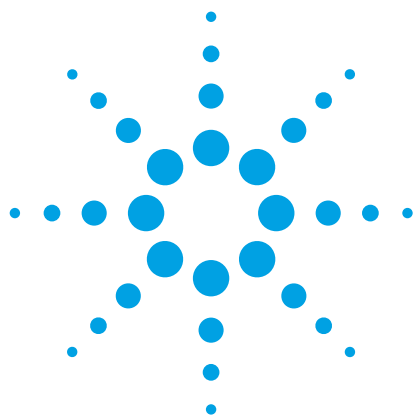




# Estabilidad a pH bajo y alto de una columna Agilent Poroshell HPH C18

## Nota de aplicación

### Autor

William Long  
Agilent Technologies, Inc.

### Introducción

La estabilidad de una columna de cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés) es uno de los factores críticos que determinan el éxito o el fracaso de un método. Durante el desarrollo de un protocolo de análisis de cromatografía de líquidos de fase reversa (RPLC, por sus siglas en inglés), y con vistas a su validación, los cromatografistas habitualmente consideran varios aspectos. Uno de los más importantes es cuánto tiempo soportará la columna un conjunto específico de condiciones de análisis. La sílice posee numerosas propiedades que la convierten en un soporte excelente para columnas HPLC de fase reversa. Sin embargo, su solubilidad aumenta notablemente cuando la fase móvil alcanza un valor de pH entre 7 y 8 o superior. En un estudio de estabilidad de columnas HPLC de sílice a pH alto llevado a cabo en Rockland Technologies se realizaron varios e importantes hallazgos: el proceso de encapsulado protegió la sílice frente a la disolución; las fases densamente ligadas incrementaron la estabilidad de la columna; y el uso de tampones orgánicos en la fase móvil alargó notablemente la vida útil de la columna en comparación con los tampones fosfato a un pH similar. Los estudios han demostrado que la degradación del relleno de la fase ligada a valores de pH entre 9 y 10 se debía principalmente a la disolución del soporte de sílice, y que no la producía principalmente la hidrólisis de los enlaces covalentes de los grupos siloxano. En principio, la estabilidad química y térmica de las columnas de fase reversa puede aumentarse mediante la mejora y el desarrollo de los sustratos y el enlace de la fase estacionaria [1-4].

En términos generales, se recomienda iniciar el desarrollo de métodos de fase reversa con fases móviles de pH bajo, ya sean los analitos ácidos, neutros o básicos. Existen varias buenas razones para aplicar estas directrices: a pH bajo, los analitos ácidos serán neutros y quedarán bien retenidos; y los grupos silanol residuales de la superficie de la sílice del relleno estarán protonados. Por lo tanto, habrá menos interacciones secundarias entre los analitos ácidos y básicos y la superficie de la sílice. Lamentablemente, la retención de los compuestos básicos, que tienen carga positiva a pH bajo, a menudo será baja o dará lugar a una forma de pico deficiente en estas condiciones. Una razón adicional para utilizar un pH bajo es la baja estabilidad de las columnas de sílice a pH alto.



**Agilent Technologies**

Tal como se indicó anteriormente, se han adoptado dos planteamientos para conseguir columnas HPLC de sílice que ofrezcan estabilidad a pH alto. Una forma de aumentar la estabilidad es emplear uniones especiales, como sucede en el caso de la columna Agilent ZORBAX Extend-C18 [3]. En esta columna se utiliza una unión bidentada para proteger la sílice frente a la disolución a pH alto. Otra forma de conseguir estabilidad a pH alto es modificar la propia sílice y hacer que sea menos soluble. Mediante la aplicación de este planteamiento, se han modificado las partículas de las columnas Poroshell de 2,7  $\mu\text{m}$  (y ahora también las de 4  $\mu\text{m}$ ) para hacer que sean menos susceptibles al ataque a pH alto.

En este estudio se evaluó la vida útil de una columna Agilent Poroshell HPH C18 con una fase móvil común de pH alto (ácido trifluoroacético (TFA, por sus siglas en inglés) al 0,1 %) y una fase móvil de pH alto (bicarbonato amónico 10 mM, pH 10), mediante un análisis en gradiente con acetonitrilo.

