

Selectividades complementarias de fases Kinetex[®] Core-Shell: C18, XB-C18, C8 y PFP

Lawrence Loo, Michael McGinley, Jeff Layne, Terrell Mathews, Ismail Rustamov, Emmet Welch, Mike Chitty y Tivadar Farkas
 Phenomenex, Inc., 411 Madrid Ave., Torrance, CA 90501 USA

La Investigación y desarrollo adicional de Kinetex core-shell, ha dado lugar a la introducción de dos fases adicionales: Kinetex XB-C18 y Kinetex C8. Estas nuevas fases ofrecen selectividades complementarias a las fases Kinetex existentes (C18, PFP e HILIC) y brindan a los analistas soluciones adicionales para separaciones de ultra alto rendimiento, especialmente útiles para componentes básicos y para trabajar con LC/MS.

Introducción

Las partículas Kinetex Core-Shell están diseñadas para ofrecer ultra alto rendimiento cercano a las 300,000 platos por metro y en algunos casos aún más sin rebasar las presiones de operación de los sistemas de HPLC convencionales, con límites de presión de regreso de 400 bar (6,000 PSI).¹ La clave ha sido la utilización de tres diferentes fases, proporcionando más opciones en el desarrollo de métodos. La C18 y PFP ofrecen selectividades complementarias de fase reversa. C18 para separaciones basadas principalmente en las diferencias de hidrofobicidad del analito y la fase PFP basada en el conjunto de selectividades aromáticas, hidrofóbicas y polares. La fase HILIC sílica ofrece una forma de separación ortogonal basada en las diferencias polares entre analitos. Al mismo tiempo que estas fases ofrecen soluciones a un gran número de métodos desarrollados en la industria, se han desarrollado otras fases complementarias para ofrecer más alternativas a las necesidades al analista. La XB-C18, con su unión cruzada del ligando butilo ofrece características de retención diferentes, especialmente para bases a bajo pH. La fase C8 ofrece una alternativa menos hidrofóbica a las fases Kinetex C18 con interacciones secundarias mínimas (debido a un enlace de mayor densidad) proporcionando una mejor forma de pico en analitos particularmente difíciles, como por ejemplo, los metabolitos de medicamentos básicos. Esta nota técnica cubrirá algunas observaciones generales con respecto a la selectividad de las nuevas fases Kinetex, y donde complementan las otras selectividades de Kinetex.

Materiales y métodos

Todos los productos químicos fueron adquiridos en Sigma Chemical (St. Louis, MO) excepto los estándares de referencia USP que fueron adquiridos en USP (Rockville, MD). Los solventes se adquirieron en EMD (San Diego, CA). Las columnas Kinetex de diversas fases (C18, XB-C18, C8, PFP e HILIC) utilizadas fueron de 50 x 2.1 mm ó 100 x 4.6 mm (Phenomenex, Torrance, CA). Todos los análisis se llevaron a cabo en un sistema Agilent 1100 o 1200 HPLC (Palo Alto, CA) con un autosampler, un detector de longitud de onda múltiple y un horno de columna. Las condiciones específicas del método son citadas para cada aplicación.

Resultados y discusión de Kinetex XB-C18 frente a Kinetex C18

Con el ligando C18 butil cruzado en lugar de una unión tradicional del ligando C18, Kinetex XB-C18 ofrece una selectividad única

en comparación a la fase Kinetex C18. Si bien la XB-C18 es una fase ligeramente más hidrofóbica que la fase Kinetex C18, las diferencias de selectividad para los compuestos básicos y ácidos son importantes, especialmente bajo condiciones de fase móvil ácida sin pareo iónico, por ejemplo 0.1 % ácido fórmico. Kinetex XB-C18 tiende a retener menos los compuestos básicos y un poco más los ácidos. Un ejemplo de esto se observa en la **Figura 1** en la cual se utiliza una mezcla de ácidos, bases y componentes neutros para resaltar las diferencias de selectividad al usar gradiente. Cuando se compara Kinetex C18 (**Figura 1A**) con Kinetex XB-C8 (**Figura 1B**), se observa un cambio importante en el orden de elusión en esta mezcla de muestras. Los componentes básicos eluyen mucho antes en la XB-C18 y los componentes ácidos eluyen mucho después. Se cree que esto se debe a la diferencias en las interacciones de los silanoles entre el ligando C18 butil cruzado con impedimento estérico comparado con el enlace C18 tradicional. El aumento de la retención en base a silanol en la fase Kinetex C18 indicaría que la fase tiene una mayor selectividad para componentes básicos, especialmente cuando se utilizan búfers con base de TFA. Para aplicaciones en las cuales se utiliza ácido fórmico (por ej.: condiciones LC/MS), Kinetex XB-C18 sería el inicio para lograr una forma de pico mejorado y una menor retención del compuesto básico. Sin embargo, dichas reglas no son estrictas, como se muestra en las **Figuras 2A y 2B** cuando se observa una mezcla esteroideal. En este caso, aunque no hay componentes básicos presentes, se observan diferencias de orden de elusión entre las fases Kinetex C18 y Kinetex XB-C18. Mientras se podrían explicar los cambios en el pico 21 del acetato de cortisona que se deben a que siendo un ester, los cambios en el 21-hidroxiprogesterona y estrona apuntan a otro mecanismo afectando las diferencias de selectividad entre las fases. Finalmente, ambas fases poseen selectividades complementarias y únicas que hace que sean columnas muy útiles para el desarrollo de método.

