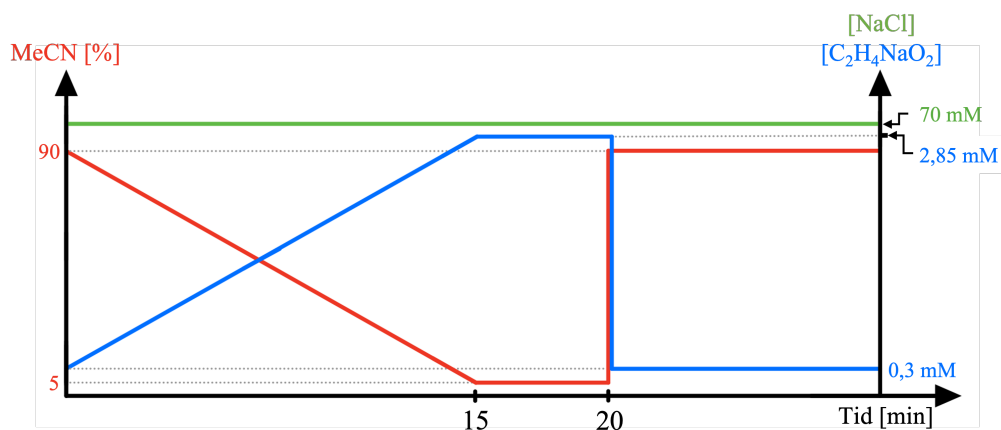
Figur B.8: Pumpgradient 15-5 som visar hur stor andel av fas A och fas B som används vid analyser.



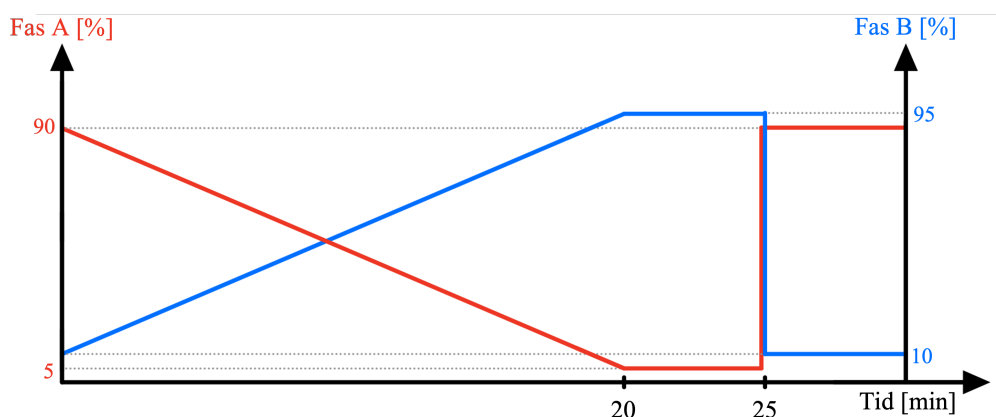
Figur B.9: Verklig gradient för analys vid pH 1,9 med pumpgradienten 15-5 och med inget salt i någon av faserna.



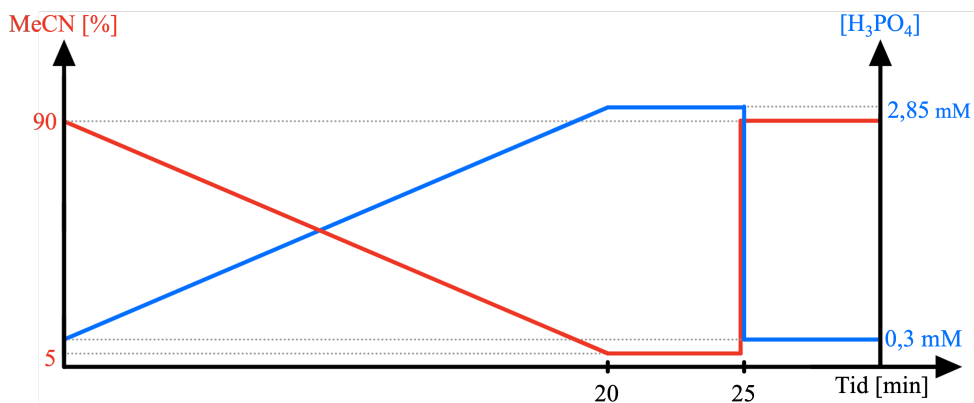
Figur B.10: Verklig gradient för analys vid pH 1,9 med pumpgradienten 15-5 och med saltgradient med fas B innehållande 70 mM NaCl.



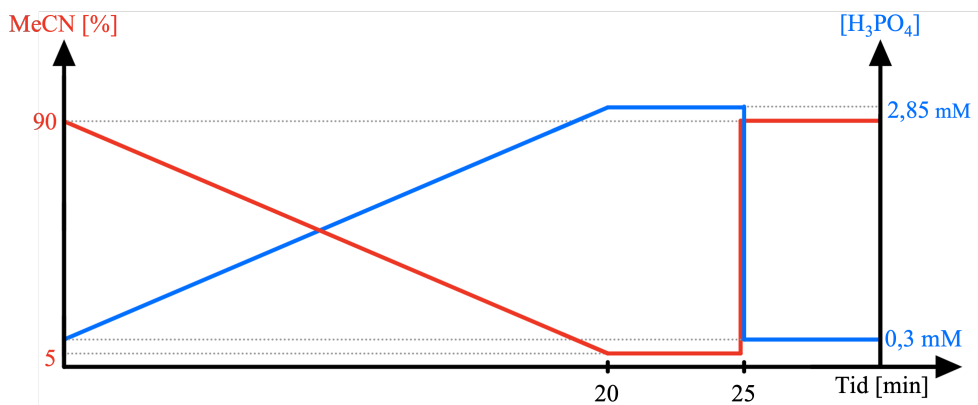
Figur B.11: Verklig gradient för analys vid pH 1,9 med pumpgradienten 15-5 och med konstant saltkoncentration om 70 mM NaCl.



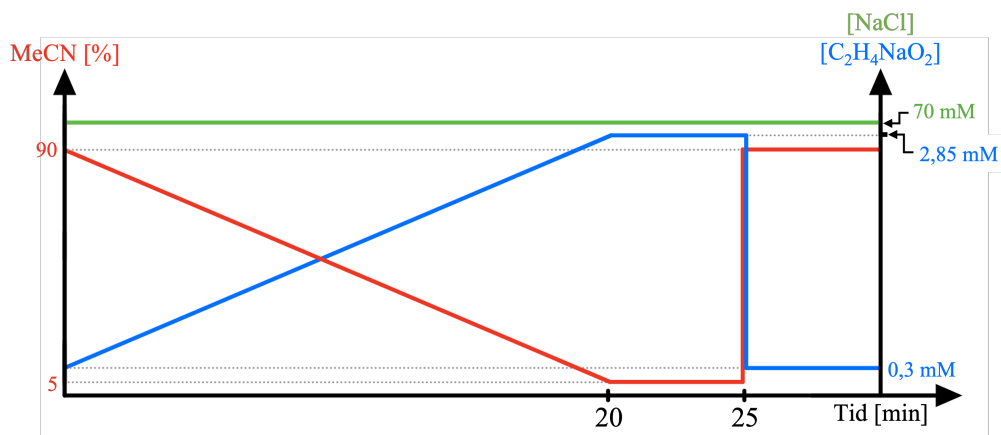
Figur B.12: Pumpgradient 20-5 som visar hur stor andel av fas A och fas B som används vid analyser.



Figur B.13: Verklig gradient för analys vid pH 1,9 med pumpgradienten 20-5 och med inget salt i någon av faserna.



Figur B.14: Verklig gradient för analys vid pH 1,9 med pumpgradienten 20-5 och med saltgradient med fas B innehållande 70 mM NaCl.



Figur B.15: Verklig gradient för analys vid pH 1,9 med pumpgradienten 20-5 och med konstant saltkoncentration om 70 mM NaCl.

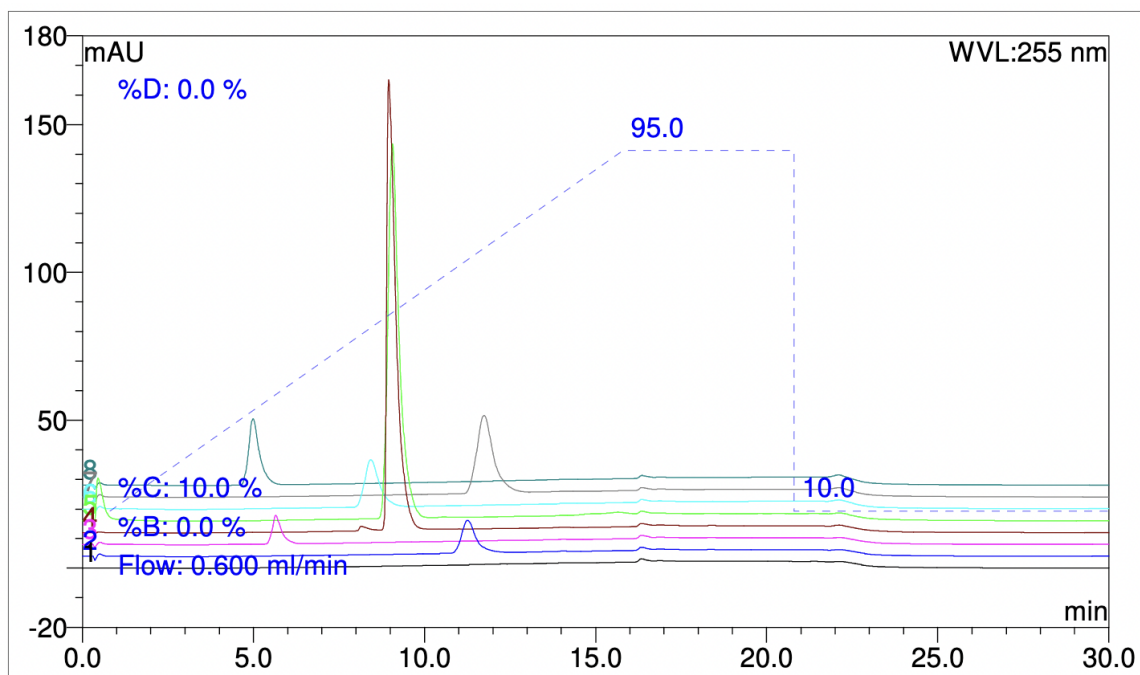
B.3 Kromatogram

I följande avsnitt visas samtliga kromatogram för analyser gjorda vid pH 1,9; 2,3; 4 samt 6,2. Vid pH 2,3 samt pH 4 har även repeterbarhetsanalyser gjorts, vilka även presenteras i följande avsnitt.

B.3.1 pH 1,9

I följande avsnitt kommer samtliga kromatogram för analyser vid pH 1,9 att presenteras.

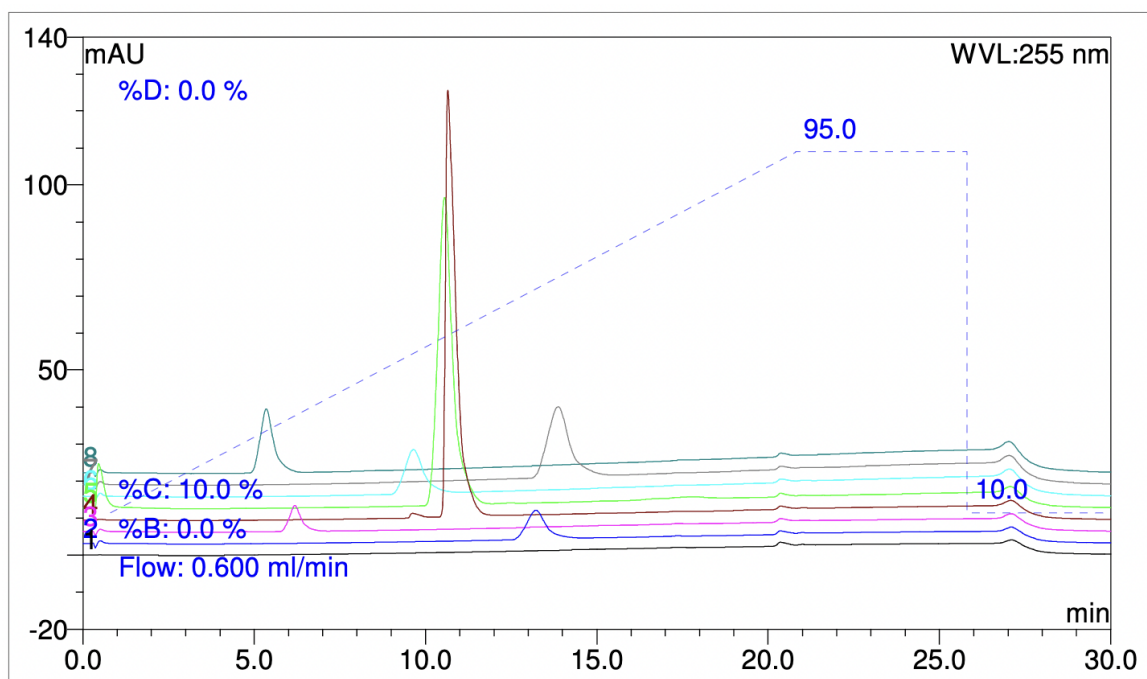
B.3.1.1 pH 1,9 - Utan salt



Figur B.16: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Metoprolol, Formoterol¹, Budesonid², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,6 ml/min, pumpgradienten 15-5 och med inget salt i någon av faserna. Notera att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,5 μ l