## Materiales y métodos

Se utilizó un sistema Agilent 1290 Infinity, compuesto por los elementos siguientes:

- Bomba binaria Agilent 1290 Infinity, capaz de proporcionar hasta 1.200 bar (G4220A), modificada con un sello de PEEK en la válvula de derivación de disolvente (sello de rotor de PEEK FL, ref. 5068-0171).
- Compartimento termostatzado para columnas (TCC) Agilent 1290 Infinity (G1316C).
- Inyector automático de alto rendimiento Agilent 1290 Infinity (G4226A) con sello de rotor de PEEK (sello de rotor de PEEK FL, ref. 5068-0170).
- Detector de diodo array (DAD) Agilent 1260 Infinity (G4220A), con una celda de flujo de 10 mm de paso óptico y 1  $\mu\text{l}$  de volumen.
- Para controlar el instrumento HPLC y procesar los datos se utilizó el software Agilent OpenLAB (versión C.01.05).
- Columna Agilent Poroshell HPH C18, 2,1 x 50 mm, 4  $\mu\text{m}$  (ref. 699770-702).

Las muestras contenían quinina, nortriptilina, amitriptilina, hexanofenona, acetofenona, ácido 4-clorocinámico y 2-hidroxi-5-metil-benzaldehído, y se prepararon en agua/acetonitrilo (50:50) hasta obtener una concentración de 1 mg/ml. Se utilizaron fases móviles empleadas habitualmente en los laboratorios, como TFA al 0,1 % y tampón de bicarbonato amónico. El tampón se preparó mediante la disolución de bicarbonato amónico en agua para obtener una solución 10 mM, que después se ajustó con una base concentrada (hidróxido amónico) hasta conseguir el pH deseado. El fosfato de sodio dibásico y el fosfato de sodio monobásico utilizados para preparar los tampones se adquirieron a Sigma-Aldrich, Corp. El acetonitrilo, de la marca Burdick & Jackson, se adquirió a Honeywell, y el agua se procesó con un sistema Millipore hasta obtener una resistencia de 18 M $\Omega$ .

El detector UV se utilizó a 254 nm y 80 Hz.

## Resultados y comentarios

Para la prueba de estabilidad se utilizaron una fase móvil de pH bajo (TFA al 0,1 %) y otra de pH alto (bicarbonato amónico 10 mM, pH 10).

### Estabilidad con TFA al 0,1 %

En el primer experimento, se realizaron 2.000 inyecciones en una columna nueva. Se inyectó cada cuatro minutos una muestra con quinina, fenol, nortriptilina, acetofenona, ácido 4-clorocinámico y hexanofenona. La muestra contenía los compuestos ácidos, básicos y neutros típicos que están presentes en prácticamente todas las muestras complejas. El TFA al 0,1 % (pH 2) es una fase móvil utilizada habitualmente en cromatografía. Como se puede observar, todos los picos quedaron retenidos en el mismo volumen de elución durante todo el experimento. Esto demostró que la columna Poroshell HPH-C18 es estable y puede utilizarse para análisis de rutina a pH bajo (consulte la Figura 1). La forma de pico fue excelente durante toda la prueba. El tiempo de análisis del método fue de aproximadamente siete minutos por inyección; el proceso llevó unos 10 días y se emplearon cerca de 5 l de acetonitrilo y de fase móvil acuosa.

### Estabilidad con bicarbonato amónico 10 mM (pH 10)

Se llevó a cabo un segundo experimento con bicarbonato amónico 10 mM a pH 10 (consulte la Figura 2). Esta fase móvil se utiliza de forma común para columnas híbridas, pero no suele utilizarse para columnas HPLC convencionales de sílice. Asimismo, esta fase móvil ayuda a controlar el pH, dado que posee una buena capacidad reguladora, y permite el uso de la detección por espectrometría de masas (MS), ya que el tampón es volátil. Se ha comprobado que los tampones de carbonato producen daños mucho mayores en las columnas de sílice que otros tampones como la glicina y el borato [5]. Para la prueba de vida útil a pH alto con TFA al 0,1 % se utilizaron los mismos materiales de muestra que en el caso anterior. Una diferencia importante entre ambas pruebas fue el orden de elución. Tal como se muestra en la Figura 3, el cambio de pH de la fase móvil modificó el orden de elución de los analitos, lo que indica una variación drástica de la selectividad.