Kinetex C8

Mientras la mayoría considera que la fase C8 es una versión menos hidrofóbica de una fase C18, las diferencias en selectividad entre Kinetex C18 y Kinetex C8 demuestra que eso no es correcto. La fase Kinetex C8 ofrece a los usuarios la oportunidad de actualizar sus métodos USP que usa columnas completamente porosas utilizando columnas de partícula core-shell de alta productividad y alto rendimiento. Además, cuando se observa una mezcla farmacéutica analizada con Kinetex C8 (**Figura 3**), se observa inmediatamente que la selectividad de fase no solo hay una disminución de hidrofobicidad en comparación a la fase Kinetex C18. Los componentes básicos cambian en comparación a analitos neutros y ácidos; aunque no son tan drásticos como la comparación entre la XB-C18 y la C18, estos cambios brindan una selectividad de la Kinetex C8 que se encuentra "en el medio" en comparación con las otras fases. Esta selectividad única hace que Kinetex C8 sea una alternativa adicional en la selección de columnas para desarrollo de métodos, especialmente para quien esté buscando actualizar un método USP existente usando una columna L7. Cuando se observan métodos reales, la fase

TN-1088

APLICACIONES

Figura 1A.
Mezcla farmacéutica en columna Kinetex® 2.6 µm C18

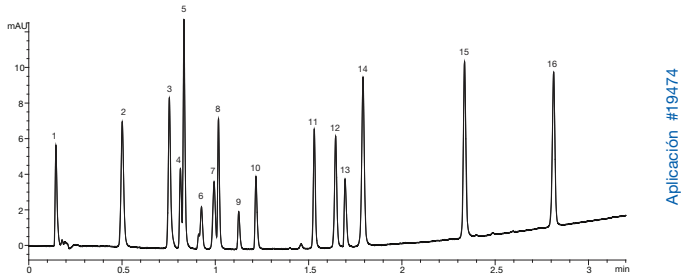
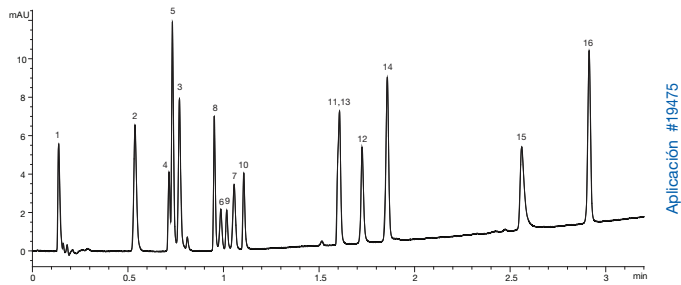


Figura 1B.
Mezcla farmacéutica en columna Kinetex 2.6µm XB-C18



Columna: Como se observa
Dimensiones: 50 x 2.1 mm
Fase móvil: A: 0.1 % Ácido fórmico en Agua
 B: 0.1 % Ácido fórmico en Acetonitrilo
Gradiente:

Tiempo (min)	% B
0	5
0.2	5
4	95

Flujo: 0.8 mL/min
Temperatura: Ambiente
Detección: UV a 254 nm
Muestra:

- | | |
|----------------------|------------------------------------|
| 1. Piridina | 9. Clorfeniramina |
| 2. Acetaminofeno | 10. Triprolidina |
| 3. Sulfatiazol | 11. Prednisolona |
| 4. Pindolol | 12. 3-Metil, 4-ácido nitrobenzóico |
| 5. Quinidina | 13. Nortriptilina |
| 6. Alcohol bencílico | 14. 2-Hidroxi, 5-metilbenzaldehído |
| 7. Fenol | 15. Diflunisal |
| 8. Acebutolol | 16. Hexanofenona |

Observe la retención reducida de componentes básicos en la columna Kinetex XB-C18 contra la columna Kinetex C18. La selectividad diferente de las dos fases hace que sean complementarias para un panel de columna de desarrollo de método.