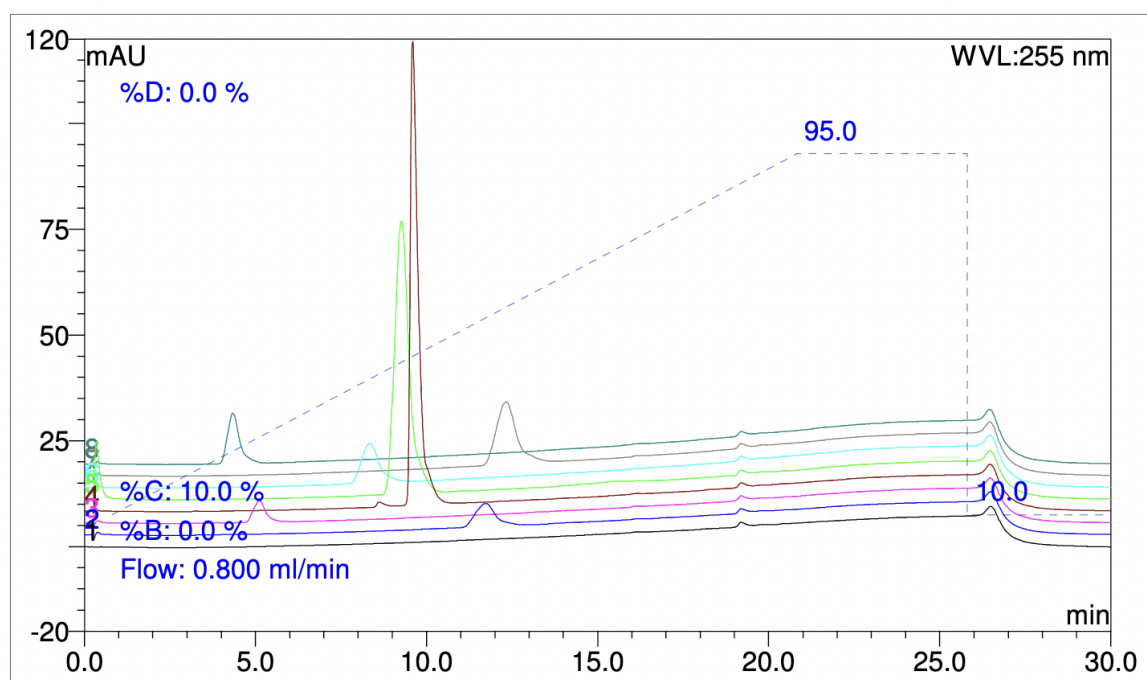
²Injektionsvolym: 0,25 μ l



Figur B.17: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Metoprolol, Budesonid¹, Formoterol², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,6 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med inget salt i någon av faserna. Notera att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,25 μ l

²Injektionsvolym: 0,5 μ l

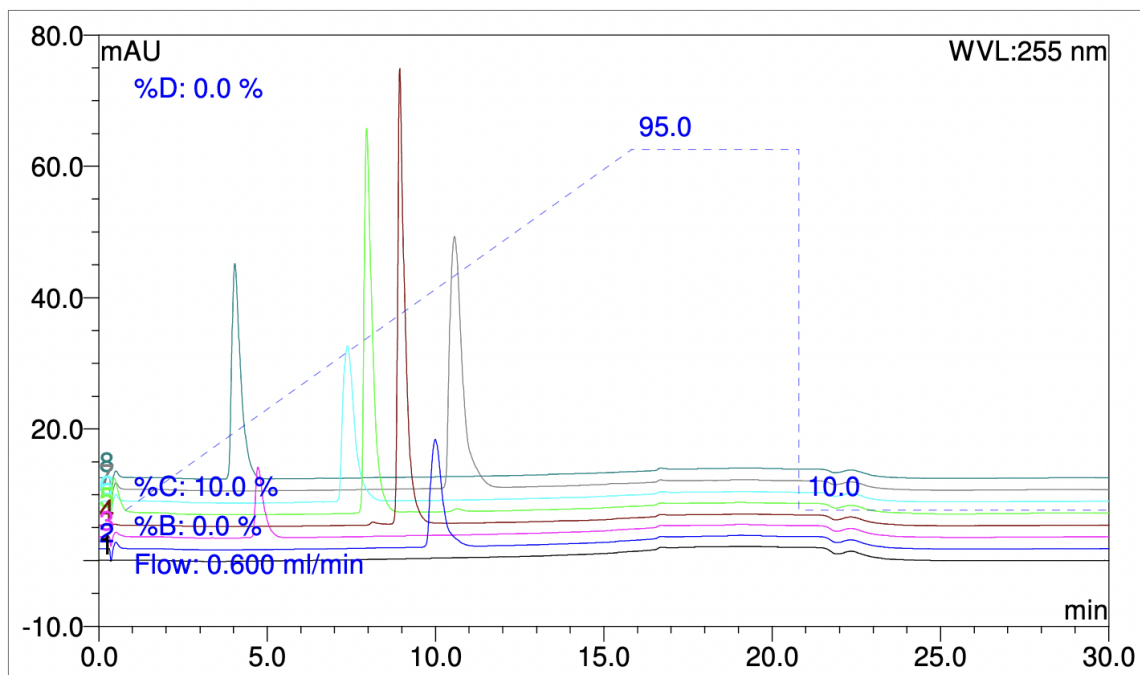


Figur B.18: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Metoprolol, Budesonid¹, Formoterol², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,8 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med inget salt i någon av faserna. Notera toppen för Atenolol, som skyms bakom texten i kromatogrammet, samt att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,25 μ l

²Injektionsvolym: 0,5 μ l

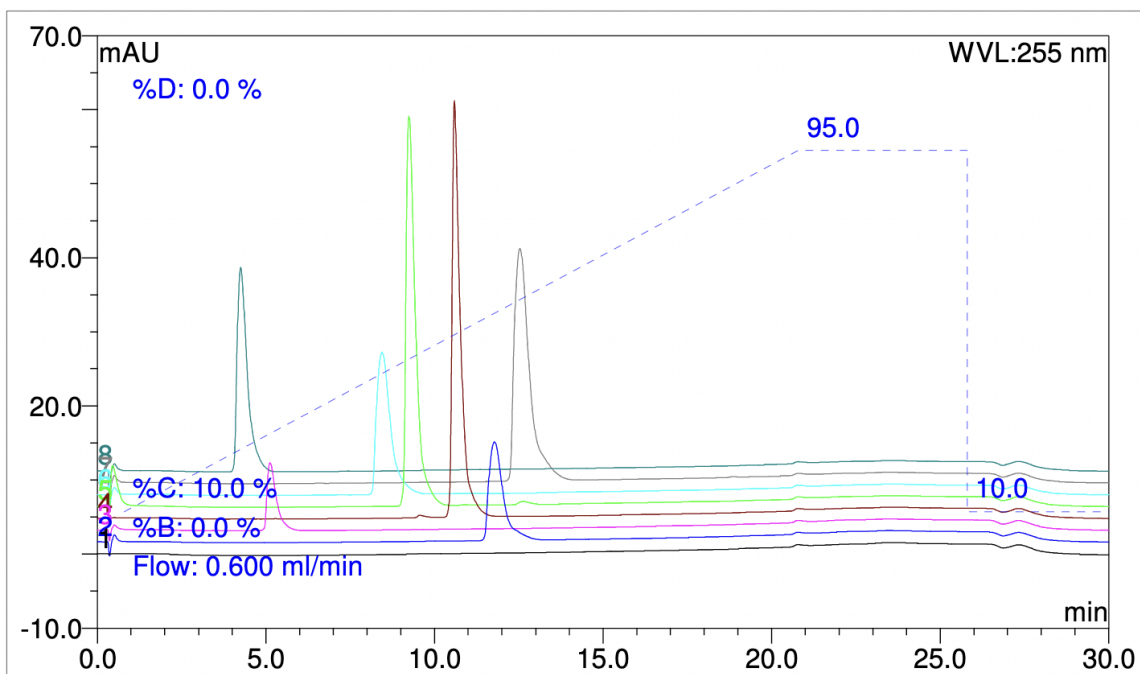
B.3.1.2 pH 1,9 - Med saltgradient



Figur B.19: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Metoprolol, Formoterol¹, Budesonid², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,6 ml/min, pumpgradienten 15-5 och med saltgradient om 70 mM NaCl i fas B. Notera toppen för Atenolol, som skymts bakom texten i kromatogrammet, samt att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,5 μ l

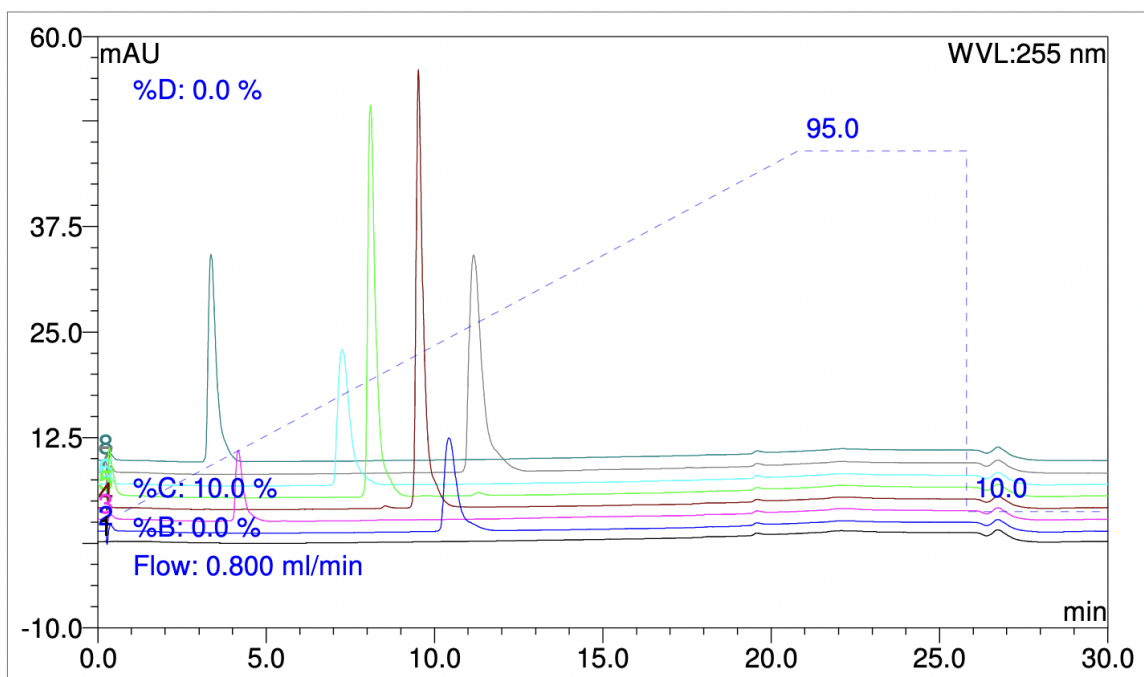
²Injektionsvolym: 0,25 μ l



Figur B.20: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Metoprolol, Formoterol¹, Budesonid², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,6 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med saltgradient om 70 mM NaCl i fas B. Notera toppen för Atenolol, som skymts bakom texten i kromatogrammet, samt att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,5 μ l

²Injektionsvolym: 0,25 μ l

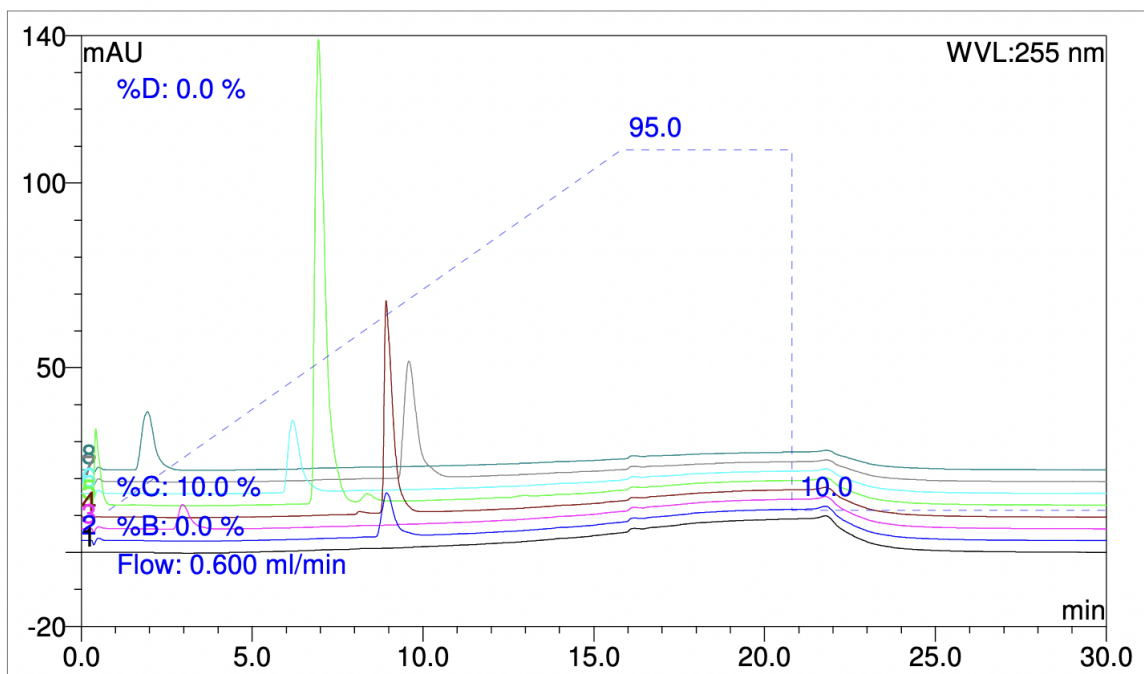


Figur B.21: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Metoprolol, Formoterol¹, Budesonid², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,8 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med saltgradient om 70 mM NaCl i fas B. Notera toppen för Atenolol, som skymts bakom texten i kromatogrammet, samt att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,5 μ l

