

Serienummer: UPKEMC-42

Lisa Lundqvist
lisa.lundqvist@telia.com

Undersökning av Corona CAD som universell detektor för vätskekromatografi

Examensarbete C
Analytisk kemi
Institutionen för kemi - BMC
Uppsala Universitet
VT13
Handledare: Per Sjöberg

Innehållsförteckning

Förkortningslista	3
Sammanfattning	4
Inledning	4
Utrustning och kemikalier	6
Utförande	7
Resultat och diskussion	9
Dynamiskt och linjärt område.....	10
Detektions- och kvantifieringsgräns.....	16
Signal för olika analyter.....	17
Gradientelueringar	21
Sammanfattning	22
Referenslista	23

Förkortningslista

Corona CAD

Corona Charged Aerosol Detector

EAA

Electrical Aerosol Analyzer

Sammanfattning

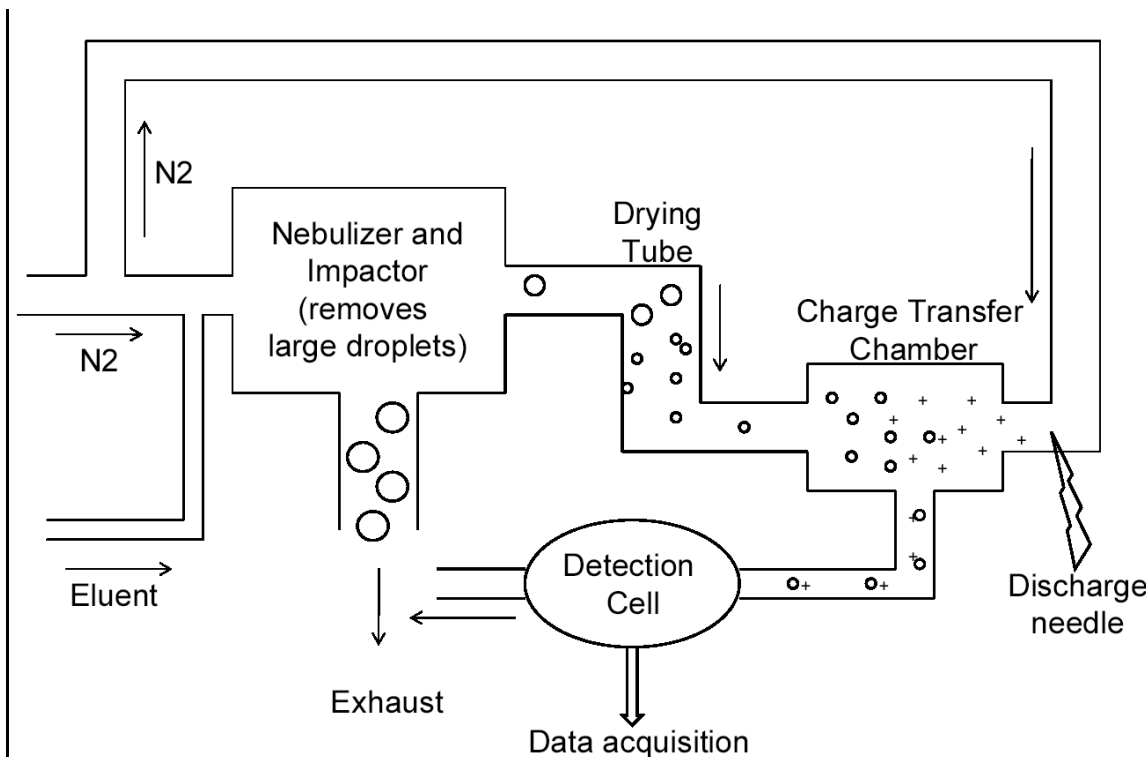
I detta examensarbete har en Corona CAD-detektor undersökts. Linjärt och dynamiskt område samt kvantifierings- och detektionsgräns undersöktes med analyten teofyllin. Detektorn skulle ge en universell signal för olika analyter, vilket undersöktes genom att analysera kalibreringskurvor för analyterna teofyllin, koffein, sackaros, naproxen och ibuprofen. Signalerna från Corona CAD jämfördes även med signaler från en UV-Vis-detektor, vilken seriekopplades till Corona CAD. En gradienteluering med fyra olika analyter analyserades för att avgöra om Corona CAD gav en ökad signal med högre andel organisk modifierare i mobilfasen, detta undersöktes även med isokratiska elueringar av teofyllin med olika halt acetonitril. Resultaten visade att Corona CAD gav en relativt universell signal för de analyter som användes, förutom de som var för flyktiga, vilka gav en betydligt lägre signal än förväntat. Det dynamiska området var stort, och det linjära området bestämdes till $0,3 \mu\text{g/ml} - 75,2 \mu\text{g/ml}$. Detektionsgränsen var högre för Corona CAD än för UV-Vis-detektorn, kvantifieringsgränsen bestämdes till $0,29 \mu\text{g/ml}$.

Inledning

Inom vissa branscher skulle det underlätta väldigt mycket om man kunde detektera analyter med en och samma detektor oberoende av kemiska egenskaper. Användningsområdena för en universell detektor som ger en universell signal oberoende av kemiska egenskaper och molekylens utseende kan framförallt illustreras inom läkemedelsindustrin där det är viktigt att kunna detektera föroreningar i de framställda preparaten. Man behöver kontrollera att mängden föroreningar hålls under en viss nivå relativt den aktiva substansen för att få sälja preparaten. Detta ställer stora krav på detektionsgräns och universell detektionsförmåga hos detektorn. I nuläget används ofta ett flertal detektorer för att kunna hitta och kvantifiera föroreningarna (Hutchinson et al., 2010). Den vanligaste detektorn för vätskekromatografi idag är UV-Vis-detektorer (Almeling, Ilko & Holzgrabe, 2012). En klar begränsning med denna detektor är att molekyler måste ha en kromofor som kan absorbera UV- eller synligt ljus för att kunna detekteras. Masspektrometri är också en populär detektor som är bra för identifiering av substanser, men inte lika bra för kvantifiering, och dessutom är kostnaden för en masspektrometer väldigt hög.

År 2002 (Dixon & Peterson, 2002) introducerades en ny detektor som skulle vara universell, billig och erbjuda en låg kvantifieringsgräns som senare kom att få namnet Corona Charged Aerosol Detector (Corona CAD). 2004 blev Corona CAD en kommersiellt tillgänglig detektor (Hutchinson et al., 2010). Corona CAD är en utveckling av den lite äldre Evaporative Light Scattering Detector (ELSD), som fungerar likadant till en början, men detekterar eluent-aerosolen med hjälp av laserljus istället för att ladda partiklarna (Dixon & Peterson, 2002). Corona CAD används oftast vid vätskekromatografi av något slag. Efter separation i kolonnen nebuliseras vätskan med hjälp av en bärgas (oftast kvävgas) och stora droppar sorteras bort. Aerosolen transporteras sedan till en upphettad kammare där flyktiga ämnen, framförallt den mobila fasen vaporiseras. En annan ström med bärgas passerar en korona och blir positivt laddad,

denna laddade ström krockar med och gör partiklarna laddade. För att minska bruset i detektorn tas sedan små partiklar (mestadels laddad bärgas) bort genom en negativt laddad stav. Detektion sker med en electrical aerosol analyzer (EAA) som detekterar laddningen (Almeling et al., 2012; Dixon & Peterson, 2002) Se figur 1, nedan.



Figur 1: Visar schematiskt hur en Corona CAD fungerar. Tagen från Almeling (2011) med författarens tillstånd.

Som med de flesta detektorer finns begränsningar även med Corona CAD. Till exempel måste analyten vara mindre flyktig än mobilfasen för att kunna detekteras, detektorn är känslig för föroreningar i mobilfasen på grund av sin universella detektionsförmåga, signalen från detektorn är inte linjär med avseende på analytens koncentration, men mer begränsade linjära områden finns, och även mobilfasens sammansättning påverkar signalen till stor del, vilket försvårar gradientelueringar (Hutchinson et al., 2010; Almeling et al., 2012; Vehovec & Obreza, 2010). Signalen från Corona CAD anses vara mass-flödesberoende. Kalibreringskurvor för Corona CAD brukar anpassas med potensfunktioner (Vehovec & Obreza, 2010).

I artiklar (Hutchinson et al., 2010; Górecki, Lynen, Szucs & Sandra, 2006) finns det flera förslag på hur man ska kunna göra för att hitta en bra anpassad kurva till signalerna från Corona CAD med avseende på mobilfasens sammansättning. Ett sådant förslag är att eliminera orsaken till att signalen inte blir linjär genom att se till att detektorn alltid blir försedd med en mobilfas av samma sammansättning. Detta kan göras genom att använda två stycken vätskekromatografiska gradientsystem vars flöde kopplas samman efter separation av analyterna, men innan de når detektorn. På detta sätt kan de två

gradientsystemen pumpa ut motsatta mobilfassammansättningar så att mobilfasen in till detektorn får konstant sammansättning (Górecki et al., 2006).