Figura 2A.
Mezcla esteroidal en columna Kinetex 2.6 µm C18

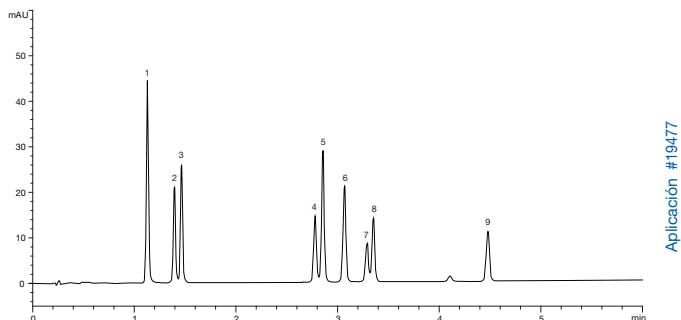
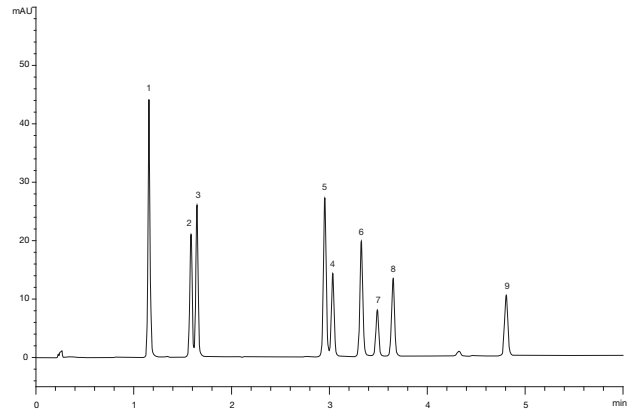


Figura 2B.
Mezcla esteroidal en columna Kinetex 2.6 µm XB-C18



Columna: Como se observa

Dimensiones: 50 x 2.1 mm

Fase móvil: A: Agua

B: Acetonitrilo

Gradiente:

Tiempo (min)	% B
0	20
6	60

Flujo: 0.5 mL/min

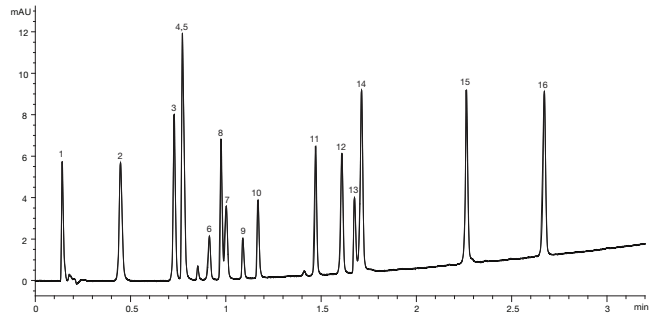
Temperatura: Ambiente

Detección: UV a 220 nm

Muestra:

- | | |
|----------------------------|---------------------------|
| 1. Estríol | 6. 21-Hidroxiprogesterona |
| 2. Hidrocortisona | 7. Estrona |
| 3. Cortisona | 8. 17-Hidroxiprogesterona |
| 4. 21 Acetato de cortisona | 9. Deoxicorticosterona |
| 5. Estradiol | |

Figura 3.
Mezcla farmacéutica en la Kinetex 2.6 µm C8



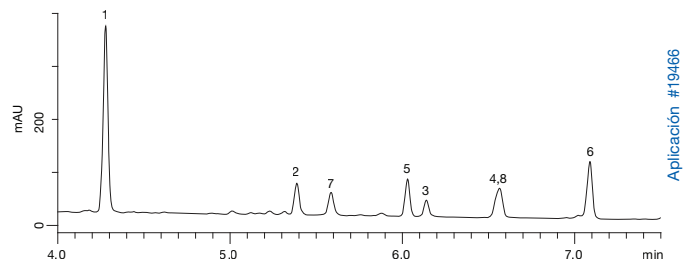
Observe la total reducción en la retención de muchos analitos en la columna Kinetex C8. Observe además que la selectividad para componentes básicos indica que Kinetex C8 presenta una buena selectividad intermedia entre la Kinetex C18 y la Kinetex XB-C18. Vea la **Figura 1** para conocer las condiciones de operación.

