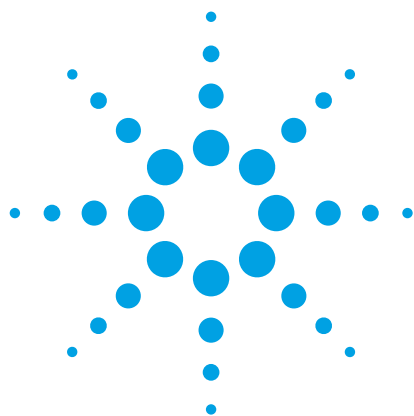




Estabilidade em pH alto e pH baixo de uma Agilent Poroshell HPH C18

Nota de aplicação

Autor

William Long
Agilent Technologies, Inc.

Introdução

A estabilidade de uma coluna de HPLC é um dos fatores determinantes do sucesso de um método. Durante o desenvolvimento de um protocolo de análise de RPLC, e a antecipação de sua validação, os analistas consideram vários problemas. Um dos mais importantes é a duração da coluna em um conjunto específico de condições de análise. A sílica tem muitas propriedades que a tornam um suporte excelente para colunas de HPLC de fase reversa. No entanto, sua solubilidade aumenta bastante quando a fase móvel atinge pH 7-8 ou superior. Em um estudo de estabilidade de coluna de HPLC de sílica em pH alto na Rockland Technologies, foram feitas várias descobertas importantes: o end-capping protegeu a sílica da dissolução, as fases ligadas densamente aumentaram a estabilidade da coluna e os tampões de fase móvel orgânica prolongaram bastante a vida útil da coluna em relação aos tampões de fosfato em pH semelhante. Estudos demonstraram que a degradação do empacotamento da fase ligada em pH 9-10 ocorreu principalmente devido à dissolução do suporte de sílica, e não como resultado da hidrólise de ligações covalentes de siloxano. Em princípio, a estabilidade química e térmica de colunas RP pode ser melhorada através do aprimoramento e desenvolvimento de substratos e da ligação química [1-4].

Geralmente, recomenda-se que o desenvolvimento de métodos de fase reversa comece com fases móveis de pH baixo, sejam os analitos ácidos, neutros ou básicos. Há vários bons motivos para seguir essas orientações. Em pH baixo, analitos ácidos ficarão neutros e bem retidos. Os silanóis residuais na superfície de sílica do empacotamento serão protonados. Portanto, haverá menos interações secundárias entre os analitos ácidos e básicos com a superfície de sílica. Infelizmente, compostos básicos que carregam uma carga positiva em pH baixo, geralmente serão pouco retidos ou apresentarão um formato de pico de qualidade inferior nessas condições. Outro motivo para usar pH baixo é a estabilidade inferior de colunas de sílica em pH alto.



Agilent Technologies

Como relatado anteriormente, duas abordagens foram feitas para atingir estabilidade em pH alto em colunas de sílica para HPLC. Uma forma de aumentar a estabilidade é usar ligação especial, como na coluna Agilent ZORBAX Extend C18 [3]. A ZORBAX Extend C18 usa uma ligação bidentada para proteger a sílica da dissolução em pH alto. Outra forma de obter estabilidade em pH alto é modificar a própria sílica, tornando-a menos solúvel. Nessa abordagem, as partículas Poroshell de 2,7 µm e 4 µm são modificadas organicamente, tornando-as menos suscetíveis ao ataque em pH alto.

Neste trabalho, a vida útil de uma Agilent Poroshell HPH C18 é avaliada com uma fase móvel de pH baixo típica (0,1 % TFA) e uma fase móvel de pH alto (10 mM de bicarbonato de amônio em pH 10) usando análise de gradiente com acetonitrila.

Materiais e métodos

Um sistema Agilent 1290 Infinity foi usado, composto de:

- Bomba binária Agilent 1290 Infinity, capaz de operar até 1.2000 bar (G4220A), modificada com um selo na válvula de desvio do solvente (Selo para rotor PEEK FL p/n 5068-0171)
- Compartimento da coluna termostatizado (TCC) Agilent 1290 Infinity (G1316C)
- Amostrador automático de alto desempenho Agilent 1290 Infinity (G4226A) com selo para rotor PEEK (5068-0170 Selo para rotor PEEK FL)
- Detector de arranjo de diodos (DAD) Agilent 1260 Infinity (G4220A) equipado com uma cela de fluxo de 1 µL com caminho óptico de 10 mm
- O software Agilent OpenLAB, versão C.01.05, foi usado para controlar o HPLC e processar os dados
- Agilent Poroshell HPH-C18, 2,1 × 50 mm, 4 µm (p/n 699770-702)