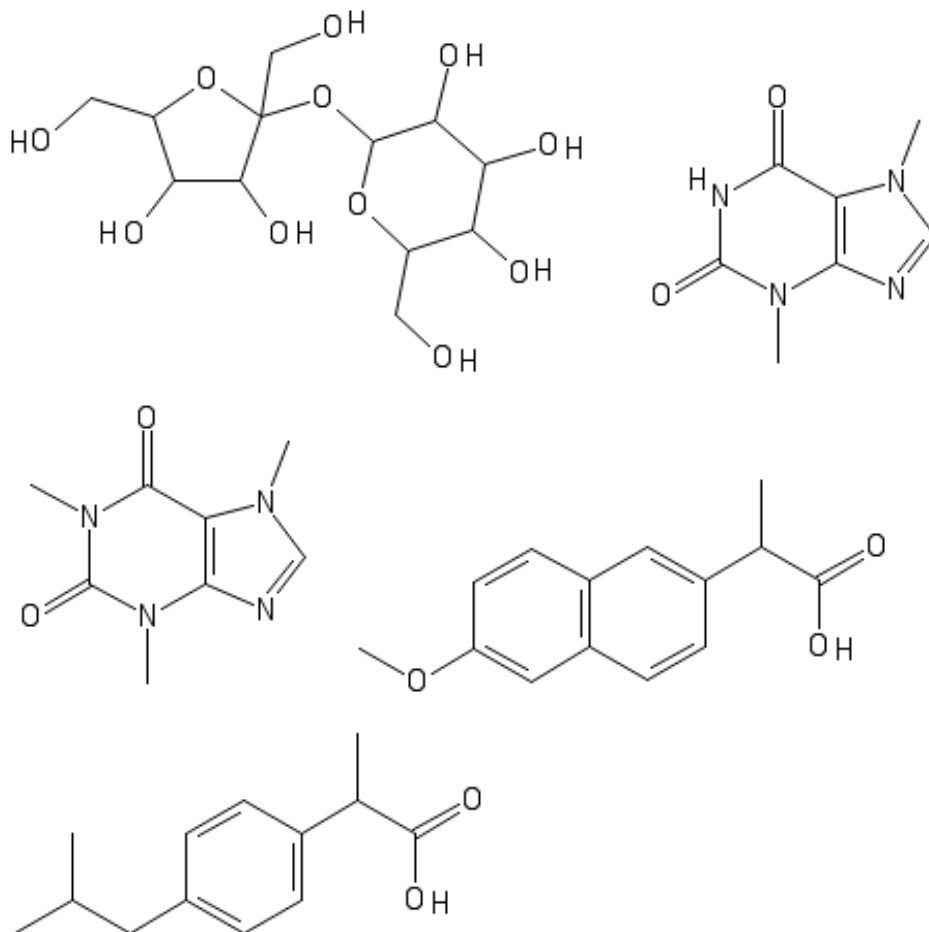
Anledningen till att signalen från detektorn inte är linjär med avseende på analytens koncentration kan vara att EAA, som detekterar partiklarna, är känslig för partikelstorlek. Vid partikelstorlekar med diameter över 10 nm minskar känsligheten och därmed signalen (Almeing et al., 2012). Vid hög koncentration kan tänkas att partiklarna klumpar ihop sig till större partiklar och därmed ger en lägre signal per molekyl.

Studier har utförts där signalen för olika typer av molekyler har testats. I en artikel (Hutchinson, et al., 2010) hittade man ett sätt att beskriva responsen som fås från Corona CAD med hänsyn till analytens koncentration och mobilfassammansättningen. Man testade en rad olika molekyler med varierande fysikaliska egenskaper, och fann att de allra flesta följde modellen med en felmarginal på ungefär 13%. Molekyler som inte följde modellen var antingen för flyktiga (kokpunkt < 400 °C) eller kvartära ammoniumföreningar (permanent laddade). Flyktiga ämnen förångas helt eller delvis i uppvärmningssteget i CADen och gav därmed en för låg signal. Varför permanent laddade partiklar, som kvartära ammoniumföreningar, ger dålig respons ger man ingen förklaring till.

Syftet med detta examensarbete var att undersöka detektorn Corona CAD. Egenskaper som skulle undersökas var bland annat linjäritet, detektionsgräns, kvantifieringsgräns, samt hur universell responsen från detektorn är för olika analyter med olika egenskaper.

Utrustning och kemikalier

Två detektorer användes, en UV-Vis-detektor (Jasco UV-970) vid 273 nm och en Corona CAD (Dionex Corona Ultra RS) där kväve användes som bärgas med ett tryck i detektorn som varierade mellan 35,0 och 35,1 psi, temperaturen hölls konstant vid standardinställningen för detektorn. Ett HPLC-system med två pumpar (Jasco PU-980) användes med en C-18-kolonn (Chrompack, partikelstorlek 5 µm, längd 100 mm, innerdiameter 3mm) och en mobilfas bestående av 0,1% myrsyra i Milli-Q-vatten med acetonitril som organisk modifierare. Injektionsslingan för HPLC-systemet var 20 µl. Alla vätskor för injektion avluftades först i ultraljudsbad och filtrerades sedan genom ett 0,20 µl filter innan injektion i HPLC-systemet. Följande analyter användes i analyser: teofyllin, koffein, naproxen, ibuprofen, sackaros. Se figur 2, nedan, för strukturformler för analyterna, samt tabell 1, nedan, för molekylvikterna för substanserna. Följande analyter försökte användas initialt, men gav av olika anledningar inga resultat som gick att använda: kinin, betulin.



Figur 2: Molekylstrukturer för analyterna, översta raden från vänster: sackaros, teofyllin. Mittenraden från vänster: koffein, naproxen. Längst ner: ibuprofen.

Tabell 1: Molekylvikter för analyterna (Aylward & Findlay, 2008).

Analyt	Molekylvikt (g/mol)
Koffein	194,2
Teofyllin	180,2
Naproxen	230,3
Ibuprofen	206,3
Sackaros	342,3

Utförande

Analyter valdes ut efter vad som omnämns i artiklar (Hutchinson et al., 2010), samt efter vad som fanns tillgängligt. Vissa analyter visade sig vara i stort sett olösliga i den valda mobilfasen, och exkluderades därför från analyser.

Tanken var från början att skapa en blandning med analyter där tillräcklig separation kunde erhållas för att analysera samtliga analyter vid isokratiska elueringar. En

analytblandning med följande analyter blandades till: kinin, betulin, teofyllin, koffein, naproxen och ibuprofen. Analyterna löstes först i nödvändiga mängder etanol och späddes sedan med 0,1% myrsyra i Milli-Q-vatten. Analytblandningen eluerades isokratiskt vid mobilfassammansättningar 80-20% acetonitril, med intervall av 10% acetonitril. Detektion skedde med enbart UV-Vis-detektorn eftersom Corona CAD inte hade hunnit installeras. Varje analyt eluerades sedan separat med 50% acetonitril för att identifiera topparna.

Corona CAD seriekopplades till UV-Vis-detektorn för att minska antalet nödvändiga elueringar. Olika inställningar för filter (minskar brus) och range¹ testades. Inställningen som valdes för filter var högsta möjliga ("Corona"), vilket rekommenderades för HPLC-analys i manualen för instrumentet, och inställningen för range varierades beroende på signalens styrka.

Teofyllin och koffein valdes ut för att testa Corona CADs dynamiska område och linjäritet. Dessa analyter separerades isokratiskt vid en mobilfassammansättning av 10% acetonitril. Alla analyter späddes med mobilfasen om inte annat anges. En stamlösning tillverkades genom invägning av analyterna och upplösning i mobilfasen 10% acetonitril med hjälp av ultraljudsbad, slutlig koncentration blev ca 1 mg/ml. Sedan vägdes stamlösning upp för att spädas till standardlösningar, och densiteten för stamlösningen mättes. Fem olika standardlösningar eluerades isokratiskt tre gånger vardera och kalibreringskurvor för koffein och teofyllin ritades upp i Excel. På grund av oväntade resultat bereddes två nya stamlösningar för varje analyt, där den ena var mycket svagare än tidigare beredda stamlösning och den andra löstes i Milli-Q-vatten. Kalibreringskurvor togs fram för de nya lösningarna. I alla kalibreringskurvor användes medelvärdet för varje koncentration. De första stamlösningarna av teofyllin och koffein användes sedan för att bereda fler standardlösningar, vilka alla eluerades isokratiskt tre gånger vardera för att få till en kalibreringskurva som sträckte sig över ett så stort dynamiskt område för Corona CAD som möjligt.

Detektionsgräns och kvantifieringsgräns för teofyllin beräknades utifrån sju elueringar av en standardlösning med koncentrationen 0,121 µg/ml. Detektionsgräns, kvantifieringsgräns, dynamiskt område och linjärt område definieras enligt följande:

Detektionsgräns = 3*standardavvikelsen mätt i koncentration

Kvantifieringsgräns = 10*standardavvikelsen mätt i koncentration

Dynamiskt område = det koncentrationsområde där signalen fortfarande ökar med ökande koncentration, och detektorn ej bottnat.