TN-1088

APLICACIONES

Figura 4A.

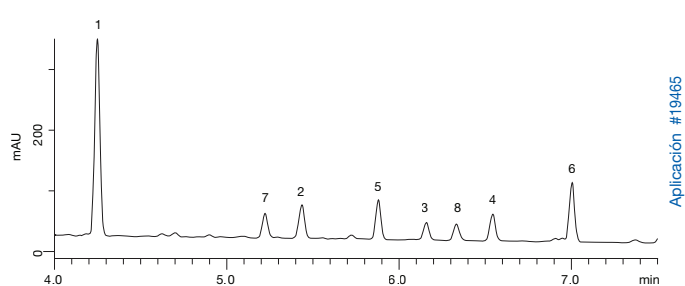
Medicamentos veterinarios en la orina de caballo en Kinetex® 2.6 µm C18



Aplicación #19466

Figura 4B.

Medicamentos veterinarios en la orina de caballo en Kinetex 2.6 µm C8



Aplicación #19465

Columna: Como se observa
Dimensiones: 100 x 4.6 mm
Fase móvil: A: 0.1 % de Ácido fosfórico en Agua
B: 0.1 % de Ácido fosfórico en Acetonitrilo
Gradiente:

Tiempo (min)	% B
0	30
4	50
7.5	70
9	95
10	30

Flujo: 1.5 mL/min

Temperatura: 25 °C

Detección: UV a 230 nm

Muestra:

1. Naproxeno	5. Indometacina
2. Fenoprofeno	6. Ácido meclufenámico
3. Ibuprofeno	7. Impureza de la matriz
4. Fenilbutazona	8. Impureza máxima

Observe la total reducción en la retención de muchos analitos en la columna Kinetex C8. Observe también como la selectividad para componentes básicos de Kinetex C8 hace que sea una buena alternativa en selectividad intermedia entre Kinetex C18 y Kinetex XB-C18, y primera elección para esta aplicación debido a su habilidad de resolver contaminantes en la matriz del analito.

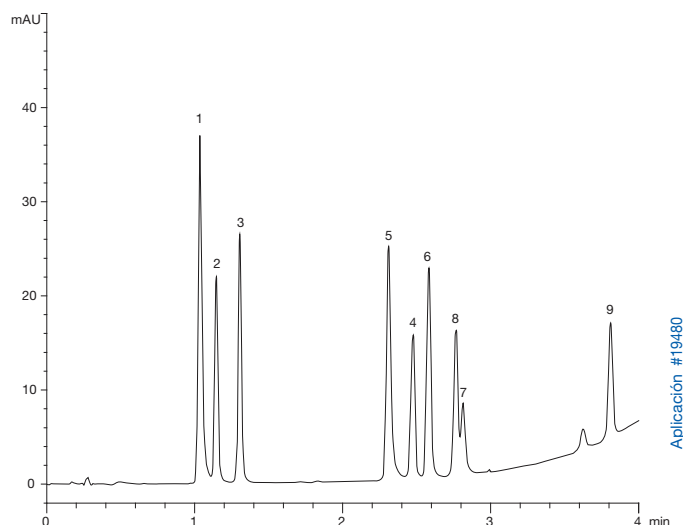
C8 puede ser una excelente elección, como puede observarse en las **Figuras 4A y 4B** en las cuales se analizan medicamentos veterinarios en la orina de caballo. En estas aplicaciones, usando también Kinetex C18 y XB-C18, algunos contaminantes de la orina co-emigran con los picos del analito en el cromatograma (**Figura 4A**). Sin embargo, cuando se utiliza Kinetex C8, todos los picos del analito son resueltos fácilmente en la matriz de los contaminantes. Dichos resultados muestran la utilidad de la fase Kinetex C8 cuya selectividad única, debe ser considerada en el desarrollo de métodos.

Relación de las fases XB-C18 y C8 con otras fases Kinetex

Además de las diferencias de selectividad entre Kinetex C18, XB-C18 y C8, Kinetex PFP también es una herramienta necesaria para muchos desarrolladores de métodos. La fase

Figura 5.