As amostras continham quinina, nortriptilina, amitriptilina, hexanofenona, acetofenona, 4-ácido clorocinâmico e 2-hidróxi-5-metil-benzaldeído, e foram preparadas na proporção de 50:50 água/acetonitrila a 1 mg/mL. Fases móveis usadas com frequência em laboratórios, como 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA), e tampão de bicarbonato de amônio foram usados. O tampão foi preparado ao dissolver bicarbonato de amônio em água para produzir uma solução 10 mM antes de ajustar ao pH desejado usando uma base concentrada (hidróxido de amônio). O fosfato de sódio dibásico e o fosfato de sódio monobásico usados para produzir tampões foram comprados da Sigma-Aldrich, Corp. A acetonitrila era Burdick e Jackson, comprada da Honeywell, e a água era Millipore.

O detector de UV foi operado a 254 nm, 80 Hz.

Resultados e discussão

O teste de estabilidade foi realizado usando uma fase móvel de pH baixo (0,1% TFA) e uma fase móvel de pH alto (bicarbonato de amônio 10 mM, pH 10).

Estabilidade em 0,1 TFA

Na primeira parte experimental, uma nova coluna foi submetida a 2.000 injeções. Uma amostra contendo quinina, fenol, nortriptilina, acetofenona, 4-ácido clorocinâmico e hexanofenona foi injetada a cada quatro minutos. A amostra continha os tipos de compostos ácidos, básicos e neutros típicos encontrados em quase todas as amostras complexas. TFA a 0,1% é uma fase móvel de cromatografia usada com frequência (pH ~2). Pode ser observado que os picos foram bem retidos no mesmo volume de eluição durante toda a parte experimental, demonstrando que a coluna Poroshell HPH-C18 foi estável e utilizável para a análise de rotina em pH baixo (Figura 1). O formato do pico manteve a qualidade durante todo o teste. O tempo de corrida do método foi de aproximadamente sete minutos por injeção, exigindo cerca de 10 dias e 5 L cada de acetonitrila e fase móvel aquosa.

Estabilidade em bicarbonato de amônio 10 mM, pH 10

Uma segunda parte experimental foi realizada usando bicarbonato de amônio 10 mM em pH 10 (Figura 2). Essa é a fase móvel geralmente usada com colunas híbridas, mas não usadas com frequência com colunas de HPLC de sílica padrão. Essa fase móvel ajuda a controlar o pH porque tem boa capacidade de tamponamento, além de permitir o uso de detecção por MS, uma vez que o tampão é volátil. Foi verificado que os tampões de carbonato danificam muito mais as colunas de sílica do que os tampões de glicina e borato [5]. Os mesmos materiais usados para o teste de 0,1 TFA foram usados como amostra do teste de vida útil em pH alto. Uma grande diferença entre esses dois testes foi a ordem de eluição. Como mostrado na Figura 3, a alteração do pH da fase móvel mudou a ordem de eluição dos analitos, indicando uma grande modificação em seletividade.

Nessa parte experimental, uma coluna Poroshell HPH-C18 foi avaliada com um método de gradiente usando bicarbonato de amônio e acetonitrila em pH 10. Como pode ser visto na Figura 2, o tempo de retenção de todos os componentes permaneceu estável ao longo da corrida de 2.000 injeções, com exceção da nortriptilina. Resultados semelhantes foram relatados anteriormente, com picos inferiores de nortriptilina ocorrendo em colunas de outro fornecedor [6].