¹ Range är en inställning för det strömintervall som detektorn omvandlar till outputintervallet 0-1 volt, vilket är det spänningsintervall som datorn klarar av för att ta emot signaler.

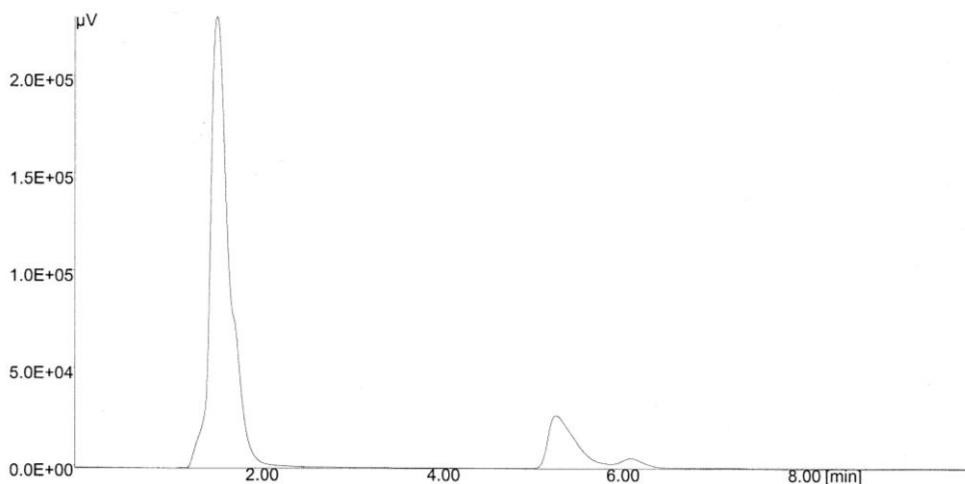
Linjärt område = det koncentrationsområde där en linjär trendlinjeanpassning i Excel ger ett R^2 -värde med minst två nior, och värdet inte förbättras avsevärt då området minskas med en punkt.

För att kunna analysera övriga analyter ändrades mobilfassammansättningen till 50% acetonitril. Ibuprofen, naproxen, teofyllin och sackaros analyserades isokratiskt vid denna mobilfassammansättning. En kalibreringskurva med fem punkter (tre elueringar för varje punkt) konstruerades för varje analyt för att testa hur universell detektorns respons var. För samtliga analyter med absorption vid 273 nm konstruerades en kalibreringskurva för Corona CAD och en kalibreringskurva för UV-Vis-detektorn. För övriga analyter konstruerades enbart en kalibreringskurva för Corona CAD.

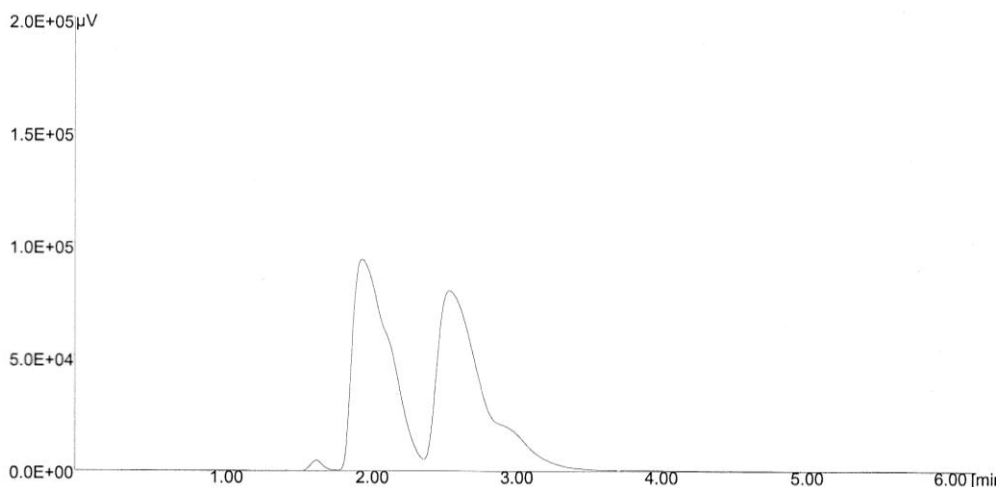
En gradienteluering utfördes för en blandning av följande analyter: sackaros, teofyllin, naproxen och ibuprofen. Detta för att undersöka hur responsen från Corona CAD varierar med ökande andel organisk modifierare i mobilfasen. En linjär gradient från 5% acetonitril till 80% acetonitril över 30 min användes. Samma gradienteluering upprepades tre gånger.

Resultat och diskussion

Två kromatogram från de första elueringarna av analytblandning (med teofyllin, koffein, naproxen, ibuprofen, kinin och betulin) visas i figur 3 och 4, nedan, från olika mobilfassammansättningar. Vid elueringar av varje analyt separat med 50% acetonitril visade det sig att ibuprofen ej absorberade vid 273 nm. Betulin bildade fällning vid spädning till låga halter organisk modifierare, och kunde därför inte analyseras vid lägre koncentrationer av acetonitril. Det undersöktes aldrig hur höga koncentrationer acetonitril som behövdes för att lösa betulin, men i 50% acetonitril löstes det inte. Kinin eluerade troligtvis inte vid lägre koncentrationer organisk modifierare, för ingen topp kunde observeras. Vid låga koncentrationer organisk modifierare i mobilfasen och höga koncentrationer kinin i den injicerade vätskan kunde först inga toppar alls observeras, sedan eluerades stora, utdragna toppar som kanske kan antas vara delar av kinin som trots allt eluerades. Koffein och teofyllin eluerades snabbt med 50% acetonitril, med i stort sett ingen retention alls. Både koffein och teofyllin absorberar vid 273 nm. Naproxen kunde identifieras med en retentionstid på strax över sex minuter, analyten detekterades av UV-Vis-detektorn.



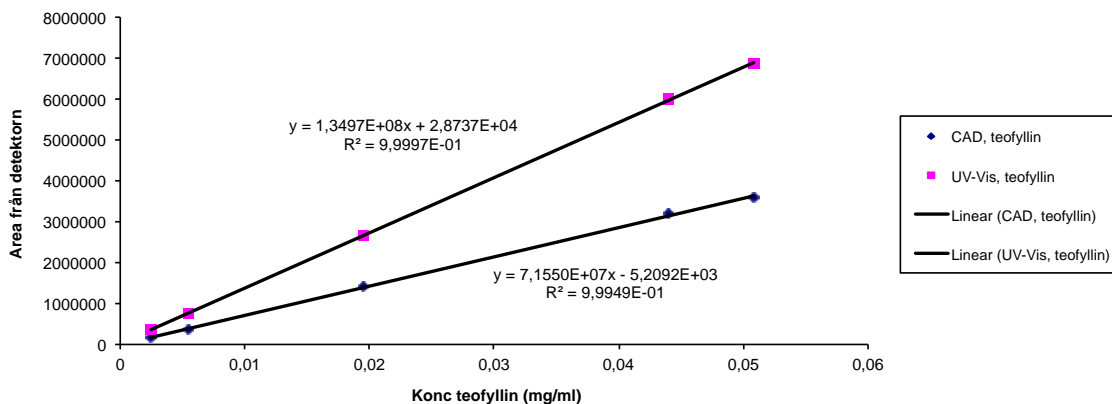
Figur 3: Kromatogram vid eluering av analytblandningen med mobilfasen 50% acetonitril. UV-Vis-detektor, den första toppen inkluderar både koffein och teofyllin, toppen vid ca 6 minuter identifierades som naproxen.



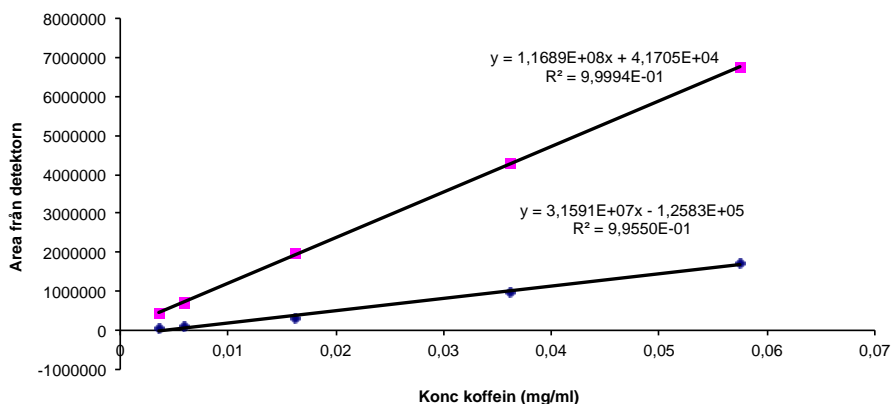
Figur 4: Den första delen av kromatogrammet vid eluering av analytblandningen med 30% acetonitril. UV-Vis-detektor, topparna är troligtvis teofyllin (eluerades först) och koffein (eluerades med lite mer retention).

