APLICAÇÕES

# A Eficácia da Modificação da Fase Estacionária Polar no formato do Pico para Compostos Básicos em Condições Gerais de Fase Reversa – Uma Comparação de Quatro Fases Alquil C18

**Zeshan Aqeel e Ryan Splitstone**
**Phenomenex, 411 Madrid Avenue, Torrance, CA 90501 EUA**

## Visão Geral

### Introdução

A cromatografia de fase reversa é um modo útil para a análise de compostos polares e não polares. No entanto, compostos básicos apresentam desafios únicos no desenvolvimento de métodos em fase reversa devido a interações secundárias não controladas, que podem resultar em problemas de reprodutibilidade e formato de pico. Esses desafios podem ser mitigados pela incorporação de aditivos na fase móvel, como tampões ou reagentes de pareamento iônico. Porém, o aumento da complexidade do método e os problemas de reprodutibilidade relacionados à inclusão de espécies ou iônicas limitam a eficácia e a usabilidade desses aditivos.

Foi observado que, enquanto as fases alquil C18 típicas são propensas a caudas de ou pareamento pico para compostos básicos, as fases C18 que incorporam modificações polares apresentam diferenças nos mecanismos de interação que podem melhorar o formato de pico para esses compostos. No caso da Kinetex PS C18, um grupo funcional polar covalentemente ligado à superfície da sílica ajuda a repelir suavemente compostos básicos que normalmente teriam interações não mitigadas com grupos silanol expostos na superfície de uma fase C18 padrão. Além disso, o grupo funcional polar na superfície da sílica tem o efeito adicional de tornar a fase estável em condições de fase móvel 100% aquosa.[1] Esse benefício das fases alquil polares foi observado em diferentes fases estacionárias com uma variedade de grupos funcionais polares.[2]

Nesse documento, são descritos os detalhes de uma investigação sobre o formato do pico de compostos básicos em quatro diferentes fases estacionárias alquil C18, todas baseadas na mesma morfologia de partícula Core-Shell para HPLC/UHPLC. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito de uma modificação na fase estacionária e, especificamente, o efeito de uma modificação com carga superficial positiva no formato de pico de compostos básicos em condições gerais de fase reversa.

### Experimento

Os padrões analíticos de referência para clorfeniramina foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO). A fase móvel de fase reversa foi composta por água com 0,1% de ácido fórmico como solvente fraco (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico como solvente orgânico forte (B). Os padrões de referência foram preparados em água como diluente nas concentrações de 0,10; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00mg/mL, respectivamente. Um sistema HPLC Agilent 1100 (Santa Clara, CA) equipado com um detector UV-Vis ajustado para um comprimento de onda único de 254 nm e um comprimento de onda de referência de 360 nm foi utilizado neste experimento.

Para investigar o impacto das modificações da fase estacionária na melhoria do formato de pico para compostos básicos em condições gerais de fase reversa, concentrações crescentes de clorfeniramina foram injetadas nas quatro diferentes fases C18 para HPLC/UHPLC. Todas as fases (C18, XB-C18, EVO C18 e PS C18) foram executadas sob as mesmas condições, no mesmo sistema, no mesmo período de tempo e fazem parte da mesma família de partículas Core-Shell Kinetex. As quatro fases Kinetex compartilhavam características comuns, como volume de poros e área superficial (Tabela 1), diferindo apenas pelas modificações secundárias polares na fase estacionária.

**Clorfeniramina**

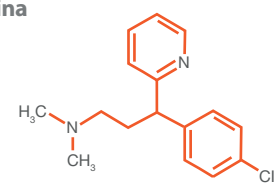



**Tabela 1.**
Características do Material

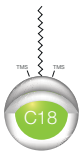
| Fase Estacionária | Tamanhos de Partículas Disponíveis (µm) | Tamanho do Poro (Å) | Área de Superfície Efetiva (m²/g) | Carga de Carbono Efetiva (%) | Estabilidade de pH | Limite de Pressão (bar) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| PS C18 | 2,6 | 100 | 200 | 9 | 1,5 – 8,5* | 1.000/600† |
| EVO C18 | 1,7 - 2,6 - 5 | 100 | 200 | 11 | 1,0 – 12 | 1.000/600† |
| C18 | 1,3 - 1,7 - 2,6 - 5 | 100 | 200 | 12 | 1,5 – 8,5* | 1.000/600† |
| XB-C18 | 1,7 - 2,6 - 5 | 100 | 200 | 10 | 1,5 – 8,5* | 1.000/600† |

* Estabilidade de pH sob condições de Gradiente. A Estabilidade do pH é de 1,5 a 10 em condições Isocráticas.
† Colunas Kinetex de 2,1 mm de diâmetro interno (ID) são estáveis sob pressão de até 1000 bar.
Ao utilizar Kinetex de 1,3 µm ou 1,7 µm, é possível obter um desempenho aprimorado; no entanto, é necessário um equipamento capaz de suportar alta pressão.