²Injektionsvolym: 0,25 μ l

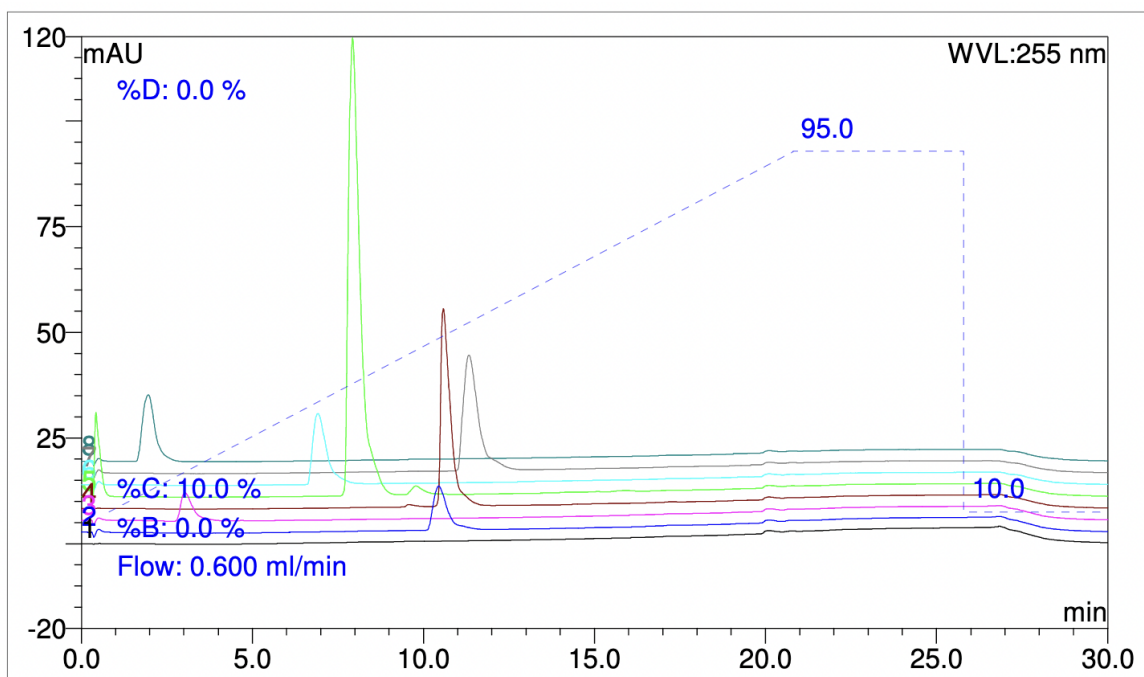
B.3.1.3 pH 1,9 - Konstant saltkoncentration



Figur B.22: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Metoprolol, Formoterol¹, Budesonid², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,6 ml/min, pumpgradienten 15-5 och med konstant saltkoncentration om 70 mM NaCl. Notera toppen för Atenolol, som skymts bakom texten i kromatogrammet, samt att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,4 μ l

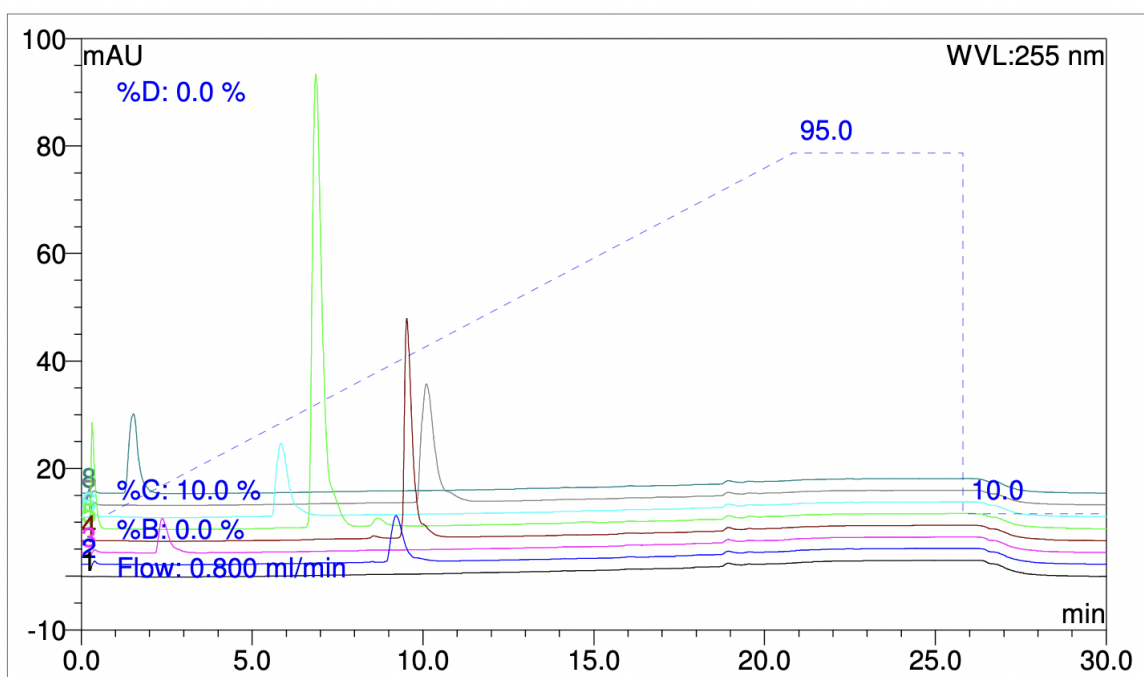
²Injektionsvolym: 0,2 μ l



Figur B.23: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Metoprolol, Formoterol¹, Alprenolol, Budesonid² och Propanolol. Analys med flödet 0,6 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med konstant saltkoncentration om 70 mM NaCl. Notera toppen för Atenolol, som skymts bakom texten i kromatogrammet, samt att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,4 μ l

²Injektionsvolym: 0,2 μ l



Figur B.24: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Metoprolol, Formoterol¹, Alprenolol, Budesonid² och Propanolol. Analys med flödet 0,8 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med konstant saltkoncentration om 70 mM NaCl. Notera toppen för Atenolol, som skymts bakom texten i kromatogrammet, samt att fas B här benämns som "C".

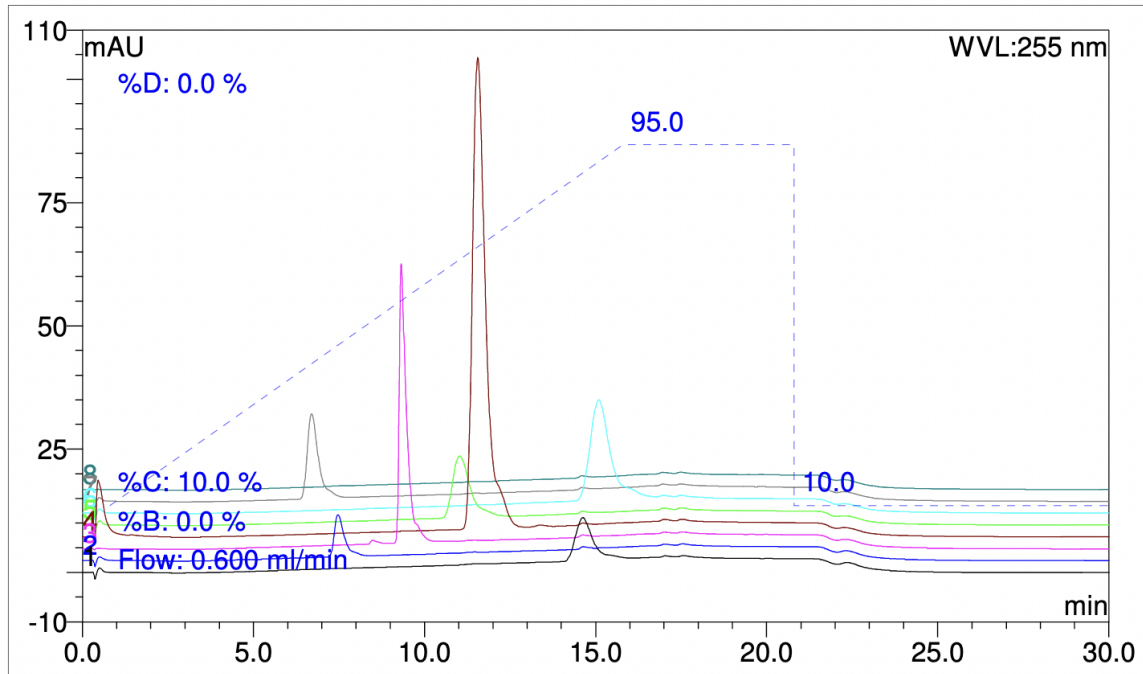
¹Injektionsvolym: 0,4 μ l

²Injektionsvolym: 0,2 μ l

B.3.2 pH 2,3

I följande avsnitt kommer samtliga kromatogram för analyser vid pH 2,3 att presenteras.

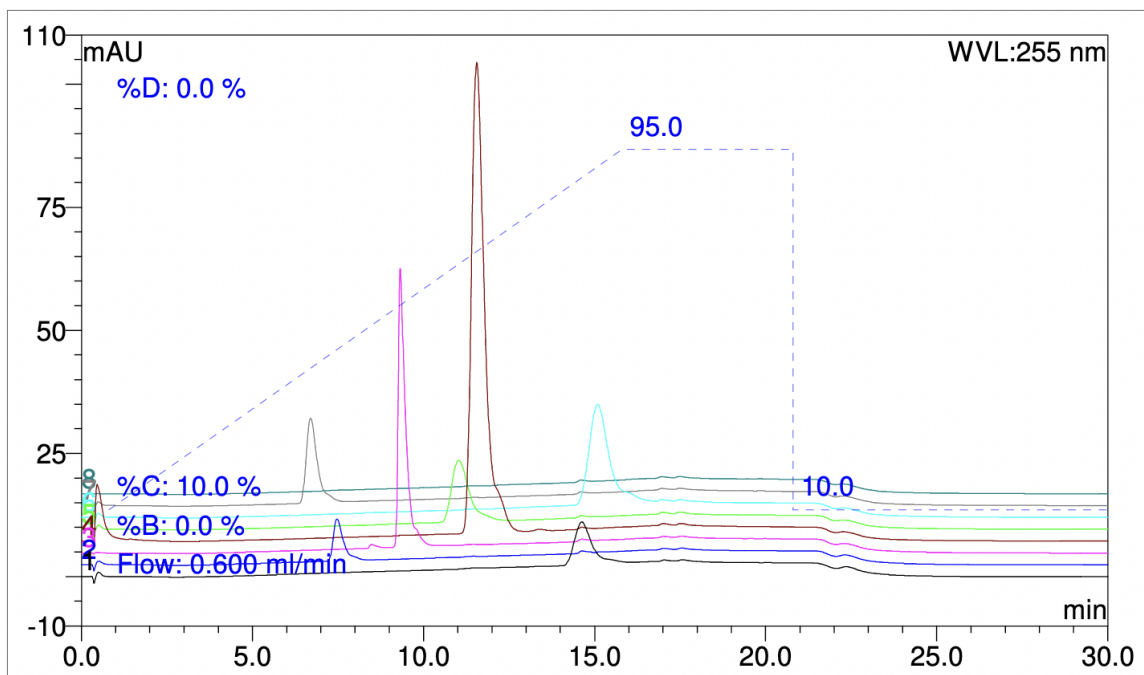
B.3.2.1 pH 2,3 - Utan salt



Figur B.25: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Budesonid¹, Metoprolol, Formoterol², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,6 ml/min, pumpgradienten 15-5 och med inget salt i någon av faserna. Notera att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,25 μ l