Mezcla esteroide en columna Kinetex 2.6 µm PFP



Aplicación #19480

Observe la selectividad significativamente diferente para varios compuestos a través del cromatograma (comparado con Figuras 2A y 2B). Dicha diferencia de selectividad ofrece la posibilidad de utilizar una fase estacionaria diferente para mejorar la resolución entre componentes con elusión muy próxima en una mezcla. Vea la **Figura 2** para conocer las condiciones de operación.

PFP es tanto aromática como polar y ofrece una selectividad única comparada con todas las otras fases de base puramente alquil. Un ejemplo de dicha diferencia de selectividad se demuestra en la **Figura 5** cuando se observa la mezcla esteroide en la columna Kinetex PFP. En este caso, las diferencias de selectividad se muestran a través de todo el cromatograma (por ejemplo, picos 2, 3, 4 y 5). El orden de elusión podría modificarse con metanol como fase móvil orgánica en sustitución del acetonitrilo, aumentando así la influencia de las interacciones aromáticas.² Finalmente, las características de los analitos, tales como basicidad, polaridad y aromaticidad deberán evaluarse primero antes de seleccionar una columna para HPLC considerando que existen otras fases alternativas para optimizar una separación.

Conclusión

Con las nuevas fases XB-C18 y C8, las columnas Kinetex core-shell para HPLC ofrecen soluciones adicionales para el desarrollo de separaciones optimizadas de ultra alto rendimiento. La consideración en la composición del analito, así como de las condiciones de la fase móvil, en función del tipo de análisis requerido (LC/UV contra LC/MS), permitirá efectuar una buena selección de la fase, ya que existen otras fases para resolver un compuesto clave en una muestra.

Referencias

1. Phenomenex Technical Note TN-1058 *Increased Efficiency and Resolution with Kinetex Core-Shell Technology*
2. Phenomenex Technical Note TN-1029 *Using Aromatic Selectivity with Gemini C6-Phenyl for Difficult Separations*

Alemania

t: 06021-58830-0
f: 06021-58830-11
anfrage@phenomenex.com

Australia

t: 02-9428-6444
f: 02-9428-6445
auinfo@phenomenex.com

Austria

t: 01-319-1301
f: 01-319-1300
anfrage@phenomenex.com

Bélgica

t: +31 (0)30-2418700
f: +31 (0)30-2383749
beinfo@phenomenex.com

Canada

t: (800) 543-3681
f: (310) 328-7768
info@phenomenex.com

Dinamarca

t: 4824 8048
f: 4810 6265
nordicinfo@phenomenex.com

Finlandia

t: +358 (0)9 4789 0063
f: +45 4810 6265
nordicinfo@phenomenex.com

Francia

t: 01 30 09 21 10
f: 01 30 09 21 11
franceinfo@phenomenex.com

Irlanda

t: 01 247 5405
f: +44 1625-501796
eireinfo@phenomenex.com

Italia

t: 051 6327511
f: 051 6327555
italiainfo@phenomenex.com

Luxemburgo

t: +31 (0)30-2418700
f: +31 (0)30-2383749
nlinfo@phenomenex.com

México

t: 001-800-844-5226
f: 001-310-328-7768
tecnicomx@phenomenex.com

Noruega

t: +47 810 02 005
f: +45 4810 6265
nordicinfo@phenomenex.com

Nueva Zelanda

t: 09-4780951
f: 09-4780952
nzinfo@phenomenex.com

Países Bajos

t: 030-2418700
f: 030-2383749
nlinfo@phenomenex.com

Puerto Rico

t: (800) 541-HPLC
f: (310) 328-7768
info@phenomenex.com

Reino Unido

t: 01625-501367
f: 01625-501796
ukinfo@phenomenex.com

Todos los demás países:
Oficinas Corporativas en USA

t: (310) 212-0555
f: (310) 328-7768
info@phenomenex.com

Información de Kinetex® para ordenar

2.6 µm Columnas analíticas (mm)