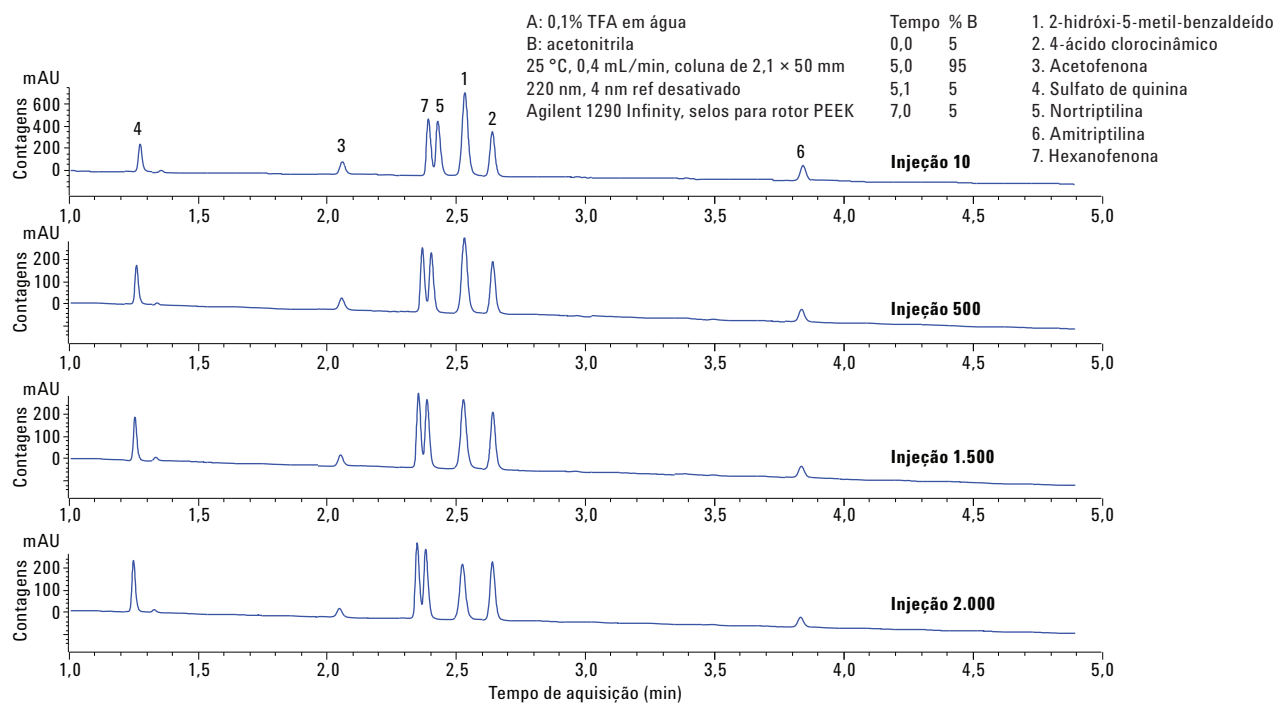


Figura 1. Vida útil da Agilent Poroshell HPH C18 em fase móvel ácida típica, 2.000 injeções de 0,1% TFA.

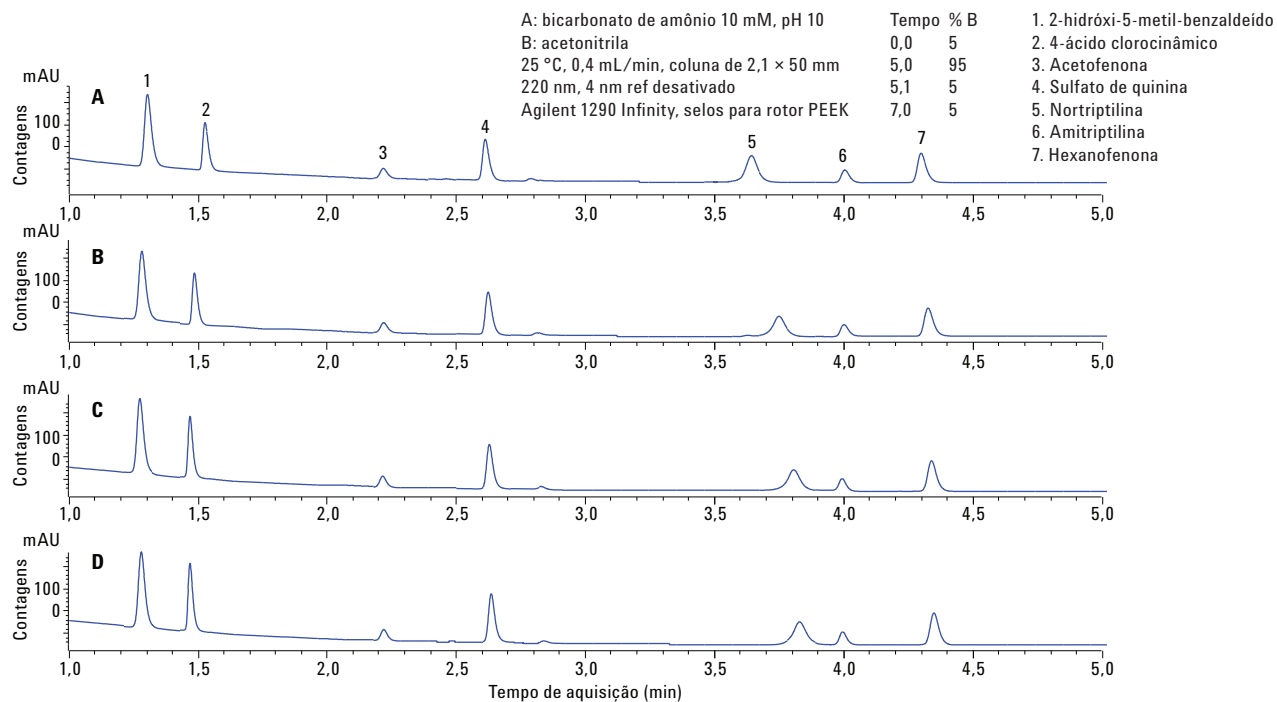


Figura 2. Vida útil da Agilent Poroshell HPH C18 em fase móvel básica, 2.000 injeções de bicarbonato de amônio 10 mM.