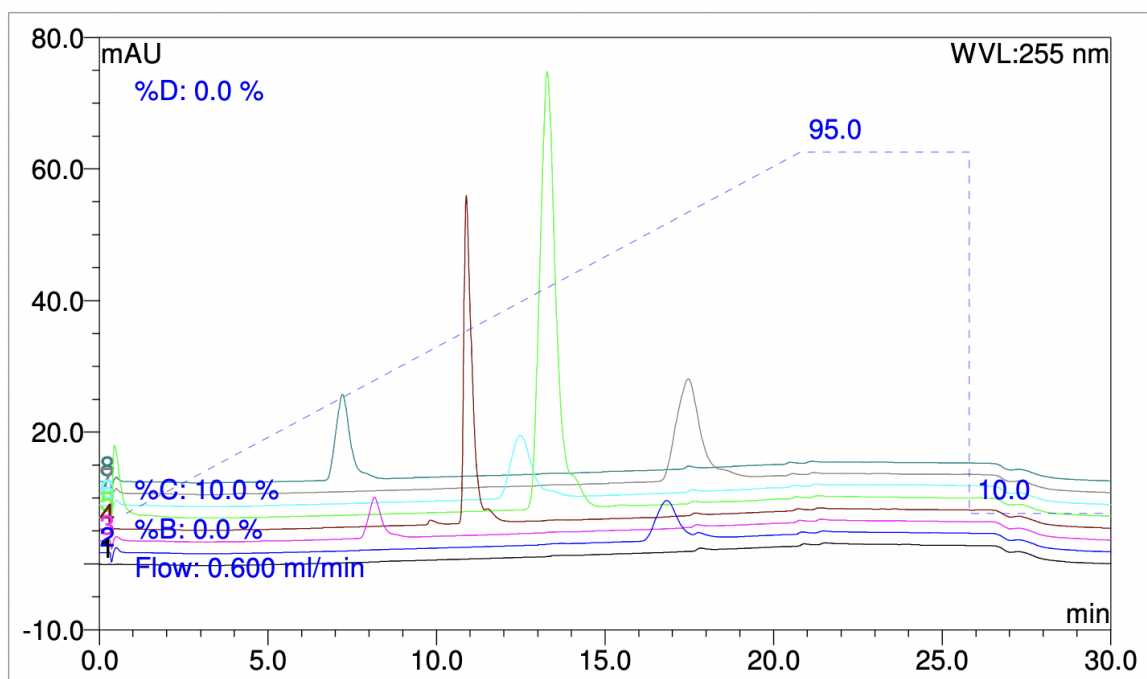
²Injektionsvolym: 0,5 μ l



Figur B.26: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Budesonid¹, Metoprolol, Formoterol², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,6 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med inget salt i någon av faserna. Notera att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,25 μ l

²Injektionsvolym: 0,5 μ l

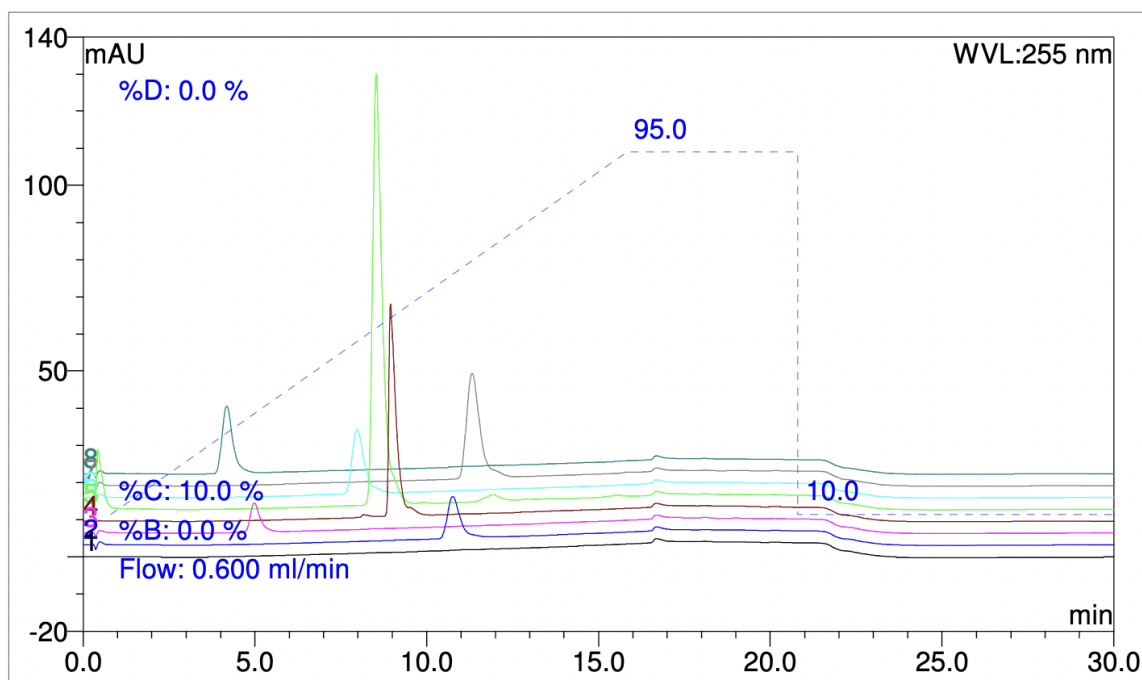


Figur B.27: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Budesonid¹, Metoprolol, Formoterol², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,8 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med inget salt i någon av faserna. Notera att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,25 μ l

²Injektionsvolym: 0,5 μ l

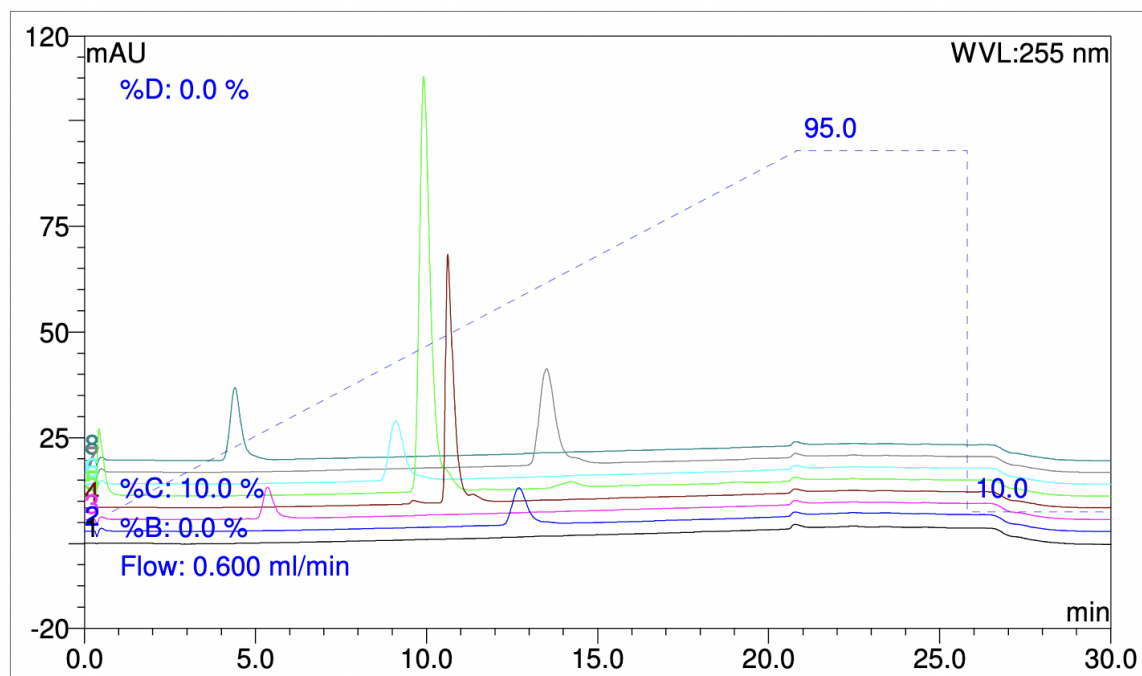
B.3.2.2 pH 2,3 - Med saltgradient



Figur B.28: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Metoprolol, Formoterol¹, Budesonid², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,6 ml/min, pumpgradienten 15-5 och med saltgradient om 70 mM NaCl i fas B. Notera toppen för Atenolol, som skymts bakom texten i kromatogrammet, samt att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,5 μ l

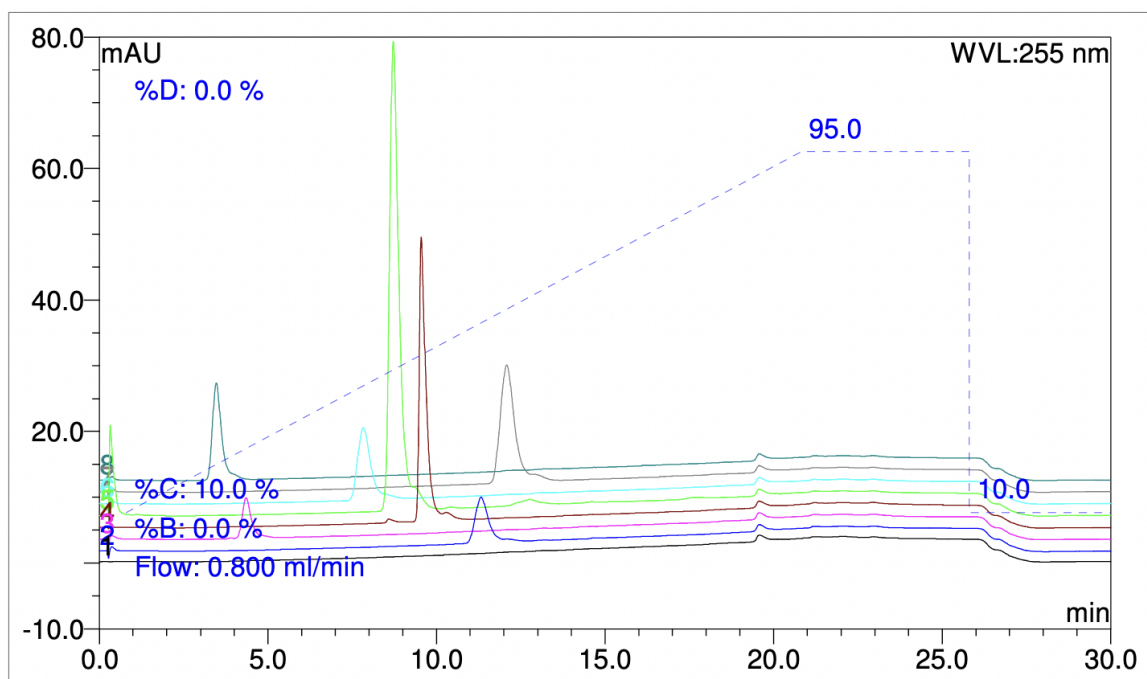
²Injektionsvolym: 0,25 μ l



Figur B.29: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Metoprolol, Formoterol¹, Budesonid², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,6 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med saltgradient om 70 mM NaCl i fas B. Notera toppen för Atenolol, som skymts bakom texten i kromatogrammet, samt att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,5 μ l

²Injektionsvolym: 0,25 μ l

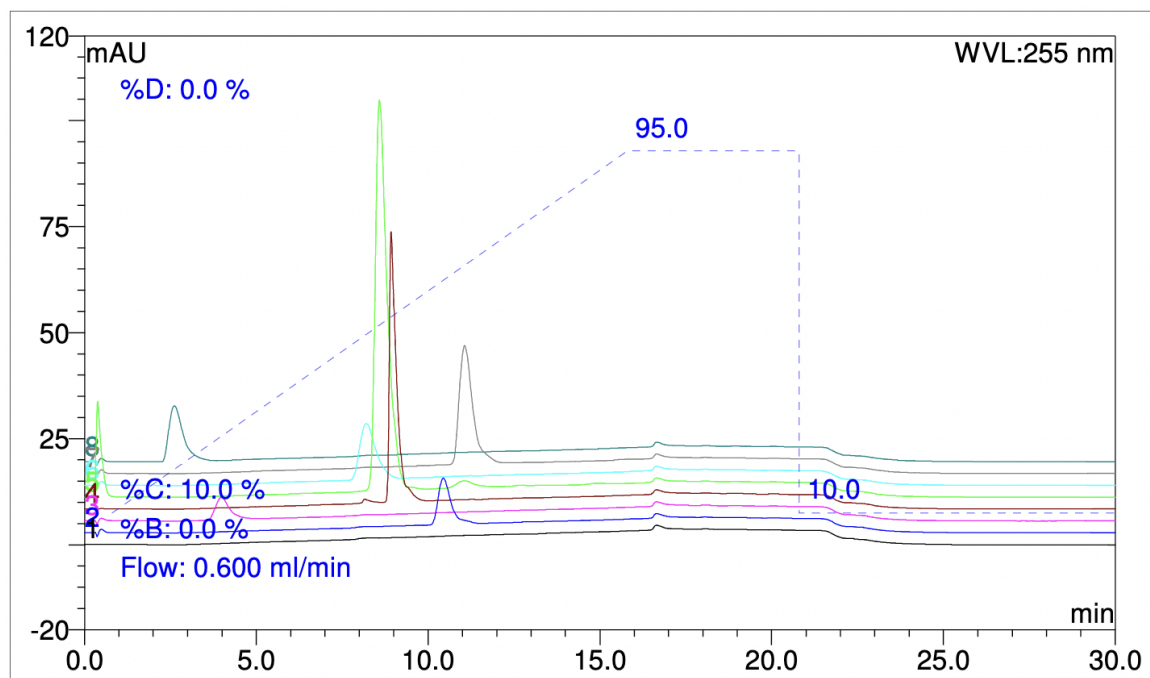


Figur B.30: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Metoprolol, Formoterol¹, Budesonid², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,8 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med saltgradient om 70 mM NaCl i fas B. Notera toppen för Atenolol, som skymts bakom texten i kromatogrammet, samt att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,5 μ l