Dynamiskt och linjärt område

För att undersöka det dynamiska och linjära området för Corona CAD valdes koffein och teofyllin eftersom de två analyterna visade sig ge god separation med 10% acetonitril, och båda två absorberade vid 273 nm vilket tillät jämförelse mellan de två detektorerna. Teofyllin eluerades först och koffein hade en lite längre retentionstid med 10% acetonitril. Vid elueringar av koffein och teofyllin noterades att koffeinet gav en mycket svagare signal från Corona CAD än vad teofyllin gav vid liknande koncentrationer. Detta syntes även då kalibreringskurvorna konstruerades, se figurer 5 och 6, nedan.

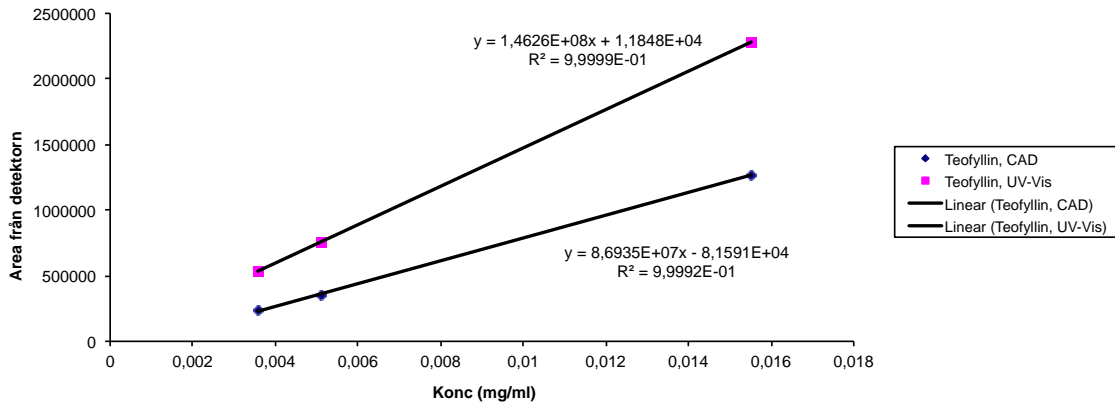


Figur 5: Kalibreringskurvor för teofyllin med 10% acetonitril i mobilfasen.

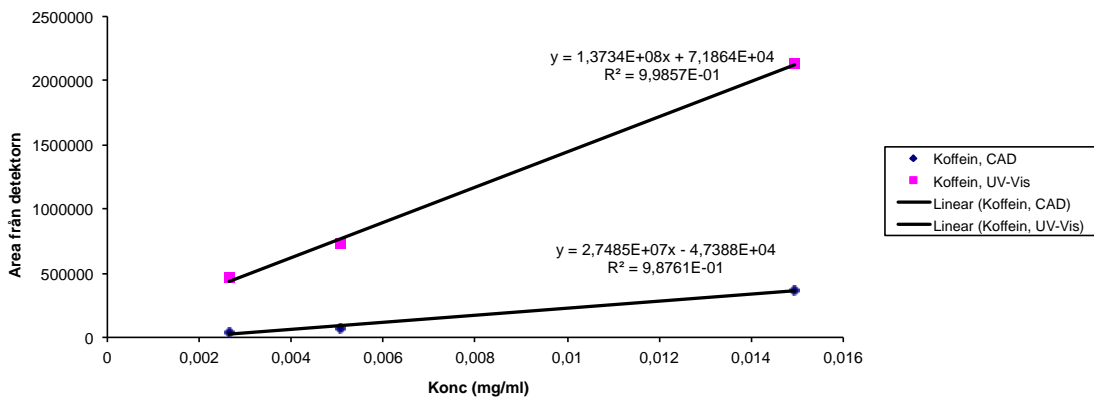


Figur 6: Kalibreringskurvor för koffein med 10% acetonitril i mobilfasen.

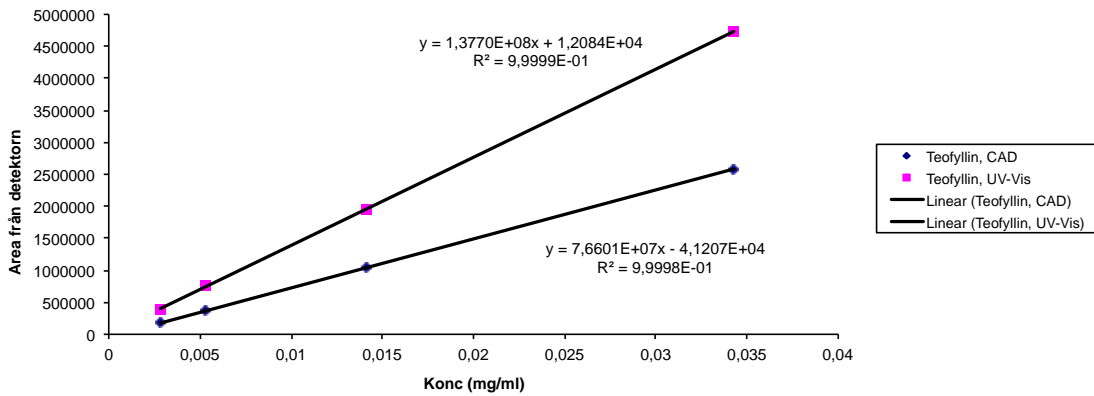
För att undersöka om de olika responserna för analyterna berodde på att koffeinet inte lösts helt i stamlösningen så tillverkades två nya stamlösningar för båda analyterna. Den ena stamlösningen tillverkades med bara en femtedel av koncentrationen i den första stamlösningen. Ingen fällning kunde observeras i den tidigare beredda stamlösningen, så en lägre koncentration analyt antogs därmed kunna lösa sig helt. Den andra nya lösningen löstes i Milli-Q-vatten istället för mobilfas (10% acetonitril). Tidigare erfarenheter har visat att koffein är lösligt i vatten i mängder runt 1 mg/ml. Standardlösningar späddes från de nytillverkade stamlösningarna och eluerades tre gånger vardera med 10% acetonitril. Kalibreringskurvorna syns i figurer 7, 8, 9 och 10, nedan.



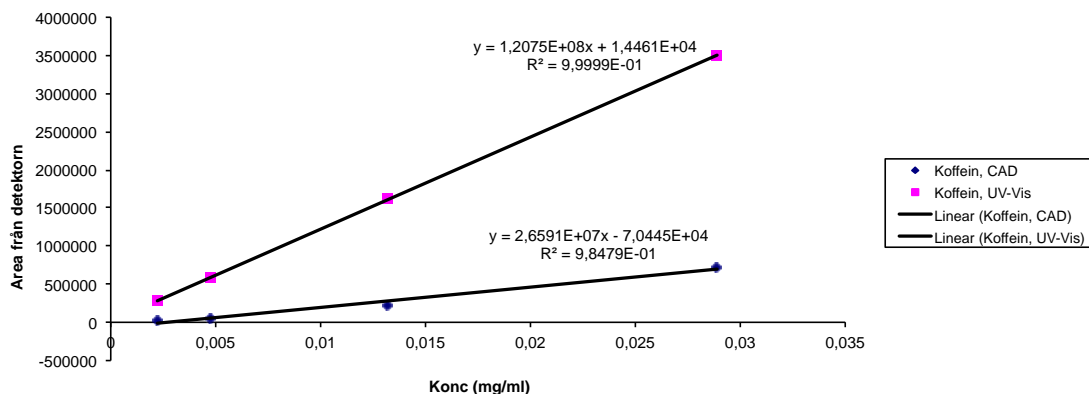
Figur 7: Kalibreringskurva för teofyllin, från den svagare stamlösningen, med 10% acetonitril i mobilfasen.



Figur 8: Kalibreringskurva för koffein, från den svagare stamlösningen, med 10% acetonitril i mobilfasen.



Figur 9: Kalibreringskurvor för teofyllin, från stamlösningen i Milli-Q-vatten, med 10% acetonitril i mobilfasen.



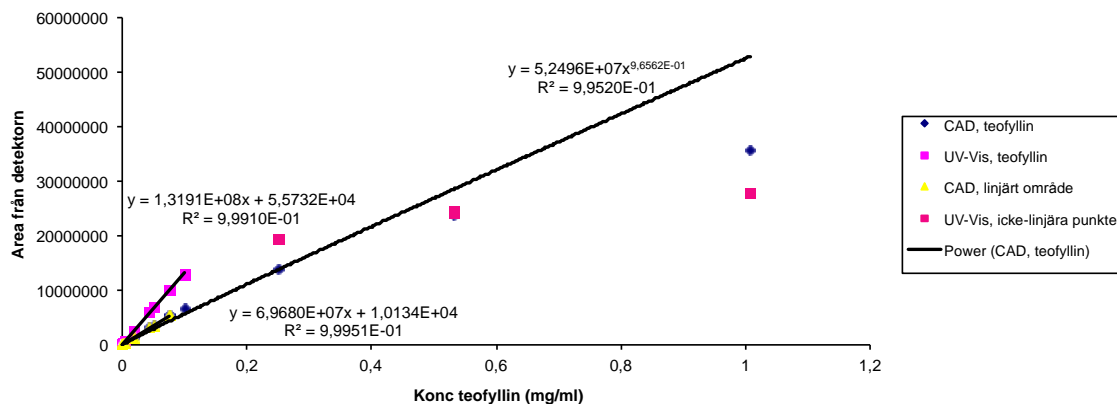
Figur 10: Kalibreringskurvor för koffein, från stamlösningen i Milli-Q-vatten, med 10% acetonitril i mobilfasen.