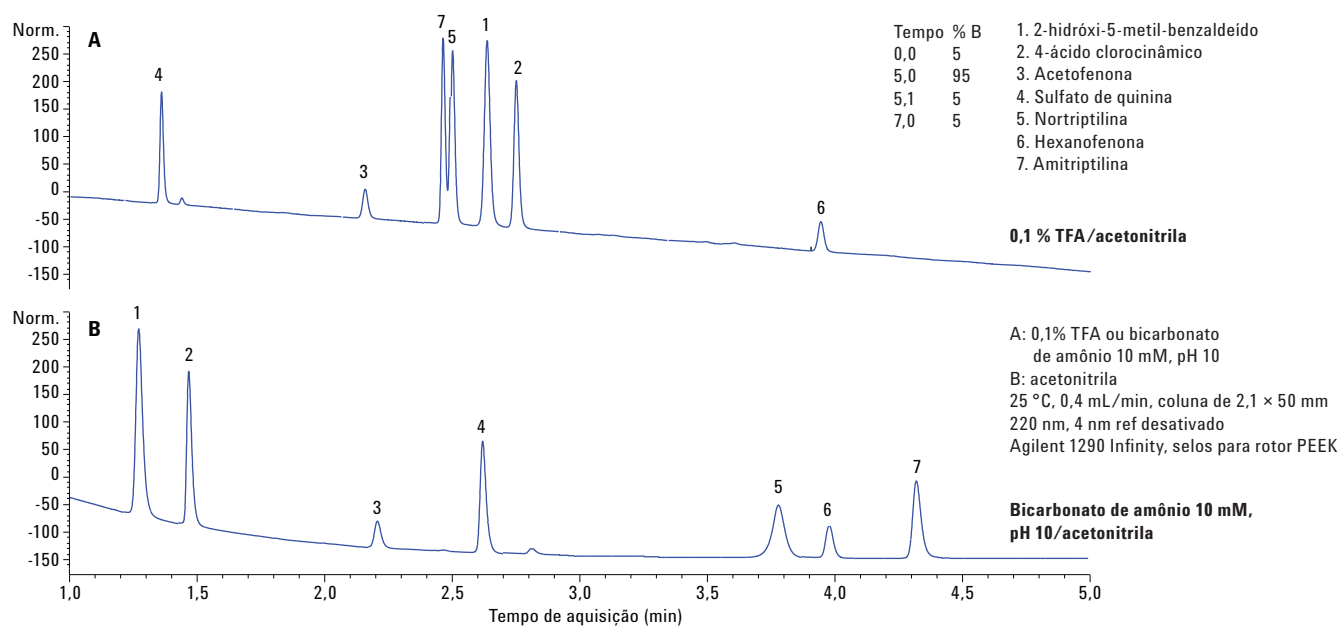


Figura 3. A Agilent Poroshell HPH C18 pode ser usada em pH baixo em 0,1% TFA ou pH alto em bicarbonato de amônio 10 mM em pH 10 para atingir seletividade bem distinta.

Conclusões

Embora as fases móveis de pH elevado, como o tampão de bicarbonato de amônio, possam ser destrutivas para colunas de HPLC de sílica convencionais, a coluna Agilent Poroshell HPH-C18 apresentou um desempenho brilhante nessa fase móvel. O TFA também pode ser destrutivo para colunas de HPLC, pois remove a fase ligada por hidrólise. Essa tecnologia de coluna fará com que os analistas possam usar os recursos de partículas híbridas junto com partículas superficialmente porosas. As partículas Poroshell HPH mantêm alto desempenho com a alta eficiência e a contrapressão baixa de partículas superficialmente porosas, e são usadas em outras fases Poroshell 120. A coluna Poroshell HPH mantém as vantagens de partículas superficialmente porosas, além de oferecer estabilidade química em condições de fase móvel de pH alto.

Referências

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. Terfloeth; 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. Publication number 5991-5022EN, **2014**.

Mais informações

Estes dados representam os resultados típicos. Para obter mais informações sobre nossos produtos e serviços, acesse o site www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

A Agilent Technologies não será responsável por erros contidos neste documento ou por danos incidentais ou consequenciais em relação ao fornecimento, desempenho ou uso deste material.

As informações, descrições e especificações nesta publicação estão sujeitas a mudanças sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
Impresso nos EUA
15 de dezembro de 2015
5991-6525PTBR



Agilent Technologies