²Injektionsvolym: 0,25 μ l

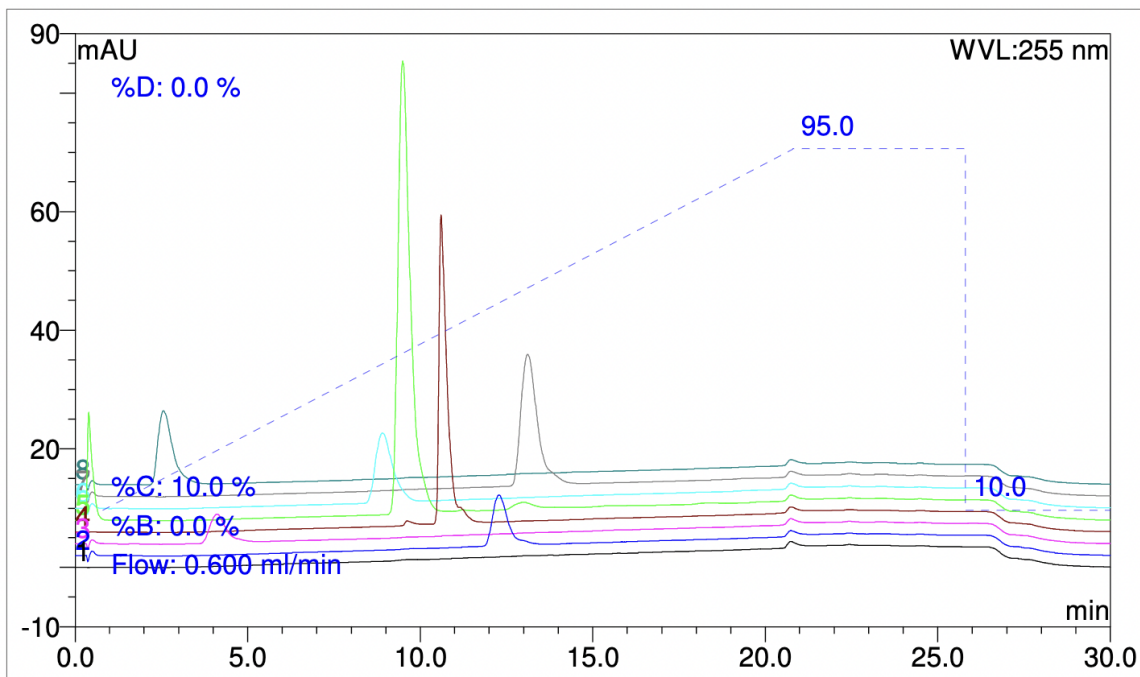
B.3.2.3 pH 2,3 - Konstant saltkoncentration



Figur B.31: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Metoprolol, Formoterol¹, Budesonid², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,6 ml/min, pumpgradienten 15-5 och med konstant saltkoncentration om 70 mM NaCl. Notera toppen för Atenolol, som skymts bakom texten i kromatogrammet, samt att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,5 μ l

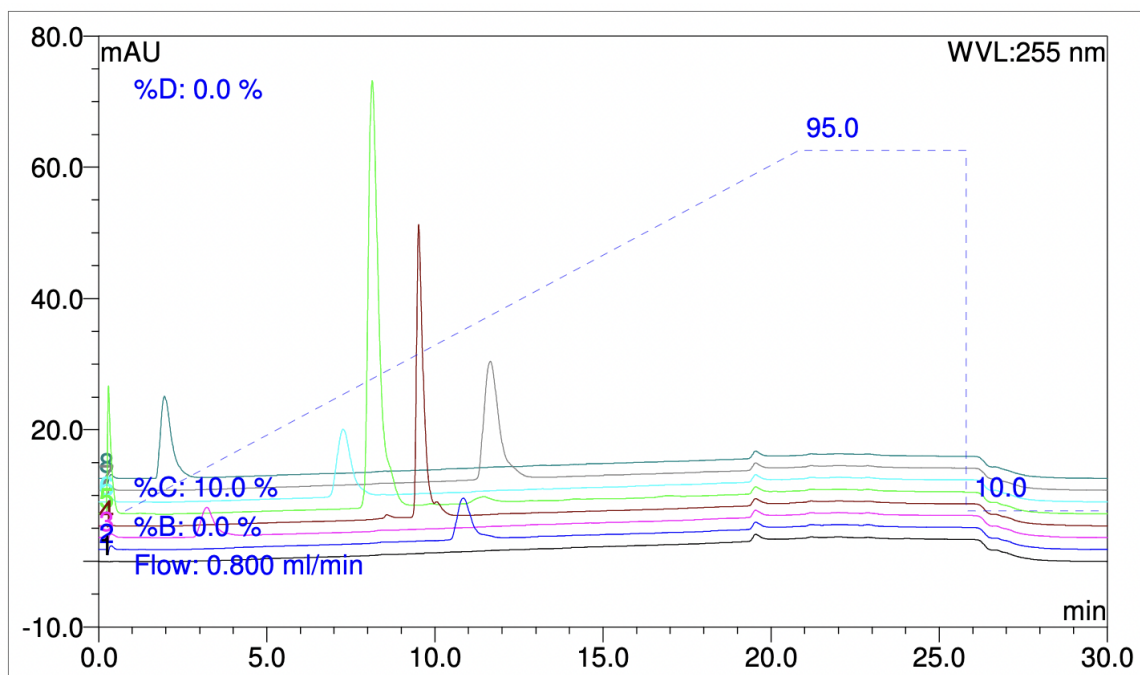
²Injektionsvolym: 0,25 μ l



Figur B.32: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Metoprolol, Formoterol¹, Budesonid², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,6 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med konstant saltkoncentration om 70 mM NaCl. Notera toppen för Atenolol, som skymts bakom texten i kromatogrammet, samt att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,5 μ l

²Injektionsvolym: 0,25 μ l

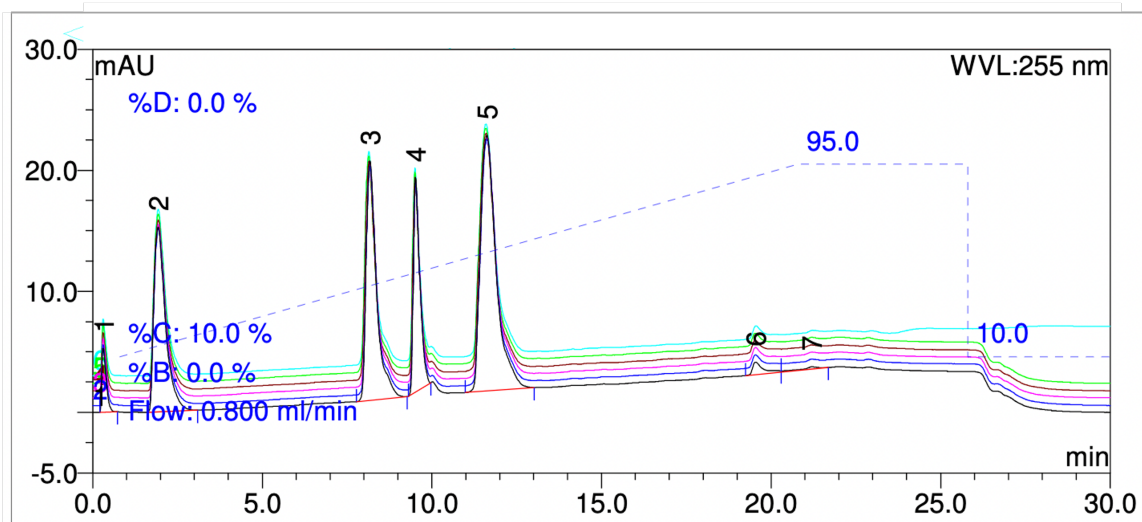


Figur B.33: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Metoprolol, Formoterol¹, Budesonid², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,8 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med konstant saltkoncentration om 70 mM NaCl. Notera toppen för Atenolol, som skymts bakom texten i kromatogrammet, samt att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,5 μ l

²Injektionsvolym: 0,25 μ l

B.3.2.4 pH 2,3 - Repeterbarhet

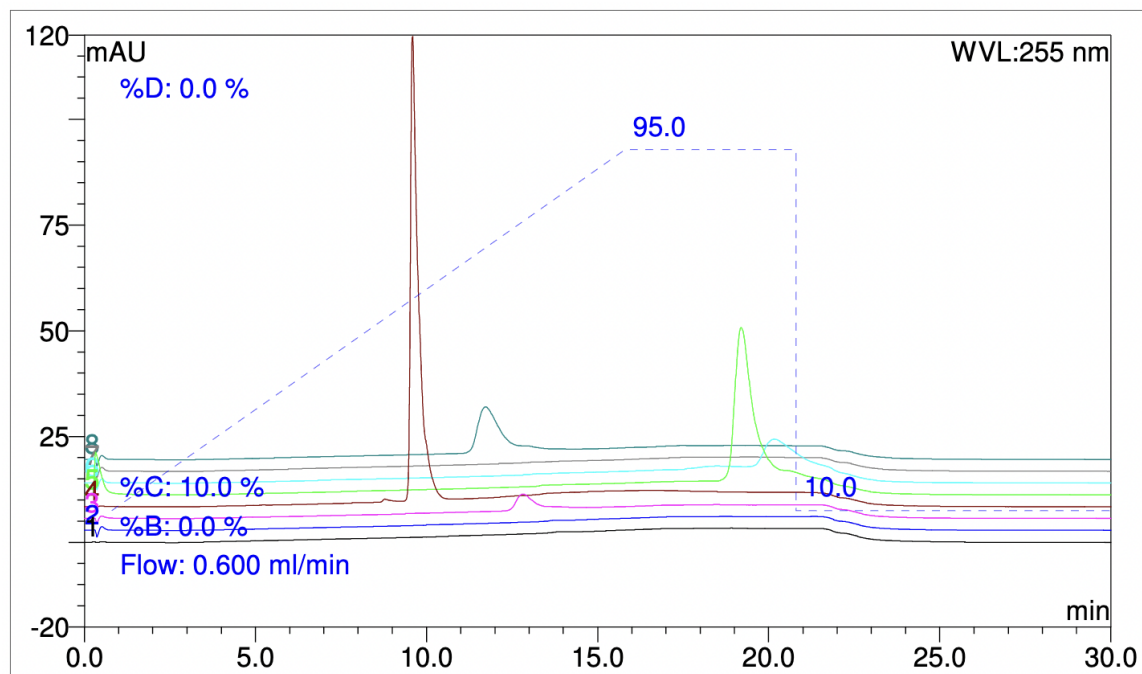


Figur B.34: Kromatogram som visar repeterbarhet av mix med substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Formoterol, Budesonid och Propranolol, Analys med flödet 0,8 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med salt i båda faserna. Notera att fas B här benämns som "C".

B.3.3 pH 4

I följande avsnitt kommer samtliga kromatogram för analyser vid pH runt 4 att presenteras.

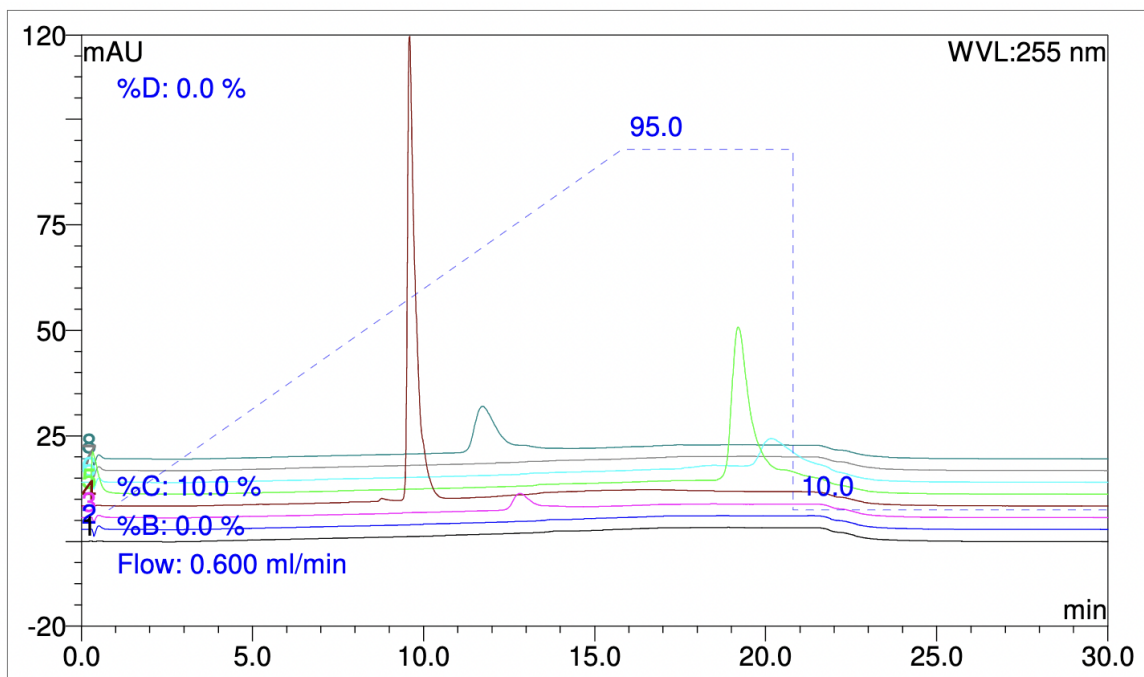
B.3.3.1 pH 4 - Utan salt



Figur B.35: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Budesonid¹, Salbutamol, Atenolol, Formoterol² och Metoprolol. Analys med flödet 0,6 ml/min, pumpgradienten 15-5 och med inget salt i någon av faserna. Notera att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,25 μ l