Samma trend där koffein gav en lägre signal än teofyllin kunde observeras även för de nyberedda lösningarna och slutsatsen drogs att det inte var fel på koffeinets löslighet i mobilfasen. Den troliga förklaringen är att koffein är för flyktigt för Corona CAD, med de inställningar som användes. Se figur 2 (s. 6) för molekylstrukturerna för teofyllin och koffein. Det kan noteras att koffein har en extra metylgrupp jämfört med teofyllin. Denna metylgrupp kan tänkas skärma kvävet och göra molekylerna mindre polära. Detta stärks av att koffein har en längre retentionstid i C-18-kolonnen, vilket innebär att den är mindre polär än teofyllin. Mindre polära molekyler har i regel lägre kokpunkt, och ämnen som är för flyktiga förångas i förångningssteget i Corona CAD (se figur 1, ovan). Detta leder till att en mindre mängd analyt når detektorn och därmed att signalen blir lägre än förväntat. Enligt en artikel (Hutchinson et al., 2010) går gränsen för ämnen som är för flyktiga för Corona CAD vid en kokpunkt runt 400 °C, inga säkra uppgifter om kokpunkt för koffein har kunnat hittas.

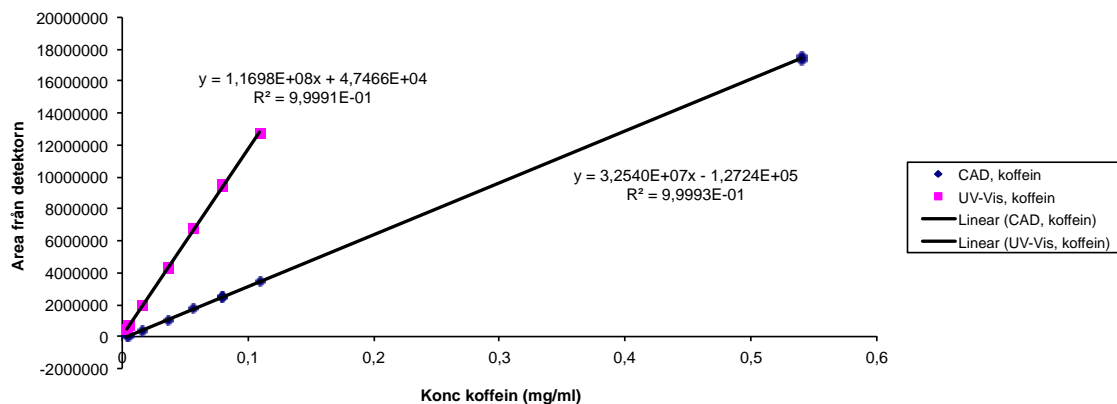
Med tanke på hur liknande molekylstrukturerna för de två molekylerna är kan tänkas att de har liknande molekylär absorptivitet (ϵ) vid våglängden 273 nm. Inga säkra uppgifter om detta har hittats i litteraturen. Detta innebär att de två analyterna bör ha ungefär lika lutning på kalibreringskurvor för UV-Vis-detektorn, vilket de också har enligt resultaten ovan. Så en jämförelse kan göras mellan kvoten för lutningarna på kurvorna mellan de två detektorerna. Kvoten UV-Vis-lutning/CAD-lutning blev för teofyllin ungefär 1,2 i genomsnitt för de tre stamlösningarna, för koffein-kurvorna blev samma kvot ungefär 3,3 för alla tre stamlösningarna. Dessa kvoter tyder på att Corona CAD inte ger en lika stark universell signal för de två analyterna. Detta pekar också på att koffein kan vara för flyktig för Corona CAD.

Tolv olika standardlösningar samt stamlösningarna med koffein och teofyllin eluerades, med 10% acetonitril, för att skapa en kalibreringskurva och undersöka linjäritet samt det dynamiska området för Corona CAD. Resultaten visas i figurer 11 och 12, nedan. En trendlinje har lagts till för hela det undersökta dynamiska området för Corona CAD, för

teofyllin (figur 11) har trendlinjen inte anpassats linjärt utan som en potensfunktion med trendlinjefunktionen i Excel.



Figur 11: Kalibreringskurvor för teofyllin, från den första stamlösningen, med 10% acetonitril i mobilfasen.



Figur 12: Kalibreringskurvor för koffein, från den första stamlösningen, med 10% acetonitril i mobilfasen.

Corona CAD har ett väldigt stort dynamiskt område, till stor del tack vare inställningsalternativet range, vilket kan anpassas efter toppens storlek så att både små och stora toppar kan ge en tydlig signal. En övre gräns för det dynamiska området kunde inte identifieras med de experiment som utförts, men de täcker in ett stort område av koncentrationer, och räckte långt utanför det linjära området. Dock bör noteras att baslinjen för Corona CAD är ganska instabil i jämförelse med baslinjen för UV-Vis-detektorn, se exempelvis figur 13, nedan, samt gradientelueringen i figur 19, nedan, vilket kan vara en klar nackdel vid analyser av analyter med låga koncentrationer. Detta kan ses vid jämförelse av detektionsgränserna för de två olika detektorerna (se diskussion kring detta nedan). Corona CAD är väldigt känslig för föroreningar i både mobilfasen och injektionen, detta kunde observeras bland annat genom att det alltid eluerades en liten

topp utan retentionstid då analyser utfördes, samt att förändringar i baslinjens höjd kunde noteras vid byte till ny fräsch mobilfas. Baslinjen sjönk märkbart vid byte från mobilfas som stått framme ett par veckor till nyberedd mobilfas, bakgrundsströmmen kunde halveras om den tidigare mobilfasen stått framme länge. Detta beror troligtvis på att mobilfasen drog till sig föroreningar när den stod framme, vilket gav en högre bakgrundsström. Vid byte till ny mobilfas minskade bakgrundsströmmen troligen på grund av färre föroreningar i vätskan.

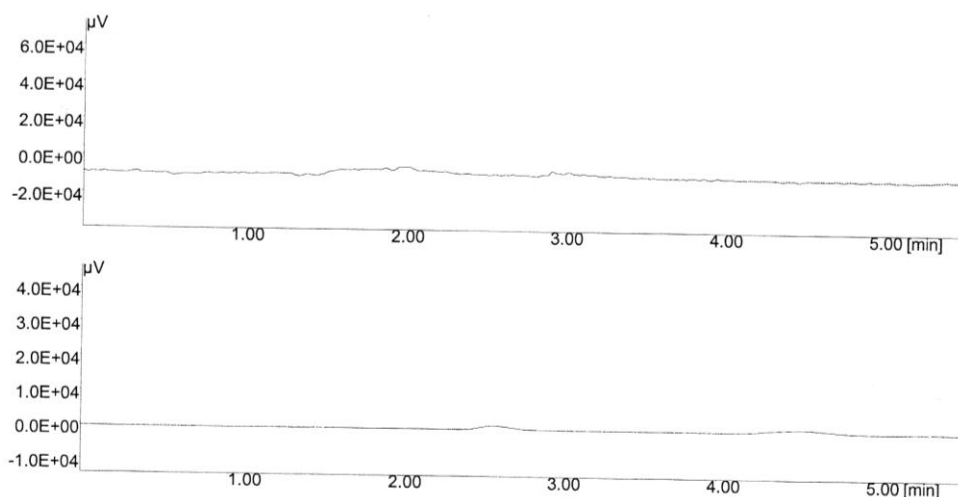
Det linjära området för Corona CAD, samt det dynamiska område som uppmättes för teofyllin presenteras i tabell 2, nedan. Det linjära området för teofyllin hade ett R^2 -värde på 0,9995.

Tabell 2: Det uppmätta linjära området, samt uppmätta dynamiska området för Corona CAD, där analyten var teofyllin.

Dynamiskt område	Minst 0,3 µg/ml – 1 mg/ml
Linjärt område	0,3 µg/ml – 75,2 µg/ml

Linjäriteten (R^2 -värdet) för CAD varierar enligt en reviewartikel (Vehovec & Obreza, 2010) oftast mellan 0,99 och 0,999. Vilket stämmer bra överrens med ovan resultat. Det linjära området varierar ännu mer (Almeling et al., 2012) allt från 1-20 ng injicerat, till 30-2000 ng injicerat, det nämns dock inte vilken definition som använts för det linjära området. Resultatet ovan översatt till ng injicerat (20 µl injektionsloop) blir ca 5,4 – 1500 ng. Med tanke på de varierande resultaten från artiklarna är det svårt att dra några slutsatser, men det kan tänkas att det dynamiska och linjära området beror till stor del av vilken koncentration organisk modifierare som används, eftersom signalen förstärks vid högre koncentrationer organisk modifierare (se nedan för mer diskussion kring detta). Det kan tänkas att detektorn snabbare bottenar för Corona CAD vid högre halter organisk modifierare, och därmed att det dynamiska och linjära området minskar. Dock skall noteras att det i artiklarna inte framgår vilken definition som använts för det linjära området, vilket kan förklara skillnaderna i resultat. Det dynamiska området har en artikel rapporterat (enligt Vehovec & Obreza, 2010) sträcka sig över ett koncentrationsintervall av ungefär $10^{4,2}$ mg/l, det uppmätta ovan är ej heltäckande eftersom signalen från Corona CAD ej bottenade inom det undersökta koncentrationsområdet, så det verkar rimligt att detektorn har ett större dynamiskt område än vad som presenteras ovan. De jämförelsevärden som används är inte för analyten teofyllin, men med tanke på att Corona CAD ska ge en universell signal anses dessa värden kunna användas i jämförelsesyfte.