	30 x 4.6	50 x 4.6	75 x 4.6	100 x 4.6	150 x 4.6	Filtro KrudKatcher™ Ultra In-line*
XB-C18	—	00B-4496-E0	00C-4496-E0	00D-4496-E0	00F-4496-E0	AF0-8497
C18	00A-4462-E0	00B-4462-E0	00C-4462-E0	00D-4462-E0	00F-4462-E0	AF0-8497
C8	—	00B-4497-E0	00C-4497-E0	00D-4497-E0	00F-4497-E0	AF0-8497
PFP	00A-4477-E0	00B-4477-E0	00C-4477-E0	00D-4477-E0	00F-4477-E0	AF0-8497
HILIC	—	00B-4461-E0	00C-4461-E0	00D-4461-E0	00F-4461-E0	AF0-8497

Columnas MidBore™ (mm) de 2.6 µm

	30 x 3.0	50 x 3.0	75 x 3.0	100 x 3.0	150 x 3.0	Filtro KrudKatcher Ultra In-line*
XB-C18	00A-4496-Y0	00B-4496-Y0	00C-4496-Y0	00D-4496-Y0	—	AF0-8497
C18	00A-4462-Y0	00B-4462-Y0	00C-4462-Y0	00D-4462-Y0	00F-4462-Y0	AF0-8497
C8	—	00B-4497-Y0	00C-4497-Y0	00D-4497-Y0	—	AF0-8497
PFP	00A-4477-Y0	00B-4477-Y0	00C-4477-Y0	00D-4477-Y0	00F-4477-Y0	AF0-8497
HILIC	00A-4461-Y0	—	—	—	00F-4461-Y0	AF0-8497

Columnas Minibore (mm) de 2.6 µm

	30 x 2.1	50 x 2.1	100 x 2.1	150 x 2.1	Filtro KrudKatcher Ultra In-line*
XB-C18	00A-4496-AN	00B-4496-AN	00D-4496-AN	00F-4496-AN	AF0-8497
C18	00A-4462-AN	00B-4462-AN	00D-4462-AN	00F-4462-AN	AF0-8497
C8	00A-4497-AN	00B-4497-AN	00D-4497-AN	00F-4497-AN	AF0-8497
PFP	00A-4477-AN	00B-4477-AN	00D-4477-AN	00F-4477-AN	AF0-8497
HILIC	—	00B-4461-AN	00D-4461-AN	00F-4461-AN	AF0-8497

*KrudKatcher Ultra requiere una llave de 5/16 pulgadas. La llave no está incluida.

Columnas Minibore (mm) de 1.7 µm

	50 x 2.1	100 x 2.1	150 x 2.1	Filtro KrudKatcher Ultra In-line*
XB-C18	00B-4498-AN	00D-4498-AN	—	AF0-8497
C18	00B-4475-AN	00D-4475-AN	00F-4475-AN	AF0-8497
C8	00B-4499-AN	00D-4499-AN	—	AF0-8497
PFP	00B-4476-AN	00D-4476-AN	00F-4476-AN	AF0-8497
HILIC	00B-4474-AN	—	—	AF0-8497

KrudKatcher Ultra requiere una llave de 5/16 pulgadas. La llave no está incluida.

**UHPLC / HPLC Sure-Lok™ High Pressure PEEK™
acoplamientos de tuerca macho**

No.de parte	Descripción	Unidad
AQ0-8503	Sure-Lok High Pressure PEEK 1-Pc Rosca 10-32, para 1/16 pulgadas. Tubos, 12,000 psi (827 baro)	10/paq.
AQ0-8530	Herramienta	c/u



Si los productos Phenomenex de este folleto técnico no ofrecen al menos una separación equivalente a la de otros productos de la misma dimensión y fase, devuelva el producto con datos comparativos dentro de los 45 días para obtener un REEMBOLSO TOTAL.

Términos y Condiciones

Sujeto a los Términos y Condiciones estándares de Phenomenex disponibles en <http://www.phenomenex.com/TermsAndConditions>.

Marcas registradas

Phenomenex y Kinetex son marcas comerciales registradas de Phenomenex en los Estados Unidos de America, la Union Europea y otras Jurisdicciones. KrudKatcher, MidBore y Sure-Lok son marcas comerciales de Phenomenex, Inc. Peek es una marca comercial de Victrex plc.

Límite de Responsabilidad

Es posible que las separaciones comparativas no sean representativas de todas las aplicaciones.

No se permite la copia ni la reutilización de esta información sin autorización por escrito de Phenomenex.

© 2011 Phenomenex, Inc. Todos los derechos reservados.

www.phenomenex.com

Los productos Phenomenex están disponibles en todo el mundo. Parar el distribuidor en su país, contacte al Departamento Internacional de Phenomenex USA, en: international@phenomenex.com