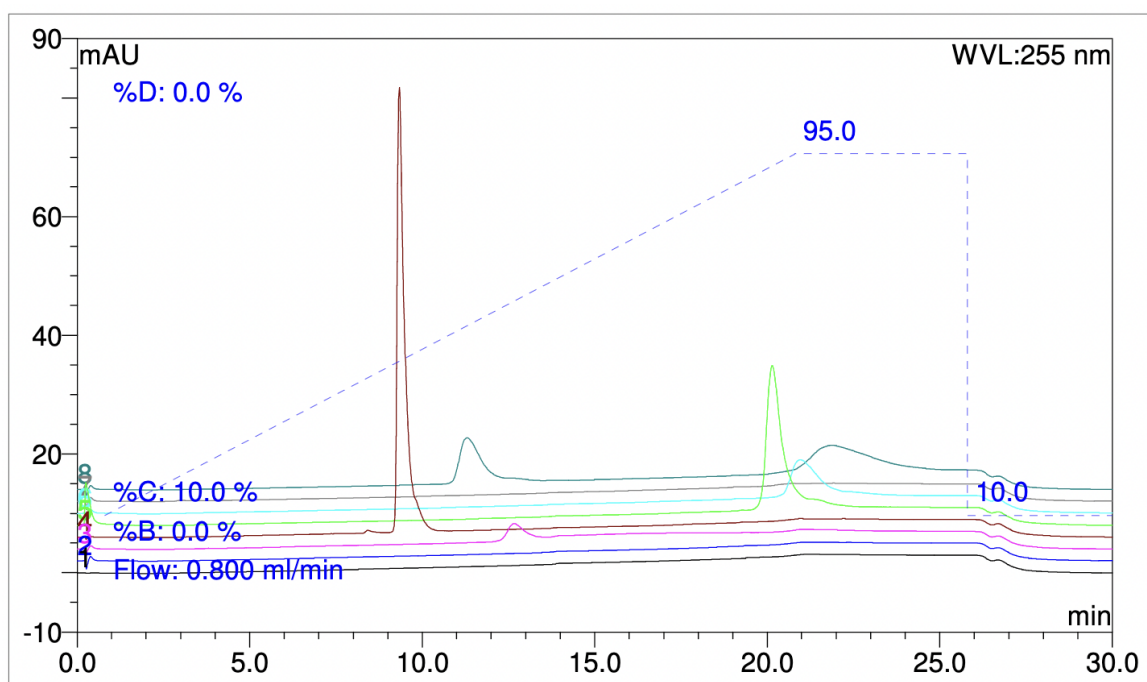
²Injektionsvolym: 0,5 μ l



Figur B.36: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Budesonid¹, Salbutamol, Atenolol, Formoterol², Metoprolol och Atenolol. Analys med flödet 0,6 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med inget salt i någon av faserna. Notera att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,25 μ l

²Injektionsvolym: 0,5 μ l

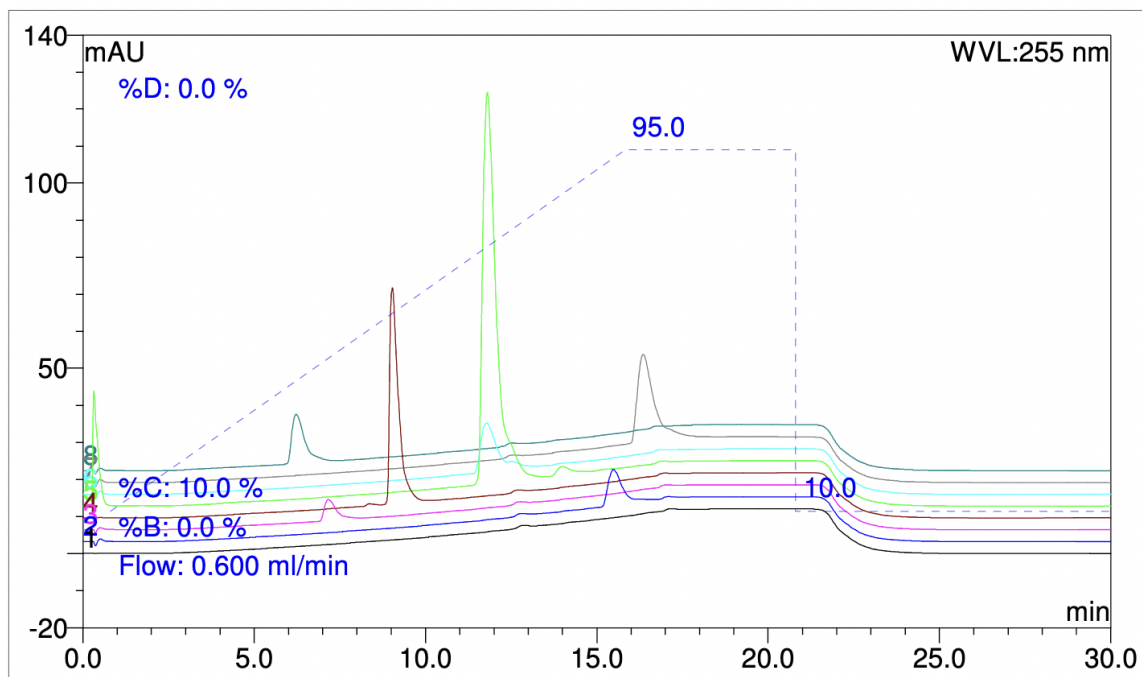


Figur B.37: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Budesonid¹, Salbutamol, Atenolol, Formoterol², Metoprolol och Salbutamol. Analys med flödet 0,8 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med inget salt i någon av faserna. Notera att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,25 μ l

²Injektionsvolym: 0,5 μ l

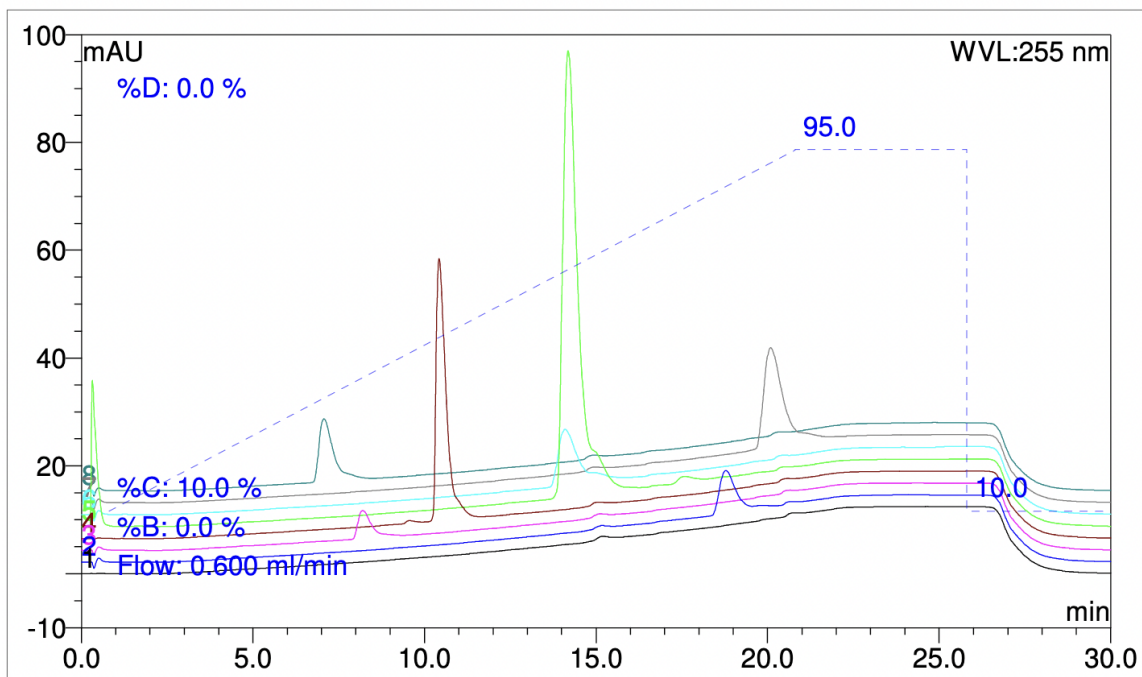
B.3.3.2 pH 4 - Med saltgradient



Figur B.38: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Budesonid¹, Metoprolol, Formoterol², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,6 ml/min, pumpgradienten 15-5 och med saltgradient om 70 mM NaCl i fas B. Notera att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,25 μ l

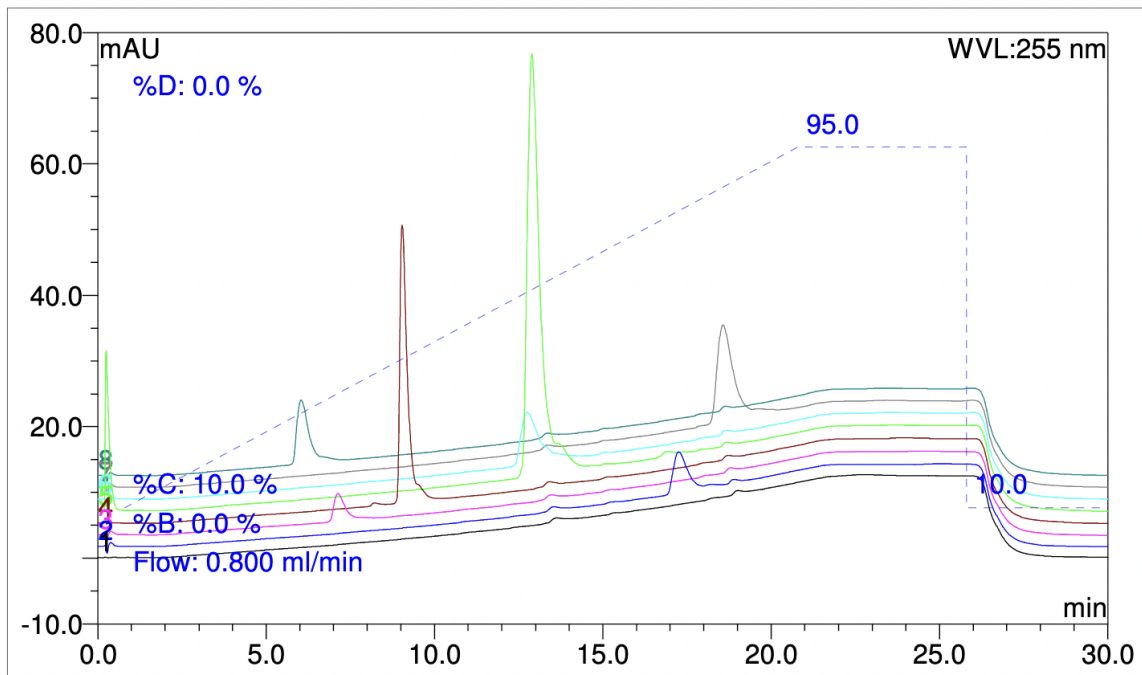
²Injektionsvolym: 0,5 μ l



Figur B.39: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Budesonid¹, Metoprolol, Formoterol², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,6 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med saltgradient om 70 mM NaCl i fas B. Notera att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,25 μ l

²Injektionsvolym: 0,5 μ l

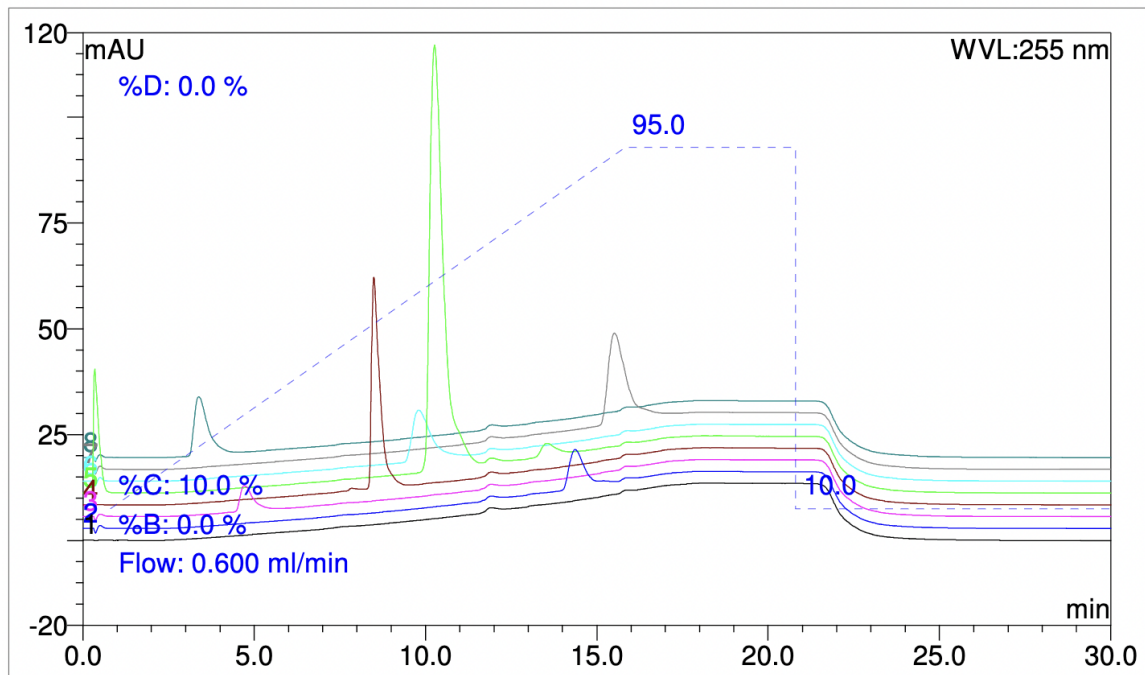


Figur B.40: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Budesonid¹, Metoprolol, Formoterol², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,8 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med saltgradient om 70 mM NaCl i fas B. Notera att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,25 μ l