Det linjära området för koffein täckte in ett mycket större koncentrationsområde än detsamma för teofyllin. Detta beror troligtvis på att känsligheten var lägre för koffein. På det sättet kan koffeinelösningarna ha hållit sig inom det linjära området för CAD-signalen trots höga koncentrationer. De lägsta koncentrationerna av koffein kunde inte detekteras av Corona CAD trots att samma koncentrationer för teofyllin kunde detekteras, förklaringen är den lägre känsligheten för koffein. Den lägsta koncentrationen av koffein och teofyllin (ca 0,05 µg/ml) kunde inte detekteras av Corona CAD, men kunde detekteras svagt av UV-Vis-detektorn, se figur 13, nedan.



Figur 13: Eluering av låg koncentration av koffein och teofyllin (ca 0,05 µg/ml), med 10% acetonitril. Överst: Corona CAD. Under: UV-Vis-detektor. Toppen för teofyllin kan anas strax före tre minuter i kromatogrammet från UV-Vis-detektorn, och toppen för koffein kan anas strax efter fyra minuter i samma kromatogram. Inga toppar för de två analyterna kan ses i kromatogrammet från Corona CAD.

Detektions- och kvantifieringsgräns

Detektionsgränsen och kvantifieringsgränsen beräknades från sju mätningar på en standardlösning med koncentration 0,121 µg/ml teofyllin. Detektionsgräns och kvantifieringsgräns för Corona CAD presenteras i tabell 3, nedan.

Tabell 3: Detektionsgräns och kvantifieringsgräns för Corona CAD, mätt med analyten teofyllin.

Detektionsgräns	0,088 µg/ml
Kvantifieringsgräns	0,29 µg/ml

Dessa värden stämmer bra överens med uppmätta data, med tanke på att vid koncentrationen 0,05 µg/ml kunde inga toppar identifieras, men vid 0,121 µg/ml kunde toppar identifieras, så det verkar rimligt att detektionsgränsen ska ligga någonstans mellan dessa två värden. De beräknade värdena stämmer dock inte så bra överens med litteraturvärden. Med en injektionsslinga på 20 µl motsvarar detektionsgränsen 1,8 ng och kvantifieringsgränsen motsvarar 5,8 ng. Artiklar som använt sig av en C-18-kolonn har fått detektionsgränser mellan 10 och 42 ng (Valcárcel, et al., 2010 enligt Almeling (2012)), vilket är klart högre än det beräknade ovan. Dock framgår inte från artikeln vilken definition som använts för detektionsgräns vilket kan förklara skillnaden. Troligtvis påverkar även mobilfasens sammansättning samt till viss del även vilken analyt som använts (flyktiga analyter bör ha en högre detektionsgräns). Artiklar har även fått kvantifieringsgränser mellan 45 och 756 ng (Valcárcel, et al., 2010 enligt Almeling (2012)) respektive mellan 3,9 och 11,3 ng (Loughlinn, et al., 2007 enligt Almeling (2012)). De senare värdena för kvantifieringsgränsen stämmer bra överens med det beräknade ovan, de tidigare värdena är dock väldigt mycket högre. I den första artikeln analyserades fosfolipider och biologiskt material (enligt Almeling, et al. 2012), medan den andra artikeln analyserade fettsyror. Det är inte orimligt att anta att den senare är mer

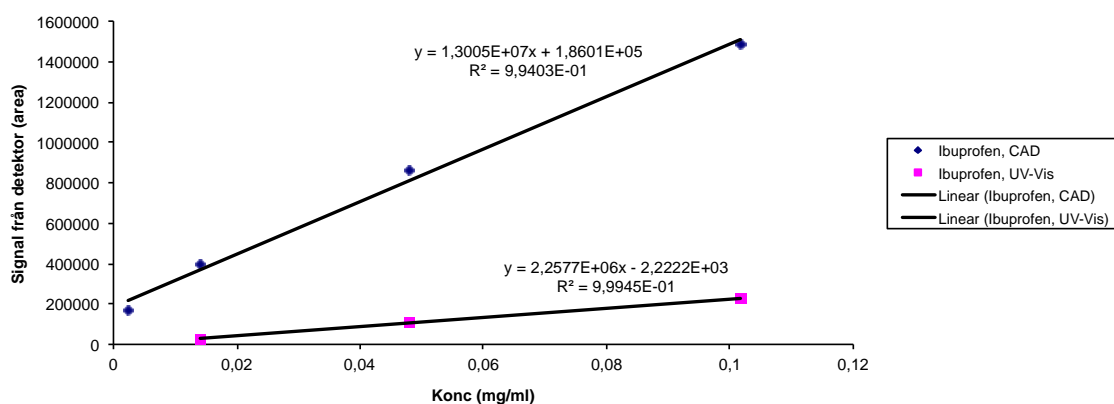
relevant för data i denna uppsats, biologiskt material skulle kunna innehålla mer föroreningar, samt bestå av komplexa molekyler som inte liknar de som använts för denna uppsats. Inte heller här framgår vilken definition som använts för kvantifieringsgränsen, vilket även det kan förklara skillnaderna mellan värdena.

Detektionsgränsen för UV-Vis-detektorn undersöktes inte i detta examensarbete, dock ansågs den lägre än för Corona CAD, för koffein och teofyllin, eftersom de lägsta koncentrationerna av teofyllin och koffein (ca 0,05 µg/ml) kunde detekteras av UV-Vis-detektorn men inte av Corona CAD. En artikel (Umemura, Kitaguchi, Inagaki & Haraguchi, 1998) bestämde detektionsgränsen för teofyllin med en C-18-kolonn och UV-Vis-detektor, men annan mobilfas, till 0,025 µg/ml. Detta kan ge en uppfattning om detektionsgränsen för analyten. Enligt denna siffra är detektionsgränsen för Corona CAD ca tre gånger högre än för UV-Vis-detektorn för teofyllin, vilket kan stämma överens med ovan observationer.

Signal för olika analyter

Då kalibreringskurvor togs fram för fler analyter kan både för- och nackdelar med Corona CAD visas.

Ibuprofen var ytterligare en analyt (förutom koffein) som gav en svag signal i jämförelse med andra analyter. Detta är troligtvis på grund av att även ibuprofen är för flyktig för analys med Corona CAD, vilket stämmer överens med observationer gjorda av Hutchinson och medarbetare (2010). Kalibreringskurvan för ibuprofen finns i figur 14, nedan. Detta stärker teorin ovan om att koffein var för flyktig för detektorn, eftersom dessa två analyter betedde sig väldigt lika.

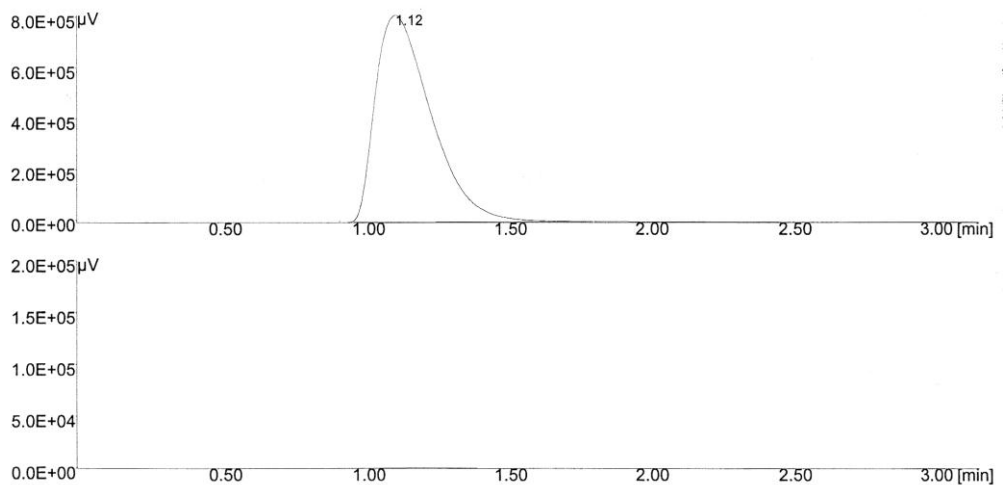


Figur 14: Kalibreringskurvor för ibuprofen, med 50% acetonitril i mobilfasen.