## Discussão

A Clorfeniramina foi selecionada como sonda de seletividade para essa investigação devido à sua conhecida problemática no formato do pico sob condições típicas de fase reversa (Figura 1). As quatro fases selecionadas para essa análise pertencem à mesma família de partículas Core-Shell Kinetex e foram escolhidas para comparar o efeito da modificação polar da fase estacionária no formato do pico para compostos básicos.

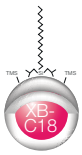
A Kinetex C18 representou a seletividade esperada de uma fase C18 e serviu como controle comparativo para as outras três fases C18 modificadas (Figura 3), especialmente para a fase Kinetex PS C18. **Abaixo estão descrições e representações das quatro diferentes fases Kinetex utilizadas nesta comparação.**



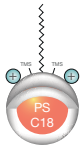

Kinetex C18 de 2,6 µm – uma C18 multiuso com a maior seletividade hidrofóbica das Colunas Kinetex




Kinetex EVO C18 de 2,6 µm – Uma C18 com modificação por enxerto de organossílica, proporcionando estabilidade em pH de 1 a 12.

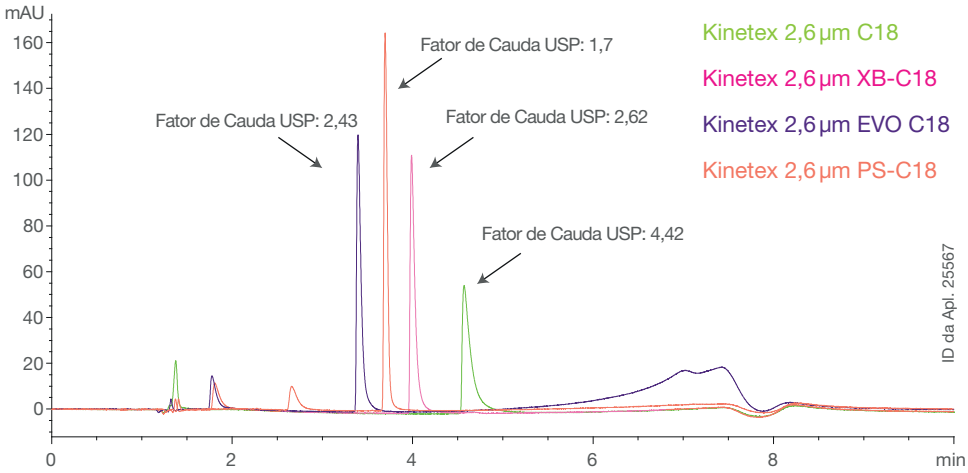



Kinetex XB-C18 de 2,6 µm – Uma C18 modificada com cadeias laterais protetoras de butil para melhor análise de compostos polares.




Kinetex PS C18 de 2,6 µm – Uma C18 com modificação de carga superficial positiva, oferecendo seletividade tanto polar quanto hidrofóbica, estabilidade em condições 100% aquosas e melhor formato de pico para compostos básicos.

**Figura 1.**
Sobreposição de Clorfeniramina na Concentração de 0,10 mg/mL.




**As mesmas condições para todos os Exemplos:**

**Coluna:** Kinetex 2,6 µm C18
Kinetex 2,6 µm XB-C18
Kinetex 2,6 µm EVO C18
Kinetex 2,6 µm PS C18

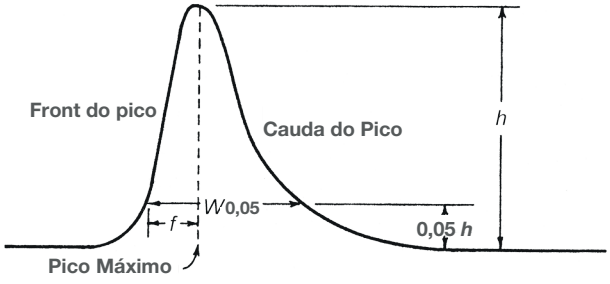
**Dimensões:** 100 x 4,6 mm
**Fase Móvel:** Água com 0,1% de ácido fórmico
Acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico

**Gradiente:**

| Tempo (min) | % B |
|---|---|
| 0 | 10 |
| 6 | 50 |
| 6,01 | 10 |
| 10 | 10 |

**Fluxo:** 1.0 mL/min
**Temperatura:** 25 °C
**Detector:** UV-Vis @ 254 nm
**Amostra** 1. Clorfeniramina

**Figura 2.**
Fator de Cauda USP, <621> Cromatografia**.



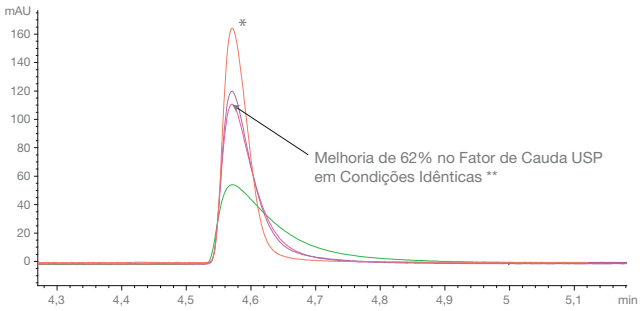

Fator de simetria ($A_S$): Também conhecido como "fator de cauda" de um pico (veja a Figura 4), é calculado por:

$A_S = W_{0,05}/2f$

onde $W_{0,05}$ é a largura do pico a 5% de altura, e f é a distância do máximo do pico até a borda frontal do pico, medida a 5% da altura do pico em relação à linha de base.

** Capítulo Geral <621> "Cromatografia" no Formulário Nacional 35 da Farmacopeia 40 dos Estados Unidos (USP 40-NF 35, Convenção Farmacopeia dos Estados Unidos, Rockville, Maryland, 2017), p. 6.

**Figura 3.**
Sobreposição Ampliada de Clorfeniramina a 0,10 mg/mL - Ajustada para Sobreposição.




Kinetex 2,6 µm C18

Kinetex 2,6 µm XB-C18

Kinetex 2,6 µm EVO C18

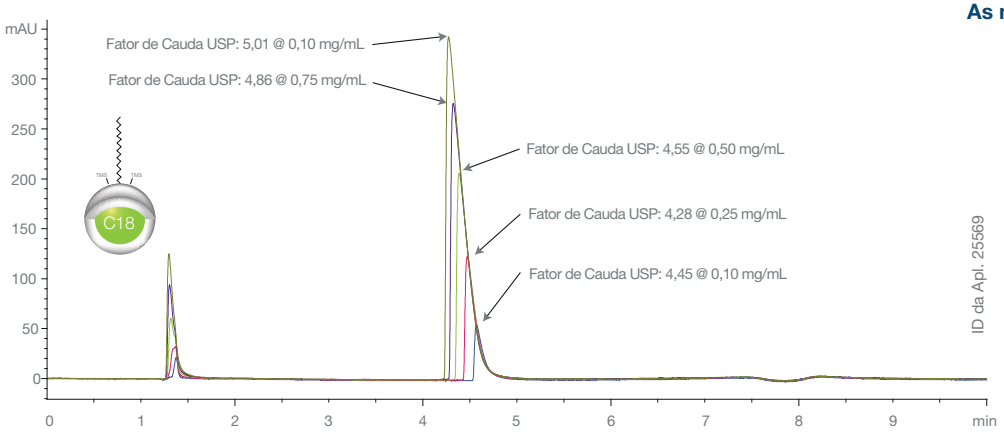
Kinetex 2,6 µm PS-C18

ID da Apl. 25568

* Os tempos de retenção da clorfeniramina variaram em função da seletividade das diferentes fases. Para fins de comparação, os picos foram alinhados em sobreposição nesse exemplo.

** A melhoria no fator de cauda da USP é baseada na comparação com o fator de cauda da Kinetex C18. vs. o fator de cauda da Kinetex PS C18 na concentração referenciada.

**Figura 4.**
Sobreposição de Clorfeniramina (0,10; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mg/mL) no Kinetex C18 de 2,6 µm.