²Injektionsvolym: 0,5 μ l

B.3.3.3 pH 4 - Konstant saltkoncentration

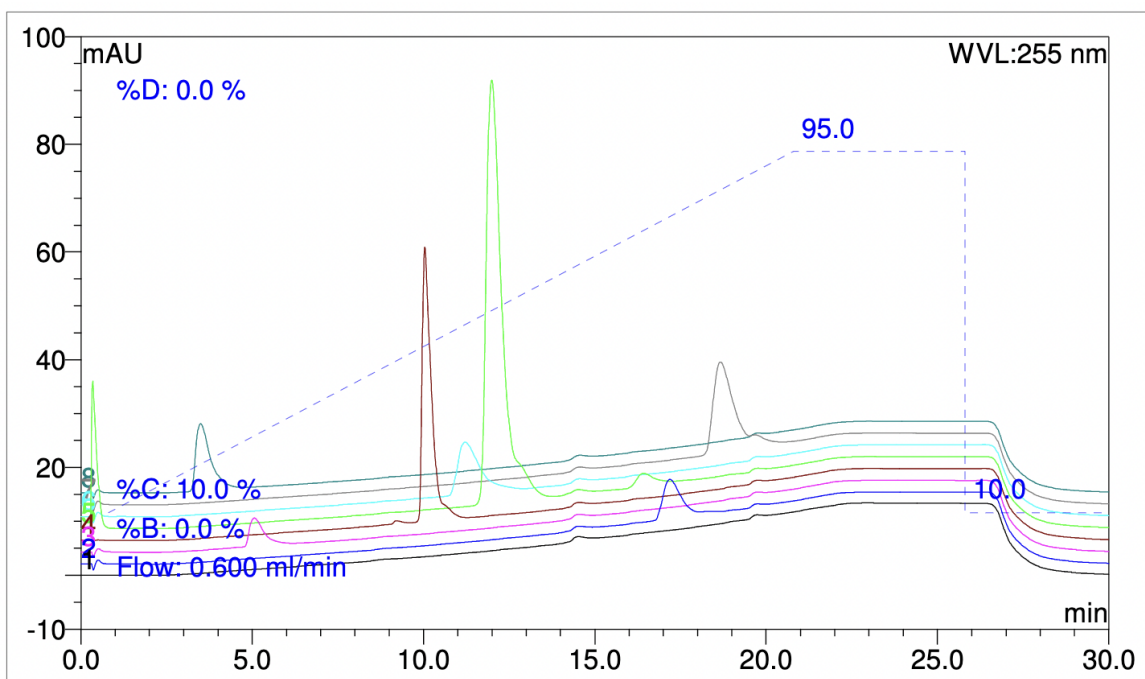


Figur B.41: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Budesonid¹, Metoprolol, Formoterol², Formoterol³, Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,6 ml/min, pumpgradienten 15-5 och med konstant saltkoncentration om 70 mM NaCl. Notera toppen för Atenolol, som skymms bakom texten i kromatogrammet, samt att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,25 μ l

²Injektionsvolym: 0,5 μ l

³Dubbeltopp av Formoterol

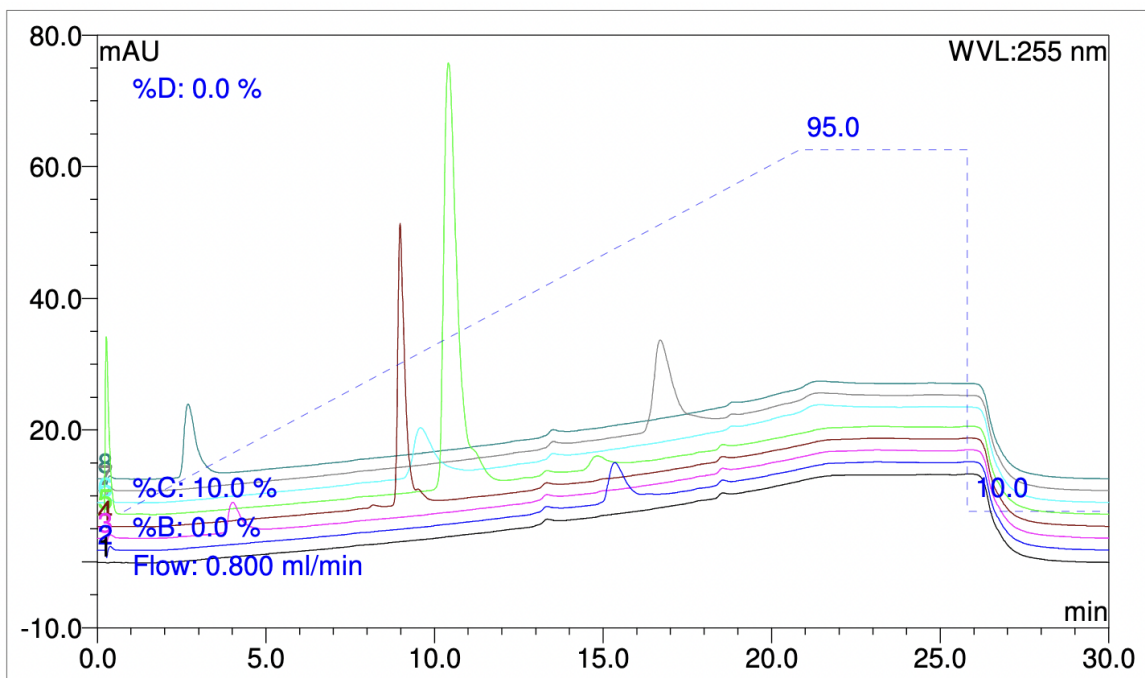


Figur B.42: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Budesonid¹, Metoprolol, Formoterol², Formoterol³, Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,6 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med konstant saltkoncentration om 70 mM NaCl. Notera toppen för Atenolol, som skymts bakom texten i kromatogrammet, samt att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,25 μ l

²Injektionsvolym: 0,5 μ l

³Dubbeltopp av Formoterol



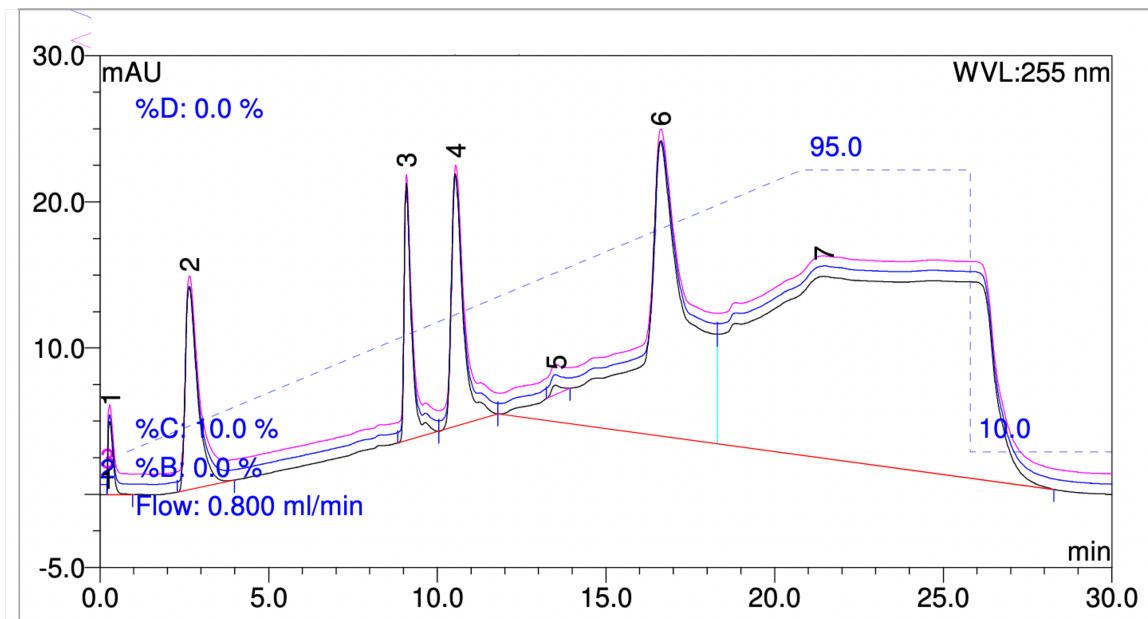
Figur B.43: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Budesonid¹, Metoprolol, Formoterol², Formoterol³, Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,8 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med konstant saltkoncentration om 70 mM NaCl. Notera toppen för Atenolol, som skymts bakom texten i kromatogrammet, samt att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,25 μ l

²Injektionsvolym: 0,5 μ l

³Dubbeltopp av Formoterol

B.3.3.4 pH 4 - Repeterbarhet

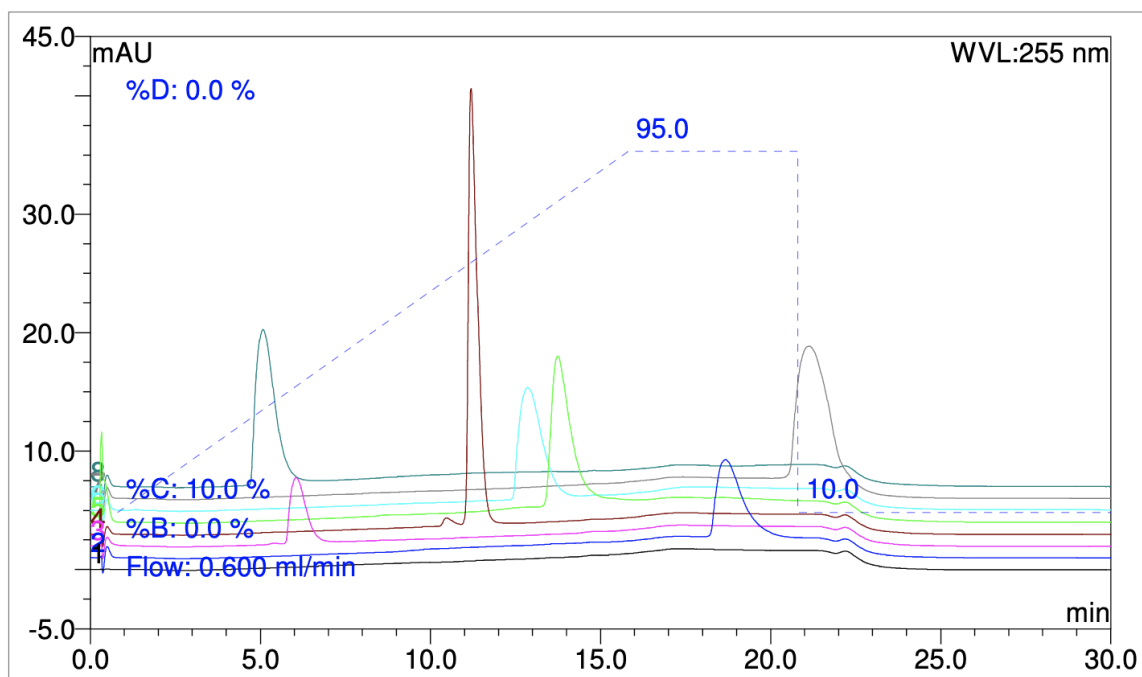


Figur B.44: Kromatogram som visar repeterbarhet av mix med substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Budesonid, Formoterol och Propranolol, Analys med flödet 0,8 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med salt i båda faserna. Notera att fas B här benämns som "C".

B.3.4 pH 6,2

I följande avsnitt kommer samtliga kromatogram för analyser vid pH 6,2 att presenteras. Vid pH 6,2 kördes endast konstant saltkoncentration.