Värt att notera för de mer flyktiga analyterna är att kurvorna trots allt ger en bra linjär anpassning. För koffein var R^2 -värdet från den första stamlösningens kalibreringskurva 0,9999, och för ibuprofen var R^2 -värdet 0,99. Detta tyder på att det inte är någon större

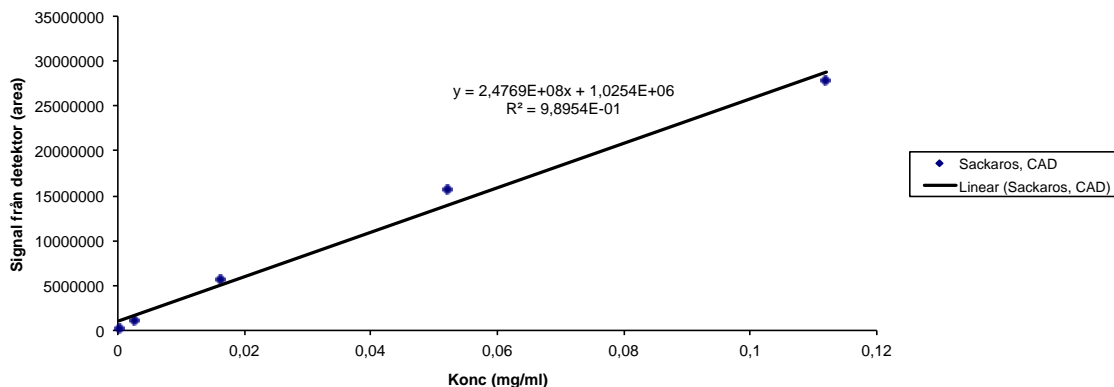
variation i signalerna, trots analyternas flyktighet. Tyvärr hann inte precisionen testas ytterligare för flyktiga och icke-flyktiga analyter, det hade varit intressant att jämföra den relativa standardavvikelsen mellan signalerna för dessa två typer av analyter.

Sackaros detekterades utan problem av Corona CAD, även i små mängder. Dock detekterades den inte alls av UV-Vis-detektorn. Se figur 15, nedan, vilken tydligt visar på en av de största fördelarna med Corona CAD som detektor, nämligen detektion av analyter som saknar kromofor.

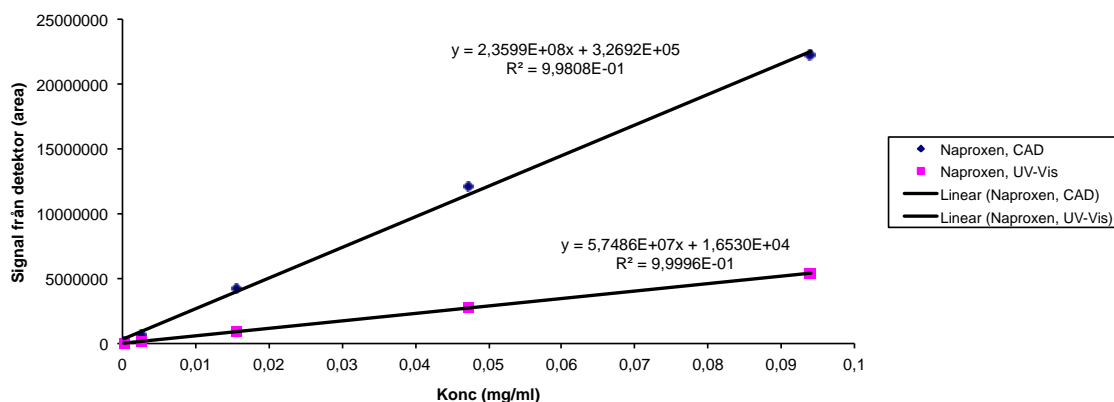


Figur 15: Eluering av sackaros med 50% acetonitril i mobilfasen. Överst: Signalen från Corona CAD. Under: Signalen från UV-Vis-detektorn.

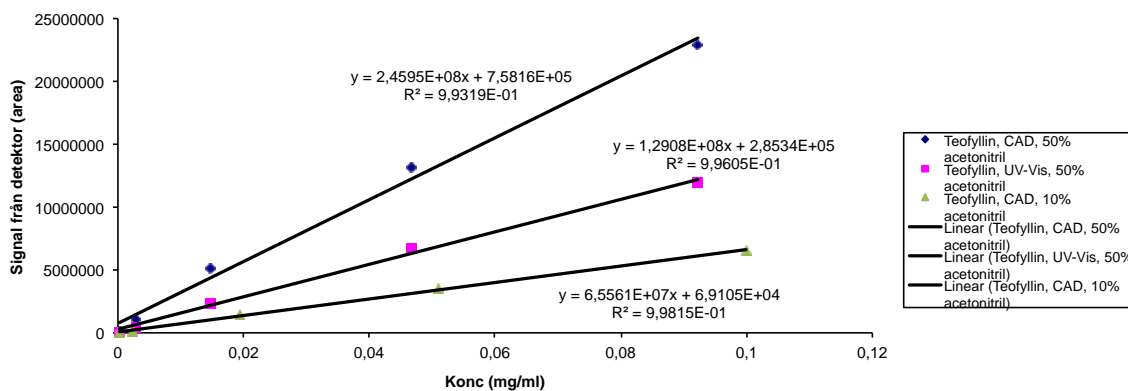
Naproxen eluerades också med 50% acetonitril, och gav en signal liknande teofyllin, naproxen detekterades av båda detektorerna. Teofyllin eluerades med 50% acetonitril för att kunna jämföra kalibreringskurvan med den vid 10% acetonitril. Med 50% acetonitril i mobilfasen var baslinjen mycket brusigare än tidigare, vilket tyder på att signalerna förstärks med högre halter organisk modifierare (se nedan för ytterligare diskussion kring detta fenomen). Se figur 16, 17 och 18, nedan, för kalibreringskurvorna för analyterna sackaros, naproxen och teofyllin. Trendlinjerna anpassades linjärt till punkterna i diagrammen, för att kunna jämföra dem, men troligtvis skulle en potensfunktion passa bättre.



Figur 16: Kalibreringskurva för sackaros, med 50% acetonitril i mobilfasen.



Figur 17: Kalibreringskurvor för naproxen, med 50% acetonitril i mobilfasen.



Figur 18: Kalibreringskurvor för teofyllin, mobilfas 50% acetonitril, samt kalibreringskurva från Corona CAD med 10% acetonitril.

De tre analyterna sackaros, naproxen och teofyllin har alla liknande lutning på Corona CAD-kurvorna: $2,48 \cdot 10^8$, $2,36 \cdot 10^8$ respektive $2,46 \cdot 10^8$, detta är en relativ skillnad på ca 5%, vilket kan anses vara relativt lika. Ibuprofen har flackare lutning, vilket var väntat med tanke på analytens flyktighet. För UV-Vis-kurvorna varierar lutningen betydligt mer, naproxen har ungefär 30% av lutningen för teofyllin, och ibuprofen har ca 1% av samma lutning. För sackaros saknas UV-Vis-data helt eftersom inga toppar vid 273 nm kunde observeras för analyten. Resultaten tyder på att Corona CAD ger en mer universell signal för olika analyter. UV-Vis-kurvorna ovan har väldigt varierande lutning, vilket visar på en klar styrka hos Corona CAD som detektor.

Som ett sätt att jämföra kalibreringskurvorna lite bättre valdes tre olika signalstyrkor, dessa tre signalstyrkor lästes alla av från kalibreringskurvorna för sackaros, naproxen och teofyllin. De resulterande koncentrationerna jämfördes, och den procentuella avvikelsen av det högsta koncentrationvärdet från det minsta koncentrationvärdet vid varje signalstyrka beräknades, se tabell 4, nedan.

Tabell 4: Jämförelse av kalibreringskurvorna för sackaros, naproxen och teofyllin med 50% acetonitril, genom jämförelse av tre signalstyrkors motsvarighet i koncentration, samt den procentuella avvikelsen av det högsta koncentrationvärdet från det minsta.

Signal från detektor (area)	Konc från sackaroskurvan (mg/ml)	Konc från naproxenkurvan (mg/ml)	Konc från teofyllinkurvan (mg/ml)	Procentuell avvikelse mellan minsta och största värdet (%)
1100000	0,000500	0,00387	0,00171	674
9000000	0,0400	0,0434	0,0412	8,5
15000000	0,0700	0,0734	0,0712	4,9

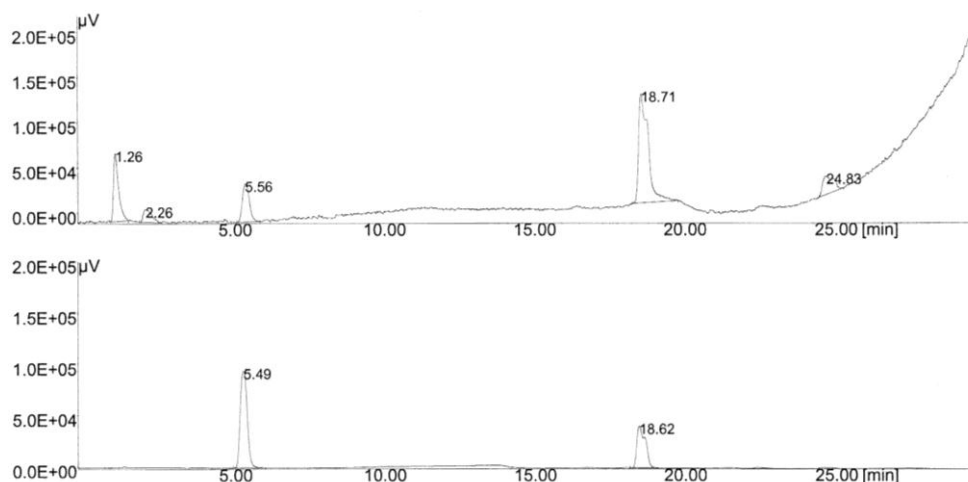
I tabell 4 syns att vid lägre koncentrationer stämmer kurvorna dåligt överens, men vid lite högre koncentrationer stämmer kurvorna bättre, och den relativa avvikelsen mellan dem är mindre än 10%. Detta kan troligtvis förbättras med potenskurvor istället för linjära anpassningar. Vid jämförelse mellan kalibreringskurvornas ekvationer syns att lutningarna är väldigt lika, men kurvorna skär y-axeln vid väldigt olika värden (det skiljer en faktor fem), vilket kan förklara varför avvikelserna ovan minskar vid högre signaler.