En este experimento se evaluó una columna Poroshell HPH C18 mediante un método de gradiente con bicarbonato amónico y acetonitrilo a pH 10. Como se puede observar en la Figura 2, el tiempo de retención de todos los compuestos permaneció estable a lo largo del análisis de 2.000 inyecciones, excepto para la nortriptilina. Se han observado resultados similares anteriormente con columnas de otros fabricantes, para las que se obtuvieron peores resultados en cuanto a desplazamiento del pico de la nortriptilina [6].

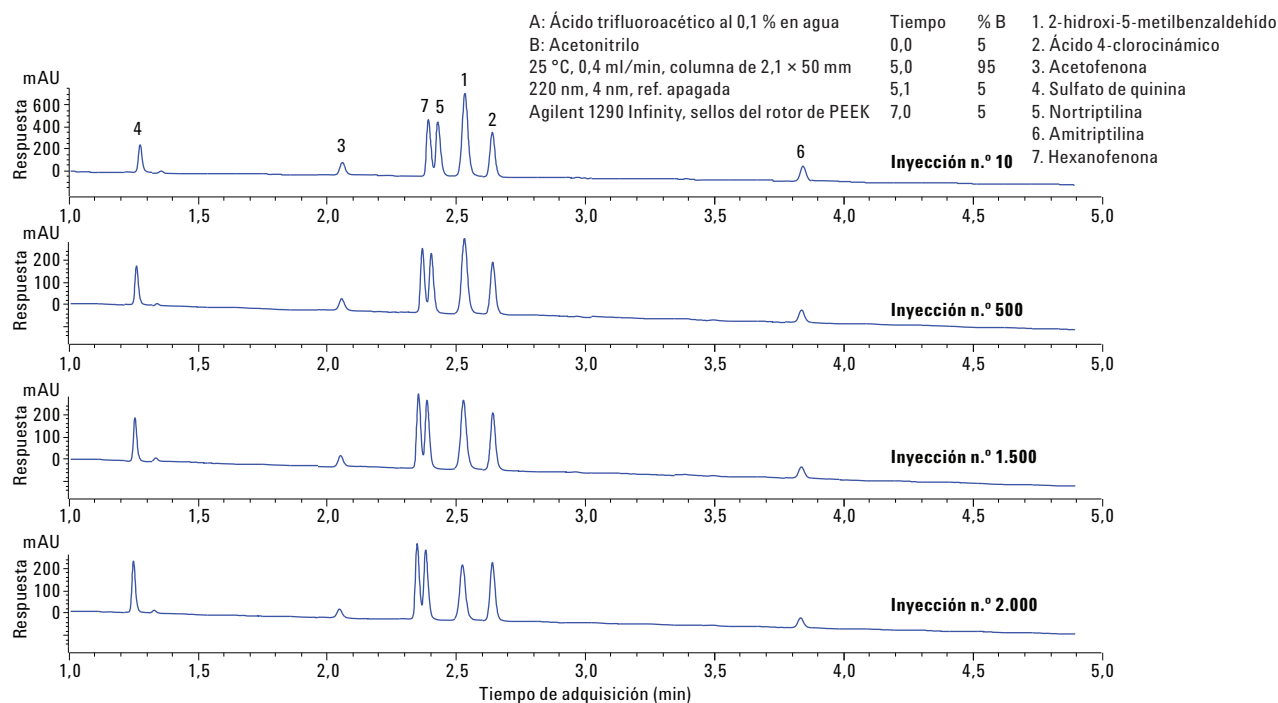


Figura 1. Vida útil de la columna Agilent Poroshell HPH C18 con una fase móvil ácida común (2.000 inyecciones de ácido trifluoroacético al 0,1 %).