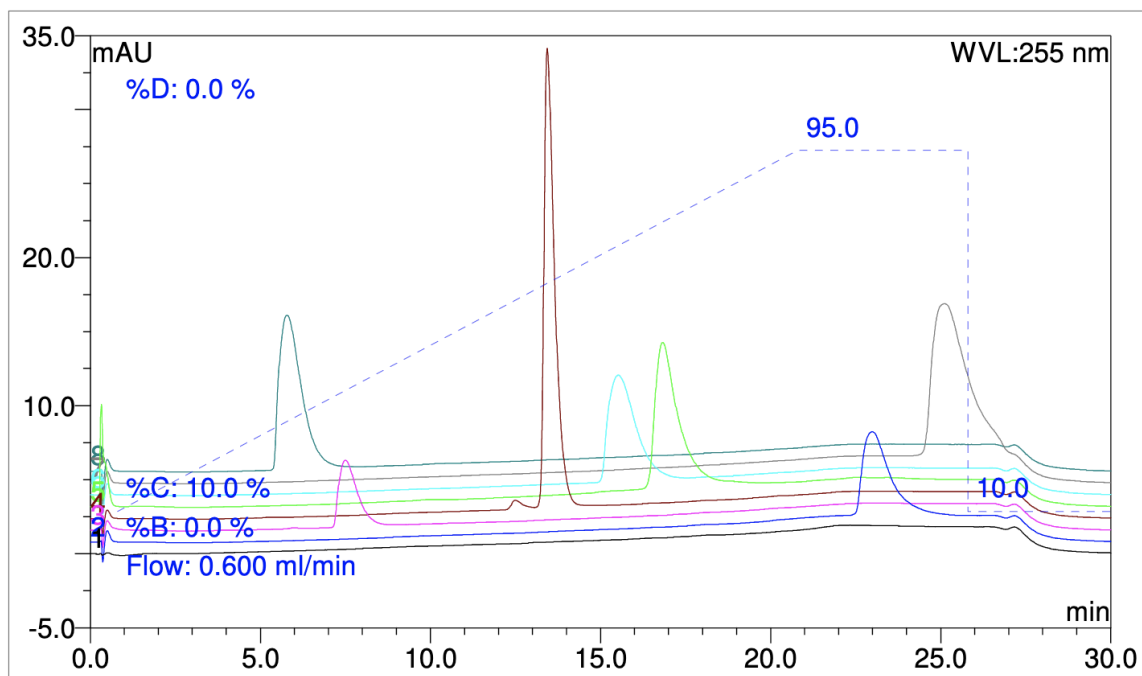
B.3.4.1 pH 6,2 - Konstant salt



Figur B.45: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Budesonid¹, Metoprolol, Formoterol², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,6 ml/min, pumpgradienten 15-5 och med konstant saltkoncentration om 70 mM NH₄Ac. Notera att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,25 µl

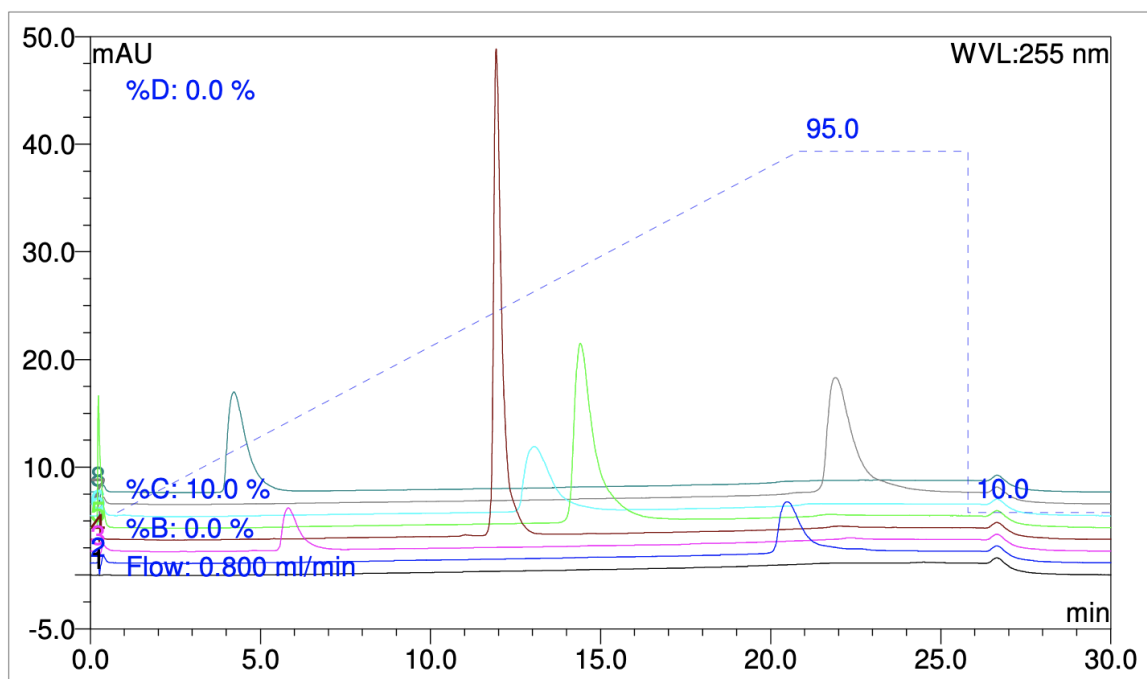
²Injektionsvolym: 0,5 µl



Figur B.46: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Budesonid¹, Metoprolol, Formoterol², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,6 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med konstant saltkoncentration om 70 mM NH₄Ac. Notera att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,25 µl

²Injektionsvolym: 0,5 µl



Figur B.47: Kromatogram som visar substanserna: (fr.v.) Salbutamol, Atenolol, Budesonid¹, Metoprolol, Formoterol², Alprenolol och Propanolol. Analys med flödet 0,8 ml/min, pumpgradienten 20-5 och med konstant saltkoncentration om 70 mM NH₄Ac. Notera att fas B här benämns som "C".

¹Injektionsvolym: 0,25 μ l

²Injektionsvolym: 0,5 μ l

C Beräkningar

C.1 Provspädning av läkemedelssubstanter till 1 mM

För att omvandla koncentrationerna från 1 mg/ml till mol/l med avseende på läkemedelssubstanserna användes ekvationerna (C.1) och (C.2)

$$c = \frac{n}{V} \quad (\text{C.1})$$

där c är koncentration, n är antalet mol och M är molmassa.

$$n = \frac{m}{M} \quad (\text{C.2})$$

där m är massa. Ekvationerna (C.1) och (C.2) kombineras och ger ekvation (C.3)

$$\Rightarrow c = \frac{m \cdot V}{M} = \frac{1 \cdot 1}{M} = \frac{1}{M} \quad (\text{C.3})$$

För att beräkna den volym som krävdes av respektive substans för att erhålla önskad volym och koncentration användes ekvation (C.4) och (C.5)

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2 \quad (\text{C.4})$$

$$V_1 = \frac{c_2 \cdot V_2}{c_1} \quad (\text{C.5})$$

Volymen metanol för att späda respektive substans beräknades enligt ekvation (C.6)

$$V_{\text{metanol}} = V_2 - V_1 = 1,5 - V_1 \quad (\text{C.6})$$

C.2 Beredning av mobilfaser

C.2.1 pH 1,9 & 2,3

Koncentrationen av fosforsyra räknades ut enligt ekvation (C.7)

$$c_{H_3PO_4} = \frac{V_{H_3PO_4} \cdot 0,84 \cdot \rho}{M} \quad (\text{C.7})$$

där $c_{H_3PO_4}$ är koncentrationen hos fosforsyran, $V_{H_3PO_4}$ är volym av fosforsyra, M är fosforsyrans molmassa (97,994 g/mol) samt ρ är fosforsyrans densitet (1880 g/l). Den uppmätta volymen av fosforsyra multiplicerades med 0,84, eftersom 84 volymprocentig fosforsyra användes. Volymen V approximerades till 1 liter eftersom bidraget från fosforsyran anses försumbart.

Koncentrationen av salt räknades ut enligt ekvation (C.8)

$$c_{NaCl} = \frac{m_{NaCl}}{M} \quad (\text{C.8})$$

där M är natriumklorids molekylvikt (58,44 g/mol) och V approximerades vara 1 liter enligt tidigare resonemang.

C.2.2 pH 3,8 & 4,2

Koncentrationen av natriumacetat räknades ut enligt (C.9)

$$c_{NaAc} = \frac{m_{NaAc}}{M} \quad (C.9)$$

där M är natriumacetats molekylvikt (82,03 g/mol) och V är totalvolymen i lösningen som approximerades till 1 liter enligt tidigare resonemang.

C.2.3 pH 6,2

Massan natriumacetat räknades ut enligt (C.10)

$$m_{NH_4Ac} = M \cdot c_{NH_4Ac} \quad (C.10)$$

där M är ammoniumacetats molekylvikt (77,08 g/mol) och c_{NH_4Ac} är den önskade koncentrationen av saltet i lösningen som var 70 mM.

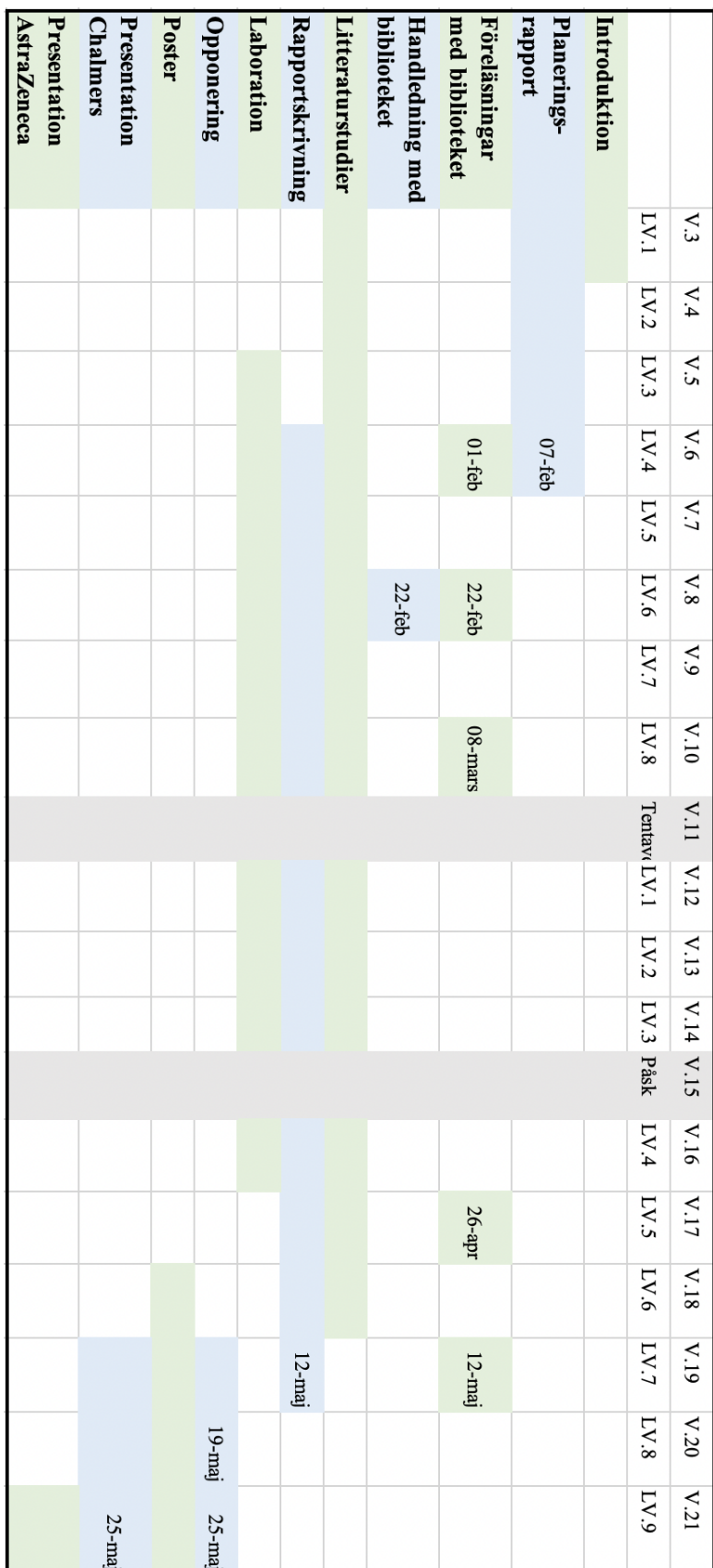
D Tidsplan

Tidsplanen för det här projekt presenteras i ett gantt-schema i figur D.1 för att ge en överblick över viktiga datum och deadlines, samt möjliggöra strukturering av arbetet från projektets början.

Genomgående under projektet kommer möten med handledarna Per Malmberg och Jan Olof Svensson hållas på fredagar klockan 08.00 för reflektion och frågeställning angående vad som genomförts under veckan och vad som ska påbörjas nästkommande vecka. I samband med dessa möten kommer gruppmedlemmarna ha ett internt möte för reflektion över den återkoppling som fås från handledarna. Kontakt med handledaren Anna Granfors kommer ske innan laborationstillfälle för att tillhandahålla substanser från AZ. Mittmöte är planerat att ske den 25/3 där en presentation av hur arbetet har gått hittills kommer presenteras.

Viktiga datum att förhålla sig till är inlämning av planeringsrapporten den 7/2, inlämning av slutrapport den 12/5, skriftlig opposition den 19/5, muntlig presentation och opposition på Chalmers den 25/5 samt presentation på AZ under vecka 21. Gruppen har satt som mål att vara klar med respektive inlämningar tre dagar innan satt deadline för att undvika att något krockar med överlappande kurs. Föreläsningar med biblioteket är inplanerade och alla förväntas delta på dessa, även de frivilliga, i avsikt att hålla arbetet igång samt att det kan vara bra för arbetsmoralen inom gruppen.

Värt att nämna om gantt-schemat är att de olika delarna kan kräva olika mycket tid då vissa infaller under samma veckor, till exempel kommer biblioteks föreläsningarna endast ta några timmar. Schemat är mest till för att se under vilka perioder saker kommer att vara aktuella. Vissa delar sker också omlott, så som laborativt arbete, litteraturstudie samt rapportskrivning vilka sker parallellt för att exempelvis kunna svara på frågeställningar som tillkommer under laborationer. Projektet är således en iterativ process.



Figur D.1: Gantt-schema för projektet

INSTITUTIONEN FÖR KEMI OCH KEMITEKNIK
AVDELNINGEN FÖR KEMI OCH BIOKEMI
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA

Göteborg, Sverige 2022

www.chalmers.se



CHALMERS