ID da Apl. 25569

**As mesmas condições para todos os Exemplos:**

**Coluna:** Kinetex 2,6 µm C18
Kinetex 2,6 µm XB-C18
Kinetex 2,6 µm EVO C18
Kinetex 2,6 µm PS C18

**Dimensões:** 100 x 4,6 mm

**Fase Móvel:** Água com 0,1% de ácido fórmico
Acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico

**Gradiente:**

| Tempo (min) | % B |
|---|---|
| 0 | 10 |
| 6 | 50 |
| 6,01 | 10 |
| 10 | 10 |

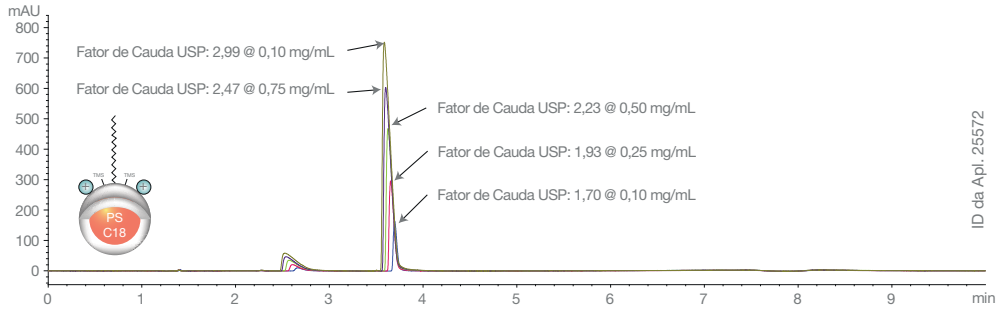
**Fluxo:** 1.0 mL/min

**Temperatura:** 25 °C

**Detector:** UV-Vis @ 254 nm

**Amostra** 1. Clorfeniramina

**Figura 5.**
Sobreposição de Clorfeniramina (0,10; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mg/mL) na Kinetex PS C18 de 2,6um.




ID da Apl. 25572

## Conclusões

Para investigar o efeito de uma modificação com carga superficial positiva no formato do pico de compostos básicos, foram selecionadas quatro diferentes fases estacionárias alquil C18. Todas as fases eram baseadas na mesma morfologia de partícula e diferiam apenas por uma modificação secundária da fase estacionária. Ao simplesmente utilizar a coluna Kinetex PS C18 nas mesmas condições cromatográficas, observou-se uma melhoria de 62% no fator de cauda USP na concentração de 0,10 mg/mL (Figura 2). Essa melhoria no formato do pico foi observada em uma faixa dinâmica de concentrações da clorfeniramina (Figuras 3 e 4).

A incorporação controlada de uma carga superficial positiva na Kinetex PS C18 resultou em um melhor formato de pico para o composto básico polar clorfeniramina, quando comparada a outras fases C18 com a mesma morfologia de partícula e sob as mesmas condições de análise. Portanto, a Kinetex PS C18 é uma coluna classificada como L1 pela USP que oferece uma combinação única de seletividade polar e hidrofóbica, é estável em condições 100% aquosas e demonstra melhoria no formato do pico para compostos básicos.

## Informações para compra de colunas LC Core-Shell da Kinetex®

| Colunas Minibore de 2,6 µm (mm) | | | | | Cartuchos SecurityGuard™ ULTRA ‡ |
|---|---|---|---|---|---|
| **Fases** | **30 x 2,1** | **50 x 2,1** | **100 x 2,1** | **150 x 2,1** | **3/pct** |
| **PS C18** | 00A-4780-AN | 00B-4780-AN | 00D-4780-AN | 00F-4780-AN | AJ0-8951 |

para DI de 2,1 mm

| Colunas MidBore™ de 2,6 µm (mm) | | | | Cartuchos SecurityGuard™ ULTRA ‡ |
|---|---|---|---|---|
| **Fases** | **50 x 3,0** | **100 x 3,0** | **150 x 3,0** | **3/pct** |
| **PS C18** | 00B-4780-Y0 | 00D-4780-Y0 | 00F-4780-Y0 | AJ0-8950 |

para DI de 3,0 mm

| Colunas Analíticas de 2,6 µm (mm) | | | | | Cartuchos SecurityGuard™ ULTRA ‡ |
|---|---|---|---|---|---|
| **Fases** | **50 x 4.6** | **100 x 4.6** | **150 x 4.6** | **250 x 4.6** | **3/pct** |
| **PS C18** | 00B-4780-E0 | 00D-4780-E0 | 00F-4780-E0 | 00G-4780-E0 | AJ0-8949 |

para DI de 4,6 mm

‡‡ Cartuchos SecurityGuard ULTRA requerem suporte, Referência: AJ0-9000

## Referências


1. Sy Do, Lawrence Loo, Ryan Splitstone. Demonstrating the Kinetex PS C18 HPLC/UHPLC Column's Resistance to Dewetting and 100 % Aqueous Stability. www.phenomenex.com. Disponível em: https://www.phenomenex.com/ViewDocumentid=demonstrating+-the+kinetex%C2%AE+ps+c18+hplc_uhplc+column%E2%80%99s+resistance+to+dewetting+and+100%25+aqueous+stability

2. Thomas H. Walter, Pamela Iraneta, Mark Capparella. Mechanism of Retention Loss When C8 and C18 HPLC Columns Are Used with Highly Aqueous Mobile Phases. J. of Chromatogr.A 2005, 1075, 177-183

3. Capítulo Geral <621> "Cromatografia" na Farmacopeia dos Estados Unidos 40 Formulário Nacional 35 (USP 40-NF 35, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, Maryland, 2017), p. 8.