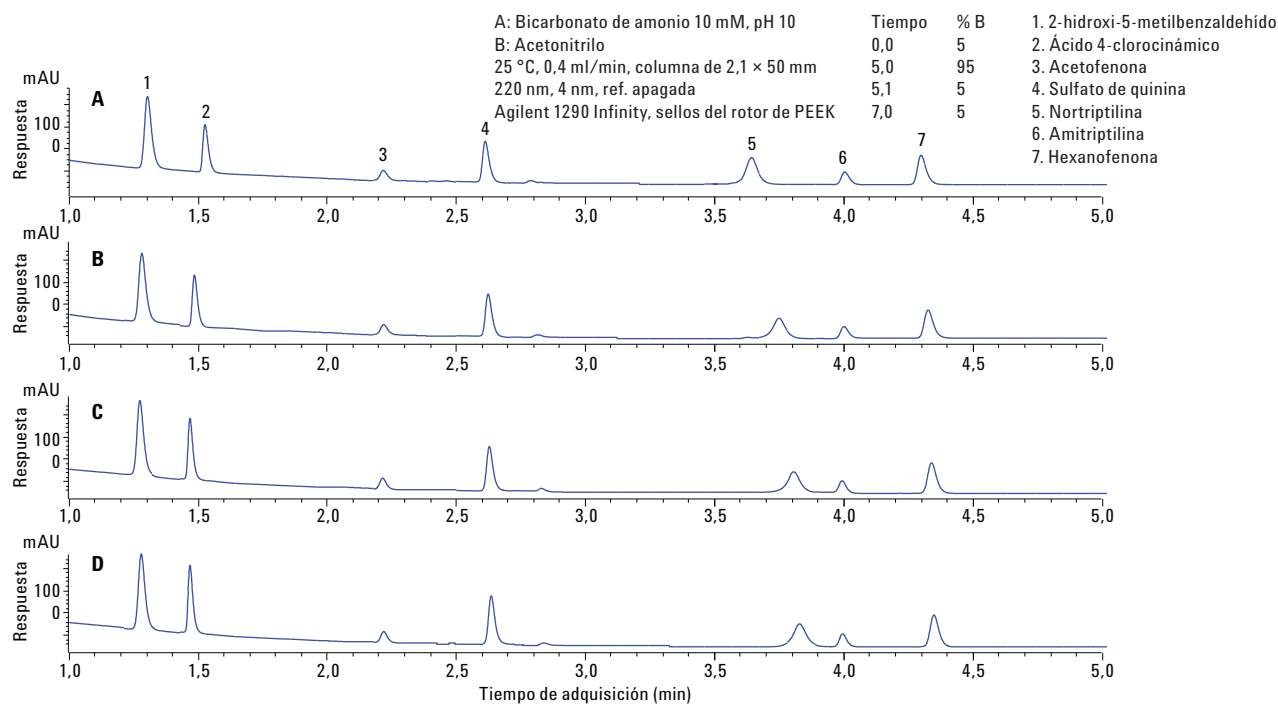


Figura 2. Vida útil de la columna Agilent Poroshell HPH C18 con una fase móvil básica (2.000 inyecciones de bicarbonato amónico 10 mM a pH 10).