Ytterligare en jämförelse som är intressant att notera är skillnaden mellan kalibreringskurvorna för teofyllin vid de två mobilfaser som använts (10% respektive 50% acetonitril). Lutningen på kurvan (det linjära området) med 10% acetonitril var $6,74 \cdot 10^7$. När punkten med den högsta koncentrationen tas bort från trendlinjen med 50% acetonitril för att hålla kurvan mer inom det linjära området fås ett R^2 -värde på 0,9977 och en lutning på $2,79 \cdot 10^8$, om ytterligare en punkt tas bort fås ett R^2 -värde på 0,99999 och lutningen $3,22 \cdot 10^8$. Lutningen för mobilfasen med högre andel organisk modifierare är över fyra gånger lutningen för mobilfasen med lägre andel organisk modifierare. Detta talar för att signalen från Corona CAD är beroende av mobilfasens sammansättning, och att detektorn ger högre signaler vid högre andel organisk modifierare i mobilfasen.

Dixon och Peterson (2002) diskuterar hur partikelstorlek påverkar detektorns signal. Större partiklar får en större laddning av koronan i Corona CAD, och ger därför en större signal då de detekteras (dock blir laddningen per massenhet antingen lika stor som för mindre partiklar, eller lägre, se förklaring under inledningen, s. 6). De resonerar vidare att vissa hygroskopiska föreningar ger en större signal än väntat eftersom de bundit vattenmolekyler och därmed ökat i storlek. Det kan tänkas att något liknande händer vid högre halter organisk modifierare i mobilfasen, att en del av de organiska molekylerna binder till analyten, som detekteras som en större molekyl och därmed ger en högre signal än väntat. Någon bättre förklaring till fenomenet har inte påträffats, vilket kan bero på att det ej undersökts ordentligt då Corona CAD är en relativt ny detektor.

Gradientelueringar

Efter analys av analyterna ovan kunde det konstateras att det skulle gå att separera dessa med en gradienteluerung. En analytblandning med sackaros, teofyllin, ibuprofen och naproxen tillverkades och eluerades där mobilfasen ändrades från 5% acetonitril till 80% acetonitril linjärt under 30 min. Elueringen upprepades tre gånger. Se figur 19, nedan, vad gradienteluerungarna gav för resultat.



Figur 19: Kromatogram vid gradienteluerung med mobilfas 5-80% acetonitril under 30 min. Överst: Corona CAD. Under: UV-Vis-detektor. Topparna motsvarar följande analyter, för Corona CAD: vid 2,26 min sackaros, vid 5,56 min teofyllin, vid 18,71 min naproxen, vid 24,83 min ibuprofen. För UV-Vis-detektorn motsvarar toppen vid 5,49 min teofyllin, och toppen vid 18,62 min naproxen.

Det kan konstateras att vid högre koncentration organisk modifierare ökar bakgrundsbruset för Corona CAD. När koncentrationen acetonitril i mobilfasen började närma sig 80% var bakgrundsbruset starkare än topparna för analyterna. Ibuprofen-toppen kunde endast vagt urskiljas i två av de tre kromatogrammen, därav exkluderas den från jämförelser. I tabell 5, nedan, jämförs medelsignalen för de olika analyterna (översatt till koncentration från den linjära kalibreringskurvan för teofyllin med isokratisk eluerung i figur 11, ovan) med den egentliga koncentrationen för analyten.

Tabell 5: Analyternas koncentration enligt kalibreringskurvan för teofyllin med isokratisk eluering (10% acetonitril), den riktiga koncentrationen för varje analyt, samt avvikelsen mellan dessa två värden, vid gradienteluering.

Analyt	Koncentration enligt kalibreringskurvan (mg/ml)	Egentlig koncentration (mg/ml)	Andel av den egentliga koncentrationen (%)
Sackaros	0,00328	0,0122	26,9
Teofyllin	0,00890	0,00972	91,6
Naproxen	0,0356	0,0138	258

I tabell 5 syns tydligt att när andelen organisk modifierare i mobilfasen ökar så ökar även signalen från Corona CAD, dock kan det ej avgöras utifrån dessa data om ökningen i signal är linjär eller ej i förhållande till mobilfassammansättningen. Baslinjens ökning i signal verkade dock inte linjär i förhållande till mobilfasens sammansättning. Andelen organisk modifierare ökades konstant över 30 min, medan baslinjen ökade brant efter ca 25 minuter (se figur 19, ovan).

Sammanfattning

Experimenten beskrivna ovan visar på att Corona CAD ger en relativt universell signal för olika analyter, genom att kalibreringskurvorna för en del av de analyserade ämnena har lutningar som endast skiljer med 5%. Signalen från Corona CAD visade sig, som förväntat, öka vid högre andel organisk modifierare i mobilfasen. Flyktiga ämnen gav en lägre signal än förväntat, men gav trots allt linjära kalibreringskurvor.

Kvantifieringsgränsen för teofyllin bestämdes till 0,29 µg/ml och detektionsgränsen bestämdes till 0,088 µg/ml. Dessa värden stämmer bra överens med de toppar som kunde observeras vid isokratiska elueringar av olika koncentrationer av teofyllin. Det linjära området för Corona CAD bestämdes till 0,3 µg/ml – 75,2 µg/ml och det dynamiska området bestämdes till minst 0,3 µg/ml – 1 mg/ml. Dessa två kan dock tänkas vara beroende av mobilfasens sammansättning eftersom signalens styrka beror av mobilfasen.

Ytterligare undersökningar som vore väldigt intressanta att utföra för Corona CAD inkluderar mobilfaskompensering (se inledningen ovan) vid gradientelueringar. Det hade också varit intressant att se om det går att få en bättre signal från flyktiga ämnen om nebuliseringstemperaturen ändras för detektorn. Tertiära ammoniumföreningar hade även de varit väldigt intressanta att undersöka, eftersom de enligt en artikel (Hutchinson et al., 2010) inte ger en väntad signal, men även mer komplexa analyter vore intressant att se om de gav en universell signal.

Referenslista

- Almeling, S. (2011). *The use of aerosol-based detection systems in the quality control of drug substances*. Doktorsavhandling. Würzburg universitet. Hämtad 4 april, 2013, från <http://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/volltexte/2011/6472/pdf/AlmelingDiss.pdf>
- Almeling, S., Ilko, D. & Holzgrabe, U. (2012). Charged aerosol detection in pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 69(SI), 50-63. doi: 10.1016/j.jpba.2012.03.019
- Aylward, G. & Findlay, T. (2008). *SI Chemical Data* (6th ed.). Milton: John Wiley & Sons Australia, Ltd.
- Dixon, R.W. & Peterson, D.S. (2002). Development and testing of a detection method for liquid chromatography based on aerosol charging. *Analytical Chemistry*, 74(13), 2930-37. doi: 10.1021/ac011208l
- Górecki, T., Lynen, F., Szucs, R. & Sandra, P. (2006). Universal response in liquid chromatography using charged aerosol detection. *Analytical Chemistry*, 78(9), 3186-92. doi: 10.1021/ac060078j
- Hutchinson, J.P., Li, J., Farrell, W., Groeber, E., Szucs, R., Dicoski, G. & Haddad, P.R. (2010). Universal response model for a corona charged aerosol detector. *Journal of Chromatography A*, 1217(47), 7418-27. doi: 10.1016/j.chroma.2010.09.056
- Umemura, T., Kitaguchi, R., Inagaki, K. & Haraguchi, H. (1998). Direct injection determination of theophylline and caffeine in blood serum by high-performance liquid chromatography using an ODS column coated with a zwitterionic bile acid derivative. *Analyst*, 123(8), 1767-1770. doi: 10.1039/a803153c
- Vehovec, T. & Obreza, A. (2010). Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector. *Journal of Chromatography A*, 1217(10), 1549-56. doi: 10.1016/j.chroma.2010.01.007
- Manual för Dionex Corona Ultra RS.