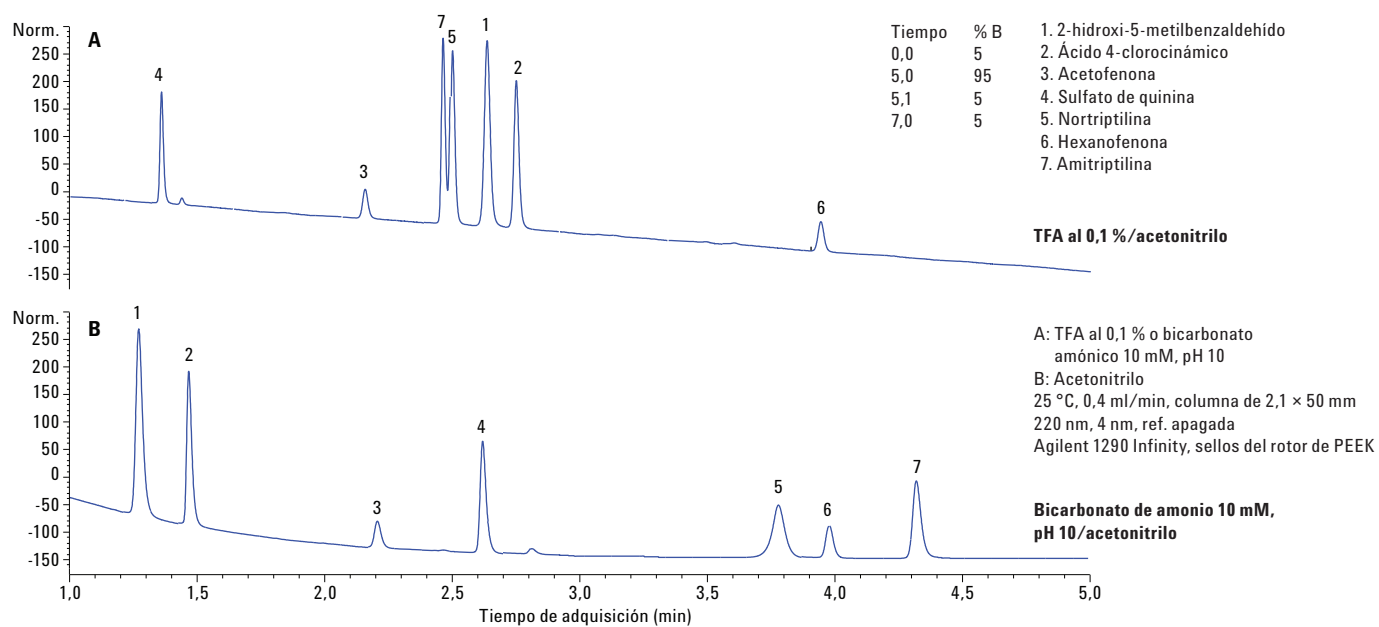


Figura 3. La columna Agilent Poroshell HPH C18 puede utilizarse a pH bajo con TFA al 0,1 % o a pH alto con bicarbonato amónico 10 mM (pH 10) para conseguir selectividades muy variadas.

## Conclusiones

Aunque las fases móviles de pH alto (como el tampón de bicarbonato amónico) pueden ser dañinas para las columnas HPLC convencionales de sílice, la columna Agilent Poroshell HPH C18 ofreció unos resultados excelentes con esta fase móvil. El TFA también puede dañar las columnas HPLC mediante la eliminación de la fase ligada por hidrólisis. Esta tecnología de columna permitirá a los investigadores combinar las capacidades de las partículas híbridas y las partículas superficialmente porosas. Las partículas Poroshell HPH ofrecen el alto rendimiento, la alta eficiencia y la baja retropresión de las partículas superficialmente porosas, como las que se utilizan en otras fases de columnas Poroshell 120. Las columnas Poroshell HPH no solo mantienen las ventajas de las partículas superficialmente porosas, sino que también aportan estabilidad química en fases móviles con valores de pH altos.

## Referencias

1. J. J. Kirkland; J. W. Henderson; J. J. DeStefano; M. A. van Straten; H. A. Claessens. Stability of silica-based, endcapped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **1997**, 762, 97-112.
2. J. J. Kirkland; M. A. van Straten; H. A. Claessens. Stability of silica-based, endcapped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **1995**, 691, 3-19.
3. J. J. Kirkland; J. B. Adams Jr.; M. A. van Straten; H. A. Claessens. Bidentate Silane Stationary Phases for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4344-4352.
4. C. Ye; G. Terfloth; Y. Li, A. Kord. A systematic stability evaluation of analytical RP-HPLC columns. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2009**, 50, 426-431.
5. H. A. Claessens; M. A. van Straten; J. J. Kirkland. Effect of buffers on silica-based column stability in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **1996**, 728, 259-270.
6. W. J. Long. *Extending Column Lifetime in Pharmaceutical Methods with High pH stable Poroshell HPH chemistries*; Agilent Technologies, Inc. Número de publicación 5991-5022EN, **2014**.

## Más información

Estos datos representan resultados típicos. Si desea obtener más información sobre nuestros productos y servicios, visite nuestra página web [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

Agilent no se hace responsable de ningún error incluido en este documento ni de ningún daño incidental o consecuencial relacionado con la distribución, la aplicación o el uso de este material.

La información, las descripciones y las especificaciones de esta publicación están sujetas a modificación sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2015  
Impreso en EE. UU.  
15 de diciembre de 2015  
5991-6525ES



**Agilent Technologies**